

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6463577号  
(P6463577)

(45) 発行日 平成31年2月6日(2019.2.6)

(24) 登録日 平成31年1月11日(2019.1.11)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 12 N 15/62	(2006.01)	C 12 N 15/62	Z
C 12 N 15/24	(2006.01)	C 12 N 15/24	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/10	Z NA
C 07 K 19/00	(2006.01)	C 07 K 19/00	
A 61 K 35/17	(2015.01)	A 61 K 35/17	Z

請求項の数 30 (全 122 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-514063 (P2016-514063)	(73) 特許権者	500039463 ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ ーシティ・オブ・テキサス・システム アメリカ合衆国 テキサス 78701, オースティン, ウエスト 7ティーエイチ ストリート 210
(86) (22) 出願日	平成26年5月14日(2014.5.14)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(65) 公表番号	特表2016-525881 (P2016-525881A)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(43) 公表日	平成28年9月1日(2016.9.1)	(72) 発明者	クーパー, ローレンス ジェイ. エヌ. アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブルバ ド 1515, ユニット 907
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/038005		
(87) 國際公開番号	W02014/186469		
(87) 國際公開日	平成26年11月20日(2014.11.20)		
審査請求日	平成29年4月17日(2017.4.17)		
(31) 優先権主張番号	61/823, 253		
(32) 優先日	平成25年5月14日(2013.5.14)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変キメラ抗原受容体(CAR) T細胞のヒト応用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

遺伝子操作細胞であって、

(a) キメラ抗原受容体(CAR)と;

(b) N末端からC末端へとIL-15およびIL-15Rを含む膜結合型融合タンパク質と

を含む、前記細胞。

## 【請求項2】

前記融合タンパク質が、配列番号6に少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む請求項1に記載の細胞。

10

## 【請求項3】

前記融合タンパク質が、配列番号6のアミノ酸配列を含む請求項2に記載の細胞。

## 【請求項4】

前記融合タンパク質が、配列番号7に少なくとも90%同一である配列を含むDNAによってコードされる請求項1に記載の細胞。

## 【請求項5】

前記融合タンパク質が、配列番号7の配列を含むDNAによってコードされる請求項4に記載の細胞。

## 【請求項6】

前記CARをコードするDNAを、前記細胞のゲノム中に組み込む請求項1に記載の細

20

胞。

【請求項 7】

前記融合タンパク質をコードするDNAが、染色体外ベクター中に含まれる請求項1に記載の細胞。

【請求項 8】

前記融合タンパク質をコードするDNAを、前記細胞のゲノム中に組み込む請求項1に記載の細胞。

【請求項 9】

治療を必要とするヒト対象においてがんを治療するための組成物であって、請求項1に記載の1つ以上の細胞を含む組成物。

10

【請求項 10】

前記細胞が、がん細胞抗原を標的にするCARを含む請求項9に記載の組成物。

【請求項 11】

前記対象が、以前に抗がん治療を経験している請求項10に記載の組成物。

【請求項 12】

前記対象が、寛解期である請求項11に記載の組成物。

【請求項 13】

前記対象が、前記がんの症状がないが、検出可能ながん細胞を含む請求項11に記載の組成物。

【請求項 14】

20

配列番号6に少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むIL-15, IL-15R融合タンパク質。

【請求項 15】

配列番号6のアミノ酸配列を含む請求項14に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

配列番号6に少なくとも90%同一であるIL-15, IL-15R融合タンパク質をコードするDNA配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 17】

配列番号7に少なくとも90%同一である配列を含む請求項16に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 18】

請求項16に記載のポリヌクレオチドを含む遺伝子操作細胞。

【請求項 19】

前記細胞が、T細胞、T前駆細胞、NK細胞またはAPCである請求項18に記載の細胞。

【請求項 20】

前記がん細胞抗原が、CD19、ROR1、CD56、EGFR、CD123、c-met、GDP2、HER2、CD20、MUC-1、CD23またはCD30である請求項10に記載の組成物。

【請求項 21】

40

前記がんが白血病または固形腫瘍である請求項10に記載の組成物。

【請求項 22】

前記融合タンパク質が前記IL-15とIL-15Rとを連結するリンカーをさらに含む請求項1に記載の細胞。

【請求項 23】

前記リンカーがセリン-グリシンリンカーをさらに含む請求項22に記載の細胞。

【請求項 24】

前記融合タンパク質が、IgEシグナルペプチドをさらに含む請求項1に記載の細胞。

【請求項 25】

DNAを含む遺伝子操作細胞であって、該DNAは、

50

(a) キメラ抗原受容体 (CAR) と;  
 (b) N末端からC末端へと IL-15 および IL-15R を含む膜結合型融合タンパク質と  
 をコードする、細胞。

## 【請求項 26】

トランスポゼースをさらに含む請求項 25 に記載の細胞。

## 【請求項 27】

前記トランスポゼースが、スリーピングビューティトランスポゼースである請求項 26 に記載の細胞。

## 【請求項 28】

前記トランスポゼースが、DNA 発現ベクターとして提供される請求項 26 に記載の細胞。

10

## 【請求項 29】

前記トランスポゼースが、スリーピングビューティトランスポゼースをコードする mRNA である請求項 26 に記載の細胞。

## 【請求項 30】

前記 mRNA は、キャップ、ポリ A 尾部またはその両方を含む請求項 29 に記載の細胞。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

20

## 【0001】

本願は、2013年5月14日出願の米国仮特許出願第 61/823,253 号の利益を主張するものであり、その全教示内容は、参照することで本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

本発明は、米国防総省により与えられた契約番号 W81XWH-11-1-0002-01 の下での政府支援に基づいて達成されたものである。米国政府は、本発明に一定の権利を有するものである。

## 配列表の組み込み

## 【0003】

37キロバイト (Microsoft Windows (登録商標) で測定したサイズ) であって 2014 年 5 月 14 日に作成された「UTFC.P1222WO\_ST25.txt」という名称のファイルに含まれる配列表は、電子申請により本願に添付して提出され、引用により本明細書に組み込まれる。

30

## 【背景技術】

## 【0004】

本発明は、広義には、医薬、免疫学、細胞生物学、及び分子生物学の分野に関する。ある態様では、本発明の分野は、免疫療法に関する。特に、本発明は、臨床等級キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞の作製及びそのような細胞を用いた治療法に関する。

遺伝子治療を免疫療法と組み合わせることで臨床等級 T 細胞の効力を改善し、(i) 腫瘍関連抗原 (TAA) の認識に優れた可能性、(ii) 注入後の持続性、(iii) 腫瘍部位に移動する可能性、及び(iv) 腫瘍微小環境内のエフェクター機能を再循環させる能力を持つ生物学的製剤を遺伝子操作することができる。遺伝子治療と免疫療法とのそのような併用により、B 細胞抗原に対する T 細胞の特異性を再指向することができ、B 細胞悪性腫瘍が進行した患者は、そのような腫瘍特異的 T 細胞の注入から恩恵を受ける (Jenala, 2010; Tilly, 2008; Porterら, 2011; Brentjensら, 2011; Cooper 及び Bolland, 2012; Kalosら, 2011; Kochenderferら, 2010; Kochenderferら, 2012; Brentjensら, 2013)。ヒト応用に設計された T 細胞の遺伝子操作のほとんどのアプローチは、キメラ抗原受容体 (CAR) の安定発現用のレトロウイルス及びレンチウイルスを使用してきた (Jenala, 2010; Ertlら, 2011; Kohnら 50

40

、2011）。このアプローチは、現行の医薬品製造管理及び品質管理基準（cGMP）に準拠しているが、限られた数の生産施設からの臨床等級組み換えウイルスの生産及びリースに依存しているため高価になり得る。血液悪性腫瘍及び固形腫瘍に対して特異性を持つ遺伝子組み換えされた臨床等級T細胞製品を生成するための新しい方法が必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Jena et al., Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 116:1035-1044, 2010. 10

【非特許文献2】Till et al., Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, 112:2261-2271, 2008.

【非特許文献3】Porter et al., Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 365:725-733, 2011. 20

【非特許文献4】Brentjens et al., 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.

【非特許文献5】Cooper and Bolland, Good T cells for bad B cells. *Blood*, 119:2700-2702, 2012. 30

【非特許文献6】Kalos et al., 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.

【非特許文献7】Kochenderfer et al., Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, 116:4099-4102, 2010. 40

【非特許文献8】Kochenderfer et al., B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 119:2709-2720, 2012.

【非特許文献9】Brentjens et al., Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory 50

B-cell leukemias. Blood, 118:4817-4828, 2011.

【非特許文献10】Ertl et al, Considerations for the clinical application of chimeric antigen receptor T cells: observations from a recombinant DNA Advisory Committee Symposium held June 15, 2010. Cancer Res., 71:3175-3181, 2011.

【非特許文献11】Kohn et al, CARs on track in the clinic. Mol. Ther., 19:432-438, 2011.

10

### 【発明の概要】

### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

第1の実施形態では、対象から（T細胞またはT前駆細胞を含む）細胞の試料を得ることと；細胞のゲノムに組み込むことが可能な、キメラT細胞受容体（CAR）をコードする核酸で細胞をトランスフェクトすることと；T細胞応答をもたらすために、対象にトランスジェニック細胞の有効量を投与することとを含む、疾患を有するヒト対象においてT細胞応答をもたらす方法を提供する。

#### 【0007】

従って、いくつかの態様では、実施形態の方法は、（a）対象から細胞の試料を得ることと、ここで、試料は、T細胞またはT前駆細胞を含む；（b）細胞を、トランスポゾンフランクキメラ抗原受容体（CAR）をコードするDNAとCARをコードするDNAを細胞のゲノム中に組み込むのに有効なトランスポゼースとでトランスフェクトし、トランスジェニックCAR発現T細胞の集団を提供することと；（c）必要に応じて、CAR発現T細胞の増殖を選択的に高める培地中でトランスジェニックCAR細胞の集団をex vivoにて培養することと、ここで、トランスジェニックCAR T細胞は培養され、仮にそうであったとしても、21日以下である；（d）T細胞応答をもたらすために、対象にトランスジェニックCAR細胞の有効量を投与することとを含む。従って、いくつかの態様では、トランスジェニックCAR細胞は、21日未満、例えば、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2日未満またはそれ未満でex vivoで培養される。ある態様では、CAR細胞は、3~5日以下でex vivoで培養される。さらに別の態様では、本方法の工程（a）~（d）（即ち、細胞試料を得ることからCAR T細胞を投与することまで）は、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以下で完了する。

20

#### 【0008】

別の態様では、実施形態による疾患を有するヒト対象においてT細胞応答をもたらす方法は、（a）対象から細胞の試料を得ることと、ここで、試料は、T細胞またはT前駆細胞を含み、対象から得た際に、約20~200mlの初期容量を有する；（b）細胞を、トランスポゾンフランクキメラ抗原受容体（CAR）をコードするDNAとCARをコードするDNAを細胞のゲノム中に組み込むのに有効なトランスポゼースとでトランスフェクトし、トランスジェニックCAR発現T細胞の集団を提供することと；（c）必要に応じて、CAR発現T細胞の増殖を選択的に高める培地中でトランスジェニックCAR細胞の集団をex vivoにて培養することと；（d）T細胞応答をもたらすために、対象にトランスジェニックCAR T細胞の有効量を投与することとを含む。例えば、対象からの細胞の試料は、約200ml未満の末梢血液または臍帯血の試料であってもよい。いくつかの態様では、試料は、アフェレーシスにより回収してもよい。しかしながら、ある好適な態様では、試料は、アフェレーシスを伴わない方法（例えば、静脈穿刺）により回収される。さらに別の態様では、細胞の試料は、約175、150、125、100、75、50、または25ml未満の初期容量を有する（例えば、細胞の試料は、対象から得

30

40

50

た際に、約 50 ~ 200 ml、50 ~ 100 ml、または 100 ~ 200 ml の初期容量を有する)。

#### 【0009】

別の実施形態では、HERV-K のエンベロープタンパク質を標的にする発現 CAR を含む単離トランスジェニック細胞を提供する。ある態様では、細胞は、細胞のゲノム中に組み込まれた CAR をコードする DNA (例えば、トランスポゾン反復配列によりフランクされた CAR DNA) を含む。例えば、CAR 配列は、モノクローナル抗体 6H5 の CDR 配列 (例えば、CDR 1 ~ 6) またはモノクローナル抗体 6H5 の scFv 配列を含み得る。いくつかの態様では、HERV-K 標的 CAR は、配列番号 4 のアミノ酸配列に少なくとも 85 % 同一である (例えば、配列番号 4 に少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 同一である配列)。ある態様では、実施形態の細胞 (例えば、ヒト HERV-K 標的 CAR 細胞) は、HERV-K 発現がんを有する対象の治療に用いることができる (または、対象において免疫応答をもたらす)。

#### 【0010】

さらに別の実施形態では、発現 CAR 及び発現膜結合型 IL-15 を含む単離トランスジェニック細胞を提供する。例えば、いくつかの態様では、膜結合型 IL-15 は、IL-15 と IL-15R との間の融合タンパク質を含む。さらに別の態様では、膜結合型 IL-15 は、配列番号 6 (本明細書において「mIL15」と呼ばれる) に少なくとも約 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。本明細書でさらに詳述されるように、場合によっては、膜結合型 IL-15 は、RNA または DNA (例えば、染色体外またはエピソームベクター) によりコードされる。ある態様では、細胞は、細胞のゲノム中に組み込まれた膜結合型 IL-15 をコードする DNA (例えば、トランスポゾン反復配列によりフランクされたコード DNA) を含む。ある態様では、実施形態の細胞 (例えば、膜結合型サイトカインを発現するヒト CAR 細胞) は、低レベルの標的抗原を有する対象、例えば、微小残存病変 (本明細書でさらに詳述される) を持つ対象の治療に用いることができる (対象において免疫応答をもたらす)。

#### 【0011】

いくつかの態様では、実施形態の方法は、キメラ T 細胞受容体 (CAR)、場合によっては、トランスポゼースをコードする DNA で細胞をトランスフェクトすることに関する。細胞をトランスフェクトする方法は、当業者には周知であるが、ある態様では、高効率のトランスフェクション方法、例えば、エレクトロポレーションを用いる。例えば、ヌクレオフェクション装置を用いて核酸を細胞に導入してもよい。好ましくは、トランスフェクション工程は、細胞を、遺伝毒性を引き起こす、及び / または、治療対象においてウイルス配列を含む細胞に対する免疫応答を引き起こす可能性のあるウイルスに感染または形質導入することを伴わない。

#### 【0012】

実施形態の別の態様は、CAR をコードする発現ベクターで細胞をトランスフェクトすることに関する。広範囲の CAR 構築物及びそれらの発現ベクターは、当該技術分野において周知であり、本明細書でさらに詳述される。例えば、いくつかの態様では、CAR 発現ベクターは、プラスミド、直鎖発現ベクター、またはエピソームなどの DNA 発現ベクターである。いくつかの態様では、ベクターは、付加配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリ A シグナル、及び / または 1 つ以上のイントロンなどの、CAR を促進する配列を含む。好適な態様では、CAR コード配列は、トランスポゼースの存在により、トランスフェクト細胞のゲノム中にコード配列を組み込むことができるよう、トランスポゾン配列によりフランクされる。

#### 【0013】

上で詳述したように、ある態様では、細胞は、トランスフェクト細胞のゲノム中に CAR コード配列の組み込みを促進するトランスポゼースでさらにトランスフェクトされる。

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、トランスポゼースは、DNA発現ベクターとして提供される。しかしながら、好適な態様では、トランスポゼースは、トランスポゼースの長期発現がトランスポゼニック細胞で起きないように、発現可能RNAまたはタンパク質として提供される。例えば、いくつかの態様では、トランスポゼースは、mRNA（例えば、キャップ及びポリA尾部を含むmRNA）として提供される。任意のトランスポゼース系を実施形態に従って使用してもよい。しかしながら、いくつかの態様では、トランスポゼースは、サケ科型Tc1様トランスポゼース（SB）である。例えば、トランスポゼースは、いわゆる「スリーピングビューティ」トランスポゼースであり得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,489,458号を参照されたい。ある態様では、トランスポゼースは、酵素活性が増した遺伝子操作酵素である。トランスポゼースのいくつかの具体例としては、限定的ではないが、SB10、SB11、またはSB100×トランスポゼースが挙げられる（例えば、参照により本明細書に組み込まれるMatesら、2009を参照されたい）。例えば、方法には、SB10、SB11、またはSB100×トランスポゼースをコードするmRNAを持つ細胞のエレクトロポレーションを伴い得る。

#### 【0014】

さらに別の態様では、実施形態のトランスポゼニックCAR細胞は、T細胞の増殖及び/または生存を刺激する膜結合型サイトカインを発現するための発現ベクターをさらに含む。特に、そのようなサイトカインを含むCAR細胞は、サイトカイン発現により提供されるシミュレーションにより、活性化及び増殖細胞（AAPC）または人工抗原提示細胞（aAPC）を有するex vivo培養をほとんどあるいは全くせずに増殖及び/または持続することができる。同様に、そのようなCAR細胞は、CARにより認識された多量の抗原が存在しない場合でも（例えば、寛解期のがん患者または微小残存病変を持つ患者の場合と同様）、in vivoで増殖することができる。いくつかの態様では、CAR細胞は、サイトカインの表面発現をもたらすために、Cサイトカイン及びエレメント（例えば、膜貫通領域）を発現するためのDNAまたはRNA発現ベクターを含む。例えば、CAR細胞は、膜結合型バージョンのIL-7、IL-15、またはIL-21を含み得る。いくつかの態様では、サイトカインは、サイトカインコード配列をサイトカインの受容体と融合させることで膜につながれる。例えば、細胞は、IL-15-IL-15R融合タンパク質（例えば、配列番号6の配列を含むタンパク質）を発現するためのベクターを含み得る。さらに別の態様では、膜結合型Cサイトカインをコードするベクターは、CAR細胞のゲノム中に組み込まれたベクターまたは染色体外ベクター（例えば、エピソームベクター）などのDNA発現ベクターである。さらに別の態様では、膜結合型Cサイトカインの発現は、プロモーター活性を誘導または抑制することでCAR細胞中のサイトカインの発現（かつ、それによるCAR細胞の増殖）を制御することができるよう、誘導性プロモーター（例えば、薬剤誘導性プロモーター）の制御下である。

#### 【0015】

実施形態の態様は、NK細胞、NKT細胞、T細胞、またはT前駆細胞を含む患者から試料を得ることに関する。例えば、場合によっては、試料は、臍帯血試料、末梢血液試料（例えば、単核球分画）、または多能性細胞を含む対象からの試料である。いくつかの態様では、対象からの試料を培養し、誘導多能性幹（iPS）細胞を生成することができ、これらの細胞は、NK細胞、NKT細胞、またはT細胞の作製に用いられる。細胞試料は、対象から直接培養してもよいし、あるいは使用前に凍結保存していくてもよい。いくつかの態様では、細胞試料を得ることは、細胞試料を回収することを含む。他の態様では、試料は、第三者により得られる。さらに別の態様では、対象からの試料を処理して、試料中のT細胞またはT前駆細胞を精製または濃縮することができる。例えば、試料を、勾配精製、細胞培養選択、及び/または細胞選別（例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）を介して）することができる。

