

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年4月30日(30.04.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/085480 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 14/705 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/041878

(22) 国際出願日: 2019年10月25日(25.10.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2018-202336 2018年10月26日(26.10.2018) JP

(71) 出願人: キッセイ薬品工業株式会社
(KISSEI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/
JP]; 〒3998710 長野県松本市芳野 1 9 番 4 8 号
Nagano (JP). 国立大学法人信州大学(SHINSHU
UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本
市旭三丁目 1 番 1 号 Nagano (JP).

(72) 発明者: 中 沢 洋 三 (NAKAZAWA Yozo);
〒3908621 長野県松本市旭三丁目 1 番 1 号 国
立大学法人信州大学医学部内 Nagano (JP).
田中 美幸(TANAKA Miyuki); 〒3908621 長野
県松本市旭三丁目 1 番 1 号 国立大学法
人信州大学医学部内 Nagano (JP). 師川 紘
一(MOROKAWA Hirokazu); 〒3908621 長野県
松本市旭三丁目 1 番 1 号 国立大学法人
信州大学医学部内 Nagano (JP). 成松 翔伍
(NARIMATSU Shogo); 〒3998304 長野県安曇

野市穂高柏原 4 3 6 5 - 1 キッセイ薬品工
業株式会社中央研究所内 Nagano (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所
(HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都
港区愛宕二丁目 5 - 1 愛宕グリーンヒルズ
MOR I タワー 3 2 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: HIGH-EFFICIENCY METHOD FOR PRODUCING GENETICALLY MODIFIED CELLS

(54) 発明の名称: 高効率な遺伝子改変細胞の作製方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to improve efficiency in a method for producing chimeric antigen receptor (CAR)-expressing cells. Provided is a method for producing genetically modified mammalian cells, the method comprising: a) a step of introducing, by a transposon method, a polynucleotide coding for a chimeric antigen receptor (CAR) protein into a cell population that contains T-cells derived from a mammal to obtain a genetically modified cell population; b) a step of preparing an endogenous cell population derived from the mammal that expresses a protein that binds to the CAR; and c) a step of coculturing the genetically modified cell population of step a) and the endogenous cell population of step b).

(57) 要約: キメラ抗原受容体 (CAR) 発現細胞の作製方法における効率の向上を図る。 a) 哺乳動物由来のT細胞を含む細胞集団にキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) タンパク質をコードするポリヌクレオチドをトランスポゾン法により導入して遺伝子改変細胞集団を得るステップ; b) 前記CARに結合するタンパク質を発現する該哺乳動物由来の内因性細胞集団を準備するステップ; 及び c) ステップ a) の遺伝子改変細胞集団とステップ b) の内因性細胞集団とを共培養するステップを含む、哺乳動物遺伝子改変細胞の作製方法を提供する。

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称： 高効率な遺伝子改変細胞の作製方法

技術分野

[0001] 本発明は、養子免疫療法の分野において有用な、キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変細胞の作製方法に関する。

背景技術

[0002] 腫瘍関連抗原を標的とするキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor : CAR) を発現させたT細胞 (CAR-T) を使用した養子免疫療法は抗腫瘍効果が強力であることが報告され、近年開発が急速に進んでいる。特にB細胞腫瘍への治療を目的としたCARの開発が進み、既に臨床応用に至っている (非特許文献 1、2)。CAR-T技術の研究開発が進む中で、細胞医薬品であるCAR-T細胞の臨床応用には、クリニカルグレードでCAR-T細胞を製造する工程の重要性が認識されている。

[0003] 従来、CAR-T細胞はウイルスベクターを用いて作製されてきたが、ウイルスベクターを用いた作製方法は安全面や設備面での課題が指摘されている (非特許文献 3、4)。ウイルスベクターを利用した従来のCAR療法における問題点を解決するために、非ウイルスベクターを用いた遺伝子改変技術の一つであるトランスポゾン法の利用が検討されている。一方で、トランスポゾン法には、ウイルスベクター法と比較して遺伝子導入効率が低く、臨床応用にはCAR発現細胞を選択する工程や長期の培養期間を要することが多い (非特許文献 5)。また、電気穿孔法による遺伝子導入 (エレクトロポレーション) に伴い細胞が傷害を受け、細胞生存率や細胞増殖率が低下するといった問題が指摘されている。T細胞治療の臨床応用には、CAR陽性細胞数が少なくとも 1×10^6 細胞数/kg程度のT細胞数を要するため、CAR-T細胞の低い発現率は臨床応用を困難にする (非特許文献 6)。

これらの問題を解決するため、トランスポゾン法を用いたCAR-T細胞の作製工程において、CAR発現細胞の増大を目的とした種々の検討がなされている。

[0004] 従来のウイルスペプチド法では末梢血単核細胞（PBMC）由来の照射フィーダー細胞と抗CD3抗体からなる迅速拡大培養（REP法）（特許文献1）や、抗CD3抗体や抗CD28抗体をアクセサリー細胞、ビーズまたは固体表面に固定することでT細胞を非特異的に刺激する手法（非特許文献4、非特許文献7）等が利用されている。

[0005] トランスポゾン的一种であるpiggyBacを用いたCD19, CAR-T細胞の作製においては、従来の方法に加えて、K562等の腫瘍細胞株にCD19や共刺激因子を強制的に発現させた人工抗原提示細胞（aAPCs）を別途調製し、CAR遺伝子を導入した細胞と共培養することでCAR特異的にCAR-T細胞を活性化する手法が開発されている（非特許文献8）。また、照射処理した末梢血単核球（PBMC）を抗CD3抗体や抗CD28抗体を用いて活性化した細胞（ATCs法）や、さらにウイルスペプチドパルス照射した細胞（ACE法）をフィーダー細胞として、CAR遺伝子を導入した細胞と共培養する方法が開発されており、効果が認められている（特許文献2、非特許文献9）。

[0006] しかしながら、これらの方法は依然として煩雑な工程を必要とする。また、腫瘍細胞株を用いたaAPCsの作製やウイルスペプチドを利用したフィーダー細胞の作製のための複雑な工程が別途発生する。さらに、これらの手法は臨床応用に向けたレギュレーション上で複雑な問題を生じる可能性がある。他にも、抗CD3抗体や抗CD28抗体等を複数利用することによる費用面での課題も存在する。そのため、トランスポゾン法において、より簡便な工程で効果的にCAR発現細胞の増大に資する作製方法の開発が望ましい。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：米国特許5, 827, 642号明細書

特許文献2：WO2017/061615

非特許文献

[0008] 非特許文献1：N. Engl. J. Med. (2017), 377, 2531-2544

非特許文献2：N. Engl. J. Med. (2018), 378, 439-448

非特許文献3 : J Immunotherapy (2013), 36(1), 1-2

非特許文献4 : Current Opinion in Biotechnology (2018)53:164-181

非特許文献5 : Cytotherapy (2014) 16, 1257-1269

非特許文献6 : Lancet (2015), 385, 517-528

非特許文献7 : J Immunol Methods (2003) Apr 1;275(1-2):251-5

非特許文献8 : Human Gene Therapy (2010) 21:427-437

非特許文献9 : Molecular Therapy:Methods & Clinical Development (2018)
3:131-140

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 上記の通り、トランスポゾン法を用いた簡便かつ効果的にCAR発現細胞の増大を実現するCAR-T細胞の作製方法が望まれている。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した。その結果、ヒト初代培養細胞 (Primary Cell) に含まれるCARに結合する物質を発現している細胞を利用することにより、従来の作製方法に比べて極めて簡便な工程でCAR発現細胞の増大を実現するCAR-T細胞の作製方法を見出した。

[0011] すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 以下のステップ :

a) 哺乳動物由来のT細胞を含む細胞集団にキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor : CAR) タンパク質をコードするポリヌクレオチドをトランスポゾン法により導入して遺伝子改変細胞集団を得るステップ ;

b) 前記CARに結合するタンパク質を発現する該哺乳動物由来の内因性細胞集団を準備するステップ ; 及び

c) ステップ a) の遺伝子改変細胞集団とステップ b) の内因性細胞集団とを共培養するステップ

を含む、哺乳動物遺伝子改変細胞の作製方法。

[2] 上記ステップ b) において、内因性細胞集団を1種または複数種のサ

イトカインの存在下で培養する、上記〔１〕に記載の作製方法。

〔３〕 上記ステップｂ）におけるサイトカインがGM-CSF及び／又はIL-4である上記〔２〕に記載の作製方法。

〔４〕 上記ステップｃ）を、１種または複数種のサイトカインの存在下で行う、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の作製方法。

〔５〕 上記ステップｃ）におけるサイトカインがIL-7及び／又はIL-15である上記〔４〕に記載の作製方法。

〔６〕 上記内因性細胞集団が、不活化処理を受けていないPBMCsに由来する細胞集団である上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の作製方法。

〔７〕 トランスポゾン法がpiggyBac法である上記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の作製方法。

〔８〕 遺伝子改変細胞集団と、内因性細胞集団が同一の個体に由来する、上記〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の作製方法。

〔９〕 上記CARタンパク質がヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）受容体に特異的な結合ドメインを含むタンパク質であり、上記内因性細胞集団がGM-CSF受容体発現細胞である、上記〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の作製方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2018-202336号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明の遺伝子改変細胞の作製方法は、従来の作製方法と比較して、極めて簡便な工程で、CAR発現細胞の増大を可能とし、さらに、本方法で作製されたCAR-T細胞は従来の作製方法と比較して同等以上の有効性を示す。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]CAR001のベクターマップを示す。

[図2]スパーサドメインを改変したCAR002(CH2CH3部分欠失-(G4S)3挿入体、GMR, CAR dCH2CH3+(G4S)3)のベクターマップの例を示す。

[図3]スパーサドメインを改変したCAR003(CH2CH3部分欠失体、E21KGMR, CAR

dCH2CH3)のベクターマップの例を示す。

[図4]スパーサドメインを改変したCAR004(CH2CH3部分欠失体、E21KGMR、CAR dCH2CH3)のベクターマップの例を示す。

[図5]CAR-T 004のday14における発現解析結果を示す。

[図6]CAR-T 004-Aのday13における発現解析結果を示す。

[図7]CAR-T 004-Bのday10における発現解析結果を示す。

[図8]CAR-T 004-BのTHP-1細胞に対する4日目(d4)、8日目(d8)、12日目(d12)、15日目(d15)、19日目(d19)、及び23日目(d23)における抗腫瘍細胞活性評価の結果を示す。

[図9]CAR-T 004-Cのday11における発現解析結果を示す。

[図10]CAR-T 004-A及びCAR-T 004-Bのday14におけるPD-1陽性率(疲弊率)を示す。

[図11]CAR-T 004-A及びCAR-T 004-Bのday14におけるステムセルメモリー分画の割合を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の実施の形態について、以下に詳細に説明する。尚、本明細書において、「細胞集団」との用語は、複数個の細胞又は複数種類の細胞を含むことを明確に示すために使用するものであり、文脈によって「細胞」と互換可能に使用されることを理解されたい。

本発明は、以下のステップ：

a) 哺乳動物由来のT細胞を含む細胞集団にキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)タンパク質をコードするポリヌクレオチドをトランスポゾン法により導入して遺伝子改変細胞集団を得るステップ；

b) 前記CARに結合するタンパク質を発現する該哺乳動物由来の内因性細胞集団を準備するステップ；及び

c) ステップa)の遺伝子改変細胞集団とステップb)の内因性細胞集団とを共培養するステップ

を含む、遺伝子改変細胞の作製方法を提供する。

[0015] 本発明の方法は哺乳動物に適用することができ、例えばヒト、サル、マウス、ラット、ブタ、ウシ、イヌ等の哺乳動物で好適に実施することができる。本発明の方法は、哺乳動物から取得した細胞に対してin vitroでポリヌクレオチドを導入するステップ、培養するステップ等を含む方法であり、得られた遺伝子改変細胞は当該哺乳動物に養子免疫療法として投与することが意図されるex vivoの方法である。

[0016] [ステップa)]

本発明における「T細胞を含む細胞集団」としては、例えば、血液（末梢血、臍帯血など）、骨髓などの体液、組織又は器官により採取、単離、精製、誘導された細胞集団を使用することができる。好適には末梢血単核細胞（PBMC）を使用することができる。

[0017] 本発明の好ましい実施態様の一つとしては、例えば、細胞傷害性タンパク質（パーフォリン、グランザイム等）を放出する細胞を用いることができる。具体的には、例えばT細胞、T細胞の前駆細胞（造血幹細胞、リンパ球前駆細胞等）、NK-T細胞を含有する細胞集団を使用することができる。さらに、これらの細胞に分化し得る細胞としてES細胞、iPS細胞等の各種幹細胞が含まれる。T細胞には、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、制御性T細胞、細胞傷害性T細胞、又は腫瘍浸潤リンパ球が含まれる。T細胞及びT細胞の前駆細胞を含有する細胞集団には、PBMCが含まれる。前記の細胞は生体より採取されたもの、それを拡大培養したもの又は細胞株として樹立されたもののいずれでもよい。製造されたCARを発現する細胞又は当該細胞より分化させた細胞を生体に移植する場合には、その生体自身又は同種の生体から採取された細胞に核酸を導入することが望ましい。

[0018] 本発明の遺伝子改変細胞のためにポリヌクレオチドが導入され、養子免疫療法に使用されるT細胞としては、持続的な抗腫瘍効果が期待されるT細胞、例えば、ステムセルメモリーT細胞を使用することができる。ステムセルメモリーT細胞の解析は、常法に従い、例えば、（Yang Xu, et al. blood. 2014; 123:3750-3759）等の記載に従って容易に確認することができる。

- [0019] 上記のポリヌクレオチドが導入される細胞として、例えば、CD45R0⁻、CD62L⁺、CD45RA⁺及びCCR7⁺である細胞が使用できる。より好ましくは、CD45RA⁺、CCR7⁺である細胞が少なくとも20%以上である細胞集団が上記のポリヌクレオチドが導入される細胞として使用できる。
- [0020] 本明細書において「キメラ抗原受容体（CAR）」とは、標的特異性をT細胞（例えば、ナイーブT細胞、ステムセルメモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、又はそれらの組み合わせ等のT細胞）等の細胞に移植することができる改変受容体を指す。CARはまた、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、又はキメラ免疫受容体としても知られる。
- [0021] 本発明の方法において使用されるCARは、標的分子に特異的に結合する標的結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを有するものである。ここで、「ドメイン」とは、ポリペプチド内の領域であって、他の領域とは独立して特定の構造に折りたたまれる領域を示す。
- [0022] 本発明の方法は、養子免疫療法に用いられるCARを発現する遺伝子改変細胞の調製全般に適用することができる。従って、CARが標的とする分子は、典型的には、腫瘍細胞において、他の細胞と比較して有意又は顕著な発現が認められる抗原であり、限定するものではないが、例えばCD19、CD20、GD2、CD22、CD30、CD33、CD44、CEA、Her2/neu、MUC1、MUC4、MUC6、EGFR、VEGFR2、GM-CSFR、IL-11R α 、IL-13 α 2等が挙げられる。
- [0023] CARタンパク質の標的結合ドメインは、例えば上記のような標的分子に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖（H鎖）可変領域及び軽鎖（L鎖）可変領域を含む単鎖抗体（scFv）断片を含むものとすることができる。当業者であれば、特定の抗原に対するモノクローナル抗体及びCARに使用可能なscFv断片を容易に作製することができ、また市販のものを利用することもできる。例えば、この実施形態で利用可能な標的結合ドメインとして、CD19に対して特異的に結合するscFv断片を挙げることができる。
- [0024] あるいはまた、標的となる抗原が腫瘍細胞表面上に発現する受容体である場合、その受容体と特異的に結合するリガンドの構造を標的結合ドメインと

