

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6857028号
(P6857028)

(45) 発行日 令和3年4月14日(2021.4.14)

(24) 登録日 令和3年3月23日(2021.3.23)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18

請求項の数 25 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-515328 (P2016-515328)	(73) 特許権者	500213834
(86) (22) 出願日	平成26年3月17日 (2014.3.17)		メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター
(65) 公表番号	特表2017-503472 (P2017-503472A)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
(43) 公表日	平成29年2月2日 (2017.2.2)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/030671	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02015/142314		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成27年9月24日 (2015.9.24)	(74) 代理人	100113413
審査請求日	平成29年3月15日 (2017.3.15)		弁理士 森下 夏樹
審判番号	不服2019-8289 (P2019-8289/J1)	(72) 発明者	フェドロフ, ビクター ディー.
審判請求日	令和1年6月21日 (2019.6.21)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1230, ボックス 15
(31) 優先権主張番号	61/802, 118		
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫治療のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T細胞であって、

1) 第1の抗原と結合する抗原認識レセプターであって、ここで該第1の抗原への該抗原認識レセプターの結合は、該T細胞を活性化する、抗原認識レセプター、および

2) a) 免疫阻害性レセプターの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、b) 第2の抗原と結合する阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)であって、ここで該第2の抗原への該iCARの結合は、該T細胞を阻害し、ここで、該第2の抗原は、移植片対宿主病(GVHD)標的組織に存在するが標的化悪性腫瘍には存在しない細胞表面抗原であり、該第2の抗原はヒト白血球抗原(HLA)である、阻害性キメラ抗原レセプター、を含む、T細胞。

【請求項 2】

前記第1の抗原は、腫瘍抗原を含む、請求項1に記載のT細胞。

【請求項 3】

前記iCARは、組換え発現される、請求項1または2に記載のT細胞。

【請求項 4】

前記iCARは、ベクターから発現される、および/または前記抗原認識レセプターは、ベクターから発現される、請求項1または2に記載のT細胞。

【請求項 5】

前記抗原認識レセプターは、T細胞レセプター(TCR)もしくはキメラ抗原レセプター

(CAR)である、請求項1～4のいずれか1項に記載のT細胞。

【請求項6】

(a)前記抗原認識レセプターは、外因性である、

(b)前記抗原認識レセプターは、内因性である、もしくは

(c)前記抗原認識レセプターは、組換え発現される、請求項1～5のいずれか1項に記載のT細胞。

【請求項7】

前記T細胞は、自己由来もしくは非自己由来である、請求項1～6のいずれか1項に記載のT細胞。

【請求項8】

前記第1の抗原は、CD19、CAIX、CEA、CD5、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、Erb-B2、Erb-B3、Erb-B4、FBP、胎児型アセチルコリンレセプター、葉酸レセプター、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-2、-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、Muc-1、Muc-16、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、癌胎児抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、およびWT-1からなる群より選択される腫瘍抗原である、請求項1～7のいずれか1項に記載のT細胞。

【請求項9】

前記第1の抗原は、CD19、PSMA、メソテリン、およびCD56からなる群より選択される、請求項8に記載のT細胞。

【請求項10】

前記免疫阻害性レセプターは、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、およびBTLAからなる群より選択される、請求項1～9のいずれか1項に記載のT細胞。

【請求項11】

前記iCARは、CD4ポリペプチド、CD8ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの膜貫通ドメインをさらに含む、請求項10に記載のT細胞。

【請求項12】

前記iCARは、Fab、scFv、リガンド、特異的リガンド、もしくは多価リガンドをさらに含む、請求項1～11のいずれか1項に記載のT細胞。

【請求項13】

前記抗原認識レセプターは、キメラ抗原レセプターを含む、請求項1～12のいずれか1項に記載のT細胞。

【請求項14】

被験体における腫瘍量もしくは腫瘍サイズを低減するための、新生物を有する被験体の生存を増進するための、または被験体における移植片対宿主病を低減するための組成物であって、該組成物は、請求項1～13のいずれか1項に記載のT細胞を含む、組成物。

【請求項15】

前記新生物は、血液の癌、B細胞白血病、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、および肉腫、ならびに急性骨髄性白血病(AML)からなる群より選択される、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

T細胞を生産するための方法であって、該方法は、

第1の抗原と結合する抗原認識レセプターをコードする配列を含む核酸をT細胞に導入する工程であって、ここで、該第1の抗原への該抗原認識レセプターの結合は、該T細胞

10

20

30

40

50

を活性化する、工程、および

a) 免疫阻害性レセプターの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、b) 移植片対宿主病 (GVHD) 標的組織に存在するが標的化悪性腫瘍には存在しない細胞表面抗原である第2の抗原と結合する阻害性キメラ抗原レセプター (iCAR) をコードする配列を含む核酸を該T細胞に導入する工程であって、ここで該第2の抗原はヒト白血球抗原 (HLA) であり、該第2の抗原への該iCARの結合は、該T細胞を阻害する、工程を含む、方法。

【請求項17】

ベクターであって、

(a) 第1の抗原に結合するキメラ抗原レセプター (CAR) をコードする核酸配列であって、ここで該第1の抗原への該CARの結合は、該ベクターを含むT細胞を活性化する、核酸配列、ならびに (b) i) 免疫阻害性レセプターの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、ii) 移植片対宿主病 (GVHD) 標的組織に存在するが標的化悪性腫瘍には存在しない細胞表面抗原である第2の抗原に結合する阻害性キメラ抗原レセプター (iCAR) をコードする核酸配列であって、ここで該第2の抗原はヒト白血球抗原 (HLA) であり、該第2の抗原への該iCARの結合は、該ベクターを含むT細胞を阻害する、核酸配列、を含むベクター。

10

【請求項18】

組成物であって、該組成物は、

(a) 第1の抗原に結合するキメラ抗原レセプター (CAR) をコードする配列を含む核酸、および

20

(b) i) 免疫阻害性レセプターの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、ii) 移植片対宿主病 (GVHD) 標的組織に存在するが標的化悪性腫瘍には存在しない細胞表面抗原である第2の抗原に結合する阻害性キメラ抗原レセプター (iCAR) をコードする配列を含む核酸であって、第2の抗原はヒト白血球抗原 (HLA) である核酸、

を含み、

該第1の抗原への該CARの結合は、該組成物を含み該CAR及び該iCARを発現するT細胞を活性化する、および、

該第2の抗原への該iCARの結合は、該T細胞を阻害する、ことを特徴とする組成物。

【請求項19】

請求項17に記載のベクターを含む、または請求項18に記載の組成物を含み、前記CAR及び前記iCARを発現するT細胞。

30

【請求項20】

請求項1～13および19のいずれか1項に記載のT細胞の有効量、および薬学的に受容可能な賦形剤を含む、薬学的組成物。

【請求項21】

被験体における移植片対白血病応答および/もしくは移植片対腫瘍応答を調節するための組成物であって、該組成物は、T細胞を含み、該T細胞は、該被験体に同種異系であり、かつ阻害性キメラ抗原レセプター (iCAR) を含み、該iCARが、a) 免疫阻害性レセプターの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、b) 移植片対宿主病 (GVHD) 標的組織に存在するが標的化悪性腫瘍には存在しない細胞表面抗原に結合し、ここで該細胞表面抗原は該被験体由来のヒト白血球抗原 (HLA) であり、該細胞表面抗原への該iCARの結合が該同種異系T細胞を阻害する、組成物。

40

【請求項22】

前記同種異系細胞は、内因性T細胞レセプターを含む、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

前記被験体は、転移性乳癌、血液系悪性腫瘍、もしくは固形腫瘍を有し、前記ヒト白血球抗原 (HLA) は、HLA-Iである、請求項21に記載の組成物。

【請求項24】

前記細胞表面抗原への前記iCARの結合は、前記細胞表面抗原を含む細胞の細胞死を減

50

少させる、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記組成物は、前記被験体における移植片対宿主病（GVHD）、もしくはその症状を低下させる、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（優先権の主張）

本出願は、2013年3月15日に出願された米国仮特許出願第61/802,118号の優先権を主張し、当該出願の内容はその全体が本明細書に参考として援用される。

【0002】

（導入）

本発明は、第1の抗原と結合抗原と結合する抗原認識レセプターおよび第2の抗原と結合する阻害性キメラ抗原レセプター（iCAR）を含む免疫応答細胞を提供し、ここで上記第1の抗原への上記抗原認識レセプターの結合は、上記免疫応答細胞を活性化し、上記第2の抗原への上記iCARの結合は、上記免疫応答細胞を阻害する。本発明はまた、上記免疫応答細胞を生産するための方法、および上記免疫応答細胞を使用することによって癌を処置するための方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

（発明の背景）

T細胞ベースの治療は、骨髄移植および臓器移植、癌免疫療法、ウイルス感染、ならびに自己免疫疾患において治療の可能性を有する。しかし、主要な処置関連合併症は、ドナーリンパ球注入もしくは自己由来の標的化T細胞療法における「オンターゲット・オフ腫瘍反応性（on-target, off-tumor reactivity）」後の移植片対宿主病（GVHD）におけるような、正常な組織に対する意図しないT細胞反応性から生じる。

【0004】

同種異系骨髄移植（BMT；全世界で1年に25,000症例）におけるドナーリンパ球注入（DLI）の使用は、ある種の患者部分セットにおいて有意な治療の増加を生じた。近年、DLIは、転移性腎細胞癌、乳癌、結腸癌、および卵巣癌を有する患者に対する有効な治療を提供することが示されており、治療が転移性固形腫瘍を処置するために進行中である。DLIの重要な効力（血液の悪性腫瘍の状況で移植片対白血病（GVL）といわれる）は、いくつかのグループが、GVHD誘発の低下が達成されなければDLIの現在のスキームが生存を改善できないと結論づけるほどまでに、急性および慢性の移植片対宿主病（GVHD）の両方の誘発によって制限される（40%を超える割合）。

【0005】

同様に、癌免疫療法治験は、TCRおよびCARがそうされたT細胞に由来する「オンターゲットであるが、オフ組織（on-target but off-tissue）」の有害事象（例えば、抗CD19 CARを発現する細胞で処置した慢性リンパ性白血病（CLL）患者におけるB細胞形成不全、肺上皮に対する抗ERBB2 CAR T細胞交叉反応性に由来する胎児急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、およびMAGE-A3 TCRで処置した黒色腫および骨髄腫患者における心筋壊死による死亡が挙げられる）を報告した。

【0006】

非特異的免疫抑制およびT細胞排除は、治療利益を捨てて重症の二次合併症を引き起こすという代償を払って、望ましくないT細胞応答を制御する現在唯一の手段である。それらは、重症かつときおり御しがたい、従って、別の点で効果的な細胞処置の使用を制限し得

10

20

30

40

50

る症状の出現に依拠する。

【 0 0 0 7 】

細胞性の副作用という帰結を防止する戦略は、実際に必要とされている。現在のアプローチでは、望ましくない副作用を制御することにおける利点としてT細胞療法により高次の複雑性を利用できない。よって、新規な治療戦略が切迫して必要とされる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

(発明の要旨)

本発明は、一般に、免疫細胞活性化活性を有する抗原結合レセプター（例えば、CARもしくはTCR）および上記免疫応答細胞の免疫活性を選択的に低下もしくは除去する阻害性キメラ抗原レセプター（iCAR）を発現する免疫応答細胞（例えば、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、および制御性T細胞）を提供する。従って、上記免疫応答細胞のオフターゲット効果は、低下される。いくつかの実施形態において、免疫活性の低下は、可逆的である。よって、本発明は、新生物形成、感染性疾患、および他の病状の処置のためにこのような免疫応答細胞を使用するための方法を提供する。

【 0 0 0 9 】

一局面において、本発明は、単離された免疫応答細胞を提供し、上記免疫応答細胞は、第1の抗原と結合し、ここで上記結合が上記免疫応答細胞を活性化する抗原認識レセプター、および第2の抗原と結合し、ここで上記結合が上記免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターを含む。

【 0 0 1 0 】

別の局面において、本発明は、被験体における腫瘍量を低下させるための方法を提供し、上記方法は、有効量の免疫応答細胞を投与し、それによって、上記被験体における腫瘍細胞死を誘発する工程を包含し、上記免疫応答細胞は、第1の抗原と結合し、ここで上記結合が上記免疫応答細胞を活性化する抗原認識レセプター、および第2の抗原と結合し、ここで上記結合が上記免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターを含む。上記方法は、非腫瘍細胞と比較して、腫瘍細胞を選択的に標的とし得る。いくつかの実施形態において、上記方法は、腫瘍細胞の数を減少させる。いくつかの実施形態において、上記方法は、腫瘍サイズを低下させる。他の実施形態において、上記方法は、上記被験体における腫瘍を根絶する。

【 0 0 1 1 】

別の局面において、本発明は、新生物形成を有する被験体の生存を増大させるための方法を提供し、上記方法は、有効量の免疫応答細胞を投与し、それによって、上記被験体における新生物形成を処置もしくは予防する工程を包含し、上記免疫応答細胞は、第1の抗原と結合し、ここで上記結合が上記免疫応答細胞を活性化する抗原認識レセプター、および第2の抗原と結合し、ここで上記結合が上記免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターを含む。ある種の実施形態において、上記新生物形成は、血液の癌、B細胞白血病、多発性骨髄腫、リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、肉腫、ならびに急性骨髄性白血病（AML）からなる群より選択される。

【 0 0 1 2 】

別の局面において、本発明は、第1の抗原と結合する抗原認識レセプターを含む抗原特異的免疫応答細胞を生産するための方法を提供し、上記方法は、上記免疫応答細胞に、第2の抗原と結合し、ここで上記結合が上記免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターをコードする核酸配列を導入する工程を包含する。

【 0 0 1 3 】

別の局面において、本発明は、抗原と結合する細胞外ドメイン；上記細胞外ドメインに作

10

20

30

40

50

動可能に連結された膜貫通ドメイン；および細胞内シグナル伝達を活性化して免疫応答を低下させる細胞内ドメインであって、上記膜貫通ドメインに作動可能に連結されている、細胞内ドメインを含む、阻害性キメラ抗原レセプター（iCAR）を提供する。いくつかの実施形態において、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される。ある種の実施形態において、上記膜貫通ドメインは、CD4ポリペプチド、CD8ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される。さらに、上記阻害性キメラ抗原レセプター（iCAR）は、Fab、scFv、リガンド、特異的リガンド、もしくは多価リガンドをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、上記iCARへの抗原の結合は、免疫応答を低下させる上記細胞内シグナル伝達ドメインを活性化する。

10

【0014】

関連する局面において、本発明は、抗原と結合する阻害性キメラ抗原レセプターをコードする核酸配列を提供し、ここで上記結合は、免疫応答を低下させる細胞内シグナル伝達ドメインを活性化する。

【0015】

別の関連する局面において、本発明は、抗原と結合する阻害性キメラ抗原レセプターをコードする核酸配列を含むベクターを提供し、ここで上記結合は、免疫応答を低下させる細胞内シグナル伝達ドメインを活性化する。

20

【0016】

関連する局面において、本発明は、有効量の本発明の免疫応答細胞を薬学的に受容可能な賦形剤中に含む、（新生物形成もしくは病原体感染の処置のための）薬学的組成物を提供する。

【0017】

別の局面において、本発明は、新生物形成、病原体感染、自己免疫障害、もしくは同種異系移植の処置のためのキットを提供し、上記キットは、第1の抗原と結合し、上記免疫応答細胞を活性化する抗原認識レセプター、および第2の抗原と結合し、上記免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターを含む免疫応答細胞を含む。種々の実施形態において、上記キットは、新生物形成、病原体感染、自己免疫障害、もしくは同種異系移植を有する被験体を処置するために上記細胞を使用するための書面による説明書をさらに含む。

30

【0018】

別の局面において、本発明は、被験体における移植片対白血病応答もしくは移植片対腫瘍応答を調節するための方法を提供し、上記方法は、上記被験体に対して同種異系の免疫応答細胞の有効量を投与し、それによって上記被験体における移植片対白血病応答もしくは移植片対腫瘍応答を調節する工程を包含し、上記免疫応答細胞は、抗原と結合し、ここで上記結合が上記同種異系の免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターを含む。ある種の実施形態において、上記被験体は、転移性乳癌、血液の悪性腫瘍、もしくは固形腫瘍を有し、上記ヒト白血球抗原（HLA）は、HLA-Iである。ある種の実施形態において、上記被験体は、上皮間葉転換（EMT）を既に受けた腫瘍を有し、上記抗原は、上皮間葉転換（EMT）抗原、E-カドヘリン、およびサイトケラチンのうちの1種以上である。種々の実施形態において、上記阻害性キメラ抗原レセプターおよび上記抗原の結合は、上記抗原を含む細胞における細胞死を減少させる。上記方法は、上記被験体における移植片対宿主病（GVHD）、もしくはその症状を低下させ得る。

40

【0019】

本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記第1の抗原もしくは上記抗原認識レセプターの抗原は、腫瘍抗原もしくは病原体抗原である。特定の実施形態において、上記抗原認識レセプターの抗原は、以下からなる群より選択される1種以上の腫瘍抗原である：CD19、CAIX、CEA、CD5、CD7、CD10、CD20、CD22

50

、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2, 3, 4、F8P、胎児型アセチルコリンレセプター、葉酸レセプター-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-2、-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、Muc-1、Muc-16、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、癌胎児抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、およびWT-1。

【0020】

本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記第2の抗原もしくは上記阻害性キメラ抗原レセプターの抗原は、CD33、CD38、ヒト白血球抗原(HLA)、器官特異的抗原、血液脳関門特異的抗原、上皮間葉転換(EMT)抗原、E-カドヘリン、サイトケラチン、オピオイド結合タンパク質/細胞接着分子(OPCML)、HYLA2、結腸直腸癌欠失(Deleted in Colorectal Carcinoma)(DCC)、足場/マトリクス付着領域結合タンパク質1(SMAR1)、細胞表面炭水化物、もしくはムチンタイプO-グリカンである。本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記iCARへの抗原の結合は、免疫応答を低下させる上記細胞内シグナル伝達ドメインを活性化する。

【0021】

本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記阻害性キメラ抗原レセプターは、組換え発現される。本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記阻害性キメラ抗原レセプターは、ベクターから発現される。本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される細胞内シグナル伝達ドメインを含む。本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、CD4ポリペプチド、CD8ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される膜貫通ドメインを含む。本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、Fab、scFv、リガンド、特異的リガンド、もしくは多価リガンドを含む。ある種の実施形態において、上記細胞は、19-28z、P28z、M28z、および56-28zからなる群より選択される組換えもしくは内因性の抗原レセプターを発現する。

【0022】

本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記抗原認識レセプターは、T細胞レセプター(TCR)もしくはキメラ抗原レセプター(CAR)である。本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、抗原認識レセプターは、外因性もしくは内因性である。本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、抗原認識レセプターは、組換え発現される。本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記抗原認識レセプターは、ベクターから発現される。本明細書で詳述される局面のうちのいずれかの種々の実施形態において、同種異系細胞は、内因性T細胞レセプターを有する。

【0023】

本明細書で詳述される局面の種々の実施形態において、上記細胞は、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、制御性T細胞、ヒト胚性幹細胞、先天性免疫系の細胞、およびリンパ球へ分化し得る多能性幹細胞のうちの1種以上である。いくつかの実施形態において、上記免疫応答細胞は、自己由来である。他の実施形態において、上記免疫応答細胞は、非自己由来である。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

1) 第1の抗原と結合する抗原認識レセプターであって、ここで該結合は、該免疫応答

10

20

30

40

50

細胞を活性化する、抗原認識レセプター、および

2) 第2の抗原と結合する阻害性キメラ抗原レセプターであって、ここで該結合は、該免疫応答細胞を阻害する、阻害性キメラ抗原レセプター、を含む、単離された免疫応答細胞。

(項目2)

前記第1の抗原は、腫瘍抗原もしくは病原体抗原である、項目1に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目3)

前記第2の抗原は、CD33、CD38、ヒト白血球抗原(HLA)、上皮間葉転換(FMT)抗原、器官特異的抗原、血液脳関門特異的抗原、E-カドヘリン、サイトケラチン、オピオイド結合タンパク質/細胞接着分子(OPCML)、HYLA2、結腸直腸癌欠失(Deleted in Colorectal Carcinoma)(DCC)、足場/マトリクス付着領域結合タンパク質1(SMAR1)、細胞表面炭水化物、ムチンタイプO-グリカンである、項目1に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目4)

前記阻害性キメラ抗原レセプターは、組換え発現される、項目1~3のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目5)

前記阻害性キメラ抗原レセプターは、ベクターから発現される、項目1~4のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目6)

前記抗原認識レセプターは、T細胞レセプター(TCR)もしくはキメラ抗原レセプター(CAR)である、項目1~5のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目7)

前記抗原認識レセプターは、外因性もしくは内因性である、項目1~6のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目8)

前記抗原認識レセプターは、組換え発現される、項目1~7のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目9)

前記抗原認識レセプターは、ベクターから発現される、項目1~8のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目10)

前記細胞は、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、制御性T細胞、ヒト胚性幹細胞、先天性免疫系の細胞、およびリンパ球へ分化し得る多能性幹細胞からなる群より選択される、項目1~9のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目11)

前記免疫応答細胞は、自己由来である、項目1~10のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目12)

前記免疫応答細胞は、非自己由来である、項目1~10のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目13)

前記第1の抗原は、CD19、CAIX、CEA、CDS、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎児型アセチルコリンレセプター、葉酸レセプター、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-2、-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接

10

20

30

40

50

着分子、MAGE-A1、メソテリン、Muc-1、Muc-16、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、癌胎児抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、およびWT-1からなる群より選択される腫瘍抗原である、項目1～12のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目14)

前記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される細胞内シグナル伝達ドメインを含む、項目1～13のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目15)

前記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、CD4ポリペプチド、CD8ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される膜貫通ドメインをさらに含む、項目14に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目16)

前記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、Fab、scFv、リガンド、特異的リガンド、もしくは多価リガンドをさらに含む、項目1～15のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目17)

前記細胞は、19-28z、P28z、M28z、および56-28zからなる群より選択される組換えもしくは内因性の抗原レセプターを発現する、項目1～16のいずれか1項に記載の単離された免疫応答細胞。

(項目18)

被験体における腫瘍量を低減するための方法であって、該方法は、有効量免疫応答細胞を投与し、それによって該被験体における腫瘍細胞死を誘発する工程を包含し、該免疫応答細胞は、第1の抗原と結合し、ここで該結合が該免疫応答細胞を活性化させる抗原認識レセプター、および第2の抗原と結合し、ここで該結合が該免疫細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターを含む、方法。

(項目19)

非腫瘍細胞と比較して、腫瘍細胞を選択的に標的とする、項目18に記載の方法。

(項目20)

腫瘍細胞の数を減少させる、項目18に記載の方法。

(項目21)

腫瘍サイズを低下させる、項目18に記載の方法。

(項目22)

前記被験体における前記腫瘍を根絶する、項目18に記載の方法。

(項目23)

新生物形成を有する被験体の生存を増進するための方法であって、該方法は、有効量の免疫応答細胞を投与し、それによって、該被験体における新生物形成を処置もしくは防止する工程を包含し、該免疫応答細胞は、第1の抗原と結合し、ここで該結合は該免疫応答細胞を活性化する抗原認識レセプター、および第2の抗原と結合し、ここで該結合は該免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターを含む、方法。

(項目24)

前記新生物形成は、血液の癌、B細胞白血病、多発性骨髄腫、リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、および肉腫、急性骨髄性白血病(AML)からなる群より選択される、項目23に記載の方法。

(項目25)

前記第1の抗原は、腫瘍抗原もしくは病原体抗原である、項目17～23のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目26)

前記第2の抗原は、CD33、CD38、ヒト白血球抗原(HLA)、上皮間葉転換(EMT)抗原、器官特異的抗原、血液脳関門特異的抗原、E-カドヘリン、サイトケラチン、オピオイド結合タンパク質/細胞接着分子(OPCML)、HYLA2、結腸直腸癌欠失(Deleted in Colorectal Carcinoma)(DCC)、足場/マトリクス付着領域結合タンパク質1(SMAR1)、細胞表面炭水化物、もしくはムチンタイプO-グリカンである、項目18~25のいずれか1項に記載の方法。

(項目27)

前記阻害性キメラ抗原レセプターは、組換え発現される、項目18~25のいずれか1項に記載の方法。

10

(項目28)

前記阻害性キメラ抗原レセプターは、ベクターから発現される、項目18~27のいずれか1項に記載の方法。

(項目29)

前記抗原認識レセプターは、T細胞レセプター(TCR)もしくはキメラ抗原レセプター(CAR)である、項目18~28のいずれか1項に記載の方法。

(項目30)

前記抗原認識レセプターは、外因性もしくは内因性である、項目18~29のいずれか1項に記載の方法。

(項目31)

前記抗原認識レセプターは、組換え発現される、項目18~30のいずれか1項に記載の方法。

20

(項目32)

前記抗原認識レセプターは、ベクターから発現される、項目18~31のいずれか1項に記載の方法。

(項目33)

前記細胞は、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、制御性T細胞、ヒト胚性幹細胞、先天性免疫系の細胞、およびリンパ球へ分化し得る多能性幹細胞からなる群より選択される、項目18~32のいずれか1項に記載の方法。

(項目34)

前記免疫応答細胞は、自己由来である、項目18~33のいずれか1項に記載の方法。

30

(項目35)

前記免疫応答細胞は、非自己由来である、項目18~33のいずれか1項に記載の方法。

(項目36)

前記第1の抗原が、CD19、CAIX、CEA、CDS、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎児型アセチルコリンレセプター、葉酸レセプター、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-2、-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、Muc-1、Muc-16、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、癌胎児抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、およびWT-1からなる群より選択される腫瘍抗原である、項目18~35のいずれか1項に記載の方法。

40

(項目37)

前記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される細胞内シグナル伝達ドメインを含む、項目18~36のいずれか1項に記載の方法。

(項目38)

50

前記阻害性キメラ抗原レセプター (i C A R) は、C D 4 ポリペプチド、C D 8 ポリペプチド、C T L A - 4 ポリペプチド、P D - 1 ポリペプチド、L A G - 3 ポリペプチド、2 B 4 ポリペプチド、および B T L A ポリペプチドからなる群より選択される膜貫通ドメインをさらに含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記阻害性キメラ抗原レセプター (i C A R) は、F a b、s c F v、リガンド、特異的リガンド、もしくは多価リガンドをさらに含む、項目 1 8 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 0)

前記方法は、前記被験体において腫瘍量を低下させるかもしくは根絶する、項目 1 8 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

(項目 4 1)

前記方法は、前記被験体における移植片対宿主病 (G V H D)、もしくはその症状を低下させる、項目 1 8 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 2)

第 1 の抗原と結合する抗原認識レセプターを含む抗原特異的免疫応答細胞を生産するための方法であって、該方法は、第 2 の抗原と結合し、ここで該結合が該免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターをコードする核酸配列を該免疫応答細胞に導入する工程を包含する、方法。

(項目 4 3)

前記第 1 の抗原は、腫瘍抗原もしくは病原体抗原である、項目 4 2 に記載の方法。

20

(項目 4 4)

前記第 2 の抗原は、C D 3 3、C D 3 8、ヒト白血球抗原 (H L A)、上皮間葉転換 (E M T) 抗原、器官特異的抗原、血液脳関門特異的抗原、E - カドヘリン、サイトケラチン、オピオイド結合タンパク質 / 細胞接着分子 (O P C M L)、H Y L A 2、結腸直腸癌欠失 (D e l e t e d i n C o l o r e c t a l C a r c i n o m a) (D C C)、足場 / マトリクス付着領域結合タンパク質 1 (S M A R 1)、細胞表面炭水化物、もしくはムチンタイプ O - グリカンである、項目 4 2 または 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記阻害性キメラ抗原レセプターは、組換え発現される、項目 4 2 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

(項目 4 6)

前記阻害性キメラ抗原レセプターは、ベクターから発現される、項目 4 2 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記抗原認識レセプターは、T 細胞レセプター (T C R) もしくはキメラ抗原レセプター (C A R) である、項目 4 2 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記抗原認識レセプターは、外因性もしくは内因性である、項目 4 2 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(項目 4 9)

前記抗原認識レセプターは、組換え発現される、項目 4 2 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 0)

前記抗原認識レセプターは、ベクターから発現される、項目 4 2 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記細胞は、T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、細胞傷害性 T リンパ球 (C T L)、制御性 T 細胞、ヒト胚性幹細胞、先天性免疫系の細胞、およびリンパ球へ分化し得る多能性幹細胞からなる群より選択される、項目 4 2 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

(項目52)

前記免疫応答細胞は、自己由来である、項目42～51のいずれか1項に記載の方法。

(項目53)

前記免疫応答細胞は、自己由来である、項目42～51のいずれか1項に記載の方法。

(項目54)

前記第1の抗原が、CD19、CAIX、CEA、CD4、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎児型アセチルコリンレセプター、葉酸レセプター、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-2、-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、Muc-1、Muc-16、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、癌胎児抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、およびWT-1からなる群より選択される腫瘍抗原である、項目42～53のいずれか1項に記載の方法。

10

(項目55)

前記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される細胞内シグナル伝達ドメインを含む、項目42～54のいずれか1項に記載の方法。

20

(項目56)

前記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される膜貫通ドメインをさらに含む、項目55に記載の方法。

(項目57)

前記阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)は、Fab、scFv、リガンド、特異的リガンド、もしくは多価リガンドをさらに含む、項目42～56のいずれか1項に記載の方法。

(項目58)

(i) 抗原と結合する細胞外ドメイン；

(ii) 該細胞外ドメインに作動可能に連結された膜貫通ドメイン；および

(iii) 細胞内シグナル伝達を活性化して、免疫応答を低下させる細胞内ドメインであって、該細胞内ドメインは、該膜貫通ドメインに作動可能に連結されている、細胞内ドメイン、

を含む、阻害性キメラ抗原レセプター。

30

(項目59)

前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される、項目58に記載の阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)。

(項目60)

前記膜貫通ドメインは、CD4ポリペプチド、CD8ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、およびBTLAポリペプチドからなる群より選択される、項目59に記載の阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)。

40

(項目61)

Fab、scFv、リガンド、特異的リガンド、もしくは多価リガンドをさらに含む、項目58～60のいずれか1項に記載の阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)。

(項目62)

前記iCARへの前記抗原の結合は、前記免疫応答を低下させる細胞内シグナル伝達ドメインを活性化する、項目58～61のいずれか1項に記載の阻害性キメラ抗原レセプター

50

(i C A R)。

(項 目 6 3)

前記抗原と結合する阻害性キメラ抗原レセプターをコードする核酸配列であって、ここで該結合は、免疫応答を低下させる細胞内シグナル伝達ドメインを活性化する、核酸配列。

(項 目 6 4)

抗原と結合する阻害性キメラ抗原レセプターをコードする核酸配列を含むベクターであって、ここで該結合は、免疫応答を低下させる細胞内シグナル伝達ドメインを活性化する、ベクター。

(項 目 6 5)

項目 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の免疫応答細胞の有効量を、薬学的に受容可能な賦形剤中に含む、薬学的組成物。

10

(項 目 6 6)

新生物形成の処置のための薬学的組成物であって、項目 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の腫瘍抗原特異的 T 細胞の有効量を、薬学的に受容可能な賦形剤中に含む、薬学的組成物。

(項 目 6 7)

新生物形成、病原体感染、自己免疫障害、もしくは同種異系移植の処置のためのキットであって、該キットは、免疫応答細胞を含み、該免疫応答細胞は、第 1 の抗原と結合し、該免疫応答細胞を活性化する抗原認識レセプター、および第 2 の抗原と結合し、該免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターを含む、キット。

(項 目 6 8)

前記キットは、新生物形成、病原体感染、自己免疫障害、もしくは同種異系移植を有する被験体を処置するために該細胞を使用するための書面による説明書をさらに含む、項目 6 7 に記載のキット。

20

(項 目 6 9)

被験体における移植片対白血病応答もしくは移植片対腫瘍応答を調節するための方法であって、該方法は、該被験体に同種異系の免疫応答細胞の有効量を投与し、それによって、該被験体における移植片対白血病応答もしくは移植片対腫瘍応答を調節する工程を包含し、該免疫応答細胞は、抗原と結合し、ここで該結合が該同種異系免疫応答細胞を阻害する阻害性キメラ抗原レセプターを含む、方法。

(項 目 7 0)

前記同種異系細胞は、内因性 T 細胞レセプターを含む、項目 6 9 に記載の方法。

30

(項 目 7 1)

前記抗原は、C D 3 3、C D 3 8、ヒト白血球抗原 (H L A)、上皮間葉転換 (E M T) 抗原、器官特異的抗原、血液脳関門特異的抗原、E - カドヘリン、サイトケラチン、オピオイド結合タンパク質 / 細胞接着分子 (O P C M L)、H Y L A 2、結腸直腸癌欠失 (D e l e t e d i n C o l o r e c t a l C a r c i n o m a) (D C C)、足場 / マトリクス付着領域結合タンパク質 1 (S M A R 1)、細胞表面炭水化物、もしくはムチンタイプ O - グリカンである、項目 6 9 または 7 0 に記載の方法。

(項 目 7 2)

前記被験体は、転移性乳癌、血液系悪性腫瘍、もしくは固形腫瘍を有し、前記ヒト白血球抗原 (H L A) は、H L A - I である、項目 7 1 に記載の方法。

40

(項 目 7 3)

前記被験体は、上皮間葉転換 (E M T) を既に受けた腫瘍を有し、前記抗原は、上皮間葉転換 (E M T) 抗原、E - カドヘリン、およびサイトケラチンのうちの 1 種以上である、項目 7 1 に記載の方法。

(項 目 7 4)

前記阻害性キメラ抗原レセプターおよび前記抗原の結合は、前記抗原を含む細胞の細胞死を減少させる、項目 6 9 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項 目 7 5)

前記方法は、前記被験体における移植片対宿主病 (G V H D)、もしくはその症状を低下

50

させる、項目 69 ~ 74 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0024】

(定義)

別段定義されなければ、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。以下の参考文献は、本発明において使用される用語の多くの一般的定義を当業者に提供する： Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed., 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で使用される場合、以下の用語は、別段特定されなければ、以下に与えられた意味を有する。

【0025】

「免疫応答細胞を活性化する」とは、免疫応答の開始を生じる細胞におけるシグナル伝達の誘発もしくはタンパク質発現の変化を意味する。例えば、CD3 鎖クラスターガリグンド結合および免疫レセプターチロシンベースの阻害モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs) (ITAM) に応答すると、シグナル伝達カスケードが生じる。ある種の実施形態において、内因性 TCR もしくは外因性 CAR が抗原と結合する場合、結合したレセプター付近の多くの分子 (例えば、CD4 もしくは CD8、CD3 / / / など) のクラスター形成を含む免疫シナプスの形成が起こる。膜結合したシグナル伝達分子のこのクラスター形成は、CD3 鎖内に含まれる ITAM モチーフがリン酸化されることを可能にする。このリン酸化は、翻って、T 細胞活性化経路を開始し、最終的に、転写因子 (例えば、NF- κ B および AP-1) を活性化する。これら転写因子は、上記 T 細胞の全体的な遺伝子発現を誘発して、T 細胞媒介性免疫応答を開始するために、主要調節因子 T 細胞タンパク質の増大および発現のために IL-2 生成を増大させる。「免疫応答細胞を刺激する」とは、強くかつ持続した免疫応答を生じるシグナルを意味する。種々の実施形態において、これは、免疫細胞 (例えば、T 細胞) 活性化後に起こるか、または CD28、CD137 (4-1BB)、OX40、および ICOS が挙げられるが、これらに限定されないレセプターを通じて同時に媒介される。特定の理論に拘束されないが、複数の刺激シグナルを受容することは、強くかつ長期間の T 細胞媒介性免疫応答を展開するために重要である。これら刺激シグナルを受容しなければ、T 細胞は、迅速に阻害され抗原に非応答性になる。これら共刺激シグナルの効果は変動し、部分的に理解されてはいるものの、それらは一般に、完全かつ持続した根絶のために抗原に強く応答する、長く生きている、増殖性の、および抗アポトーシス性の T 細胞を生成するために、遺伝子発現の増大を生じる。

【0026】

用語「抗原認識レセプター」とは、本明細書で使用される場合、抗原結合に応じて免疫細胞 (例えば、T 細胞) を活性化し得るレセプターをいう。例示的抗原認識レセプターは、天然のもしくは内因性の T 細胞レセプター、細胞に導入される外因性 T 細胞レセプターおよび / または主要抗原結合ドメインが免疫細胞 (例えば、T 細胞) を活性化し得る細胞内シグナル伝達ドメインに融合されているキメラ抗原レセプターであり得る。

【0027】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」とは、無傷の抗体分子のみならず、免疫原結合能を保持する抗体分子の配列もまた意味する。このようなフラグメントはまた、当該分野で周知であり、インビトロおよびインビボの両方で適切に使用される。よって、本明細書で使用される場合、用語「抗体」とは、無傷の抗体分子のみならず、周知の活性フラグメント F(ab')₂、および Fab もまた意味する。F(ab')₂、および無傷の抗体

10

20

30

40

50

のFcフラグメントを欠いているFabフラグメントは、循環からより迅速に消失し、無傷の抗体の非特異的組織結合がより少なくなり得る(Wahl et al., J Nucl. Med. 24:316-325 (1983))。本発明の抗体は、完全な天然の抗体、二重特異的抗体；キメラ抗体；Fab、Fab'、単鎖V領域フラグメント(scFv)、融合ポリペプチド、および慣例に従わない抗体を含む。

【0028】

「アフィニティー」とは、結合強度の尺度を意味する。理論には拘束されないが、アフィニティーは、抗体結合部位と抗原決定基との間での立体化学的フィットの緊密さ、それらの間の接触の面積、および荷電した基および疎水性基の分布に依存する。アフィニティーはまた、用語「アビディティー」を含み、この用語は、可逆的複合体の形成後の抗原-抗体結合の強さをいう。抗原に対する抗体のアフィニティーを計算するための方法は、当該分野で公知であり、上記方法は、結合実験を使用して、アフィニティーを計算することを包含する。機能的アッセイ（例えば、フローサイトメトリーアッセイ）における抗体活性はまた、抗体アフィニティーを反映する。抗体およびアフィニティーは、表現型として特徴付けられ得、機能的アッセイ（例えば、フローサイトメトリーアッセイ）を使用して比較され得る。

【0029】

用語「キメラ抗原レセプター」もしくは「CAR」とは、本明細書で使用される場合、免疫細胞を活性化もしくは刺激し得る細胞内シグナル伝達ドメインに融合されている抗原結合ドメインをいう。最も一般的には、上記CARの細胞外結合ドメインは、マウスモノクローナル抗体もしくはヒト化モノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の融合に由来する単鎖可変フラグメント(scFv)から構成される。あるいは、scFvは、Fabに由来するものが使用され得る（抗体に由来する代わりに、例えば、Fabライブラリーから得られる）。種々の実施形態において、このscFvは、膜貫通ドメインに融合され、次いで、細胞内シグナル伝達ドメインに融合される。「第1世代」CARは、抗原結合の際にCD3シグナルを提供するのみのものを含み、「第2世代」CARは、共刺激（例えば、CD28もしくはCD137）および活性化（CD3）の両方を提供するものを含む。「第3世代」CARは、複数の共刺激（例えば、CD28およびCD137）および活性化（CD3）を提供するものを含む。種々の実施形態において、上記CARは、上記抗原に対して高アフィニティーもしくはアビディティーを有するように選択される。

【0030】

用語「阻害性キメラ抗原レセプター」もしくは「iCAR」とは、本明細書で使用される場合、免疫細胞の免疫活性を阻害もしくは抑制し得る細胞内シグナル伝達ドメインに融合されている抗原結合ドメインをいう。iCARは、免疫細胞阻害能力を有し、免疫細胞活性化能力を有するレセプターであるCARとは異なりかつ区別可能である。例えば、CARは、CD3を含むので、活性化レセプターである。iCARは、活性化ドメインを含まない。従って、iCARは、CARとは異なり、CARの下位グループではない。ある種の実施形態において、上記抗原結合ドメインは、膜貫通ドメイン、および免疫阻害レセプターの細胞内ドメインに融合される。上記iCARの膜貫通ドメインは、CD8ポリペプチド、CD4ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、もしくはBTLAポリペプチドであり得る。上記iCARの細胞内ドメインは、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、もしくはBTLAポリペプチドであり得る。種々の実施形態において、上記iCARの細胞外結合ドメインは、マウスモノクローナル抗体もしくはヒト化モノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域に由来する単鎖可変フラグメント(scFv)から構成される。ある種の実施形態において、上記scFvは、前立腺特異的膜抗原(PSMA)に対して特異的なscFvである。あるいは、scFvは、Fabに由来するものが使用され得る（抗体に由来する代わりに、例えば、Fabライブラリーから得られる）。iCARは、抗原認識の際にT細胞機能を特異