#### 【0016】

いくつかの態様では、実施形態の方法は、抗原提示細胞を得ること、作製すること、または用いることをさらに含む。例えば、抗原提示細胞は、樹状細胞、活性化及び増殖細胞

10

20

30

40

50

(A a P C)、または不活性化(例えば、照射)人工抗原提示細胞(a A P C)であってもよい。そのようなa A P Cの作製方法は、当該技術分野において周知であり、本明細書でさらに詳述される。従って、いくつかの態様では、トランスジェニックC A R細胞は、C A R細胞集団を増殖させるために、限られた時間のあいだ *ex vivo*で不活性化a A P Cと共に培養される。C A R細胞をa A P Cと共に培養する工程は、例えば、インターロイキン-21(IL-21)及び/またはインターロイキン-2(IL-2)を含む培地で行ってもよい。いくつかの態様では、共培養することは、C A R細胞対不活性化a A P Cの比率が約10:1~約1:10; 約3:1~約1:5; または約1:1~約1:3で行われる。例えば、C A R細胞とa A P Cとの共培養は、約1:1、約1:2、または約1:3の比率であってもよい。

10

#### 【0017】

いくつかの態様では、A a P Cまたはa A P Cなどの、C A R細胞を培養するための細胞は、特異的ポリペプチドを発現するために遺伝子操作され、C A R細胞の増殖を高める。例えば、細胞は、(i)トランスジェニックC A R細胞上で発現したC A Rにより標的とされる抗原;(i i)CD64;(i i)CD86;(i i i)CD137L;及び/または(v)a A P Cの表面上で発現した膜結合型IL-15を含み得る。いくつかの態様では、A a P Cまたはa A P Cは、A a P Cまたはa A P Cの表面上で発現したC A R結合抗体またはその断片を含む。好ましくは、本方法で用いられるA a P Cまたはa A P Cは、感染性物質について試験し、該感染性物質を含まないことが確認され、及び/または、不活性化及び非増殖性について試験し、不活性化及び非増殖性であることが確認される。

20

#### 【0018】

A a P Cまたはa A P Cの増殖により培養中にC A R細胞の数または濃度を増すことができるが、この処理は、人手が掛かり、かつ高価である。さらに、いくつかの態様では、治療を必要とする対象には、できるだけ短時間でトランスジェニックC A R細胞を再注入すべきである。従って、いくつかの態様では、トランスジェニックC A R細胞を *ex vivo*培養すること(c)は、14日以下、7日以下、または3日以下である。例えば、*ex vivo*培養(例えば、A a P Cまたはa A P Cの存在下で培養)は、トランスジェニックC A R細胞の集団の1倍加未満で行ってもよい。さらに別の態様では、トランスジェニック細胞は、A a P Cまたはa A P Cの存在下で *ex vivo*培養されない。

30

#### 【0019】

さらに別の態様では、実施形態の方法は、細胞のトランスフェクション(工程(b))または細胞の *ex vivo*増殖(工程(c))の後にC A R発現T細胞の細胞集団を濃縮する工程を含む。例えば、濃縮工程は、例えば、C A RまたはC A R結合抗体に結合した抗原を用いた細胞の選別(例えば、F A C Sを介して)を含み得る。さらに別の態様では、濃縮工程は、非T細胞の枯渇またはC A R発現を欠いた細胞の枯渇を含む。例えば、CD56<sup>+</sup>細胞は、培養集団から枯渇してもよい。さらに別の態様では、C A R細胞の試料は、細胞を対象に投与する場合に保存される(または培養で維持される)。例えば、試料は、後々の増殖または分析用に凍結保存してもよい。

#### 【0020】

40

ある態様では、実施形態のトランスジェニックC A R細胞は、内因性T細胞受容体及び/または内因性H L Aを発現するために不活性化される。例えば、T細胞は、内因性/T細胞受容体(T C R)の発現を排除するために遺伝子操作してもよい。特定の実施形態では、C A R<sup>+</sup>T細胞は、T C Rの発現を排除するために遺伝子改変される。いくつかの態様では、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Z F N)を用いてC A R発現T細胞のT細胞受容体/鎖を破壊する。ある態様では、C A R発現T細胞のT細胞受容体鎖は、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いてノックアウトされる。

#### 【0021】

本明細書でさらに詳述されるように、実施形態のC A R細胞は、広範囲の疾患及び病態の治療に用いることができる。本質的に、特定の抗原の特異的発現または増強発現を伴う

50

任意の疾患は、CAR細胞を抗原に標的化することで治療することができる。例えば、自己免疫疾患、感染症、及びがんは、本発明の方法及び/または組成物で治療することができる。これらには、原発性がん、転移性がん、再発がん、治療に対して感受性のがん、治療に対して難治性のがん（例えば、化学療法難治性のがん）が含まれる。がんは、血液、肺、脳、結腸、前立腺、乳房、肝臓、腎臓、胃、頸部、卵巣、睾丸、下垂体、食道、脾臓、皮膚、骨など（例えば、B細胞リンパ腫または黒色腫）であってもよい。がん治療の場合、CAR細胞は通常、がん細胞抗原（腫瘍関連抗原（TAA）としても知られる）を標的にする。

#### 【0022】

さらに別の態様では、実施形態のトランスジェニックCAR細胞は、微小残存病変を有する対象（例えば、ごく少量のCAR標的抗原を有する対象）、例えば、明らかな寛解期にあるがん患者の治療に用いてもよい。新規の高感度診断技術を用いて、がん関連抗原（またはがん細胞）を、明らかながん症状を示さない患者で検出することができる。そのような患者は、抗原標的CAR細胞を用いて残存疾患を排除するために本方法により治療してもよい。好適な実施形態では、残存疾患を標的にするためのトランスジェニックCAR細胞は、これらの細胞が標的抗原に対して少量にもかかわらずin vivo増殖する能力を保持するため、膜結合型増殖性サイトカインの発現をさらに含む。

10

#### 【0023】

実施形態のプロセスを利用して、種々の腫瘍抗原（例えば、CD19、ROR1、CD56、EGFR、CD123、c-met、GD2）に対するCAR<sup>+</sup>T細胞を（例えば、臨床試験用に）製造することができる。この技術を用いて生成されたCAR<sup>+</sup>T細胞は、白血病（AML、ALL、CML）、感染症、及び/または固形腫瘍を持つ患者の治療に用いることができる。例えば、実施形態の方法は、細胞増殖性疾患、真菌病原体、ウイルス感染、細菌感染、または寄生感染の治療に用いることができる。標的となり得る病原体には、限定されるが、マラリア原虫、トリパノソーマ、アスペルギルス、カンジダ、HSV、RSV、EBV、CMV、JCウイルス、BKウイルス、またはエボラ病原体が挙げられる。実施形態のCAR細胞により標的とされ得る抗原のさらなる例としては、限定的ではないが、CD19、CD20、がん胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、CA-125、5T4、MUC-1、上皮腫瘍抗原、メラノーマ関連抗原、変異p53、変異ras、HER2/Neu、ERBB2、葉酸結合タンパク質、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp41、GD2、CD123、CD23, CD30、CD56、c-Met、メソテリン、GD3、HERV-K、IL-11R、鎖、鎖、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII、またはVEGFR2が挙げられる。ある態様では、実施形態の方法は、CD19またはHERV-K発現細胞を標的にすることに関する。例えば、HERV-K標的CAR細胞は、モノクローナル抗体6H5のscFv配列を含むCARを含み得る。さらに別の態様では、実施形態のCARは、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21などのサイトカインまたはその組み合わせと共にまたは融合することができる。

20

#### 【0024】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞集団から細胞の有効量を提供する工程を含む方法で、病状がある個体を、2回以上、いくつかの態様では、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、またはそれ以上の日にちを空けて治療することを提供する。特定の実施形態では、がんは、リンパ腫、白血病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、またはB細胞関連自己免疫疾患である。

30

#### 【0025】

さらに別の実施形態では、配列番号1に少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むCD19標的CARを含む単離または組み換えポリペプチドを提供する。関連する実施形態では、CD19標的CARをコードする（例えば、配列番号1に85%、9

40

50

0 %、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列をコードする)単離または組み換えポリスクレオチド配列を提供する。例えば、いくつかの態様では、ポリスクレオチド配列は、(CD-19標的CARをコードする)配列番号3、または(CD-19標的CAR、発現制御配列、及び隣接トランスポゾン反復をコードする)配列番号4に85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。さらに別の実施形態では、CD19標的CARをコードするポリペプチド及び/または実施形態のCD19標的CARをコードするポリスクレオチドを含む宿主細胞を提供する。例えば、宿主細胞は、T細胞またはT前駆細胞であり得る。好ましくは、宿主細胞は、ヒト細胞である。当業者であれば、上記のポリペプチド、ポリスクレオチド、または宿主細胞のいずれかを本明細書で詳述される方法に従って使用してもよいことが認識されるであろう。

#### 【0026】

さらに別の実施形態では、配列番号4に少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むHERV-K標的CARを含む単離または組み換えポリペプチドを提供する。関連する実施形態では、HERV-K標的CARをコードする(例えば、配列番号4に85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列をコードする)単離または組み換えポリスクレオチド配列を提供する。例えば、いくつかの態様では、ポリスクレオチド配列は、(HERV-K標的CAR、発現制御配列、及び隣接トランスポゾン反復をコードする)配列番号5に85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。さらに別の実施形態では、HERV-K標的CARをコードするポリペプチド及び/または実施形態のHERV-K標的CARをコードするポリスクレオチドを含む宿主細胞を提供する。例えば、宿主細胞は、T細胞またはT前駆細胞であり得る。好ましくは、宿主細胞は、ヒト細胞である。当業者であれば、上記のポリペプチド、ポリスクレオチド、または宿主細胞のいずれかを本明細書で詳述される方法に従って使用してもよいことが認識されるであろう。

#### 【0027】

さらに別の実施形態では、配列番号6に少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む膜結合型IL-15を含む単離または組み換えポリペプチドを提供する。関連する実施形態では、膜結合型IL-15をコードする(例えば、配列番号6に85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列をコードする)単離または組み換えポリスクレオチド配列を提供する。例えば、いくつかの態様では、ポリスクレオチド配列は、(膜結合型IL-15、発現制御配列、及び隣接トランスポゾン反復)配列番号7に85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。さらに別の実施形態では、膜結合型IL-15をコードするポリペプチド及び/または実施形態の膜結合型IL-15をコードするポリスクレオチドを含む宿主細胞を提供する。例えば、宿主細胞は、T細胞、T前駆細胞、またはaAPCであり得る。好ましくは、宿主細胞は、ヒト細胞である。当業者であれば、上記のポリペプチド、ポリスクレオチド、または宿主細胞のいずれかを本明細書で詳述される方法に従って使用してもよいことが認識されるであろう。

#### 【0028】

本明細書中で使用される場合、「a」または「a n」は1つ以上を意味し得る。特許請求の範囲において本明細書中で使用される場合、「を含む」という語と組み合わせて使用される場合、「a」または「a n」は、1であるかまたは1より大きいことを意味し得る。

#### 【0029】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物のみに言及することが

10

20

30

40

50

明確に示されない限りまたは代替物が相互に排他的でない限り、「及び／または」という意味のために使用されるが、本開示は、代替物のみ及び「及び／または」を指す定義を支持する。本明細書中で使用される場合、「別の」は、少なくとも2番目またはそれ以降を意味し得る。

【0030】

本出願を通じて、「約」という用語は、値が、値を測定するために使用される装置、方法に対する固有の誤差変動または研究対象物の間に存在する変動を含むことを指すために使用される。

【0031】

本発明のその他の目的、特性、及び長所は、以下の詳細な説明から明らかになろう。しかしながら、詳細な説明及び具体例は本発明の好ましい実施形態を示してはいるが、この詳細な説明から本発明の精神及び範囲内の様々な変更及び改変が当業者にとって明らかとなろうから、単なる例示に過ぎないことを理解されたい。

【0032】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、かつ本発明のある態様をさらに実証するために含まれる。本明細書中に提示される具体的な実施形態の詳細な説明と合わせてこれらの図面の1つ以上を参照することによって、本発明がより詳細に理解されよう。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

in vitro方法であって、

(a) 細胞の試料を対象から得ることと、ここで、前記試料は、T細胞またはT前駆細胞を含む；

(b) 前記細胞を、トランスポゾンフランクキメラ抗原受容体(CAR)をコードするDNAと前記CARをコードする前記DNAを前記細胞のゲノム中に組み込むのに有効なトランスポゼースとでトランスフェクトし、トランスジェニックCAR発現T細胞の集団を提供することと；

(c) 必要に応じて、CAR発現T細胞の増殖を選択的に高める培地中で前記トラン

スジェニックCAR細胞の集団をex vivoにて培養することと、ここで、前記トラン

スジェニックCAR T細胞は培養され、仮にそうであったとしても、18日以下である

、

を含む、前記方法。

(項目2)

in vitro方法であって、

(a) 細胞の試料を対象から得ることと、ここで、前記試料は、T細胞またはT前駆細胞を含み、前記対象から得た際に、約20~200mlの初期容量を有する；

(b) 前記細胞を、トランスポゾンフランクキメラ抗原受容体(CAR)をコードするDNAと前記CARをコードする前記DNAを前記細胞のゲノム中に組み込むのに有効なトランスポゼースとでトランスフェクトし、トランスジェニックCAR発現T細胞の集団を提供することと；

(c) 必要に応じて、CAR発現T細胞の増殖を選択的に高める培地中で前記トラン

スジェニックCAR細胞の集団をex vivoにて培養することと

を含む、前記方法。

(項目3)

工程(b)前に前記試料中のT細胞を精製または濃縮することをさらに含む項目1または2に記載の方法。

(項目4)

前記試料中のT細胞を濃縮することが、単核球分画を回収することを含む項目3に記載の方法。

(項目5)

前記トランスジェニックCAR T細胞が、14日以下で培養される項目1または2に

10

20

30

40

50

記載の方法。(項目 6 )

工程 ( a ) 乃至 ( c ) のプロセスが、18日以下で完了する項目1または2に記載の方法。

(項目 7 )

前記細胞試料が、前記対象から得た際に、約20～200mlの初期容量を有する項目1に記載の方法。

(項目 8 )

前記細胞試料が、前記対象から得た際に、約50～200ml、50～100ml、または100～200mlの初期容量を有する項目2または7に記載の方法。

10

(項目 9 )

前記細胞試料が、凍結保存試料である項目1または2に記載の方法。

(項目 10 )

前記細胞試料が、臍帯血由来である項目1または2に記載の方法。

(項目 11 )

前記細胞試料が、前記対象からの末梢血液試料である項目1または2に記載の方法。

(項目 12 )

前記細胞試料をアフェレーシスにより得た項目1または2に記載の方法。

(項目 13 )

前記細胞試料を静脈穿刺により得た項目1または2に記載の方法。

20

(項目 14 )

前記細胞試料が、T細胞の亜集団である項目1または2に記載の方法。

(項目 15 )

前記トランスジェニックCAR細胞が、内因性T細胞受容体及び/または内因性HLAを発現するために不活性化される項目1または2に記載の方法。

(項目 16 )

前記細胞試料を得ることが、前記細胞を第三者から得ることを含む項目1または2に記載の方法。

(項目 17 )

工程 ( b ) において、CARをコードするDNAを前記T細胞にエレクトロポレートすることを含む項目1または2に記載の方法。

30

(項目 18 )

工程 ( b ) において、前記細胞をウイルスに感染または該ウイルスで形質導入することを伴わない項目1または2に記載の方法。

(項目 19 )

前記細胞をトランスフェクトすることが、膜結合型Cサイトカインをコードする核酸で前記細胞をトランスフェクトすることをさらに含む項目1または2に記載の方法。

(項目 20 )

前記膜結合型Cサイトカインが、膜結合型のIL-7、IL-15、またはIL-21である項目19に記載の方法。

40

(項目 21 )

前記膜結合型Cサイトカインが、IL-15-IL-15R融合タンパク質である項目19に記載の方法。

(項目 22 )

CARをコードする前記DNAが、プラスミドである項目1または2に記載の方法。

(項目 23 )

前記トランスポゼースが、DNA発現ベクターとして提供される項目1または2に記載の方法。

(項目 24 )

前記トランスポゼースが、mRNAとして提供される項目1または2に記載の方法。

50

(項目 25)

前記mRNAが、キャップド及び／またはポリA尾部を含む項目24に記載の方法。

(項目 26)

前記トランスポゼースが、ポリペプチドまたは発現可能RNAとして提供される項目1または2に記載の方法。

(項目 27)

前記トランスポゼースが、サケ科型Tc1様トランスポゼース(SB)である項目1または2に記載の方法。

(項目 28)

前記トランスポゼースが、SB11またはSB100×トランスポゼースである項目27に記載の方法。

10

(項目 29)

前記トランスジェニックCAR細胞を培養すること(c)が、前記CAR発現T細胞の増殖を刺激する樹状細胞または人工抗原提示細胞(aAPC)の存在下で前記トランスジェニックCAR細胞を培養することを含み得る項目1または2に記載の方法。

(項目 30)

前記aAPCが、トランスジェニックK562細胞である項目29に記載の方法。

(項目 31)

前記aAPCが、(i)前記トランスジェニックCAR細胞上で発現した前記CARにより標的とされる抗原；(ii)CD64；(iii)CD86；(iii)CD137L；及び／または(v)前記aAPCの表面上で発現した膜結合型IL-15を含む項目29に記載の方法。

20

(項目 32)

前記aAPCが、前記aAPCの表面上で発現したCAR結合抗体またはその断片を含む項目29に記載の方法。

(項目 33)

前記aAPCが、T細胞を活性化または共刺激する付加分子を含む項目29に記載の方法。

(項目 34)

前記付加分子が、膜結合型C サイトカインを含む項目33に記載の方法。

30

(項目 35)

前記aAPCが不活性化される項目29に記載の方法。

(項目 36)

前記aAPCが照射される項目35に記載の方法。

(項目 37)

前記aAPCが、感染性物質について試験し、該感染性物質を含まないことが確認された項目29に記載の方法。

(項目 38)

aAPCの存在下で前記トランスジェニックCAR細胞を培養することが、IL-21及び／またはIL-2を含む培地中で前記トランスジェニックCAR細胞を培養することを含む項目29に記載の方法。

40

(項目 39)

aAPCの存在下で前記トランスジェニックCAR細胞を培養することが、約10：1～約1：10(aAPCに対するCAR細胞)の比率で前記細胞を培養することを含む項目29に記載の方法。

(項目 40)

前記トランスジェニック細胞を培養すること(c)が、7、14、21、28、35、または42日以下である項目1または2に記載の方法。

(項目 41)

前記トランスジェニック細胞を培養すること(c)が、前記トランスジェニックCAR

50

細胞の集団の 1 倍加未満をもたらす項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記トランスジェニック細胞を培養すること (c) が、前記トランスジェニック C A R 細胞の集団の少なくとも 1 倍加をもたらす項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記トランスジェニック細胞が、a A P C の存在下で e x v i v o 培養されない項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

工程 (b) または工程 (c) の後に C A R 発現 T 細胞の前記細胞集団を濃縮することをさらに含む項目 1 または 2 に記載の方法。

10

(項目 4 5)