して利用することができる。例えば、この実施形態で利用可能な標的結合ドメインとして、GM-CSFを挙げることができる。

[0025] 本発明の方法は、CARタンパク質をコードするポリヌクレオチドが導入される細胞とは別に、該CARタンパク質と結合するタンパク質を発現する内因性細胞集団を必要とする。このタンパク質は、CARタンパク質と結合する限り、上記の標的分子と同じであっても異なっても良い。標的分子は、腫瘍以外の内因性細胞においても細胞膜表面に発現する標的であることが好ましい。

[0026] さらに、標的に特異的に結合するリガンド、例えばアフィボディ、天然型受容体由来のリガンド結合ドメイン、（例えば、腫瘍細胞上の）受容体の溶解性タンパク質/ペプチドリガンド、ペプチド等を標的結合ドメインとして使用しても良い。

[0027] 以下の詳細な説明では、ヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）受容体を標的とする場合によってCARタンパク質の構造を具体的に説明する。

[0028] ヒトGM-CSF受容体を標的とする場合、標的結合ドメインとしては、ヒトGM-CSFのオープンリーディングフレームがコードするアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いることができる。具体的には、配列番号1のアミノ酸配列を含むGM-CSFタンパク質を使用することができる。あるいは、配列番号1のアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、ヒトGM-CSF受容体に対する結合能を有するポリペプチドを使用することができる。

[0029] あるいはまた、ヒトGM-CSF受容体を標的とする場合、標的結合ドメインは、配列番号1に示すアミノ酸配列のうち第21番目のグルタミン酸が他のアミノ酸、例えばリシンに置換された変異体ポリペプチド（配列番号2）であってもよい。ヒトGM-CSF受容体に対する結合能を保持している限り、他のアミノ酸残基部分にも置換がされた変異体、更に、これらのポリペプチドの断片、すなわち結合性断片を使用しても良い。

[0030] ここで、「ヒトGM-CSF受容体に対する結合能」を有するとは、ヒトGM-CSF

受容体に対する結合定数が例えば1-1000 nM以下であることを意図する。この結合能は、抗原と抗体との結合能と比較して相対的に弱い結合であって良い。

[0031] あるいはまた、ヒトGM-CSF受容体を標的とする場合であっても、標的結合ドメインは、例えば、ヒトGM-CSF受容体との結合能を有するモノクローナル抗体由来の単鎖抗体（scFv）を使用することもできる。

[0032] CARタンパク質は、場合によって、細胞外に存在する標的結合ドメインと膜結合ドメインとの間に「細胞外スペーサドメイン」を含むことができる。細胞外スペーサドメインは、CARと抗原の結合を促進し、細胞内へのシグナル伝達を亢進する配列であることが望ましい。例えば、抗体のFcフラグメント、又はそのフラグメントもしくは誘導体、抗体のヒンジ領域、又はそのフラグメントもしくは誘導体、抗体のCH2領域、抗体のCH3領域、人工スペーサ配列、又はそれらの組み合わせを用いることができる。

[0033] 本発明の一態様として、細胞外スペーサドメインとして、(i) IgG4のヒンジ、CH2、及びCH3領域、(ii) IgG4のヒンジ領域、(iii) IgG4のヒンジ及びCH2、(iv) CD8aのヒンジ領域、(v) IgG1のヒンジ、CH2、及びCH3領域、(vi) IgG1のヒンジ領域、もしくは(vii) IgG1のヒンジ及びCH2、又はそれらの組み合わせを使用することができる。例えば、IgG1のヒンジ領域として、配列番号3に示すヌクレオチド配列によってコードされる以下のアミノ酸配列（配列番号4）を有するものを好適に使用することができるが、これに限定されるものではない。

UniProt No.: P01857 (99-110)

EPKSCDKTHTCP PCDPA EPKSPDKTHTCP

ヒンジ スペーサー ヒンジ

[0034] また、IgG1のCH2領域として、配列番号5に示すヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列（配列番号6）を有するもの、CH3領域として、配列番号7に示すヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列（配列番号8）を有するものをそれぞれ好適に使用することができる。

[0035] 好ましい態様として、細胞外スペーサードメインはヒトIgG1のヒンジ、CH2、及びCH3領域又はその一部を使用することができる。

[0036] また、好ましい態様として、細胞外スペーサードメインは、(i) ヒトIgG1のヒンジ領域単独（配列番号4）、(ii) ヒトIgG1のヒンジ領域（配列番号4）及びCH2領域（配列番号6）及びCH3領域（配列番号8）の組み合わせ、(iii) ヒトIgG1のヒンジ領域（配列番号4）及びCH3領域（配列番号8）の組み合わせ、(iv) CH3領域単独（配列番号8）、で使用する事ができる。

[0037] 本発明の一態様として、細胞外スペーサードメインに用いる人工スペーサー配列として、式 $(G4S)_n$ で表されるスペーサー配列を使用することができる。式中、 n は、1～10であり、好ましくは $n=3$ である。例えば、配列番号9を有するものを好適に使用することができる。このようなスペーサー配列を有するスペーサーは、ペプチドリinkerと呼ばれることもある。当分野において好適に使用されるペプチドリinkerを、本発明において適宜使用することができる。この場合、ペプチドリinkerの構成及び鎖長は、得られるCARタンパク質の機能を損なわない範囲で適切なものを選択することができる。

[0038] 更に好ましい態様として、細胞外スペーサードメインは、ヒトIgG1のヒンジ領域（配列番号4）及び $(G4S)_3$ のスペーサー配列（配列番号9）の組み合わせを使用することができる。

[0039] 細胞外スペーサードメインは、上記に例示したものから適宜選択して、又は当分野における技術常識に基づいて更に改変して、本発明のために使用することができる。

細胞外スペーサードメインは、標的結合ドメインと、膜貫通ドメインとの間に存在し得るように、それぞれのドメインのアミノ酸配列をコードする塩基配列を連結してベクターに挿入し、宿主細胞において発現させることができる。あるいはまた、細胞外スペーサードメインは、予め作製したプラスミドCARタンパク質をコードするポリヌクレオチドを鋳型として改変することもできる。

細胞外スペーサドメインの改変は、例えば、CARをコードするポリヌクレオチドを導入したCAR-T細胞の宿主細胞におけるCAR遺伝子発現率の向上、シグナル伝達、細胞の老化、腫瘍への分布、抗原認識又は*in vivo*活性への影響を考慮した場合に有用である。

[0040] CARタンパク質は、標的結合ドメイン及び任意に細胞外スペーサドメインを含む細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメイン及び任意に共刺激ドメインを含む細胞内ドメインとを含む。当分野において周知であるように、「膜貫通ドメイン」は、細胞外ドメイン及び細胞内ドメインがいずれも親水性ドメインであるのに対して、細胞膜を構成する脂質二重層に対する親和性を有するドメインである。

[0041] 膜貫通ドメインは、CARタンパク質が細胞膜上に存在でき、標的結合ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインの機能を損なわない限り、特に限定するものではないが、後述する共刺激ドメインと同じタンパク質由来のポリペプチドが膜貫通ドメインとしての機能を果たす場合もあり得る。膜貫通ドメインは、例えば、CD28、CD3 ϵ 、CD8 α 、CD3、CD4又は4-1BBなどの膜貫通ドメインを用いることができる。例えば、膜貫通ドメインは、ヒトCD28 (Uniprot No. : P10747 (153 - 179)) を使用することができる。具体的には、配列番号 10 に示すヌクレオチド配列 (NCBI Accession No.: NM_006139.3 (679-759)) によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 11) を有するものを膜貫通ドメインとして好適に使用することができる。

[0042] CARタンパク質は、場合によって「共刺激ドメイン」を含むことができる。共刺激ドメインは共刺激リガンドと特異的に結合し、それによって、これらに限定されないが、CAR-T細胞の増殖、サイトカイン産生、機能分化、標的細胞の細胞死のような、細胞による共刺激応答が媒介される。共刺激ドメインとしては、例えば、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、CD134 (OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、CD30、CD40、PD-1、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、TNFR-1、TNFR-II、Fas、Lckを用いることができる。例えば、共刺激ドメインは、ヒトCD28 (Uniprot No. : P10747 (180 - 220)) 又は4-1BB (GenBank : U03397.1)

等を使用することができる。具体的には、配列番号 1 2 に示すヌクレオチド配列 (NCBI Accession No.: NM_006139.3 (760-882)) によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 1 3) を有するものを共刺激ドメインとして好適に使用することができる。

[0043] CARタンパク質は「細胞内シグナル伝達ドメイン」を含む。細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫細胞のエフェクター機能の発揮に必要なシグナルを伝達する。細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、ヒトCD3ζ鎖、FcγRIII、FcεRI、Fc受容体の細胞質末端、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を有する細胞質受容体又はそれらの組み合わせを用いることができる。例えば、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3ζ鎖 (例えばNCBI Accession No. NM_000734.3のヌクレオチド299-637) を使用することができる。具体的には配列番号 1 4 に示すヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 1 5) を有するものを細胞内シグナル伝達ドメインとして好適に使用することができる。

[0044] 目的とするポリヌクレオチドは常法に従い、容易に作製することができる。各ドメインのアミノ酸配列を示すNCBI RefSeq IDやGenBankのAccession番号からアミノ酸配列をコードする塩基配列を取得することが可能であり、標準的な分子生物学的及び/又は化学的手順を用いて本発明のポリヌクレオチドを作製することができる。例えば、これらの塩基配列をもとに、核酸を合成することができ、また、cDNAライブラリーよりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して得られるDNA断片を組み合わせることで本発明のポリヌクレオチドを作製することができる。

[0045] 従って、CARタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、上記のそれぞれのドメインをコードするポリヌクレオチドを連結して作製することができ、このポリヌクレオチドを適切な細胞に導入することによって、遺伝子改変細胞を作製することができる。また、CARタンパク質は、標的結合ドメイン以外の構成成分が同一である既存のCARタンパク質をコードするポリヌクレオチドを鋳型として、常法に従い、標的結合ドメインを組み替えることによっても

作製することができる。

[0046] 更に、目的に応じて、既存のCARタンパク質をコードするポリヌクレオチドを鋳型として、1以上のドメイン、例えば細胞外スペーサードメインを、inverse PCR (iPCR) 法等を使用して、改変することができる。細胞外スペーサードメインの改変技術については、例えばOncoimmunology, 2016, Vol.5, No.12, e1253656等に記載されている。

[0047] 尚、本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」には、天然又は合成のDNA及びRNA、例えばゲノムDNA、cDNA（相補DNA）、mRNA（メッセンジャーRNA）、rRNA（リボソームRNA）、shRNA（小ヘアピンRNA）、snRNA（核内低分子RNA）、snoRNA（核小体低分子RNA）、miRNA（マイクロRNA）、及び／又はtRNAが含まれるが、これらに限定されない。

[0048] また、本明細書において「コードする」とは、当分野において通常使用されているように、所定のヌクレオチド配列が所定のタンパク質又は（ポリ）ペプチドのアミノ酸配列情報を暗号化していることをいい、本明細書において、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方を「コードする」との文脈において使用する。

[0049] 本発明の方法において、遺伝子改変細胞を作製するためのポリヌクレオチドの導入は、トランスポゾン法による非ウイルス性の方法で実施する。トランスポゾン法のために、プラスミドトランスポゾンを使用することができ、sleeping beautyトランスポゾンシステム（例えばHuang X, Guo H, et al. Mol Ther. 2008; 16: 580-9; Singh H, Manuri PR, et al. Cancer Res. 2008; 68: 2961-71; Deniger DC, Yu J, et al. PLoS One. 2015; 10: e0128151; Singh H, Moyes JS, et al. Cancer Gene Ther. 2015; 22: 95-100; Hou X, Du Y, et al. Cancer Biol Ther. 2015; 16: 8-16; Singh H, Huls H, et al. Immunol Rev. 2014; 257: 181-90; 及びMaiti SN, Huls H, et al. J Immunother. 2013; 36: 112-23に記載）又はpiggyBacトランスポゾンシステム（Nakazawa Y, Huye LE, et al. J Immunother. 2009; 32: 826-36; Galvan DL, Nakazawa Y, et al. J Immunother. 2009; 32: 837-44; Nakazawa Y, Huye

LE, et al. Mol Ther. 2011; 19: 2133-43 ; Huye LE, Nakazawa Y, et al. Mol Ther. 2011; 19: 2239-48 ; Saha S, Nakazawa Y, et al. J Vis Exp. 2012; (69): e4235 ; Nakazawa Y, Saha S, et al. J Immunother. 2013; 36: 3-10 ; Saito S, Nakazawa Y, et al. Cytotherapy. 2014; 16: 1257-69 ; 及び Nakazawa et al. Journal of Hematology & Oncology (2016) 9:27に記載) が好適に使用できる。

[0050] piggyBacトランスポゾンシステムを使用する場合、典型的には、piggyBacトランスポザゼをコードする遺伝子を保持したプラスミド（本明細書中においてpiggyBacプラスミドと記載する）と、CARタンパク質をコードするポリヌクレオチドがpiggyBac逆向き反復配列に挟まれた構造を備えるプラスミドとを導入（トランスフェクション）する。トランスフェクションには、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、ヌクレオフェクション、リポフェクション、リン酸カルシウム法等の各種手法が利用できる。双方のプラスミドには、ポリA付加シグナル配列、レポーター遺伝子、選択マーカー遺伝子、エンハンサー配列等を含めることができる。

[0051] エレクトロポレーションのために使用する装置としては、限定するものではないが、例えば4D-Nucleofector（ロンザジャパン株式会社）、NEPA21（ネッパジーン株式会社）等を用いることができ、それぞれの使用説明書に従って操作することができる。

上記の方法により、 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 個の範囲の細胞に遺伝子導入することが可能である。

[0052] [ステップb)]

本発明の方法では、ステップa) で調製する遺伝子改変細胞集団が発現するCARに結合するタンパク質を発現する内因性細胞集団を準備することを特徴とする。従って、本発明の方法は、内因性細胞集団にCARタンパク質に結合するタンパク質が発現していることを必要とするが、そのような内因性細胞集団を取得できる限り、CARタンパク質は特に限定されない。