10

20

30

40

50

的に阻害する免疫抑制活性を有する。

【 0 0 3 1 】

「免疫応答細胞を阻害する」もしくは「免疫応答細胞を抑制する」とは、免疫応答の抑制（例えば、サイトカイン生成の減少）を生じる細胞におけるシグナル伝達の誘発もしくはタンパク質発現の変化を意味する。好ましい実施形態において、免疫応答細胞の阻害もしくは抑制は、選択的および／もしくは可逆的である。

【 0 0 3 2 】

用語「免疫抑制活性」とは、免疫応答の低下を生じる細胞（例えば、活性化免疫応答細胞）におけるシグナル伝達の誘発もしくはタンパク質発現の変化を意味する。免疫応答を抑制もしくは低下させることが公知のポリペプチドとしては、C T L A - 4 ポリペプチド、P D - 1 ポリペプチド、L A G - 3 ポリペプチド、2 B 4 ポリペプチド、もしくはB T L A ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、それらの対応するリガンドへの結合による）。最低でも、i C A Rシグナル伝達は、このような分子の細胞内部分を使用し、機能的i C A Rを生成するために必要な場合、上記分子の膜貫通ドメインおよび／もしくは細胞外ドメインの部分を含み得る。用語「免疫刺激活性」とは、免疫応答の増大を生じる細胞（例えば、活性化免疫応答細胞）におけるシグナル伝達の誘発もしくはタンパク質発現の変化を意味する。免疫刺激活性は、炎症促進活性を含み得る。それらの結合によって免疫応答を刺激もしくは増大させることが公知のポリペプチドとしては、C D 2 8、O X - 4 0、4 - 1 B B、およびそれらの対応するリガンド（B 7 - 1、B 7 - 2、O X - 4 0 L、および4 - 1 B B Lが挙げられる）が挙げられる。このようなポリペプチドは、腫瘍微小環境に存在し、新生物細胞への免疫応答を活性化する。種々の実施形態において、炎症促進性ポリペプチドおよび／もしくはそれらのリガンドを促進、刺激もしくは作動する（a g o n i z e）ことは、上記免疫応答細胞の免疫応答を増強する。

【 0 0 3 3 】

「C D 3 ポリペプチド」とは、活性化活性もしくは刺激活性を有するN C B I R e f e r e n c e N o : N P _ 9 3 2 1 7 0もしくはそのフラグメントと少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一性を有するタンパク質を意味する。例示的C D 3 は、以下に提供される[配列番号1]。

【化1】

```
1 mkwkalfataa ilqaqlpita aqsfglldpk lcyllldgilf iygviltalf lrvkfsrsad
61 apayqqggnq lynelnlgrrr eeydvldkrr grdpemggkp qrrknpgqgl ynelqkdkma
121 eayseigmkg errrrgkghdg lyqglstatk dtydalhmqa lppr
```

【 0 0 3 4 】

「C D 3 核酸分子」とは、C D 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【 0 0 3 5 】

「C D 2 8 ポリペプチド」とは、刺激活性を有するN C B I R e f e r e n c e N o : N P _ 0 0 6 1 3 0もしくはそのフラグメントと少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一性を有するタンパク質を意味する。例示的C D 2 8は、以下に提供される[配列番号2]。

【化2】

```
1 mlrllllalnl fpsiqvtgnk ilvkqspmlv aydnavlslc kysynlfsre fraslhkglc
61 savevcvvyg nysqqqlqvys ktgfncdgkl gnesvtfylq nlyvnqtdiy fckievmypp
121 pyldneksng tiihvkghkl cpsplfpgps kpfwvlvvg gvlacysllv tvafiifwvr
181 skrsrllhsd ymmmtprprg ptrkhyqpva pprdfaayrs
```

【 0 0 3 6 】

「C D 2 8 核酸分子」とは、C D 2 8 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【 0 0 3 7 】

「 1 9 - 2 8 z 」とは、以下に提供される配列 [配列番号 3] と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % もしくは 1 0 0 % 同一性を有し、アミノ酸 1 ~ 1 8 でリーダー配列を含み、C D 1 9 に結合し得るタンパク質を意味する。

【 化 3 】

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNW
VKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSED
SAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGT'TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIELTQS
PKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDR
FTGSGSGTDF'TLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVM
YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLV
VAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFS
RSAEPFAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRX

10

【 0 0 3 8 】

1 9 - 2 8 z ポリペプチド (リーダー配列を含む) をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される [配列番号 4] 。

30

50

は、少なくとも約 50 % ホルムアミドの存在下で得られ得る。ストリンジेंटな温度条件は、通常、少なくとも約 30 、より好ましくは、少なくとも約 37 、および最も好ましくは、少なくとも約 42 の温度を含む。さらなるパラメーター（例えば、ハイブリダイゼーション時間、界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS））の濃度、およびキャリア DNA を含めるか排除するか）を変化させることは、当業者に周知である。ストリンジエンシーの種々のレベルは、必要に応じてこれら種々の条件を組み合わせることによって達成される。好ましい実施形態において、ハイブリダイゼーションは、30 において、750 mM NaCl、75 mM クエン酸三ナトリウム、および 1 % SDS 中で起こる。より好ましい実施形態において、ハイブリダイゼーションは、37 において、500 mM NaCl、50 mM クエン酸三ナトリウム、1 % SDS、35 % ホルムアミド、および 100 µg/ml 変性サケ精子 DNA (ssDNA) 中で起こる。最も好ましい実施形態において、ハイブリダイゼーションは、42 において、250 mM NaCl、25 mM クエン酸三ナトリウム、1 % SDS、50 % ホルムアミド、および 200 µg/ml ssDNA 中で起こる。これら条件に関する有用なバリエーションは、当業者に容易に明らかである。

【0041】

大部分の適用に関しては、ハイブリダイゼーション後の洗浄工程はまた、ストリンジエンシーで変動する。洗浄ストリンジエンシー条件は、塩濃度によって、および温度によって規定され得る。上記のように、洗浄ストリンジエンシーは、塩濃度を低下させることによって、もしくは温度を上昇させることによって、増大され得る。例えば、洗浄工程に関するストリンジेंटな塩濃度は、好ましくは、約 30 mM NaCl および 3 mM クエン酸三ナトリウム未満、および最も好ましくは、約 15 mM NaCl および 1.5 mM クエン酸三ナトリウム未満である。洗浄工程に関するストリンジेंटな温度条件は、通常、少なくとも約 25 、より好ましくは、少なくとも約 42 、およびさらにより好ましくは、少なくとも約 68 の温度を含む。好ましい実施形態において、洗浄工程は、25 において、30 mM NaCl、3 mM クエン酸三ナトリウム、および 0.1 % SDS 中で起こる。より好ましい実施形態において、洗浄工程は、42 において、15 mM NaCl、1.5 mM クエン酸三ナトリウム、および 0.1 % SDS 中で起こる。より好ましい実施形態において、洗浄工程は、68 において、15 mM NaCl、1.5 mM クエン酸三ナトリウム、および 0.1 % SDS 中で起こる。これら条件に関するさらなるバリエーションは、当業者に容易に明らかである。ハイブリダイゼーション技術は、当業者に周知であり、例えば、Benton and Davis (Science 196:180、1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961、1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York に記載されている。

【0042】

「実質的に同一」とは、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書で記載されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つ）もしくは核酸配列（例えば、本明細書で記載される核酸配列のうちのいずれか 1 つ）と少なくとも 50 % 同一性を示すポリペプチドもしくは核酸分子を意味する。好ましくは、このような配列は、比較のために使用される配列に対してアミノ酸レベルもしくは核酸レベルで、少なくとも 60 %、より好ましくは、80 % もしくは 85 %、およびより好ましくは、90 %、95 % もしくはさらには 99 % 同一である。

【0043】

配列同一性は、代表的には、配列分析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group、University of Wisconsin Biotechnology Center、1710 University Avenue、Madison、Wis. 53705、BLAST、BESTFIT、GAP、もしくはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を使用して測定される。このようなソフトウェアは、相同性の程度を種々の置換、欠失、および/もしくは他の改変に割り当てることによって、同一もしくは類似の配列を適合させる。保存的置換は、代表的には、以下の群内での置換を含む：グリシン、アルギニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定することへの例示的アプローチにおいて、BLASTプログラムは、密接に関連した配列を示す、 $e^{-3} \sim e^{-100}$ の間の確率スコアとともに使用され得る。

10

【0044】

「アナログ」とは、参照ポリペプチドもしくは核酸分子の機能を有する構造的に関連したポリペプチドもしくは核酸分子を意味する。

【0045】

用語「リガンド」とは、本明細書で使用される場合、レセプターに結合する分子をいう。特に、上記リガンドは、別の細胞上のレセプターを結合し、細胞間認識および/もしくは相互作用を可能にする。

20

【0046】

用語「構成的発現」とは、本明細書で使用される場合、全ての生理学的条件下での発現をいう。

【0047】

「疾患」とは、細胞、組織、もしくは器官の正常な機能に損害を与えるかもしくは妨害する任意の状態もしくは障害を意味する。疾患の例としては、細胞の新生物形成もしくは病原体感染が挙げられる。

【0048】

「有効量」とは、治療効果を有するために十分な量を意味する。一実施形態において、「有効量」とは、新生物形成の継続する増殖、成長、もしくは転移（例えば、新生物の浸潤もしくは移動）を停止、改善もしくは阻害するために十分な量である。

30

【0049】

「内因性」とは、細胞もしくは組織において通常発現される核酸分子もしくはポリペプチドを意味する。

【0050】

「寛容を強化する(enforcing tolerance)」とは、移植した器官もしくは組織を標的とする自己反応細胞もしくは免疫応答細胞の活性を妨げることを意味する。

【0051】

「外因性」とは、細胞中に内因的に存在しないか、または過剰発現される場合に得られる機能的効果を達成するために十分なレベルで存在する、核酸分子もしくはポリペプチドを意味する。用語「外因性」は、従って、細胞中で発現される任意の組換え核酸分子もしくはポリペプチド（例えば、外来の、異種の、および過剰発現される核酸分子およびポリペプチド）を包含する。

40

【0052】

「異種核酸分子もしくはポリペプチド」とは、細胞または細胞から得られるサンプル中に通常は存在しない核酸分子（例えば、acDNA、DNAもしくはRNA分子）またはポリペプチドを意味する。この核酸は、別の生物に由来し得るか、またはそれは、例えば、細胞もしくはサンプル中で通常発現されないmRNA分子であり得る。

【0053】

50

「免疫応答細胞」とは、免疫応答において機能する細胞、またはその先祖もしくは子孫を意味する。

【 0 0 5 4 】

「増大する」とは、少なくとも 5 % 程度正に変化することを意味する。変化は、5 %、10 %、25 %、30 %、50 %、75 % 程度、もしくはさらには 100 % 程度であり得る。

【 0 0 5 5 】

「単離された細胞」とは、細胞に天然に付随する分子成分および / もしくは細胞成分から分離されている細胞を意味する。

【 0 0 5 6 】

用語「単離された」、「精製された」、もしくは「生物学的に純粋」とは、物質がその天然の状態で見出されるように通常は上記物質に付随する成分から、種々の程度離れている物質を意味する。「単離する」とは、元の供給源もしくは環境からのある程度の分離を示す。「精製する」とは、単離より高度の分離の程度を示す。「精製された」もしくは「生物学的に純粋な」タンパク質は、いかなる不純物も、上記タンパク質の生物学的特性に本質的に影響を及ぼさず、他の有害な結果を引き起こさないように、他の物質から十分に離れている。すなわち、本発明の核酸もしくはペプチドは、これが、組換え DNA 技術によって生成される場合には細胞物質、ウイルス物質、もしくは培養培地を、または化学合成される場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まなければ、精製されている。純度および均質性は、代表的には、分析化学技術、例えば、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動もしくは高速液体クロマトグラフィーを使用して決定される。用語「精製された」とは、核酸もしくはタンパク質が電気泳動ゲル中で本質的に 1 本のバンドを生じること示し得る。改変（例えば、リン酸化もしくはグリコシル化）に供され得るタンパク質に関しては、種々の改変が、別個に精製され得る異なる単離されたタンパク質を生じ得る。

【 0 0 5 7 】

用語「腫瘍抗原結合ドメイン」とは、本明細書で使用される場合、特定の抗原決定基もしくは腫瘍に存在する抗原決定基のセットを特異的に結合し得るドメインをいう。

【 0 0 5 8 】

「薬剤を得る」におけるような用語「得る」とは、上記薬剤（または示された物質もしくは材料）を購入するか、合成するか、または別の手段で獲得することを含むことが意図される。

【 0 0 5 9 】

「リンカー」とは、本明細書で使用される場合、2 個以上のポリペプチドもしくは核酸を、これらが互いに接続されるように共有結合する官能基（例えば、化学物質もしくはポリペプチド）を意味するものとする。本明細書で使用される場合、「ペプチドリリンカー」とは、2 個のタンパク質を一緒に繋ぐ（例えば、 V_H ドメインおよび V_L ドメインを繋ぐ）ために使用される 1 個以上のアミノ酸をいう。本発明において使用される例示的なリンカー配列は、GGGGSGGGSGGGSG [配列番号 10] である。

【 0 0 6 0 】

「調節する」とは、正にもしくは負に変化させることを意味する。例示的な調節は、1 %、2 %、5 %、10 %、25 %、50 %、75 %、もしくは 100 % の変化を含む。

【 0 0 6 1 】

「新生物形成」とは、細胞もしくは組織の病的な増殖およびその後の他の組織もしくは器官への移動もしくは侵襲によって特徴付けられる疾患を意味する。新生物形成の成長は、代表的には、制御されず、進行性であり、正常細胞の増殖を誘発しないかまたは正常細胞の増殖の中止を引き起こす条件下で起こる。新生物形成は、種々の細胞タイプ、組織、もしくは器官（膀胱、骨、脳、乳房、軟骨、グリア、食道、卵管、胆嚢、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、神経組織、卵巣、膵臓、前立腺、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿生殖路、尿管、尿道、子宮、および膣からなる群より選択

10

20

30

40

50

される器官、またはこれらの組織もしくは細胞タイプが挙げられるが、これらに限定されない)に影響し得る。新生物形成は、癌(例えば、肉腫、癌腫、もしくは形質細胞腫(形質細胞の悪性腫瘍))を含む。本発明が使用され得る例示的新生物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:白血病(例えば、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病)、真性多血症、リンパ腫(ホジキン病、非ホジキン病)、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、H鎖病、および固形腫瘍、例えば、肉腫および癌腫(例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫(lymphangiomaendotheliosarcoma)、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫瘍、血管芽腫、聴神経腫瘍、希突起神経腫、シュワン細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫。

【0062】

「作動可能に連結された」とは、本明細書で使用される場合、生体分子と関連する生物学的機能、活性、および/もしくは構造が、少なくとも保持されるようにされている2種以上の生体分子の連結を意味する。ポリペプチドに関して、上記用語は、2個以上のポリペプチドの連結が、各ポリペプチド成分のそれぞれの個々の活性のうちの少なくともいくつかを保持する融合ポリペプチドを生じることを意味する。上記2個以上のポリペプチドは、直接もしくはリンカーを介して連結され得る。核酸に関して、上記用語は、第1のポリヌクレオチドが、適切な分子(例えば、転写アクチベータータンパク質)が第2のポリヌクレオチドに結合される場合に、上記第1のポリヌクレオチドの転写を指向する上記第2のポリヌクレオチドに隣接して配置されることを意味する。

【0063】

「病原体」とは、疾患を引き起こし得るウイルス、細菌、真菌、寄生生物もしくは原生動物を意味する。

【0064】

例示的ウイルスとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: *Retroviridae* (例えば、ヒト免疫不全ウイルス(例えば、HIV-1(HDTV-II)、LAVもしくはHTLV-III/LAV、もしくはHIV-IIIともいわれる)); および他の分離株(例えば、HIV-LP); *Picornaviridae* (例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス; エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス); *Calciviridae* (例えば、胃腸炎を引き起こす株); *Togaviridae* (例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス); *Flaviridae* (例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス); *Coronaviridae* (例えば、コロナウイルス); *Rhabdoviridae* (例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス); *Filoviridae* (例えば、エボラウイルス); *Paramyxoviridae* (例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合抱体ウイルス); *Orthomyxoviridae* (例えば、インフルエンザウイルス); *Bungaviridae* (例えば、ハンタンウイルス、ブニヤウイルス(bungavirus)、フレボウイルスおよびナイロウイルス); *Arenaviridae* (出血熱ウイルス); *Reoviridae* (例えば、レオウイルス、オルピウイルスおよびロタウイルス); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (B型肝炎ウイルス); *Parvoviridae* (パルボウイルス); *Papovaviridae* (パピローマウイルス、ポリオーマウイルス); *Adenoviridae* (大部分のアデノウイルス); *Herpesvi*

ridae (単純ヘルペスウイルス (HSV) 1 および 2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、ヘルペスウイルス); Poxviridae (天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス); および Iridoviridae (例えば、アフリカブタコレラウイルス); ならびに未分類のウイルス (例えば、デルタ型肝炎の因子 (B型肝炎ウイルスの欠損性サテライトであると考えられる)、非 A 非 B 型肝炎の因子 (クラス 1 = 内部伝播 (internally transmitted); クラス 2 = 非経口伝播 (すなわち、C型肝炎)); ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、およびアストロウイルス。

【0065】

例示的細菌としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: *Pasteurella*, *Staphylococci*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* 種、および *Salmonella* 種。感染性細菌の具体例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (例えば、*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (A群 *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* (B群 *Streptococcus*), *Streptococcus (viridans group)*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus hofmannii*, *Streptococcus (anaerobic sps.)*, *Streptococcus pneumoniae*, *pathogenic Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, および *Actinomyces israelii*.

【0066】

「レセプター」とは、1種以上のリガンドを選択的に結合する細胞膜に存在するポリペプチドもしくはその部分を意味する。

【0067】

「低下、減少」とは、少なくとも5%程度負に変化させることを意味する。変化は、5%、10%、25%、30%、50%、75%程度、もしくはさらには100%程度であり得る。

【0068】

「認識する」とは、標的を選択的に結合することを意味する。ウイルスを認識するT細胞は、代表的には、ウイルスによって発現される抗原と結合するレセプターを発現する。

【0069】

「参照」もしくは「コントロール」とは、比較標準を意味する。例えば、CARおよびiCARを発現する細胞の免疫応答は、CARのみを発現する対応する細胞の免疫応答と比較され得る。

【0070】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、用語「単鎖可変フラグメント」もしくは「s c F v」とは、V H : : V Lヘテロダイマーを形成するために共有結合される免疫グロブリンの重鎖(V H)および軽鎖(V L)の可変領域の融合タンパク質である。重鎖(V H)および軽鎖(V L)は、直接結合されるか、またはペプチドコードリンカー(例えば、10個、15個、20個、25個のアミノ酸)によって結合されるかのいずれかであり、V HのN末端とV LのC末端とが、またはV HのC末端とV LのN末端とが繋がれる。上記リンカーは、通常、可撓性のためにグリシンが、ならびに溶解度のためにセリンもしくはスレオニンが豊富である。定常領域の除去およびリンカーの導入にもかかわらず、s c F vタンパク質は、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。単鎖F vポリペプチド抗体は、H u s t o n、e t a l. (P r o c. N a t. A c a d. S c i. U S A、85:5 879-5883、1988)によって記載されるように、V Hコード配列およびV Lコード配列を含む核酸から発現され得る。米国特許第5,091,513号、同第5,132,405号および同第4,956,778号;ならびに米国特許公開第20050196754号および同第20050196754号もまた参照のこと。

【0071】

「分泌(された)」とは、小胞体、ゴルジ装置を通る分泌経路を介して、および細胞形質膜に一時的に融合する小胞として細胞から放出され、細胞の外にタンパク質を放出されるポリペプチドを意味する。

【0072】

「シグナル配列」もしくは「リーダー配列」とは、分泌経路に入るように指向する、新たに合成されたタンパク質のN末端に存在するペプチド配列(5個、10個、15個、20個、25個、30個のアミノ酸長)を意味する。

【0073】

「可溶性」とは、水性環境(例えば、膜結合されていない)に自由に拡散できるポリペプチドを意味する。

【0074】

「特異的に結合する」とは、目的の生物学的分子(例えば、ポリペプチド)を認識および結合するが、本発明のポリペプチドを天然に含むサンプル(例えば、生物学的サンプル)中の他の分子を実質的に認識および結合しないポリペプチドもしくはそのフラグメントを意味する。

【0075】

用語「腫瘍抗原」とは、本明細書で使用される場合、正常もしくは非新生物細胞と比較して、腫瘍細胞で特異にもしくは差次的に発現される抗原(例えば、ポリペプチド、糖タンパク質、もしくは糖脂質)をいう。本発明に関して、腫瘍抗原は、抗原認識レセプターによって認識され得る(例えば、C D 19、M u c - 1)か、またはレセプター-リガンド結合を介して免疫応答を抑制し得る(例えば、C D 47、P D - L 1 / L 2、87.112)、腫瘍によって発現される任意のポリペプチドを含む。

【0076】

「組織抗原」とは、腫瘍細胞と比較して、正常もしくは非新生物の細胞もしくは組織で特異にもしくは差次的に発現される抗原(例えば、ポリペプチドもしくは糖タンパク質もしくは糖脂質)を意味する。

【0077】

「ウイルス抗原」とは、免疫応答を誘発し得る、ウイルスによって発現されるポリペプチドを意味する。

【0078】

用語「c o m p r i s e s (含む、包含する)」、「c o m p r i s i n g (含む、包含する)」は、米国特許法でそれらに与えられた広い意味を有すると解釈され、「i n c l u d e s (含む、包含する)」、「i n c l u d i n g (含む、包含する)」などを意味し得る。

【0079】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「処置」とは、処置されている個体もしくは細胞の疾患過程を変化させようとの試みにおける臨床介入をいい、予防のために、または臨床病理の過程の間のいずれかに行われ得る。処置の治療効果としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：疾患の発生もしくは再発の防止、症状の緩和、上記疾患の任意の直接的もしくは間接的な病的転帰の減少、転移の防止、疾患進行の速度の低下、疾患状態の改善もしくは軽減、ならびに緩解もしくは予後の改善。疾患もしくは障害の進行を防止することによって、処置は、罹患した被験体もしくは診断された被験体、または障害を有すると疑われる被験体の上記障害に起因する悪化を防止し得るが、同様に、処置は、上記障害のリスクがあるか、もしくは上記障害を有すると疑われている被験体における上記障害の始まりまたは上記障害の症状を防止し得る。

10

【0080】

用語「被験体」とは、本明細書で使用される場合、脊椎動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトをいう。

【0081】

用語「免疫システムが損なわれている」とは、本明細書で使用される場合、免疫不全を有する被験体をいう。上記被験体は、日和見感染、健康な免疫系を有する個体では疾患を通常引き起こさないが、十分に機能しないかもしくは抑制された免疫系を有する人々には影響を及ぼし得る生物によって引き起こされる感染症に対して非常に攻撃されやすい。

【0082】

本発明の他の局面は、以下の開示に記載され、本発明の範囲内にある。

20

【0083】

以下の詳細な説明は、例示によって与えられるが、本発明に記載される具体的実施形態に限定するとは意図されず、添付の図面に関連して記載され得る。

【図面の簡単な説明】**【0084】**

【図1-1】図1A~1Dは、iCARストラテジー、設計および初代ヒトT細胞における発現を表す。(A)腫瘍およびオフターゲット組織の両方に対して特異性を有するT細胞は、オフターゲット組織を保護するために、上記T細胞に導入される抗原特異的iCARを使用することによって、腫瘍のみに制限され得る。(B)iCARおよびPdelのために使用されるバイシストロンベクターの模式図。iCAR-P：各阻害レセプターのスペーサー、膜貫通、および細胞内テールを、CD8リーダー配列(LS)を有する以前に記載されたレトロウイルスベクターにクローニングした。IRES、内部リボソーム侵入部位；hrGFP、ヒト化Renilla緑色蛍光タンパク質レセプター。Pdelコントロールベクターを、スペーサーおよびCD8膜貫通(TM)ドメインで、および細胞内テールを欠如させて設計した。(C)上記iCARの細胞表面発現を、フローサイトメトリーによって、形質導入した初代ヒトT細胞において評価した。ドットプロットは、8種の異なるドナーの代表である。GAM、上記CARのマウス由来細胞外ドメインに結合する、ヤギ抗マウス免疫グロブリンG₁F(ab')₂抗体。(D)形質導入した初代ヒトT細胞においてヤギ抗マウス(GAM)染色を使用する上記iCARの細胞表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。

30

40

【図1-2】図1A~1Dは、iCARストラテジー、設計および初代ヒトT細胞における発現を表す。(A)腫瘍およびオフターゲット組織の両方に対して特異性を有するT細胞は、オフターゲット組織を保護するために、上記T細胞に導入される抗原特異的iCARを使用することによって、腫瘍のみに制限され得る。(B)iCARおよびPdelのために使用されるバイシストロンベクターの模式図。iCAR-P：各阻害レセプターのスペーサー、膜貫通、および細胞内テールを、CD8リーダー配列(LS)を有する以前に記載されたレトロウイルスベクターにクローニングした。IRES、内部リボソーム侵入部位；hrGFP、ヒト化Renilla緑色蛍光タンパク質レセプター。Pdelコントロールベクターを、スペーサーおよびCD8膜貫通(TM)ドメインで、および細胞内テールを欠如させて設計した。(C)上記iCARの細胞表面発現を、フローサイトメ

50

トリーによって、形質導入した初代ヒトT細胞において評価した。ドットプロットは、8種の異なるドナーの代表である。GAM、上記CARのマウス由来細胞外ドメインに結合する、ヤギ抗マウス免疫グロブリンG F (a b ') 2抗体。(D)形質導入した初代ヒトT細胞においてヤギ抗マウス(GAM)染色を使用する上記iCARの細胞表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。

【図1-3】図1A~1Dは、iCARストラテジー、設計および初代ヒトT細胞における発現を表す。(A)腫瘍およびオフターゲット組織の両方に対して特異性を有するT細胞は、オフターゲット組織を保護するために、上記T細胞に導入される抗原特異的iCARを使用することによって、腫瘍のみに制限され得る。(B)iCARおよびPdelのために使用されるバイシストロンベクターの模式図。iCAR-P:各阻害レセプターのスペーサー、膜貫通、および細胞内テールを、CD8リーダー配列(LS)を有する以前に記載されたレトロウイルスベクターにクローニングした。IRES、内部リボソーム侵入部位;hrGFP、ヒト化Renilla緑色蛍光タンパク質レセプター。Pdelコントロールベクターを、スペーサーおよびCD8膜貫通(TM)ドメインで、および細胞内テールを欠如させて設計した。(C)上記iCARの細胞表面発現を、フローサイトメトリーによって、形質導入した初代ヒトT細胞において評価した。ドットプロットは、8種の異なるドナーの代表である。GAM、上記CARのマウス由来細胞外ドメインに結合する、ヤギ抗マウス免疫グロブリンG F (a b ') 2抗体。(D)形質導入した初代ヒトT細胞においてヤギ抗マウス(GAM)染色を使用する上記iCARの細胞表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。

【0085】

【図2-1】図2A~2Fは、iCARが、TCR媒介性同種異系反応からiPS-fibを保護したことを示す。同種異系moDCで刺激した、コントロールPdel形質導入もしくはiCAR形質導入したT細胞を、ある範囲のE/T比を使用して、moDCに同系のコメツキムシルシフェラーゼ(CBL)を発現するiPS由来線維芽細胞(iPS-fib)とともにインキュベートした。(A)標的iPS-fibに対して反応するPdel形質導入T細胞、PD-1形質導入T細胞、もしくはmutCTLA-4 iCAR-P形質導入T細胞(n=3/条件)。上記iPS-fibの死滅を、Bright-Gloアッセイ系で定量した。(B)4:1 E/T比での(A)からの細胞培養上清中のサイトカイン分泌を、18時間で評価した。GM-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子;IFN-、インターフェロン-g;TNF-、腫瘍壊死因子-a。(C)Pdel陽性もしくはiCAR陽性のT細胞を、24時間、PSMAを発現するオフターゲットiPS-fib(iPS-fib-PSMA)とともにインキュベートし、ルシフェラーゼシグナル(左)を、定量した(右)(n=3/各条件)。(D~F)(C)からの細胞培養上清中で、24時間で測定したサイトカイン分泌。エラーバーは、±SEMを表す。iCARとPdelとを比較する分散分析(ANOVA)、およびHolm-Sidak法で較正した多重t検定(multiple t tests)での事後分析によって、*P<0.01、***P<0.001。生データおよびP値を、図19A~19Eに提供する。

【図2-2】図2A~2Fは、iCARが、TCR媒介性同種異系反応からiPS-fibを保護したことを示す。同種異系moDCで刺激した、コントロールPdel形質導入もしくはiCAR形質導入したT細胞を、ある範囲のE/T比を使用して、moDCに同系のコメツキムシルシフェラーゼ(CBL)を発現するiPS由来線維芽細胞(iPS-fib)とともにインキュベートした。(A)標的iPS-fibに対して反応するPdel形質導入T細胞、PD-1形質導入T細胞、もしくはmutCTLA-4 iCAR-P形質導入T細胞(n=3/条件)。上記iPS-fibの死滅を、Bright-Gloアッセイ系で定量した。(B)4:1 E/T比での(A)からの細胞培養上清中のサイトカイン分泌を、18時間で評価した。GM-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子;IFN-、インターフェロン-g;TNF-、腫瘍壊死因子-a。(C)Pdel陽性もしくはiCAR陽性のT細胞を、24時間、PSMAを発現するオフタ

ターゲット*iPS-fib* (*iPS-fib-PSMA*)とともにインキュベートし、ルシフェラーゼシグナル(左)を、定量した(右) ($n = 3$ / 各条件)。(D~F)(C)からの細胞培養上清中で、24時間で測定したサイトカイン分泌。エラーバーは、 \pm SEMを表す。*iCAR*と*Pdel*とを比較する分散分析(ANOVA)、およびHolm-Sidak法で較正した多重t検定(multiple t tests)での事後分析によって、 $* P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。生データおよびP値を、図19A~19Eに提供する。

【図2-3】図2A~2Fは、*iCAR*が、TCR媒介性同種異系反応から*iPS-fib*を保護したことを示す。同種異系*modC*で刺激した、コントロール*Pdel*形質導入もしくは*iCAR*形質導入したT細胞を、ある範囲のE/T比を使用して、*modC*に同系のコメツキムシルシフェラーゼ(CBL)を発現する*iPS*由来線維芽細胞(*iPS-fib*)とともにインキュベートした。(A)標的*iPS-fib*に対して反応する*Pdel*形質導入T細胞、PD-1形質導入T細胞、もしくは*mutCTLA-4 iCAR-P*形質導入T細胞 ($n = 3$ / 条件)。上記*iPS-fib*の死滅を、Bright-Gloアッセイ系で定量した。(B)4:1 E/T比での(A)からの細胞培養上清中のサイトカイン分泌を、18時間で評価した。GM-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子; IFN- γ 、インターフェロン-g; TNF- α 、腫瘍壊死因子-a。(C) *Pdel*陽性もしくは*iCAR*陽性のT細胞を、24時間、*PSMA*を発現するターゲット*iPS-fib* (*iPS-fib-PSMA*)とともにインキュベートし、ルシフェラーゼシグナル(左)を、定量した(右) ($n = 3$ / 各条件)。(D~F)(C)からの細胞培養上清中で、24時間で測定したサイトカイン分泌。エラーバーは、 \pm SEMを表す。*iCAR*と*Pdel*とを比較する分散分析(ANOVA)、およびHolm-Sidak法で較正した多重t検定(multiple t tests)での事後分析によって、 $* P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。生データおよびP値を、図19A~19Eに提供する。

【0086】

【図3-1】図3A~3Dは、*iCAR*が化学量論的様式で機能したことを示す。(A) *Pdel*形質導入したかもしくはPD-1 *iCAR-P*形質導入したアロ反応性T細胞を、図13Aに示されるように、各それぞれのレセプターの高発現もしくは低発現についてソートし、*iPS-fib-PSMA*発現CBLに播種した。未処理細胞と比較した*iPS-fib-PSMA*の死滅を、Bright-Gloアッセイ系で評価した(各条件につき $n = 3$)。(B)4:1 E/T比率で(A)からの細胞培養上清中で24時間で測定したサイトカイン分泌。(C)PD-1 *iCAR-P*形質導入したアロ反応性T細胞を、図13Bに示されるように*PSMA*発現の高レベルもしくは低レベルについてソートした*iPS-fib-PSMA*とともにインキュベートした。未処理細胞と比較した各集団の死滅を、Bright-Gloアッセイ系で定量した($n = 3$ / 条件)。(D)(C)からのサイトカインを、24時間で評価した。エラーバーは、 \pm SEMを表す。スチューデントt検定による $*** P < 0.001$ 。エラーバーは、 \pm SEMを表す。高*Pdel*群に対して比較するANOVAおよびHolm-Sidak法で較正した多重t検定での事後分析による $* P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。生データおよびP値を、図20Aおよび図20Bに提供する。

【図3-2】図3A~3Dは、*iCAR*が化学量論的様式で機能したことを示す。(A) *Pdel*形質導入したかもしくはPD-1 *iCAR-P*形質導入したアロ反応性T細胞を、図13Aに示されるように、各それぞれのレセプターの高発現もしくは低発現についてソートし、*iPS-fib-PSMA*発現CBLに播種した。未処理細胞と比較した*iPS-fib-PSMA*の死滅を、Bright-Gloアッセイ系で評価した(各条件につき $n = 3$)。(B)4:1 E/T比率で(A)からの細胞培養上清中で24時間で測定したサイトカイン分泌。(C)PD-1 *iCAR-P*形質導入したアロ反応性T細胞を、図13Bに示されるように*PSMA*発現の高レベルもしくは低レベルについてソートした*iPS-fib-PSMA*とともにインキュベートした。未処理細胞と比較した各

集団の死滅を、Bright-Gloアッセイ系で定量した ($n = 3$ / 条件)。D) (C) からのサイトカインを、24時間で評価した。エラーバーは、 \pm SEMを表す。スチューデントt検定による $*** P < 0.001$ 。エラーバーは、 \pm SEMを表す。高Pdel群に対して比較するANOVAおよびHolm-Sidak法で校正した多重t検定での事後分析による $* P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。生データおよびP値を、図20Aおよび図20Bに提供する。

【0087】

【図4】図4Aおよび図4Bは、iCARがインビボで同種異系応答を制限したことを示す。NOD/SCID/β₂-マウスに、CBL/PSMAを発現する 1×10^6 iPS由来線維芽細胞 (iPS-fib-PSMA) を腹腔内注射し、7日後、 5×10^5 PD-1 iCAR-P形質導入もしくはPdel形質導入し、ソートしたアロ反応性T細胞を腹腔内に処置した。未処置マウス (T細胞なし) をコントロールとして使用した。(A) iPS-fib-PSMAの生存を、T細胞注入の前および後の選択された時点でBLIによって評価した。各群の4匹の代表的マウスの画像を示す。(B) 各マウスの全ボディーフラックス (Total body flux) (光子/秒) を、定量し、1群あたりで平均した ($n = 5$ / 群)。エラーバーは、 \pm SEMを表す。Pdelと比較するANOVAおよびHolm-Sidak法で校正した多重t検定での事後分析によって、 $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 。生データおよびP値を、図21Aおよび図21Bに提供する。

【0088】

【図5-1】図5A~5Fは、iCARがヒトT細胞サイトカイン放出、増殖、および19-28z CARによって駆動される標的細胞排除を阻害したことを示す。(A) 二重ソートした19-28z/Pdel形質転換したかもしくは19-28z/iCAR形質転換したヒトT細胞を、3T3-CD19 (標的) もしくは3T3-CD19-PSMA (オフターゲット) AAPCに播種した24時間後の培養上清のルミネックス多重サイトカイン分析。データを、オフターゲット値/ターゲット値の比として表し、3回の独立した実験からプールする ($n = 6$ ウェル/条件)。エラーバーは、 \pm SEMを表す。iCARをPdelと比較するANOVAおよびHolm-Sidak法で校正した多重t検定での事後分析によって、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。(B) 0日目および7日目にオフターゲットAAPCで刺激した19-28z/Pdelもしくは19-28z/iCAR T細胞の絶対数。外因性のサイトカインは添加しなかった。データは、6回の独立した実験の代表である。(C) 標的AAPCに関する増殖と比較する、0日目および7日目にオフターゲットAAPCで刺激した19-28z/Pdelもしくは19-28z/iCAR T細胞の増殖。外因性サイトカインは添加しなかった。データは、6回の独立した実験の代表である。(D) T細胞を、1:1比で標的およびオフターゲットmCherry⁺ AAPCに播種した。5回の独立した実験のうちの1回からの38時間および5日の画像を示す。スケールバー、0.5mm。(EおよびF) 材料および方法に記載されるように、mCD19標的 (E) もしくはCD19-PSMAオフターゲット細胞 (F) に対する (D) からのCherryシグナルの定量。エラーバーは、 \pm SEMを表す。スチューデントt検定によって $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。生データおよびP値を、図22A~図22Cに提供する。

【図5-2】図5A~5Fは、iCARがヒトT細胞サイトカイン放出、増殖、および19-28z CARによって駆動される標的細胞排除を阻害したことを示す。(A) 二重ソートした19-28z/Pdel形質転換したかもしくは19-28z/iCAR形質転換したヒトT細胞を、3T3-CD19 (標的) もしくは3T3-CD19-PSMA (オフターゲット) AAPCに播種した24時間後の培養上清のルミネックス多重サイトカイン分析。データを、オフターゲット値/ターゲット値の比として表し、3回の独立した実験からプールする ($n = 6$ ウェル/条件)。エラーバーは、 \pm SEMを表す。iCARをPdelと比較するANOVAおよびHolm-Sidak法で校正した多重t検定での事後分析によって、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。(B) 0日目および

7日目にオフターゲットAAPCで刺激した19-28z/Pde1もしくは19-28z/iCAR T細胞の絶対数。外因性のサイトカインは添加しなかった。データは、6回の独立した実験の代表である。(C)標的AAPCに関する増殖と比較する、0日目および7日目にオフターゲットAAPCで刺激した19-28z/Pde1もしくは19-28z/iCAR T細胞の増殖。外因性サイトカインは添加しなかった。データは、6回の独立した実験の代表である。(D)T細胞を、1:1比で標的およびオフターゲットmCherry⁺ AAPCに播種した。5回の独立した実験のうちの1回からの38時間および5日の画像を示す。スケールバー、0.5 mm。(EおよびF)材料および方法に記載されるように、mCD19標的(E)もしくはCD19-PSMAオフターゲット細胞(F)に対する(D)からのCherryシグナルの定量。エラーバーは、±SEMを表す。スチューデントt検定によって**P<0.01、***P<0.001。生データおよびP値を、図22A~図22Cに提供する。

【図5-3】図5A~5Fは、iCARがヒトT細胞サイトカイン放出、増殖、および19-28z CARによって駆動される標的細胞排除を阻害したことを示す。(A)二重ソートした19-28z/Pde1形質転換したかもしくは19-28z/iCAR形質転換したヒトT細胞を、3T3-CD19(標的)もしくは3T3-CD19-PSMA(オフターゲット)AAPCに播種した24時間後の培養上清のルミネックス多重サイトカイン分析。データを、オフターゲット値/ターゲット値の比として表し、3回の独立した実験からプールする(n=6ウェル/条件)。エラーバーは、±SEMを表す。iCARをPde1と比較するANOVAおよびHolm-Sidak法で較正した多重t検定の事後分析によって、**P<0.01、***P<0.001。(B)0日目および7日目にオフターゲットAAPCで刺激した19-28z/Pde1もしくは19-28z/iCAR T細胞の絶対数。外因性のサイトカインは添加しなかった。データは、6回の独立した実験の代表である。(C)標的AAPCに関する増殖と比較する、0日目および7日目にオフターゲットAAPCで刺激した19-28z/Pde1もしくは19-28z/iCAR T細胞の増殖。外因性サイトカインは添加しなかった。データは、6回の独立した実験の代表である。(D)T細胞を、1:1比で標的およびオフターゲットmCherry⁺ AAPCに播種した。5回の独立した実験のうちの1回からの38時間および5日の画像を示す。スケールバー、0.5 mm。(EおよびF)材料および方法に記載されるように、mCD19標的(E)もしくはCD19-PSMAオフターゲット細胞(F)に対する(D)からのCherryシグナルの定量。エラーバーは、±SEMを表す。スチューデントt検定によって**P<0.01、***P<0.001。生データおよびP値を、図22A~図22Cに提供する。