前記濃縮することが、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) を含む項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記濃縮することが、C A R 発現細胞を選別することを含む項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記濃縮することが、常磁性粒子上で C A R 発現細胞を選別することを含む項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

C A R 発現細胞を選別することが、C A R 結合抗体の使用を含む項目 4 6 に記載の方法。

20

(項目 4 9)

前記濃縮することが、C D 5 6 + 細胞の枯渇を含む項目 4 4 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記トランスジェニック C A R 細胞の集団の試料を凍結保存することをさらに含む項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記 C A R が、がん細胞抗原を標的にする項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記がん細胞抗原が、C D 1 9、C D 2 0、R O R 1、C D 2 2 がん胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、C A - 1 2 5、5 T 4、M U C - 1、上皮腫瘍抗原、前立腺特異抗原、メラノーマ関連抗原、変異 p 5 3、変異 r a s、H E R 2 / N e u、葉酸結合タンパク質、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 1 2 0、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 4 1、G D 2、C D 1 2 3、C D 3 3、C D 1 3 8、C D 2 3、C D 3 0、C D 5 6、c - M e t、メソテリン、G D 3、H E R V - K、I L - 1 1 R 、鎖、鎖、C S P G 4、E R B B 2、E G F R v I I I 、V E G F R 2、H E R 2 - H E R 3 の組み合わせ、またはH E R 1 - H E R 2 の組み合わせである項目 5 1 に記載の方法。

30

(項目 5 3)

前記がん細胞抗原が、C D 1 9 であり、前記 C A R が、C D 1 9 標的 C A R である項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記 C A R が、配列番号 1 に少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む C D 1 9 標的 C A R である項目 5 3 に記載の方法。

40

(項目 5 5)

前記 C A R が、H E R V - K エンベロープタンパク質標的 C A R である項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記 C A R が、モノクローナル抗体 6 H 5 の s c F v 配列を含む項目 5 5 に記載の方法。

。

(項目 5 7)

前記 C A R が、病原体抗原を標的にする項目 1 または 2 に記載の方法。

50

(項目 5 8)

前記病原体が、真菌病原体、ウイルス性病原体、または細菌性病原体である項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記病原体が、マラリア原虫、トリパノソーマ、アスペルギルス、カンジダ、H S V、R S V、E B V、C M V、J C ウィルス、B K ウィルス、またはエボラ病原体である項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 0)

項目 1 または 2 に記載の方法により作製された T 細胞組成物。

(項目 6 1)

10

疾患を有するヒト対象において T 細胞応答をもたらす項目 6 0 に記載の組成物。

(項目 6 2)

前記疾患が、細胞増殖性疾患である項目 6 1 に記載の組成物。

(項目 6 3)

前記細胞増殖性疾患が、自己免疫疾患であり、前記 C A R が、前記自己免疫細胞を標的にする項目 6 1 に記載の組成物。

(項目 6 4)

前記細胞増殖性疾患が、がんであり、前記 C A R が、がん細胞抗原を標的にする項目 6 2 に記載の組成物。

(項目 6 5)

20

前記対象が、以前に抗がん治療を経験している項目 6 1 に記載の組成物。

(項目 6 6)

前記対象が、寛解期であるかまたは、前記対象が、前記がんの症状がないが、検出可能ながん細胞を含む項目 6 1 に記載の組成物。

(項目 6 7)

前記疾患が、病原体により引き起こされる感染性疾患であり、前記 C A R が、病原体抗原を標的にする項目 6 1 に記載の組成物。

(項目 6 8)

H E R V - K のエンベロープタンパク質を標的にする発現キメラ T 細胞受容体 ( C A R ) を含む単離トランスジェニック細胞。

30

(項目 6 9)

前記細胞が、ヒト細胞である項目 6 8 に記載の単離細胞。

(項目 7 0)

前記 C A R をコードする D N A を、前記細胞のゲノム中に組み込む項目 6 8 に記載の単離細胞。

(項目 7 1)

前記 C A R が、配列番号 4 に少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む項目 6 8 に記載の単離細胞。

(項目 7 2)

前記 C A R をコードする D N A が、トランスポゾン反復配列によりフランクされる項目 6 8 に記載の単離細胞。

40

(項目 7 3)

配列番号 5 に少なくとも約 9 0 % 同一である組み込み D N A 配列を含む項目 6 8 に記載の単離細胞。

(項目 7 4)

前記 C A R が、モノクローナル抗体 6 H 5 の C D R 配列を含む項目 6 8 に記載の単離細胞。

(項目 7 5)

前記 C A R が、モノクローナル抗体 6 H 5 の s c F v 配列を含む項目 7 3 に記載の単離細胞。

50

(項目 7 6)

前記 C A R が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む項目 7 3 に記載の単離細胞。

(項目 7 7)

前記対象に項目 6 8 に記載のトランスジェニック細胞の有効量を投与することを含む、疾患を有するヒト対象において T 細胞応答をもたらす方法。

(項目 7 8)

発現キメラ T 細胞受容体 ( C A R ) 及び発現膜結合型 I L - 1 5 を含む単離トランスジェニック細胞であって、

前記膜結合型 I L - 1 5 が、 I L - 1 5 と I L - 1 5 R との間の融合タンパク質を含む、前記単離トランスジェニック細胞。

10

(項目 7 9)

前記細胞が、ヒト細胞である項目 7 8 に記載の単離細胞。

(項目 8 0)

前記膜結合型 I L - 1 5 が、配列番号 6 に少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む項目 7 8 に記載の単離細胞。

(項目 8 1)

前記膜結合型 I L - 1 5 が、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む項目 8 0 に記載の単離細胞。

(項目 8 2)

配列番号 7 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリヌクレオチド配列を含む項目 7 8 に記載の単離細胞。

20

(項目 8 3)

配列番号 7 のポリヌクレオチド配列を含む項目 8 2 に記載の単離細胞。

(項目 8 4)

前記 C A R をコードする D N A を、前記細胞のゲノム中に組み込む項目 7 8 に記載の単離細胞。

(項目 8 5)

前記膜結合型 I L - 1 5 をコードする D N A が、染色体外要素を含む項目 7 8 に記載の単離細胞。

(項目 8 6)

30

前記膜結合型 I L - 1 5 をコードする D N A を、前記細胞のゲノム中に組み込む項目 7 8 に記載の単離細胞。

(項目 8 7)

前記対象に項目 7 8 に記載のトランスジェニック細胞の有効量を投与することを含む、疾患を有するヒト対象において T 細胞応答をもたらす方法。

(項目 8 8)

前記疾患が、がんであり、前記 C A R が、がん細胞抗原を標的にする項目 8 7 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記対象が、以前に抗がん治療を経験している項目 8 8 に記載の方法。

40

(項目 9 0)

前記対象が、寛解期である項目 8 9 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記対象が、前記がんの症状がないが、検出可能ながん細胞を含む項目 8 9 に記載の方法。

(項目 9 2)

配列番号 1 ; 配列番号 4 、または配列番号 6 に少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む組み換えポリペプチド。

(項目 9 3)

配列番号 1 に少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む C D 1 9 標的 C A R を含

50

む項目 9 2 に記載のポリペプチド。

(項目 9 4 )

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む項目 9 3 に記載のポリペプチド。

(項目 9 5 )

配列番号 4 に少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む H E R V - K 標的 C A R を含む項目 9 2 に記載のポリペプチド。

(項目 9 6 )

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む項目 9 5 に記載のポリペプチド。

(項目 9 7 )

配列番号 6 に少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む膜結合型 I L - 1 5 を含む項目 9 2 に記載のポリペプチド。

10

(項目 9 8 )

配列番号 6 のアミノ酸配列を含む項目 9 7 に記載のポリペプチド。

(項目 9 9 )

配列番号 1 ; 配列番号 4 、または配列番号 6 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

(項目 1 0 0 )

配列番号 2 ; 配列番号 3 ; 配列番号 5 、または配列番号 7 に少なくとも 9 0 % 同一である配列を含む項目 9 9 に記載のポリヌクレオチド。

20

(項目 1 0 1 )

項目 9 2 ~ 9 8 に記載のポリペプチドまたは項目 9 9 ~ 1 0 0 に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

(項目 1 0 2 )

前記細胞が、 T 細胞、 T 前駆細胞、または a A P C である項目 1 0 1 に記載の宿主細胞

。

(項目 1 0 3 )

疾患を有するヒト対象において T 細胞応答をもたらす方法であって、

( a ) 前記対象から細胞の試料を得ることと、ここで、前記試料は、 T 細胞または T 前駆細胞を含む；

( b ) 前記細胞を、トランスポゾンフランクキメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする D N A と前記 C A R をコードする前記 D N A を前記細胞のゲノム中に組み込むのに有効なトランスポゼースとでトランスフェクトし、トランスジェニック C A R 発現 T 細胞の集団を提供することと；

30

( c ) 必要に応じて、 C A R 発現 T 細胞の増殖を選択的に高める培地中で前記トランスジェニック C A R 細胞の集団を e x v i v o にて培養することと、ここで、前記トランスジェニック C A R T 細胞は培養され、仮にそうであったとしても、 1 8 日以下である；

( d ) T 細胞応答をもたらすために、前記対象に前記トランスジェニック C A R T 細胞の有効量を投与することと

を含む、前記方法。

40

(項目 1 0 4 )

疾患を有するヒト対象において T 細胞応答をもたらす方法であって、

( a ) 前記対象から細胞の試料を得ることと、ここで、前記試料は、 T 細胞または T 前駆細胞を含み、前記対象から得た際に、約 2 0 ~ 2 0 0 m l の初期容量を有する；

( b ) 前記細胞を、トランスポゾンフランクキメラ抗原受容体 ( C A R ) をコードする D N A と前記 C A R をコードする前記 D N A を前記細胞のゲノム中に組み込むのに有効なトランスポゼースとでトランスフェクトし、トランスジェニック C A R 発現 T 細胞の集団を提供することと；

( c ) 必要に応じて、 C A R 発現 T 細胞の増殖を選択的に高める培地中で前記トランスジェニック C A R 細胞の集団を e x v i v o にて培養することと；

50

(d) T細胞応答をもたらすために、前記対象に前記トランスジェニックCAR T細胞の有効量を投与することと  
を含む、前記方法。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】PB及びUCBからCAR<sup>+</sup>T細胞を電気穿孔し、増殖させるプロセスの概要を述べる工程である。

【図2A】図2。PBからの遺伝子改変T細胞の特性化。(A)遺伝子導入の効率を評価するため、第1の刺激サイクル0日目でのEGFPの発現(B)エレクトロポレーションからおよそ24時間後、(C)aAPC上で共培養してから28日後での、CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、及びCD4<sup>+</sup>T細胞上のフローサイトメトリーにより評価された際のCD19特異的CAR(CD19RC28)の発現。同様のCAR発現が、UCB由来T細胞で観察された。(D)CAR発現の動態。

【図2B-2C】図2。PBからの遺伝子改変T細胞の特性化。(A)遺伝子導入の効率を評価するため、第1の刺激サイクル0日目でのEGFPの発現(B)エレクトロポレーションからおよそ24時間後、(C)aAPC上で共培養してから28日後での、CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、及びCD4<sup>+</sup>T細胞上のフローサイトメトリーにより評価された際のCD19特異的CAR(CD19RC28)の発現。同様のCAR発現が、UCB由来T細胞で観察された。(D)CAR発現の動態。

【図2D】図2。PBからの遺伝子改変T細胞の特性化。(A)遺伝子導入の効率を評価するため、第1の刺激サイクル0日目でのEGFPの発現(B)エレクトロポレーションからおよそ24時間後、(C)aAPC上で共培養してから28日後での、CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、及びCD4<sup>+</sup>T細胞上のフローサイトメトリーにより評価された際のCD19特異的CAR(CD19RC28)の発現。同様のCAR発現が、UCB由来T細胞で観察された。(D)CAR発現の動態。

【図3】PB由来CAR<sup>+</sup>T細胞の増殖。組み換えヒト可溶性IL-2及びIL-21の存在下で、照射aAPC上での反復共培養によるPB由来のCD3<sup>+</sup>及びCAR<sup>+</sup>T細胞の数的増殖率。上向き矢印は、各刺激サイクルの開始を示す照射aAPCの追加を示す。UCB由来CAR<sup>+</sup>T細胞は、同様の数的増殖率を示す。

【図4】PB及びUCB由来のCAR<sup>+</sup>T細胞を遺伝的に改変し、増殖させるため、SB及びaAPC系を用いた製造プロセスの概略。CD19特異的CAR<sup>+</sup>T細胞は、組み換えヒト可溶性IL-2及びIL-21の存在下で、SB由来超らせんDNAプラスミドの電気導入及びそれに続くK562由来aAPC(クローン#4)上での共培養により生成された。

【図5A】図5。aAPCの採取及び特性化。(A、B)Sepax滅容。VueLifeバッグ中で増殖させたaAPCクローン#4を、Sepax IIのCS-490.1キットを用いて採取した。Sepax採取(S、n=4)をマニュアル(M、n=1)手順と比較した。平均のプロセス前後の細胞カウント(4.9×10<sup>8</sup>対5×10<sup>8</sup>)は、Sepaxシステムを用いて同様であった。(C)aAPC(クローン#4)の表現型。K562 aAPC及びK562親対照上でEGFP(mIL-15-EGFP)と共に発現させたCD19、CD64、CD86、CD137L、及び膜結合型バージョンのIL-15(改変IgG4 Fc領域に融合したペプチド)の発現を示すフローサイトメトリー分析。

【図5B】図5。aAPCの採取及び特性化。(A、B)Sepax滅容。VueLifeバッグ中で増殖させたaAPCクローン#4を、Sepax IIのCS-490.1キットを用いて採取した。Sepax採取(S、n=4)をマニュアル(M、n=1)手順と比較した。平均のプロセス前後の細胞カウント(4.9×10<sup>8</sup>対5×10<sup>8</sup>)は、Sepaxシステムを用いて同様であった。(C)aAPC(クローン#4)の表現型。K562 aAPC及びK562親対照上でEGFP(mIL-15-EGFP)と共に発現させたCD19、CD64、CD86、CD137L、及び膜結合型バージョンのIL

10

20

30

40

50

- 15 ( 改変 IgG4 Fc 領域に融合したペプチド ) の発現を示すフローサイトメトリー分析。

【図 5 C】図 5。 aAPC の採取及び特性化。(A、B) Sepax 減容。VueLife バッグ中で増殖させた aAPC クローン #4 を、Sepax II の CS-490.1 キットを用いて採取した。Sepax 採取 (S, n = 4) をマニュアル (M, n = 1) 手順と比較した。平均のプロセス前後の細胞カウント ( $4.9 \times 10^8$  対  $5 \times 10^8$ ) は、Sepax システムを用いて同様であった。(C) aAPC (クローン #4) の表現型。K562 aAPC 及び K562 親対照上で EGFP (mIL-15-EGFP) と共に発現させた CD19、CD64、CD86、CD137L、及び膜結合型バージョンの IL-15 (改変 IgG4 Fc 領域に融合したペプチド) の発現を示すフローサイトメトリー分析。  
10

【図 6】臨床等級 CD19 特異的 T 細胞を生成するプロセスの概略。MCB (PACT) 及び WCB (MDACC) を K562 由来 aAPC (クローン #4) に対して生成した。CAR<sup>+</sup> T 細胞を生成するために、aAPC をバッグ中で数値的に増殖させ、Sepax II システムを用いて採取し、照射 (100 Gy) し、後々の使用のために凍結保存した。CD19 特異的 T 細胞は、以下のように製造した; PBMC は、Sepax II システム及び凍結保存を用いて健常ドナーアフェレーシス製品から単離した。その後、PBMC を解凍し、SB-DNA プラスミド (CD19RCD28 CAR トランスポゾン、SB11 トランスポゼース) をヌクレオフェクター System を用いて電気穿孔し、サイトカイン (IL-2 及び IL-21) と共に、解凍した照射 aAPC 上で 28 日の培養期間にわたって共培養し、凍結保存した。  
20

【図 7 A】図 7。CAR<sup>+</sup> T 細胞の表現型。(A) エレクトロポレーションした次の日 (培養 1 日目) 及び CD19<sup>+</sup> aAPC が欠如した aAPC クローン #4 上で共培養してから 28 日後の T 細胞上の CD19RCD28 CAR の発現 (B) CD3 - 特異的抗体を用いたウエスタンプロット分析による CAR 発現。全細胞溶解物を還元条件下において SDS-PAGE でランした。分子量マーカー (M)、親 Jurkat 細胞 (レーン 1)、CD19RCD28<sup>+</sup> Jurkat 細胞 (レーン 2)、CAR<sup>neg</sup> 陰性対照一次 T 細胞 (レーン 3)、及び CD19RCD28<sup>+</sup> T 細胞 (レーン 4)。(C) 経時的な培養におけるリンパ球ゲート内の CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup>、及び CD8<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T 細胞の発現率。各記号は、別の実験を表し; 実線は、3 つの検証実験の平均である。(D) 共培養の最後 (d28) における CAR<sup>+</sup> T 細胞上のメモリー / ナイーブ、接着、活性化、細胞溶解、及び枯渇マーカーの免疫表現型。  
30

【図 7 B】図 7。CAR<sup>+</sup> T 細胞の表現型。(A) エレクトロポレーションした次の日 (培養 1 日目) 及び CD19<sup>+</sup> aAPC が欠如した aAPC クローン #4 上で共培養してから 28 日後の T 細胞上の CD19RCD28 CAR の発現 (B) CD3 - 特異的抗体を用いたウエスタンプロット分析による CAR 発現。全細胞溶解物を還元条件下において SDS-PAGE でランした。分子量マーカー (M)、親 Jurkat 細胞 (レーン 1)、CD19RCD28<sup>+</sup> Jurkat 細胞 (レーン 2)、CAR<sup>neg</sup> 陰性対照一次 T 細胞 (レーン 3)、及び CD19RCD28<sup>+</sup> T 細胞 (レーン 4)。(C) 経時的な培養におけるリンパ球ゲート内の CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup>、及び CD8<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T 細胞の発現率。各記号は、別の実験を表し; 実線は、3 つの検証実験の平均である。(D) 共培養の最後 (d28) における CAR<sup>+</sup> T 細胞上のメモリー / ナイーブ、接着、活性化、細胞溶解、及び枯渇マーカーの免疫表現型。  
40

【図 7 C】図 7。CAR<sup>+</sup> T 細胞の表現型。(A) エレクトロポレーションした次の日 (培養 1 日目) 及び CD19<sup>+</sup> aAPC が欠如した aAPC クローン #4 上で共培養してから 28 日後の T 細胞上の CD19RCD28 CAR の発現 (B) CD3 - 特異的抗体を用いたウエスタンプロット分析による CAR 発現。全細胞溶解物を還元条件下において SDS-PAGE でランした。分子量マーカー (M)、親 Jurkat 細胞 (レーン 1)、CD19RCD28<sup>+</sup> Jurkat 細胞 (レーン 2)、CAR<sup>neg</sup> 陰性対照一次 T 細胞 (レーン 3)、及び CD19RCD28<sup>+</sup> T 細胞 (レーン 4)。(C) 経時的な培養に  
50