[0053] 尚、本ステップにおける「準備」とは、ステップc) の共培養に供する内因

性細胞集団を、ステップa) のCARをコードするポリヌクレオチドを導入する細胞集団とは別に用意することを意図し、本ステップには単離した内因性細胞集団をそのままステップc) の共培養に供するのみならず、目的のタンパク質を発現する細胞の割合を高めること及び／又は成熟させる（分化させる）ために培養することも含まれる。上記の説明において使用する内因性細胞集団の「単離」とは、目的のタンパク質を発現する細胞のみを単離することを意図するものではなく、目的のタンパク質を発現する細胞を含み、ステップb) で使用し得る細胞集団として用意することを意図する。

[0054] 例えば、実施例に記載するように、同じ個体に由来する細胞集団の一部を、ステップa) で用いる「T細胞を含む細胞集団」として用い、残部をステップb) で培養する「内因性細胞集団」として用いることができる。しかしながら、ステップa) における細胞集団は導入されたCARが標的を認識した際に活性化されるT細胞を含むことが必須である一方、ステップb) における細胞集団は、従来の方で用いる外因性の刺激ではなく、本発明の方法の特徴としての内因性細胞を用いたCAR特異的な刺激が可能な集団であることが重要であることが理解されるべきである。

[0055] 内因性細胞集団においてCARに結合するタンパク質が発現していることは、常法により、容易に確認しうる。例えば、CARタンパク質をGM-CSF受容体に対して特異的に結合するものとする場合、GM-CSF受容体に対する抗体を用いたフローサイトメトリー解析により内因性細胞集団におけるGM-CSF受容体の発現を確認することができる。また、CARタンパク質をCD19に対して特異的に結合するものとする場合、抗CD19抗体を用いたフローサイトメトリー解析により内因性細胞集団におけるCD19の発現を確認することができる。

[0056] 本明細書において「内因性細胞」とは、CARタンパク質をコードするポリヌクレオチドを導入する細胞と同種の哺乳動物が本来有する細胞をいい、例えば、血液（末梢血、臍帯血など）、骨髓などの体液、組織又は器官により採取、単離、精製、誘導された細胞を使用することができる。末梢血単核細胞（PBMC）、免疫細胞[樹状細胞、B細胞、造血幹細胞、マクロファージ、単球

、NK細胞又は血球系細胞（好中球、好塩基球）、臍帯血単核球、繊維芽細胞、前駆脂肪細胞、幹細胞、皮膚角化細胞、間葉系細胞、脂肪肝細胞、がん細胞又は神経幹細胞を使用することができる。

[0057] 好ましい態様としては、PBMCを内因性細胞として利用できる。

[0058] 本発明における「内因性細胞」は、ステップa)で調製する遺伝子改変細胞集団が発現するCARに結合するタンパクを発現しているため、ステップa)で調製した細胞集団と共培養することで、CAR特異的な刺激が可能となり、効率的なT細胞の活性化と増幅を実現する。したがって、本明細書における内因性細胞を用いたCAR刺激とは、例えばビーズ等に被覆した抗CD3抗体や抗CD28抗体を用いた非特異的なT細胞刺激、K562等の腫瘍細胞株にCARに結合する抗原分子や共刺激因子を強制的に発現させた人工抗原提示細胞（aAPCs）による人工的なCAR特異的な刺激等とは異なることを意図する。ステップb)に使用する内因性細胞の数は、CAR特異的な刺激によるT細胞の活性化の実現と、過剰な活性化によるT細胞の早期疲弊を抑制する観点から適宜決定される。具体例は実施例に示す。また、本発明において使用する内因性細胞集団は、紫外線等の照射処理による不活化処理をせずに使用することができる。

[0059] ステップb)で準備（単離・培養）する内因性細胞集団は、ステップa)で取得するT細胞を含む細胞集団が由来する哺乳動物と同じ種の哺乳動物に由来する。好適な実施形態では、遺伝子改変細胞集団と、内因性細胞集団が同一の個体に由来するものである。

[0060] 例えば、CARタンパク質がCD19に対して特異的に結合するものとする場合、内因性細胞集団として、CD19を発現するB細胞を含む細胞集団を内因性細胞として利用することができる。また、例えばCARがGM-CSF受容体に対して特異的に結合するものとする場合、内因性細胞集団として、GM-CSF受容体を発現する単球もしくは単球に由来する細胞を含む細胞集団を内因性細胞として利用することができる。

[0061] 本発明の一実施形態において、内因性細胞集団は、末梢血単核細胞（PBMC）をプレート上で培養した場合にプレートに付着する細胞を含む。このよう

な細胞としては、例えば単球等が挙げられる。また、別の一実施形態において、内因性細胞集団は、PBMCをin vitroで培養した細胞集団であり得る。

[0062] 内因性細胞集団は、ステップb)において、1種または複数種のサイトカインの存在下で培養することが好ましく、例えばサイトカインはGM-CSF及び／又はIL-4であり得る。GM-CSFは、例えば5～20 ng/mL、IL-4は、例えば5～20 ng/mLの範囲の濃度で使用することが好ましい。

ステップb)における培養条件は、特に限定するものではないが、例えば37℃で0～10日間の範囲内とすることが好適である。

[0063] [ステップc)]

本発明の方法は、ステップa)で得られた遺伝子改変細胞集団と、ステップb)で得られた内因性細胞集団とを共培養するステップを含む。

上記ステップc)を、1種または複数種のサイトカインの存在下で行うことができ、例えばサイトカインはIL-7及び／又はIL-15であり得る。IL-7は、例えば5～20 ng/mL、IL-15は、例えば1～10 ng/mLの範囲の濃度で使用することが好ましい。

[0064] 内因性細胞集団は、1回で、又は複数回に分けて、遺伝子改変細胞集団に添加することができる。

ステップc)における培養条件は、特に限定するものではないが、例えば37℃で1～14日間とすることが好適である。

[0065] ステップc)における培養には、血清（ヒト血清、ウシ胎仔血清、人工血清など）を添加した培地を用いても良い。臨床応用する際の安全性の観点からは、自己血清あるいは人工血清が望ましい。好ましい態様としては人工血清を用いることができる。人工血清は常法に従い、培養に適した条件で培地に添加すれば良い。例えば、10%以下の濃度で使用する。好ましい態様としては、1～5%の範囲の濃度を使用することができる。上記血清は容易に入手することができる（例えば、株式会社細胞化学研究所から提供されている）。

[0066] 特に限定するものではないが、本発明の好適な実施形態において、CARタン

パク質はヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）受容体に特異的な結合ドメインを含むタンパク質であり、上記内因性細胞集団がGM-CSF受容体発現細胞である。

[0067] 本発明の方法は、ウイルスベクターを使用しないトランスポゾン法によりポリヌクレオチドを導入するものであり、また従来の方法のようにウイルスペプチドや腫瘍細胞株、モノクローナル抗体、ビーズ等による外因性刺激を利用しないため、煩雑な工程を必要とせず、臨床応用に向けた安全性の懸念も解消することができる。更に、本発明の方法によって得られる遺伝子改変細胞は、従来の方法と比較して発現率が高く、抗腫瘍細胞活性も長期間持続すると共に、疲弊マーカーであるPD-1陽性のT細胞の割合も少なく、従来の方法と比較して本発明の方法による細胞活性化に伴うT細胞の早期疲弊も認められなかった。

実施例

[0068] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。尚、以下の実施例において例示するGM-CSF受容体を標的とするCARタンパク質を、便宜的に「GMR.CAR」と、GM-CSF受容体を標的とするCARタンパク質を発現するように遺伝子改変されたT細胞を含む細胞集団を「GMR.CAR-T細胞」と記載する。

[0069] [実施例1 GMR.CAR発現プラスミド（CAR 001）の作製]

ヒトGM-CSF（NCBI Accession No.: NM_000758の翻訳領域（配列番号16、33～464塩基：終止コドン前）の5'側にEcoRIサイト、3'側にIgG1のヒンジをコードする塩基配列及びBclIサイトをつけたPCR産物をpTA2クローニングベクター（TOYOBO）にサブクローニングした。ヒトGM-CSFとIgG1のヒンジ配列をサブクローニングしたpTA2クローニングベクターをEcoRIとBclIでダブルダイジェストし、ヒトGM-CSFとIgG1のヒンジ配列を切り出した。

[0070] 一方、pSL1190ベクター（Amersham社）に、SFG-CD19.CAR（Savoldo et al., J Clin Invest 2011;121(5):1822-1826）をNcoIとSphIでダブルダイジェストすることで得られたanti-CD19 scFv（FMC63; Zola H. et al., Immunol Cel

l Biol. 1991;69(Pt6):411-412)-CD28-CD3zetaの断片をライゲーションすることでpSL1190-CD19, CARベクターを作製した。

[0071] pSL1190-CD19, CARベクターをEcoRIとBamHIでダブルダイジェストした後、前述の切り出したヒトGM-CSFとIgG1のヒンジ配列をcompatible siteを使用してライゲーションすることでpSL1190-GMR, CARベクターを作製した。さらに、pIRII-CD19, CARベクター (Huye et al. Mol Ther 2011;19(12):2239-2248) をEcoRIとNotIでダブルダイジェストすることでCD19, CAR断片を除き、代わりにpSL1190-GMR, CARベクターをEcoRIとNotIでダブルダイジェストすることで得られた断片をライゲーションすることでGMR, CAR発現プラスミドを取得した (CAR 001)。図1に、作製されたCAR 001のベクターマップを示す。

[0072] [実施例2 スペーサー改変GMR, CAR発現プラスミド (CAR 002) の作製]

実施例1で作製したCAR 001を鋳型にしたinverse-PCR法により、CH2CH3を部分欠失させ、(G4S)3を挿入したスペーサー改変体を作製した。inverse-PCRに用いるPCRプライマーは、以下に示すようにデザイン (配列番号17及び18) し、合成した (ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託)。

フォワードプライマー:

5' - GGTGGTGGTGGATCCGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTAAAGATCCCAAATTTTGGGT
GCTGG -3' (配列番号17)

リバースプライマー:

5' - TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCAGGAGATTTGGGC -3' (配列番号18)

[0073] CAR 001を50 ng/ μ Lに調製して鋳型として用い、各PCRプライマーは反応液中濃度が0.3 μ Mになるように調製した。inverse-PCRはKOD-Plus-Mutagenesis Kit (東洋紡株式会社) を用い、反応組成はキット添付のプロトコールに従った。反応条件は、(i)94°C 2分、(ii)98°C 10秒、(iii)68°C 7分で、(ii)及び(iii)を10サイクル行った。

[0074] PCR反応後のサンプルの一部を1~1.2%アガロースゲル電気泳動にて分離し、目的のサイズの直鎖状のDNAの生成を確認した。次いで、残りのPCR反応後のサンプルをキット添付のプロトコールに従ってDpn I処理により、メチル化

された鋳型プラスミドCAR 001を切断して排除する反応を行った。その後、直鎖状DNAをキット添付のLigation high及びT4 Polynucleotide Kinaseによりセルフライゲーションさせて環状プラスミドとした。得られた環状プラスミドにより大腸菌DH5 α （東洋紡株式会社）を形質転換し、50 μ g/mLアンピシリン含有LB寒天培地上で約16時間培養した。

[0075] 出現したコロニーをさらに50 μ g/mLアンピシリン含有LB液体培地中で約16時間培養した。培養した大腸菌培養液からQIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン）を用いてプラスミドを精製して塩基配列確認を行い、目的の塩基配列の改変が確認されたスペーサー改変GMR. CAR発現プラスミド：CAR 002(GMR. CAR dCH2CH3+(G4S)3)を取得した。図2に、作製されたCAR 002のベクターマップを示す。

[0076] [実施例3 変異型スペーサー改変GMR. CAR発現プラスミド（CAR 003）の作製]

実施例2で作製したCAR 002を鋳型にしたinverse-PCR法により、GM-CSFポリペプチド（配列番号1）の21番目のEをKに置換した変異型スペーサー改変体を作製した。inverse-PCRに用いるPCRプライマーは、以下に示すようにデザイン（配列番号19及び20）し、合成した（ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託）。

フォワードプライマー：

5' - AAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTG -3'（配列番号19）

リバースプライマー：

5' - CTGGATGGCATTACATGCTCCCAGGG -3'（配列番号20）

[0077] CAR 002を50 ng/ μ Lに調製して鋳型として用い、各PCRプライマーは反応液中濃度が0.3 μ Mになるように調製した。inverse-PCRはKOD-Plus-Mutagenesis Kit（東洋紡株式会社）を用い、反応組成はキット添付のプロトコールに従った。反応条件は、(i)94 $^{\circ}$ C 2分、(ii)98 $^{\circ}$ C 10秒、(iii)68 $^{\circ}$ C 7分で、(ii)及び(iii)を10サイクル行った。

[0078] PCR反応後のサンプルの一部を1～1.2%アガロースゲル電気泳動にて分離し

、目的のサイズの直鎖状のDNAの生成を確認した。次いで、残りのPCR反応後のサンプルをキット添付のプロトコールに従ってDpn I処理により、メチル化された鋳型プラスミドを切断して排除する反応を行った。その後、直鎖状DNAをキット添付のLigation high及びT4 Polynucleotide Kinaseによりセルフライゲーションさせて環状プラスミドとした。得られた環状プラスミドにより大腸菌DH5 α （東洋紡株式会社）を形質転換し、50 μ g/mLアンピシリン含有LB寒天培地上で約16時間培養した。

[0079] 出現したコロニーをさらに50 μ g/mLアンピシリン含有LB液体培地中で約16時間培養した。培養した大腸菌培養液からQIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン）を用いてプラスミドを精製して塩基配列確認を行い、目的の塩基配列の改変が確認された変異型スペーサー改変GMR, CAR発現プラスミド：CAR 003（E21KGMR, CAR dCH2CH3+(G4S)3）を取得した。図3に、作製されたCAR 003ベクターマップを示す。

[0080] PCR法により調製したカナマイシン耐性遺伝子の配列を、SeamlessクローニングによりCAR 003及びpCMV-piggyBacへ挿入し、選択マーカーとしての耐性遺伝子をアンピシリンからカナマイシンへ変更するプラスミドの改変を実施した（メディリッジ株式会社に委託）。塩基配列確認を行い、目的の塩基配列の改変が確認されたGMR, CAR発現プラスミド：CAR 004（E21KGMR, CAR dCH2CH3+(G4S)3 kan）及びpCMV-piggyBac（kan）を取得した。図4に、作製されたCAR 004ベクターマップを示す。

[0081] [実施例4 GMR, CAR-T細胞の培養・増幅]