【0089】

【図6-1】図6A~6Fは、iCARが19-28z CAR標的細胞特異性をインビボで制限したことを示す。(A)ソートした19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞で処置したNOD/SCID/γ⁻マウスにおけるNALM/6もしくはNALM/6-PSMAの腫瘍進行を示すBLI。未処置マウス(T細胞なし)をコントロールとして使用した。(B)各マウスの腫瘍量を定量し、平均総フラックス/群を示す。(C)21日目に屠殺した(A)のマウスの脾臓重量。各ドットは、1匹のレシピエントマウスを表す。(D)腫瘍細胞(CD19⁺GFP⁺)およびT細胞(CD19-19-28z/GFP⁺CD4⁺CD8⁺)の存在に関する(C)の大腿骨髄のフローサイトメトリー分析。19-28z発現を、LNGFRレセプター(その相補的DNA(cDNA)が19-28zに連結され、検出マーカーとして使用される)を染色することによって評価した。(EおよびF)(C)の脾臓中の腫瘍細胞の絶対数(E)およびCD19-19-28z/GFP⁺CD4⁺CD8⁺ T細胞の絶対数(F)を、CountBrightビーズでのフローサイトメトリーによって定量した(n=4)。エラーバーは、±SEMを表す。スチューデントt検定によって**P<0.01、***P<0.001。

【図6-2】図6A~6Fは、iCARが19-28z CAR標的細胞特異性をインビボで制限したことを示す。(A)ソートした19-28z/PD-1 iCAR-P T

細胞で処置したNOD/SCID/β₂-マウスにおけるNALM/6もしくはNALM/6-PSMAの腫瘍進行を示すBLI。未処置マウス(T細胞なし)をコントロールとして使用した。(B)各マウスの腫瘍量を定量し、平均総フラックス/群を示す。(C)21日目に屠殺した(A)のマウスの脾臓重量。各ドットは、1匹のレシピエントマウスを表す。(D)腫瘍細胞(CD19⁺GFP⁺)およびT細胞(CD19⁻19-28z/GFP⁺CD4⁺CD8⁺)の存在に関する(C)の大腿骨髄のフローサイトメトリー分析。19-28z発現を、LNGFRレセプター(その相補的DNA(cDNA)が19-28zに連結され、検出マーカーとして使用される)を染色することによって評価した。(EおよびF)(C)の脾臓中の腫瘍細胞の絶対数(E)およびCD19⁻19-28z/GFP⁺CD4⁺CD8⁺T細胞の絶対数(F)を、CountBrightビーズでのフローサイトメトリーによって定量した(n=4)。エラーバーは、±SEMを表す。スチューデントt検定によって**P<0.01、***P<0.001。

【図6-3】図6A~6Fは、iCARが19-28z CAR標的細胞特異性をインビボで制限したことを示す。(A)ソートした19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞で処置したNOD/SCID/β₂-マウスにおけるNALM/6もしくはNALM/6-PSMAの腫瘍進行を示すBLI。未処置マウス(T細胞なし)をコントロールとして使用した。(B)各マウスの腫瘍量を定量し、平均総フラックス/群を示す。(C)21日目に屠殺した(A)のマウスの脾臓重量。各ドットは、1匹のレシピエントマウスを表す。(D)腫瘍細胞(CD19⁺GFP⁺)およびT細胞(CD19⁻19-28z/GFP⁺CD4⁺CD8⁺)の存在に関する(C)の大腿骨髄のフローサイトメトリー分析。19-28z発現を、LNGFRレセプター(その相補的DNA(cDNA)が19-28zに連結され、検出マーカーとして使用される)を染色することによって評価した。(EおよびF)(C)の脾臓中の腫瘍細胞の絶対数(E)およびCD19⁻19-28z/GFP⁺CD4⁺CD8⁺T細胞の絶対数(F)を、CountBrightビーズでのフローサイトメトリーによって定量した(n=4)。エラーバーは、±SEMを表す。スチューデントt検定によって**P<0.01、***P<0.001。

【0090】

【図7-1】図7A~7Dは、iCAR機能が一時的かつ可逆的であったことを示す。(A)19-28z/Pdelもしくは19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞を、標的(T)もしくはオフターゲット(O) AAPCとともに最初の刺激の間インキュベートする。3日後もしくは7日後、各群の細胞を、いずれかの標的[T T(1)もしくはO T(2)]またはオフターゲット[T O(3)もしくはO O(4)] AAPCで、その後のT細胞機能に対する第1の刺激の効果を分析するために、三目並べ様式(crissscross manner)で再刺激した。(B)各T細胞群(第2の刺激)でのインキュベーション後24時間における標的(T)もしくはオフターゲット(O) AAPCの死滅を、Bright-Gloアッセイ系で分析した(各条件につきn=3)。(C)(B)からの細胞培養上清中のエフェクターサイトカインの分泌を、第2の刺激の24時間後に分析した。インターフェロン-γ(IFN-γ)を、代表的結果として示す(各条件につきn=3)。(D)第2の刺激後7日目でのT細胞増殖(各条件につきn=3)。エラーバーは、±SEMを表す。統計比較を、各条件内で行った(すなわち、T T Pdel 対 PD-1 iCAR-P)。スチューデントt検定によって**P<0.001。

【図7-2】図7A~7Dは、iCAR機能が一時的かつ可逆的であったことを示す。(A)19-28z/Pdelもしくは19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞を、標的(T)もしくはオフターゲット(O) AAPCとともに最初の刺激の間インキュベートする。3日後もしくは7日後、各群の細胞を、いずれかの標的[T T(1)もしくはO T(2)]またはオフターゲット[T O(3)もしくはO O(4)] AAPCで、その後のT細胞機能に対する第1の刺激の効果を分析するために、三目並べ様式(crissscross manner)で再刺激した。(B)各T細胞群(第2の刺激)でのインキュベーション後24時間における標的(T)もしくはオフターゲット(O)

AAPCの死滅を、Bright-Gloアッセイ系で分析した（各条件につき $n = 3$ ）。（C）（B）からの細胞培養上清中のエフェクターサイトカインの分泌を、第2の刺激の24時間後に分析した。インターフェロン- γ （IFN- γ ）を、代表的結果として示す（各条件につき $n = 3$ ）。（D）第2の刺激後7日目でのT細胞増殖（各条件につき $n = 3$ ）。エラーバーは、 \pm SEMを表す。統計比較を、各条件内で行った（すなわち、T T Pdel 対 PD-1 iCAR-P）。スチューデントt検定によって **
 $^{*} P < 0.001$ 。

【0091】

【図8-1】図8A~8Eは、iCAR発現T細胞およびCAR発現T細胞が、インビトロおよびインビボで標的を識別したことを示す。（A）19-28z/Pdelもしくは19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞を、標的（CD19 $^{+}$ GFP $^{+}$ ，緑）およびオフターゲット（CD19 $^{+}$ PSMA $^{+}$ mCherry $^{+}$ ，赤）AAPCの1:1ミックスとともにインキュベートし、微速度顕微鏡検査法（time-lapse microscopy）を使用して、各集団のリアルタイム死滅を38時間にわたって可視化した。代表的画像を示し、ノーカット動画（full-length movies）を作製した。スケールバーは0.1mm。（B）（A）のように、19-28z/Pdelもしくは19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞を、標的（CD19 $^{+}$ ）およびオフターゲット（CD19 $^{+}$ PSMA $^{+}$ ）AAPCの1:1ミックスとインキュベートした。各AAPC集団の死滅を、各AAPCタイプのうちの1つをCBL（CD19 $^{+}$ CBL $^{+}$ /CD19 $^{+}$ PSMA $^{+}$ ミックスもしくはCD19 $^{+}$ /CD19 $^{+}$ PSMA $^{+}$ CBL $^{+}$ ミックス）で標識する並行実験において評価した。死滅を、38時間でBright-Gloアッセイ系で定量した（各条件につき $n = 3$ ）。（C~E）NOD/SCID/c-mouseに、NALM/6細胞およびNALM/6-PSMA細胞の1:1混合物を注射し、19-28zもしくは19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞で処置した。（C）屠殺の際に、骨髄の中の標的およびオフターゲットNALM/6細胞の存在を、フローサイトメトリーによって分析した。（D）屠殺したマウスの骨髄の中の標的/オフターゲットNALM/6細胞の比を、フローサイトメトリーによって定量した。（E）処置したマウスの脾臓重量もまた、屠殺時に記録した。エラーバーは、 \pm SEMを表す。スチューデントt検定によって $^{***} P < 0.001$ 。

【図8-2】図8A~8Eは、iCAR発現T細胞およびCAR発現T細胞が、インビトロおよびインビボで標的を識別したことを示す。（A）19-28z/Pdelもしくは19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞を、標的（CD19 $^{+}$ GFP $^{+}$ ，緑）およびオフターゲット（CD19 $^{+}$ PSMA $^{+}$ mCherry $^{+}$ ，赤）AAPCの1:1ミックスとともにインキュベートし、微速度顕微鏡検査法（time-lapse microscopy）を使用して、各集団のリアルタイム死滅を38時間にわたって可視化した。代表的画像を示し、ノーカット動画（full-length movies）を作製した。スケールバーは0.1mm。（B）（A）のように、19-28z/Pdelもしくは19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞を、標的（CD19 $^{+}$ ）およびオフターゲット（CD19 $^{+}$ PSMA $^{+}$ ）AAPCの1:1ミックスとインキュベートした。各AAPC集団の死滅を、各AAPCタイプのうちの1つをCBL（CD19 $^{+}$ CBL $^{+}$ /CD19 $^{+}$ PSMA $^{+}$ ミックスもしくはCD19 $^{+}$ /CD19 $^{+}$ PSMA $^{+}$ CBL $^{+}$ ミックス）で標識する並行実験において評価した。死滅を、38時間でBright-Gloアッセイ系で定量した（各条件につき $n = 3$ ）。（C~E）NOD/SCID/c-mouseに、NALM/6細胞およびNALM/6-PSMA細胞の1:1混合物を注射し、19-28zもしくは19-28z/PD-1 iCAR-P T細胞で処置した。（C）屠殺の際に、骨髄の中の標的およびオフターゲットNALM/6細胞の存在を、フローサイトメトリーによって分析した。（D）屠殺したマウスの骨髄の中の標的/オフターゲットNALM/6細胞の比を、フローサイトメトリーによって定量した。（E）処置したマウスの脾臓重量もまた、屠殺時に記録した。エラーバーは、 \pm SEMを表す。スチューデントt検定によって $^{***} P < 0.001$ 。

【0092】

【図9】図9A～Cは、CTLA-4 iCAR細胞表面発現がT細胞活性化の後に増大したことを示す。(A)形質転換した初代ヒトT細胞でのCTLA-4 iCAR-Pの細胞表面および細胞内発現。(B)形質導入していない(2)およびCTLA-4 iCAR-P形質導入した(1)初代ヒトT細胞でのCTLA-4の細胞内ドメインに特異的な抗体を使用するウェスタンブロット分析。マウスEL4細胞(3)を、陰性コントロールとして供した。(C)19-28z/CTLA-4 iCAR T細胞を、3T3-19 AAPCを使用して活性化し、活性化の7時間後および30時間後での細胞表面CTLA-4 iCAR発現を分析した(n=3)。

【0093】

【図10】図10は、iCAR-PがPSMA発現細胞に結合したことを示す。EL4-wt細胞もしくはEL4-PSMA細胞(親油性DiD色素で標識した)を、細胞結合体化アッセイ(cellular conjugation assay)においてiCAR/GFP発現T細胞とともにインキュベートした。結合体を、DiD/GFP二重陽性事象としてフローサイトメトリーによって検出した。

【0094】

【図11-1】図11A～11Dは、iPS由来線維芽細胞および同遺伝子型moDCを使用する同種異系反応性モデルを表す。(A)人工多能性幹(iPS)細胞を、ドナー1 PBMCから生成し、これを使用して線維芽細胞を得た。ドナー1 PBMCもまた使用して、moDCを得、これに、線維芽細胞溶解物を適用したところ、第2のドナーのPBMCからの同種異系反応を刺激できた。(B)培養物中で増殖させた奇形腫由来iPS線維芽細胞の形態を示す顕微鏡写真。(C)多能性マーカーの発現を欠いているiPS-fibは、線維芽細胞形態を示し、CD90、PDGFR-b2、およびCD10を含むいくつかの線維芽細胞表面マーカーについて陽性染色であった。(RED=アイソタイプコントロール; BLUEおよびGREENは、2つの独立した単離された系統である)(D)iPS-fibは、HLAクラスIに対しては基本的に陽性染色されるが、クラスIIに対しては染色されず、組換えINF 処置の際に両方の発現を休息にアップレギュレートした。

【図11-2】図11A～11Dは、iPS由来線維芽細胞および同遺伝子型moDCを使用する同種異系反応性モデルを表す。(A)人工多能性幹(iPS)細胞を、ドナー1 PBMCから生成し、これを使用して線維芽細胞を得た。ドナー1 PBMCもまた使用して、moDCを得、これに、線維芽細胞溶解物を適用したところ、第2のドナーのPBMCからの同種異系反応を刺激できた。(B)培養物中で増殖させた奇形腫由来iPS線維芽細胞の形態を示す顕微鏡写真。(C)多能性マーカーの発現を欠いているiPS-fibは、線維芽細胞形態を示し、CD90、PDGFR-b2、およびCD10を含むいくつかの線維芽細胞表面マーカーについて陽性染色であった。(RED=アイソタイプコントロール; BLUEおよびGREENは、2つの独立した単離された系統である)(D)iPS-fibは、HLAクラスIに対しては基本的に陽性染色されるが、クラスIIに対しては染色されず、組換えINF 処置の際に両方の発現を休息にアップレギュレートした。

【0095】

【図12】図12A～12Cは、同種異系iPS由来線維芽細胞に対するiCAR形質導入初代ヒトT細胞の強力な反応性を示す。(A)一方のドナーに由来するiCAR形質導入T細胞を、異なるドナーのiPS-fib溶解物を添加したmoDCで刺激し、6日後に、活性化マーカーCD25およびHLA-DRに対して染色した。(B)2回刺激したiCAR形質導入T細胞を、iPS-fib-lucとともに18時間インキュベートし、Bright-Gloアッセイ系を使用して死滅を定量した(各条件につきn=3)。(C)サイトカインを、4:1 E:T比で(B)の細胞培養上清中、18時間で測定した。エラーバーは、±SEMを表す。統計比較を、各条件内で行った(すなわち、T₁T)。スチューデントt検定によって***p<0.001。

10

20

30

40

50

【0096】

【図13-1】図13Aおよび13Bは、iCARもしくは19-28z/iCAR T細胞の形質導入およびソートストラテジーを表す。(A)PD1-iCAR(GFP)形質導入T細胞もしくはPde1(GFP)形質導入T細胞を、GFP発現レベルに基づいて、導入遺伝子発現に関してソートした。各ドナーは、別個の実験を表す。ソート後分析を行った、純度を検証した。(B)19-28z(LNGFR)/iCAR(GFP)形質導入T細胞もしくは19-28z/Pde1/GFP形質導入T細胞を、GFP発現およびLNGFRレベルに基づいて、導入遺伝子発現に関してソートした。各ドナーは、別個の実験を表す。ソート後分析を行って、純度およびiCAR発現を検証した。

【図13-2】図13Aおよび13Bは、iCARもしくは19-28z/iCAR T細胞の形質導入およびソートストラテジーを表す。(A)PD1-iCAR(GFP)形質導入T細胞もしくはPde1(GFP)形質導入T細胞を、GFP発現レベルに基づいて、導入遺伝子発現に関してソートした。各ドナーは、別個の実験を表す。ソート後分析を行った、純度を検証した。(B)19-28z(LNGFR)/iCAR(GFP)形質導入T細胞もしくは19-28z/Pde1/GFP形質導入T細胞を、GFP発現およびLNGFRレベルに基づいて、導入遺伝子発現に関してソートした。各ドナーは、別個の実験を表す。ソート後分析を行って、純度およびiCAR発現を検証した。

【0097】

【図14-1】図14Aおよび14Bは、低/高iCAR発現T細胞およびPSMA発現iPS線維芽細胞のソートストラテジーを表す。(A)PD1-iCAR/GFP形質導入T細胞もしくはPde1/GFP形質導入T細胞を、GFP発現レベルに基づいて、低いもしくは高い導入遺伝子発現に関してソートした。(B)iPS由来線維芽細胞(iPS-fib)を、PSMAを発現するように形質導入し、抗PSMA抗体を使用してソートした(iPS-fib-PSMAソートバルク+)。これら細胞を、図2および図4における実験に使用した。第2の別個のソートを、抗PSMA抗体を使用して低いもしくは高い表面PSMA発現iPS-fibを精製するために使用し、これら細胞を、図3における実験に使用した。

【図14-2】図14Aおよび14Bは、低/高iCAR発現T細胞およびPSMA発現iPS線維芽細胞のソートストラテジーを表す。(A)PD1-iCAR/GFP形質導入T細胞もしくはPde1/GFP形質導入T細胞を、GFP発現レベルに基づいて、低いもしくは高い導入遺伝子発現に関してソートした。(B)iPS由来線維芽細胞(iPS-fib)を、PSMAを発現するように形質導入し、抗PSMA抗体を使用してソートした(iPS-fib-PSMAソートバルク+)。これら細胞を、図2および図4における実験に使用した。第2の別個のソートを、抗PSMA抗体を使用して低いもしくは高い表面PSMA発現iPS-fibを精製するために使用し、これら細胞を、図3における実験に使用した。

【0098】

【図15-1】図15A~15Dは、iCARが、19-28z駆動ヒトT細胞サイトカイン放出および増殖を阻害したことを示す。(A)CD19もしくはCD19およびPSMAの両方を発現する人工抗原提示細胞(AAPC)中でのヒトT細胞増殖。(B)CD19(標的)陽性もしくはCD19/PSMA(オフターゲット)陽性AAPCに、二重ソートした19-28z/Pde1形質導入ヒトT細胞もしくはiCAR形質導入ヒトT細胞を播種して24時間後および48時間後での上清の代表的INF サイトカイン分析。データは、オフターゲット/標的値の比として表され、3回の独立した実験からプールした(各条件につきn=6ウェル)。エラーバーは、±SEMを表す。(C)CD19+(標的)AAPCで0日目および7日目に刺激した二重陽性19-28z/Pde1T細胞もしくはiCAR T細胞の絶対数。(D)異種移植片NOD/SCID/cマウスモデルにおけるNALM/6細胞およびNALM/6-PSMA細胞での治療的T細胞応答の比較。

【図15-2】図15A~15Dは、iCARが、19-28z駆動ヒトT細胞サイトカ

10

20

30

40

50

イン放出および増殖を阻害したことを示す。(A) CD19もしくはCD19およびPSMAの両方を発現する人工抗原提示細胞(AAPC)中でのヒトT細胞増殖。(B) CD19(標的)陽性もしくはCD19/PSMA(オフターゲット)陽性AAPCに、二重ソートした19-28z/Pde1形質導入ヒトT細胞もしくはiCAR形質導入ヒトT細胞を播種して24時間後および48時間後での上清の代表的INF サイトカイン分析。データは、オフターゲット/標的値の比として表され、3回の独立した実験からプールした(各条件につきn=6ウェル)。エラーバーは、±SEMを表す。(C) CD19+(標的)AAPCで0日目および7日目に刺激した二重陽性19-28z/Pde1T細胞もしくはiCAR T細胞の絶対数。(D) 異種移植片NOD/SCID/c-mauモデルにおけるNALM/6細胞およびNALM/6-PSMA細胞での治療的T細胞応答の比較。

10

【0099】

【図16-1】図16A~16Iは、iCARの基礎発現が初代ヒトT細胞の機能に影響を及ぼさなかったことを示す。(A, B) 19-28z/iCAR、T細胞での形質導入後7日間は、CD3/CD28ビーズで活性化し、IL-2/INF レベルを、24時間後に評価した。(C) ビーズ活性化後8日間で、絶対T細胞増大を、CountBrightビーズを使用して定量し、(D) 各iCAR群におけるGFP陽性細胞の%変化を、非刺激細胞に対して正規化した。(E) 19-28z/iCAR T細胞を、照射したEL4-WT細胞もしくはEL4-PSMA細胞とともに5日間共培養し、フローサイトメトリーを使用して免疫表現型を決定した。(F) は、親油性DiD色素で標識し、iCAR発現T細胞とともにインキュベートしたEL4-wt細胞もしくはEL4-PSMA細胞の細胞結合体化アッセイを示す。(G) は、19-28z/iCARでの形質導入後7日間に、CD3/CD28ビーズでの活性化後24時間でのT細胞におけるIL-2/INF レベルを示すグラフを表す。(H) は、ビーズ活性化後8日間で、CountBrightビーズを使用する絶対T細胞増大の定量を示すグラフである。(I) は、非刺激細胞に対して計算した各iCAR群におけるGFP陽性細胞の%変化を示すグラフである。

20

【図16-2】図16A~16Iは、iCARの基礎発現が初代ヒトT細胞の機能に影響を及ぼさなかったことを示す。(A, B) 19-28z/iCAR、T細胞での形質導入後7日間は、CD3/CD28ビーズで活性化し、IL-2/INF レベルを、24時間後に評価した。(C) ビーズ活性化後8日間で、絶対T細胞増大を、CountBrightビーズを使用して定量し、(D) 各iCAR群におけるGFP陽性細胞の%変化を、非刺激細胞に対して正規化した。(E) 19-28z/iCAR T細胞を、照射したEL4-WT細胞もしくはEL4-PSMA細胞とともに5日間共培養し、フローサイトメトリーを使用して免疫表現型を決定した。(F) は、親油性DiD色素で標識し、iCAR発現T細胞とともにインキュベートしたEL4-wt細胞もしくはEL4-PSMA細胞の細胞結合体化アッセイを示す。(G) は、19-28z/iCARでの形質導入後7日間に、CD3/CD28ビーズでの活性化後24時間でのT細胞におけるIL-2/INF レベルを示すグラフを表す。(H) は、ビーズ活性化後8日間で、CountBrightビーズを使用する絶対T細胞増大の定量を示すグラフである。(I) は、非刺激細胞に対して計算した各iCAR群におけるGFP陽性細胞の%変化を示すグラフである。

30

40

【図16-3】図16A~16Iは、iCARの基礎発現が初代ヒトT細胞の機能に影響を及ぼさなかったことを示す。(A, B) 19-28z/iCAR、T細胞での形質導入後7日間は、CD3/CD28ビーズで活性化し、IL-2/INF レベルを、24時間後に評価した。(C) ビーズ活性化後8日間で、絶対T細胞増大を、CountBrightビーズを使用して定量し、(D) 各iCAR群におけるGFP陽性細胞の%変化を、非刺激細胞に対して正規化した。(E) 19-28z/iCAR T細胞を、照射したEL4-WT細胞もしくはEL4-PSMA細胞とともに5日間共培養し、フローサイトメトリーを使用して免疫表現型を決定した。(F) は、親油性DiD色素で標識し、iC

50

A R 発現 T 細胞とともにインキュベートした E L 4 - w t 細胞もしくは E L 4 - P S M A 細胞の細胞結合体化アッセイを示す。(G) は、19 - 28 z / i C A R での形質導入後 7 日間後に、C D 3 / C D 28 ビーズでの活性化後 24 時間での T 細胞における I L - 2 / I N F レベルを示すグラフを表す。(H) は、ビーズ活性化後 8 日間で、C o u n t B r i g h t ビーズを使用する絶対 T 細胞増大の定量を示すグラフである。(I) は、非刺激細胞に対して計算した各 i C A R 群における G F P 陽性細胞の % 変化を示すグラフである。

【図 16 - 4】図 16 A ~ 16 I は、i C A R の基礎発現が初代ヒト T 細胞の機能に影響を及ぼさなかったことを示す。(A , B) 19 - 28 z / i C A R、T 細胞での形質導入後 7 日間は、C D 3 / C D 28 ビーズで活性化し、I L - 2 / I N F レベルを、24 時間後に評価した。(C) ビーズ活性化後 8 日間で、絶対 T 細胞増大を、C o u n t B r i g h t ビーズを使用して定量し、(D) 各 i C A R 群における G F P 陽性細胞の % 変化を、非刺激細胞に対して正規化した。(E) 19 - 28 z / i C A R T 細胞を、照射した E L 4 - W T 細胞もしくは E L 4 - P S M A 細胞とともに 5 日間共培養し、フローサイトメトリーを使用して免疫表現型を決定した。(F) は、親油性 D i D 色素で標識し、i C A R 発現 T 細胞とともにインキュベートした E L 4 - w t 細胞もしくは E L 4 - P S M A 細胞の細胞結合体化アッセイを示す。(G) は、19 - 28 z / i C A R での形質導入後 7 日間後に、C D 3 / C D 28 ビーズでの活性化後 24 時間での T 細胞における I L - 2 / I N F レベルを示すグラフを表す。(H) は、ビーズ活性化後 8 日間で、C o u n t B r i g h t ビーズを使用する絶対 T 細胞増大の定量を示すグラフである。(I) は、非刺激細胞に対して計算した各 i C A R 群における G F P 陽性細胞の % 変化を示すグラフである。

【図 16 - 5】図 16 A ~ 16 I は、i C A R の基礎発現が初代ヒト T 細胞の機能に影響を及ぼさなかったことを示す。(A , B) 19 - 28 z / i C A R、T 細胞での形質導入後 7 日間は、C D 3 / C D 28 ビーズで活性化し、I L - 2 / I N F レベルを、24 時間後に評価した。(C) ビーズ活性化後 8 日間で、絶対 T 細胞増大を、C o u n t B r i g h t ビーズを使用して定量し、(D) 各 i C A R 群における G F P 陽性細胞の % 変化を、非刺激細胞に対して正規化した。(E) 19 - 28 z / i C A R T 細胞を、照射した E L 4 - W T 細胞もしくは E L 4 - P S M A 細胞とともに 5 日間共培養し、フローサイトメトリーを使用して免疫表現型を決定した。(F) は、親油性 D i D 色素で標識し、i C A R 発現 T 細胞とともにインキュベートした E L 4 - w t 細胞もしくは E L 4 - P S M A 細胞の細胞結合体化アッセイを示す。(G) は、19 - 28 z / i C A R での形質導入後 7 日間後に、C D 3 / C D 28 ビーズでの活性化後 24 時間での T 細胞における I L - 2 / I N F レベルを示すグラフを表す。(H) は、ビーズ活性化後 8 日間で、C o u n t B r i g h t ビーズを使用する絶対 T 細胞増大の定量を示すグラフである。(I) は、非刺激細胞に対して計算した各 i C A R 群における G F P 陽性細胞の % 変化を示すグラフである。

【0100】

【図 17 - 1】図 17 A ~ 17 C は、P D - 1 i C A R のシグナル伝達経路および生化学的経路の特徴付けを示す。19 - 28 z / P D - 1 i C A R 細胞を、4 : 1 の E : T 比で 60 分間、抗原なし (W T)、C D 19 (標的)、もしくは C D 19 および P S M A (オフターゲット) を発現する A A P C に曝した。(A) 19 - 28 z / P D - 1 i C A R T 細胞およびそれぞれの A A P C に由来する 100 μ g の溶解物とともにインキュベートしたヒトホスホイムノレセプターアレイ。全てのプロットを、同じ X 線フィルムでのケミルミネッセンスを使用して検出して、曝露レベルを正規化した。(B , C) スキャンした X 線フィルム画像を使用して、(A) におけるアレイの定量を、画像分析ソフトウェアを使用して分析した。全てのピクセル密度を、内部 p Y コントロールを使用して、各アレイで正規化する。(B) 標的、オフターゲット、もしくはコントロール A A P C の S H P 1 および S H P 2 リン酸化状態。(C) 59 の I T A M / I T I M 関連イムノレセプターのリン酸化レベルの定量。

【図17-2】図17A~17Cは、PD-1 iCARのシグナル伝達経路および生化学的経路の特徴付けを示す。19-28z/PD-1 iCAR細胞を、4:1のE:T比で60分間、抗原なし(WT)、CD19(標的)、もしくはCD19およびPSMA(オフターゲット)を発現するAAPCに曝した。(A)19-28z/PD-1 iCAR T細胞およびそれぞれのAAPCに由来する100μgの溶解物とともにインキュベートしたヒトホスホイムノレセプターアレイ。全てのプロットを、同じX線フィルムでのケミルミネッセンスを使用して検出して、曝露レベルを正規化した。(B,C)スキャンしたX線フィルム画像を使用して、(A)におけるアレイの定量を、画像分析ソフトウェアを使用して分析した。全てのピクセル密度を、内部pYコントロールを使用して、各アレイで正規化する。(B)標的、オフターゲット、もしくはコントロールAAPCのSHP1およびSHP2リン酸化状態。(C)59のITAM/ITIM関連イムノレセプターのリン酸化レベルの定量。

10

【0101】

【図18】図18は、iCARが刺激レセプターに直接作用して、そのシグナル伝達をブロックすることを示す。

【0102】

【図19-1】図19A~19Eは、図2A~2Fについての生データおよび統計的有意性検定を示す。(A)上記iPS線維芽細胞の死滅を、Pdel形質導入T細胞、PD-1形質導入T細胞、もしくはmutCTLA-4 iCAR-P形質導入T細胞についてBright-Gloアッセイ系を使用して定量した。(B)4:1 E:T比での(A)の細胞培養上清におけるサイトカイン分泌を、18時間で評価した。(C)PdelもしくはiCAR陽性T細胞を、PSMAを発現するオフターゲットiPS-fib(iPS-fib-PSMA)とともに24時間インキュベートし、ルシフェラーゼシグナルを定量した。(D)(C)の事後分析を、Holm-Sidak法で校正した多重t検定を使用して行った。(E)サイトカイン分泌を、(C)の細胞培養上清において24時間で測定した。GM-CSFの生の値を示す。E:T比、エフェクター:標的比。

20

【図19-2】図19A~19Eは、図2A~2Fについての生データおよび統計的有意性検定を示す。(A)上記iPS線維芽細胞の死滅を、Pdel形質導入T細胞、PD-1形質導入T細胞、もしくはmutCTLA-4 iCAR-P形質導入T細胞についてBright-Gloアッセイ系を使用して定量した。(B)4:1 E:T比での(A)の細胞培養上清におけるサイトカイン分泌を、18時間で評価した。(C)PdelもしくはiCAR陽性T細胞を、PSMAを発現するオフターゲットiPS-fib(iPS-fib-PSMA)とともに24時間インキュベートし、ルシフェラーゼシグナルを定量した。(D)(C)の事後分析を、Holm-Sidak法で校正した多重t検定を使用して行った。(E)サイトカイン分泌を、(C)の細胞培養上清において24時間で測定した。GM-CSFの生の値を示す。E:T比、エフェクター:標的比。

30

【図19-3】図19A~19Eは、図2A~2Fについての生データおよび統計的有意性検定を示す。(A)上記iPS線維芽細胞の死滅を、Pdel形質導入T細胞、PD-1形質導入T細胞、もしくはmutCTLA-4 iCAR-P形質導入T細胞についてBright-Gloアッセイ系を使用して定量した。(B)4:1 E:T比での(A)の細胞培養上清におけるサイトカイン分泌を、18時間で評価した。(C)PdelもしくはiCAR陽性T細胞を、PSMAを発現するオフターゲットiPS-fib(iPS-fib-PSMA)とともに24時間インキュベートし、ルシフェラーゼシグナルを定量した。(D)(C)の事後分析を、Holm-Sidak法で校正した多重t検定を使用して行った。(E)サイトカイン分泌を、(C)の細胞培養上清において24時間で測定した。GM-CSFの生の値を示す。E:T比、エフェクター:標的比。

40

【0103】

【図20-1】図20Aおよび20Bは、図3A~3Dの生データおよび統計的有意性検定を表す。(A)未処理細胞に対するiPS-fib-PSMAの死滅を、ソートした高いおよび低いPdel形質導入したかもしくはPD1 iCAR-P形質導入したアロ反応

50

性T細胞に関してBright-Gloアッセイ系を使用することによって評価した。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。(B)高いもしくは低いレベルのPSMA発現に関してソートしたiPS-fib-PSMAのPD1 iCAR-P形質導入したアロ反応性T細胞死滅を、Bright-Gloアッセイ系を使用して定量した。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。

【図20-2】図20Aおよび20Bは、図3A~3Dの生データおよび統計的有意性検定を表す。(A)未処理細胞に対するiPSfib-PSMAの死滅を、ソートした高いおよび低いPdel形質導入したかもしくはPD1 iCAR-P形質導入したアロ反応性T細胞に関してBright-Gloアッセイ系を使用することによって評価した。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。(B)高いもしくは低いレベルのPSMA発現に関してソートしたiPS-fib-PSMAのPD1 iCAR-P形質導入したアロ反応性T細胞死滅を、Bright-Gloアッセイ系を使用して定量した。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。

10

【0104】

【図21】図21Aおよび21Bは、図4Aおよび4Bに関する生データおよび統計的有意性検定を示す。(A)T細胞注入の前および注入後の選択された時点でのiPS-fib-PSMAのバイオルミネッセント画像(BLI)。(B)事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。

20

【0105】

【図22-1】図22A~22Cは、図5A~5Fに関する生データおよび統計的有意性検定を示す。(A)24時間での培養上清のルミネックス多重サイトカイン分析。データは、オフターゲット/標的値の比として表し、3回の独立した実験からプールする(各条件につきn=6ウェル。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。(B)19-28z/Pdelおよび19-28z/PD1 iCARの増殖を比較する図5Bに関しては、事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。(C)方法に記載されるとおり、CD19標的もしくはCD19-PSMAオフターゲット細胞に対するmCherryシグナルの定量。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。

30

【図22-2】図22A~22Cは、図5A~5Fに関する生データおよび統計的有意性検定を示す。(A)24時間での培養上清のルミネックス多重サイトカイン分析。データは、オフターゲット/標的値の比として表し、3回の独立した実験からプールする(各条件につきn=6ウェル。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。(B)19-28z/Pdelおよび19-28z/PD1 iCARの増殖を比較する図5Bに関しては、事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。(C)方法に記載されるとおり、CD19標的もしくはCD19-PSMAオフターゲット細胞に対するmCherryシグナルの定量。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。

【図22-3】図22A~22Cは、図5A~5Fに関する生データおよび統計的有意性検定を示す。(A)24時間での培養上清のルミネックス多重サイトカイン分析。データは、オフターゲット/標的値の比として表し、3回の独立した実験からプールする(各条件につきn=6ウェル。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。(B)19-28z/Pdelおよび19-28z/PD1 iCARの増殖を比較する図5Bに関しては、事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。(C)方法に記載されるとおり、CD19標的もしくはCD19-PSMAオフターゲット細胞に対するmCherryシグナルの定量。事後分析を、Holm-Sidak法で較正した多重t検定を使用して行った。

40

【0106】

【図23】図23は、iCARおよびCARに関する標的抗原の選択の模式図。

50

【発明を実施するための形態】

【0107】

(発明の詳細な説明)

本発明は、一般に、抗原認識レセプター（例えば、TCRもしくはCAR）および免疫応答細胞の免疫活性を選択的に低減するもしくは排除する阻害性キメラ抗原レセプター（iCAR）の組み合わせを少なくとも発現する、遺伝子改変免疫応答細胞（例えば、T細胞（CD4、CD8、記憶、ナイーブ、エフェクター、T-regなどのような全てのサブセットを含む）、先天性免疫系の細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）細胞）を含む細胞、ならびに「オフターゲット」免疫応答の低減が望ましい新生物形成および他の病状の処置のためにこのような細胞を使用する方法を提供する。本発明は、少なくとも部分的に、標的抗原（例えば、本明細書で示されるとおりのPSMA）を結合する阻害性キメラ抗原レセプター（iCARs）が、免疫反応性細胞を選択的に阻害および抑制するために有用であるという発見に基づく。特に、本発明のiCARは、免疫反応性細胞の免疫応答の活性化を減少もしくは妨げる。本アプローチは、腫瘍根絶の選択的免疫原性を提供すると同時に、非腫瘍組織に上記免疫応答を与えない。よって、抗原認識レセプターおよびiCARを発現するT細胞は、従来の養子T細胞療法を超える顕著な利点を示す。

10

【0108】

癌を処置するためのドナー白血球の幅広い使用は、移植片対腫瘍効果（GVT）の治療効力を移植片対宿主病（GVHD）の潜在的に致命的な効果から区別できないことによって妨げられている。2つの一般的アプローチが、T細胞療法副作用を制御するために使用されてきた。第1は、免疫抑制薬の使用であり、これらは、細胞分裂をブロックすることによって非特異的に作用し（細胞増殖抑制剤）、免疫応答を広く制限する（グルココルチコイド、イムノフィリンなど）か、またはクリアランス/死滅のためにT細胞を標的とする（抗体）。強力ではあるものの、これらアプローチは、治療上機能するT細胞を区別するという観点では非特異的であり、有害副作用を引き起こす。さらに、これらの全ての薬物は、顕著な長期の二次的副作用（易感染性、心臓、腎臓、および神経的な損傷）を引き起こす。

20

【0109】

第2のアプローチは、T細胞を自殺遺伝子/死滅スイッチで操作する。これらは、いったん適切な合図をもたらした後に、上記操作された細胞を死滅させる遺伝的アプローチである。それらのうちのいくつかは、毒性薬剤（例えば、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ（HSV-tk））の選択的酵素メタボライザーの導入に基づく。さらに、ダイマー化の特異的化學誘発因子を使用して活性化される誘発性カスパーゼ-9タンパク質の使用は、活発に誘発される広い細胞死に対する有望なアプローチであった。これらアプローチの主な制限は、それらが全ての標的細胞において細胞死を誘発する（それによって、有益な細胞を排除する）ことである。従来の免疫抑制と同様に、それらは通常、実施前に症状の出現（従って、患者に対して起こり得る永続的な損傷）を要する。

30

【0110】

対照的に、本明細書で記載されるiCAR戦略は、T細胞作用を選択的にフィルタにかけ、オフターゲット部位における活性を制限すると同時に、意図された標的に対して治療的機能を与えない。本明細書で示されるように、iCARは、iPS由来ヒト線維芽細胞を使用して新規なインビトロモデルおよびインビボモデルにおいて「宿主」組織を攻撃することから、ヒトアロ反応性T細胞を阻害し得た。GVHD標的組織（例えば、骨髄系統に関するCD33もしくは器官特異的抗原）に存在するが、標的化悪性腫瘍には存在しない特有の表面抗原は、GVHDをGVTから区別するためのiCAR標的の候補である。同様に、本明細書で記載される結果は、iCAR媒介性阻害が、CAR操作されたT細胞の「オンターゲットであるがオフターゲット」効果を成功裡に制限することを示し、その例としては、CD19特異的CARを発現するT細胞で処置した白血病患者におけるB細胞形成不全（Kalos et al., Science translat

40

50

onal medicine、2011、3(95): 95ra73)、肺上皮に対する抗ERBB2 CART細胞交叉反応性から生じると考えられる胎児急性呼吸窮迫症候群(ARDS)(Morgan et al.、Mol. Ther.、2010、18(4): 843-51)、およびMage-A3 TCRで処置した黒色腫および骨髄腫患者における心筋壊死による死亡(June、Update on Immunotherapy Trials for HIV and Cancer、in Recombinant DNA Advisory Committee、2012)が挙げられる。心筋細胞もしくは肺上皮で発現されるが、腫瘍細胞には存在しない表面抗原を認識すれば、iCARは、Mage-A3 TCRもしくは抗ERBB2 CAR交叉反応性から保護するために潜在的に使用され得るので、別の点で有望な治療剤を復活させる。あるいは、多くの腫瘍は、HLA分子を活発にダウンレギュレートして、免疫認識から逃れるので、HLA標的化iCARは、いくつかの組織に対する同時保護を提供する能力を有する。