おけるリンパ球ゲート内のCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>、及びCD8<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の発現率。各記号は、別の実験を表し；実線は、3つの検証実験の平均である。(D)共培養の最後(d28)におけるCAR<sup>+</sup>T細胞上のメモリー/ナイーブ、接着、活性化、細胞溶解、及び枯渇マーカーの免疫表現型。

【図7D】図7。CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型。(A)エレクトロポレーションした次の日(培養1日目)及びCD19<sup>+</sup>aAPCが欠如したaAPCクローン#4上で共培養してから28日後のT細胞上のCD19RC D28 CARの発現(B)CD3-特異的抗体を用いたウエスタンプロット分析によるCAR発現。全細胞溶解物を還元条件下においてSDS-PAGEでランした。分子量マーカー(M)、親Jurkat細胞(レーン1)、CD19RC D28<sup>+</sup>Jurkat細胞(レーン2)、CAR<sup>neg</sup>陰性対照一次T細胞(レーン3)、及びCD19RC D28<sup>+</sup>T細胞(レーン4)。(C)経時的な培養におけるリンパ球ゲート内のCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>、及びCD8<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の発現率。各記号は、別の実験を表し；実線は、3つの検証実験の平均である。(D)共培養の最後(d28)におけるCAR<sup>+</sup>T細胞上のメモリー/ナイーブ、接着、活性化、細胞溶解、及び枯渇マーカーの免疫表現型。

【図8A】図8。CAR<sup>+</sup>T細胞の増殖動態及び再指向特異性。遺伝子改変T細胞をaAPCクローン#4と28日間共培養した。各刺激サイクル(7日)の最後に、細胞を計数し、CAR及びCD3の発現用に染色した。3つの検証ラン(V1、V2、及びV3)を行い、グラフは、経時的に推定された(A)CAR<sup>+</sup>T細胞、(B)CD3<sup>+</sup>T細胞、(C)総生細胞を表す。矢印は、培養にaAPCを追加したことを示す。(D)CAR<sup>+</sup>T細胞による4時間クロム遊離アッセイを用いてCD19<sup>neg</sup>EL-4のバックグラウンド溶解と比較したCD19<sup>+</sup>標的(Daudi<sub>2m</sub>、NALM-6、CD19<sup>+</sup>EL-4)の溶解。3つの検証ランの平均±標準偏差を表す。

【図8B】図8。CAR<sup>+</sup>T細胞の増殖動態及び再指向特異性。遺伝子改変T細胞をaAPCクローン#4と28日間共培養した。各刺激サイクル(7日)の最後に、細胞を計数し、CAR及びCD3の発現用に染色した。3つの検証ラン(V1、V2、及びV3)を行い、グラフは、経時的に推定された(A)CAR<sup>+</sup>T細胞、(B)CD3<sup>+</sup>T細胞、(C)総生細胞を表す。矢印は、培養にaAPCを追加したことを示す。(D)CAR<sup>+</sup>T細胞による4時間クロム遊離アッセイを用いてCD19<sup>neg</sup>EL-4のバックグラウンド溶解と比較したCD19<sup>+</sup>標的(Daudi<sub>2m</sub>、NALM-6、CD19<sup>+</sup>EL-4)の溶解。3つの検証ランの平均±標準偏差を表す。

【図8C】図8。CAR<sup>+</sup>T細胞の増殖動態及び再指向特異性。遺伝子改変T細胞をaAPCクローン#4と28日間共培養した。各刺激サイクル(7日)の最後に、細胞を計数し、CAR及びCD3の発現用に染色した。3つの検証ラン(V1、V2、及びV3)を行い、グラフは、経時的に推定された(A)CAR<sup>+</sup>T細胞、(B)CD3<sup>+</sup>T細胞、(C)総生細胞を表す。矢印は、培養にaAPCを追加したことを示す。(D)CAR<sup>+</sup>T細胞による4時間クロム遊離アッセイを用いてCD19<sup>neg</sup>EL-4のバックグラウンド溶解と比較したCD19<sup>+</sup>標的(Daudi<sub>2m</sub>、NALM-6、CD19<sup>+</sup>EL-4)の溶解。3つの検証ランの平均±標準偏差を表す。

【図8D】図8。CAR<sup>+</sup>T細胞の増殖動態及び再指向特異性。遺伝子改変T細胞をaAPCクローン#4と28日間共培養した。各刺激サイクル(7日)の最後に、細胞を計数し、CAR及びCD3の発現用に染色した。3つの検証ラン(V1、V2、及びV3)を行い、グラフは、経時的に推定された(A)CAR<sup>+</sup>T細胞、(B)CD3<sup>+</sup>T細胞、(C)総生細胞を表す。矢印は、培養にaAPCを追加したことを示す。(D)CAR<sup>+</sup>T細胞による4時間クロム遊離アッセイを用いてCD19<sup>neg</sup>EL-4のバックグラウンド溶解と比較したCD19<sup>+</sup>標的(Daudi<sub>2m</sub>、NALM-6、CD19<sup>+</sup>EL-4)の溶解。3つの検証ランの平均±標準偏差を表す。

【図9A】図9。SB系に関連する安全性プロフィール。(A)蛍光in situハイブリダイゼーション及びフローサイトメトリー(Flow-FISH)アッセイを用いて細胞のテロメア長を測定した。28日目の主要T細胞集団(V1及びV2、CD8<sup>+</sup>T細

10

20

30

40

50

胞 ; V 3、 CD 4<sup>+</sup> T 細胞 ) を 0 日目からの T 細胞のミルテニーカラム精製サブセットとそれぞれ比較した。 ( B ) CD 19 R C D 2 8 CAR に特異的なプライマー及びプローブを用いて、 28 日目の CAR<sup>+</sup> T 細胞からのゲノム DNA を増殖させた。 CD 19 R C D 2 8 CAR 形質導入 Jurkat 細胞を用いて、 CD 19 R C D 2 8 標的コピー数の相対量 ( R Q ) 分析を判断した。これは、参考として FISH 分析から 1 ゲノム当たり CD 19 R C D 2 8 CAR 及び正規化群として内因性 RNase P が 1 つ組み込まっていることが知られている。 ( C ) 28 日目及び 35 日目の CAR<sup>+</sup> T 細胞の TCR V 分析。データは、 0 日目の非操作対照と比較した CAR<sup>+</sup> T 細胞の 3 つの検証ランの平均 ± 標準偏差を示す。 ( D ) SB 11 トランスポゼース組み込みの欠如を示すゲノム PCR 。 SB 11 または GAPDH プライマーを用いてゲノム DNA ( 20 ng ) を増殖させた。 SB 11 プライマーを用いて増殖させた CAR 陰性対照 T 細胞 ( レーン 5 ) 及び CAR<sup>+</sup> T 細胞 ( レーン 7 ) ; GAPDH プライマーを用いて増殖させた CAR 陰性対照 T 細胞 ( レーン 6 ) 、 CAR<sup>+</sup> T 細胞 ( レーン 8 ) 、及び SB 11 を安定的に発現する Jurkat ( レーン 4 ) 。 SB 11 プライマーを用いて増殖させた、 SB 11 を安定的に発現する Jurkat ( Jurkat / SB 11 - IRES2 - EGFP ) ( レーン 3 ) 及び線状化プラスミドである pKan - CMV - SB 11 ( レーン 2 ) を陽性対照として用いた。 ( E ) 3 つの検証ランからの CAR<sup>+</sup> T 細胞の G バンド核型の構造的または数値変化は全くない。検証 2 からの代表的な展開を示す。

【図 9 B】図 9。 SB 系に関連する安全性プロフィール。 ( A ) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション及びフローサイトメトリー ( Flow - FISH ) アッセイを用いて細胞のテロメア長を測定した。 28 日目の主要 T 細胞集団 ( V 1 及び V 2 、 CD 8<sup>+</sup> T 細胞 ; V 3、 CD 4<sup>+</sup> T 細胞 ) を 0 日目からの T 細胞のミルテニーカラム精製サブセットとそれぞれ比較した。 ( B ) CD 19 R C D 2 8 CAR に特異的なプライマー及びプローブを用いて、 28 日目の CAR<sup>+</sup> T 細胞からのゲノム DNA を増殖させた。 CD 19 R C D 2 8 CAR 形質導入 Jurkat 細胞を用いて、 CD 19 R C D 2 8 標的コピー数の相対量 ( R Q ) 分析を判断した。これは、参考として FISH 分析から 1 ゲノム当たり CD 19 R C D 2 8 CAR 及び正規化群として内因性 RNase P が 1 つ組み込まっていることが知られている。 ( C ) 28 日目及び 35 日目の CAR<sup>+</sup> T 細胞の TCR V 分析。データは、 0 日目の非操作対照と比較した CAR<sup>+</sup> T 細胞の 3 つの検証ランの平均 ± 標準偏差を示す。 ( D ) SB 11 トランスポゼース組み込みの欠如を示すゲノム PCR 。 SB 11 または GAPDH プライマーを用いてゲノム DNA ( 20 ng ) を増殖させた。 SB 11 プライマーを用いて増殖させた CAR 陰性対照 T 細胞 ( レーン 5 ) 及び CAR<sup>+</sup> T 細胞 ( レーン 7 ) ; GAPDH プライマーを用いて増殖させた CAR 陰性対照 T 細胞 ( レーン 6 ) 、 CAR<sup>+</sup> T 細胞 ( レーン 8 ) 、及び SB 11 を安定的に発現する Jurkat ( レーン 4 ) 。 SB 11 プライマーを用いて増殖させた、 SB 11 を安定的に発現する Jurkat ( Jurkat / SB 11 - IRES2 - EGFP ) ( レーン 3 ) 及び線状化プラスミドである pKan - CMV - SB 11 ( レーン 2 ) を陽性対照として用いた。 ( E ) 3 つの検証ランからの CAR<sup>+</sup> T 細胞の G バンド核型の構造的または数値変化は全くない。検証 2 からの代表的な展開を示す。

【図 9 C】図 9。 SB 系に関連する安全性プロフィール。 ( A ) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション及びフローサイトメトリー ( Flow - FISH ) アッセイを用いて細胞のテロメア長を測定した。 28 日目の主要 T 細胞集団 ( V 1 及び V 2 、 CD 8<sup>+</sup> T 細胞 ; V 3、 CD 4<sup>+</sup> T 細胞 ) を 0 日目からの T 細胞のミルテニーカラム精製サブセットとそれぞれ比較した。 ( B ) CD 19 R C D 2 8 CAR に特異的なプライマー及びプローブを用いて、 28 日目の CAR<sup>+</sup> T 細胞からのゲノム DNA を増殖させた。 CD 19 R C D 2 8 CAR 形質導入 Jurkat 細胞を用いて、 CD 19 R C D 2 8 標的コピー数の相対量 ( R Q ) 分析を判断した。これは、参考として FISH 分析から 1 ゲノム当たり CD 19 R C D 2 8 CAR 及び正規化群として内因性 RNase P が 1 つ組み込まっていることが知られている。 ( C ) 28 日目及び 35 日目の CAR<sup>+</sup> T 細胞の TCR V 分析。データは、 0 日目の非操作対照と比較した CAR<sup>+</sup> T 細胞の 3 つの検証ランの平均 ± 標

標準偏差を示す。(D) SB11トランスポゼース組み込みの欠如を示すゲノムPCR。SB11またはGAPDHプライマーを用いてゲノムDNA(20ng)を増殖させた。SB11プライマーを用いて増殖させたCAR陰性対照T細胞(レーン5)及びCAR<sup>+</sup>T細胞(レーン7); GAPDHプライマーを用いて増殖させたCAR陰性対照T細胞(レーン6)、CAR<sup>+</sup>T細胞(レーン8)、及びSB11を安定的に発現するJurkat(レーン4)。SB11プライマーを用いて増殖させた、SB11を安定的に発現するJurkat(Jurkat/SB11-IRES2-EGFP)(レーン3)及び線状化プラスミドであるpKan-CMV-SB11(レーン2)を陽性対照として用いた。(E)3つの検証ランからのCAR<sup>+</sup>T細胞のGバンド核型の構造的または数値変化は全くない。検証2からの代表的な展開を示す。

【図9D】図9。SB系に関連する安全性プロフィール。(A)蛍光in situハイブリダイゼーション及びフローサイトメトリー(Flow-FISH)アッセイを用いて細胞のテロメア長を測定した。28日目の主要T細胞集団(V1及びV2、CD8<sup>+</sup>T細胞; V3、CD4<sup>+</sup>T細胞)を0日目からのT細胞のミルテニーカラム精製サブセットとそれぞれ比較した。(B)CD19RC28 CARに特異的なプライマー及びプローブを用いて、28日目のCAR<sup>+</sup>T細胞からのゲノムDNAを増殖させた。CD19RC28 CAR形質導入Jurkat細胞を用いて、CD19RC28標的コピー数の相対量(RQ)分析を判断した。これは、参照としてFISH分析から1ゲノム当たりCD19RC28 CAR及び正規化群として内因性RNasePが1つ組み込まっていることが知られている。(C)28日目及び35日目のCAR<sup>+</sup>T細胞のTCR V分析。データは、0日目の非操作対照と比較したCAR<sup>+</sup>T細胞の3つの検証ランの平均±標準偏差を示す。(D)SB11トランスポゼース組み込みの欠如を示すゲノムPCR。SB11またはGAPDHプライマーを用いてゲノムDNA(20ng)を増殖させた。SB11プライマーを用いて増殖させたCAR陰性対照T細胞(レーン5)及びCAR<sup>+</sup>T細胞(レーン7); GAPDHプライマーを用いて増殖させたCAR陰性対照T細胞(レーン6)、CAR<sup>+</sup>T細胞(レーン8)、及びSB11を安定的に発現するJurkat(レーン4)。SB11プライマーを用いて増殖させた、SB11を安定的に発現するJurkat(Jurkat/SB11-IRES2-EGFP)(レーン3)及び線状化プラスミドであるpKan-CMV-SB11(レーン2)を陽性対照として用いた。(E)3つの検証ランからのCAR<sup>+</sup>T細胞のGバンド核型の構造的または数値変化は全くない。検証2からの代表的な展開を示す。

【図9E】図9。SB系に関連する安全性プロフィール。(A)蛍光in situハイブリダイゼーション及びフローサイトメトリー(Flow-FISH)アッセイを用いて細胞のテロメア長を測定した。28日目の主要T細胞集団(V1及びV2、CD8<sup>+</sup>T細胞; V3、CD4<sup>+</sup>T細胞)を0日目からのT細胞のミルテニーカラム精製サブセットとそれぞれ比較した。(B)CD19RC28 CARに特異的なプライマー及びプローブを用いて、28日目のCAR<sup>+</sup>T細胞からのゲノムDNAを増殖させた。CD19RC28 CAR形質導入Jurkat細胞を用いて、CD19RC28標的コピー数の相対量(RQ)分析を判断した。これは、参照としてFISH分析から1ゲノム当たりCD19RC28 CAR及び正規化群として内因性RNasePが1つ組み込まっていることが知られている。(C)28日目及び35日目のCAR<sup>+</sup>T細胞のTCR V分析。データは、0日目の非操作対照と比較したCAR<sup>+</sup>T細胞の3つの検証ランの平均±標準偏差を示す。(D)SB11トランスポゼース組み込みの欠如を示すゲノムPCR。SB11またはGAPDHプライマーを用いてゲノムDNA(20ng)を増殖させた。SB11プライマーを用いて増殖させたCAR陰性対照T細胞(レーン5)及びCAR<sup>+</sup>T細胞(レーン7); GAPDHプライマーを用いて増殖させたCAR陰性対照T細胞(レーン6)、CAR<sup>+</sup>T細胞(レーン8)、及びSB11を安定的に発現するJurkat(レーン4)。SB11プライマーを用いて増殖させた、SB11を安定的に発現するJurkat(Jurkat/SB11-IRES2-EGFP)(レーン3)及び線状化プラスミドであるpKan-CMV-SB11(レーン2)を陽性対照として用いた。(E)3つの検証ランからのCAR<sup>+</sup>T細胞のGバンド核型の構造的または数値変化は全くない。検証2からの代表的な展開を示す。

E ) 3 つの検証ランからの CAR<sup>+</sup> T 細胞の G バンド核型の構造的または数値変化は全くない。検証 2 からの代表的な展開を示す。

【図 10】CD19RCD28 CAR トランスポゾンの生成。コドン最適化キメラ抗原受容体 (CAR) 及び SB DNA プラスミド pT - MNDU3 - EGFP を含む CD19RCD28mz (CoOp) / pEKベクター (Singhら、2008; Hollisら、2006) を、SpeI & NheI 及び SpeI & NruI で消化し、CAR 及び EGFP 断片をそれぞれ放出させた。その後、EGFP 欠失 pT - MNDU3 ベクターを CAR 断片に連結させ、CD19RCD28mz (CoOp) / pT - MNDU3 ベクターを生成した。さらに、カナマイシン耐性遺伝子と、pEKベクターの AscI & PacI 消化により得られた ColE1 複製起点とを、SalI & ZraI 消化 CD19RCD28mz (CoOp) pT - MNDU3 ベクターに連結させ、プレ CD19RCD28mz (CoOp) / pSBSO を作成した。最後の工程で、NheI & NsiI による消化を用いて、プレ CD19RCD28mz (CoOp) / pSBSO からの MNDU3 プロモーターを放出し、XhoI & NheI を用いて pVitro4 ベクターから得られた hEF-1a プロモーター断片に置換し、最終ベクター CD19RCD29mz (CoOp) / pSBSO を生成した。

【図 11】SB11 トランスポゼースの生成。SB トランスポゼースベクター pCMV - SB11 を PvuII で消化し、遺伝子をコードする CMV プロモーター / エンハンサー及び SB トランスポゼースを含有する断片を放出した、これをカナマイシン耐性遺伝子及び pEKベクターからの ColE1 複製起点を含有する断片に連結させ、pKan - CMV - SB11 ベクターを生成した。

【図 12】CD19 発現プラスミドである CD19CoOp - F2A - Neo / pSBSO の概略。プラスミド CoOp CD19RCD28 / pSBSO からの CD19RCD28 CAR をコードする DNA 断片を、F2A リンカー (アミノ酸、VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP; [Szymczakら、2004; Yangら、2008; Kimら、2011]) を介してコドン最適化 (GENEART) 切断 CD19 (CD19, [Serranoら、2006; Mahmoudら、1999]) に融合したネオマイシン耐性遺伝子 (NeoR) [pSelect - Neo (InvivoGen) からクローンした PCR] をコードする DNA 断片と交換し、CD19CoOp - F2A - Neo / pSBSO を生成した。EF1 プロモーター、伸長因子 - 1 プロモーター; NeoR、ネオマイシン耐性遺伝子; bGHPAn、ウシ増殖ホルモンからのポリアデニル化シグナル; ColE1、ori; KanR、カナマイシン耐性遺伝子; IR、SB 逆位 / 重複配列。

【図 13】CD19 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の数的増殖率。遺伝子改変 T 細胞を 7 日間の刺激サイクルで aAPC と共に培養し、全体、CD3<sup>+</sup> 及び CAR<sup>+</sup> T 細胞の各刺激サイクルの最後に、各検証ランからの週間倍数増殖率を算出した。平均倍数増殖を示す (n = 3)。