<4-1 PBMCの精製>

健康成人ドナーから末梢血を採取し、D-PBS（富士フィルム和光純薬株式会社）で2倍に希釈した後、Ficoll-Paque PLUS（GE Healthcare）に希釈末梢血をSepMate-50（STEMCELL Technologies）を用いて重層し、1200 x gで15分の遠心分離を行い、PBMCを分取した。分取したPBMCをD-PBSで2回洗浄し、遠心分離により精製した。精製したPBMCを、ACEフィーダー細胞（4-2）、ベクターを電氣的導入する細胞（4-3）、OKT3 blast作製用の細胞（4-4）としてそ

れぞれ使用した。

[0082] <4-2 PBMC ACEフィーダー細胞の作製 (Day 0) >

上記4-1で精製したPBMCにpeptivatorペプチドプール（登録商標、ミルテニーバイオテック）によるウイルスペプチドパルスを行った。具体的には、100 μL のD-PBSに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のAdv5 Hexon、CMV pp65、EBV BZLF1及びEBV EBNA-1（4種類のペプチドを総称してACEペプチドと呼ぶ）を2 μL ずつ添加したペプチドプールに、PBMCを 12×10^6 個懸濁し、CO₂インキュベーター内で37℃、30分間ウイルスペプチドパルスを実施した。30分後、ウイルスペプチドパルスされたPBMCに5 mLのD-PBSを加えて懸濁し、その後4分間のUV照射を行った。UV照射されたPBMC（PBMC ACEフィーダー細胞）を回収し、遠心分離した。遠心分離後、 2×10^6 個/ウェル/2 mLとなるように10 ng/mL human IL-7（ミルテニーバイオテック）、5 ng/mL human IL-15（ミルテニーバイオテック）及びArtificial serum Animal-free（株式会社細胞科学研究所）2%含有ALyS705（株式会社細胞科学研究所）中に懸濁し、24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレート（FALCON）に移した。

[0083] <4-3 GMR, CAR発現ベクターとpiggyBacベクターの電氣的導入 (Day 0) >

上記4-1で精製した 15×10^6 個のPBMCへの遺伝子導入のために、実施例3で作製したCAR 004プラスミド及びpCMV-piggyBac (kan) プラスミドをそれぞれ7.5 μg 添加した上で、Artificial serum Animal-free 2%含有ALyS705中に懸濁した。懸濁した細胞をNEPAキューベット電極2 mmギャップ（ネッパジーン株式会社）へセットし、遺伝子導入装置であるNEPA21（ネッパジーン株式会社）を用いて懸濁液の抵抗値を測定した。その際、メーカー推奨の適正範囲内の抵抗値（0.038～0.046 k Ω ）になるようにArtificial serum Animal-free 2%含有ALyS705を用いて液量調節した。調節後、NEPA21で設定可能な範囲内で電氣的導入を実施した。

[0084] 電氣的導入した細胞全量を、予め上記4-2で作製したPBMC ACEフィーダー細胞の入った24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレートに加えて37℃のCO₂インキュベーター内で培養を開始した。プラスミドを添加せず、電氣的刺激

を施したMock-T細胞を同様に培養した。24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレートで7日間培養したが、その期間中、適宜培地交換、IL-7及びIL-15の添加を行った。

[0085] <4-4 OKT3 blastの作製 (Day 0~7) >

Day 0にD-PBSで1 μ g/mLに調製したAnti-human CD3抗体（ミルテニーバイオテック）及びAnti-human CD28抗体（ミルテニーバイオテック）を24ウェルノントリートメントプレート平底（FALCON）に500 μ L添加し、37°C、2時間CO₂インキュベーターへ入れることで、抗体をプレートに固相した。2時間後、上清を除くことで抗体固相したプレートを作製した。

[0086] 上記4-1で精製したPBMCを、5 ng/mL human IL-15及び Artificial serum Animal-free 2%含有ALyS705中に懸濁した。懸濁したPBMCを1.5 x 10⁶個/ウェル/2 mLとなるように、予め抗体固相したプレートに播種することで、T細胞に対して刺激をしながら培養を開始した。

[0087] Day 3にOKT3 blastの再刺激用の抗体固相プレートを作製した。具体的には、D-PBSで1 μ g/mLに調製したAnti-human CD3抗体及びAnti-human CD28抗体を24ウェルノントリートメントプレート平底に500 μ L添加し、4°C、オーバーナイトでインキュベートすることで、抗体をプレートに固相した。

一方、Day 0から刺激をしていたOKT3 blastは抗体を固相していない24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレートに移すことで、一時的に刺激を行わなかった。

[0088] Day 4に前日固相したプレートから上清を除き、OKT3 blastを添加することで、OKT3 blastのAnti-human CD3抗体及びAnti-human CD28抗体による再刺激を開始した。再刺激はDay 7まで実施したが、その期間中、適宜培地交換及びIL-15の添加を行った。

[0089] <4-5 OKT3 ACEフィーダー細胞の作製 (Day 7) >

上記4-4で作製したOKT3 blastに対して、上記4-2と同様のpeptivatorペプチドプールによるウイルスペプチドパルス及びUV照射を行ってOKT3 ACEフィーダー細胞とした。このOKT3 ACEフィーダー細胞を回収し、5 x 10⁶個を30 mL

の10 ng/mL human IL-7、5 ng/mL human IL-15及びArtificial serum Animal-free 2%含有ALyS705中に懸濁し、G-Rex 細胞培養プレート 6well (wilson wolf manufacturing corporation) に移した。

[0090] <4-6 CAR-T細胞の培養・増幅 (Day 7~14) >

上記4-3で電氣的導入した細胞全量を、上記4-5でOKT3 ACEフィーダー細胞が播種されたG-Rex 細胞培養プレート 6well に移し、Day 14までGMR, CAR-T細胞の培養・増幅を行ったが、その期間中、適宜培地交換、IL-7及びIL-15の添加を行った。発現プラスミドCAR 004を用いてPBMCへの電氣的導入操作及びT細胞の培養・増幅によって得られるGMR, CAR-T細胞を、CAR-T 004とした。

[0091] <4-7 GMR, CAR発現率の評価 (Day 14) >

Day 14まで培養・増幅したGMR, CAR-T細胞におけるGMR, CARの発現率をフローサイトメトリー解析により評価した。上記4-6の細胞培養懸濁液100 μ L を採取し、遠心分離した細胞にPE Anti-human GM-CSF抗体 (ミルテニーバイオテック) 5 μ L及びAPC Anti-human CD3抗体 (ミルテニーバイオテック) 5 μ Lを加えて懸濁し、4°C、遮光にて20分間抗体標識反応を行った。20分後、D-PBSで細胞を洗浄し、遠心分離により細胞を沈殿させ上清を除去した後、D-PBS適量に再懸濁したサンプルについてFACSCantoII (ベクトン・ディッキンソン) 及びFLOWJO (ベクトン・ディッキンソン) を用いて解析し、GM-CSF/CD3陽性を指標としてGMR, CARの発現率を測定した。

CAR-T 004のday 14における発現解析結果を図5に示す。GMR, CAR発現率は11.1%であった。

[0092] [実施例5 内因性の細胞を用いたGMR, CAR-T細胞の培養・増幅 (方法A)]

<5-1 PBMCの精製 (Day 0) >

実施例4と同一の健康成人ドナーから末梢血を採取し、D-PBS (富士フィルム和光純薬株式会社) で2倍に希釈した後、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) に希釈末梢血をSepMate-50 (STEMCELL Technologies) を用いて重層し、1200 x gで15分の遠心分離を行い、PBMCを分取した。分取したPBMCをD-PBSで2回洗浄し、遠心分離により精製した。精製したPBMCを、ベクターを電氣的導

入する細胞（5-3）及び内因性のCAR刺激用細胞（5-4及び5-5）としてそれぞれ使用した。

[0093] <5-2 精製したPBMCの分離（Day 0）>

上記5-1で精製したPBMCを24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレート（FALCON）に 20×10^6 個/ウェル/2 mLとなるようにD-PBSで懸濁し、播種した。播種した細胞を37℃、2時間CO₂インキュベーター内で静置させた後、培養上清とともに浮遊細胞を回収し、下記5-3の電氣的導入を実施した。

一方で、プレートに付着した細胞は、2mLの10 ng/mL human IL-7（ミルテニーバイオテック）、5 ng/mL human IL-15（ミルテニーバイオテック）及びArtificial serum Animal-free（株式会社細胞科学研究所）2%含有ALyS705（株式会社細胞科学研究所）で培養し、内因性のCAR刺激用細胞として下記5-4の操作に使用した。

[0094] <5-3 GMR, CAR発現ベクターとpiggyBacベクターの電氣的導入（Day 0）>

上記5-2で回収した浮遊細胞への遺伝子導入のために、CAR 004プラスミド及びpCMV-piggyBac (kan) プラスミドをそれぞれ7.5 µg添加した上で、Artificial serum Animal-free 2%含有ALyS705中に懸濁した。懸濁した細胞をNEPAキューベット電極2 mmギャップ（ネッパジーン株式会社）へセットし、遺伝子導入装置であるNEPA21（ネッパジーン株式会社）を用いて懸濁液の抵抗値を測定した。その際、メーカー推奨の適正範囲内の抵抗値（0.038～0.046 kΩ）になるようにArtificial serum Animal-free 2%含有ALyS705を用いて液量調節した。調節後、実施例4と同様の設定値で電氣的導入を実施した。

[0095] <5-4 遺伝子導入した細胞への初回CAR刺激と培養（Day 0～7）>

上記5-3で電氣的導入した細胞全量を、上記5-2で用意した内因性のCAR刺激用細胞が予め付着した24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレートへ移し、37℃のCO₂インキュベーター内で培養を開始した。プラスミドを添加せず、電氣的刺激を施したMock-T細胞を同様に培養した。7日間の培養期間中、適宜培地交換、IL-7及びIL-15の添加を行った。

[0096] <5-5 PBMCを用いたCAR刺激用細胞の培養（Day 0～7）>

上記5-1で精製したPBMCを、 5×10^6 個/ウェル/15 mLとなるように10 ng/mL human GM-CSF（ミルテニーバイオテック）及び10 ng/mL human IL-4（ミルテニーバイオテック）含有ALyS705で懸濁し、G-Rex 細胞培養プレート 6well（wilson wolf manufacturing corporation）に播種し、37°CのCO₂インキュベーター内で培養を開始した。7日間の培養期間中、適宜GM-CSF及びIL-4の添加を行った。

[0097] <5-6 遺伝子導入した細胞への2回目のCAR刺激と培養・増幅（Day 7～13）>

上記5-5で7日間培養したG-Rex 細胞培養プレート 6wellから上清を除き、30mLの10 ng/mL human IL-7、5 ng/mL human IL-15及びArtificial serum Animal-free 2%含有ALyS705を添加した。さらに、7日間24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレートで培養していた細胞全量をG-Rex 細胞培養プレート 6wellへ移すことで、遺伝子導入した細胞への2回目のCAR刺激を実施した。その後さらに6日間培養・増幅し、その期間中、適宜培地交換、IL-7及びIL-15の添加を行った。Day 13まで培養・増幅したGMR, CAR-T細胞におけるGMR, CARの発現率を以下の方法にて測定した。本実施例において内因性の細胞を用いてCAR刺激を施したGMR, CAR-T細胞の培養・増幅によって得られる、発現プラスミドCAR 004を用いたGMR, CAR-T細胞をCAR-T 004-Aとした。

[0098] <5-7 GMR, CAR発現率の評価（Day 13）>

Day 13まで培養・増幅したGMR, CAR-T細胞におけるGMR, CARの発現率をフローサイトメトリー解析により評価した。上記5-6の細胞培養懸濁液100 μ L を採取し、遠心分離した細胞にPE Anti-human GM-CSF抗体（ミルテニーバイオテック）5 μ L及びAPC anti-human CD3抗体（ミルテニーバイオテック）5 μ Lを加え懸濁し、4°C、遮光にて20分間抗体標識反応を行った。20分後、D-PBS適量で細胞を洗浄し、遠心分離により細胞を沈殿させ上清を除去した後、D-PBS適量に再懸濁したサンプルについてFACSCantoII（ベクトン・ディッキンソン）及びFLOWJO（ベクトン・ディッキンソン）を用いて解析し、GM-CSF/CD3陽性を指標としてGMR, CARの発現率を測定した。

[0099] CAR-T 004-Aのday 13における発現解析結果を図6に示す。GMR, CAR発現率は43.5%であり、Mock-T細胞における発現率0.88%と比較して高く、実施例4の結果と比較しても発現率は大幅に改善された。

[0100] [実施例6 内因性の細胞を用いた、GMR, CAR-T細胞の培養・増幅（方法B）]

<6-1 PBMCの精製（Day 0）>

実施例4及び5と同一の健康成人ドナーから末梢血を採取し、D-PBS（富士フィルム和光純薬株式会社）で2倍に希釈した後、Ficoll-Paque PLUS（GE Healthcare）に希釈末梢血をSepMate-50（STEMCELL Technologies）を用いて重層し、1200 x gで15分の遠心分離を行い、PBMCを分取した。分取したPBMCをD-PBSで2回洗浄し、遠心分離により精製した。精製したPBMCを、ベクターを電氣的導入する細胞（6-2）及び内因性のCAR刺激用細胞（6-3）としてそれぞれ使用した。

[0101] <6-2 GMR, CAR発現ベクターとpiggyBacベクターの電氣的導入と培養（Day 0～3）>

上記6-1で精製した 15×10^6 個のPBMCへの遺伝子導入のために、CAR 004プラスミド及びpCMV-piggyBac (kan) プラスミドをそれぞれ7.5 μ g添加した上で、Artificial serum Animal-free（株式会社細胞科学研究所）2%含有ALyS705（株式会社細胞科学研究所）中に懸濁した。懸濁した細胞をNEPAキューベット電極2 mmギャップ（ネッパジーン株式会社）へセットし、遺伝子導入装置であるNEPA21（ネッパジーン株式会社）を用いて懸濁液の抵抗値を測定した。その際、メーカー推奨の適正範囲内の抵抗値（0.038～0.046 k Ω ）になるようにArtificial serum Animal-free 2%含有ALyS705を用いて液量調節した。調節後、実施例4及び5と同様の設定値で電氣的導入を実施した。

[0102] 電氣的導入した細胞全量を2 mLの10 ng/mL human IL-7（ミルテニーバイオテック）、5 ng/mL human IL-15（ミルテニーバイオテック）及びArtificial serum Animal-free 2%含有ALyS705で懸濁し、24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレート（FALCON）に播種し、37℃のCO₂インキュベーター内で3日間

培養した。プラスミドを添加せず、電氣的刺激を施したMock-T細胞を同様に培養した。

[0103] <6-3 PBMCを用いたCAR刺激用細胞の培養 (Day 0~3) >

上記6-1で精製したPBMCを、 5×10^6 個/ウェル/15 mLとなるように10 ng/mL human GM-CSF (ミルテニーバイオテック) 及び10 ng/mL human IL-4 (ミルテニーバイオテック) 含有ALyS705で懸濁し、G-Rex 細胞培養プレート 6well (wilson wolf manufacturing corporation) に播種し、37°CのCO₂インキュベーター内で3日間培養した。