10

【0111】

iCARの臨床上的利用可能性の重要な要件は、iCARの事前シグナル伝達にも関わらず、T細胞機能性を維持することである。興味深いことには、iCAR形質導入T細胞は、阻害性抗原への曝露後に、標的抗原に対する応答をなお高めることが見出された。この可逆性は、転写状態ではなくシグナル伝達分子のリン酸化状態が、細胞傷害性のような迅速な機能的応答を制御するナチュラルキラー細胞の挙動を模倣する。抗PD-1抗体および抗CTLA4抗体は、T細胞応答を一時的に調節する能力をさらに議論して、アレルギー化したかもしくは疲弊したT細胞の損なわれた機能を改善し得る。さらに、TCR複合体に対するPD-1およびCTLA-4効果の生化学的分析から、リン酸化状態、下流のキナーゼ、およびアポトーシスではなく運動性に依存することが示された。インビトロの結果もインビボの結果も、オフターゲット細胞に応じた阻害と継続した治療機能性を示したが、細胞のうちのいくらかがアレルギー化され得るという可能性がある。T細胞で機能することに加えて、CTLA4およびPD-1は、B細胞、マクロファージ、および樹状細胞でも機能する。従って、iCARは、他の免疫現象を操作する可能性もある。

20

【0112】

本発明のiCARは、例えば、iCARに抗原(例えば患者に注入された組換えPSMA-Ig)を導入することによって全身性のサイトカインストームもしくは免疫細胞応答を制限するための減衰ツール(dampening tool)として使用され得る。上記PSMA-Igは、iCARを結合および活性化し得、従って、T細胞活性化を一時的に阻害し得る。これは、サイトカインストームを引き起こす循環スパイラルを一時的に壊し得、全身性の副作用を制限してT細胞を活性化させ得る。上記iCARは、iCARを架橋することによって示されるように、この機能性を有する。

30

【0113】

本発明は、生理的機構を利用して、T細胞副作用を制限する。このアプローチは、天然に存在するT細胞反応性の制限を模倣し、従って、貴重な治療上生存可能な細胞の排除を要しない。本アプローチは、T細胞を指示して、所望の機能のみを発揮させる合成レセプターを使用することによって、薬物として細胞の多面的機能性を利用する。結論として、抗原特異的阻害性レセプターは、特異的細胞表面抗原の結合の際にT細胞増殖、サイトカイン分泌、および細胞傷害性を成功裡に制限し、従って、正常な組織に対する保護を付与すると同時に、重要なTCRもしくはCAR媒介性の治療機能を保持する。従って、iCARは、自己由来の状況でも同種異系の状況でもより安全でかつより抗過程なT細胞療法を確立する新規なストラテジーを提供する。

40

【0114】

移植片対白血病効果(GVL)および移植片対宿主病(GVHD)

同種異系骨髄移植物の最初の使用以来、白血病の根治はドナー由来免疫応答に依存性であると認識されてきた。移植片対白血病効果(GVL)は、同種異系骨髄移植(BMT)後のドナーリンパ球注入の成功後にさらに解明および認識された。ドナーリンパ球注入(D

50

DLI)は、悪性腫瘍に関する養子免疫療法の最も確立され広がっている用途である。不運なことに、DLI後の罹病率および死亡率の主な原因は、移植片対宿主病(GVHD)の発生である。その発生および重症度の低下は、固形腫瘍および血液腫瘍におけるDLIのより幅広い潜在的に治癒力のある使用への重大な限界である。上記iCAR戦略は、GVLの有益な効果をGVHDの危険な転帰から区別することによって、この問題を解決することを目的とする。GVHDは、皮膚、肝臓、および腸管、標的悪性腫瘍に存在し得ない微量のallo抗原(minor allo-antigens)のような特有の抗原を有する部位に主に影響を及ぼす。このようなことが起こると、iCARがGVLおよびGVHDの効果を区別する、あり得る役割が裏付けられる。

【0115】

養子治療において、再標的化T細胞は、いくつかの悪性腫瘍において潜在的な治癒力のある役割を果たすことが示された。なお、この変形する傾向のあるアプローチは、その交叉反応性およびその後の重要な正常組織(心臓、肺)に対する毒性が原因で制限されている。従って、iCAR戦略が計画している、T細胞の治療機能を減衰することなくT細胞反応性を制御する方法を開発する重大な必要性がある心筋細胞もしくは肺上皮で発現されるが、腫瘍細胞には存在しない表面抗原を認識すれば、iCARは、Mage-A3 TCRもしくは抗ERBB2 CAR交叉反応性から保護するために潜在的に使用され得、従って、別の方法で有望な治療剤を復活させ得る。あるいは、多くの腫瘍はHLA分子を活発にダウンレギュレートして、免疫認識から逃れるので、HLA標的化iCARは、いくつかの組織に対する同時保護を潜在的に提供し得る。

【0116】

一実施形態において、同種異系リンパ球(ある程度の免疫ミスマッチがある)は、HLA-I(転移性乳癌(極めて活発なHLA-Iダウンレギュレーションを有する癌のタイプ)の処置のために種々の組織で普遍的に発現される抗原)を標的化するiCARを発現するように操作される。上記患者に、上記細胞が注入される。上記iCARは、HLA-1を発現する全ての正常なもしくは非新生物組織を保護する一方で、上記腫瘍は、陰性のもしくは極めて低いHLA-I発現に起因して排除される。

【0117】

別の実施形態において、患者は、血液悪性腫瘍の処置のために、または固形腫瘍の補助処置としてHSCTを受ける。上記患者は、再発するかもしれない疾患を有し、それは、HLA-I陰性であるかもしれないと分析される。ドナーリンパ球は、iCAR標的化HLA-Iで操作される。上記患者に、上記細胞が注入される。上記iCARは、HLA-Iを発現する全ての正常なもしくは非新生物組織を保護する一方で、上記腫瘍は、陰性のもしくは極めて低いHLA-I発現に起因して排除される。

【0118】

さらに別の実施形態において、患者は、皮膚、肝臓、もしくは消化管細胞に関連しない部位に生じる腫瘍(GVHD関連死の腫瘍部位)を有する。ドナーリンパ球細胞は、皮膚、肝臓、または消化管もしくは3種全てに発現される抗原を標的とするiCARで操作される。例えば、上記腫瘍が上皮間葉転換(EMT)を受けた場合、腫瘍進行および転移性腫瘍とともに見出されるように、E-カドヘリンおよびサイトケラチンは、このプロセスの一部としてダウンレギュレートされることが示された。E-カドヘリンは、正常な皮膚、肝臓、および消化管において高度に発現される(Tsuchiya et al., Arch. Histol. Cytol., 69(2): 135-145(2006))。従って、E-カドヘリンに対するiCARを発現するドナーリンパ球は、GVL様式で上記腫瘍に対して反応するが、皮膚、肝臓、もしくは消化管を攻撃するそれらの能力が制限される。

【0119】

iCARおよびCARに関する標的抗原の選択

本発明は、免疫阻害性レセプター（上記 i C A R）のシグナル伝達ドメインを利用する合成レセプターを使用することによって、T細胞もしくは他の免疫調節細胞の応答を制御するための方法および新規な試薬セットを提供する。上記 i C A R に関する適切な抗原は、腫瘍における天然のバリエーションに起因して、個別化医薬アプローチをときおり利用する。同時に、i C A R の使用およびタイプに依存して、抗原のいくつかの潜在的「クラス」が、同時にいくつかの組織に対して保護を提供する能力を有する。これらとしては、以下が挙げられる：（１）腫瘍によってダウンレギュレートされるが、正常組織によってはダウンレギュレートされない、普遍的に発現される免疫原性抗原（例えば、ヒト白血球抗原（H L A））。（２）腫瘍進行、特に、転移性表現型の達成中にダウンレギュレートされるが、ある種の正常組織においては維持される抗原。このような抗原としては、以下が挙げられる：（３）細胞表面 E M T 抗原（例えば、E - カドヘリンおよびサイトケラチン）；（４）細胞表面腫瘍サブレッサー抗原（例えば、O P C M L（C u i et al .、P L o S O N E . 2 0 0 8 ; 3 (8) : e 2 9 9 0））；および（６）他の類似の抗原（例えば、H Y A L 2、D C C、S M A R 1 など）。O P C M L - v 1 は、全ての正常な成体および胎児の組織（胎盤および末梢血単核細胞を除く）において種々のレベルで広く発現される。（７）細胞表面炭水化物、脂質、および翻訳後修飾（例えば、ムチン型 O - グリカン（コア 3 O - グリカン）（L e e and F u k u d a、M e t h o d s E n z y m o l . 2 0 1 0 ; 4 7 9 : 1 4 3 - 5 4 ; S u z u k i - A n e k o j i et al .、J B i o i C h e m . 2 0 1 1 S e p 1 6 ; 2 8 6 (3 7) : 3 2 8 2 4 - 3 3 ; B a o and F u k u d a、M e t h o d s E n z y m o l . 2 0 1 0 ; 4 7 9 : 3 8 7 - 9 6））。（８）さらには、腫瘍において破壊される多くの他のプロセス（代謝、アポトーシス、移動（t r a f f i c k i n g）、分化など）があり、各々、表面抗原のダウンレギュレーションをもたらし、これらのうちのいずれも、潜在的な i C A R 抗原標的として使用され得る。

【 0 1 2 0 】

一般に、本発明は、各患者に対して採用され得る個別のアプローチを提供する。本明細書で記載されるように、上記 i C A R 抗原は、アルゴリズムプロセスを通じて選択され得、その後、医師は、上記患者の腫瘍に合わせられた特異的レセプターを注文し得る。次いで、このレセプターは、刺激レセプター（すなわち、T C R もしくは C A R もしくは G V L シグナル）のソバに導入されて、選択組織に対する保護を提供する。

【 0 1 2 1 】

上記 i C A R が、活性化 C A R と同じ抗原と結合し得ることに注意することは、重要である。例えば、抗原が腫瘍組織と正常組織との間でそれらの発現がバイナリーである（すなわち、一方には完全に存在せず、他方には存在する）ことが見出されていない状況があり得る。なお、腫瘍状の抗原が正常組織より遙かに高いレベルで発現される場合、上記刺激性 C A R および上記 i C A R レセプターの両方が、その同じ抗原を標的とし得る。腫瘍の場合には、非常に多くの抗原が存在するので、上記刺激性 C A R は、優位を占め、腫瘍を排除させる。正常組織の場合、抗原発現レベルは低いので、上記 i C A R は、適切な阻害を提供し得る。これは、両方／もしくは単一の上記標的抗原のレベル、および上記刺激性および上記 i C A R のレベルが、免疫応答細胞の転帰応答（o u t c o m e r e s p o n s e）に影響を及ぼし得るので真実である（図 2 3）。さらに、各レセプターのアフィニティーを変化させることは、上記応答を調節および微調整するために使用され得る。

【 0 1 2 2 】

標的組織とオフターゲット組織との間の抗原不均衡は、発現の絶対的な非存在ではなく、主に発現のレベルにおける差異で制限され得る。さらに、変動性の発現レベルは、いくつかの組織が、i C A R を使用する保護に関する 1 つの共通抗原とともに示される場合に予期され得る。1 つのこのような例は、細胞タイプの大部分で広く見出されるが、しばしば異なる発現レベルを伴う H L A 分子の発現である。興味深いことには、H L A 分子のダウンレギュレーションは、主な腫瘍機構が T 細胞免疫応答から逃れることを表す。このような筋書きでは、悪性腫瘍でダウンレギュレートされる H L A 分子に対して i C A R で操作

される D L I T 細胞は、種々の組織タイプの G V H D からの広い保護を提供し得ると同時に、G V L 効果を維持する。

【 0 1 2 3 】

このような抗原選択の組み合わせの可能性は、利用可能な抗体、腫瘍表面抗原プロファイリング、および公知の組織特異的抗原によって制限されるのみである。

【 0 1 2 4 】

細胞傷害性 T - リンパ球抗原 4 (C T L A - 4)

C T L A - 4 は、活性化 T 細胞によって発現される阻害性レセプターであり、これは、その対応するリガンド（それぞれ、C D 8 0 および C D 8 6 ; B 7 - 1 および B 7 - 2 ）によって結合される場合に、活性化 T 細胞阻害もしくはアネルギーを媒介する。前臨床研究および臨床研究の両方において、全身性の抗体注入による C T L A - 4 ブロックは、内因性抗腫瘍応答を増強したが、臨床状況では、顕著な予見できなかった毒性を有した。

【 0 1 2 5 】

C T L A - 4 は、細胞外 V ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質テールを含む。異なるアイソフォームをコードする選択的スプライシング改変体が、特徴付けられた。膜結合型アイソフォームは、ジスルフィド結合によって相互連結されたホモダイマーとして機能する一方で、可溶性アイソフォームは、モノマーとして機能する。上記細胞内ドメインは、本質的な触媒活性を有さず、P I 3 K、P P 2 A および S H P - 2 を結合し得る 1 個の Y V K M モチーフおよび S H 3 含有タンパク質を結合し得る 1 個のプロリンリッチモチーフを含むという点で、C D 2 8 のものに類似である。T 細胞応答を阻害することにおける C T L A - 4 の 1 つの役割は、T C R の近位にあるシグナル伝達タンパク質（例えば、C D 3 および L A T ）の S H P - 2 および P P 2 A 脱リン酸化を直接媒介するようである。C T L A - 4 はまた、C D 8 0 / 8 6 結合に関して C D 2 8 との競合を間接的に介してシグナル伝達に影響を及ぼし得る。C T L A - 4 はまた、P I 3 K、C D 8 0、A P 2 M 1、および P P P 2 R 5 A と結合および / もしくは相互作用することが示された。

【 0 1 2 6 】

C T L A - 4 は、配列番号 5 に示されるとおりのアミノ酸配列を有し得る。

【 化 5 】

```

1  MACLGFRHKA AQLNLATRTW PCTLLFLLLF IPVFCKAMHV AQPAVVLASS RGIASFVCEY
61  ASPGKATEVRVTVLRLQADSQ VTEVCAATYM MGNELTFLLDD SICTGTSSGN QVNLTIQGLR
121  AMDTGLYICK VELMYPPPY LIGINGTQIY VIDPEPCPDS DFLWILAAV SSGLEFFYSFL
181  LTAVSLSKML KKRSPLETTGV YVKMPPTPE CEKQFQPYFI PIN

```

【 0 1 2 7 】

本発明によれば、C T L A - 4 ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % もしくは 1 0 0 % 相同であるアミノ酸配列を有し得る（本発明中の相同性は、B L A S T もしくは F A S T A のような標準ソフトウェアを使用して決定され得る）。非限定的実施形態において、C T L A - 4 ポリペプチドは、少なくとも 2 0 個、もしくは少なくとも 3 0 個、もしくは少なくとも 4 0 個、もしくは少なくとも 5 0 個、および最大 2 2 2 個までのアミノ酸の長さである配列番号 5 の連続部分であるアミノ酸配列を有し得る。代わりにもしくはさらに、非限定的な種々の実施形態において、上記 C T L A - 4 ポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸 1 ~ 2 2 3、1 ~ 5 0、5 0 ~ 1 0 0、1 0 0 ~ 1 4 0、1 4 1 ~ 1 6 1、1 6 2 ~ 1 8 2、1 8 3 ~ 2 2 3、1 4 1 ~ 2 2 3、1 6 2 ~ 2 2 3、もしくは 1 8 3 ~ 2 2 3 のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、上記 C T L A - 4 ポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸 1 8 3 ~ 2 2 3 のアミノ酸配列を有する。ある種の実施形態において、上記 i C A R の細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 5 のアミノ酸 1 8 3 ~ 2 2 3 のアミノ酸配列を有する C T L A - 4 ポリペプチドを含む。ある種の実施形態において、上記 i C A R の膜貫通ドメインは、配列番号 5 のアミノ酸 1 6 2 ~ 1 8 2 のアミノ酸配列を有する C T L A - 4 ポリペプチドを含む。

【 0 1 2 8 】

本発明によれば、「C T L A - 4 核酸分子」とは、C T L A - 4 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをいう。

【 0 1 2 9 】

プログラムされた細胞死タンパク質 1 (P D - 1)

P D - 1 は、内因性マクロファージおよび樹状細胞で発現されるその対応するリガンド P D - L 1 および P D - L 2 との結合の際に、活性化 T 細胞の負の免疫調節因子である。P D - 1 は、268 アミノ酸のタイプ I 膜タンパク質である。P D - 1 は、2 つのリガンド、P D - L 1 および P D - L 2 を有し、これらは、B 7 ファミリーのメンバーである。上記タンパク質の構造は、細胞外 I g V ドメイン、次に、膜貫通領域および細胞内テールを含む。上記細胞内テールは、P D - 1 が T C R シグナルを負に調節する、イムノレセプターチロシンベースの阻害性モチーフおよびイムノレセプターチロシンベースのスイッチモチーフに位置する 2 個のリン酸化部位を含む。S H P - I および S H P - 2 ホスファターゼは、リガンド結合の際に P D - 1 の細胞質テールに結合する。P D - L 1 のアップレギュレーションは、腫瘍細胞が宿主免疫系を巧みにかわし得る 1 つの機構である。前臨床試験および臨床試験において、拮抗抗体による P D - 1 ブロックは、宿主の内因性免疫系を通じて媒介される抗腫瘍応答を誘発した。

10

【 0 1 3 0 】

P D - 1 は、配列番号 6 に示されるとおりのアミノ酸配列を有し得る。

【 化 6 】

20

```
1  mqipqapwpv vwaviqlgwr pgwfldspdr pwnpptfspa llvvtgdna tftcsfsnts
61  esfvlnwyrn spsnqtdkla afpedrsqpg qdcrrfrvtql pnggrdfhmsv vrarrndsgt
121 ylcgaisslap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtiv vgvvggllgs
181 lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfqw rektpeppvp
241 cvpeqteyat ivfpsgmgtg sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl
```

【 0 1 3 1 】

本発明によれば、P D - 1 ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % もしくは 100 % 相同であるアミノ酸配列を有し得る。非限定的実施形態において、P D - 1 ポリペプチドは、少なくとも 20 個、もしくは少なくとも 30 個、もしくは少なくとも 40 個、もしくは少なくとも 50 個、および最大 287 個までのアミノ酸の長さである配列番号 6 の連続部分であるアミノ酸配列を有し得る。代わりにもしくはさらに、非限定的な種々の実施形態において、P D - 1 ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 288、1 ~ 50、50 ~ 100、100 ~ 144、145 ~ 170、171 ~ 191、192 ~ 288、145 ~ 288、171 ~ 288、もしくは 192 ~ 288 のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、上記 P D - 1 ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸 192 ~ 288 のアミノ酸配列を有する。ある種の実施形態において、上記 i C A R の細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸 192 ~ 288 のアミノ酸配列を有する P D - 1 ポリペプチドを含む。ある種の実施形態において、上記 i C A R の膜貫通ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸 171 ~ 191 のアミノ酸配列を有する P D - 1 ポリペプチドを含む。

30

40

【 0 1 3 2 】

本発明によれば、「P D - 1 核酸分子」とは、P D - 1 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをいう。

【 0 1 3 3 】

リンパ球活性化遺伝子 3 (L A G - 3)

リンパ球活性化タンパク質 3 (L A G - 3) は、免疫細胞の負の免疫調節因子である。L A G - 3 は、免疫グロブリン (I g) スーパーファミリーに属し、4 個の細胞外 I g 様ドメインを含む。上記 L A G 3 遺伝子は、8 個のエキソンを含む。配列データ、エキソン / イントロン組織化、および染色体位置は全て、L A G 3 と C D 4 との密接な関係を示す。

50

LAG3はまた、CD223(CD分類223(cluster of differentiation 223))と称された。

【0134】

LAG-3は、配列番号7に示されるとおりのアミノ酸配列を有し得る。

【化7】

```

1 mweaqflgl1 flqplwvapv kplqpgaevp vwwaqegapa qlpcstipl qdlsllrrag
61 vtwqhqpdsq ppaaapghpl apgphpaaps swgprprrryt vlsvpggglr sgrlplqprv
121 qldergrqrg dfsllwlrpar radageyraa vhlrdraisc rrlrlrgqas mtasppgsir
181 asdwvilncs fsrpdrrpasv hwfrnrgqgr vpvresphhh laesflflpq vspmdsgpwg
241 ciltyrdgfn vsimynltvl glepptpltv yagagsrvgl pcrlpagvgt rsfltakwtp
301 pgggpdllvt gdngdftlrl edvsqaqagt ytchihlqeq qlnatvtlai itvtpksfgs
361 pgsigkllce vtpvsgqerf vwssldtspq rsfsgpwlea qeaqlsqpw qcqlyqgerl
421 lgaavyftel sspgaqrsgr apgalpaghl llflilgvl llllvtgafg fhllrrqwrp
481 rrfsaleggi hppqaqskie eleqepepep epepepepep epeql

```

10

【0135】

本発明によれば、LAG-3ポリペプチドは、配列番号7と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%相同であるアミノ酸配列を有し得る。非限定的実施形態において、LAG-3ポリペプチドは、少なくとも20個、もしくは少なくとも30個、もしくは少なくとも40個、もしくは少なくとも50個、および最大524個までのアミノ酸の長さである配列番号7の連続部分であるアミノ酸配列を有し得る。代わりにもしくはさらに、非限定的な種々の実施形態において、LAG-3ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸1~525、1~50、50~100、100~150、150~200、200~250、250~300、300~350、350~400、400~420、421~450、451~471、472~525、421~525、451~525、もしくは472~525のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、上記LAG-3ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸472~525のアミノ酸配列を有する。ある種の実施形態において、上記iCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸472~525のアミノ酸配列を有するLAG-3ポリペプチドを含む。ある種の実施形態において、上記iCARの膜貫通ドメインは、配列番号7

20

30

【0136】

本発明によれば、「LAG-3核酸分子」とは、LAG-3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをいう。

【0137】

ナチュラルキラー細胞レセプター2B4(2B4)

ナチュラルキラー細胞レセプター2B4(2B4)は、NK細胞およびT細胞のサブセットに対する非MHC拘束細胞死滅を媒介する。今日まで、2B4の機能は、未だ調査中であるが、2B4-Sアイソフォームは、活性化レセプターであると考えられ、2B4-Lアイソフォームは、免疫細胞の負の免疫調節因子であると考えられている。2B4は、その高アフィニティーリガンドであるCD48を結合する際に結合状態になる。2B4は、チロシンベースのスイッチモチーフ(上記タンパク質を種々のホスファターゼと会合させる分子スイッチを含む。2B4は、CD244(CD分類244))とも称された。

40

【0138】

2B4は、配列番号8に示されるとおりのアミノ酸配列を有し得る。

【化 8】

```

1 mlgqvvtlil llllkvyqgk gcqgsadhv sisgvplqlq pnsiqtkvds iawkkllpsq
61 ngfhhilkwe ngslpsntsn drfsfivknl sllikaqqq dsglyclevt sisgkvqtat
121 fqvfvfesll pdkvekprlq gqgkildrgr cgvalscivs rdgnvsyawy rgskliqtag
181 nltyldeevd ingthtytcn vsnpvswesh tlnltqdcqn ahqefrwpf lviivilsal
241 flgtlacfcv wrkrkekqs etspkelfti yedvkdiktr rnhegeqtfp gggstiyismi
301 qsqssaptsq epaytlysli qpsrksgsrk rnhspsfnst iyevigksqp kaqnparlsr
361 kelenfdvys

```

【0139】

10

本発明によれば、2 B 4 ポリペプチドは、配列番号 8 と少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % もしくは 100 % 相同であるアミノ酸配列を有し得る。非限定的実施形態において、2 B 4 ポリペプチドは、少なくとも 20 個、もしくは少なくとも 30 個、もしくは少なくとも 40 個、もしくは少なくとも 50 個、および最大 369 個までのアミノ酸の長さである配列番号 8 の連続部分であるアミノ酸配列を有し得る。代わりにもしくはさらに、非限定的な種々の実施形態において、2 B 4 ポリペプチドは、配列番号 8 のアミノ酸 1 ~ 370、1 ~ 50、50 ~ 100、100 ~ 150、150 ~ 215、216 ~ 229、230 ~ 250、251 ~ 370、216 ~ 370、230 ~ 370、もしくは 251 ~ 370 のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、上記 2 B 4 ポリペプチドは、配列番号 8 のアミノ酸 251 ~ 370 のアミノ酸配列を有する。ある種の実施形態において、上記 i C A R の細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 8 のアミノ酸 251 ~ 370 のアミノ酸配列を有する 2 B 4 ポリペプチドを含む。ある種の実施形態において、上記 i C A R の膜貫通ドメインは、配列番号 8 のアミノ酸 230 ~ 250 のアミノ酸配列を有する 2 B 4 ポリペプチドを含む。

20

【0140】

本発明によれば、「2 B 4 核酸分子」とは、2 B 4 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをいう。

【0141】

B リンパ球および T リンパ球減衰因子 (a t t e n u a t o r) (B T L A)
 B リンパ球および T リンパ球減衰因子 (B T L A) 発現は、T 細胞の活性化の間に誘発され、B T L A は、T h 1 細胞で発現されたままであるが、T h 2 細胞ではそうではない。P D 1 および C T L A 4 のように、B T L A は、B 7 ホモログである B 7 H 4 と相互作用する。しかし、P D - 1 および C T L A - 4 とは異なり、B T L A は、細胞表面レセプターの B 7 ファミリーだけでなく、腫瘍壊死ファミリーレセプター (T N F - R) との相互作用を介して T 細胞阻害を示す。B T L A は、腫瘍壊死因子 (レセプター) スーパーファミリーのリガンドであるメンバー 14 (T N F R S F 14) (ヘルペスウイルス侵入媒介因子 (h e r p e s v i r u s e n t r y m e d i a t o r) (H V E M) としても公知) である。B T L A - H V E M 複合体は、T 細胞免疫応答を負に調節する。B T L A 活性化は、ヒト C D 8 ⁺ 癌特異的 T 細胞の機能を阻害することが示された。B T L A はまた、C D 2 7 2 (分化クラスター (c l u s t e r o f d i f f e r e n t i a t i o n) 2 7 2) と称された。

30

40

【0142】

B T L A は、配列番号 9 に示されるとおりのアミノ酸配列を有し得る。

【化 9】

```

1 MKTLPAMLTG GKLFVFFLI PYLDIWNHNG KESCDVQLYI KRQSEHSILA GDPFELECPV
61 KYCANRPHVT WCKLNGTTCV KLEDRTQSWK EEKNISFFIL HFEPVLPNDN GSYRCSANFQ
121 SNLIESHSTT LYVTDVKSAS ERPSKDEMAS RPWLLYRLLP LGGLPLLITT CFCFLCCLRR
181 HQGKQNELSD TAGREINLVD AHLKSEQTEA STRQNSQVLL SETGIYDNDP DLCFRMQEGS
241 EVYSNPLEE NKPGIVYASL NHSVIGPNSR LARNVKEAPT EYASICVRS

```

50

【0143】

本発明によれば、BTLAポリペプチドは、配列番号9と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%相同であるアミノ酸配列を有し得る。非限定的実施形態において、BTLAポリペプチドは、少なくとも20個、もしくは少なくとも30個、もしくは少なくとも40個、もしくは少なくとも50個、および最大288個までのアミノ酸の長さである配列番号9の連続部分であるアミノ酸配列を有し得る。代わりにもしくはさらに、非限定的な種々の実施形態において、BTLAポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸1~289、1~50、50~100、100~134、135~157、158~178、179~289、135~289、158~289、もしくは179~289のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、上記BTLAポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸179~289のアミノ酸配列を有する。ある種の実施形態において、上記iCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号9のアミノ酸179~289のアミノ酸配列を有するBTLAポリペプチドを含む。ある種の実施形態において、上記iCARの膜貫通ドメインは、配列番号9のアミノ酸158~178のアミノ酸配列を有するBTLAポリペプチドを含む。

10

【0144】

本発明によれば、「BTLA核酸分子」とは、BTLAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをいう。

【0145】

造血細胞系統

20

哺乳動物造血（血液）細胞は、多様な範囲の生理学的活性を提供する。造血細胞は、リンパ系統、骨髄系統および赤血球系統へと分かれる。リンパ系統（B細胞、T細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞を含む）は、抗体の生成、細胞性免疫系の調節、血中の外来因子の検出、宿主にとって外来の細胞の検出などを提供する。用語「T細胞」とは、本明細書で使用される場合、胸腺で成熟し、細胞媒介性免疫を主に担うリンパ球をいう。T細胞は、適応免疫系に關与する。用語「ナチュラルキラー（NK）細胞」とは、本明細書で使用される場合、細胞媒介性免疫の一部であり、先天的な免疫応答の間に作用するリンパ球をいう。それらは、標的細胞に対してそれらの細胞傷害性効果を発揮するために、事前の活性化を要しない。細胞傷害性T細胞（CTLもしくはキラーT細胞）は、感染した体細胞もしくは腫瘍細胞の死滅を誘発し得るTリンパ球のサブセットである。

30

【0146】

本発明の方法において使用するための細胞

本発明は、免疫応答細胞を活性化する抗原認識レセプター（例えば、TCR、CAR）および阻害性キメラ抗原レセプター（iCAR）の組み合わせを発現する細胞、ならびに増強された免疫応答を要する疾患の処置のためにこのような細胞を使用するための方法を提供する。1つのアプローチにおいて、腫瘍抗原特異的T細胞（CD4、CD8、記憶、ナイーブ、エフェクター、T-regなどを含む全てのサブセット）、先天性免疫系の細胞、NK細胞、CTL細胞もしくは他の免疫応答細胞は、新生物形成の処置もしくは予防のために、非腫瘍組織の抗原と結合するiCARを発現させるために使用される。例えば、CD19を認識するキメラ抗原レセプター19-28zを発現するT細胞は、CD33を結合するiCARを発現するT細胞において共発現される。このような細胞は、血液の癌（例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫）の処置もしくは予防のために、必要なヒト被験体に投与される。別のアプローチにおいて、ウイルス抗原特異的T細胞、NK細胞、CTL細胞は、ウイルス疾患の処置のために使用され得る。上記細胞は、組換えもしくは内因性の抗原レセプターを発現し得、これらは、CD19に対して特異的である19-28z、PSMAに対して特異的であるP28z、メソテリンに対して特異的であるM28z、もしくはCD56に対して特異的である56-28zであり得る。

40

【0147】

患者自身のT細胞は、キメラ抗原レセプター（CAR）といわれる人工T細胞レセプターをコードする遺伝子の導入を通じて腫瘍を標的化するように遺伝子改変され得る。CAR

50

は、免疫応答を活性化するCARおよび免疫応答を抑制するiCARを含む。

【0148】

腫瘍抗原特異的Tリンパ球（およびNK細胞）

本発明の方法において使用され得る腫瘍抗原特異的Tリンパ球のタイプとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：キメラ抗原レセプター（CAR）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.、et al. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45）、αおよびヘテロダイマーを含む全長腫瘍抗原認識T細胞レセプター複合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（Morgan、R. A.、et al. 2006 Science 314:126-129）、腫瘍生検において腫瘍浸潤リンパ球（TIL）から得られたリンパ球培養物（Panelli、M. C.、et al. 2000 J Immunol 164:495-504；Panelli、M. C.、et al. 2000 J Immunol 164:4382-4392）、および人工抗原提示細胞（AAPC）もしくはパルスした（pulsed）樹状細胞を使用する選択的にインビトロで増大させた抗原特異的末梢血白血球（Dupont、J.、et al. 2005 Cancer Res 65:5417-5427；Papanicolaou、G. A.、et al. 2003 Blood 102:2498-2505）。上記T細胞は、自己由来の、非自己由来の（例えば、同種異系）もしくはインビトロで操作された前駆細胞もしくは幹細胞に由来するものであり得る。T細胞は、末梢血リンパ球（PBL）、もしくは腫瘍浸潤リンパ球（TIL）で一般に行われるように大量に（in bulk）調製されてもよいし、T細胞は、例えば、CD4、CD8、CD62Lを使用することによって精製されてもよい。

10

20

【0149】

任意の適切な腫瘍抗原（抗原性ペプチド）は、本明細書で記載される腫瘍関連実施形態における使用に適している。免疫応答活性化抗原の供給源としては、癌タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。上記抗原は、ペプチドとして、または無傷なタンパク質もしくはその一部として発現され得る。上記無傷なタンパク質もしくはその一部は、天然であってもよいし、変異誘発されていてもよい。適切な免疫応答活性化抗原としては、前立腺特異的膜抗原（PSMA）および前立腺幹細胞抗原（PCSA）が挙げられる。

【0150】

ウイルス抗原特異的Tリンパ球（およびNK細胞）

病原体感染もしくは他の感染性疾患の処置において、例えば、免疫無防備状態の被験体において使用するのに適した抗原としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、およびインフルエンザウイルスに存在するウイルス抗原。

30

【0151】

CTLの未精製供給源は、当該分野で公知のもののいずれかであり得る（例えば、骨髓、胎児、新生児もしくは成体または他の造血細胞源、例えば、胎児肝臓、末梢血もしくは臍帯血）。種々の技術が、上記細胞を分離するために使用され得る。例えば、負の選択法は、非CTLを最初に取り出し得る。mAbは、特定の細胞系統および/もしくは正の選択もしくは負の選択の両方に関する分化のステージと関連するマーカーを同定するために特に有用である。

40

【0152】

最終的に分化した細胞の大きな割合が、比較的粗い分離によって最初に取り出され得る。例えば、磁性ビーズ分離は、多数の関連性のない細胞を取り出すために最初に使用され得る。好ましくは、全造血細胞のうちの少なくとも約80%、通常は少なくとも70%が、細胞単離の前に取り出される。

【0153】

分離手順としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：密度勾配遠心分離；リセット（resetting）；細胞密度を変える粒子への結合；抗体被覆磁性ビーズで

50

の磁性分離；アフィニティークロマトグラフィー；補体および細胞毒が挙げられるが、これらに限定されない、mAbに結合したもしくはmAbと関連して使用される細胞傷害性薬剤；ならびに固体マトリクス（例えば、プレート、チップ）に結合させた抗体でのパニング、傾瀉（elutriation）または任意の他の従来技術。

【0154】

分離および分析のための技術としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：フローサイトメトリー（これは、種々の程度の精製を有し得る）、例えば、複数のカラーチャンネル、低角度および鈍角の光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネル。

【0155】

上記細胞は、死細胞と会合する色素（例えば、ヨウ化プロピジウム（PI））を使用することによって、死細胞に対して選択され得る。好ましくは、上記細胞は、2% ウシ胎仔血清（FCS）もしくは0.2% ウシ血清アルブミン（BSA）を含む媒体、または任意の他の適切な、好ましくは無菌の等張性媒体の中に集められる。

【0156】

よって、本発明は一般に、免疫応答細胞（例えば、第1の抗原と結合し、免疫応答細胞を活性化するレセプター、および第2の抗原と結合し、免疫応答細胞を阻害するレセプターを含むウイルス特異的もしくは腫瘍特異的T細胞）を提供する。

【0157】

ベクター

免疫応答細胞（例えば、T細胞、CTL細胞、NK細胞）の遺伝子改変は、実質的に均一な細胞組成物を組換えDNAもしくはRNA構築物で形質導入することによって達成され得る。好ましくは、レトロウイルスベクター（レトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターのいずれか）は、上記DNAもしくはRNA構築物を宿主細胞ゲノムの中に導入するために使用される。例えば、抗原（例えば、腫瘍抗原、またはその改変体もしくはフラグメント）を結合するレセプターをコードするポリヌクレオチドは、レトロウイルスベクターにクローニングされ得、発現は、その内因性プロモーターから、レトロウイルス長末端反復から、または選択的内部プロモーター（alternative internal promoter）から駆動され得る。非ウイルスベクターもしくはRNAも同様に使用され得る。ランダム染色体組み込み、もしくは標的化組み込み（例えば、ヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALENs）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFNs）、および/もしくはclustered regularly interspaced short palindromic repeats（CRISPRs）を使用する）、または導入遺伝子発現（例えば、天然のもしくは化学改変されたRNAを使用する）が使用され得る。

【0158】

腫瘍もしくはウイルス抗原特異的細胞を提供する細胞の最初の遺伝子改変のために、レトロウイルスベクターは、一般に、形質導入のために使用されるが、任意の他の適切なウイルスベクターもしくは非ウイルス送達システムが使用され得る。上記細胞を遺伝子改変して、少なくとも2つの共刺激リガンドを含む抗原提示複合体を含む細胞を提供するために、レトロウイルス遺伝子移入（形質導入）は、同様に有効であると判明している。レトロウイルスベクターおよび適切なパッケージング株の組み合わせもまた適切であり、ここでキャプシドタンパク質は、ヒト細胞に感染させるために機能する。種々の広宿主性ウイルス生成細胞株は公知である（PA12（Miller, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437）；PA317（Miller, et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902）；およびCRIP（Danos, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464）が挙げられるが、これらに限定されない）。非広宿主性粒子もまた適切である（例えば、VSVG、RD114もしくはGALVエンベロープおよび当該分野で公知の任意の他のもので偽型化された粒子）。

10

20

30

40

50

【0159】

考えられる形質導入法はまた、上記細胞とプロデューサー細胞との直接共培養（例えば、Bregni、et al. (1992) Blood 80:1418-1422の方法による）、または適切な増殖因子およびポリカチオンありもしくはなしでのウイルス上清のみもしくは濃縮されたベクターストックとの培養（例えば、Xu、et al. (1994) Exp. Hemat. 22:223-230；およびHughes、et al. (1992) J. Clin. Invest. 89:1817の方法による）を含む。

【0160】

形質導入するウイルスベクターは、免疫応答細胞において共刺激リガンドを発現するために使用され得る。好ましくは、その選択されたベクターは、高い感染効率、ならびに安定な組み込みおよび発現を示す（例えば、Cayouette et al.、Human Gene Therapy 8:423-430、1997；Kido et al.、Current Eye Research 15:833-844、1996；Bloomer et al.、Journal of Virology 71:6641-6649、1997；Naldini et al.、Science 272:263-267、1996；およびMiyoshi et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319、1997を参照のこと）。使用され得る他のウイルスベクターとしては、以下が挙げられる：例えば、アデノウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルスのベクター、ワクシニアウイルス、ウシパピローマウイルス、もしくはヘルペスウイルス（例えば、エプスタイン・バーウイルス）（例えば、the vectors of Miller、Human Gene Therapy 15:14、1990；Friedman、Science 244:1275-1281、1989；Eglitis et al.、BioTechniques 6:608-614、1988；Tolstoshev et al.、Current Opinion in Biotechnology 1:55-61、1990；Sharp、The Lancet 337:1277-1278、1991；Cornetta et al.、Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322、1987；Anderson、Science 226:401-409、1984；Moen、Blood Cells 17:407-416、1991；Miller et al.、Biotechnology 7:980-990、1989；Le Gal La Salle et al.、Science 259:988-990、1993；およびJohnson、Chest 107:77S-83S、1995のベクターもまた参照のこと）。レトロウイルスベクターは、特に十分に開発されており、臨床状況において使用されてきた（Rosenberg et al.、N. Engl. J. Med 323:370、1990；Anderson et al.、米国特許第5,399,346号）。

【0161】

非ウイルスアプローチはまた、細胞中でのタンパク質の発現のために使用され得る。例えば、核酸分子は、リポフェクション（Feigner et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413、1987；Ono et al.、Neuroscience Letters 17:259、1990；Brigham et al.、Am. J. Med. Sci. 298:278、1989；Staubinger et al.、Methods in Enzymology 101:512、1983）、アシアロオロソムコイド-ポリリジン結合体化（Wu et al.、Journal of Biological Chemistry 263:14621、1988；Wu et al.、Journal of Biological Chemistry 264:16985、1989）の存在下で核酸を投与することによって、または手術条件下でのマイクロインジェクション

10

20

30

40

50

(Wolff et al., Science 247:1465, 1990)によって、細胞に導入され得る。遺伝子移入のための他の非ウイルス手段としては、インビトロでリン酸カルシウム、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、およびプロトプラスト融合を使用するトランスフェクションが挙げられる。リポソームはまた、DNAを細胞に送達するために潜在的に有益であり得る。被験体の罹患した組織への正常な遺伝子の移植はまた、正常な核酸を培養可能な細胞タイプ（例えば、自己由来のもしくは異種由来の初代細胞もしくはその子孫）にエキソビボで移入することによって達成され得、その後、上記細胞（もしくはその子孫）は、標的とした組織に注射されるか、または全身に注射される。組換えレセプターはまた、トランスポザーゼもしくは標的化ヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、もしくはTALEヌクレアーゼ）を使用して導かれ得るか、または得られ得る。一過性の発現は、RNAエレクトロポレーションによって得られ得る。