【図 14】CD19 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の再指向特異性。標準 4 時間クロミウムアッセイにおける 3 つの検証ラン (V1, V2, V3) で生成した CAR<sup>+</sup> T 細胞による CD19<sup>+</sup> 腫瘍標的 (Daudi<sub>2m</sub>, NALM-6, CD19<sup>+</sup> EL-4) の CD19 特異的溶解。CAR<sup>neg</sup> 対照に対するバックグラウンド自己溶解は、1.5% であった。

【図 15】染色体異常に関する安全性。検証ラン (V1 及び V3) から生成した CAR<sup>+</sup> T 細胞の G バンド核型の構造的または数値変化は全くない。

【図 16 A】図 16。 (A) アイソタイプ IgG2a 対照染色 (一番下のパネル) と比較した際の、HERV - K 発現 (一番上のパネル) の強度 (0 ~ 3 で採点) を変えた腫瘍細胞 (200X) の代表的な写真。 (B) 点状で細胞膜 (実線矢印) に隣接する HERV - K 染色またはより広範な細胞質染色 (点線矢印) を示す腫瘍細胞 (400X) の写真。 (C) 各患者の H 指数を表すドットプロットは、良性組織と腫瘍組織との間の有意差 (p < 0.0267) を示した。 (D) 悪性腫瘍と転移性腫瘍との間には有意差は見られなかつた。良性腫瘍と悪性腫瘍または転移性腫瘍との間には有意差が見られた。

【図16B】図16。(A)アイソタイプIgG2a対照染色(一番下のパネル)と比較した際の、HERV-K発現(一番上のパネル)の強度(0~3で採点)を変えた腫瘍細胞(200X)の代表的な写真。(B)点状で細胞膜(実線矢印)に隣接するHERV-K染色またはより広範な細胞質染色(点線矢印)を示す腫瘍細胞(400X)の写真。(C)各患者のH指数を表すドットプロットは、良性組織と腫瘍組織との間の有意差( $p < 0.0267$ )を示した。(D)悪性腫瘍と転移性腫瘍との間には有意差は見られなかつた。良性腫瘍と悪性腫瘍または転移性腫瘍との間には有意差が見られた。

【図16C】図16。(A)アイソタイプIgG2a対照染色(一番下のパネル)と比較した際の、HERV-K発現(一番上のパネル)の強度(0~3で採点)を変えた腫瘍細胞(200X)の代表的な写真。(B)点状で細胞膜(実線矢印)に隣接するHERV-K染色またはより広範な細胞質染色(点線矢印)を示す腫瘍細胞(400X)の写真。(C)各患者のH指数を表すドットプロットは、良性組織と腫瘍組織との間の有意差( $p < 0.0267$ )を示した。(D)悪性腫瘍と転移性腫瘍との間には有意差は見られなかつた。良性腫瘍と悪性腫瘍または転移性腫瘍との間には有意差が見られた。

【図16D】図16。(A)アイソタイプIgG2a対照染色(一番下のパネル)と比較した際の、HERV-K発現(一番上のパネル)の強度(0~3で採点)を変えた腫瘍細胞(200X)の代表的な写真。(B)点状で細胞膜(実線矢印)に隣接するHERV-K染色またはより広範な細胞質染色(点線矢印)を示す腫瘍細胞(400X)の写真。(C)各患者のH指数を表すドットプロットは、良性組織と腫瘍組織との間の有意差( $p < 0.0267$ )を示した。(D)悪性腫瘍と転移性腫瘍との間には有意差は見られなかつた。良性腫瘍と悪性腫瘍または転移性腫瘍との間には有意差が見られた。

【図17A】図17。(A)SBプラスミドをコードするHERV-K特異的CAR。(B)CD3<sup>+</sup>HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の1日目及び35日目のCAR(Fc)発現を表すフロープロット。フロープロットのクオドラントパーセンテージは、右上隅である。CAR、キメラ抗原受容体。(C)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞と非特異的CD-19 CAR<sup>+</sup>T細胞との間の全細胞増殖における有意差はない。(D)21日目まで、全てのHERV-K特異的CAR細胞は、CD3<sup>+</sup>T細胞である。(E)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞は、細胞1個当たり2個未満の組み込みを有することが、CAR組み込み分析により示される。データは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。(F)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型は、高レベルのグランザイムBを産生するCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>hi</sup>CD45RA<sup>1°</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞である。全てのデータは、4人のドナーの平均を表す。

【図17B】図17。(A)SBプラスミドをコードするHERV-K特異的CAR。(B)CD3<sup>+</sup>HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の1日目及び35日目のCAR(Fc)発現を表すフロープロット。フロープロットのクオドラントパーセンテージは、右上隅である。CAR、キメラ抗原受容体。(C)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞と非特異的CD-19 CAR<sup>+</sup>T細胞との間の全細胞増殖における有意差はない。(D)21日目まで、全てのHERV-K特異的CAR細胞は、CD3<sup>+</sup>T細胞である。(E)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞は、細胞1個当たり2個未満の組み込みを有することが、CAR組み込み分析により示される。データは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。(F)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型は、高レベルのグランザイムBを産生するCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>hi</sup>CD45RA<sup>1°</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞である。全てのデータは、4人のドナーの平均を表す。

【図17C】図17。(A)SBプラスミドをコードするHERV-K特異的CAR。(B)CD3<sup>+</sup>HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の1日目及び35日目のCAR(Fc)発現を表すフロープロット。フロープロットのクオドラントパーセンテージは、右上隅である。CAR、キメラ抗原受容体。(C)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞と非特異的CD-19 CAR<sup>+</sup>T細胞との間の全細胞増殖における有意差はない。(D)21日目

10

20

30

40

50

まで、全てのHERV-K特異的CAR細胞は、CD3<sup>+</sup>T細胞である。(E)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞は、細胞1個当たり2個未満の組み込みを有することが、CAR組み込み分析により示される。データは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。(F)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型は、高レベルのグランザイムBを産生するCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>hi</sup>CD45RA<sup>1°</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞である。全てのデータは、4人のドナーの平均を表す。

【図17D】図17。(A)SBプラスミドをコードするHERV-K特異的CAR。(B)CD3<sup>+</sup>HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の1日目及び35日目のCAR(Fc)発現を表すフロープロット。フロープロットのクオドラントパーセンテージは、右上隅である。CAR、キメラ抗原受容体。(C)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞と非特異的CD-19 CAR<sup>+</sup>T細胞との間の全細胞増殖における有意差はない。(D)21日目まで、全てのHERV-K特異的CAR細胞は、CD3<sup>+</sup>T細胞である。(E)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞は、細胞1個当たり2個未満の組み込みを有することが、CAR組み込み分析により示される。データは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。(F)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型は、高レベルのグランザイムBを産生するCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>hi</sup>CD45RA<sup>1°</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞である。全てのデータは、4人のドナーの平均を表す。

【図17E】図17。(A)SBプラスミドをコードするHERV-K特異的CAR。(B)CD3<sup>+</sup>HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の1日目及び35日目のCAR(Fc)発現を表すフロープロット。フローブロットのクオドラントパーセンテージは、右上隅である。CAR、キメラ抗原受容体。(C)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞と非特異的CD-19 CAR<sup>+</sup>T細胞との間の全細胞増殖における有意差はない。(D)21日目まで、全てのHERV-K特異的CAR細胞は、CD3<sup>+</sup>T細胞である。(E)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞は、細胞1個当たり2個未満の組み込みを有することが、CAR組み込み分析により示される。データは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。(F)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型は、高レベルのグランザイムBを産生するCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>hi</sup>CD45RA<sup>1°</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞である。全てのデータは、4人のドナーの平均を表す。

【図17F】図17。(A)SBプラスミドをコードするHERV-K特異的CAR。(B)CD3<sup>+</sup>HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の1日目及び35日目のCAR(Fc)発現を表すフローブロット。フローブロットのクオドラントパーセンテージは、右上隅である。CAR、キメラ抗原受容体。(C)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞と非特異的CD-19 CAR<sup>+</sup>T細胞との間の全細胞増殖における有意差はない。(D)21日目まで、全てのHERV-K特異的CAR細胞は、CD3<sup>+</sup>T細胞である。(E)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞は、細胞1個当たり2個未満の組み込みを有することが、CAR組み込み分析により示される。データは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。(F)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型は、高レベルのグランザイムBを産生するCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>hi</sup>CD45RA<sup>1°</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞である。全てのデータは、4人のドナーの平均を表す。

【図18A】図18。(A)アイソタイプ対照(青色)と比較した腫瘍細胞表面上のHERV-K抗原発現(赤色)のヒストグラム表現。(B)無DNA対照T細胞(点線)と比較した、HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞(実線)の希釈を変化させた黒色腫瘍標的の標準4時間CRA。データは、2つの独立した実験からプールした4人の健康なドナー(各ドナーの3重測定の平均)からの平均±標準偏差である。ボンフェローニのポスト検定による二元配置ANOVAを、HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞と無DNA対照細胞との間で、(B)及び(C)で行った。CAR、キメラ抗原受容体; CRA、クロム遊離

10

20

30

40

50

アッセイ；E : T、エフェクター対標的の比率。（D）標的によるインキュベーション時のCAR<sup>+</sup>T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生。PMA-イオノマイシンを陽性対照として用いる。

【図18B】図18。（A）アイソタイプ対照（青色）と比較した腫瘍細胞表面上のHERV-K抗原発現（赤色）のヒストグラム表現。（B）無DNA対照T細胞（点線）と比較した、HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞（実線）の希釈を変化させた黒色腫瘍標的の標準4時間CRA。データは、2つの独立した実験からプールした4人の健康なドナー（各ドナーの3重測定の平均）からの平均±標準偏差である。ポンフェローニのポスト検定による二元配置ANOVAを、HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞と無DNA対照細胞との間で、（B）及び（C）で行った。CAR、キメラ抗原受容体；CRA、クロム遊離アッセイ；E : T、エフェクター対標的の比率。（D）標的によるインキュベーション時のCAR<sup>+</sup>T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生。PMA-イオノマイシンを陽性対照として用いる。

【図18C】図18。（A）アイソタイプ対照（青色）と比較した腫瘍細胞表面上のHERV-K抗原発現（赤色）のヒストグラム表現。（B）無DNA対照T細胞（点線）と比較した、HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞（実線）の希釈を変化させた黒色腫瘍標的の標準4時間CRA。データは、2つの独立した実験からプールした4人の健康なドナー（各ドナーの3重測定の平均）からの平均±標準偏差である。ポンフェローニのポスト検定による二元配置ANOVAを、HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞と無DNA対照細胞との間で、（B）及び（C）で行った。CAR、キメラ抗原受容体；CRA、クロム遊離アッセイ；E : T、エフェクター対標的の比率。（D）標的によるインキュベーション時のCAR<sup>+</sup>T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生。PMA-イオノマイシンを陽性対照として用いる。

【図19A】図19。HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の特異性。（A）HERV-K抗原（黒色）を人工的に発現するEL4細胞のヒストグラムを、HERV-K<sup>neg</sup>EL4親（青色）及びアイソタイプ対照染色（オレンジ色）と共にプロットした。（B）E : T比率を変えたHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞による親と比較した際に、抗原を発現するEL4細胞の殺傷が有意な増加（p < 0.001）したことが、4時間CRAにより示された。（C）免疫プロットアッセイを行い、スクランブルshRNAで処理したA888親またはA888と比較した際に、A888細胞においてHERV-Kエンベロープ特異的shRNA媒介ノックダウンが示された。下部パネルは、アクチンタンパク質発現を対照として示す。（D）A888HERV-K KD細胞、A888親（A888P）及びA888スクランブル対照（A888scr）によるHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞のCRAにより、T細胞による有意な抗原特異的殺傷が示された。全てのデータは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。ポンフェローニのポスト検定による二元配置ANOVAを（B）に用いて、EL4親とHERV-K<sup>+</sup>EL4を比較し、Newman-Keul's多重比較検定による一元配置ANOVAを（C）に用いて、A888KDと、A888P及びA888scrとを比較した。

【図19B】図19。HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の特異性。（A）HERV-K抗原（黒色）を人工的に発現するEL4細胞のヒストグラムを、HERV-K<sup>neg</sup>EL4親（青色）及びアイソタイプ対照染色（オレンジ色）と共にプロットした。（B）E : T比率を変えたHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞による親と比較した際に、抗原を発現するEL4細胞の殺傷が有意な増加（p < 0.001）したことが、4時間CRAにより示された。（C）免疫プロットアッセイを行い、スクランブルshRNAで処理したA888親またはA888と比較した際に、A888細胞においてHERV-Kエンベロープ特異的shRNA媒介ノックダウンが示された。下部パネルは、アクチンタンパク質発現を対照として示す。（D）A888HERV-K KD細胞、A888親（A888P）及びA888スクランブル対照（A888scr）によるHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞のCRAにより、T細胞による有意な抗原特異的殺傷が示された。全てのデータは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。ポンフ

10

20

30

40

50

エローニのポスト検定による二元配置ANOVAを(B)に用いて、EL4親とHERV-K<sup>+</sup>EL4を比較し、Newman-Keuls多重比較検定による一元配置ANOVAを(C)に用いて、A888KDと、A888P及びA888scrとを比較した。

【図19C】図19。HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の特異性。(A)HERV-K抗原(黒色)を人工的に発現するEL4細胞のヒストグラムを、HERV-K<sup>neg</sup>EL4親(青色)及びアイソタイプ対照染色(オレンジ色)と共にプロットした。(B)E:T比率を変えたHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞による親と比較した際に、抗原を発現するEL4細胞の殺傷が有意な増加( $p < 0.001$ )したことが、4時間CRAにより示された。(C)免疫プロットアッセイを行い、スクランブルshRNAで処理したA888親またはA888と比較した際に、A888細胞においてHERV-Kエンベロープ特異的shRNA媒介ノックダウンが示された。下部パネルは、アクチンタンパク質発現を対照として示す。(D)A888HERV-K KD細胞、A888親(A888P)、及びA888スクランブル対照(A888scr)によるHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞のCRAにより、T細胞による有意な抗原特異的殺傷が示された。全てのデータは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。ボンフエローニのポスト検定による二元配置ANOVAを(B)に用いて、EL4親とHERV-K<sup>+</sup>EL4を比較し、Newman-Keuls多重比較検定による一元配置ANOVAを(C)に用いて、A888KDと、A888P及びA888scrとを比較した。

【図19D】図19。HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の特異性。(A)HERV-K抗原(黒色)を人工的に発現するEL4細胞のヒストグラムを、HERV-K<sup>neg</sup>EL4親(青色)及びアイソタイプ対照染色(オレンジ色)と共にプロットした。(B)E:T比率を変えたHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞による親と比較した際に、抗原を発現するEL4細胞の殺傷が有意な増加( $p < 0.001$ )したことが、4時間CRAにより示された。(C)免疫プロットアッセイを行い、スクランブルshRNAで処理したA888親またはA888と比較した際に、A888細胞においてHERV-Kエンベロープ特異的shRNA媒介ノックダウンが示された。下部パネルは、アクチンタンパク質発現を対照として示す。(D)A888HERV-K KD細胞、A888親(A888P)、及びA888スクランブル対照(A888scr)によるHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞のCRAにより、T細胞による有意な抗原特異的殺傷が示された。全てのデータは、3通りで行った3人の異なるドナーによる2つの独立した実験の平均を表す。ボンフエローニのポスト検定による二元配置ANOVAを(B)に用いて、EL4親とHERV-K<sup>+</sup>EL4を比較し、Newman-Keuls多重比較検定による一元配置ANOVAを(C)に用いて、A888KDと、A888P及びA888scrとを比較した。

【図20A】図20。15時間にわたるHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の活性を判断するため、標的細胞及びエフェクター細胞を、Sytox(登録商標)(Invitrogen、死細胞染色)と共に1:5の比率で培地中に載置した。エフェクター細胞を持つ各標的の50枚の画像を、この期間に7分刻みで記録した。(A)CAR<sup>+</sup>T細胞を持つHERV-K<sup>+</sup>黒色腫細胞(A888及びA375)及びHERV-K陰性対照(HEK293親)細胞を表す写真は、種々の時点である。緑色に変わった細胞は、死細胞として記録し、蛍光の強度を測定した。(B、C、D)標的細胞の平均蛍光強度を表す。上側の線は、死細胞を表すが、下側の線は、生細胞の基礎強度を表す。(E)プロットは、HEK293親細胞と比較した15時間時点での平均蛍光強度における有意差( $^*p < 0.05$ )を表す。データは、各々が50枚の画像を持つ2つの独立した実験の平均を表す。テューキーのポスト検定による一元配置ANOVAを行った。

【図20B】図20。15時間にわたるHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の活性を判断するため、標的細胞及びエフェクター細胞を、Sytox(登録商標)(Invitrogen、死細胞染色)と共に1:5の比率で培地中に載置した。エフェクター細胞を持つ各標的の50枚の画像を、この期間に7分刻みで記録した。(A)CAR<sup>+</sup>T細胞を持つHERV-K<sup>+</sup>黒色腫細胞(A888及びA375)及びHERV-K陰性対照(HEK293親)細胞を表す写真は、種々の時点である。緑色に変わった細胞は、死細胞として

10

20

30

40

50

記録し、蛍光の強度を測定した。(B、C、D)標的細胞の平均蛍光強度を表す。上側の線は、死細胞を表すが、下側の線は、生細胞の基礎強度を表す。(E)プロットは、HEK293親細胞と比較した15時間時点での平均蛍光強度における有意差( $^* p < 0.05$ )を表す。データは、各々が50枚の画像を持つ2つの独立した実験の平均を表す。テューキーのポスト検定による一元配置ANOVAを行った。

【図20C】図20。15時間にわたるHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の活性を判断するため、標的細胞及びエフェクター細胞を、Sytox(登録商標)(Invitrogen、死細胞染色)と共に1:5の比率で培地中に載置した。エフェクター細胞を持つ各標的の50枚の画像を、この期間に7分刻みで記録した。(A)CAR<sup>+</sup>T細胞を持つHERV-K<sup>+</sup>黒色腫細胞(A888及びA375)及びHERV-K陰性対照(HEK293親)細胞を表す写真は、種々の時点である。緑色に変わった細胞は、死細胞として記録し、蛍光の強度を測定した。(B、C、D)標的細胞の平均蛍光強度を表す。上側の線は、死細胞を表すが、下側の線は、生細胞の基礎強度を表す。(E)プロットは、HEK293親細胞と比較した15時間時点での平均蛍光強度における有意差( $^* p < 0.05$ )を表す。データは、各々が50枚の画像を持つ2つの独立した実験の平均を表す。テューキーのポスト検定による一元配置ANOVAを行った。