[0104] <6-4 遺伝子導入した細胞へのCAR初回刺激と培養・増幅 (Day 3~10) >

上記6-3で3日間培養したG-Rex 細胞培養プレート 6wellから上清を除き、30mLの10 ng/mL human IL-7、5 ng/mL human IL-15及びArtificial serum Animal-free 2%含有ALyS705を添加した。さらに、3日間24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレートで培養していた上記6-2の遺伝子導入細胞全量をG-Rex 細胞培養プレート 6wellへ移すことで、遺伝子導入した細胞へのCAR刺激を実施した。その後さらに7日間培養し、その期間中、適宜培地交換、IL-7及びIL-15の添加を行った。Day 10まで培養・増幅したGMR, CAR-T細胞におけるGMR, CARの発現率を以下の方法にて測定した。内因性の細胞を用い、かつ実施例5より簡便な方法でCAR刺激を施したGMR, CAR-T細胞の培養・増幅によって得られる、発現プラスミドCAR 004を用いたGMR, CAR-T細胞をCAR-T 004-Bとした。

[0105] <6-5 GMR, CAR発現率の評価 (Day 10) >

Day 10まで培養・増幅したGMR, CAR-T細胞におけるGMR, CARの発現率をフローサイトメトリー解析により評価した。上記6-4の細胞培養懸濁液100 μ L を採取し、遠心分離した細胞にPE Anti-human GM-CSF抗体 (ミルテニーバイオテック) 5 μ L及びAPC Anti-human CD3抗体 (ミルテニーバイオテック) 5 μ Lを加え懸濁し、4°C、遮光にて20分間抗体標識反応を行った。20分後、D-PBS適量で細胞を洗浄し、遠心分離により細胞を沈殿させ上清を除去した後、D-PBS適量に再懸濁したサンプルについてFACSCantoII(ベクトン・ディッキンソン

ン)及びFLOWJO (ベクトン・ディッキンソン)を用いて解析し、GM-CSF/CD3陽性を指標としてGMR, CARの発現率を測定した。

[0106] CAR-T 004-BのDay 10における発現解析結果を図7に示す。GMR, CAR発現率は37.9%であり、Mock-T細胞における発現率0.45%と比較して高く、実施例4の結果と比較しても発現率は大幅に改善された。また、方法Aよりも工程を簡略化し、培養日数も短縮しているが、同等の発現率を得ることができた。

[0107] [実施例7 GMR, CAR-T抗腫瘍細胞活性持続性評価]

養子免疫療法において効果が期待されるCAR-T細胞は、持続的な細胞傷害活性が要求される。したがって、実施例6で作製したCAR-T 004-Bを用いて抗腫瘍細胞活性の持続性を評価した。

[0108] Day10まで培養・増幅したCAR-T 004-Bの腫瘍細胞傷害活性の持続性を評価するため、長期間の腫瘍細胞との共培養試験を行った。具体的には、AML腫瘍細胞株THP-1細胞 (American Type Culture Collection) を 2.5×10^5 個/mLとなるように10%FBS (CORNING) 含有RPMI 1640 Medium, GlutaMAX Supplement (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で懸濁し、24ウェルトリートメント培養プレートに1 mL/ウェルで播種した。同様に、CAR-T 004-Bを 2.5×10^5 個/mLとなるように10%FBS含有RPMI 1640 Medium, GlutaMAX Supplement で懸濁し、予めTHP-1細胞が播種されている24ウェルトリートメント培養プレートに1 mL/ウェルで上から播種した。このようなウェルを複数用意し、腫瘍細胞との共培養を開始させた。

[0109] 共培養を開始して4日後、複数のウェルのうち、1ウェルだけウェル内の細胞を全て回収し、遠心分離した。遠心分離した細胞にAPC Anti-human CD3抗体 (ミルテニーバイオテック) $5 \mu\text{L}$ 及びPE Anti-human CD33抗体 (ミルテニーバイオテック) $5 \mu\text{L}$ を加え懸濁し、 4°C 、遮光にて20分間抗体標識反応を行った。20分後、D-PBS適量で細胞を洗浄し、遠心分離により細胞を沈殿させ上清を完全に除去した後、 $450 \mu\text{L}$ のD-PBSで再懸濁し、さらにCountBright absolute counting beads (インビトロジェン) を $50 \mu\text{L}$ 添加したサンプルについて、FACS Canto II (ベクトン・ディッキンソン) 及びFLOWJO (ベクトン

・ディッキンソン)を用いて解析し、カウンティングビーズをもとにCD3陽性 (CAR-T 004-B) 細胞数とCD33陽性 (腫瘍) 細胞数を評価した。

[0110] 共培養開始時と比較して腫瘍細胞が殺傷された (腫瘍細胞数が減少した) 場合、残りのウェルからそれぞれ上清を1 mL除き、10%FBS含有RPMI 1640 Medium, GlutaMAX Supplementで 2.5×10^5 個/mLに調製したTHP-1細胞を1 mL/ウェルで添加することで、新たな腫瘍細胞との共培養を開始させた。この一連の操作を培養期間4日または3日で繰り返し、共培養開始時と比較して腫瘍細胞数が増加した時点で共培養を終了することとした。

[0111] 図8に共培養を開始して4日、8日、12日、15日、19日、及び23日目における抗腫瘍細胞活性評価の結果を示す。本結果は、CAR-T 004-BがTHP-1細胞を複数回殺傷することを示しており、持続的に殺傷効果を有することが確認された。

[0112] [実施例8 内因性の細胞を用いた、GMR. CAR-T細胞の培養・増幅 (方法C)]
<8-1 PBMCの精製 (Day 0) >

実施例4、5及び6と同一の健康成人ドナーから末梢血を採取し、D-PBS (富士フィルム和光純薬株式会社) で2倍に希釈した後、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) に希釈末梢血をSepMate-50 (STEMCELL Technologies) を用いて重層し、 $1200 \times g$ で15分の遠心分離を行い、PBMCを分取した。分取したPBMCをD-PBSで2回洗浄し、遠心分離により精製した。精製したPBMCを、ベクターを電氣的導入する細胞 (8-2) 及び内因性のCAR刺激用細胞 (8-3) としてそれぞれ使用した。

[0113] <8-2 GMR. CAR発現ベクターとpiggyBacベクターの電氣的導入と培養 (Day 0 ~3) >

上記8-1で精製した 20×10^6 個のPBMCへの遺伝子導入のために、CAR 004プラスミド及びpCMV-piggyBac (kan) プラスミドをそれぞれ7.5 μg 添加した上で、Artificial serum Animal-free (株式会社細胞科学研究所) 5%含有ALyS705 (株式会社細胞科学研究所) 中に懸濁した。懸濁した細胞をNEPAキューベット電極2 mmギャップ (ネッパジーン株式会社) ヘセットし、遺伝子導入装置で

あるNEPA21（ネッパジーン株式会社）を用いて懸濁液の抵抗値を測定した。その際、メーカー推奨の適正範囲内の抵抗値（0.038～0.046 k Ω ）になるようにArtificial serum Animal-free 5%含有ALyS705を用いて液量調節した。調節後、実施例4、5及び6と同様の設定値で電氣的導入を実施した。

[0114] 電氣的導入した細胞全量を2 mLの10 ng/mL human IL-7（ミルテニーバイオテック）、5 ng/mL human IL-15（ミルテニーバイオテック）及びArtificial serum Animal-free 5%含有ALyS705で懸濁し、24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレート（FALCON）に播種し、37℃のCO₂インキュベーター内で3日間培養した。プラスミドを添加せず、電氣的刺激を施したMock-T細胞を同様に培養した。

[0115] <8-3 PBMCを用いたCAR刺激用細胞の培養（Day 0～3）>

上記8-1で精製したPBMCを、5 x 10⁶個/ウェル/15 mLとなるようにALyS705で懸濁し、G-Rex 細胞培養プレート 6well（wilson wolf manufacturing corporation）に播種し、37℃のCO₂インキュベーター内で3日間培養した。

[0116] <8-4 遺伝子導入した細胞への初回CAR刺激と培養・増幅（Day 3～11）>

上記8-3で3日間培養したG-Rex 細胞培養プレート 6wellから上清を除き、30mLの10 ng/mL human IL-7、5 ng/mL human IL-15及びArtificial serum Animal-free 5%含有ALyS705を添加した。さらに、3日間24ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレートで培養していた上記8-2の遺伝子導入細胞全量をG-Rex 細胞培養プレート 6wellへ移すことで、遺伝子導入した細胞へのCAR刺激を実施した。その後さらに8日間培養し、その期間中、適宜培地交換、IL-7及びIL-15の添加を行った。Day 11まで培養・増幅したGMR, CAR-T細胞におけるGMR, CARの発現率を以下の方法にて測定した。実施例6とは異なり、IL-4やGM-CSFといったサイトカインを添加せずに内因性の細胞を培養し、かつ実施例5より簡便な方法でCAR刺激を施したGMR, CAR-T細胞の培養・増幅によって得られる、発現プラスミドCAR 004を用いたGMR, CAR-T細胞をCAR-T 004-Cとした。

[0117] <8-5 GMR, CAR発現率の評価（Day 11）>

Day 11まで培養・増幅したGMR, CAR-T細胞におけるGMR, CARの発現率をフロ

ーサイトメトリ解析により評価した。上記8-4の細胞培養懸濁液100 μ L を採取し、遠心分離した細胞にPE Anti-human GM-CSF抗体（ミルテニーバイオテック）5 μ L及びAPC Anti-human CD3抗体（ミルテニーバイオテック）5 μ Lを加え懸濁し、4℃、遮光にて20分間抗体標識反応を行った。20分後、D-PBS適量で細胞を洗浄し、遠心分離により細胞を沈殿させ上清を除去した後、D-PBS適量に再懸濁したサンプルについてFACSCantoII（ベクトン・ディッキンソン）及びFLOWJO（ベクトン・ディッキンソン）を用いて解析し、GM-CSF/CD3陽性を指標としてGMR, CARの発現率を測定した。

[0118] CAR-T 004-CのDay 11における発現解析結果を図9に示す。GMR, CAR発現率は23.6%であり、Mock-T細胞における発現率0.81%と比較して高く、実施例4の結果と比較しても発現率は大幅に改善された。

[0119] [実施例9 GMR, CAR発現T細胞のフェノタイプ解析]

実施例5で作製したCAR-T 004-A及び実施例6で作製したCAR-T 004-BをDay 14まで培養してGMR, CAR-T細胞のフェノタイプを解析した。フェノタイプ解析することで、PD-1陽性率を指標にした疲弊率と、CD45RA/CCR7陽性率を指標にしたステムセルメモリー分画の割合を算出した。

[0120] 1×10^6 個の細胞を採取し、遠心分離した細胞を3%FBS（CORNING）含有D-PBS（富士フイルム和光純薬株式会社）100 μ Lに懸濁した。その後、5 μ Lのhuman BD Fc Block（ベクトン・ディッキンソン）を添加し、10分間氷上でインキュベートすることで、Fcレセプターのブロック処理を実施した。さらにBrilliant Stain Buffer（ベクトン・ディッキンソン）50 μ Lに、PE-Cy7 Anti-human CD45RA抗体（ベクトン・ディッキンソン）、BV421 Anti-human CCR7抗体（BioLegend）、AF647 Anti-human PD-1抗体（ベクトン・ディッキンソン）、及びPE Anti-human GM-CSF抗体（ミルテニーバイオテック）を5 μ Lずつ添加したものをブロッキング処理した細胞懸濁液へ添加し、4℃、遮光にて20分間抗体標識反応を行った。

上記と同様の要領で 1×10^6 個の細胞をPE-Cy7 Isotype control抗体（ベクトン・ディッキンソン）、AF647 Isotype control抗体（ベクトン・ディッキン

ソン)、BV421 Isotype control抗体(ベクトン・ディッキンソン)と反応させたものをアイソタイプコントロールとした。

[0121] 20分後、3%FBS含有D-PBS適量で細胞を洗浄し、遠心分離により細胞を沈殿させ上清を除去した後、3%FBS含有D-PBS適量に再懸濁したサンプルについて、FACSCelesta(ベクトン・ディッキンソン)及びFLOWJO(ベクトン・ディッキンソン)を用いて測定・解析し、PD-1陽性率(疲弊率)及びCD45RA/CCR7陽性率(ステムセルメモリー分画の割合)を評価した。

その結果、図10に示すように、CAR-T 004-A及びCAR-T 004-BのPD-1陽性率はそれぞれ4.2%、1.82%であり、CAR刺激しても疲弊した細胞の割合は少なかった。また、図11に示すように、CAR-T 004-A及びCAR-T 004-BのCD45RA/CCR7陽性率はそれぞれ34.0%及び30.7%であった。

産業上の利用可能性

[0122] 本発明により、養子免疫治療に使用することができるCARタンパク質を発現する遺伝子改変細胞を、ウイルスを使用せず、簡便な方法で作製することができ、従来の方法と比較してより安全でコストが低減された遺伝子改変細胞の作製方法が提供される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 以下のステップ：

a) 哺乳動物由来のT細胞を含む細胞集団にキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor : CAR) タンパク質をコードするポリヌクレオチドをトランスポゾン法により導入して遺伝子改変細胞集団を得るステップ；

b) 前記CARに結合するタンパク質を発現する該哺乳動物由来の内因性細胞集団を準備するステップ；及び

c) ステップ a) の遺伝子改変細胞集団とステップ b) の内因性細胞集団とを共培養するステップを含む、哺乳動物遺伝子改変細胞の作製方法。

[請求項2] 上記ステップ b) において、内因性細胞集団を1種または複数種のサイトカインの存在下で培養する、請求項 1 に記載の作製方法。

[請求項3] 上記ステップ b) におけるサイトカインがGM-CSF及び／又はIL-4である請求項 2 に記載の作製方法。

[請求項4] 上記ステップ c) を、1種または複数種のサイトカインの存在下で行う、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の作製方法。

[請求項5] 上記ステップ c) におけるサイトカインがIL-7及び／又はIL-15である請求項 4 に記載の作製方法。

[請求項6] 上記内因性細胞集団が、不活化処理を受けていないPBMCに由来する細胞集団である請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の作製方法。