10

【0162】

ポリヌクレオチド治療法における使用のためのeDNA発現は、任意の適切なプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、シミアンウイルス40（SV40）プロモーター、もしくはメタロチオネインプロモーター）から指向され得、任意の適切な哺乳動物調節エレメントもしくはイントロン（例えば、伸長因子1 エンハンサー/プロモーター/イントロン構造）によって調節され得る。例えば、望ましい場合、特定の細胞タイプにおいて遺伝子発現を優先的に指向することが公知のエンハンサーは、核酸の発現を指向するために使用され得る。使用されるエンハンサーとしては、組織特異的エンハンサーもしくは細胞特異的エンハンサーとして特徴付けられるものが挙げられ得るが、これらに限定されない。あるいは、ゲノムクローンを治療用構築物として使用する場合、調節は、コグネイト調節配列によって、もしくは望ましい場合、異種供給源に由来する調節配列（上記のプロモーターもしくは調節エレメントのうちのいずれかを含む）によって、媒介され得る。

20

【0163】

得られた細胞は、改変されていない細胞に類似の条件下で増殖させられ得、それによって、上記改変された細胞が増大させられ得、種々の目的のために使用され得る。

【0164】

ポリペプチドおよびアナログ

30

CD19、PSMA、CD28、CD3、CTLA-4、PD-1、および19-28zポリペプチドまたはこれらの抗新生物活性を増強する（例えば、ヒト化モノクローナル抗体）か、または免疫応答細胞において発現される場合に、細胞傷害性活性を阻害する（例えば、iCAR）方法で改変されているそれらのフラグメントもまた、本発明に含まれる。本発明は、配列の中に変化を生じさせることによって、アミノ酸配列もしくは核酸配列を最適化するための方法を提供する。このような変化としては、ある種の変異、欠失、挿入、または翻訳後修飾が挙げられる。本発明はさらに、本発明の任意の天然に存在するポリペプチドのアナログを含む。アナログは、本発明の天然に存在するポリペプチドから、アミノ酸配列の差異によって、翻訳後修飾によって、またはその両方によって異なり得る。本発明のアナログは、一般に、本発明の天然に存在するアミノ酸配列のうちの全てもしくは一部と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはより高い同一性を示す。配列比較の長さは、少なくとも5個、10個、15個もしくは20個のアミノ酸残基、好ましくは、少なくとも25個、50個、もしくは75個のアミノ酸残基、およびより好ましくは、100個より多くのアミノ酸残基である。繰り返すと、同一性の程度を決定する例示的なアプローチにおいて、密接に関連した配列を示す $e^{-3} \sim e^{-100}$ の間の確率スコアでBLASTプログラムが使用され得る。改変としては、ポリペプチドのインビボおよびインビトロでの化学的誘導体化、例えば、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、もしくはグリコシル化が挙げられ；このような改変は、ポリペプチド合成もしくはプロセシングの間に、または単離された改変酵素での処理の後に、起こり得る。アナログはまた、本発明の天然に

40

50

存在するポリペプチドから、一次配列における変化によって異なり得る。これらとしては、天然および誘発性（例えば、照射もしくはエタンメチルスルフェートへの曝露によるか、または Sambrook、Fritsch and Maniatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.)、CSH Press、1989、もしくは Ausubel et al.、前出によって記載されるとおりの部位特異的変異誘発による、ランダム変異誘発から生じる）の両方の遺伝子改変体が挙げられる。L-アミノ酸以外の残基、例えば、D-アミノ酸もしくは天然に存在しないかもしくは合成のアミノ酸（例えば、アミノ酸もしくはアミノ酸）を含む、環化ペプチド、分子、およびアナログもまた、含まれる。

【0165】

全長ポリペプチドに加えて、本発明はまた、本発明のポリペプチドもしくはペプチドドメインのうちのいずれか1つのフラグメントを提供する。本明細書で使用される場合、用語「フラグメント」とは、少なくとも5個、10個、13個、もしくは15個のアミノ酸を意味する。他の実施形態において、フラグメントは、少なくとも20個の連続したアミノ酸、少なくとも30個の連続したアミノ酸、もしくは少なくとも50個の連続したアミノ酸、および他の実施形態において、少なくとも60～80個、100個、200個、300個もしくはより多くの連続したアミノ酸である。本発明のフラグメントは、当業者に公知の方法によって生成され得るか、または通常のタンパク質プロセッシング（例えば、生物学的活性にとって必要とされない発生期ポリペプチドからのアミノ酸の除去もしくは選択的mRNAスプライシングもしくは選択的タンパク質プロセッシング事象によるアミノ酸の除去）から生じ得る。

【0166】

非タンパク質アナログは、本発明のタンパク質の機能的活性を模倣するように設計された化学構造を有する。このようなアナログは、本発明の方法に従って投与される。このようなアナログは、元のポリペプチドの生理学的活性を超え得る。アナログ設計の方法は、当該分野で周知であり、アナログの合成は、得られるアナログが、免疫応答細胞において発現される場合にその元のポリペプチドの抗新生物活性を増大させるように化学的構造を改変することによって、このような方法に従って行われ得る。これら化学的改変としては、代替りのR基に置換すること、および参照ポリペプチドの特定の炭素原子における飽和の程度を変化させることが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、上記タンパク質アナログは、インビボでの分解に比較的抵抗性であり、投与の際により長期の治療効果を生じる。機能的活性を測定するためのアッセイとしては、以下の実施例に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0167】

共刺激リガンド

少なくとも1種の共刺激リガンドとの相互作用は、免疫細胞（例えば、T細胞）の完全な活性化にとって重要な非抗原特異的シグナルを提供する。共刺激リガンドとしては、腫瘍壊死因子（TNF）リガンド、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-12、IL-15もしくはIL-21）、および免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。腫瘍壊死因子（TNF）は、全身炎症に関与するサイトカインであり、急性期反応を刺激する。その主な役割は、免疫細胞の調節にある。腫瘍壊死因子（TNF）リガンドは、多くの共通する特徴を共有する。上記リガンドの大部分は、短い細胞質セグメントおよび比較的長い細胞外領域を含むタイプII膜貫通型タンパク質（細胞外C末端）として合成される。TNFリガンドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：神経増殖因子（NGF）、CD40L（CD40L）/CD154、CD1137L/4-1BB、腫瘍壊死因子（TNF）、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fasリガンド（FasL）、CD30L/CD153、腫瘍壊死因子（TNF）/リンホトキシン（LT）、リンホトキシン（LT）、CD257/B細胞活性化因子（BAFF）/Blys/THANK/Tal1-1、グルココルチコイド誘発性TNFレセプターリガンド（GITRL

）、およびTNF関連アポトーシス誘発リガンド（TRAIL）、LIGHT（TNFSF14）。免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーは、細胞の認識、結合もしくは接着プロセスに関与する細胞表面タンパク質および可溶性タンパク質の大きなグループである。これらタンパク質は、免疫グロブリンと構造特徴を共有する。すなわち、それらは、免疫グロブリンドメイン（折りたたみ）を有する。免疫グロブリンスーパーファミリーリガンドとしては、CD80、CD86およびICOS（ともに、CD28のリガンド）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0168】

投与

本発明の遺伝子改変された免疫応答細胞（例えば、T細胞、先天性免疫系の細胞、NK細胞、CTL細胞、もしくはそれらの子孫）を含む組成物は、新生物形成、病原体感染、もしくは感染性疾患の処置のために、被験体に全身にもしくは直接提供され得る。一実施形態において、本発明の細胞は、目的の器官（例えば、新生物形成に冒されている器官）へと直接注射される。あるいは、遺伝子改変された免疫応答細胞を含む組成物は、上記目的の器官へと、例えば、循環系（例えば、腫瘍血管系）への投与によって、間接的に提供される。増殖および分化薬剤は、上記細胞の投与の前、その間、もしくはその後に提供されて、T細胞、先天性免疫系の細胞、NK細胞、もしくはCTL細胞のインビボもしくはインビトロでの生成を増大し得る。

【0169】

上記改変された細胞は、任意の生理学的に受容可能なビヒクル中で、通常は静脈内に投与され得るが、それらはまた、骨もしくは他の都合の良い部位に導入され得、ここで上記細胞は、再生および分化に適切な部位を見出し得る（例えば、胸腺）。通常、少なくとも 1×10^5 細胞が投与され、最終的には、 1×10^{10} 以上に達する。本発明の遺伝子改変された免疫応答細胞は、精製された細胞集団を含み得る。当業者は、種々の周知の方法（例えば、蛍光活性化セルソーティング（FACS））を使用して、集団中の遺伝子改変された免疫応答細胞のパーセンテージを容易に決定し得る。遺伝子改変された免疫応答細胞を含む集団中の純度の好ましい範囲は、約50～約55%、約55～約60%、および約65～約70%である。より好ましくは、上記純度は、約70～約75%、約75～約80%、約80～約85%であり；そしてさらにより好ましくは、上記純度は、約85～約90%、約90～約95%、および約95～約100%である。投与量は、当業者によって容易に調節され得る（例えば、純度の低下は、投与量の増大を要し得る）。上記細胞は、注射、カテーテルなどによって導入され得る。望ましい場合、インターロイキン（例えば、IL-2、IL-3、IL6、IL-11、IL7、IL12、IL15、IL21、ならびに他のオンターロイキン）、コロニー刺激因子（例えば、G-CSF、M-CSFおよびGM-CSF）、インターフェロン（例えば、インターフェロン）、およびエリスロポエチンが挙げられるが、これらに限定されない因子もまた、含まれ得る。

【0170】

本発明の組成物は、遺伝子改変された免疫応答細胞もしくはそれらの子孫および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を包含する。投与は、自己由来のもしくは異種由来であり得る。例えば、免疫応答細胞、もしくは子孫は、ある被験体から得られ得、同じ被験体もしくは異なる適合性の被験体に投与され得る。本発明の末梢血由来免疫応答細胞もしくはそれらの子孫（例えば、インビボ、エキソビボもしくはインビトロ由来の）は、カテーテル投与、全身投与、局所注射、静脈内注射、もしくは非経口投与を含め、局所注射を介して投与され得る。本発明の治療的組成物（例えば、遺伝子改変された免疫応答細胞を含む薬学的組成物）を投与する場合、それは一般に、単位投与注射形態（液剤、懸濁物、エマルジョン）中に製剤化される。

【0171】

製剤

遺伝子改変された免疫応答細胞を含む本発明の組成物は、選択されたpHに緩衝化され得る滅菌液体調製物（例えば、等張性水性溶液、懸濁物、エマルジョン、分散物、もしくは

10

20

30

40

50

粘性組成物)として、都合の良いように提供され得る。液体調製物は通常、ゲル、他の粘性組成物、および固体組成物より調製しやすい。さらに、液体組成物は、投与する(特に注射による)には、幾分より都合がよい。粘性組成物は、他方で、特定の組織とのより長い接触期間を提供するために適切な粘性範囲内で製剤化され得る。液体もしくは粘性の組成物は、溶媒もしくは分散媒(例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、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など)、およびこれらの適切な混合物を含む)であり得るキャリアを含み得る。

【0172】

滅菌注射用溶液は、必要量の適切な溶媒の中に、望ましい場合には種々の量の他の成分とともに、本発明を実施するにあたって利用される遺伝子改変された免疫応答細胞を組み込むことによって調製され得る。このような組成物は、適切なキャリア、希釈剤、もしくは賦形剤(例えば、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなど)と混合した状態にあり得る。上記組成物はまた、凍結乾燥され得る。上記組成物は、投与経路および所望の調製物に依存して、補助物質(例えば、湿潤剤、分散剤、もしくは乳化剤(例えば、メチルセルロース)、pH緩衝化剤、ゲル化剤もしくは粘性増強添加剤、保存剤、矯味矯臭剤、着色剤など)を含み得る。標準テキスト、例えば、「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE」、17th edition、1985(本明細書に参考として援用される)が、過度の実験なく適切な調製物を調製するために調べられ得る。

【0173】

上記組成物の安定性および滅菌性を増強する種々の添加剤(抗菌性保存剤、抗酸化剤、キレート化剤、および緩衝化剤が挙げられる)が、添加され得る。微生物活動の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって保証され得る。薬学的な注射用形態の長期の吸収は、球腫を遅らせる薬剤、例えば、水酸化アルミニウム(alum)、イヌリン(inulin)モノステアレートおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。しかし、本発明によれば、使用される任意のビヒクル、希釈剤もしくは添加剤が、遺伝子改変された免疫応答細胞もしくはそれらの子孫と適合性でなければならない。

【0174】

上記組成物は等張性であり得る。すなわち、それらは、血液もしくは涙液と同じ浸透圧を有し得る。本発明の組成物の所望の等張性は、塩化ナトリウム、もしくは他の薬学的に受容可能な薬剤(例えば、デキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、ポリエチレングリコールまたは他の無機溶質もしくは有機溶質)を使用して達成され得る。塩化ナトリウムは、特にナトリウムイオンを含む緩衝液にとって好ましい。

【0175】

上記組成物の粘性は、望ましい場合、薬学的に受容可能な濃化剤を使用して選択したレベルで維持され得る。メチルセルロースは、容易にかつ経済的に入手可能であり、扱いやすいことから好ましい。他の適切な濃化剤としては、例えば、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが挙げられる。上記濃化剤の好ましい濃度は、選択される薬剤に依存する。重要な点は、選択された粘性を達成する量を使用することである。明らかに、適切なキャリアおよび他の添加剤の選択は、正確な投与経路および特定の投与形態(例えば、液体投与形態(例えば、上記組成物が溶液、懸濁物、ゲルもしくは別の液体形態(例えば、徐放性形態もしくは液体充填形態(liquid-filled form)へと製剤化される予定か否か)の性質に依存する。

【0176】

当業者は、上記組成物の成分が化学的に不活性であり、本発明に記載されるとおりの遺伝子改変された免疫応答細胞の生存性もしくは効力に影響を与えないように選択されるべきであることを認識する。これは、化学および薬学の原理に熟練した者にとって何ら問題を提示せず、または問題は、標準テキストを参照することによって、もしくは単純な実験(

10

20

30

40

50

過度な実験を要しない)によって、本開示および本明細書で引用される文書から容易に回避され得る。

【0177】

本発明の遺伝子改変された免疫応答細胞の治療的使用に関する1つの懸念は、最適な効果を達成するために必要な細胞の量である。投与される予定の細胞の量は、処置されている被験体によって変動する。一実施形態において、 $10^4 \sim 10^{10}$ の間、 $10^5 \sim 10^9$ の間もしくは $10^6 \sim 10^8$ の間の本発明の遺伝子改変された免疫応答細胞が、ヒト被験体に投与される。より有効な細胞が、さらに小数で投与されてもよい。いくつかの実施形態において、少なくとも約 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、および 5×10^8 の本発明の遺伝子改変された免疫応答細胞は、ヒト被験体に投与される。何が有効用量であるかの正確な決定は、各被験体に特有の因子(それらの大きさ、年齢、性別、体重、および特定の被験体の状態が挙げられる)に基づき得る。投与量は、本開示および当該分野の知識から、当業者によって容易に確認され得る。

10

【0178】

当業者は、本発明の組成物中の、および本発明の方法において投与される予定の細胞および選択肢的な添加剤、ビヒクル、および/もしくはキャリアの量を容易に決定し得る。代表的には、任意の添加剤(活性な細胞および/もしくは薬剤に加えて)は、リン酸緩衝化生理食塩水中に0.001~50%(重量)溶液の量で存在し、上記活性成分は、マイクログラムもしくはミリグラム程度(例えば、約0.0001~約5重量%、好ましくは、約0.0001~約1重量%、さらにより好ましくは、約0.0001~約0.05重量%もしくは約0.001~約20重量%、好ましくは、約0.01~約10重量%、およびさらにより好ましくは、約0.05~約5重量%)で存在する。当然のことながら、動物もしくはヒトに投与される予定の任意の組成物に関して、および任意の特定の投与方法に関して、そのために：毒性(例えば、適切な動物モデル(例えば、マウスのような齧歯類)において致死用量(LD)およびLD50を決定する)；ならびに上記組成物の投与量、その中の成分の濃度および上記組成物を投与するタイミング(これは、適切な応答を誘発する)を決定することは、好ましい。このような決定は、当業者の知識、本開示および本明細書で引用される文書から過度な実験を要しない。そして逐次的な投与の時間は、過度な実験なしに確認され得る。

20

【0179】

処置方法

本明細書で提供されるのは、被験体において新生物形成を処置するための方法である。被験体(例えば、免疫無防備状態のヒト被験体)において病原体感染もしくは他の感染性疾患を処置するための方法もまた、本明細書で企図される。上記方法は、本発明のT細胞、先天性免疫系の細胞、NK細胞、もしくはCTL細胞を、望ましい効果、既存の状態の緩和もしくは再発の防止を達成するために有効な量で投与する工程を包含する。処置に関して、投与される量は、望ましい効果を生じるにあたって有効な量である。有効量は、1回の投与もしくは一連の投与の中で提供され得る。有効量は、ボーラスでもしくは連続灌流によって提供され得る。

30

【0180】

「有効量」(もしくは「治療上有効な量」)は、処置の際に有益なもしくは所望の臨床的結果をもたらすために十分な量である。有効量は、1以上の用量で被験体に投与され得る。処置に関して、有効量は、上記疾患の進行を和らげる、改善する(ameliorate)、安定化する、改善する(reverse)もしくは遅らせるか、またはさもないければ上記疾患の病理学的転帰を軽減するために十分な量である。上記有効量は、一般には、症例毎を基本に医師によって決定され、当業者の技術範囲内である。有効量を達成するために適切な投与量を決定する場合に、いくつかの要因が代表的には考慮される。これら要因としては、被験体の年齢、性別および体重、処置されている疾患の状態、上記状態の重症度ならびに投与される抗原結合フラグメントの形態および有効濃度が挙げられる。

40

【0181】

50

抗原特異的 T 細胞を使用する養子免疫療法のために、 $10^6 \sim 10^{10}$ の範囲（例えば、 10^9 ）の細胞用量が、代表的には注入される。上記遺伝子改変された細胞を上記宿主に投与し、その後分化した際に、上記特定の抗原に対して特異的に指向される T 細胞が誘発される。T 細胞の「誘発」は、例えば、欠失もしくはアネルギーによる、抗原特異的 T 細胞の不活性化を含み得る。不活性化は、自己免疫障害におけるように寛容性を確立もしくは再確立するために特に有用である。上記改変された細胞は、当該分野で公知の任意の方法によって投与され得る（静脈内、皮下、節内、腫瘍内、鞘内、胸腔内、腹腔内および胸腺に直接、が挙げられるが、これらに限定されない）。

【0182】

治療法

本発明は、必要な被験体において免疫応答を増大させるための方法を提供する。一実施形態において、本発明は、被験体において新生物形成を処置もしくは予防するための方法を提供する。本発明は、従来の治療介入に反応しない血液の癌（例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫）または卵巣癌を有する被験体の処置のために特に有用な治療を提供する。治療に適切なヒト被験体は、代表的には、臨床基準によって区別され得る 2 つの処置群を含む。「進行した疾患」もしくは「高腫瘍量」を有する被験体は、臨床的に測定可能な腫瘍を有する被験体である。臨床的に測定可能な腫瘍は、腫瘍の塊に基づいて（例えば、触診、CAT スキャン、ソノグラム、マンモグラムもしくは X 線によって；それら自体にある陽性の生化学的もしくは組織病理学的マーカーは、この集団を同定するためには不十分である）検出され得るものである。本発明において具現化される薬学的組成物は、それら状態を和らげる目的で、抗腫瘍応答を誘発するためにこれら被験体に投与される。理想的には、結果として腫瘍塊の縮小が起こるが、任意の臨床的改善は利益を与える。臨床的改善としては、進行のリスクもしくは速度の低下、または上記腫瘍の病理学的転帰の低減が挙げられる。

【0183】

適切な被験体の第 2 の群は、当該分野で「補助群」として公知である。これらは、新生物形成の履歴を有したことがあるが、別の治療態様に応答性であった個体である。以前の治療としては、外科的切除、放射線療法、および古典的な化学療法を受けたことがあり得るが、これらに限定されない。結果として、これら個体は、臨床的に測定可能な腫瘍を有しない。しかし、彼らは、元の腫瘍部位付近でもしくは転移によってのいずれかであっても、上記疾患の進行のリスクがあると疑われる。この群は、高リスク個体および低リスク個体へとさらに下位分類され得る。この下位分類は、最初の処置の前後に認められた特徴に基づいて行われる。これら特徴は、臨床分やで公知であり、各異なる新生物形成に関して適切に定義される。高リスク亜群に代表的な特徴は、腫瘍が隣接する組織に侵襲してしまったか、またはリンパ節への侵襲を示すものである。

【0184】

別の群は、新生物形成の遺伝的素因を有するが、新生物形成の臨床徴候をこれまで明示したことがない。例えば、乳癌と関連する遺伝的変異に関して試験陽性であるが、未だ妊娠可能な年齢である女性は、予防的手術を行うのが適切になるまでに、新生物形成の発生を予防的に妨げる処置において本明細書で記載される抗原結合フラグメントのうちの 1 種以上を受けようとし得る。

【0185】

以下の新生物形成のうちのいずれか：神経膠芽腫、黒色腫、神経芽腫、腺癌、神経膠腫、軟組織肉腫、および種々の癌腫（前立腺癌および小細胞肺癌が挙げられる）を有するヒト新生物形成被験体は、特に適切な被験体である。適切な癌腫としては、腫瘍学分野で公知のいずれかのものがさらに挙げられる（星状細胞腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、乏突起神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、未分化神経外胚葉性腫瘍（PNET）、軟骨肉腫、骨原性肉腫、膵管腺癌、小細胞肺癌および大細胞肺癌（small and large cell lung adenocarcinomas）、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（endotheliosarcoma）、扁平上皮癌、細気管支肺胞癌（broncho

10

20

30

40

50

alveolarcarcinoma)、上皮性腺癌、およびこれらの肝転移、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫(lymphangiomasarcoma)、肝癌、胆管癌、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、横紋筋肉腫、結腸癌、基底細胞癌、汗腺癌、乳頭状癌、脂腺癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫瘍、血管芽腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、神経芽腫、網膜芽腫、白血病、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、およびH鎖病、乳房腫瘍(例えば、管癌および小葉癌)、子宮頸部の扁平上皮癌および腺癌、子宮および卵巣の上皮癌、前立腺癌、膀胱の移行扁平上皮癌、B細胞およびT細胞リンパ腫(リンパ節型およびびまん型)形質細胞腫、急性および慢性の白血病、悪性黒色腫、軟組織肉腫および平滑筋肉腫が挙げられるが、これらに限定されない)。

10

【0186】

上記被験体は、進行した疾患形態を有し得、その場合、処置目的は、疾患進行の緩和もしくは改善、および/または副作用の改善を含み得る。上記被験体は、上記状態の履歴を有し得、そのために、彼らは既に処置されており、その場合、治療目的は、代表的には、再発のリスクの低下もしくは遅延を含む。

【0187】

よって、本発明は、被験体において新生物形成を処置もしくは予防するための方法を提供し、上記方法は、腫瘍抗原と結合し、免疫応答細胞を活性化するレセプター(例えば、TCR、CAR)および標的抗原と結合し、上記免疫応答細胞を抑制する阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)をコードするベクターを含む、有効量の免疫応答細胞を投与する工程を包含する。腫瘍抗原と結合し、上記免疫応答細胞を活性化するレセプター(例えば、TCR、CAR)および標的抗原と結合し、上記免疫応答細胞を抑制する阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)をコードするベクターの細胞表面発現の結果として、養子移入されたヒトT細胞もしくはNK細胞は、選択的細胞傷害性活性が与えられる。

20

【0188】

一実施形態において、上記新生物形成は、血液の癌(例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫)、卵巣癌、肉腫、および急性骨髄性白血病(AML)、前立腺癌、乳癌、膀胱癌、脳の癌、結腸癌、腸の癌、肝臓癌、肺癌、脾臓癌、前立腺癌、皮膚癌、胃癌、神経膠芽腫、および咽頭癌からなる群より選択される。別の実施形態において、上記腫瘍抗原は、以下のうちの1以上である:炭酸脱水素酵素IX(CAIX)、癌胎児性抗原(CEA)、CD5、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞の抗原(例えば、細胞表面抗原)、上皮糖タンパク質2(EGP2)、上皮糖タンパク質-40(EGP-40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、レセプターチロシンプロテインキナーゼerbB-2、3、4、葉酸結合タンパク質(FBP)、胎児型アセチルコリンレセプター(ACHR)、葉酸レセプター-a、ガングリオシドG2(GD2)、ガングリオシドG3(GD3)、ヒト上皮増殖因子レセプター2(HER-2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、インターロイキン-13レセプターサブユニット-2(IL-13R2)、-軽鎖、キナーゼインサートドメインレセプター(KDR)、ルイスY(LeY)、L1細胞接着分子(L1CAM)、黒色腫抗原ファミリーA1(MAGE-A1)、ムチン16(Muc-16)、ムチン1(Muc-1)、メソテリン(MSLN)、NKG2Dリガンド、癌精巣抗原NY-ESO-1、癌胎児抗原(h5T4)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72)、血管内皮増殖因子R2(VEGF-R2)、もしくはウィルムス腫瘍タンパク質(WT-1)。

30

40

【0189】

他の実施形態において、本発明は、病原体感染(例えば、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、寄生生物感染、もしくは原生動物感染)を有する患者を処置するための方法を提供

50

する。本発明は、免疫無防備状態の被験体において免疫応答を増強するために特に有用である。本発明の方法を使用する処置に反応しやすい例示的なウイルス感染としては、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、およびインフルエンザウイルスの感染が挙げられるが、これらに限定されない。よって、本発明は、被験体において病原体感染を処置もしくは予防するための方法を提供し、上記方法は、有効量の、本明細書で記載されるとおりの免疫応答細胞を投与する工程を包含する。

【0190】

キット

本発明は、新生物形成、病原体感染、免疫障害もしくは同種異系移植の処置もしくは予防のためのキットを提供する。一実施形態において、上記キットは、活性化抗原レセプターおよび阻害性キメラ抗原レセプター（iCAR）を含む免疫応答細胞の有効量を単位投与形態で含む治療用もしくは予防用の組成物を含む。いくつかの実施形態において、上記キットは、治療用もしくは予防用のワクチンを含む滅菌容器を含み；このような容器は、ボックス、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、プリスターパック、もしくは当該分野で公知の他の適切な容器形態であり得る。このような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属ホイル、もしくは医薬を保持するために適した他の材料から作製され得る。

【0191】

望ましい場合、上記免疫応答細胞は、新生物形成、病原体感染、免疫障害もしくは同種異系移植を有するかまたは発生させるリスクのある被験体に、上記細胞を投与するための説明書と一緒に提供される。上記説明書は、一般に、新生物形成、病原体感染、免疫障害もしくは同種異系移植の処置もしくは予防のための組成物の使用についての情報を含む。他の実施形態において、上記説明書は、以下のうちの少なくとも1つを含む：治療剤の説明；投与スケジュールおよび新生物形成、病原体感染、免疫障害もしくは同種異系移植またはこれらの症状の処置もしくは予防のための投与；予防措置；警告；適応症；禁忌（counter-indication）；過剰投与情報；有害反応；動物薬理学；臨床研究；および/または参考文献。上記説明書は、容器（存在する場合）に直接印刷され得るか、あるいは容器に貼付されるラベルとしてもしくは別個のシート、パンフレット、カードまたは上記容器の中にもしくは容器と一緒に供給されるフォルダとして印刷され得る。

【実施例】

【0192】

本発明の実施は、別段示されなければ、分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術（これらは、当業者の十分に技術範囲内である）を使用する。このような技術は、文献（例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、second edition（Sambrook、1989）；「Oligonucleotide Synthesis」（Gait、1984）；「Animal Cell Culture」（Freshney、1987）；「Methods in Enzymology」；「Handbook of Experimental Immunology」（Weir、1996）；「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」（Miller and Calos、1987）；「Current Protocols in Molecular Biology」（Ausubel、1987）；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」、(Mullis、1994)；「Current Protocols in Immunology」（Coligan、1991)）の中で十分に説明されている。これら技術は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの生成に適用可能であり、よって、本発明の作製および実施にあたって考慮され得る。特定の実施形態のために特に有用な技術は、以下の節において考察される。

【0193】

以下の実施例は、当業者に本発明のアクセイ、スクリーニング、および治療法をどのように作製および使用するかの完全な開示および説明を提供するために示され、本発明者らが彼らの発明として解釈するものの範囲を限定するとは意図されない。

【0194】

実施例1．阻害性キメラ抗原レセプター（iCAR）はオフターゲット応答を回避する。

【0195】

概要

T細胞療法は、いくつかの癌の処置に関する長期の効力および根治の可能性を示した。しかし、それらの使用は、ドナーリンパ球注入後の移植片対宿主病において認められるように、バースタンダー組織への損傷、またはいくらかの操作されたT細胞療法において被る「オンターゲット、オフ腫瘍」毒性によって制限される。非特異的免疫抑制および可逆性のT細胞除去は、このような有害な応答を制御するための現在唯一の手段であるが、治療利益を捨てるまたは二次的な合併症を引き起こすという犠牲を払っている。免疫阻害性レセプターの生理学的パラダイムに基づいて、抗原特異的阻害性キメラ抗原レセプター（iCAR）を、T細胞応答を先制的に抑えるように設計した。その結果は以下に示されたとおり、CTL A - 4ベースのもしくはPD - 1ベースのiCARが、サイトカイン分泌、細胞傷害性、および内因性T細胞レセプターもしくは活性化キメラレセプターを通じて誘発される増殖を選択的に制限し得ることを示す。上記iCARの最初の効果は一時的であるので、T細胞がそれらの活性化レセプターによって認識される抗原とその後遭遇する際に機能することを可能にする。このようにして、iCARは、不適切なT細胞特異性の転帰を処置するというよりむしろ予防するためのダイナミックな自己調節性安全スイッチを提供する。

【0196】

導入

T細胞療法は、骨髄および臓器移植、癌免疫療法、ウイルス感染、ならびに自己免疫疾患において臨床効力を示した（1 - 6）。不運なことに、T細胞は、有害な副作用にも関わり得る。「オンターゲットであるがオフ腫瘍」の有害事象は、T細胞レセプター（TCR）操作したT細胞およびキメラ抗原レセプター（CAR）操作したT細胞の両方を使用する癌免疫療法臨床試験において報告された。これらとしては、抗CD19 CARを発現するT細胞で処置した慢性リンパ性白血病患者におけるB細胞形成不全（7 - 9）、肺上皮に対する交叉反応性から生じると考えられる抗ERBB2 CAR T細胞注入後の胎児急性呼吸窮迫症候群（10）、および癌精巢抗原を認識するTCRで処置した患者が被った心筋壊死もしくは神経毒性に由来するTCR誘発性の死亡（11 - 13）が挙げられる。同様に、同種異系の骨髄移植におけるドナーリンパ球注入（DLI）の治療力の獲得は、急性および慢性両方の移植片対宿主病（GVHD）および骨髄形成不全の誘発によって妨げられる（14）。移植片対腫瘍（GVT）の有益な効果をGVHDから区別する戦略は、今日まで成功が制限されている（15）。

【0197】

T細胞媒介性毒性を抑制する現在のアプローチは、T細胞に対して細胞増殖抑制性効果もしくは細胞傷害性効果を発揮して、免疫応答を抑制する免疫抑制レジメン（例えば、高用量コルチコステロイド治療）の使用に依拠している（16）。有効ではあるものの、このアプローチは、有益なT細胞機能と有害なT細胞機能との間を識別できない。さらに、免疫抑制薬は、実質的な二次的副作用（例えば、易感染性、ならびに心臓、腎臓、および神経の損傷）を引き起こす（14）。自殺遺伝子操作戦略（これは、毒性因子（例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（17）もしくは誘発性カスパーゼ - 9（18））の選択的酵素メタボライザーを使用し得る）、またはT細胞へと操作された異所性エピトープを標的とする抗体媒介性除去戦略（19, 20）はまた、それらの治療効力からも見境なく、T細胞を除去する。さらに、これらアプローチは、それらが有害な副作用を観察した後に実施されるので反作用的（reactive）である。望ましくないT細胞反応性を防止する戦略は、よって、非常に望まれる。

【0198】

T細胞活性化の生理学的調節は、免疫阻害性レセプターを含むいくつかの機構（これらは、T細胞応答を弱らせるかもしくは終わらせるにあたって中心的な役割を果たす）によって達成される（21, 22）。阻害性レセプターは、免疫応答を次第に減らすためにT細胞刺激の間にアップレギュレートされ得るか、または活性化閾値を調節するために基礎発現され得る。従って、阻害性レセプターCTLA-4を欠損するマウスは、広範囲に及ぶT細胞活性化および増殖を示し、最終的には、活性化T細胞の浸潤を伴う重症の全身性自己免疫疾患で死に至る（23）。同様に、PD-1（活性化T細胞上で特異的に発現される別の阻害性レセプター）の喪失は、C57BL/6マウスにおいて進行性の関節炎および糸球体腎炎を、ならびに非肥満性糖尿病（NOD）マウスにおいて加速した膵島炎を引き起こす（24, 25）。これらレセプターの調節およびそれらの下流のシグナル伝達経路は、T細胞機能に対して実質的な影響を有する。T細胞刺激の間のCTLA-4もしくはPD-1のインビトロでのライゲーションは、活性化、サイトカイン放出、および増殖をブロックする（26）。顕著なことには、抗CTLA-4抗体および抗PD-1抗体は、黒色腫、肺癌および腎癌を有するいくつかの患者において抗T細胞応答を抑制解除することによって臨床上的有望性を示した（22, 27, 28）。CTLA-4およびPD-1両方のブロックはまた、慢性B型肝炎およびHIV感染における免疫機能不全およびウイルス持続性を改善するために活発に調査されている最中である（29, 30）。しかし、非特異的免疫抑制と同様に、抗体媒介性阻害性レセプターチェックポイントブロックは、抗原特異的ではないので、有益なT細胞集団と有害なT細胞集団との間を識別しない。

10

20

【0199】

遺伝子操作ストラテジーは、天然のT細胞阻害生理学を制御・利用し、抗原選択的様式でT細胞応答を調節するために使用された。表面抗原認識ドメインと強力な急性阻害性シグナル伝達ドメインとを併せ持って、活性化レセプターの同時の結合にも拘わらずT細胞応答性を制限する阻害性キメラ抗原レセプター（CAR（iCAR））を設計した（図1A）。以下で示したように、ヒト初代T細胞において、PD-1ベースのおよびCTLA-4ベースのiCARは、重要なTCRもしくは活性化CAR機能を可逆的に制限し、従って、インビトロおよびインビボで、標的細胞とオフターゲット細胞との間の識別を可能にする。

30

【0200】

材料および方法

研究設計

本研究の目的は、抗原依存性かつ可逆性の様式で標的細胞に対するT細胞毒性を制限し得る合成レセプターを作ることであった。CTLA-4もしくはPD-1の細胞内テールおよびscFv標的化ドメイン（PSMAに対する）を使用する2つのこのようなレセプターを設計し、それらが（i）TCR駆動T細胞機能性もしくは（ii）CAR駆動T細胞機能性を、インビトロおよびインビボでブロックし得るか否かを分析した。インビトロでは、（i）細胞傷害性、（ii）サイトカイン分泌、および（iii）T細胞増殖を分析することに焦点を当てた。インビボ実験では、iCARがライブイメージングおよびエンドポイント分析（マウスの末処置群によって示される）を使用して細胞標的を保護する統合能力を分析した。実験手順は、Institutional Animal Care and Use Committee of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center（MSKCC）によって承認を受けた。上記実験の全般的設計は、T細胞（iCARもしくはコントロールPd-1レセプターを発現する）を標的細胞（PSMAを発現するかもしくは欠いている）に曝し、常に内部コントロールの存在下でiCAR機能をインターロゲートしようとする群を比較することであった。iCARを欠いているT細胞は、T細胞をiCARもしくはiCAR/CAR二重陽性（レポーター遺伝子を使用する）であるようにソートすることによって、結果に混合を引き起こすことから制限された。各実験を、種々のドナーT細胞を使用して複数回行った

40

50

(T細胞は決してプールしなかった)。大部分の場合、代表的実験(サンプル複製は3より大きい)を使用するデータを、形質導入効率およびソーティング効率、ドナー関連変動性、ならびにE/T比に起因する差異のような混乱させる変数を回避するために示した。

【0201】

阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)設計

各阻害性キメラ抗原レセプター(iCAR)を、2つのアプローチを使用するUniProt配列註釈とともに設計した。第1に、商業的遺伝子合成もしくはcDNAを使用して、各レセプターの細胞内ドメインを、以前に記載されたPz1レセプター(Stephan et al., Nature medicine, 2007, 13(12): 1440-9)のCD28/CD3ドメインの代わりにクローニングし、従って、CD8膜貫通ドメインおよびヒンジドメインを利用した。CD8ポリペプチドは、以下に示されるとおりのアミノ酸配列を有し得る：

【化10】

```
MALPVTALLLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTS  
GCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSD  
FRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQP  
LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNH  
RNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV 【配列番号11】
```

【0202】

上記CD8膜貫通ドメインおよびヒンジドメインを、配列番号11のアミノ酸137~209のアミノ酸配列を有し得る。代わりにもしくはさらに、CD4膜貫通ドメインおよびヒンジドメインも使用し得、そして試験した。iCAR構築物の核酸配列およびアミノ酸配列を、付録Aに提供する。あるいは、上記膜貫通ドメインおよび最大で上記第1の註釈をつけた細胞外位相的ドメイン(topological domain)までのアミノ酸(PD-1に関してはアミノ酸145~288;CTLA4に関してはアミノ酸161~223)を、各レセプターの内因性ヒンジ領域を利用するように含めた。これら構築物を、PSMA scFvの後ろにP28zベクターにクローニングした。上記2つのアプローチによって生じたレセプターの間で、有意な機能的差異は認められなかった。さらに、いかなる標的化ドメインをも欠いているが、各レセプターの膜貫通部分および細胞内部分を保持する、各iCARのバージョンを作った。コントロールPdellレセプターを、P-28zのCD28/CD3ドメインを削除することによって設計した(34)。iCARは、CAR(これらの全ては、iCARとは全く対照的に、T細胞活性化を誘発する)から明確に区別されるべきである。PSMA scFvの核酸配列は、以下に提供される：

【化 1 1】

atggCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATG
 CAGAGGTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttc
 agtgaggatatacctgcaagacttctggatacacattcactgaatataccata
 cactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggaaacatca
 atcctaacaatggtggtaccacctacaatcagaagttcgaggacaaggccac
 attgactgtagacaagtcctccagtacagcctacatggagctccgcagccta
 acatctgaggattctgcagtcctattattgtgcagctggttggaaactttgact
 actggggccaaggaccacGGTCACGtctcctcaggtggaggTggAtcagg
 TggaggtggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATGACCCAGTCTCAC
 AAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGTAAGGCCA
 GTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATC
 TCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGAT
 CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATG
 TTCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTGTCAGCAATATAACAGCTATCC
 CCTCACGTTCCGGTGTCTGGGACCATGCTGGACCTGAAACGGGcgggccgcA

【配列番号12】

10

【 0 2 0 3】

P S M A s c F v のアミノ酸配列は、以下に提供される：

【化 1 2】

MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTI
 HWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSL
 TSEDSAVYYCAAGWNFDYWQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIVMTQSH
 KFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPD
 RFTGSGSGTDFLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAA

【配列番号13】

20

【 0 2 0 4】

レセプター（例えば、P D - 1、C T L A - 4、2 B 4、L A G - 3 および B T L A - 4）をまた、C D 1 9 標的 s c F V で試験した。C D 1 9 s c F V の核酸配列は、以下に提供される：

30

【化 1 3】

ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
 GTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATT
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAG
 AGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACT
 AACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGC
 ACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGT
 GCAAGAAAGACCATTAGTTCCGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGG
 ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGA
 GGTGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGA
 GACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGG
 TATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGG
 AACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
 ACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAAC
 AGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGcgggccgcA

【配列番号14】

40

【 0 2 0 5】

C D 1 9 s c F V のアミノ酸配列は、以下に提供される：

【化 1 4 - 1】

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISKASGYAFSSYWM
 NWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGL

50

【化 1 4 - 2】

TSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD
 IELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATY
 RNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLE
 IKRAAAMALPVTALLLPLALLLHAEVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYA
 FSSYWMNWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAY
 MQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSG
 GGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPL
 IYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSG
 GGTGLEIKRAAA 【配列番号15】