【図20D】図20。15時間にわたるHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の活性を判断するため、標的細胞及びエフェクター細胞を、Sytox(登録商標)(Invitrogen、死細胞染色)と共に1:5の比率で培地中に載置した。エフェクター細胞を持つ各標的の50枚の画像を、この期間に7分刻みで記録した。(A)CAR<sup>+</sup>T細胞を持つHERV-K<sup>+</sup>黒色腫細胞(A888及びA375)及びHERV-K陰性対照(HEK293親)細胞を表す写真は、種々の時点である。緑色に変わった細胞は、死細胞として記録し、蛍光の強度を測定した。(B、C、D)標的細胞の平均蛍光強度を表す。上側の線は、死細胞を表すが、下側の線は、生細胞の基礎強度を表す。(E)プロットは、HEK293親細胞と比較した15時間時点での平均蛍光強度における有意差( $^* p < 0.05$ )を表す。データは、各々が50枚の画像を持つ2つの独立した実験の平均を表す。テューキーのポスト検定による一元配置ANOVAを行った。

【図20E】図20。15時間にわたるHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の活性を判断するため、標的細胞及びエフェクター細胞を、Sytox(登録商標)(Invitrogen、死細胞染色)と共に1:5の比率で培地中に載置した。エフェクター細胞を持つ各標的の50枚の画像を、この期間に7分刻みで記録した。(A)CAR<sup>+</sup>T細胞を持つHERV-K<sup>+</sup>黒色腫細胞(A888及びA375)及びHERV-K陰性対照(HEK293親)細胞を表す写真は、種々の時点である。緑色に変わった細胞は、死細胞として記録し、蛍光の強度を測定した。(B、C、D)標的細胞の平均蛍光強度を表す。上側の線は、死細胞を表すが、下側の線は、生細胞の基礎強度を表す。(E)プロットは、HEK293親細胞と比較した15時間時点での平均蛍光強度における有意差( $^* p < 0.05$ )を表す。データは、各々が50枚の画像を持つ2つの独立した実験の平均を表す。テューキーのポスト検定による一元配置ANOVAを行った。

【図21A】図21。HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞のIn vivo抗腫瘍活性。(A)実験の概略。(B)3日目～25日目のマウスの代表的な画像。(C)mKate<sup>+</sup>rRLuc<sup>+</sup>HERV-K<sup>+</sup>A375-SM腫瘍由来のBLI、及び(D)mKate<sup>+</sup>腫瘍転移性fociを表す赤色ドットを持つ肝臓組織の事後分析。データは、平均±標準偏差( $n=1$ グループ当たり5～6匹のマウス)である。ボンフェローニのポスト検定による二元配置ANOVA(D)による統計を、処理マウスと未処理マウスとの間で行った。 $^{**} P < 0.01$ 及び $^{***} P < 0.001$ 。ANOVA、分散分析；BLI、生物発光イメージング；CAR、キメラ抗原受容体；IL、インターロイキン。

【図21B】図21。HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞のIn vivo抗腫瘍活性。(A)実験の概略。(B)3日目～25日目のマウスの代表的な画像。(C)mKate<sup>+</sup>rRLuc<sup>+</sup>HERV-K<sup>+</sup>A375-SM腫瘍由来のBLI、及び(D)mKate<sup>+</sup>腫瘍転移性fociを表す赤色ドットを持つ肝臓組織の事後分析。データは、平均±標準偏差( $n=1$ グループ当たり5～6匹のマウス)である。ボンフェローニのポスト検定による二元配置ANOVA(D)による統計を、処理マウスと未処理マウスとの間で行った。 $^{**} P < 0.01$ 及び $^{***} P < 0.001$ 。ANOVA、分散分析；BLI、生物発光イメージング；CAR、キメラ抗原受容体；IL、インターロイキン。

標準偏差 (n = 1 グループ当たり 5 ~ 6 匹のマウス) である。ボンフェローニのポスト検定による二元配置 ANOVA (D) による統計を、処理マウスと未処理マウスとの間で行った。\* \* P < 0.01 及び \* \* \* P < 0.001。ANOVA、分散分析；BLI、生物発光イメージング；CAR、キメラ抗原受容体；IL、インターロイキン。

【図 21 C】図 21。HERV-K特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の In vivo 抗腫瘍活性。  
(A) 実験の概略。(B) 3日目～25日目のマウスの代表的な画像。(C) mKate<sup>+</sup> rRLuc<sup>+</sup> HERV-K<sup>+</sup> A375-SM 腫瘍由来の BLI、及び(D) mKate<sup>+</sup> 腫瘍転移性 foci を表す赤色ドットを持つ肝臓組織の事後分析。データは、平均 ± 標準偏差 (n = 1 グループ当たり 5 ~ 6 匹のマウス) である。ボンフェローニのポスト検定による二元配置 ANOVA (D) による統計を、処理マウスと未処理マウスとの間で行った。\* \* P < 0.01 及び \* \* \* P < 0.001。ANOVA、分散分析；BLI、生物発光イメージング；CAR、キメラ抗原受容体；IL、インターロイキン。

【図 21 D】図 21。HERV-K特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の In vivo 抗腫瘍活性。  
(A) 実験の概略。(B) 3日目～25日目のマウスの代表的な画像。(C) mKate<sup>+</sup> rRLuc<sup>+</sup> HERV-K<sup>+</sup> A375-SM 腫瘍由来の BLI、及び(D) mKate<sup>+</sup> 腫瘍転移性 foci を表す赤色ドットを持つ肝臓組織の事後分析。データは、平均 ± 標準偏差 (n = 1 グループ当たり 5 ~ 6 匹のマウス) である。ボンフェローニのポスト検定による二元配置 ANOVA (D) による統計を、処理マウスと未処理マウスとの間で行った。\* \* P < 0.01 及び \* \* \* P < 0.001。ANOVA、分散分析；BLI、生物発光イメージング；CAR、キメラ抗原受容体；IL、インターロイキン。

【図 21 E】図 21。HERV-K特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の In vivo 抗腫瘍活性。  
(A) 実験の概略。(B) 3日目～25日目のマウスの代表的な画像。(C) mKate<sup>+</sup> rRLuc<sup>+</sup> HERV-K<sup>+</sup> A375-SM 腫瘍由来の BLI、及び(D) mKate<sup>+</sup> 腫瘍転移性 foci を表す赤色ドットを持つ肝臓組織の事後分析。データは、平均 ± 標準偏差 (n = 1 グループ当たり 5 ~ 6 匹のマウス) である。ボンフェローニのポスト検定による二元配置 ANOVA (D) による統計を、処理マウスと未処理マウスとの間で行った。\* \* P < 0.01 及び \* \* \* P < 0.001。ANOVA、分散分析；BLI、生物発光イメージング；CAR、キメラ抗原受容体；IL、インターロイキン。

【図 22 A】図 22。(A) 29 個の正常臓器からの組織部位上の HERV-K 抗原発現の代表的な写真 (200X) を示す。これらの組織のいずれにも染色が観察されなかったため、H 指数は 0 として算出した。(B) 種々の臓器及び異なる患者からの悪性腫瘍組織の H 指数をドットプロットで示す。

【図 22 B】図 22。(A) 29 個の正常臓器からの組織部位上の HERV-K 抗原発現の代表的な写真 (200X) を示す。これらの組織のいずれにも染色が観察されなかったため、H 指数は 0 として算出した。(B) 種々の臓器及び異なる患者からの悪性腫瘍組織の H 指数をドットプロットで示す。

【図 23 A】図 23。(A) CD4<sup>+</sup> 対 CD8<sup>+</sup> HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の増殖を示す。(B) HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞対無 DNA 対照細胞における種々の遺伝子の発現を表す nCounter 分析。赤色は高発現を示すが、緑色は低 mRNA レベルを示す。(C) HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞中で高発現した遺伝子の Ingenuity Pathway 解析。

【図 23 B】図 23。(A) CD4<sup>+</sup> 対 CD8<sup>+</sup> HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の増殖を示す。(B) HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞対無 DNA 対照細胞における種々の遺伝子の発現を表す nCounter 分析。赤色は高発現を示すが、緑色は低 mRNA レベルを示す。(C) HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞中で高発現した遺伝子の Ingenuity Pathway 解析。

【図 23 C】図 23。(A) CD4<sup>+</sup> 対 CD8<sup>+</sup> HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の増殖を示す。(B) HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞対無 DNA 対照細胞における種々の遺伝子の発現を表す nCounter 分析。赤色は高発現を示すが、緑色は低 mRNA レベルを示す。(C) HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞中で高発現した遺伝子の Ingenuity Pathway 解析。

10

20

30

40

50

nuity Pathway 解析。

【図24】黒色腫及びCD19特異的腫瘍標的並びにCD19 CAR<sup>+</sup> T細胞で4時間標準CRAを行った。全てのデータは、6人のドナーの平均で行い、かつポンフェローニのポスト検定による二元配置ANOVAを用いて分析した2つの独立した実験を表す。

【図25】hEF-1 プロモーター下のHERV-K抗原及びCMVプロモーター下のネオマイシン耐性遺伝子をコードする二方向SBプラスミド。

【図26】腫瘍細胞表面上でHERV-K抗原(赤色)と係合したHERV-K特異的CAR(緑色)を表す。

【図27A】図27。(A)ネオマイシン耐性遺伝子を持つmyc-ffLucをコードするSBプラスミド。(B)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup> T細胞及びHERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞の全細胞増殖。(C)HERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞によるA375SM及びEL4親細胞の4時間CRA。(D)ffLuc活性を表すマウス画像。(E)腫瘍細胞イメージング用にRLuc及びmKateをコードするレンチウイルスプラスミド。

【図27B】図27。(A)ネオマイシン耐性遺伝子を持つmyc-ffLucをコードするSBプラスミド。(B)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup> T細胞及びHERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞の全細胞増殖。(C)HERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞によるA375SM及びEL4親細胞の4時間CRA。(D)ffLuc活性を表すマウス画像。(E)腫瘍細胞イメージング用にRLuc及びmKateをコードするレンチウイルスプラスミド。

【図27C】図27。(A)ネオマイシン耐性遺伝子を持つmyc-ffLucをコードするSBプラスミド。(B)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup> T細胞及びHERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞の全細胞増殖。(C)HERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞によるA375SM及びEL4親細胞の4時間CRA。(D)ffLuc活性を表すマウス画像。(E)腫瘍細胞イメージング用にRLuc及びmKateをコードするレンチウイルスプラスミド。

【図27D】図27。(A)ネオマイシン耐性遺伝子を持つmyc-ffLucをコードするSBプラスミド。(B)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup> T細胞及びHERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞の全細胞増殖。(C)HERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞によるA375SM及びEL4親細胞の4時間CRA。(D)ffLuc活性を表すマウス画像。(E)腫瘍細胞イメージング用にRLuc及びmKateをコードするレンチウイルスプラスミド。

【図27E】図27。(A)ネオマイシン耐性遺伝子を持つmyc-ffLucをコードするSBプラスミド。(B)HERV-K特異的CAR<sup>+</sup> T細胞及びHERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞の全細胞増殖。(C)HERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup> T細胞によるA375SM及びEL4親細胞の4時間CRA。(D)ffLuc活性を表すマウス画像。(E)腫瘍細胞イメージング用にRLuc及びmKateをコードするレンチウイルスプラスミド。

【図28A】図28A及び28B。mIL15の概略。A)スリーピングビューティ発現プラスミドの成分である逆方向反復によりフランクされるmIL15構築物。mIL15ムテインは、フレキシブルなセリン-グリシンリンカーによるIL-15と全長IL-15Rの融合である。B)mIL15の発現タンパク質構造を表す概略。

【図28B】図28A及び28B。mIL15の概略。A)スリーピングビューティ発現プラスミドの成分である逆方向反復によりフランクされるmIL15構築物。mIL15ムテインは、フレキシブルなセリン-グリシンリンカーによるIL-15と全長IL-15Rの融合である。B)mIL15の発現タンパク質構造を表す概略。

【図29A】図29A及び29B。5回の刺激サイクル後、aAPC上でex vivo増殖後の遺伝子改変T細胞中のCAR及びmIL15発現。A)5人のドナー代表的な試料の発現。B)遺伝子改変T細胞中の表示マーカー(CAR及び/またはmIL15)の発現。

10

20

30

40

50

【図29B】図29A及び29B。5回の刺激サイクル後、aAPC上で $\text{ex vivo}$ 増殖後の遺伝子改変T細胞中のCAR及びmIL15発現。A)5人のドナー代表的な試料の発現。B)遺伝子改変T細胞中の表示マーカー(CAR及び/またはmIL15)の発現。

【図30】pSTAT5のフォスフローを介したmIL15の機能性の検証。基礎及びIL-15媒介リン酸化を得るために、特に断りのない限り、無血清及び無サイトカイン条件における細胞の5時間インキュベーション。代表的なプロット( $n=6$ )。

【図31】aAPC上で4回の刺激サイクル後のmIL15の共発現の有無に関わらないCAR<sup>+</sup>T細胞の推定カウント。CAR<sup>+</sup>T細胞を可溶性IL-2及びIL-21(標準培養条件)またはIL-15及びIL-21(可溶性サイトカイン対照)で培養し、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞をIL-21で培養した。データは、平均±標準偏差であり、 $n=4$ である。  
10

【図32A】図32A及び32B。 $\text{ex vivo}$ 増殖させたmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型及び特異的溶解能。A)aAPC上で4回刺激した後の特定のT細胞マーカー、活性化マーカー、及び分化関連マーカーの表面発現率。水平ラインは、平均値を示す。

\* $P=0.047$ 、対応有t検定、 $n>4$ 。B)4時間クロム遊離アッセイからのCD19<sup>+</sup>またはCD19<sup>neg</sup>標的のaAPC上で5回刺激した後のCAR<sup>+</sup>T細胞(左側パネル)及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞(右側パネル)の特異的溶解。データは、平均±標準偏差として表し、 $n=3$ である。

【図32B】図32A及び32B。 $\text{ex vivo}$ 増殖させたmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型及び特異的溶解能。A)aAPC上で4回刺激した後の特定のT細胞マーカー、活性化マーカー、及び分化関連マーカーの表面発現率。水平ラインは、平均値を示す。

\* $P=0.047$ 、対応有t検定、 $n>4$ 。B)4時間クロム遊離アッセイからのCD19<sup>+</sup>またはCD19<sup>neg</sup>標的のaAPC上で5回刺激した後のCAR<sup>+</sup>T細胞(左側パネル)及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞(右側パネル)の特異的溶解。データは、平均±標準偏差として表し、 $n=3$ である。  
20

【図33A】図33。AICDに対して機能的に適格かつ耐性を保持するmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の $\text{in vitro}$ 長期持続性。A)4回のaAPC刺激の後に $\text{ex vivo}$ 増殖させたmIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>T細胞は、長期 $\text{in vitro}$ 持続性を評価し、かつ60+日にわたる増殖動態を観察するために、抗原再刺激から離脱させた。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、いずれの外因性サイトカインサポートも受けなかつたが、CAR<sup>+</sup>T細胞は、無サイトカイン、IL-2、またはIL-15を受けた。データは、平均±標準偏差の対数であり、 $^{* * * *} P < 0.0001$ 、RM ANOVA、 $n=3$ である。  
30

B)抗原暴露後75日を超える生存T細胞を、無標的、CD19<sup>+</sup>/EL4、CD19<sup>+</sup>Nalm-6、またはLACと6時間インキュベーションすることによる抗原応答性について試験した。IFN- $\gamma$ 細胞内染色のフローサイトメトリーによる分析を行った。代表的なフロープロットを示し、 $n=3$ である。C)離脱後75日の生存T細胞を、前述したようにaAPCと1:1で刺激して試験し、培地は、離脱培養メンテナンス<sup>+</sup>IL-21の追加中に用いたサイトカイン(あるとすれば)で補充した。8日後、T細胞をアネキシンVで染色し、刺激培養における生細胞対アポトーシス/壞死細胞の割合を判断した。代表的なフロープロットを示し、 $n=3$ である。  
40

【図33B】図33。AICDに対して機能的に適格かつ耐性を保持するmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の $\text{in vitro}$ 長期持続性。A)4回のaAPC刺激の後に $\text{ex vivo}$ 増殖させたmIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>T細胞は、長期 $\text{in vitro}$ 持続性を評価し、かつ60+日にわたる増殖動態を観察するために、抗原再刺激から離脱させた。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、いずれの外因性サイトカインサポートも受けなかつたが、CAR<sup>+</sup>T細胞は、無サイトカイン、IL-2、またはIL-15を受けた。データは、平均±標準偏差の対数であり、 $^{* * * *} P < 0.0001$ 、RM ANOVA、 $n=3$ である。  
50

B)抗原暴露後75日を超える生存T細胞を、無標的、CD19<sup>+</sup>/EL4、CD19<sup>+</sup>Nalm-6、またはLACと6時間インキュベーションすることによる抗原応答

性について試験した。IFN 細胞内染色のフローサイトメトリーによる分析を行った。代表的なフロープロットを示し、n = 3 である。C) 離脱後 75 日の生存 T 細胞を、前述したように aAPC と 1 : 1 で刺激して試験し、培地は、離脱培養メンテナンス + IL-21 の追加中に用いたサイトカイン（あるとすれば）で補充した。8 日後、T 細胞をアネキシン V で染色し、刺激培養における生細胞対アポトーシス / 壊死細胞の割合を判断した。代表的なフロープロットを示し、n = 3 である。

【図 33 C】図 33。AICD に対して機能的に適格かつ耐性を保持する mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞の In vitro 長期持続性。A) 4 回の aAPC 刺激の後に Ex vivo 増殖させた mIL15<sup>+</sup>/- CAR<sup>+</sup> T 細胞は、長期 in vitro 持続性を評価し、かつ 60+ 日にわたる増殖動態を観察するために、抗原再刺激から離脱させた。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞は、いずれの外因性サイトカインサポートも受けなかつたが、CAR<sup>+</sup> T 細胞は、無サイトカイン、IL-2、または IL-15 を受けた。データは、平均 ± 標準偏差の対数であり、\*\*\* P < 0.0001、RM ANOVA、n = 3 である。B) 抗原暴露後 75 日を超える生存 T 細胞を、無標的、CD19<sup>+</sup>/- EL4、CD19<sup>+</sup>Na1m-6、または LAC と 6 時間インキュベーションすることによる抗原応答性について試験した。IFN 細胞内染色のフローサイトメトリーによる分析を行った。代表的なフロープロットを示し、n = 3 である。C) 離脱後 75 日の生存 T 細胞を、前述したように aAPC と 1 : 1 で刺激して試験し、培地は、離脱培養メンテナンス + IL-21 の追加中に用いたサイトカイン（あるとすれば）で補充した。8 日後、T 細胞をアネキシン V で染色し、刺激培養における生細胞対アポトーシス / 壊死細胞の割合を判断した。代表的なフロープロットを示し、n = 3 である。

【図 34 A】図 34 A 乃至 34 C。長期持続性 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞は、二又の CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/- 表現型になる。A) 4 刺激からの mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞、及び最後の抗原刺激後に 75 日間持続する mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞の CD45RA 及び CCR7 集団の代表的なフロープロット、n = 7。B) (A) からの集団サブセットの頻度。\*\*\* P < 0.001 及び \*\*\* P < 0.0001、RM ANOVA、n = 7。C) 4 刺激からの mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞、及び最後の抗原刺激後に 75 日間持続する mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞の CCR7<sup>neg</sup> 及び CCR7<sup>+</sup> におけるアネキシン V レベルを示す代表的なヒストグラム、n = 3。ヒストグラムは、非特異的 CCR7 染色を避けるためにリンパ球集団上でゲートされる。