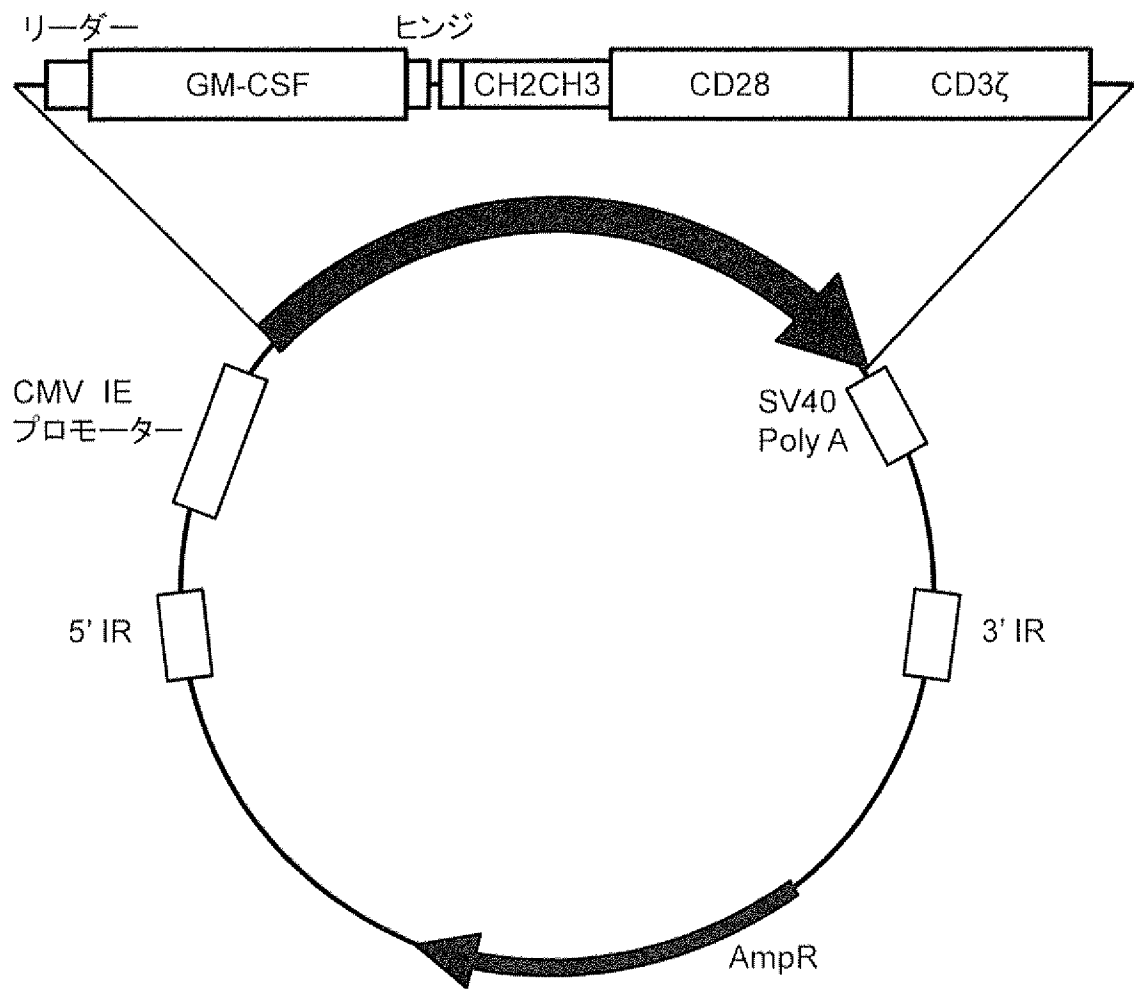
[請求項7] トランスポゾン法がpiggyBac法である請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の作製方法。

[請求項8] 遺伝子改変細胞集団と、内因性細胞集団が同一の個体に由来する、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の作製方法。

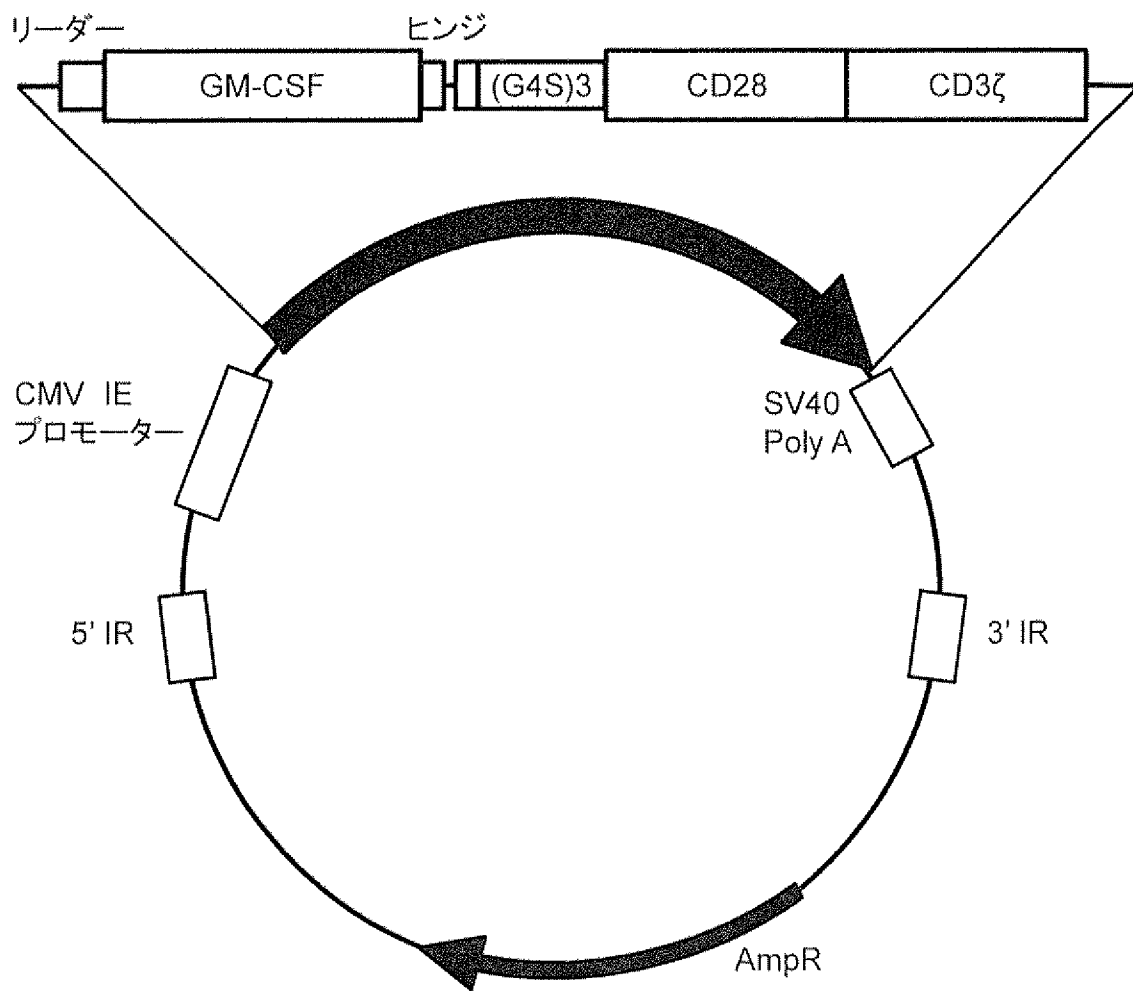
[請求項9] 上記CARタンパク質がヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 受容体に特異的な結合ドメインを含むタンパク質であり、上記内因性細胞集団がGM-CSF受容体発現細胞である、請求項 1 ～ 8 の

いずれか一項に記載の作製方法。

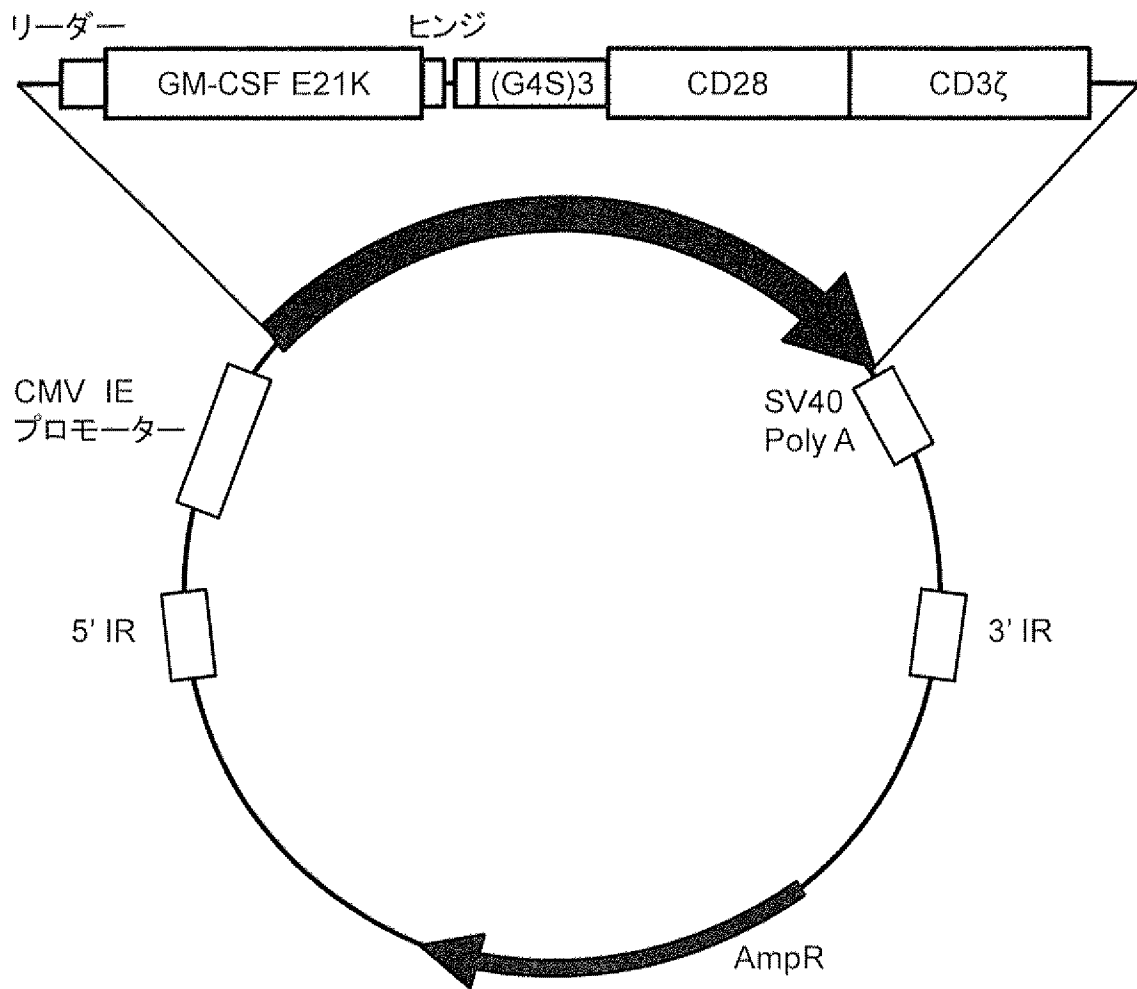
[図1]



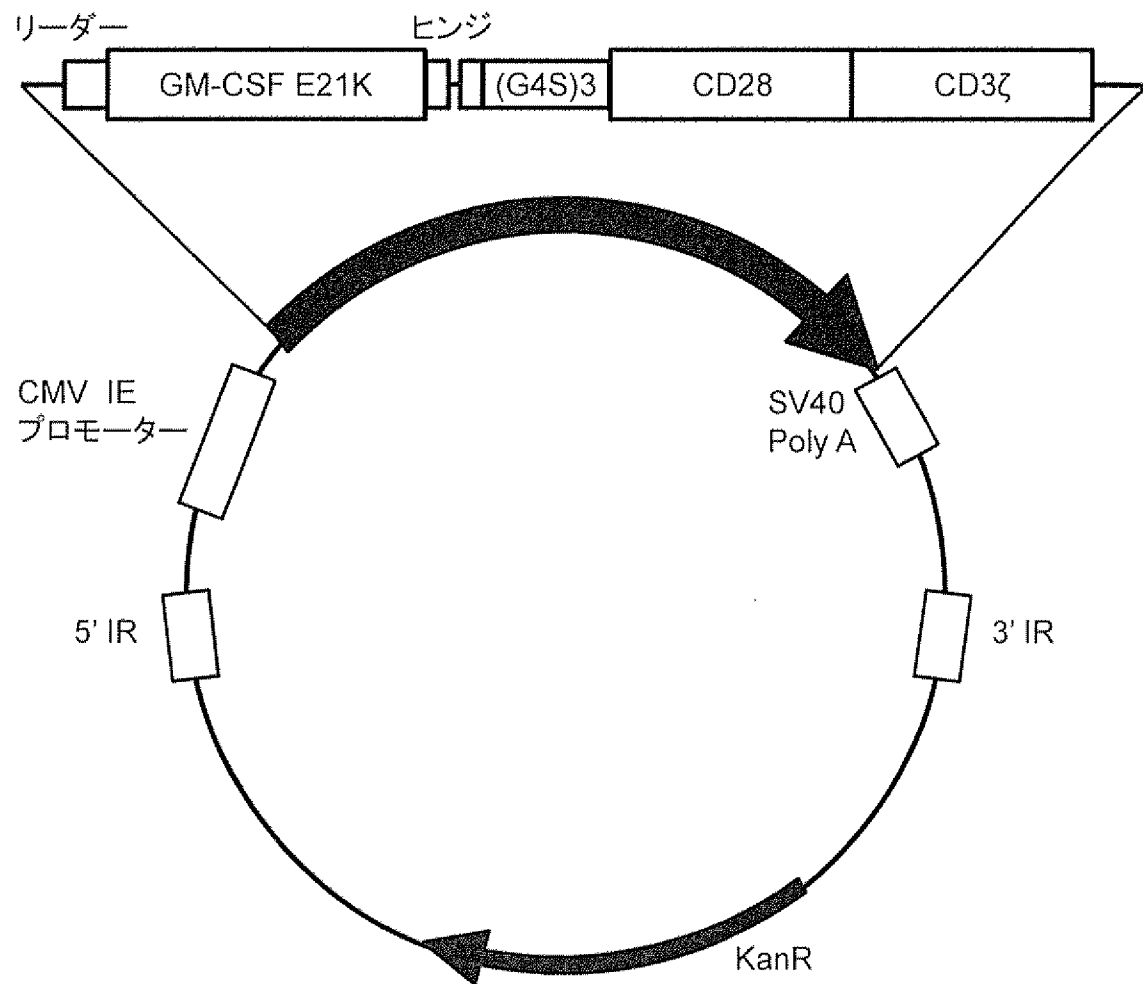
[図2]