10

【0206】

上記PSMA標的s c F Vおよび上記CD19標的s c F Vは、適切な構造的考察が認められる限りにおいて、iCARのモジュラー性質に起因して交換され得る。

【0207】

結合体化アッセイ、ウェスタンブロットおよびGAM染色

【0208】

各iCARの細胞表面発現を、以前に記載されたヤギ抗マウス染色プロトコル(Markley et al., Blood, 2010, 115(17): 3508-19)を使用して分析した。細胞結合体化アッセイを、以前に記載されたように行った(Burshdyn and Davidson, Natural killer cell conjugate assay using two-color flow cytometry, Methods in molecular biology, 2010, 612: 89-96)。簡潔には、EL4細胞もしくはEL4-PSMA細胞を、親油性DiD色素(Invitrogen)で標識し、1:1比でT細胞とFACSチューブ中で混合し、37℃において5分間インキュベートし、フローサイトメトリーで分析した。ウェスタンブロット分析を、標準プロトコルを使用してBio-rad Mini-PROTEAN Tetraシステムで行った。CTLA-4の細胞内テールを、CTLA-4末端を認識するポリクローナル抗体C-19(Santa Cruz Biotechnology)を使用して検出した。

20

【0209】

レトロウイルスベクターおよびウイルス生成

SFGオンコレトロウイルスベクターをコードするプラスミドを、標準的分子生物学技術を使用して調製した。19-28z-IRES-LNGFR、CD19、PSMA、GFP、mCherryおよびコメツキムシルシフェラーゼ(CBL)ベクターの合成が記載されている(Markley et al., Blood, 2010, 115(17): 3508-19; Stephan et al., Nature medicine, 2007, 13(12): 1440-9; Brentjens et al., Clin. Cancer Res., 2007, 13(18:1): 5426-35)。レトロウイルスプロデューサーを、プラスミドでトランスフェクトしたH29細胞上清から調製した(Stephan et al., Nature medicine, 2007, 13(12): 1440-9)。

30

40

【0210】

細胞株

EL4-CD19、EL4-PSMAならびに人工抗原提示細胞(AAPC) NIH3T3-CD19およびNIH3T3-PSMAが記載されている(Gade (2005); Stephan et al., Nature medicine, 2007, 13(12): 1440-9; Maher et al., Nature Biotechnology, 2002, 20(1): 70-75; Markley et al., Blood, 2010, 115(17): 3508-19; Brentjens et al., Clin. Cancer Res., 2007, 13(1

50

8 : 1) : 5 4 2 6 - 3 5)。NIH3T3 - CD19 - PSMA、NIH3T3 - CD19 - mCherry、NIH3T3 - CD19 - GFP、およびNIH3T3 - CD19 - CBLならびにNALM/6 - CBLおよびNALM/6 - PSMA - CBLは、H29プロデューサー細胞のそれぞれのレトロウイルス上清での形質導入後に得た。細胞株の全ての比較群を、MoFloソーターを使用して、CD19、GFP、もしくはmCherryの同等の発現についてソートした。

【0211】

末梢血白血球 (PBL) 回収およびレトロウイルス形質導入

末梢血を、Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) 治験審査委員会によって承認されたプロトコルの下で、インフォームド・コンセントの後に健康ドナーから得た。PBLを、Ficoll-Paqueを使用して単離し、フィトヘマグルチニン (PHA) で48時間活性化した。活性化T細胞を、レトロネクチン被覆 (Takara) レトロウイルスベクター結合プレート中での遠心分離によって3連続日目に形質導入した。細胞に、3日毎に、20UのIL-2を補充したRPMI培地を供給した。形質導入の10日後に、増強されたGFP (iCARをマークする) およびLNGFR (19-28zをマークする) に基づくFACS選択を使用して、MoFloソーターで陽性細胞を単離した。ソート後分析を行って、両方のレポーターの同等の発現を確保した。

【0212】

iPS由来線維芽細胞の生成

末梢血リンパ球をPHAで活性化し、レトロウイルス上清 (f-citrine-P2A-Myc-E2A-Sox2およびf-vexGFP-P2A-Okt4-T2A-Klf4) で形質導入し、24時間後にMEFフィーダー細胞上にプレートした (Thomli (2013))。培地を、形質導入後5日目に、線維芽細胞増殖因子 (FGF) (8ng/ml) を含むヒトES培地に交換し、その後、半分の培地を毎日交換した。T-iPSコロニーは、形質導入の約22~25日後に出現した。皮下異種移植片奇形腫アッセイを、T-iPS-1.10細胞株を使用して行った。3ヶ月間で、奇形腫を取り出し、100U/mlのコラゲナーゼ (Invitrogen) および2U/mlのディスパーゼ (Invitrogen) と37℃で2時間処理して、単一の細胞懸濁物を得た。上記細胞を、HLA-ABC陽性細胞に関してソートし、1% L-グルタミン、1% ペニシリン、1% ストレプトアビジンおよび10% ウシ胎仔血清 (FBS) を補充したRPMI中での培養の1週間後、それらは、iPS-fibを再現性高く自発的に生じた。

【0213】

フローサイトメトリー

全てのフローサイトメトリー分析を、LSRIISaitometer (BD Biosciences) で行い、FlowJoソフトウェア, Ver. 9.6 (TreeStar) で分析した。抗ヒトLNGFR、CD45、CD140b、CD10、HLA-ABC、HLA-DR、CD80、CD86、およびCD62Lを、BD Biosciencesから得た；抗ヒトCD4、CD8、CD3、CD19、CD90、および4, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) を、Invitrogenから得た；抗ヒトPSMAを、Medical & Biological Laboratoriesから得た；抗ヒトCCR7をR&Dから得た；抗ヒトFoxp3 (236A/E7)、およびFoxp3アイソタイプをeBioscienceから得た。

【0214】

インビトロT細胞アッセイ

増殖、エフェクターサイトカイン生成アッセイ、および細胞傷害性アッセイに関して一般には、ソートした精製T細胞の連続希釈物を、96ウェル平底プレート (プレートの外側ウェルは、エバポレーションの効果を最小限にするために培地のみを含む) 中に、それぞれのAAPC (40~50Gyで照射し、 3×10^4 / ウェルで24時間前に播種した)

10

20

30

40

50

に播種した。i P S - 線維芽細胞は、標的として使用した場合には照射しなかった。新鮮な培地を3～4日ごとにまたは培地の色が変化したときに添加した。サイトカイン生成を、酵素結合イムノソルベントアッセイ (E L I S A) キット (e B i o s c i e n c e) および L u m i n e x アッセイ (I n v i t r o g e n) のいずれかによって、製造業者の説明書に従ってテキスト中で述べられているとおりに定量した。T細胞数を、全ウェルを集めることによって、L S R I I フローサイトメーター (B D) 上の生存細胞数 (D A P I) および C o u n t B r i g h t ビーズ (I n v i t r o g e n) を使用して計算した。全てのインビトロ培養実験を、1% L - グルタミン、1% ペニシリン、1% ストレプトマイシンおよび10% F B S を補充した R P M I 中で行った。明確に述べられなければ、いかなるときも外因性サイトカインを投与しなかった。

10

【0215】

ルシフェラーゼ C T L アッセイ

読み取り値としてバイオルミネッセンスを使用する細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) アッセイを、以前に記載されるように行った (F u e t a l . , P l o s O n e , 2 0 1 0 . 5 (7) : e 1 1 8 6 7) 。簡潔には、全てのインビトロルシフェラーゼアッセイを、B r i g h t - G l o L u c i f e r a s e A s s a y S y s t e m (P r o m e g a) および96ウェル O p t i c a l B o t t o m B l a c k M i c r o p l a t e s (N u n c) で行い、製造業者のプロトコルに従って僅かに調節して行った。全ての標的細胞を、C B L と G F P レポーターを発現するように操作して、同等の発現レベルを確保した。培養培地を、1ウェルあたり50μlまで除去し、調製したルシフェラーゼ試薬のうちの50μlを96ウェルプレートの各ウェルに添加し、そのプレートを5分間インキュベートして、上記細胞を完全に溶解させた。I V I S I m a g i n g S y s t e m 1 0 0 S e r i e s (X e n o g e n) で測定を行った。L i v i n g I m a g e ソフトウェアバージョン2.6 (X e n o g e n) を使用して、光子放出強度を定量した。

20

【0216】

C T L の微速度顕微鏡検査および蛍光顕微鏡検査

全ての顕微鏡撮影法を、ライブイメージングシステムを装備した Z e i s s A x i o V e r t 2 0 0 M を使用して行った。微速度撮影動画を獲得し、M e t a M o r p h ソフトウェア (M o l e c u l a r D e v i c e s) の M u l t i - D i m e n s i o n a l A c q u i s i t i o n を使用して編集した。C T L 実験に関しては、m C h e r r y 陽性 A A P C のシグナルを、M e t a M o r p h の中の I n t e g r a t e d M o r p h o m e t r i c A n a l y s i s 機能を使用して定量した。

30

【0217】

m o D C および刺激

単球由来樹状細胞を、T - i P S 細胞と同じドナーから M o - D C G e n e r a t i o n T o o l B o x (M i l t e n y i) を使用して生成した。上記 m o D C に、未成熟ステージ (5～6日目) において、6回の凍結融解サイクルを通じて生成した i P S - F i b 由来の溶解物を24時間添加した。上記 DC の成熟を、C D 8 0、C D 8 6 および H L A - D R のフローサイトメトリーによって確認した。以前に記載されるように刺激を行った (Y u a n e t a l . , J o u r n a l o f i m m u n o l o g y , 2 0 0 5 . 1 7 4 (2) : 7 5 8 - 6 6) 。簡潔には、第1回の刺激を、1:30 T細胞/moDC比を使用して、第2回を、1:10～1:30比を使用して行った。1% L - グルタミン、1% ペニシリン、1% ストレプトマイシン、10% ヒト A B 血清 (C e l l G r o) および5ng/ml ヒト I L - 1 5 (R & D S y s t e m s) を補充した R P M I を、使用した。3日目に、20U/ml の I L - 2 を添加した。

40

【0218】

プロテオームプロファイラーアレイ

T細胞を、E/T比 4:1において60分間、A A P C に曝し、洗浄し、溶解させ、ヒトホスホイムノレセプターアレイ上で (100μg) を、製造業者 (R & D S y s t e m

50

s) のプロトコルに従ってインキュベートした。全てのプロットを、露出レベルを標準化するために同じ x 線フィルム上でのケミルミネッセンスを使用して検出した。スキャンした x 線フィルム画像を、画像分析ソフトウェアで分析した。全てのピクセル密度を、内部 p Y コントロールで各アレイに対して正規化した。

【0219】

マウスモデルおよび定量的バイオルミネッセンス

NALM/6 研究のために、6 ~ 12 週齢の雄性 NOD/SCID/γ⁻ マウス (Jackson Laboratory) に、 5×10^5 腫瘍細胞 (単一の腫瘍もしくは腫瘍混合型の実験に関して同じ用量) を静脈内接種した。NALM/6 細胞を、CBL と GFP レポーターを発現するように操作した。4 日後、 3×10^5 のソートした T 細胞を静脈内に注入した; 細胞用量は、ソート後分析によって確認されるとおり、% GFP⁺ 19 - 28 ± に基づいた。21 日間でマウスを屠殺した (T 細胞コントロールは、後肢麻痺を示さない)。iPS-fib 研究のために、6 ~ 12 週齢の雄性 NOD/SCID/γ⁻ (ヌル) マウスに、氷冷 RPMI および Matrigel 混合物 (BD Biosciences) の 1:1 混合物中に調製した 1×10^6 細胞を腹腔内接種した。8 日後に、 5×10^5 の 2 回 moDC で刺激した GFP ソート T 細胞を、腹腔内に注入した; 細胞用量は、ソート後分析によって確認されるとおり、パーセント GFP⁺ に基づいた。さらに、インビトロシフェラーゼ CTL アッセイを行って、標的として iPS-Fib を使用して、全ての群において同等の同種異系反応性を確立した。両方のモデルにおいて、D-シフェリン (Xenogen, 腹腔内に 150 mg/kg) を、コメツキムシルシフェラーゼの基質として使用し、バイオルミネッセンス画像を、IVIS 100 Imaging System で集めた。Living Image ソフトウェアバージョン 2.6 を使用して、以前に記載された (Markley et al., Blood, 2010, 115 (17): 3508-19) ように、バイオルミネッセンス画像化データセットを獲得および定量した。マウスを、Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) の組織ガイドラインに従ってケアした。

【0220】

統計法

データを、本文中で述べられるように、平均 ± 標準偏差 / 平均の標準誤差として提示する。結果を、本文中で述べられるように、不對の スチューデント t 検定 (両側) によって、もしくは ANOVA によって分析した。統計的有意性を $p < 0.05$ として定義した。ペアワイズ多重比較を、Holm-Sidak 法で多重比較のために較正した多重 t 検定を使用して行った。全ての正確な P 値を提供する。全ての統計分析を、Prism ソフトウェアバージョン 6.0 (GraphPad) で行った。

【0221】

結果

1. iCAR は、初代ヒト T 細胞の細胞表面でよく発現される

特定の理論に拘束されないが、膜貫通領域を通じて免疫阻害性レセプター (CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、もしくは BTLA) のシグナル伝達ドメインに融合した抗原に対して特異的な単鎖可変フラグメント (scFv) もしくは Fab は、抗原認識に際して特異的に T 細胞機能を阻害すると仮定した。これらレセプターは、免疫細胞阻害能力を有するので iCAR といわれ、特定の抗原と結合し、CAR (免疫細胞活性化能力を有するレセプターを記載するために使用される用語) とは異なるキメラレセプターである。

【0222】

ヒト前立腺特異的膜抗原 (PSMA) に対して特異的な scFv を、モデル表面抗原として使用した (31)。この scFv は、広く研究されており、前立腺癌の免疫療法に関してフェーズ 1 治験で調査中である (32)。PSMA は、転移性前立腺癌において過剰発現されているが、正常な腎臓、肝臓、結腸、および脳星状細胞においても見出される (3

3)。CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、およびBTLA細胞内ドメインをそれぞれ有する、PSMAに対して特異的な5種の異なるiCAR(iCAR-Pといわれる)を、生成した。コントロールレセプター、Pdelを生成した。これは、標的化scFvおよび膜貫通ドメインのみを有するが、細胞質ドメインを欠いていた(図1B)。各iCARを、バイシストロン性レトロウイルスベクターへと、IRES-GFPレセプターモジュールとともにクローニングした(図1B)。末梢血単核細胞からのヒト初代T細胞の形質導入の際に、上記CTLA4-iCARは、細胞表面で十分に発現されており、PD-1-iCAR-PおよびPdelは、P28zレセプター(34)(臨床試験で現在使用されているCD28/CD3ベースの二重シグナル伝達PSMA特異的レセプター)に類似のレベルで細胞表面で発現された(図1Cおよび図1D)。ホスホアレイを使用して、上記PD1-iCARがレセプター結合の際にシグナルを伝達しているかを調べた。リン酸化の状態を、3T3-S標的に対して3t3-D標的への曝露の際に、RnDヒトホスホイムノレセプターアレイを使用して分析した。19-28z-P-PD1細胞を、3T3-WT、3T3-S、もしくは3T3-D細胞のいずれかとともにインキュベートした。レセプター結合を2時間行い、次いで、ホスホ状態の細胞溶解物を分析した。3T3-Dに曝露した細胞は、SHP-1、SHP-2、および2B4(全てPD1シグナル伝達の下流の標的)のリン酸化に有意な増大を有し、重要なことには、3t3-Sへの曝露の場合には、全3種が、シグナル強度の低下を示した(図18)。CTLA4-iCARの場合には、ウェスタンブロットおよび細胞内フローサイトメトリーによって強い細胞内発現が認められたが、細胞表面発現は制限されていた(図1C、図1Dおよび図9A~C)。表面発現を、Y165G変異CTLA4-テール(細胞表面移動に重要な残基)を使用して回復させて、mutCTLA4-iCARを構築した(図1C、図1Dおよび図9A~C)。この知見は、休止T細胞において構成的にインターナライズされ、エンドサイトーシスアダプター複合体AP-2との、そのチロシンモチーフYVKM(35)を介する活性化を通じて分解されるCTLA-4の生理学的移動と一致する。実際に、T細胞活性化後の細胞表面への上記CTLA-4-iCAR-Pのアップレギュレーションが見出され(図9C)、チロシンモチーフY165G変異を使用して構成的表面発現を回復させて、mutCTLA-4-iCAR-Pを構築した。これは、休止細胞において細胞表面発現を示した(図1C)。iCARによるPSMA認識は、細胞結合体化アッセイを使用して示された。ここでiCAR発現T細胞はPSMAを発現するマウス胸腺腫EL4細胞を結合した(図10A)。

【0223】

2. iCARは、抗原拘束様式でTCR応答を制限する

自己標的化T細胞に対するそれらの使用に加えて、iCARは、移植後ドナーリンパ球注入においてGVHDの予防のために潜在的有用性を有する。従って、iCARの効力を、アロ反応性(移植片拒絶、GVHDおよび治療上の移植片対腫瘍(GVT)応答の根底にある強力な免疫応答)の状況において、形質転換されていない代理の正常組織を保護することにおいて評価した。さらに、内因性TCR駆動初代ヒトT細胞応答に対するiCARの効果を研究するために、標的としての樹状細胞(DC)に同系の抗原提示細胞および線維芽細胞を刺激する場合に同種異系DCを使用するアロ反応性モデル(図11A)を、確立した(図11A)。このモデルにおいて、上記iCAR操作したT細胞もしくはPdel操作したT細胞を、内因性T細胞レセプター(TCR)の極めて強力な刺激因子である単球由来樹状細胞(moDC)で刺激し。次いで、線維芽細胞がPSMA抗原を発現するか否かに対して評価した。反復の皮膚生検を必要とせずに上記DCに対して同系の再補充可能な線維芽細胞を得るために、人工多能性幹細胞(iPSC)を確立した; 安定な線維芽細胞株(iPS-fibといわれる)を、iPSCから得た(図11B~D)。上記iPS-fibは、複製的な老化および接触阻害を示し、容易に形質導入、継代、およびNOD/重症複合免疫不全(SCID)/マウスにおいて移植でき、上記マウスの中でそれらは、腫瘍を形成することなく、数週間残った。iPS-fibに対して内因性TCR特異性を有する強力なアロ反応性T細胞を獲得するために、moDCに上記同系iP

S - f i b に由来する溶解物を適用した。この刺激培養系は、いくつかのT細胞ドナーから強い細胞傷害性およびCD4駆動応答およびCD8駆動応答の両方を生じるサイトカイン分泌を刺激した(図12A~C)。

【0224】

上記iCARがPSMA⁺細胞に対するアロ反応性を制限する能力を調べるために、2回の適用したmoDCで刺激したiCAR発現T細胞もしくはPd1発現T細胞を、ソートし、次いで、iPS-fibもしくはPSMAを発現するiPS-fibとともに同時インキュベートした(図13A)(36)。T細胞の全ての群は、効率的にiPS-fibを死滅させた。これは、同種異系の細胞傷害性(図2Aおよび2B)を示すが、上記iCAR陽性T細胞は、iPS-fib-PSMA⁺細胞を死滅させるそれらの能力を有意に阻害した(図2C)。PD-1ベースのiCARを発現するT細胞による細胞傷害性は、低いエフェクター対標的(E/T)比において最大で95%までの程度低下した。細胞傷害性が迅速に起こり、他のT細胞応答と比較して低い活性が閾値を有するので、サイトカイン分泌もまた分析した。上記PD-1 iCARは、サイトカイン分泌のより強い阻害を生じた(79~88%低下)のに対して、上記mutCTLA-4 iCARは、55~71%低下を誘発した(図2D~F)。これら結果は、iCARが、抗原依存性様式で反応性を制限し得ることを示唆した。

【0225】

3. iCARは、化学量論的様式で機能する

上記PD-1 iCAR-Pが、その発現のレベルもしくは上記標的抗原の発現レベルに依存して、差次的阻害レベルを提供し得るか否かを、調べた。PD-1 iCAR-PもしくはPd1の高レベルもしくは低レベルの発現に関して、刺激したT細胞をソートし、iPS-fib-PSMAに曝した(図14A)。T細胞死滅、サイトカイン放出、および発現されたiCARのレベルの間に、化学量論的關係性を見出した。上記PD-1 iCAR-Pの発現の低レベルに関してソートしたT細胞は、最大でE/T比1:1までで50%阻害を提供し得るに過ぎなかったが、PD-1 iCAR-P発現の高レベルは、最大でE/T比8:1までで80%阻害を可能にし、16:1においてさらに50%阻害を可能にした(図3Aおよび図3B)。上記iCAR抗原発現レベルの影響を調べるために、iPS-fibを、高いもしくは低いPSMA発現に関してソートし、ソートしたPD-1 iCAR-P T細胞に曝した(図14B)。高PSMA発現を有するiPS-fibは、ある範囲のE/T比(1:1~4:1)にわたって、PD-1 iCAR-P T細胞の死滅およびサイトカイン分泌のうちの少なくとも80%を阻害したのに対して、低PSMA発現を有するiPS-fibは、同レベルの阻害を提供しなかった(図3Cおよび図3D)。

【0226】

4. iCARは、インビボで同種異系応答を制限する

iCARが、インビボでT細胞媒介性の除去から組織を保護し得るか否かを調べるために、iPS-fib-PSMA⁺細胞(これはまた、CBLを発現した)を、NOD/SCID/c⁻マウスに腹腔内注射した(図14B)。上記細胞は、バイオルミネッセンス画像化(BLI)によってモニターされ得る小結節を樹立した。 1×10^6 iPS-fib-PSMA⁺細胞を注射して5日後に、上記マウスを、 5×10^5 moDC刺激したPd1発現T細胞もしくはPD-1-iCAR-P発現T細胞で処置した。上記Pd1群は、BLIシグナルの有意な減少(7~22倍)とともにiPS-fib-PSMA⁺細胞を排除したのに対して、上記PD-1-iCAR-P群は、T細胞で処置しなかったコントロールマウスに類似して、BLIで小結節を一掃できなかった(図4Aおよび図4B)。これら結果は、iCARが、インビボでTCR駆動応答を抗原特異的様式で制限し得るという証拠を提供する。

【0227】

5. iCARは、活性化キメラ抗原レセプターを阻害し得る

活性化CARの調節に対するiCARの効果を研究するために、19-28z(広範囲に

特徴付けられた、臨床試験で現在使用されている第2世代CAR)を使用した; 19-28zは、CD19抗原に応答して活性化およびCD28共刺激を提供する(9, 34)。初代T細胞を、19-28z CARおよび上記iCAR-プレセプターで形質導入し、二重発現に関してソートし、それぞれ、以前に報告された、標的組織およびオフターゲット組織をまねて、CD19もしくはCD19とPSMAの両方を発現する人工抗原提示細胞(AAPC)に播種した(図13Bおよび図15A)。上記19-28zキメラ抗原レセプター(CAR)(広く特徴付けられた、現在臨床試験中の第2世代CAR)を利用して、CD19抗原に応じて活性化および共刺激シグナルを提供した(Brentjens et al., Blood, 2011, 118(18): 4817-28; Maher et al., Nature Biotechnology, 2002, 20(1): 70-75)。Although コントロール群由来のT細胞(19-28z単独もしくは19-28z/Pdel)は、両方のAAPCに対して類似のサイトカイン分泌を示したが、上記iCAR発現T細胞は、オンターゲット細胞と比較して、オフターゲット細胞に曝した場合に、サイトカイン分泌の顕著な低下を示した(図5Aおよび図15B)。PD-1 iCAR-Pは、サイトカインレベルの最も強い低下を生じた(71~89%)のに対して、mutCTLA-4 iCAR-Pは、より小さな低下を誘発し(48~67%)、LAG-3-、BTLA-、および2B4 iCAR-Pは、30%阻害を誘発した。

【0228】

19-28zは、CD19発現AAPCによって誘発される、強力な増殖シグナルを提供する。19-28z/Pdel T細胞は、いずれのAAPCに対しても同様に増殖したが、mutCTLA-4もしくはPD-1 iCARを発現するT細胞は、オフターゲットAAPCの存在下で低下した蓄積を示し、上記PD-1 iCAR-Pは、第2のAAPC刺激後のT細胞蓄積において蓄積90%低下を引き起こした(図5B、図5Cおよび図15C)。上記iCARがT細胞サイトカイン分泌および増殖をブロックする能力を示したので、iCARを、細胞傷害性に対するそれらの効果について評価したところ、それは、迅速に起こり、他のT細胞機能より低い活性化閾値を有する。この共培養系において、mCherryをさらに発現するように改変したこれらAAPCの運命の定量的顕微鏡検査を行った(図5D)。38時間以内に、19-28z/iCAR-Pおよびコントロール二重陽性T細胞の全ての群が、標的細胞を溶解した(図5E)。CD19+PSMA+ オフターゲット細胞に曝された場合、上記mutCTLA-4ベースのおよびPD-1ベースのiCARは、それぞれ、細胞傷害性において67%および91%の低下を引き起こした(図5F)。PD-1の場合には、AAPCは、5日間残ったのに対して、mutCTLA-4 iCARの効果は、より制限されていた(図5D)。従って、上記PD-1ベースのiCARを、さらにインビボで評価するために選択した。

【0229】

インビボでのPD-1 iCARの機能を評価するために、NALM/6、CD19+B細胞白血病細胞株(PSMAあり)を評価し、治療的T細胞応答を、以前に確立された異種移植片NOD/SCID/マウスモデル(Markley et al., Blood, 2010, 115(17): 3508-19; Brentjens et al., Clin. Cancer Res., 2007, 13(18:1): 5426-35)において、NALM/6およびNALM/6-PSMA細胞に対して比較した(図15D)。全身腫瘍注入の5日後に、上記マウスを、単一用量の 3×10^5 19-28z/PD-1-iCARPソートした二重陽性T細胞で処置した。腫瘍量のバイオルミネッセント画像化(BLI)は、NALM/6(オンターゲット)とは対照的に、NALM/6-PSMA(オフターゲット)の根絶において有意差(3倍~10倍減少)を示した(図6Aおよび図6B)。最初に骨髄に制限されたが、NALM/6白血病は、最終的には脾臓に侵襲し、その重量は、疾患負荷の後期指数を提供する。19-28z/PD-1-iCAR-P T細胞での処置後に、NALM/6-PSMAマウスは、上記コントロール「T細胞なし」群の脾臓重量において有意差を示さなかったが、NALM

／6を有するマウスの脾臓重量は、1／2．6であった（図6C）。フローサイトメトリ分析から、NALM／6 - P S M A群とは対照的に、脾臓および骨髄中のNALM／6細胞数の低下が確認された（図6Dおよび図6E）。並行して、T細胞のより多くの残留が、NALM／6 - P S M A群よりNALM／6群において認められた（図6Dおよび図6F）。これら知見は、PD - 1ベースのi C A Rが、「オフターゲット」NALM／6 - P S M A細胞のインビボでの排除を選択的に妨げると同時に、「オンターゲット」NALM／6細胞に対する治療応答を進めさせることを確立した。

【0230】

6．i C A Rは、一時的かつ可逆的様式で機能する

i C A Rの臨床的有用性に関する魅力的な局面は、機能的可逆性、すなわち、阻害性オフターゲット組織と以前接触した後のT細胞機能性の再出現である。i C A Rによる有効なP S M A認識は、i C A R発現T細胞とP S M Aを発現するE L 4細胞との結合退形成によって示されたが、野生型E L 4細胞では示されなかった（図16FA）。i C A Rの構成的発現は、コントロールT細胞と比較してT細胞の増殖能（C D 3／C D 28ビーズもしくはD C活性化後）、サイトカイン分泌、もしくは表面マーカー発現を損なわなかった（図16A～Eおよび図16G - I）。i C A R媒介性阻害の一時的特徴を評価するために、標的細胞およびオフターゲット細胞による逐次的T細胞刺激を、4種の異なるシーケンス（s e q u e n c e s）で死滅、サイトカイン分泌、および増殖の能力を分析するために設定した。19 - 28 z／P d e l T細胞もしくは19 - 28 z／P D - 1 - i C A R - P T細胞を、第1の刺激として、標的（C D 19⁺）もしくはオフターゲット（C D 19⁺ P S M A⁺）A A P Cのいずれかに曝し、続いて、第2の刺激でいずれかのA A P Cに曝した（図7A）。上記第2の刺激の際に、両方のT細胞群は、上記第1の刺激標的とは無関係に等しく標的細胞を死滅させた（図7B）。このことは、上記第1の刺激においてオフターゲット細胞に曝した上記19 - 28 z／i C A R - P T細胞が、標的細胞を死滅させ、上記第2の刺激の間に両方の刺激において標的細胞に曝されたT細胞を増殖させたことを裏付ける。19 - 28 z／P d e lを発現するコントロールT細胞は、同じ条件下で低下した機能性を示さなかった。さらに、上記第1の刺激に対して活性化したT細胞は、上記第2の刺激に対して上記オフターゲットA A P Cによって提示されたi C A Rリガンドに曝された際になお阻害され得た。このことは、i C A Rが、活性化T細胞を調節し得たことを示唆する。両方の刺激に対してオフターゲット細胞に曝されたT細胞は、上記第2の曝露に対してそれらの死滅能力のより大きな阻害を有することもまた観察された（図7Cおよび7D）。

【0231】

これら機能の知見を確認したので、本発明者らは、上記PD - 1 i C A R、19 - 28 z／P d e l、および19 - 28 z／P D - 1 - i C A R - Pの二重陽性T細胞が、調節性S H P - 1およびS H P - 2ホスファターゼを差次的にリン酸化することを見出した（図17A～C）。C D 19⁺標的A A P Cへの曝露は、脱リン酸化および結果として生じる、T細胞活性化の際のS H P - 1／2の抑制効果のブロックを示す以前の研究（39，40）と一致して、C D 19を欠いているA A P Cへの曝露後に認められる、規定レベルと比較してより低いS H P - 1およびS H P - 2のリン酸化レベルを示した。対照的に、C D 19およびP S M Aを発現するオフターゲットA A P Cへの曝露後に、S H P - 1およびS H P - 2は、増大したリン酸化レベルを示した。これは、上記PD - 1 i C A Rが、上記内因性PD - 1分子と同じ生化学的経路を増員することを裏付ける。

【0232】

7．i C A RおよびC A R二重発現T細胞は、インビトロおよびインビボで標的を識別する

上記PD - 1ベースのi C A Rを発現するT細胞が、同じ生物内の標的細胞の存在下で、オフターゲット細胞を防御することによって、インビトロで、および特にインビボで、標的細胞間を識別し得るか否かを、評価した。この筋書きは、G F P⁺ C D 19⁺標的A A P Cおよびm C h e r r y⁺ C D 19⁺ P S M A⁺ オフターゲットA A P Cを1：1比

10

20

30

40

50

で混合するインビトロ共培養系において最初に扱った。微速度顕微鏡検査法を、19-28z/Pde1 T細胞もしくは19-28z/iCAR-P T細胞の効果を分析するために行った。上記標的細胞および上記オフターゲット細胞の両方が、19-28z/Pde1 T細胞によって類似の速度で排除されたが、上記19-28z/iCAR-P T細胞は、上記標的細胞を優先的に排除すると同時に、オフターゲット細胞を残した(図8A)。上記AAPCのコメツキムシルシフェラーゼ(CBL)形質導入バージョンでの三目並べ方式の実験を使用して、この選択性を定量した。38時間で、上記19-28z/iCAR-P T細胞は、上記標的AAPCのうちの大部分(85%)を排除したが、上記オフターゲット細胞はそのうちの僅か(10%)しか排除されず、微速度顕微鏡検査法の結果を確認した(図8B)。

10

【0233】

同じ選択性がインビボで達成され得るか否かを分析するために、NOD/SCID/c-mouseに、NALM/6腫瘍細胞およびNALM/6-PSMA腫瘍細胞の混合物を注射し、これら動物を、19-28z形質導入T細胞もしくは19-28z/iCAR-P形質導入T細胞で処置した。屠殺した際に、19-28z T細胞で処置したマウスは、19-28z/iCAR-P T細胞で処置したマウスと比較して、脾臓および骨髄中のPSMA+細胞数の3倍減少を示した(図8Cおよび8D)。よって、上記iCAR処置群は、脾臓重量において3.3倍の増大および全体的な腫瘍量の増大を有した(図8E)。これら実験は、標的細胞およびオフターゲット細胞の混合物の存在下で、iCARは、インビボおよびインビトロの両方で、標的細胞の拒絶を止めることなく、オフターゲット細胞を選択的に防御し得ることを示す。

20

【0234】

考察

この実施例において、T細胞の特異性を制限するために遺伝的アプローチがとられたところ、T細胞は、腫瘍特異的免疫療法を送達するための内因性の標的化機構を有するように操作され得ることが示された。抗原認識ドメインを免疫阻害性レセプターCTLA-4およびPD-1のシグナル伝達ドメインと成功裡に組み合わせ、T細胞細胞傷害性の抗原特異的抑制、サイトカイン放出、および増殖を達成した。この概念実証研究は、T細胞機能をオフターゲット部位では制限し、従って、免疫応答を意図しない標的組織から反らす戦略としてのiCARの能力を示す。

30

【0235】

上記iCAR戦略の難題は、3つの重大な特性に依拠する。その第1は、iCARの基礎発現が、抗原の非存在下でT細胞機能を阻害しないことである。内因性CTLA-4もしくはPD-1シグナル伝達は、それらの効果を発揮するためにそれぞれのリガンドの存在を要する。同様に、本明細書で記載されるiCARの発現は、基本的なT細胞機能に影響を及ぼすとは見出されなかった。T細胞サブセットに制限される他の阻害性レセプターは、T細胞応答の調節を微細に調整するために協力して作用し得る(21, 22)。LAG-3、2B4、およびBTLAのようなレセプター、ならびにこれらの組み合わせ(例えば、複数の組み合わせられた細胞質ドメインを有する単一の第2世代iCARとして)は、さらなる調査を正当化する。

40

【0236】

第2の重要な特性は、iCARの事前の結合にも拘わらず、T細胞機能性の維持である。iCAR形質導入T細胞は、阻害性抗原への事前の曝露後に、標的抗原に対する応答をなお高め得ることが見出された。この可逆性は、ナチュラルキラー細胞の挙動を思わせ、ここでは転写の変化ではなくシグナル伝達分子のリン酸化状態が、迅速な機能的応答(例えば、細胞傷害性)を制御する(41)。抗PD-1抗体および抗CTLA-4抗体は、T細胞応答を一時的に調節する能力を繰り返し議論するが、アネルギー化したかもしくは疲弊したT細胞の損なわれた機能を改善し得る(22)。さらに、TCR複合体に対するPD-1およびCTLA-4効果の生化学的分析は、リン酸化状態、下流のキナーゼ、およびアポトーシスではなく運動性に依存する(40, 42-44)。インビトロおよびイン

50

ピボ両方での結果は、オフターゲット細胞に応じた阻害と持続した治療的機能性を示すが、上記細胞のうちのいくらかが、時間を経てアネルギー状態になり得る可能性はそれでもある(42)。最終的には、いくつかのT細胞がそれらの標的に即座に遭遇して、それを排除するのに対して、他のT細胞は、阻害精細胞に最初に遭遇すると推測されるのがT細胞注入である。オフターゲット細胞に反復して遭遇するT細胞は増殖しない(治療応答を進めさせると同時に、正常組織に対する免疫による攻撃を減らすことを目的とするiCARストラテジーの満足いく結果)が考えられる。上記注入したT細胞集団の全体的な増殖は、あるT細胞は増殖を受ける一方で、他方は抑制されて、恐らく、時間を経て全ての注入されたT細胞の消失を生じる、クローンレベルで起こるこれら種々の経路を統合する。実験条件下では、十分なT細胞が、3週間にわたって残って、標的とした腫瘍を排除した。このような環境下では、第2のもしくは第3のT細胞注入物が、必要であれば、注入され得る。これは、他のところで考察されるように臨床的には有利であり得る(9)。オフターゲット組織を保護すると同時に、腫瘍排除を進めさせる手段としての、アネルギーおよびクローン性排除の結果としての誘発は、有害な反応がそれ自体、T細胞排除が誘発される前に発現されなければならない、治療応答の終結も生じる自殺遺伝子ストラテジーとは対照的であるはずである。

10

【0237】

上記iCAR媒介性免疫応答は、癌および慢性感染の処置のためのドナーリンパ球注入後に、移植片対宿主病を制御するために有用である(特に、制限された毒性とともに、DLIの有益な特性を可能にする)。さらに、iCARは、癌および慢性感染の処置のための操作された養子T細胞に由来する組織毒性からのターゲットオフの制御に有用である。これは、養子T細胞療法後の意図しない心臓もしくは肺の認識のような受容できない毒性プロフィールを有する有望な治療剤を復活させる可能性を高める。従って、iCARは、自己由来および同種異系両方の状況での安全かつ効果的なT細胞両方を確立する新規なストラテジーを提供する。

20

【0238】

第3に、上記iCARアプローチは、抗原特異的であるので、腫瘍に存在しないかもしくはダウンレギュレートされるが、オフターゲット組織によって発現される組織特異的標的抗原を同定する能力を要する。この問題は、腫瘍抗原に関する研究として未だ広く調査されていないが、Protein Atlasデータベースのような活動は、全てのヒト組織の「サーフェソーム(surfaceome)」を特徴付けている最中である(45)。1つのストラテジーは、腫瘍細胞でダウンレギュレートされる表面抗原の広いクラスを使用することである。一例は、実質的に全ての細胞タイプで見出されるが、腫瘍がT細胞免疫応答から逃れる機構として、腫瘍でダウンレギュレートされるヒト白血球抗原(HLA)分子によって表される(46)。従って、腫瘍でダウンレギュレートされる宿主HLA分子に対するiCARを発現する同種異系のT細胞は、GVT効果を選択的に促進し得る。上記iCARアプローチは、GVT応答を損なうことなく、GVHD標的組織を防御する手段として、DLIの状況で非常に重要であり得る。類似のストラテジーに使いやすい(-amiable)抗原の別のクラスは、細胞表面腫瘍サプレッサー抗原(例えば、OPCML、HYAL2、DCC、およびSMAR1(47-49))を含む。OPCML-v1は、例えば、全ての正常成体組織および胎児組織において広く発現されるが、リンパ腫ならびに乳癌および前立腺癌においてダウンレギュレートされる。細胞表面炭水化物、脂質、および翻訳後修飾(例えば、ムチンタイプO-グリカン(コア3 O-グリカン))はまた、腫瘍によってダウンレギュレートされることが見出された(50)。別の候補となる標的は、E-カドヘリンであり、これは、正常皮膚、肝臓、および消化管で高度に発現され、GVHDの主な標的(51)であるが、上皮間葉転移を受けて、腫瘍進行および転移を示す腫瘍細胞によってダウンレギュレートされる(52)。

30

40

【0239】

この研究の主な制限は、強い臨床的に関連性のあるヒト「正常組織」モデル、特に、ヒト細胞、ヒト抗原、ならびにヒトTCR、CARおよびiCARの利用を可能にするモデル

50

の利用可能性がないことである。ヒトT細胞、ヒト標的抗原、およびヒトiCARを使用してアロ反応性反応を駆動するために、同じドナーに由来するDCと合わせたiPS細胞を樹立することによって、このギャップを埋めようと試みられてきた。単に、HLAミスマッチ同種異系T細胞と、iPSもしくはiPS-fib細胞とを共インキュベートすることでは、アロ反応性は生じなかった。同系DCの使用は、強力なアロ反応性を生じるために重要であった。このアロ反応性の性質は、定義されなかったので、ブロックされた応答がGVHDに關与する機構に無関係であることは考えられる。

【0240】

上記iCARの発現レベルが重要であることは示された。活性化レセプターもしくは抗原の高い発現レベルおよび/またはiCARもしくはiCAR標的化抗原の低い発現の状況において、十分なブロックは達成できなかった。分析の大部分において、上記iCARは、T細胞機能を低下させたが、これを排除しなかった(希に、何らかのアッセイにおいて90%阻害を超えることはあった)。上記iCARストラテジーを臨床状況で適用するにあたって、あらゆるiCARの機能性は、レセプターアフィニティー、レセプター発現レベル(すなわち、プロモーター強度)、および一部はそれらの発現レベルに基づく適切な標的抗原の選択に基づいて、最適化される必要がある。これらはまた、オフターゲット部位での阻害を達成するために活性化レセプターに対して釣り合いをとる必要がある。CAR標的化治療の場合、最適化されたCAR/iCAR比は、注意深いベクター設計を通じて達成され得る。

【0241】

結論として、抗原特異的阻害性レセプターが、特定の細胞表面抗原に結合した際にT細胞増殖、サイトカイン分泌、および細胞傷害性を成功裡に再指向し得、従って、T細胞毒性をある組織から反らすと同時に、その同じ抗原を発現する別の組織に対する重大なエフェクター機能を保持するという概念実証が提供された。これは、TCRもしくはCARのいずれかによって媒介される応答で示された。このアプローチは、意図しない標的組織への損傷を防止、もしくは少なくとも低下させるので、受容できない毒性が発生した後に、治療的T細胞を不可逆的に排除する必要性を未然に防ぐ。それは、T細胞をガイドおよび教育して、有益な機能のみを発揮する合成レセプターを使用することによって、薬物として細胞の多面的な機能性を利用するパラダイムシフトアプローチである。この動的な安全性スイッチは、自己由来T細胞および同種異系T細胞の治療の範囲において有用な適用を見出し得る。

【0242】

参考文献

【化15-1】

1. J. N. Blattman, P. D. Greenberg, Cancer immunotherapy: A treatment for the masses. *Science* 305, 200–205 (2004).

2. N. P. Restifo, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, Adoptive immunotherapy for cancer: Harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 269–281 (2012).