【図 34 B】図 34 A 乃至 34 C。長期持続性 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞は、二又の CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/- 表現型になる。A) 4 刺激からの mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞、及び最後の抗原刺激後に 75 日間持続する mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞の CD45RA 及び CCR7 集団の代表的なフロープロット、n = 7。B) (A) からの集団サブセットの頻度。\*\*\* P < 0.001 及び \*\*\* P < 0.0001、RM ANOVA、n = 7。C) 4 刺激からの mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞、及び最後の抗原刺激後に 75 日間持続する mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞の CCR7<sup>neg</sup> 及び CCR7<sup>+</sup> におけるアネキシン V レベルを示す代表的なヒストグラム、n = 3。ヒストグラムは、非特異的 CCR7 染色を避けるためにリンパ球集団上でゲートされる。

【図 34 C】図 34 A 乃至 34 C。長期持続性 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞は、二又の CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/- 表現型になる。A) 4 刺激からの mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞、及び最後の抗原刺激後に 75 日間持続する mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞の CD45RA 及び CCR7 集団の代表的なフロープロット、n = 7。B) (A) からの集団サブセットの頻度。\*\*\* P < 0.001 及び \*\*\* P < 0.0001、RM ANOVA、n = 7。C) 4 刺激からの mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞、及び最後の抗原刺激後に 75 日間持続する mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞の CCR7<sup>neg</sup> 及び CCR7<sup>+</sup> におけるアネキシン V レベルを示す代表的なヒストグラム、n = 3。ヒストグラムは、非特異的 CCR7 染色を避けるためにリンパ球集団上でゲートされる。

【図 35 A】図 35 A 乃至 35 D。グラフは、フローサイトメトリー分析による mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> T 細胞の追加の特性化を示す。図 35 A、1 ~ 2 年間の抗原再刺激のない培

養下にあった3人の健常ドナー（染色後10日でPKH希釈）からのWD-mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の恒常的増殖レベル（一番上のパネル）、及びaAPCによる抗原再刺激時のこれらの細胞の増殖能（一番下のパネル）。図35B、染色体分析に提出された長期離脱mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞（CD3及びmIL15表面発現）の表現型。まず、表現型検査及び染色体分析用に提出前に、離脱T細胞をaAPCで再刺激した。図35C、抗原再刺激及び外因性サイトカインの不在下においてin vitroで長期間（1.5～2.46年）持続するmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の正常核型（G-バンディング）結果。4人の健常ドナーからの代表的な分裂中期展開を示す。図35D、K562 aAPCを用いた細胞の刺激後のメモリー動態。図35E、CAR及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の1対2刺激によるメモリー動態。

10

【図35B】図35A乃至35D。グラフは、フローサイトメトリー分析によるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の追加の特性化を示す。図35A、1～2年間の抗原再刺激のない培養下にあった3人の健常ドナー（染色後10日でPKH希釈）からのWD-mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の恒常的増殖レベル（一番上のパネル）、及びaAPCによる抗原再刺激時のこれらの細胞の増殖能（一番下のパネル）。図35B、染色体分析に提出された長期離脱mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞（CD3及びmIL15表面発現）の表現型。まず、表現型検査及び染色体分析用に提出前に、離脱T細胞をaAPCで再刺激した。図35C、抗原再刺激及び外因性サイトカインの不在下においてin vitroで長期間（1.5～2.46年）持続するmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の正常核型（G-バンディング）結果。4人の健常ドナーからの代表的な分裂中期展開を示す。図35D、K562 aAPCを用いた細胞の刺激後のメモリー動態。図35E、CAR及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の1対2刺激によるメモリー動態。

20

【図35C】図35A乃至35D。グラフは、フローサイトメトリー分析によるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の追加の特性化を示す。図35A、1～2年間の抗原再刺激のない培養下にあった3人の健常ドナー（染色後10日でPKH希釈）からのWD-mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の恒常的増殖レベル（一番上のパネル）、及びaAPCによる抗原再刺激時のこれらの細胞の増殖能（一番下のパネル）。図35B、染色体分析に提出された長期離脱mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞（CD3及びmIL15表面発現）の表現型。まず、表現型検査及び染色体分析用に提出前に、離脱T細胞をaAPCで再刺激した。図35C、抗原再刺激及び外因性サイトカインの不在下においてin vitroで長期間（1.5～2.46年）持続するmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の正常核型（G-バンディング）結果。4人の健常ドナーからの代表的な分裂中期展開を示す。図35D、K562 aAPCを用いた細胞の刺激後のメモリー動態。図35E、CAR及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の1対2刺激によるメモリー動態。

30

【図35D】図35A乃至35D。グラフは、フローサイトメトリー分析によるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の追加の特性化を示す。図35A、1～2年間の抗原再刺激のない培養下にあった3人の健常ドナー（染色後10日でPKH希釈）からのWD-mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の恒常的増殖レベル（一番上のパネル）、及びaAPCによる抗原再刺激時のこれらの細胞の増殖能（一番下のパネル）。図35B、染色体分析に提出された長期離脱mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞（CD3及びmIL15表面発現）の表現型。まず、表現型検査及び染色体分析用に提出前に、離脱T細胞をaAPCで再刺激した。図35C、抗原再刺激及び外因性サイトカインの不在下においてin vitroで長期間（1.5～2.46年）持続するmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の正常核型（G-バンディング）結果。4人の健常ドナーからの代表的な分裂中期展開を示す。図35D、K562 aAPCを用いた細胞の刺激後のメモリー動態。図35E、CAR及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の1対2刺激によるメモリー動態。

40

【図35E】図35A乃至35D。グラフは、フローサイトメトリー分析によるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の追加の特性化を示す。図35A、1～2年間の抗原再刺激のない培養下にあった3人の健常ドナー（染色後10日でPKH希釈）からのWD-mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の恒常的増殖レベル（一番上のパネル）、及びaAPCによる抗原再刺激

50

時のこれらの細胞の増殖能(一番下のパネル)。図35B、染色体分析に提出された長期離脱mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞(CD3及びmIL15表面発現)の表現型。まず、表現型検査及び染色体分析用に提出前に、離脱T細胞をaAPCで再刺激した。図35C、抗原再刺激及び外因性サイトカインの不在下においてin vitroで長期間(1.5~2.46年)持続するmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の正常核型(G-バンディング)結果。4人の健常ドナーからの代表的な分裂中期展開を示す。図35D、K562 aAPCを用いた細胞の刺激後のメモリー動態。図3E、CAR及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の1対2刺激によるメモリー動態。

【図36】長期持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が分化の程度が低いT細胞サブセットと関連した特徴を示すことが、分子プロファイリングにより示される。4刺激からmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞間で著しく特異的に発現した全ての遺伝子、及び離脱条件を通じて持続するものは、遺伝子オントロジー情報に基づいて広義のカテゴリー下で機能的に分類される。カテゴリー内の遺伝子は、持続性離脱mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞における上方または下方調節に基づいて区分される。

【図37】長期持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が低分化状態を示すことが、T細胞分化状態と関連する転写因子の検証により示される。一番上のパネル：選択特異的発現遺伝子(Tcf-7、Blimp-1、及びT-bet)を細胞内染色により検証し、フローサイトメトリーにより分析した。代表的なフロープロットを示し、n=5である。一番下のパネル：nCounter分析システム出力からの正規化mRNAコピー数。

【図38A】図38。長期持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が低分化を示すことが、T細胞分化状態と関連する表面マーカーの検証により示される。一番上のパネル：選択特異的発現遺伝子であるIL-7Ra及びCCR7を染色により検証し、フローサイトメトリーにより分析した。\*P=0.0156及び\*\*\*P<0.001、それぞれ、1-テイルドウィルコクソン・マッチドペア・サインド・ランク検定及び対応有1-テイルドT検定。代表的なフロープロットを示し、n=5~7である。一番下のパネル：nCounter分析システム出力からの正規化mRNAコピー数、n=3。

【図38B】図38。長期持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が低分化を示すことが、T細胞分化状態と関連する表面マーカーの検証により示される。一番上のパネル：選択特異的発現遺伝子であるIL-7Ra及びCCR7を染色により検証し、フローサイトメトリーにより分析した。\*P=0.0156及び\*\*\*P<0.001、それぞれ、1-テイルドウィルコクソン・マッチドペア・サインド・ランク検定及び対応有1-テイルドT検定。代表的なフロープロットを示し、n=5~7である。一番下のパネル：nCounter分析システム出力からの正規化mRNAコピー数、n=3。

【図38C】図38。長期持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が低分化を示すことが、T細胞分化状態と関連する表面マーカーの検証により示される。一番上のパネル：選択特異的発現遺伝子であるIL-7Ra及びCCR7を染色により検証し、フローサイトメトリーにより分析した。\*P=0.0156及び\*\*\*P<0.001、それぞれ、1-テイルドウィルコクソン・マッチドペア・サインド・ランク検定及び対応有1-テイルドT検定。代表的なフロープロットを示し、n=5~7である。一番下のパネル：nCounter分析システム出力からの正規化mRNAコピー数、n=3。

【図38D】図38。長期持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が低分化を示すことが、T細胞分化状態と関連する表面マーカーの検証により示される。一番上のパネル：選択特異的発現遺伝子であるIL-7Ra及びCCR7を染色により検証し、フローサイトメトリーにより分析した。\*P=0.0156及び\*\*\*P<0.001、それぞれ、1-テイルドウィルコクソン・マッチドペア・サインド・ランク検定及び対応有1-テイルドT検定。代表的なフロープロットを示し、n=5~7である。一番下のパネル：nCounter分析システム出力からの正規化mRNAコピー数、n=3。

【図39A】図39。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞によるIL-2産生能力の獲得。A)4刺激及び刺激しないかまたはリンパ球活性化カクテル(LAC)で6時間活性化されたかいずれかの後、細胞内IL-2染色をし、フローサイトメトリーにより分析した持続性

10

20

30

40

50

抗原離脱mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞(WD-mIL15-CAR)のIL-2細胞内染色の代表的なヒストグラム。B)(A)からのIL-2を産生するLAC刺激T細胞の頻度。\*\*\*P<0.0001、n=6、対応有t検定。

【図39B】図39。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞によるIL-2産生能力の獲得。A)4刺激及び刺激しないかまたはリンパ球活性化カクテル(LAC)で6時間活性化されたかいずれかの後、細胞内IL-2染色をし、フローサイトメトリーにより分析した持続性抗原離脱mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞(WD-mIL15-CAR)のIL-2細胞内染色の代表的なヒストグラム。B)(A)からのIL-2を産生するLAC刺激T細胞の頻度。\*\*\*P<0.0001、n=6、対応有t検定。

【図40A】図40A乃至40D。腫瘍抗原が豊富な環境におけるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のIn vivo持続性及び抗腫瘍活性。A)実験の概略。B)Nalm-6腫瘍導入後のマウスに養子導入したmIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>ffluc<sup>+</sup>T細胞由来のBLI(n=5)。C)ヒトCD3で染色によるヒトT細胞の存在について14日目の脾臓(一番上のパネル)及び骨髄(一番下のパネル)の分析、及びフローサイトメトリーによる検出。代表的なフロープロット(n=5)。D)CD3<sup>+</sup>及びCD19<sup>+</sup>細胞の存在についてフローサイトメトリーによる末梢血液の分析。マウスCD45<sup>+</sup>細胞をゲートアウトした後に得られた頻度。データは、個々のマウス及び平均±標準偏差を示す。\*\*\*P<0.001、1元配置ANOVA、n=3~5。

【図40B】図40A乃至40D。腫瘍抗原が豊富な環境におけるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のIn vivo持続性及び抗腫瘍活性。A)実験の概略。B)Nalm-6腫瘍導入後のマウスに養子導入したmIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>ffluc<sup>+</sup>T細胞由来のBLI(n=5)。C)ヒトCD3で染色によるヒトT細胞の存在について14日目の脾臓(一番上のパネル)及び骨髄(一番下のパネル)の分析、及びフローサイトメトリーによる検出。代表的なフロープロット(n=5)。D)CD3<sup>+</sup>及びCD19<sup>+</sup>細胞の存在についてフローサイトメトリーによる末梢血液の分析。マウスCD45<sup>+</sup>細胞をゲートアウトした後に得られた頻度。データは、個々のマウス及び平均±標準偏差を示す。\*\*\*P<0.001、1元配置ANOVA、n=3~5。

【図40C】図40A乃至40D。腫瘍抗原が豊富な環境におけるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のIn vivo持続性及び抗腫瘍活性。A)実験の概略。B)Nalm-6腫瘍導入後のマウスに養子導入したmIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>ffluc<sup>+</sup>T細胞由来のBLI(n=5)。C)ヒトCD3で染色によるヒトT細胞の存在について14日目の脾臓(一番上のパネル)及び骨髄(一番下のパネル)の分析、及びフローサイトメトリーによる検出。代表的なフロープロット(n=5)。D)CD3<sup>+</sup>及びCD19<sup>+</sup>細胞の存在についてフローサイトメトリーによる末梢血液の分析。マウスCD45<sup>+</sup>細胞をゲートアウトした後に得られた頻度。データは、個々のマウス及び平均±標準偏差を示す。\*\*\*P<0.001、1元配置ANOVA、n=3~5。

【図40D】図40A乃至40D。腫瘍抗原が豊富な環境におけるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のIn vivo持続性及び抗腫瘍活性。A)実験の概略。B)Nalm-6腫瘍導入後のマウスに養子導入したmIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>ffluc<sup>+</sup>T細胞由来のBLI(n=5)。C)ヒトCD3で染色によるヒトT細胞の存在について14日目の脾臓(一番上のパネル)及び骨髄(一番下のパネル)の分析、及びフローサイトメトリーによる検出。代表的なフロープロット(n=5)。D)CD3<sup>+</sup>及びCD19<sup>+</sup>細胞の存在についてフローサイトメトリーによる末梢血液の分析。マウスCD45<sup>+</sup>細胞をゲートアウトした後に得られた頻度。データは、個々のマウス及び平均±標準偏差を示す。\*\*\*P<0.001、1元配置ANOVA、n=3~5。

【図41A】図41A乃至41E。低抗原環境におけるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の持続性及び抗腫瘍効果のIn vivoモデル評価。A)実験の概略。B)CAR<sup>+</sup>T細胞またはmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のいずれかの養子導入を受けた後、T細胞生着の6日後にCD19<sup>+</sup>Nalm-6腫瘍注入したマウスのT細胞(ffluc<sup>+</sup>)BLI。C)Nalm-6負荷の縦方向BLIモニタリング。画像は、Nalm-6細胞由来rLUC

10

20

30

40

50

活性からの光子束を表す。D) CAR<sup>+</sup> T細胞、mIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞、または無T細胞のいずれかで処理したマウスの経時的な腫瘍光束(rLuc)。データは、平均±標準偏差である。\* \* \* \* P < 0.0001、一元配置ANOVA、n = 4~5。E)採取した組織及び血液の分析。ここで、ヒトT細胞(ヒトCD3<sup>+</sup>)及びNa1m-6腫瘍細胞(ヒトCD19<sup>+</sup>)をフローサイトメトリーにより検出した。E)低腫瘍モデルを用いて、マウスの長期生存について98日目まで評価した。実験条件は、低腫瘍モデルについて前述したのと同様に行い、mIL15-CAR T細胞(n = 7)、CAR T細胞(n = 8)、または無T細胞(n = 8)でマウスを生着した後、NALM-6腫瘍抗原投与を行った。括弧内の分数は、98日目までのマウス生存の割合を表す。\* P = 0.045(mIL15-CAR対CAR T細胞治療)、ログランク(マンテル・コックス)。

【図41B】図41A乃至41E。低抗原環境におけるmIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞の持続性及び抗腫瘍効果のIn vivoモデル評価。A)実験の概略。B)CAR<sup>+</sup> T細胞またはmIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞のいずれかの養子導入を受けた後、T細胞生着の6日後にCD19<sup>+</sup>Na1m-6腫瘍注入したマウスのT細胞(fffLuc<sup>+</sup>)BLI。C)Na1m-6負荷の縦方向BLIモニタリング。画像は、Na1m-6細胞由来rLuc活性からの光子束を表す。D)CAR<sup>+</sup> T細胞、mIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞、または無T細胞のいずれかで処理したマウスの経時的な腫瘍光束(rLuc)。データは、平均±標準偏差である。\* \* \* \* P < 0.0001、一元配置ANOVA、n = 4~5。E)採取した組織及び血液の分析。ここで、ヒトT細胞(ヒトCD3<sup>+</sup>)及びNa1m-6腫瘍細胞(ヒトCD19<sup>+</sup>)をフローサイトメトリーにより検出した。E)低腫瘍モデルを用いて、マウスの長期生存について98日目まで評価した。実験条件は、低腫瘍モデルについて前述したのと同様に行い、mIL15-CAR T細胞(n = 7)、CAR T細胞(n = 8)、または無T細胞(n = 8)でマウスを生着した後、NALM-6腫瘍抗原投与を行った。括弧内の分数は、98日目までのマウス生存の割合を表す。\* P = 0.045(mIL15-CAR対CAR T細胞治療)、ログランク(マンテル・コックス)。

【図41C】図41A乃至41E。低抗原環境におけるmIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞の持続性及び抗腫瘍効果のIn vivoモデル評価。A)実験の概略。B)CAR<sup>+</sup> T細胞またはmIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞のいずれかの養子導入を受けた後、T細胞生着の6日後にCD19<sup>+</sup>Na1m-6腫瘍注入したマウスのT細胞(fffLuc<sup>+</sup>)BLI。C)Na1m-6負荷の縦方向BLIモニタリング。画像は、Na1m-6細胞由来rLuc活性からの光子束を表す。D)CAR<sup>+</sup> T細胞、mIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞、または無T細胞のいずれかで処理したマウスの経時的な腫瘍光束(rLuc)。データは、平均±標準偏差である。\* \* \* \* P < 0.0001、一元配置ANOVA、n = 4~5。E)採取した組織及び血液の分析。ここで、ヒトT細胞(ヒトCD3<sup>+</sup>)及びNa1m-6腫瘍細胞(ヒトCD19<sup>+</sup>)をフローサイトメトリーにより検出した。E)低腫瘍モデルを用いて、マウスの長期生存について98日目まで評価した。実験条件は、低腫瘍モデルについて前述したのと同様に行い、mIL15-CAR T細胞(n = 7)、CAR T細胞(n = 8)、または無T細胞(n = 8)でマウスを生着した後、NALM-6腫瘍抗原投与を行った。括弧内の分数は、98日目までのマウス生存の割合を表す。\* P = 0.045(mIL15-CAR対CAR T細胞治療)、ログランク(マンテル・コックス)。

【図41D】図41A乃至41E。低抗原環境におけるmIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞の持続性及び抗腫瘍効果のIn vivoモデル評価。A)実験の概略。B)CAR<sup>+</sup> T細胞またはmIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞のいずれかの養子導入を受けた後、T細胞生着の6日後にCD19<sup>+</sup>Na1m-6腫瘍注入したマウスのT細胞(fffLuc<sup>+</sup>)BLI。C)Na1m-6負荷の縦方向BLIモニタリング。画像は、Na1m-6細胞由来rLuc活性からの光子束を表す。D)CAR<sup>+</sup> T細胞、mIL15<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> T細胞、または無T細胞のいずれかで処理したマウスの経時的な腫瘍光束(rLuc)。データは、平均±標準偏差である。\* \* \* \* P < 0.0001、一元配置ANOVA、n = 4~5。E)採取した組織及び血液の分析。ここで、ヒトT細胞(ヒトCD3<sup>+</sup>)及びNa1m-6腫瘍細胞(ヒトCD19<sup>+</sup>)をフローサイトメトリーにより検出した。E)低腫瘍モデルを用