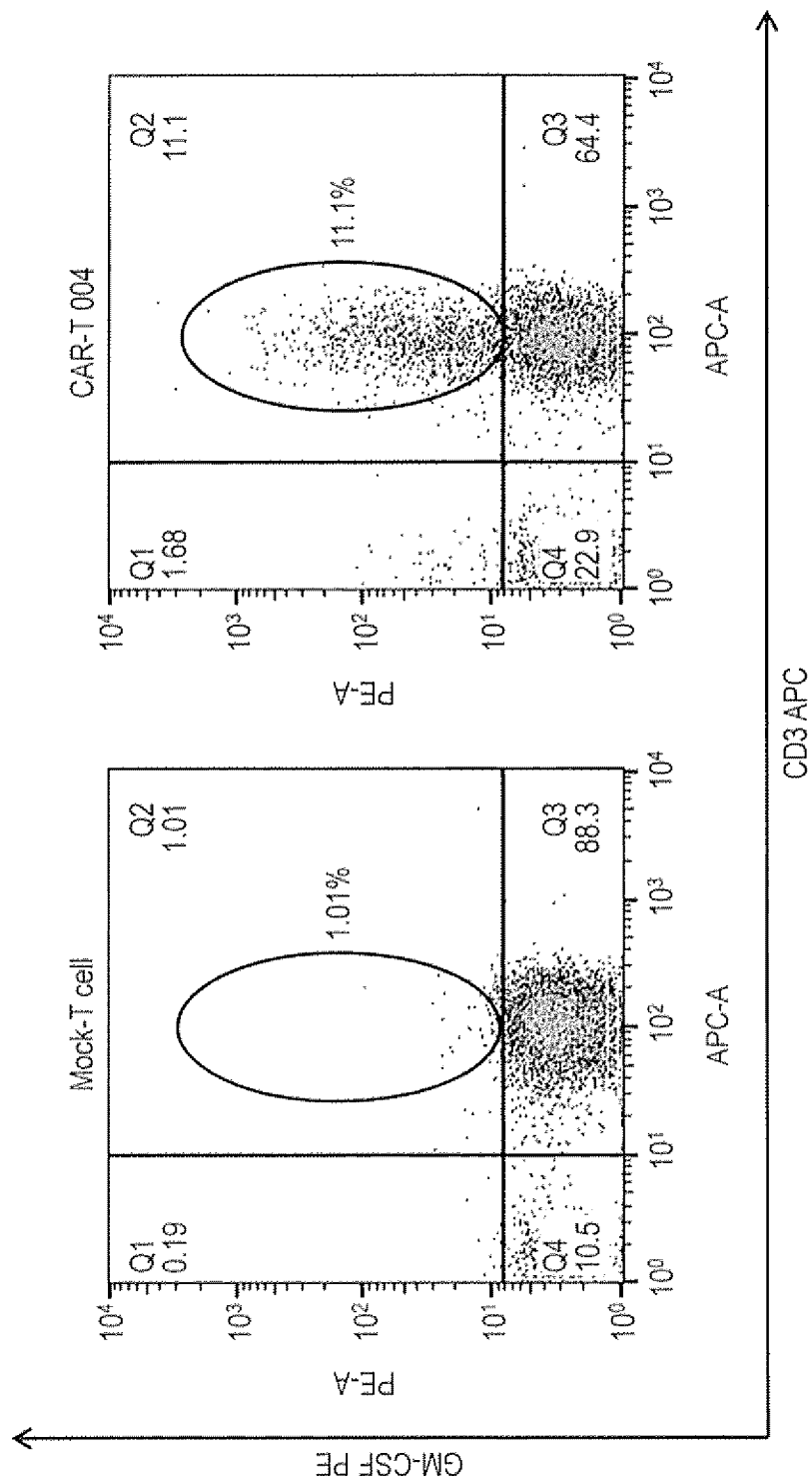
[図3]



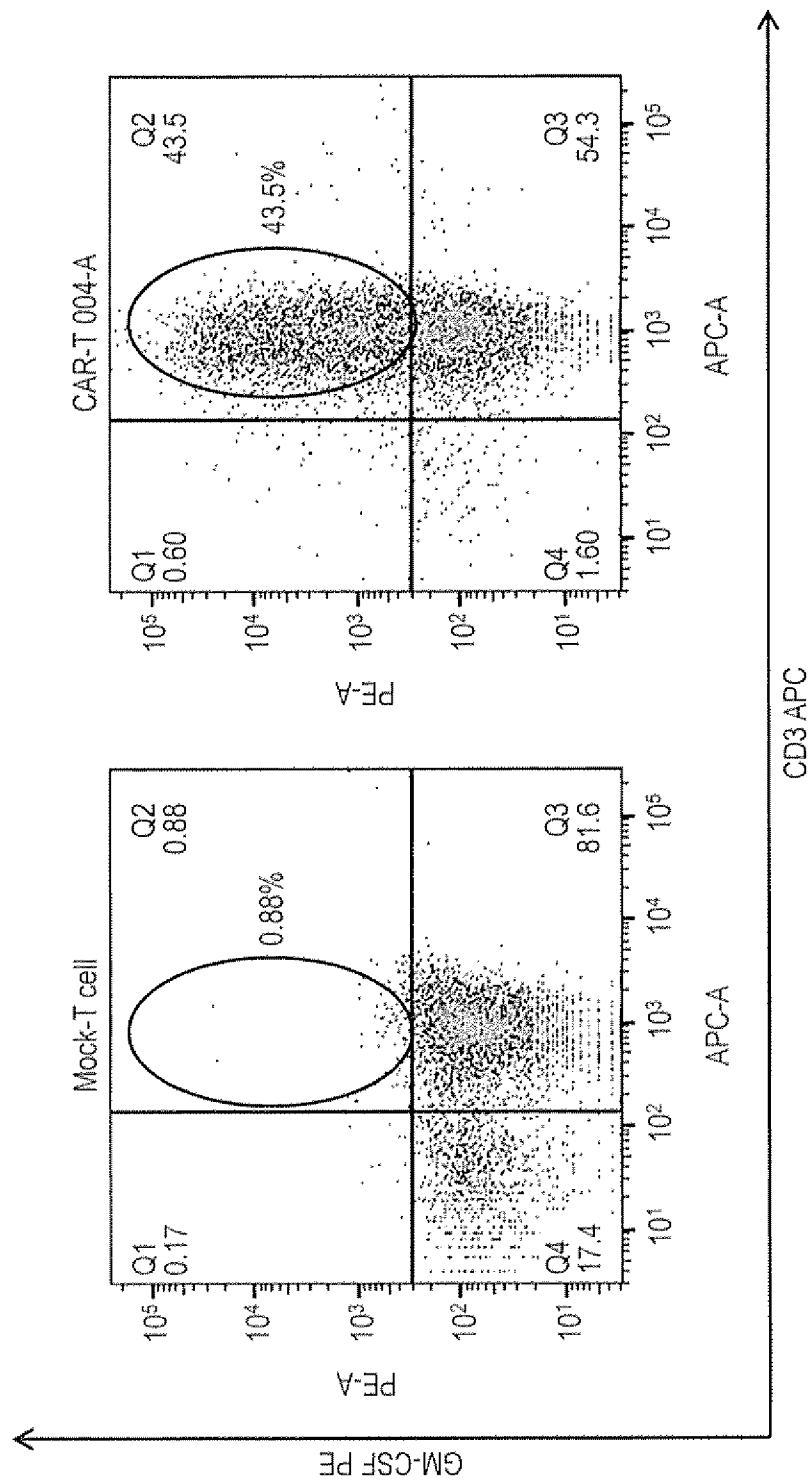
[図4]



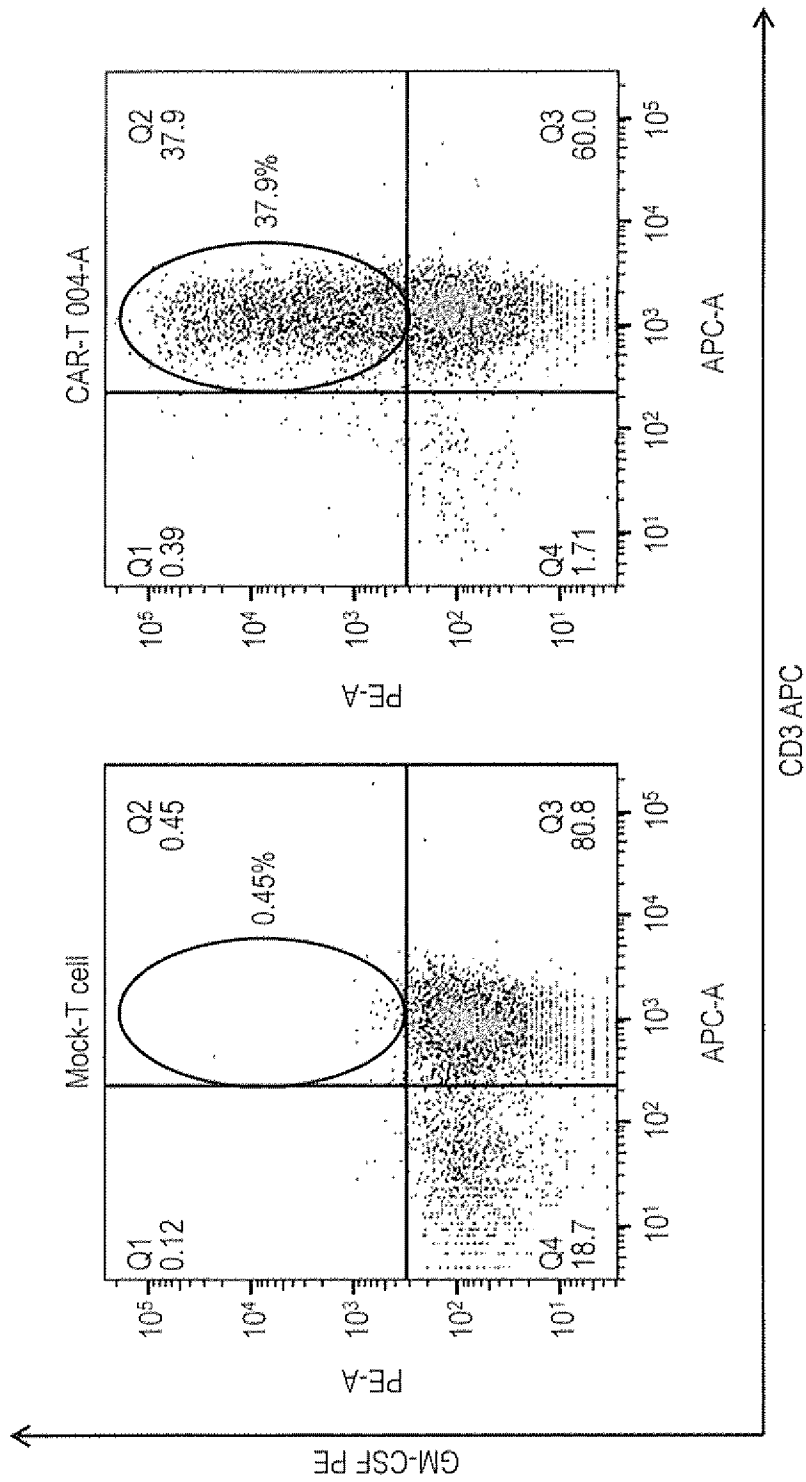
[図5]



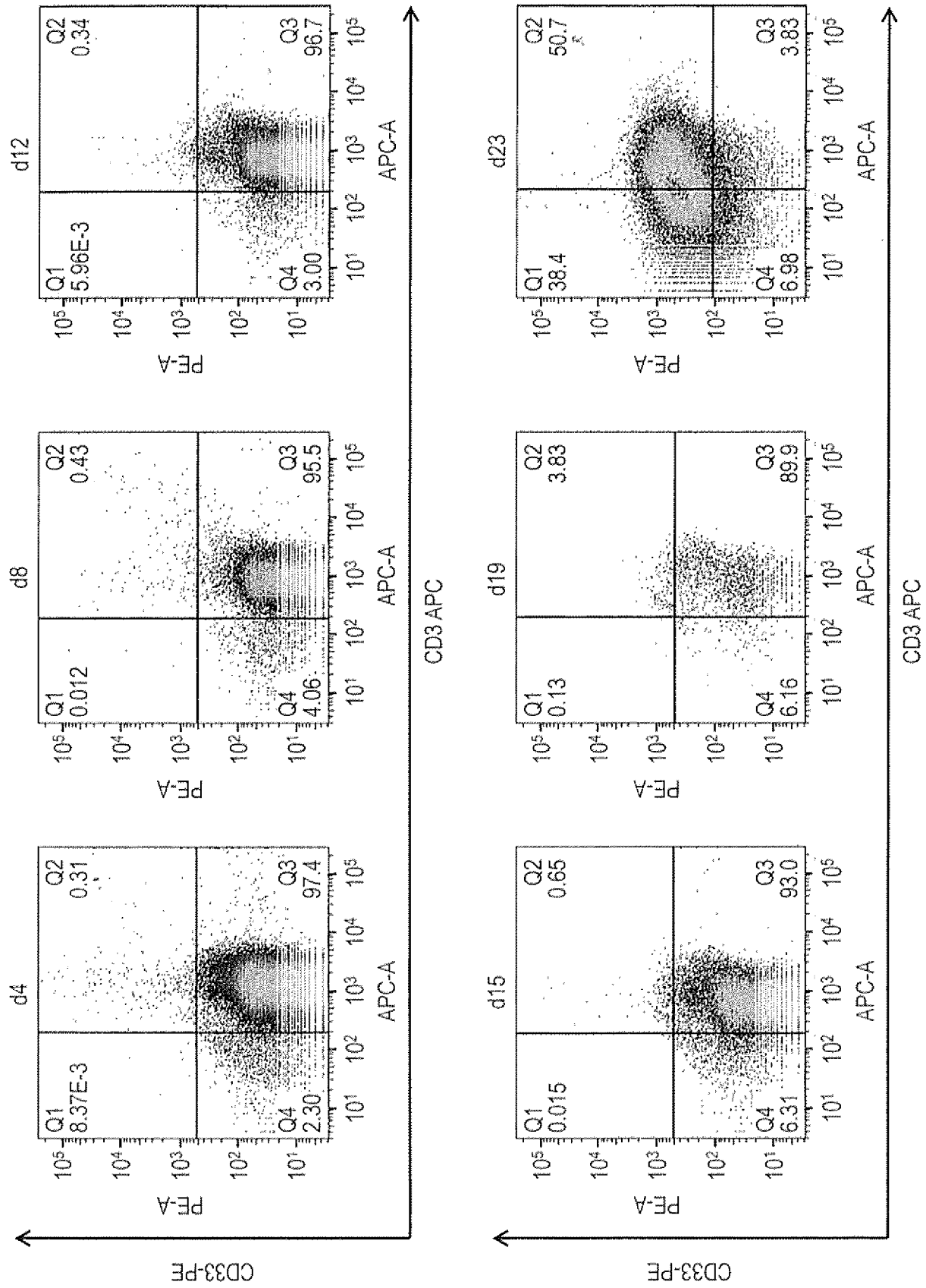
[図6]