10

20

30

40

【化 1 5 - 2 】

3. M. Sadelain, R. Brentjens, I. Rivière, The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 215–223 (2009).

4. C. J. Turtle, M. Hudecek, M. C. Jensen, S. R. Riddell, Engineered T cells for anti-cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 633–639 (2012).

5. B. R. Blazar, W. J. Murphy, M. Abedi, Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 443–458 (2012).

6. T. M. Brusko, A. L. Putnam, J. A. Bluestone, Human regulatory T cells: Role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol. Rev.* 223, 371–390 (2008).

10

7. M. Kalos, B. L. Levine, D. L. Porter, S. Katz, S. A. Grupp, A. Bagg, C. H. June, T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.* 3, 95ra73 (2011).

8. R. J. Brentjens, I. Rivière, J. H. Park, M. L. Davila, X. Wang, J. Stefanski, C. Taylor, R. Yeh, S. Bartido, O. Borquez-Ojeda, M. Olszewska, Y. Bernal, H. Pegram, M. Przybylowski, D. Hollyman, Y. Usachenko, D. Pirraglia, J. Hosey, E. Santos, E. Halton, P. Maslak, D. Scheinberg, J. Jurcic, M. Heaney, G. Heller, M. Frattini, M. Sadelain, Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 118, 4817–4828 (2011).

20

9. R. J. Brentjens, M. L. Davila, I. Riviere, J. Park, X. Wang, L. G. Cowell, S. Bartido, J. Stefanski, C. Taylor, M. Olszewska, O. Borquez-Ojeda, J. Qu, T. Wasielewska, Q. He, Y. Bernal, I. V. Rijo, C. Hedvat, R. Kobos, K. Curran, P. Steinherz, J. Jurcic, T. Rosenblat, P. Maslak, M. Frattini, M. Sadelain, CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38 (2013).

30

10. R. A. Morgan, J. C. Yang, M. Kitano, M. E. Dudley, C. M. Laurencot, S. A. Rosenberg, 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).

40

11. R. A. Morgan, N. Chinnasamy, D. Abate-Daga, A. Gros, P. F. Robbins, Z. Zheng, M. E. Dudley, S. A. Feldman, J. C. Yang, R. M. Sherry, G. Q. Phan, M. S. Hughes, U. S. Kammula, A. D. Miller, C. J. Hessman, A. A. Stewart, N. P. Restifo, M. M. Quezado, M. Alimchandani, A. Z. Rosenberg, A. Nath, T. Wang, B.

【化 1 5 - 3】

Bielekova, S. C. Wuest, N. Akula, F. J. McMahon, S. Wilde, B. Mosetter, D. J. Schendel, C. M. Laurencot, S. A. Rosenberg, Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J. Immunother.* 36, 133–151 (2013).

12. B. J. Cameron, A. B. Gerry, J. Dukes, J. V. Harper, V. Kannan, F. C. Bianchi, F. Grand, J. E. Brewer, M. Gupta, G. Plesa, G. Bossi, A. Vuidepot, A. S. Powlesland, A. Legg, K. J. Adams, A. D. Bennett, N. J. Pumphrey, D. D. Williams, G. Binder-Scholl, I. Kulikovskaya, B. L. Levine, J. L. Riley, A. Varela-Rohena, E. A. Stadtmauer, A. P. Rapoport, G. P. Linette, C. H. June, N. J. Hassan, M. Kalos, B. K. Jakobsen, Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Sci. Transl. Med.* 5, 197ra103 (2013).

10

13. G. P. Linette, E. A. Stadtmauer, M. V. Maus, A. P. Rapoport, B. L. Levine, L. Emery, L. Litzky, A. Bagg, B. M. Carreno, P. J. Cimino, G. K. Binder-Scholl, D. P. Smethurst, A. B. Gerry, N. J. Pumphrey, A. D. Bennett, J. E. Brewer, J. Dukes, J. Harper, H. K. Tayton-Martin, B. K. Jakobsen, N. J. Hassan, M. Kalos, C. H. June, Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* 122, 863–871 (2013).

20

14. J. L. Ferrara, J. E. Levine, P. Reddy, E. Holler, Graft-versus-host disease. *Lancet* 373, 1550–1561 (2009).

15. E. Kotsiou, J. K. Davies, New ways to separate graft-versus-host disease and graft-versus-tumour effects after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 160, 133–145 (2013).

30

16. G. Akpek, S. M. Lee, V. Anders, G. B. Vogelsang, A high-dose pulse steroid regimen for controlling active chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 7, 495–502 (2001).

17. M. T. Lupo-Stanghellini, E. Provasi, A. Bondanza, F. Ciceri, C. Bordignon, C. Bonini, Clinical impact of suicide gene therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hum. Gene Ther.* 21, 241–250 (2010).

18. A. Di Stasi, S. K. Tey, G. Dotti, Y. Fujita, A. Kennedy-Nasser, C. Martinez, K. Straathof, E. Liu, A. G. Durett, B. Grilley, H. Liu, C. R. Cruz, B. Savoldo, A. P. Gee, J. Schindler, R. A. Krance, H. E. Heslop, D. M. Spencer, C. M. Rooney, M. K. Brenner, Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 1673–1683 (2011).

40

【化 1 5 - 4】

19. I. Vogler, S. Newrzela, S. Hartmann, N. Schneider, D. von Laer, U. Koehl, M. Grez, An improved bicistronic CD20/tCD34 vector for efficient purification and in vivo depletion of gene-modified T cells for adoptive immunotherapy. *Mol. Ther.* 18, 1330–1338 (2010).

20. E. Kieback, J. Charo, D. Sommermeyer, T. Blankenstein, W. Uckert, A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 623–628 (2008).

21. D. M. Pardoll, The blockade of immune checkpoints in cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264 (2012).

22. P. Sharma, K. Wagner, J. D. Wolchok, J. P. Allison, Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: Recent successes and next steps. *Nat. Rev. Cancer* 11, 805–812 (2011).

23. E. A. Tivol, F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone, A. H. Sharpe, Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541–547 (1995).

24. H. Nishimura, M. Nose, H. Hiai, N. Minato, T. Honjo, Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141–151 (1999).

25. J. Wang, T. Yoshida, F. Nakaki, H. Hiai, T. Okazaki, T. Honjo, Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11823–11828 (2005).

26. R. V. Parry, J. M. Chemnitz, K. A. Frauwirth, A. R. Lanfranco, I. Braunstein, S. V. Kobayashi, P. S. Linsley, C. B. Thompson, J. L. Riley, CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9543–9553 (2005).

27. S. L. Topalian, F. S. Hodi, J. R. Brahmer, S. N. Gettinger, D. C. Smith, D. F. McDermott, J. D. Powderly, R. D. Carvajal, J. A. Sosman, M. B. Atkins, P. D. Leming, D. R. Spigel, S. J. Antonia, L. Horn, C. G. Drake, D. M. Pardoll, L. Chen, W. H. Sharfman, R. A. Anders, J. M. Taube, T. L. McMiller, H. Xu, A. J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G. D. Kolia, A. Gupta, J. M. Wigginton, M. Sznol, Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2443–2454 (2012).

10

20

30

40

【化 1 5 - 5】

28. F. S. Hodi, S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbé, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos, W. J. Urba, Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723 (2010).

10

29. V. A. Pedicord, W. Montalvo, I. M. Leiner, J. P. Allison, Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8+ T-cell memory formation, function, and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 266–271 (2011).

30. V. Velu, K. Titanji, B. Zhu, S. Husain, A. Pladevega, L. Lai, T. H. Vanderford, L. Chennareddi, G. Silvestri, G. J. Freeman, R. Ahmed, R. R. Amara, Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* 458, 206–210 (2009).

20

31. T. P. Gade, W. Hassen, E. Santos, G. Gunset, A. Saudemont, M. C. Gong, R. Brentjens, X. S. Zhong, M. Stephan, J. Stefanski, C. Lyddane, J. R. Osborne, I. M. Buchanan, S. J. Hall, W. D. Heston, I. Rivière, S. M. Larson, J. A. Koutcher, M. Sadelain, Targeted elimination of prostate cancer by genetically directed human T lymphocytes. *Cancer Res.* 65, 9080–9088 (2005).

32. M. Sadelain, R. Brentjens, I. Rivière, The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.* 3, 388–398 (2013).

33. Y. Kinoshita, K. Kuratsukuri, S. Landas, K. Imaida, P. M. Rovito Jr., C. Y. Wang, G. P. Haas, Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World J. Surg.* 30, 628–636 (2006).

30

34. J. Maher, R. J. Brentjens, G. Gunset, I. Rivière, M. Sadelain, Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRz/CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* 20, 70–75 (2002).

35. W. A. Teft, M. G. Kirchhof, J. Madrenas, A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 65–97 (2006).

36. X. Fu, L. Tao, A. Rivera, S. Williamson, X. T. Song, N. Ahmed, X. Zhang, A simple and sensitive method for measuring tumor-specific T cell cytotoxicity. *PLOS One* 5, e11867 (2010).

40

37. R. J. Brentjens, E. Santos, Y. Nikhamin, R. Yeh, M. Matsushita, K. La Perle, A. QuintásCardama, S. M. Larson, M. Sadelain, Genetically targeted T cells

【化 1 5 - 6】

eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin. Cancer Res.* 13, 5426–5435 (2007).

38. J. C. Markley, M. Sadelain, IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood* 115, 3508–3519 (2010).

39. J. M. Chemnitz, R. V. Parry, K. E. Nichols, C. H. June, J. L. Riley, SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell ctivation. *J. Immunol.* 173, 945–954 (2004).

10

40. T. Yokosuka, M. Takamatsu, W. Kobayashi-Imanishi, A. Hashimoto-Tane, M. Azuma, T. Saito, Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* 209, 1201–1217 (2012).

41. Y. T. Bryceson, E. O. Long, Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 344–352 (2008).

20

42. S. Amarnath, C. W. Mangus, J. C. Wang, F. Wei, A. He, V. Kapoor, J. E. Foley, P. R. Massey, T. C. Felizardo, J. L. Riley, B. L. Levine, C. H. June, J. A. Medin, D. H. Fowler, The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* 3, 111ra120 (2011).

43. K. S. Peggs, S. A. Quezada, J. P. Allison, Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy. *Immunol. Rev.* 224, 141–165 (2008).

44. C. E. Rudd, The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 153–160 (2008).

30

45. M. Uhlen, P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, M. Zwahlen, C. Kampf, K. Wester, S. Hober, H. Wernerus, L. Björling, F. Ponten, Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* 28, 1248–1250 (2010).

46. M. Campoli, S. Ferrone, HLA antigen changes in malignant cells: Epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene* 27, 5869–5885 (2008).

47. Y. Cui, Y. Ying, A. van Hasselt, K. M. Ng, J. Yu, Q. Zhang, J. Jin, D. Liu, J. S. Rhim, S. Y. Rha, M. Loyo, A. T. Chan, G. Srivastava, G. S. Tsao, G. C. Sellar, J. J. Sung, D. Sidransky, Q. Tao, OPCML is a broad tumor suppressor for multiple carcinomas and lymphomas with frequently epigenetic inactivation. *PLOS One* 3, e2990 (2008).

40

【化 1 5 - 7】

48. K. Singh, D. Mogare, R. O. Giridharagopalan, R. Gogiraju, G. Pande, S. Chattopadhyay, p53 target gene SMAR1 is dysregulated in breast cancer: Its role in cancer cell migration and invasion. PLOS One 2, e660 (2007).

49. L. Meimei, L. Peiling, L. Baoxin, L. Changmin, Z. Rujin, H. Chunjie, Lost expression of DCC gene in ovarian cancer and its inhibition in ovarian cancer cells. Med. Oncol. 28, 282–289 (2011).

50. S. Tsuboi, S. Hatakeyama, C. Ohyama, M. Fukuda, Two opposing roles of O-glycans in tumor metastasis. Trends Mol. Med. 18, 224–232 (2012).

51. B. Tsuchiya, Y. Sato, T. Kameya, I. Okayasu, K. Mukai, Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. Arch. Histol. Cytol. 69, 135–145 (2006).

52. C. L. Chaffer, R. A. Weinberg, A perspective on cancer cellmetastasis. Science 331, 1559–1564 (2011).

53. M. T. Stephan, V. Ponomarev, R. J. Brentjens, A. H. Chang, K. V. Dobrenkov, G. Heller, M. Sadelain, T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. Nat. Med. 13, 1440–1449 (2007).

54. D. N. Burshtyn, C. Davidson, Natural killer cell conjugate assay using two-color flow cytometry. Methods Mol. Biol. 612, 89–96 (2010).

55. M. Themeli, C. C. Kloss, G. Ciriello, V. D. Fedorov, F. Perna, M. Gonen, M. Sadelain, Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. Nat. Biotechnol. 31, 928–933 (2013).

56. J. Yuan, J. B. Latouche, J. L. Reagan, G. Heller, I. Riviere, M. Sadelain, J. W. Young, Langerhans cells derived from genetically modified human CD34+ hemopoietic progenitors are more potent than peptide-pulsed Langerhans cells for inducing antigen-specific CD8+ cytolytic T lymphocyte responses. J. Immunol. 174, 758–766 (2005).

【 0 2 4 3】

本発明の実施形態

【 0 2 4 4】

前述の説明から、本明細書で記載される発明を種々の使用法および条件に適合させるために、バリエーションおよび改変が、本明細書で記載される発明に対して行われ得ることは、明らかである。このような実施形態はまた、以下の請求項の範囲内である。

【 0 2 4 5】

本明細書中の変数の任意の定義の中の要素の列挙の記載は、任意の単数形の要素もしくは列挙された要素の組み合わせ（もしくは部分組み合わせ）としてのその変数の定義を含む。本明細書中の実施形態の記載は、その実施形態を、任意の単一の実施形態としてまたは任意の他の実施形態もしくはその一部との組み合わせにおいて含む。

【 0 2 4 6】

本願の主題のうちのいくつかは、米国特許出願第 1 2 / 5 9 3 , 7 5 1 号 (3 5 U . S

10

20

30

40

50

. C . § 3 7 1 に従って、米国仮特許出願第 6 0 / 9 2 1 , 1 4 4 号 (2 0 0 7 年 3 月 3 0 日出願) の利益を主張する国際特許出願番号 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 0 4 2 5 1 (2 0 1 0 年 3 月 8 日出願) の米国の国内段階の出願である) に関連し得る。それらの開示は、それら全体において本明細書に参考として援用される。

【 0 2 4 7 】

本明細書で言及される全ての特許および刊行物は、各独立した特許および刊行物が、援用されることが具体的かつ個々に示されるのと同程度、本明細書に参考として援用される。

【化 16 - 1】

付録A

「P-PD1tm-PD1」の核酸配列。「P-PD1tm-PD1」は、PD-1膜貫通ドメイン、PD-1細胞質ドメイン、およびPSMA svFVを含むiCARである。

atggCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
GTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttcagtgaggata
tcctgcaagacttctggatacacattcactgaatataccatacactgggtgaagcag
agccatggaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatggtggtacc
acctacaatcagaagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtccctccagt
acagcctacatggagctccgcagcctaacaatctgaggattctgcagtctattattgt
gcagctgggttggaaactttgactactggggccaagggaccacGGTCACCgtctcctca
ggtggaggTggAtcaggTggagggtggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATG
ACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGT
AAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
TCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATGTTTCACTCT
GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCTAGCAATATAACAGCTATCCCCTCACGTTCCGGT
GCTGGGACCATGCTGGACCTGAAACGGGcgggccgcAgagagaagggcagaagtgcc
acagcccccagccctcaccagccagccggccagttccaaaccctggtggtt
ggtgtcgtgggcccgtgctgggcagcctggtgctgctagtctgggtcctggccgtc
atctgctccgggcccgcagcagggacaataggagccagggccagccagccctg
aaggaggaccctcagccgtgctgtgttctctgtggactatggggagctggatttc
cagtggcgagagaagaccccgagcccccggtgacctgtgtccctgagcagacggag
tatgccaccattgtctttcctagcgggaatgggcacctcatccccgcccgcaggggc
tcagccgacggccctcgagtgcccagccactgaggcctgaggatggacactgctct
tggtccctctga 【配列番号16】

10

20

「P-PD1tm-PD1」のアミノ酸配列

MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQ
SHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC
AAGWNFDYWQGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC
KASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS
EDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMDLKRAAERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLVV
GVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSVDYGELDF
QWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCS
WPL 【配列番号17】

30

「P-CTLA-4tm-CTLA-4wt」の核酸配列。「P-CTLA-4tm-CTLA-4wt」は、CTLA-4膜貫通ドメイン、野生型CTLA-4細胞質ドメインおよびPSMA svFVを含むiCARである。

atggCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
GTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttcagtgaggata
tcctgcaagacttctggatacacattcactgaatataccatacactgggtgaagcag
agccatggaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatggtggtacc
acctacaatcagaagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtccctccagt
acagcctacatggagctccgcagcctaacaatctgaggattctgcagtctattattgt
gcagctgggttggaaactttgactactggggccaagggaccacGGTCACCgtctcctca

40

【化 16 - 2】

ggtggaggTggAtcaggTggaggtggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATG
 ACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGT
 AAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
 TCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC
 TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATGTTTCACTCT
 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCTAGCAATATAACAGCTATCCCCTCACGTTCCGGT
 GCTGGGACCATGCTGGACCTGAAACGGGcgggccgcACTGGGCATAGGCAACGGAACC
 CAGATTTATGTAATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGACTTCCTCCTCTGGATC
 CTTGCAGCAGTTAGTTTCGGGGTTGTTTTTTTATAGCTTTCTCCTCACAGCTGTTTCT
 TTGAGCAAAATGCTAAAGAAAAGAAGCCCTCTTACAACAGGGGTCTATGTGAAAATG
 CCCCCAACAGAGCCAGAATGTGAAAAGCAATTTTCTCAGCCTTATTTTATTTCCCATCAAT
 TGA [配列番号18]

10

「P-CTLA-4tm-CTLA-4wt」の amino 酸配列

MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHVKQ
 SHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC
 AAGWNFDYWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC
 KASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS
 EDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMDLKRRAALGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWI
 LAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
 [配列番号19]

20

「P-CTLA-4tm-CTLA-4mut」の核酸配列。「P-CTLA-4tm-CTLA-4mut」は、変
 異CTLA-4膜貫通ドメイン(Y165G変異)、CTLA-1細胞質ドメインおよびPSMA標的svFVを
 含むiCARである。CTLA-4の別の2種の変異バージョン: Y182G変異およびY165G & Y182G
 変異もまた作製した。

atggCTCTCCAGTGAAGTGGCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
 GTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttcagtgaggata
 tcttgcaagacttctggatacacattcactgaatataccatacactgggtgaagcag
 agccatggaaagagccttgagtggattggaacatcaatcctaacaatggtggtacc
 acctacaatcagaagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtcctccagt
 acagcctacatggagctccgcagcctaacaatctgaggattctgcagtcattattgt
 gcagctggttggaaactttgactactggggccaaggaccacGGTCACCgtctcctca
 ggtggaggTggAtcaggTggaggtggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATG
 ACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGT
 AAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
 TCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC
 TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATGTTTCACTCT
 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCTAGCAATATAACAGCTATCCCCTCACGTTCCGGT
 GCTGGGACCATGCTGGACCTGAAACGGGcgggccgcACTGGGCATAGGCAACGGAACC
 CAGATTTATGTAATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGACTTCCTCCTCTGGATC
 CTTGCAGCAGTTAGTTTCGGGGTTGTTTTTTTATAGCTTTCTCCTCACAGCTGTTTCT
 TTGAGCAAAATGCTAAAGAAAAGAAGCCCTCTTACAACAGGGGTCTGTTGTGAAAATG
 CCCCCAACAGAGCCAGAATGTGAAAAGCAATTTTCTCAGCCTTATTTTATTTCCCATCAAT
 TGA [配列番号20]

30

40

「P-CTLA-4tm-CTLA-4mut」の amino 酸配列

【化 16 - 3】

MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQ
 SHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC
 AAGWNFDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC
 KASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS
 EDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAALGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWI
 LAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
 [配列番号21]

「P-LAG3tm-LAG3」の核酸配列。「P-LAG3tm-LAG3」は、LAG3膜貫通ドメイン、LAG3細胞質ドメイン、およびPSMA svFVを含むiCARである。

atggCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
 GTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttcagtgaggata
 tcctgcaagacttctggatacacattcactgaatataccatacactgggtgaagcag
 agccatggaaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatggtggtacc
 acctacaatcagaagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtcctccagt
 acagcctacatggagctccgcagcctaacatctgaggattctgcagtcctattattgt
 gcagctggttggaactttgactactggggccaagggaccacGGTCACCGtctcctca
 ggtggaggTggAtcaggTggaggTggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATG
 ACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGT
 AAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
 TCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC
 TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATGTTTCAGTCT
 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCTAGCAATATAACAGCTATCCCCTCACGTTCCGGT
 GCTGGGACCATGCTGGACCTGAAACGGgcgccgcACTTGGAGCAGCAGTGTACTTC
 ACAGAGCTGTCTAGCCCAGGTGCCCAACGCTCTGGGAGAGCCCCAGGTGCCCTCCCA
 GCAGGCCACCTCCTGCTGTTTCTCATCCTTGGTGTCTTTCTCTGCTCCTTTTGGTG
 ACTGGAGCCTTTGGCTTTTACCTTTGGAGAAGACAGTGGCGACCAAGACGATTTTCT
 GCCTTAGAGCAAGGGATTACCCCTCCGCAGGCTCAGAGCAAGATAGAGGAGCTGGAG
 CAAGAACCGGAGCCGGAGCCGGAGCCGGAACCGGAGCCCGAGCCCGAGCCCGAGCCG
 GAGCAGCTCTGA [配列番号22]

「P-LAG3tm-LAG3」のアミノ酸配列

MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQ
 SHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC
 AAGWNFDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC
 KASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS
 EDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAALGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALP
 AGHLLFLILGVLSLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELE
 QEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL [配列番号23]

「P-BTLA_{tm}-BTLA」の核酸配列。「P-BTLA_{tm}-BTLA」は、BTLA膜貫通ドメイン、BTLA細胞質ドメインおよびPSMA svFVを含むiCARである。

atggCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
 GTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttcagtgaggata
 tcctgcaagacttctggatacacattcactgaatataccatacactgggtgaagcag
 agccatggaaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatggtggtacc

【化 16 - 4】

acctacaatcagaagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtcctccagt
 acagcctacatggagctccgcagcctaacatctgaggattctgcagtctattattgt
 gcagctgggttggaaactttgactactggggccaagggaccacGGTCACCgtctcctca
 ggtggaggTggAtcaggTggaggtggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATG
 ACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGT
 AAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
 TCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC
 TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATGTTTCAGTCT
 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCTAGCAATATAACAGCTATCCCCTCACGTTCCGGT
 GCTGGGACCATGCTGGACCTGAAACGGgcggccgcAGATGTAAAAAGTGCCTCAGAA
 CGACCCTCCAAGGACGAAATGGCAAGCAGACCCTGGCTCCTGTATAGTTTACTTCCT
 TTGGGGGGATTGCCTCTACTCATCTACCTGTTTCTGCCTGTTCTGCTGCCTGAGA
 AGGCACCAAGGAAAGCAAATGAACTCTCTGACACAGCAGGAAGGGAAATTAACCTG
 GTTGATGCTCACCTTAAGAGTGAGCAAACAGAAGCAAGCACCAGGCAAAATTCCTCA
 GTACTGCTATCAGAACTGGAATTTATGATAATGACCCTGACCTTTGTTTCAGGATG
 CAGGAAGGGTCTGAAGTTTATTCTAATCCATGCCTGGAAGAAAACAAACCAGGCATT
 GTTTATGCTTCCCTGAACCATTCTGTCTATTGGACCGAACTCAAGACTGGCAAGAAAT
 GTAAAAGAAGCACCAACAGAATATGCATCCATATGTGTGAGGAGTTAA 【配列
 番号24】

10

「P-BTLA_{tm}-BTLA」のアミノ酸配列

MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQ
 SHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC
 AAGWNFDYWQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC
 KASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQS
 EDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAADVKASERPSKDEMASRPWLLYSLLP
 LGGLPLLITTCFLFCCLRRHQKQNELSDTAGREINLVDHLKSEQTEASTRONSQ
 VLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCCLEENKPGIVYASLNHSHVIGPNSRLARN
 VKEAPTEYASICVRS 【配列番号25】

20

「P-2B4_{tm}-2B4」の核酸配列。「P-2B4_{tm}-2B4」は、2B4膜貫通ドメイン、2B4細胞質ド
 メインおよびPSMA svFVを含むiCARである。

atggCTCTCCAGTGAAGTCCCTACTGCTTCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
 GTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttcagtgaggata
 tcctgcaagacttctggatacacattcactgaatataccatacactgggtgaagcag
 agccatggaaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatggtggtacc
 acctacaatcagaagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtcctccagt
 acagcctacatggagctccgcagcctaacatctgaggattctgcagtctattattgt
 gcagctgggttggaaactttgactactggggccaagggaccacGGTCACCgtctcctca
 ggtggaggTggAtcaggTggaggtggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATG
 ACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGT
 AAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
 TCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC
 TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATGTTTCAGTCT
 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCTAGCAATATAACAGCTATCCCCTCACGTTCCGGT
 GCTGGGACCATGCTGGACCTGAAACGGgcggccgcACAGGACTGTGAGAATGCCCAT
 CAGGAATTCAGATTTTGGCCGTTTTTGGTGATCATCGTGATTCTAAGCGCACTGTTT
 CTTGGCACCTTGCTGCTTCTGTGTGTGGAGGAGAAAGAGGAAGGAGAAGCAGTCA

30

40

【化 16 - 5】

GAGACCAGTCCCAAGGAATTTTGTGACAATTTACGAAGATGTCAAGGATCTGAAAACC
 AGGAGAAATCACGAGCAGGAGCAGACTTTTCTGGAGGGGGGAGCACCATCTACTCT
 ATGATCCAGTCCAGTCTTCTGCTCCACGTCACAAGAACCTGCATATACATTATAT
 TCATTAATTCAGCCTTCCAGGAAGTCTGGATCCAGGAAGAGGAACACAGCCCTTCC
 TTCAATAGCACTATCTATGAAGTGATTGGAAAGAGTCAACCTAAAGCCCAGAACCCT
 GCTCGATTGAGCCGCAAAGAGCTGGAGAACTTTGATGTTTATTCCTAG [配列
 番号26]

「P-2B4tm-2B4」の amino 酸配列

10

MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQ
 SHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC
 AAGWNFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC
 KASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS
 EDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAQDCQNAHQEFKFWPFLVIVILSALF
 LGTLACFCVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTTPGGGSTIYS
 MIQSSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQN
 PRLSRKELENFDVYS [配列番号27]

「全CTLA4テールCD8ヒンジおよびtm」の核酸配列。これは、CD8ヒンジおよび膜貫通ドメイン、CTL

20

A-4細胞内テール、およびPSMA svFVを含むiCARである。

atggCTCTCCAGTGAAGTGCCTTCTCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
 GTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttcagtgaggata
 tctctgcaagacttctggatacacattcactgaatataccatacactgggtgaagcag
 agccatggaaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatggtggtacc
 acctacaatcagaagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtcctccagt
 acagcctacatggagctccgcagcctaacatctgaggattctgcagtcctattattgt
 gcagctgggttggaactttgactactggggccaaggaccacGGTCACCgtctctca
 ggtggaggTggAtcaggTggagggtggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATG
 ACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGT
 AAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
 TCTCCTAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC
 TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATGTTTCAGTCT
 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTGAGCAATATAACAGCTATCCCCCTCAGTTCCGT
 GCTGGGACCATGCTGGACCTGAAACGGGcgcgccgcACCCACCACGACGCCAGCGCCG
 CGACCACCAACCCCGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCctgtccctgcgcccagag
 gcgtgcccggccagcggcgggggcgcgagtcacacgagggggctggacttcgcctgt
 gatctctacatctgggcccctgtggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactg
 gttatcaccccttactgcaaccacagagcaccggcgGTTTCTTTGAGCAAATGCTA
 AAGAAAAGAAGCCCTCTTACAACAGGGTTCGGTGTGAAAATGCCCCAACAGAGCCA
 GAATGTGAAAAGCAATTTACGCTTATTTTATTCCCATCAATTGA [配列番号28]

30

「全CTLA4テールCD8ヒンジおよびtm」の amino 酸配列

40

MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQ
 SHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC
 AAGWNFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC
 KASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS

【化 16 - 6】

EDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAAPTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRAPAVSLSKML
KKRSPLTTGVGVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN [配列番号29]

「P-CD8tm-PD1」の核酸配列。「P-CD8tm-PD1」は、CD8膜貫通ドメイン、PD-1細胞質ドメインおよびPSMA svFVを含むiCARである。

atggCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
GTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactgggtgaagcctgggacttcagtgaggata
tcctgcaagacttctggatacacattcactgaatataccatacactgggtgaagcag
agccatggaaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatgggtgggtacc
acctacaatcagaagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtcctccagt
acagcctacatggagctccgcagcctaacatctgaggattctgcagtcctattattgt
gcagctgggttggaaactttgactactggggccaaggaccacGGTCACCgtctcctca
gggtggaggTggAtcaggTggagggtggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATG
ACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGT
AAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
TCTCCTAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATGTTTCAGTCT
GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCTAGCAATATAACAGCTATCCCCTCACGTTCCGGT
GCTGGGACCATGTCTGGACCTGAAACGGgcggcgccACCCACCACGACGCCAGCGCCG
CGACCACCAACCCCGCGGCCACGATCGCGTCGCAGCCCctgtccctgcgcccagag
gcgtgccggccagcgccggggggcgagtcgacacgaggggggtggacttcgcctgt
gatattctacatctggggcgcccCtggccgggacttggtggggctccttctcctgtcactg
gttatcaccctttactgcaaccacagaatgcattgctcccggggccgcagaggggaca
ataggagccagggcgaccggccagcccctgaaggaggacccctcagccgtgcctgtg
ttctctgtggactatggggagctggatttccagtggtgagagaagaccccgagccc
cccgtgccctgtgtccctgagcagacggagtatgccaccattgtctttccttagcgga
atgggcacctcatcccccgcccgagggggtcagccgacggccctcgaggtgccag
ccactgaggcctgaggatggacactgctcttggcccctctga [配列番号30]

「P-CD8tm-PD1」のアミノ酸配列

MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQ
SHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC
AAGWNFDYWGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC
KASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS
EDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAAPTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRMHCSRAARGT
IGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSG
MGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL [配列番号31]

「P-CD8tm-CTLA4wt」の核酸配列。「P-CD8tm-CTLA4wt」は、CD8膜貫通ドメイン、野生型CTLA-4細胞質ドメイン、およびPSMA svFVを含むiCARである。

atggCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG
GTGCAGCTGCAGcagtcaggacctgaactgggtgaagcctgggacttcagtgaggata
tcctgcaagacttctggatacacattcactgaatataccatacactgggtgaagcag
agccatggaaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatgggtgggtacc

【化 16 - 7】

acctacaatcagaagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtcctccagt
 acagcctacatggagctccgcagcctaacatctgaggattctgcagtctattattgt
 gcagctgggttggaaactttgactactggggccaaggaccacGGTCACCgtctcctca
 ggtggaggTggAtcaggTggaggtggAtctggTggAggTggatcTGACATTGTGATG
 ACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGT
 AAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
 TCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC
 TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAATGTTTCACTCT
 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCTCAGCAATATAACAGCTATCCCCCTCACGTTCCGGT
 GCTGGGACCATGCTGGACCTGAAACGGgcggccgcACCCACCACGACGCCAGCGCCG
 CGACCACCAACCCCGGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCctgtccctgcgcccagag
 gcgtgccggccagcggcgggggggcgagtgacacgagggggctggacttcgcctgt
 gatatctacatctggggcggccCtggccgggacttgtggggctccttctcctgtcactg
 gttatcaccctttactgcaaccacagagcaccggcgATGCTAAAGAAAAGAAGCCCT
 CTTACAACAGGGGTCTATGTGAAAATGCCCCAACAGAGCCAGAATGTGAAAAGCAA
 TTTTCAGCCTTATTTTATTTCCATCAATTGA 【配列番号32】

10

「P-CD8tm-CTLA4wt」のアミノ酸配列

MALPVTALLLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQ
 SHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC
 AAGWNFDYWQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC
 KASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS
 EDLADYFCQQNSYPLTFGAGTMLDLKRAAAPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
 ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRAPAMLLKKRSP
 LTTGVYVKMPTEPECEKQFPYFIPIN 【配列番号33】

20

【図 1 - 1】

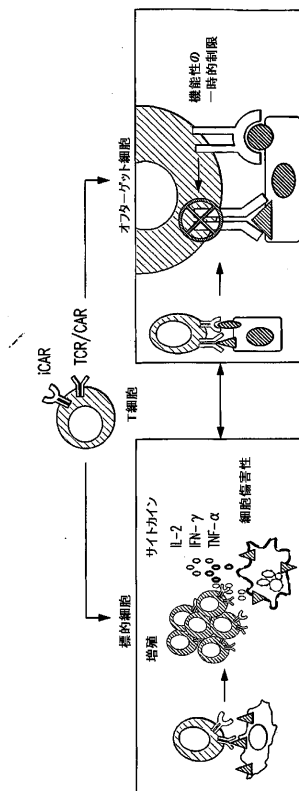


FIG. 1A

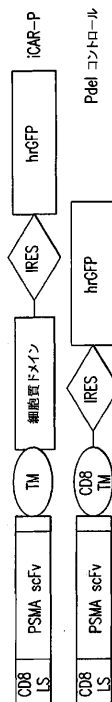


FIG. 1B

【図 1 - 2】

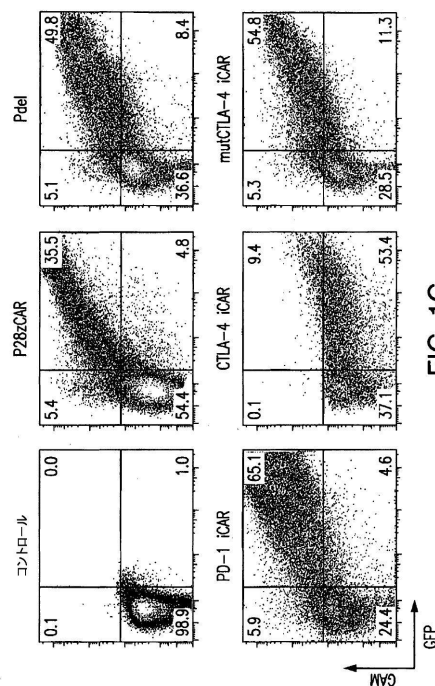
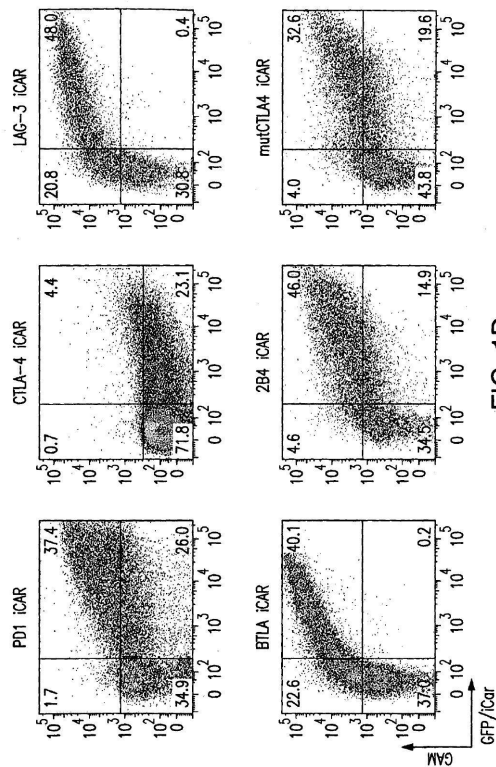
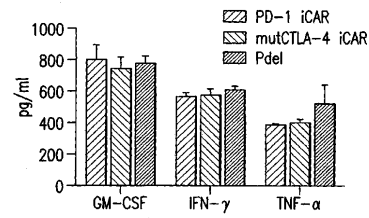
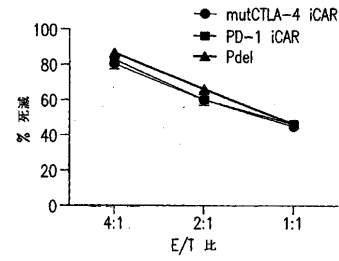


FIG. 1C

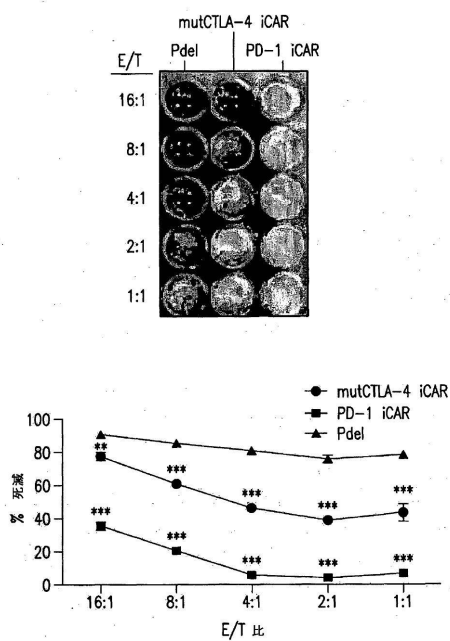
【図 1 - 3】



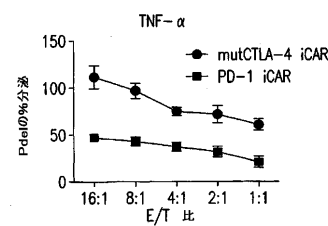
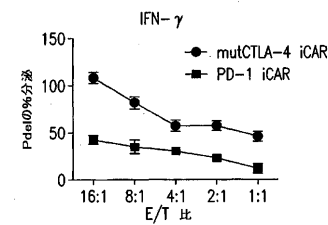
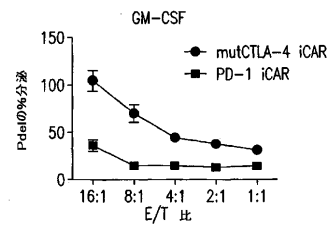
【図 2 - 1】



【図 2 - 2】



【図 2 - 3】



【図 3 - 1】

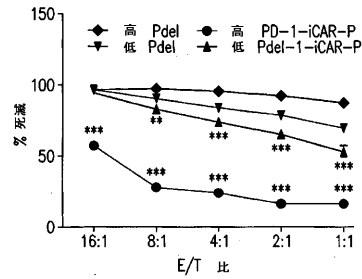


FIG. 3A

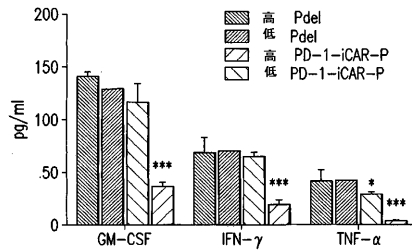


FIG. 3B

【図 3 - 2】

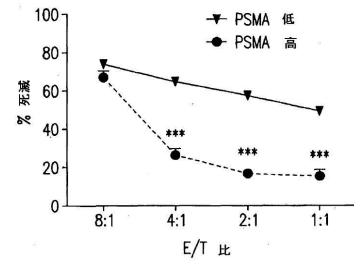


FIG. 3C

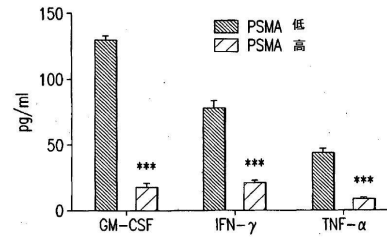


FIG. 3D

【図 4】



FIG. 4A

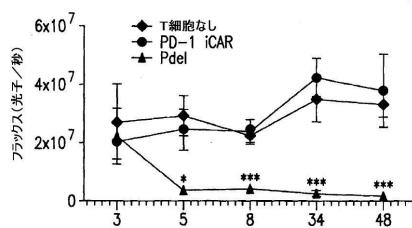


FIG. 4B

【図 5 - 1】

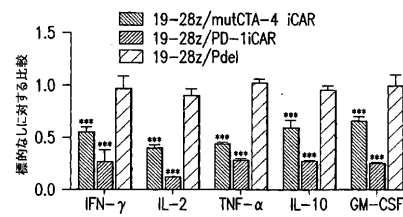


FIG. 5A

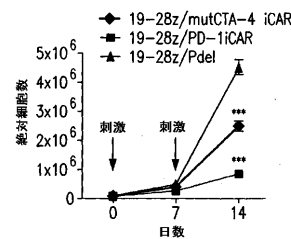


FIG. 5B

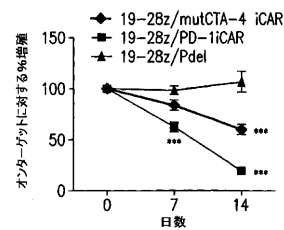
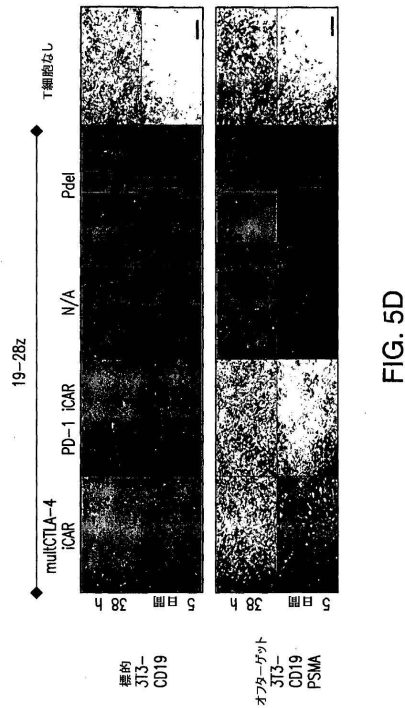
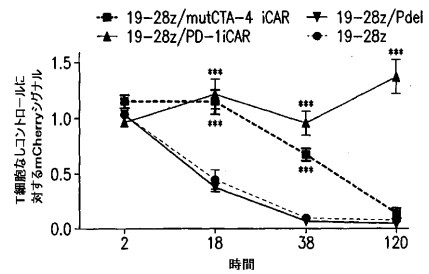
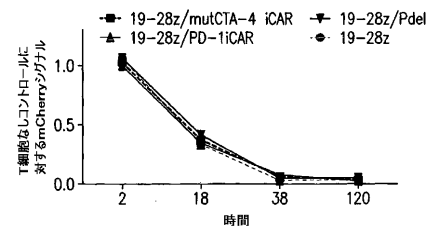


FIG. 5C

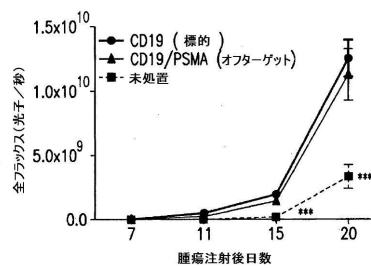
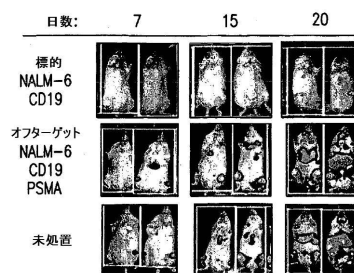
【図 5 - 2】



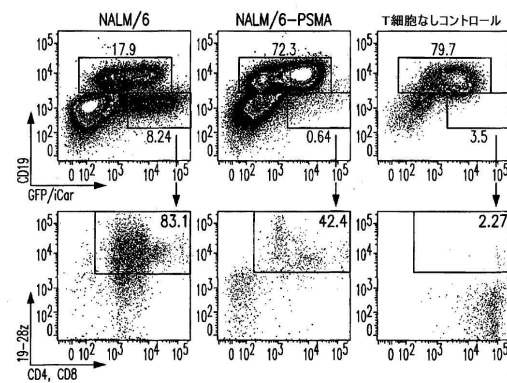
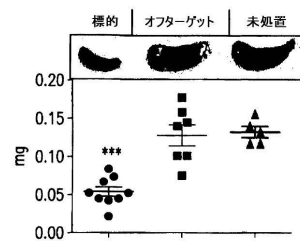
【図 5 - 3】



【図 6 - 1】



【図 6 - 2】



【図 6 - 3】

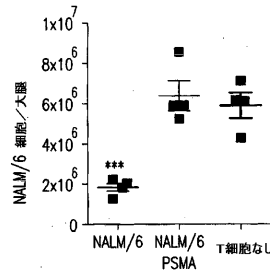


FIG. 6E

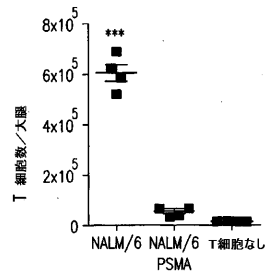


FIG. 6F

【図 7 - 1】

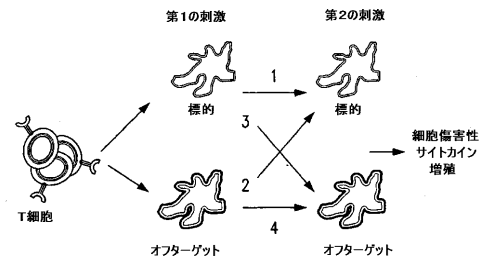


FIG. 7A

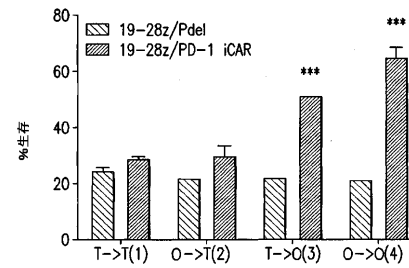


FIG. 7B

【図 7 - 2】

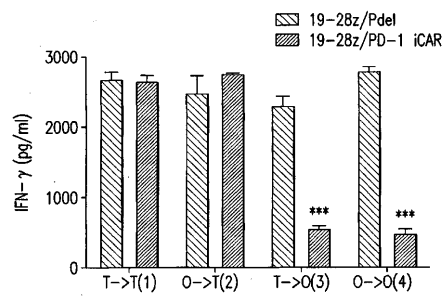


FIG. 7C

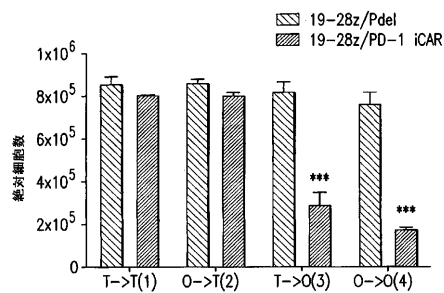


FIG. 7D

【図 8 - 1】

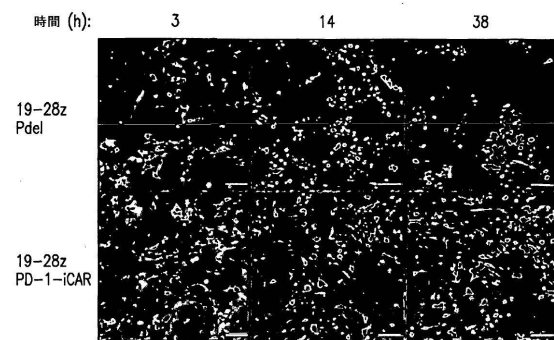


FIG. 8A

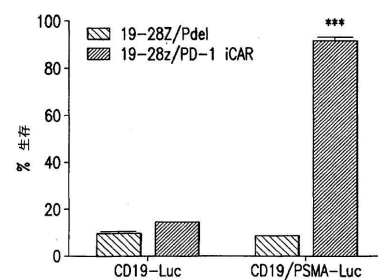
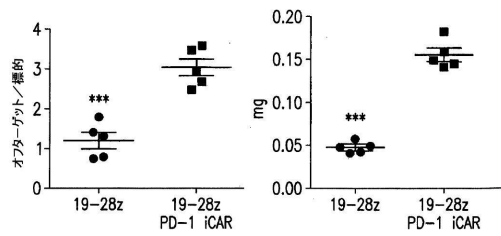
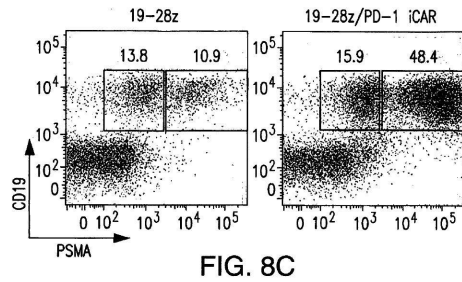
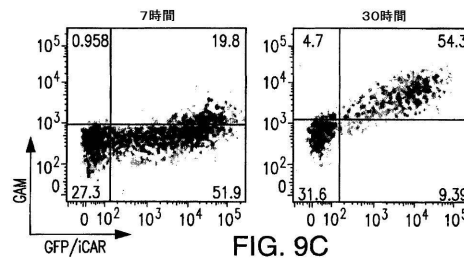
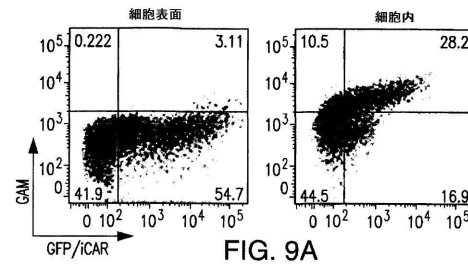


FIG. 8B

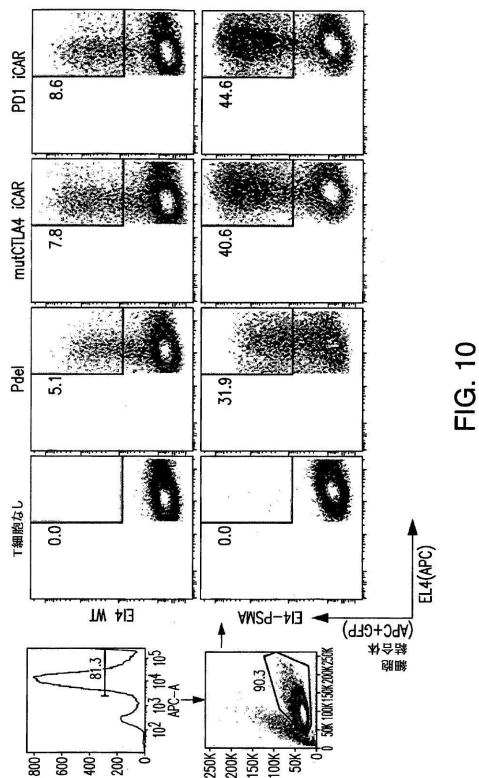
【図 8 - 2】



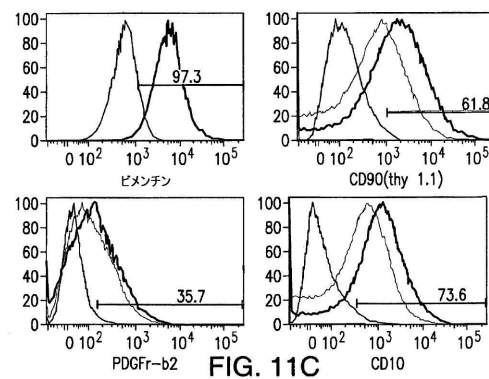
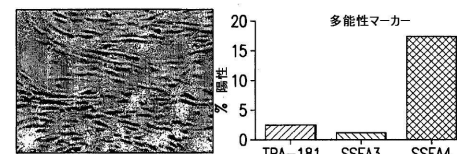
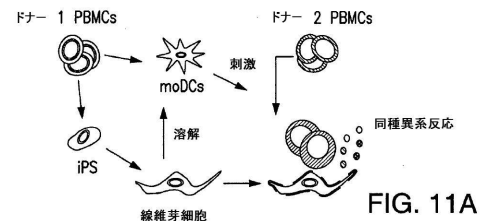
【図 9】



【図 10】



【図 11 - 1】



【図 11 - 2】

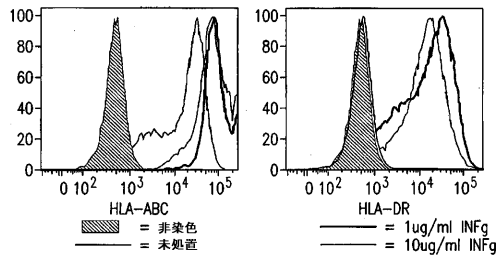


FIG. 11D

【図 12】

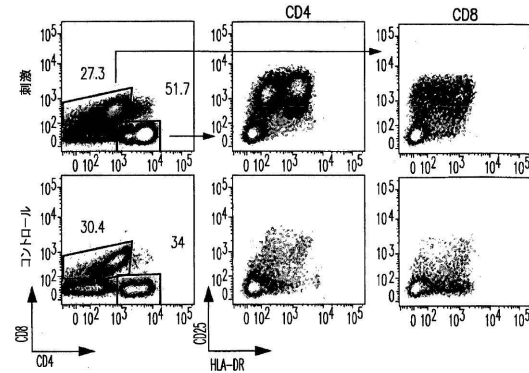


FIG. 12A

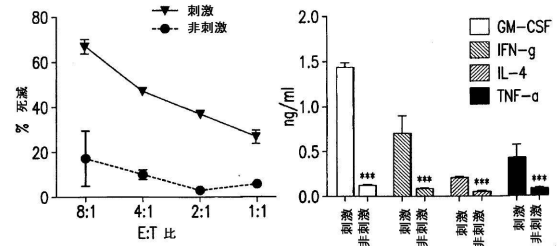


FIG. 12B

FIG. 12C

【図 13 - 1】

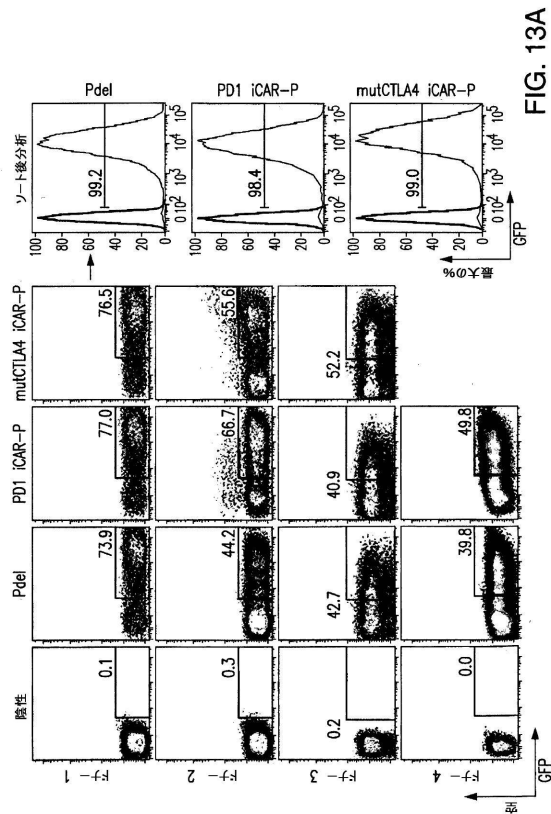


FIG. 13A

【図 13 - 2】

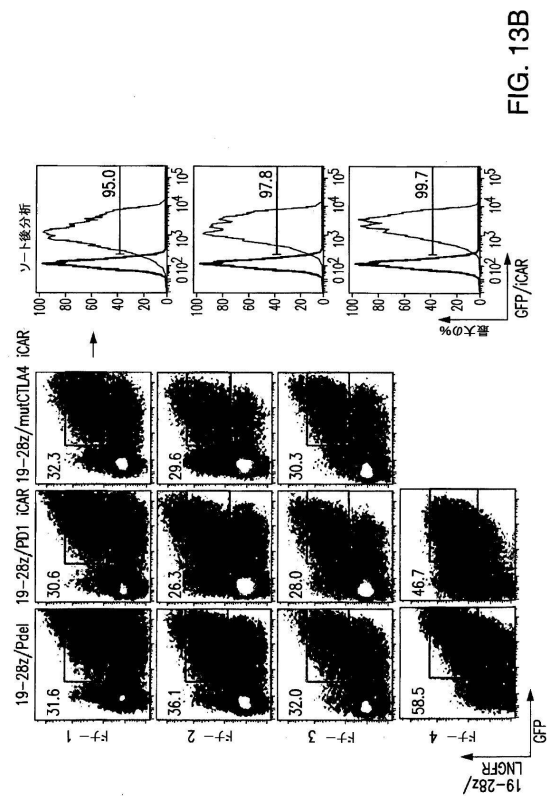


FIG. 13B

【図 14 - 1】

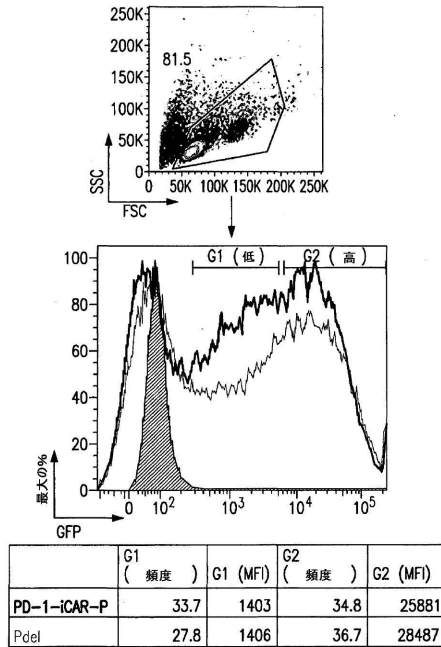


FIG. 14A

【図 14 - 2】

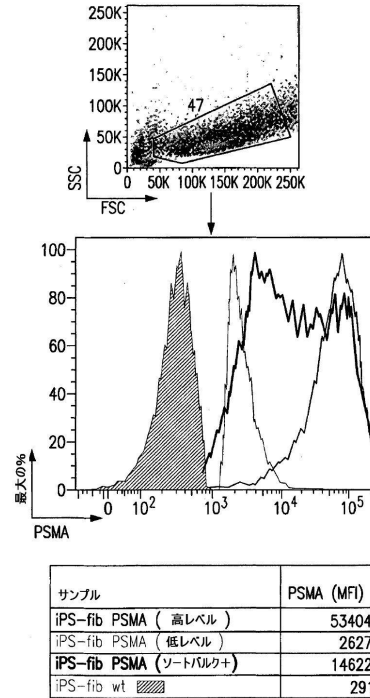


FIG. 14B

【図 15 - 1】

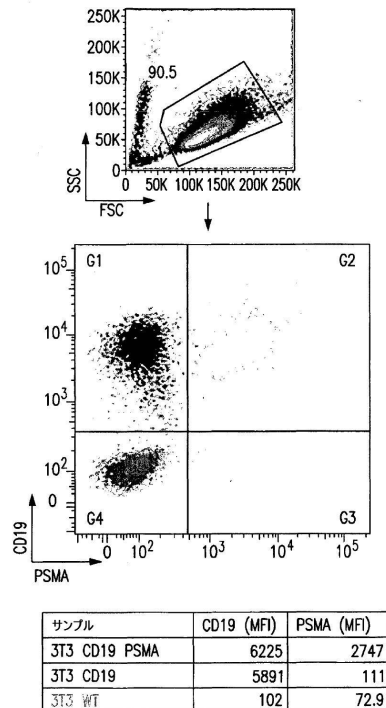


FIG. 15A

【図 15 - 2】

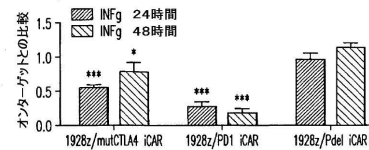


FIG. 15B

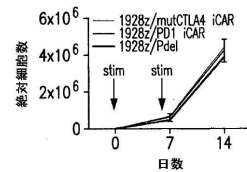


FIG. 15C

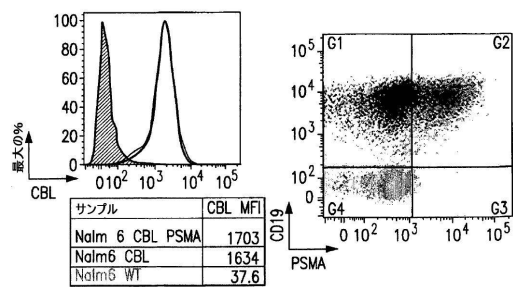


FIG. 15D

【図 16 - 1】

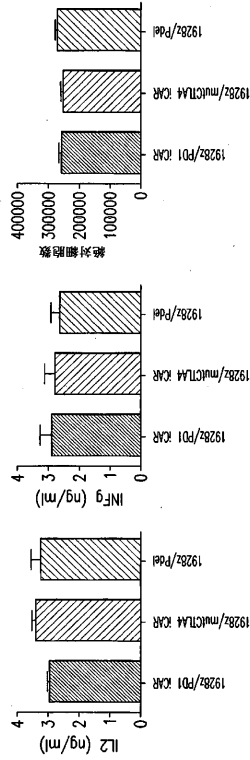


FIG. 16C

FIG. 16B

FIG. 16A

【図 16 - 2】

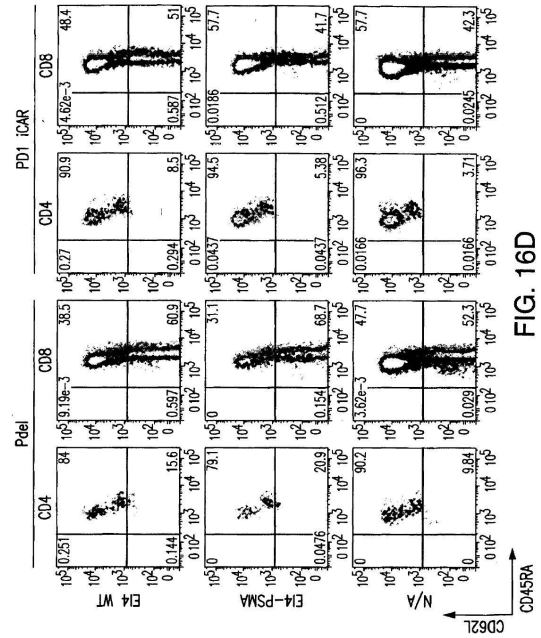


FIG. 16D

【図 16 - 3】

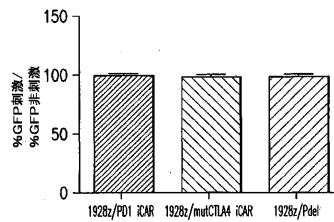


FIG. 16E

【図 16 - 4】

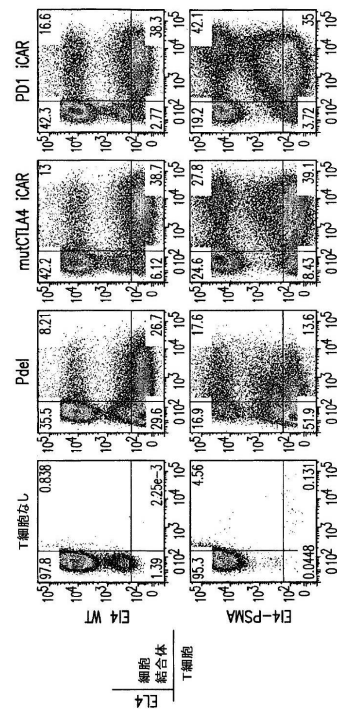


FIG. 16F

【図 16 - 5】

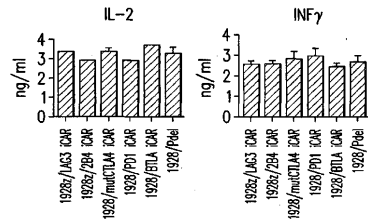


FIG. 16G

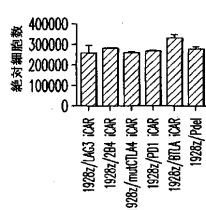


FIG. 16H

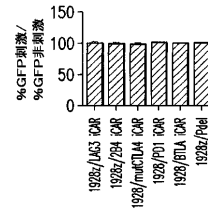


FIG. 16I

【図 17 - 1】

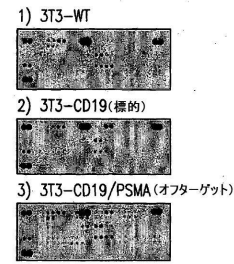


FIG. 17A

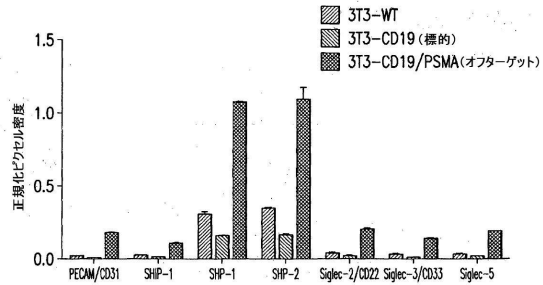


FIG. 17B

【図 17 - 2】

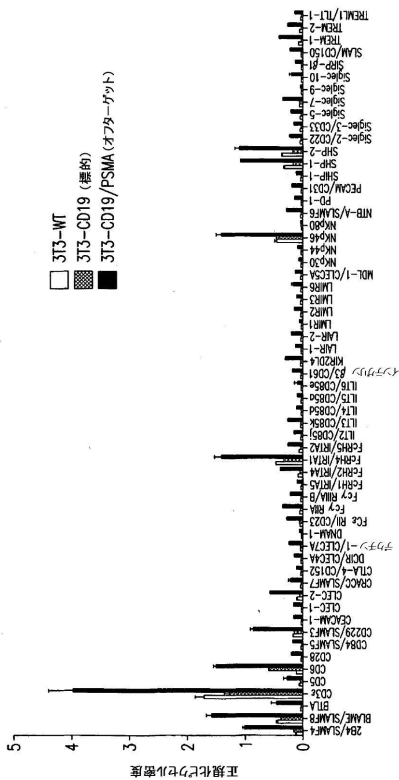


FIG. 17C

【図 18】

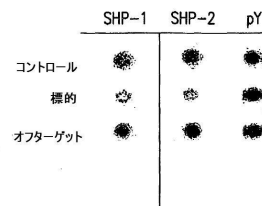


FIG. 18

【図 19 - 1】

生BLI (フラックス-光子)	mutCTLA4 iCAR		PD1 iCAR		Pdel
4:1	1.5E+07	1.4E+07	1.5E+07	1.5E+07	1.6E+07
2:1	1.2E+07	9.9E+06	1.1E+07	1.0E+07	1.2E+07
1:1	8.2E+06	8.2E+06	8.3E+06	8.5E+06	7.9E+06
±細胞なし	2.4E+07	1.9E+07			9.0E+06

FIG. 19A

pg/mL	mutCTLA4 iCAR		PD1 iCAR		Pdel
GM-CSF	647.2	801.3	765.5	703.8	887.3
INF-γ	621.2	552.2	534.4	533	581
INF-α	379	422	400.1	388	379
					375.5
					394
					643
					523.2

FIG. 19B

生BLI (フラックス-光子)	mutCTLA4 iCAR		PD1 iCAR		Pdel
16:1	3.87E+01	4.28E+01	4.07E+01	1.67E+01	2.09E+01
8:1	3.09E+01	3.30E+01	3.23E+01	9.96E+00	1.10E+01
4:1	2.30E+01	2.62E+01	2.40E+01	3.27E+00	3.06E+00
2:1	2.11E+01	1.98E+01	2.02E+01	5.27E+01	3.48E+00
1:1	2.78E+01	1.81E+01	2.25E+01	5.01E+00	2.00E+00
±細胞なし	3.92E+07	3.85E+07	3.76E+07		

FIG. 19C

【図 19 - 2】

PD1 対 Pdel	有意?	P値	PDI	Pdel	差異	差異のSE	t比	df
16:1	*	2.7372E-05	35.47	90.58	-55.12	2.55	21.59	4
8:1	*	7.47524E-07	20.80	85.47	-64.67	1.22	53.20	4
4:1	*	9.9969E-10	6.03	80.83	-74.80	0.27	278.33	4
2:1	*	1.2563E-05	3.73	75.87	-72.13	2.75	26.23	4
1:1	*	1.74306E-06	6.67	78.23	-71.57	1.66	43.03	4

FIG. 19D

CTLA4 対 Pdel	有意?	P値	CTLA4	Pdel	差異	差異のSE	t比	df
16:1	*	0.00581413	77.33	90.58	-13.25	2.47	5.37	4
8:1	*	5.02912E-05	60.86	85.47	-24.61	1.33	18.50	4
4:1	*	4.23971E-05	46.33	80.83	-34.50	1.79	19.31	4
2:1	*	9.05225E-05	38.67	75.87	-37.20	2.33	15.94	4
1:1	*	0.0027265	43.27	78.23	-34.97	5.30	6.60	4

【図 19 - 3】

GM-CSF 生	Pdel	平均 Pdel		mutCTLA4 iCAR		PD1 iCAR	
16:1	564.94	573.44	591.49	576.62	549.74	596.70	181.79
8:1	339.22	378.48	320.44	346.05	277.03	243.96	58.42
4:1	179.60	136.10	190.34	168.68	74.20	75.93	26.04
2:1	63.26	71.91	73.08	69.42	26.72	26.34	9.54
1:1	20.49	23.10	16.49	20.03	6.15	6.59	2.49

μPDEL	mutCTLA4 iCAR		PD1 iCAR	
16:1	95.34	116.21	103.48	31.53
8:1	80.05	62.92	70.50	16.88
4:1	43.99	44.63	45.02	15.44
2:1	38.49	38.61	37.94	13.74
1:1	30.72	34.57	32.89	12.42

FIG. 19E

【図 20 - 1】

正規化フラックス	低 Pdel		高 Pdel		高 P-PDI		低 P-PDI	
16:1	96.76	96.88	96.99	97.41	96.9	97.2	54.7	59.9
8:1	87.3	92.68	89.71	97.66	97.02	97.03	24.7	30.7
4:1	83.2	84.2	83.81	96.65	95.1	95.44	21.5	25.8
2:1	77.6	80.1	78	91.4	92.68	92.87	18.3	15.3
1:1	71.1	68	69.1	89.4	85.7	87.37	13.7	17.5

低 PDI 対 高 Pdel	低 PDI		高 Pdel		差異		差異のSE		t比	df
有意?	P値	低 PDI	高 Pdel	差異	差異	差異のSE	t比	df		
16:1	*	0.12	95.05	96.88	-1.83	0.91	2.00	4.00		
8:1	*	0.01	83.27	89.90	-6.63	1.62	4.10	4.00		
4:1	*	0.00	74.43	83.74	-9.30	0.35	26.96	4.00		
2:1	*	0.00	65.40	76.57	-13.17	1.07	12.31	4.00		
1:1	*	0.00	53.17	69.40	-16.23	2.73	5.95	4.00		
高 PDI 対 高 Pdel	高 PDI		高 Pdel		差異		差異のSE		t比	df
有意?	P値	高 PDI	高 Pdel	差異	差異	差異のSE	t比	df		
16:1	*	0.00	57.47	97.17	-39.70	1.52	26.16	4.00		
8:1	*	0.00	27.57	97.24	-69.67	1.75	39.81	4.00		
4:1	*	0.00	23.59	95.73	-72.14	1.33	54.29	4.00		
2:1	*	0.00	16.60	92.32	-75.72	1.00	75.60	4.00		
1:1	*	0.00	15.43	87.49	-72.06	1.54	46.75	4.00		

FIG. 20A

【 図 2 0 - 2 】

正規化フリップス	PSMA 低		PSMA 高	
8:1	74.3	73	73.8	61.3
4:1	64.3	64.1	64.7	21.5
2:1	57.5	57	57.6	13.8
1:1	48.6	49.4	49.3	20.7

PSAM 低 対 PSAM 高		PSMA 高	PSMA 低	P 値	有意？	差異	差異のSE	t 比	df
8:1		0.08	73.70	66.87		6.83		2.87	2,38 4,00
4:1	*	0.00	64.37	26.21		38.15		2.94	12.98 4,00
2:1	*	0.00	57.37	16.60		40.77		1.79	22.80 4,00
1:1	*	0.00	49.10	15.43		33.67		3.19	10.54 4,00

FIG. 20B

【 図 2 1 】

生BL(ブラックス-美子)														
日数	手離能なし				P01 iCAR				P02					
300	7.78E+07	1.43E+07	1.40E+07	1.48E+07	1.46E+07	1.69E+07	1.47E+07	1.44E+07	1.15E+07	2.74E+07	8.59E+05	5.06E+07	5.81E+05	2.32E+07
330	5.00E+07	1.91E+07	1.04E+07	4.73E+07	2.78E+07	8.76E+05	8.87E+05	3.95E+07	3.93E+07	2.38E+07	6.17E+05	4.41E+05	2.05E+05	4.00E+05
500	4.09E+07	1.91E+07	1.04E+07	4.73E+07	2.78E+07	8.76E+05	8.87E+05	3.95E+07	3.93E+07	2.38E+07	6.17E+05	4.41E+05	2.05E+05	4.00E+05
800	2.27E+07	2.01E+07	1.59E+07	2.82E+07	2.65E+07	3.28E+07	1.47E+07	1.56E+07	3.29E+07	2.17E+07	5.28E+05	4.78E+05	5.43E+05	3.19E+05
3400	4.62E+07	2.95E+07	1.34E+07	5.53E+07	3.35E+07	5.63E+07	3.42E+07	2.84E+07	5.58E+07	3.31E+07	2.01E+06	6.37E+05	1.32E+05	2.18E+05
4000	4.98E+07	3.01E+07	1.31E+07	5.55E+07	3.35E+07	5.63E+07	3.42E+07	2.84E+07	5.58E+07	3.31E+07	2.01E+06	6.37E+05	1.32E+05	2.18E+05
4500	4.98E+07	3.01E+07	1.31E+07	5.55E+07	3.35E+07	5.63E+07	3.42E+07	2.84E+07	5.58E+07	3.31E+07	2.01E+06	6.37E+05	1.32E+05	2.18E+05

FIG. 21A

T網なし 対 Pdel		有意？		P値	T網なし	Pdel	差異	差異のSE	t 比	df
3.00E+00				7.75E-01	2.71E+07	2.24E+07	4.68E+06	1.58E+07	2.96E-01	8.00E+00
5.00E+00	*			5.97E-03	2.91E+07	3.76E+06	2.33E+07	6.83E+06	3.71E+00	8.00E+00
8.00E+00	*			6.38E-05	2.23E+07	4.25E+06	1.81E+07	2.38E+06	7.59E+00	8.00E+00
3.40E+01	*			2.58E-03	3.48E+07	2.63E+06	3.22E+07	7.46E+06	4.31E+00	8.00E+00
4.80E+01	*			9.12E-05	3.30E+07	1.78E+06	3.12E+07	4.33E+06	7.21E+00	8.00E+00

T網なし 対 P01		有意？		P値	T網なし	P01	差異	差異のSE	t 比	df
3.00E+00				6.48E-01	2.71E+07	2.03E+07	6.74E+06	1.41E+07	4.79E-01	8.00E+00
5.00E+00				6.48E-01	2.91E+07	2.43E+07	4.55E+06	4.74E-01	8.00E+00	8.00E+00
8.00E+00				7.98E-01	2.23E+07	2.37E+07	-1.44E+06	4.50E+06	3.18E-01	8.00E+00
3.40E+01				4.75E-01	3.48E+07	4.27E+07	-7.30E+06	9.74E+06	7.49E-01	8.00E+00
4.80E+01				7.25E-01	3.30E+07	3.77E+07	-4.68E+06	1.28E+07	3.65E-01	8.00E+00

FIG. 21B

【 図 2 2 - 1 】

有意?	P値	1928z/pdel	1928z/pd1	差異	差異のSE	t 比	df
*	0.00	0.95	0.26	0.69	0.07	9.51	4.00
*	0.00	0.89	0.12	0.76	0.03	27.09	4.00
*	0.00	1.02	0.27	0.75	0.02	35.73	4.00
*	0.00	0.96	0.28	0.67	0.02	29.46	4.00
*	0.00	1.00	0.25	0.75	0.03	26.52	4.00

有意?	P値	1928z/pdel	1928z/mutCL44	差異	差異のSE	t 比	df
*	0.00	0.95	0.54	0.41	0.06	7.18	4.00
*	0.00	0.89	0.40	0.49	0.03	17.32	4.00
*	0.00	1.02	0.44	0.58	0.02	37.31	4.00
*	0.00	0.96	0.59	0.36	0.04	9.87	4.00
*	0.00	1.00	0.65	0.35	0.03	10.30	4.00

FIG. 22A

【 図 2 2 - 2 】

細胞数	有意?	p値	1928z/pd1	差異	差異のSE	t 比	df
0							
7	*	0.00726118	464667	246000	218667	31497.8	6.94229
14	*	0.000187776	4490000	840333	3649667	275554	13.2448

FIG. 22B

【図 22 - 3】

正規化した mCherryシグナル	1928z/mutCTLA4	iCAR	1928z/PD1	iCAR	1928z/Pdel	1928z
2.00	0.98 1.23 1.19	1.21	0.96 0.98 0.90	1.02	1.00 1.02 1.02	1.06 1.03 1.11 1.02 0.98
18.00	0.88 1.43 1.09	1.21 1.27	1.58 1.00	1.02	0.38 0.42 0.41	0.27 0.43 0.69 0.40 0.26
38.00	0.73 0.54 0.62	0.78 0.79	1.09 0.75	1.20	0.08 0.08 0.06	0.06 0.09 0.09 0.09 0.10
120.00	0.12 0.27 0.11	0.06 1.66	1.58 1.00	1.26	0.04 0.05 0.05	0.03 0.07 0.09 0.07 0.07

	有意？	P値	1928z/pdel	1928z/pd1	差異	差異のSE	t 比	df
2.00		1.06E-01	1.02	0.97	-0.06	0.03	1.90	6.00
18.00	*	9.54E-04	0.37	1.22	0.85	0.14	6.01	6.00
38.00	*	2.11E-04	0.07	0.96	0.89	0.11	7.95	6.00
120.00	*	1.32E-04	0.04	1.38	1.33	0.15	8.64	6.00

	有意？	P値	1928z/pdel	1928z/mutCTLA4	差異	差異のSE	t 比	df
2.00		7.44E-02	1.02	1.15	-0.13	0.06	2.16	6.00
18.00	*	6.04E-04	0.37	1.15	-0.78	0.12	6.55	6.00
38.00	*	3.79E-05	0.07	0.67	-0.60	0.06	10.77	6.00
120.00		8.37E-02	0.04	0.14	-0.10	0.05	2.07	6.00

FIG. 22C

【図 23】

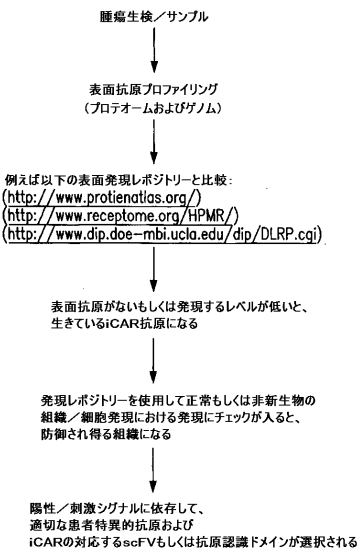


FIG. 23

【配列表】

0006857028000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P 13/08
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K 14/705
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/09

(72)発明者 サデレイン, ミシェル
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 2 5, ニューヨーク, セントラル パーク ウェスト
 4 4 4, アパートメント 8エイチ

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 山本 晋也

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 8 / 0 9 5 1 4 1 (WO, A1)
 Chicaybam L. et al., A conditional system for the activation of lymphocytes expressing activating and inhibitory CARs., Human Gene Therapy, vol. 21 no. 10 (2010), p. 1418 P60
 Chicaybam L. et al., International Reviews of Immunology, 30 (2011), p. 294-311
 ALTVATER B. et al., Clin Cancer Res, 15 (15) (2009), p. 4857-4866

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N5

C12N15

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

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