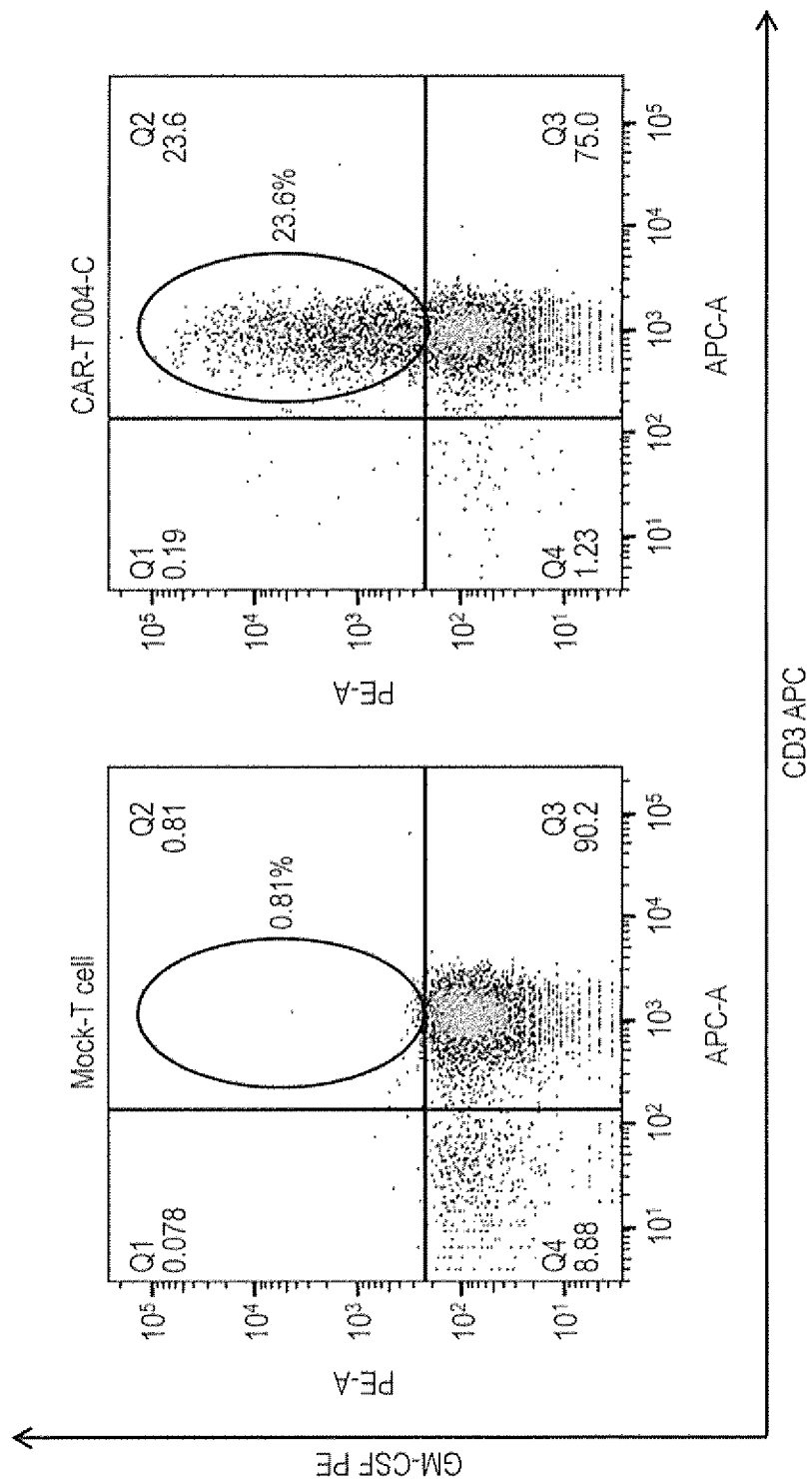
[図7]



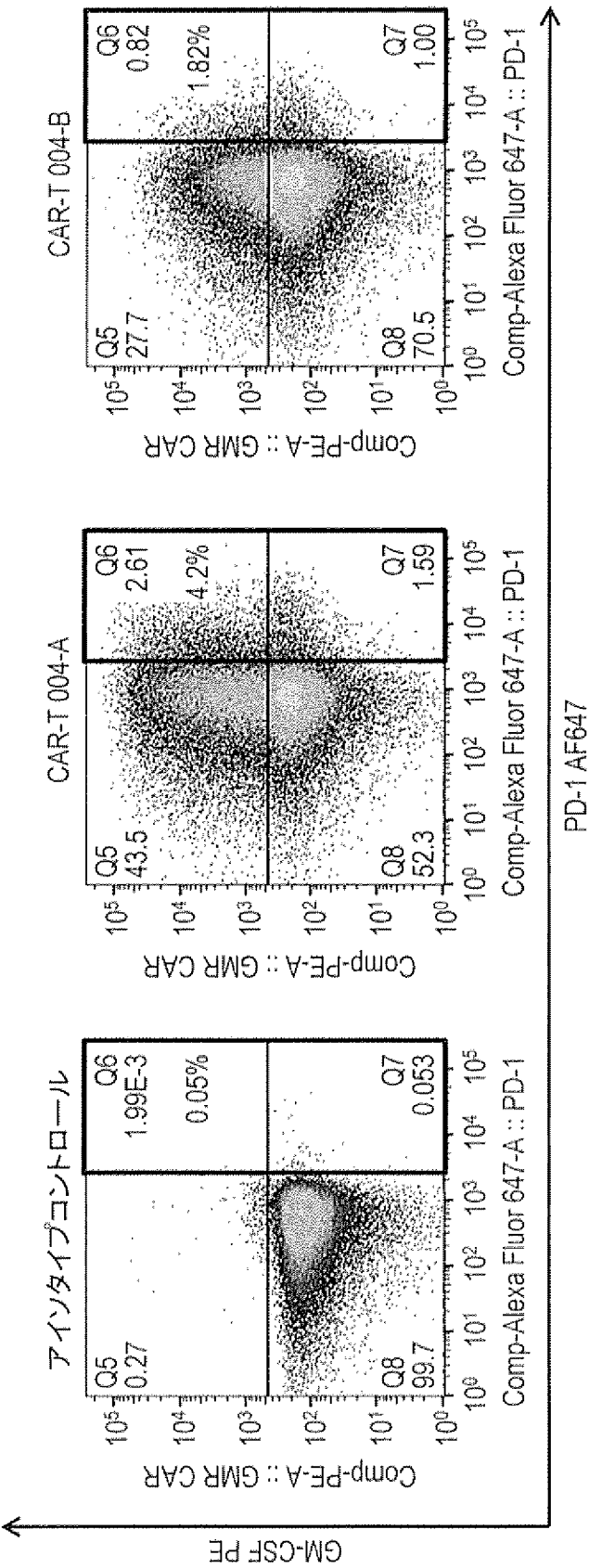
[図8]



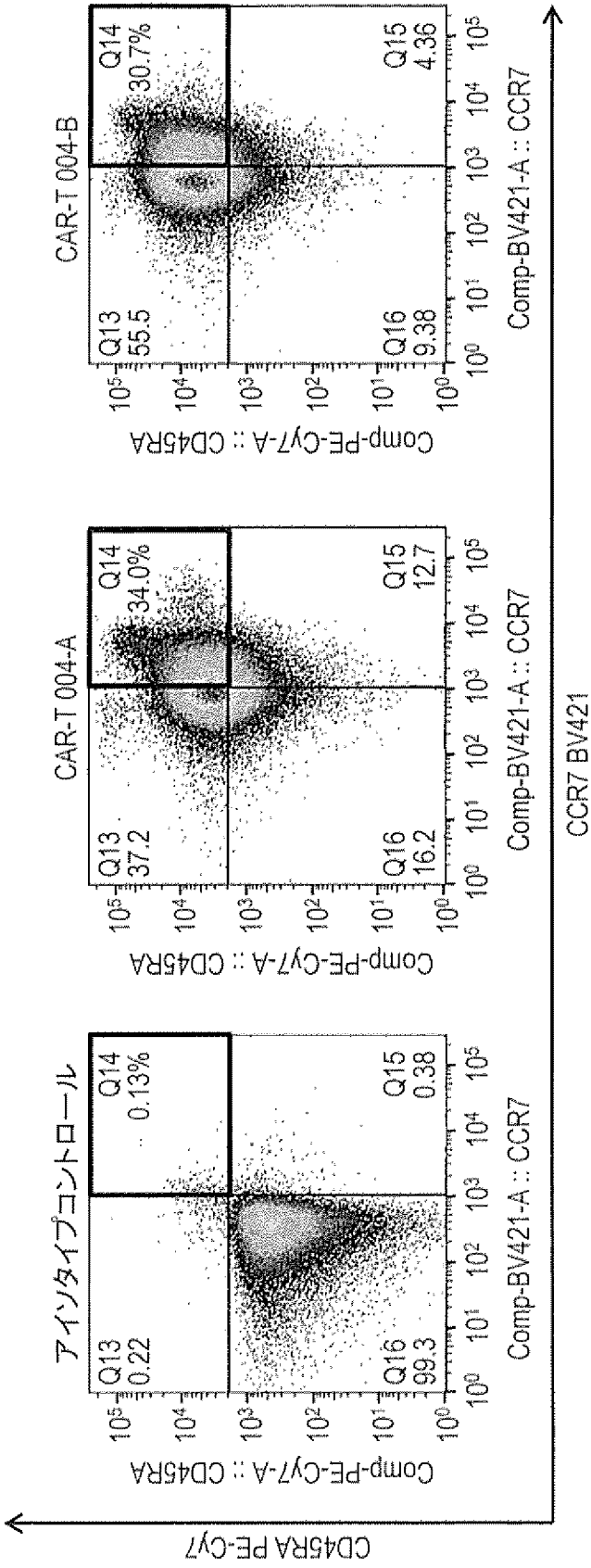
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/041878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/705(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i

FI: C12N5/10; C12N15/12 ZNA; C12N15/63; C07K14/705; C12N5/0783

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K14/705; C12N5/0783; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/63

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020

Registered utility model specifications of Japan 1996-2020

Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/061615 A1 (NAGOYA UNIVERSITY) 13.04.2017 (2017-04-13) claims 1-20, paragraph [0006], examples	1-9
Y	JP 2018-531014 A (THE UNITED STATES OF AMERICA) 25.10.2018 (2018-10-25) claims 1, 15, 18, paragraphs [0054], [0096], [0098], example 7	1-9
Y	WO 2017/079705 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 11.05.2017 (2017-05-11) claims 1, 29, examples 1, 3, paragraphs [0260], [0288]	1-9
Y	JP 2013-529061 A (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 18.07.2013 (2013-07-18) paragraphs [0164], [0165], [0174], [0189]-[0194]	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2020 (15.01.2020)

Date of mailing of the international search report

28 January 2020 (28.01.2020)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2019/041878

Patent referred in the Report	Documents in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017/061615 A1		13 Apr. 2017	US 2018/0289742 A claims 1-20, paragraph [0009], examples EP 3360961 A1	
JP 2018-531014 A		25 Oct. 2018	US 2019/0062426 A claims 1, 15, 22, paragraphs [0062], [0104], [0106], example 7 WO 2017/066122 A1 EP 33624 76 A1	
WO 2017/079705 A1		11 May 2017	JP 2018-532432 A claims 1, 29, examples 1, 3, paragraphs [0251], [0473] US 2018/0319862 A1 EP 3370762 A1	
JP 2013-529061 A		18 Jul. 2013	US 2013/0171152 A1 paragraphs [0185], [0187], [0198], [0225]-[0233] WO 2011/119979 A2 EP 2552959 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 14/705(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i FI: C12N5/10; C12N15/12 ZNA; C12N15/63; C07K14/705; C12N5/0783																	
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K14/705; C12N5/0783; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/63 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table> 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年																
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017/061615 A1 (国立大学法人名古屋大学) 13.04.2017 (2017 - 04 - 13) 請求項 1 - 20、[0006]、実施例</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2018-531014 A (アメリカ合衆国) 25.10.2018 (2018 - 10 - 25) 請求項 1, 15, 18, 段落 [0054], [0096], [0098], 実施例7</td> <td>1 - 9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017/079705 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 11.05.2017 (2017 - 05 - 11) 請求項 1, 29, 実施例 1, 3, [0260], [0288]</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2013-529061 A (メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター) 18.07.2013 (2013 - 07 - 18) 段落[0164], [0165], [0174], [0189]-[0194]</td> <td>1 - 9</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	WO 2017/061615 A1 (国立大学法人名古屋大学) 13.04.2017 (2017 - 04 - 13) 請求項 1 - 20、[0006]、実施例	1-9	Y	JP 2018-531014 A (アメリカ合衆国) 25.10.2018 (2018 - 10 - 25) 請求項 1, 15, 18, 段落 [0054], [0096], [0098], 実施例7	1 - 9	Y	WO 2017/079705 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 11.05.2017 (2017 - 05 - 11) 請求項 1, 29, 実施例 1, 3, [0260], [0288]	1-9	Y	JP 2013-529061 A (メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター) 18.07.2013 (2013 - 07 - 18) 段落[0164], [0165], [0174], [0189]-[0194]	1 - 9
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
Y	WO 2017/061615 A1 (国立大学法人名古屋大学) 13.04.2017 (2017 - 04 - 13) 請求項 1 - 20、[0006]、実施例	1-9															
Y	JP 2018-531014 A (アメリカ合衆国) 25.10.2018 (2018 - 10 - 25) 請求項 1, 15, 18, 段落 [0054], [0096], [0098], 実施例7	1 - 9															
Y	WO 2017/079705 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 11.05.2017 (2017 - 05 - 11) 請求項 1, 29, 実施例 1, 3, [0260], [0288]	1-9															
Y	JP 2013-529061 A (メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター) 18.07.2013 (2013 - 07 - 18) 段落[0164], [0165], [0174], [0189]-[0194]	1 - 9															
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																	
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献																	
国際調査を完了した日 15.01.2020		国際調査報告の発送日 28.01.2020															
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 濱田 光浩 4N 3763 電話番号 03-3581-1101 内線 3488															

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2019/041878

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2017/061615	A1	13.04.2017	US 2018/0289742 A 請求項 1 - 20、[0009]、実施例 EP 3360961 A1	
JP	2018-531014	A	25.10.2018	US 2019/0062426 A 請求項 1, 15, 22, 段落 [0062], [0104], [0106], 実施例 7 WO 2017/066122 A1 EP 3362476 A1	
WO	2017/079705	A1	11.05.2017	JP 2018-532432 A 請求項 1, 29, 実施例 1, 3, [0251], [473] US 2018/0319862 A1 EP 3370762 A1	
JP	2013-529061	A	18.07.2013	US 2013/0171152 A1 段落[0185], [0187], [0198], [0225]-[0233] WO 2011/119979 A2 EP 2552959 A1	