10

20

30

40

50

いて、マウスの長期生存について98日目まで評価した。実験条件は、低腫瘍モデルについて前述したのと同様に行い、mIL15-CAR T細胞( $n=7$ )、CAR T細胞( $n=8$ )、または無T細胞( $n=8$ )でマウスを生着した後、NALM-6腫瘍抗原投与を行った。括弧内の分数は、98日目までのマウス生存の割合を表す。\*P=0.045(mIL15-CAR対CAR T細胞治療)、ログランク(マンテル・コックス)。

【図41E】図41A乃至41E。低抗原環境におけるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の持続性及び抗腫瘍効果のIn vivoモデル評価。A)実験の概略。B)CAR<sup>+</sup>T細胞またはmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のいずれかの養子導入を受けた後、T細胞生着の6日後にCD19<sup>+</sup>Nalm-6腫瘍注入したマウスのT細胞(ffluc<sup>+</sup>)BLI。C)Nalm-6負荷の縦方向BLIモニタリング。画像は、Nalm-6細胞由来rLuc活性からの光子束を表す。D)CAR<sup>+</sup>T細胞、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞、または無T細胞のいずれかで処理したマウスの経時的な腫瘍光束(rLuc)。データは、平均±標準偏差である。\*\*\*P<0.0001、一元配置ANOVA、n=4~5。E)採取した組織及び血液の分析。ここで、ヒトT細胞(ヒトCD3<sup>+</sup>)及びNalm-6腫瘍細胞(ヒトCD19<sup>+</sup>)をフローサイトメトリーにより検出した。E)低腫瘍モデルを用いて、マウスの長期生存について98日目まで評価した。実験条件は、低腫瘍モデルについて前述したのと同様に行い、mIL15-CAR T細胞( $n=7$ )、CAR T細胞( $n=8$ )、または無T細胞( $n=8$ )でマウスを生着した後、NALM-6腫瘍抗原投与を行った。括弧内の分数は、98日目までのマウス生存の割合を表す。\*P=0.045(mIL15-CAR対CAR T細胞治療)、ログランク(マンテル・コックス)。

【図41F】低抗原環境におけるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の持続性及び抗腫瘍効果のIn vivoモデル評価。A)実験の概略。B)CAR<sup>+</sup>T細胞またはmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のいずれかの養子導入を受けた後、T細胞生着の6日後にCD19<sup>+</sup>Nalm-6腫瘍注入したマウスのT細胞(ffluc<sup>+</sup>)BLI。C)Nalm-6負荷の縦方向BLIモニタリング。画像は、Nalm-6細胞由来rLuc活性からの光子束を表す。D)CAR<sup>+</sup>T細胞、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞、または無T細胞のいずれかで処理したマウスの経時的な腫瘍光束(rLuc)。データは、平均±標準偏差である。\*\*\*P<0.0001、一元配置ANOVA、n=4~5。E)採取した組織及び血液の分析。ここで、ヒトT細胞(ヒトCD3<sup>+</sup>)及びNalm-6腫瘍細胞(ヒトCD19<sup>+</sup>)をフローサイトメトリーにより検出した。E)低腫瘍モデルを用いて、マウスの長期生存について98日目まで評価した。実験条件は、低腫瘍モデルについて前述したのと同様に行い、mIL15-CAR T細胞( $n=7$ )、CAR T細胞( $n=8$ )、または無T細胞( $n=8$ )でマウスを生着した後、NALM-6腫瘍抗原投与を行った。括弧内の分数は、98日目までのマウス生存の割合を表す。\*P=0.045(mIL15-CAR対CAR T細胞治療)、ログランク(マンテル・コックス)。

【図42A】図42A乃至42E。抗原に依存しないmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の持続性及び保持機能。A)実験の概略。B)腫瘍抗原の不在下においてCAR<sup>+</sup>及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞で処理したマウスのffluc<sup>+</sup>T細胞のBLI。C)フローサイトメトリーにより検出した際の、ヒトCD3<sup>+</sup>T細胞及びCD19<sup>+</sup>腫瘍細胞の骨髄、脾臓、及び末梢血液の分析。代表的なフローブロット(左側パネル)及びヒトCD3<sup>+</sup>T細胞のプロット頻度(右側パネル)を示す。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*\*P=0.0027(骨髄)、\*\*P=0.0081(脾臓)、ns=無有意、対応なし $t$ 検定。D)T細胞光束(ffluc)の縦方向プロット。バックグラウンド発光(灰色陰影)は、ffluc<sup>+</sup>T細胞を受けていないマウスから得た光束で定義した。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*P=0.0128、\*\*P<0.00231、対応なし $t$ 検定。E)脾臓、肝臓、または骨髄から単離した細胞を、aAPC上でex vivo増殖させ、CD19<sup>-</sup>及びCD19<sup>+</sup>標的(前述したように)に応答した細胞内IFN産生を評価するための十分な細胞数を生成した。3つの組織源及び4匹のマウスからn=7である。ヒストグラムをCD3上でゲートした。

【図42B】図42A乃至42E。抗原に依存しないmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の持続性及び保持機能。A)実験の概略。B)腫瘍抗原の不在下においてCAR<sup>+</sup>及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞で処理したマウスのffluc<sup>+</sup>T細胞のBLI。C)フローサイトメトリーにより検出した際の、ヒトCD3<sup>+</sup>T細胞及びCD19<sup>+</sup>腫瘍細胞の骨髄、脾臓、及び末梢血液の分析。代表的なフローブロット(左側パネル)及びヒトCD3<sup>+</sup>T細胞のプロット頻度(右側パネル)を示す。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*\*P=0.0027(骨髄)、\*\*P=0.0081(脾臓)、ns=無有意、対応なし $t$ 検定。D)T細胞光束(ffluc)の縦方向プロット。バックグラウンド発光(灰色陰影)は、ffluc<sup>+</sup>T細胞を受けていないマウスから得た光束で定義した。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*P=0.0128、\*\*P<0.00231、対応なし $t$ 検定。E)脾臓、肝臓、または骨髄から単離した細胞を、aAPC上でex vivo増殖させ、CD19<sup>-</sup>及びCD19<sup>+</sup>標的(前述したように)に応答した細胞内IFN産生を評価するための十分な細胞数を生成した。3つの組織源及び4匹のマウスからn=7である。ヒストグラムをCD3上でゲートした。

【図42C】図42A乃至42E。抗原に依存しないmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の持続性及び保持機能。A)実験の概略。B)腫瘍抗原の不在下においてCAR<sup>+</sup>及びmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞で処理したマウスのffluc<sup>+</sup>T細胞のBLI。C)フローサイトメトリーにより検出した際の、ヒトCD3<sup>+</sup>T細胞及びCD19<sup>+</sup>腫瘍細胞の骨髄、脾臓、及び末梢血液の分析。代表的なフローブロット(左側パネル)及びヒトCD3<sup>+</sup>T細胞のプロット頻度(右側パネル)を示す。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*\*P=0.0027(骨髄)、\*\*P=0.0081(脾臓)、ns=無有意、対応なし $t$ 検定。D)T細胞光束(ffluc)の縦方向プロット。バックグラウンド発光(灰色陰影)は、ffluc<sup>+</sup>T細胞を受けていないマウスから得た光束で定義した。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*P=0.0128、\*\*P<0.00231、対応なし $t$ 検定。E)脾臓、肝臓、または骨髄から単離した細胞を、aAPC上でex vivo増殖させ、CD19<sup>-</sup>及びCD19<sup>+</sup>標的(前述したように)に応答した細胞内IFN産生を評価するための十分な細胞数を生成した。3つの組織源及び4匹のマウスからn=7である。ヒストグラムをCD3上でゲートした。

10

20

30

40

50

性及び保持機能。A) 実験の概略。B) 腫瘍抗原の不在下においてCAR+及びmIL15+CAR+T細胞で処理したマウスのffLuc+T細胞のBLI。C) フローサイトメトリーにより検出した際の、ヒトCD3+T細胞及びCD19+腫瘍細胞の骨髓、脾臓、及び末梢血液の分析。代表的なフロープロット(左側パネル)及びヒトCD3+T細胞のプロット頻度(右側パネル)を示す。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*\*P=0.0027(骨髓)、\*\*P=0.0081(脾臓)、ns=無有意、対応なし $t$ 検定。D) T細胞光束(ffLuc)の縦方向プロット。バックグラウンド発光(灰色陰影)は、ffLuc+T細胞を受けていないマウスから得た光束で定義した。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*P=0.0128、\*\*P+0.00231、対応なし $t$ 検定。E) 脾臓、肝臓、または骨髓から単離した細胞を、aAPC上でex vivo増殖させ、CD19-及びCD19+標的(前述したように)に応答した細胞内IFN産生を評価するための十分な細胞数を生成した。3つの組織源及び4匹のマウスからn=7である。ヒストグラムをCD3上でゲートした。

【図42C】図42A乃至42E。抗原に依存しないmIL15+CAR+T細胞の持続性及び保持機能。A) 実験の概略。B) 腫瘍抗原の不在下においてCAR+及びmIL15+CAR+T細胞で処理したマウスのffLuc+T細胞のBLI。C) フローサイトメトリーにより検出した際の、ヒトCD3+T細胞及びCD19+腫瘍細胞の骨髓、脾臓、及び末梢血液の分析。代表的なフロープロット(左側パネル)及びヒトCD3+T細胞のプロット頻度(右側パネル)を示す。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*\*P=0.0027(骨髓)、\*\*P=0.0081(脾臓)、ns=無有意、対応なし $t$ 検定。D) T細胞光束(ffLuc)の縦方向プロット。バックグラウンド発光(灰色陰影)は、ffLuc+T細胞を受けていないマウスから得た光束で定義した。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*P=0.0128、\*\*P+0.00231、対応なし $t$ 検定。E) 脾臓、肝臓、または骨髓から単離した細胞を、aAPC上でex vivo増殖させ、CD19-及びCD19+標的(前述したように)に応答した細胞内IFN産生を評価するための十分な細胞数を生成した。3つの組織源及び4匹のマウスからn=7である。ヒストグラムをCD3上でゲートした。

【図42D】図42A乃至42E。抗原に依存しないmIL15+CAR+T細胞の持続性及び保持機能。A) 実験の概略。B) 腫瘍抗原の不在下においてCAR+及びmIL15+CAR+T細胞で処理したマウスのffLuc+T細胞のBLI。C) フローサイトメトリーにより検出した際の、ヒトCD3+T細胞及びCD19+腫瘍細胞の骨髓、脾臓、及び末梢血液の分析。代表的なフロープロット(左側パネル)及びヒトCD3+T細胞のプロット頻度(右側パネル)を示す。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*\*P=0.0027(骨髓)、\*\*P=0.0081(脾臓)、ns=無有意、対応なし $t$ 検定。D) T細胞光束(ffLuc)の縦方向プロット。バックグラウンド発光(灰色陰影)は、ffLuc+T細胞を受けていないマウスから得た光束で定義した。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*P=0.0128、\*\*P+0.00231、対応なし $t$ 検定。E) 脾臓、肝臓、または骨髓から単離した細胞を、aAPC上でex vivo増殖させ、CD19-及びCD19+標的(前述したように)に応答した細胞内IFN産生を評価するための十分な細胞数を生成した。3つの組織源及び4匹のマウスからn=7である。ヒストグラムをCD3上でゲートした。

【図42E】図42A乃至42E。抗原に依存しないmIL15+CAR+T細胞の持続性及び保持機能。A) 実験の概略。B) 腫瘍抗原の不在下においてCAR+及びmIL15+CAR+T細胞で処理したマウスのffLuc+T細胞のBLI。C) フローサイトメトリーにより検出した際の、ヒトCD3+T細胞及びCD19+腫瘍細胞の骨髓、脾臓、及び末梢血液の分析。代表的なフロープロット(左側パネル)及びヒトCD3+T細胞のプロット頻度(右側パネル)を示す。データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*\*P=0.0027(骨髓)、\*\*P=0.0081(脾臓)、ns=無有意、対応なし $t$ 検定。D) T細胞光束(ffLuc)の縦方向プロット。バックグラウンド発光(灰色陰影)は、ffLuc+T細胞を受けていないマウスから得た光束で定義した。

データは、平均±標準偏差として表し、n=5である。\*P=0.0128、\*\*P<0.00231、対応なし $t$ 検定。E)脾臓、肝臓、または骨髄から単離した細胞を、aAPC上でex vivo増殖させ、CD19-及びCD19+標的(前述したように)に応答した細胞内IFN産生を評価するための十分な細胞数を生成した。3つの組織源及び4匹のマウスからn=7である。ヒストグラムをCD3上でゲートした。

【図43】mRNAとして提供されるSBトランスポゼースを用いたCAR-T細胞作製用のプロトコルの一例を示す概略。有効量の活性CAR-T細胞は、2週間またはそれ以内(例えば、16日)で作製することができた。

【図44A】図44A乃至44D。図44A、CARを安定的に発現するT細胞の百分率が、9日目(8.3%)~16日目(66.2%)に有意に増加することを示すグラフ(左側パネル)及びフローサイトメトリーヒストグラム(右側パネル)。図44B、T細胞が急速に増殖し、エレクトロポレーション後16日目に20倍に増加することを示すグラフ。図44C、16日目のT細胞を用いたクロム遊離アッセイからの結果を示すグラフ。作製されたCAR-T細胞は、標的細胞に対してCD-19特異的細胞毒性をもたらした(左側パネル)。本質的に、非改変T細胞には細胞毒性活性が見られなかった(右側パネル)。図44D、エレクトロポレーション後9日目(左側パネル)及び17日目(右側パネル)のセントラルメモリーT細胞数(Tcm)を示すフローサイトメトリーヒストグラム。これらの研究用の細胞は、#0として指名されたドナーから得、SB11 mRNAをエレクトロポレーションで用いた。

【図44B】図44A乃至44D。図44A、CARを安定的に発現するT細胞の百分率が、9日目(8.3%)~16日目(66.2%)に有意に増加することを示すグラフ(左側パネル)及びフローサイトメトリーヒストグラム(右側パネル)。図44B、T細胞が急速に増殖し、エレクトロポレーション後16日目に20倍に増加することを示すグラフ。図44C、16日目のT細胞を用いたクロム遊離アッセイからの結果を示すグラフ。作製されたCAR-T細胞は、標的細胞に対してCD-19特異的細胞毒性をもたらした(左側パネル)。本質的に、非改変T細胞には細胞毒性活性が見られなかった(右側パネル)。図44D、エレクトロポレーション後9日目(左側パネル)及び17日目(右側パネル)のセントラルメモリーT細胞数(Tcm)を示すフローサイトメトリーヒストグラム。これらの研究用の細胞は、#0として指名されたドナーから得、SB11 mRNAをエレクトロポレーションで用いた。

【図44C】図44A乃至44D。図44A、CARを安定的に発現するT細胞の百分率が、9日目(8.3%)~16日目(66.2%)に有意に増加することを示すグラフ(左側パネル)及びフローサイトメトリーヒストグラム(右側パネル)。図44B、T細胞が急速に増殖し、エレクトロポレーション後16日目に20倍に増加することを示すグラフ。図44C、16日目のT細胞を用いたクロム遊離アッセイからの結果を示すグラフ。作製されたCAR-T細胞は、標的細胞に対してCD-19特異的細胞毒性をもたらした(左側パネル)。本質的に、非改変T細胞には細胞毒性活性が見られなかった(右側パネル)。図44D、エレクトロポレーション後9日目(左側パネル)及び17日目(右側パネル)のセントラルメモリーT細胞数(Tcm)を示すフローサイトメトリーヒストグラム。これらの研究用の細胞は、#0として指名されたドナーから得、SB11 mRNAをエレクトロポレーションで用いた。

【図44D】図44A乃至44D。図44A、CARを安定的に発現するT細胞の百分率が、9日目(8.3%)~16日目(66.2%)に有意に増加することを示すグラフ(左側パネル)及びフローサイトメトリーヒストグラム(右側パネル)。図44B、T細胞が急速に増殖し、エレクトロポレーション後16日目に20倍に増加することを示すグラフ。図44C、16日目のT細胞を用いたクロム遊離アッセイからの結果を示すグラフ。作製されたCAR-T細胞は、標的細胞に対してCD-19特異的細胞毒性をもたらした(左側パネル)。本質的に、非改変T細胞には細胞毒性活性が見られなかった(右側パネル)。図44D、エレクトロポレーション後9日目(左側パネル)及び17日目(右側パネル)のセントラルメモリーT細胞数(Tcm)を示すフローサイトメトリーヒストグラ

10

20

30

40

50

ム。これらの研究用の細胞は、#0として指名されたドナーから得、S B 1 1 m R N A をエレクトロポレーションで用いた。

【図45A】図45A及び45B。図45A、9日目（上側パネル）及び15日目（下側パネル）のT細胞を用いたクロム遊離アッセイからの結果を示すグラフ。作製されたC A R T細胞は、標的細胞に対してC D - 1 9特異的細胞毒性をもたらした（左側パネル）。本質的に、非改変T細胞には細胞毒性活性が見られなかった（右側パネル）。改変T細胞は、異なるC A R陽性細胞数にかかわらず、同様の効率で9日目及び15日目にC D 1 9陽性標的細胞を殺傷する。図45B、電気穿孔細胞内のC A Rコピー数（左側パネル）及びC A R発現（右側パネル）を示すグラフ。C A R DNAコピー数は、15日目から22日目に1.5から0.9に減少し、その時点以後は安定していることを結果は示している。これらの研究用の細胞は、#1として指名されたドナーから得、S B 1 0 0 x m R N A をエレクトロポレーションで用いた。 10

【図45B】図45A及び45B。図45A、9日目（上側パネル）及び15日目（下側パネル）のT細胞を用いたクロム遊離アッセイからの結果を示すグラフ。作製されたC A R T細胞は、標的細胞に対してC D - 1 9特異的細胞毒性をもたらした（左側パネル）。本質的に、非改変T細胞には細胞毒性活性が見られなかった（右側パネル）。改変T細胞は、異なるC A R陽性細胞数にかかわらず、同様の効率で9日目及び15日目にC D 1 9陽性標的細胞を殺傷する。図45B、電気穿孔細胞内のC A Rコピー数（左側パネル）及びC A R発現（右側パネル）を示すグラフ。C A R DNAコピー数は、15日目から22日目に1.5から0.9に減少し、その時点以後は安定していることを結果は示している。これらの研究用の細胞は、#1として指名されたドナーから得、S B 1 0 0 x m R N A をエレクトロポレーションで用いた。 20

【図46】エレクトロポレーション後の細胞生存率を示すフローサイトメトリーデータ。DNA / m R N A でエレクトロポレーション後、全細胞数はまず減少し（1日目及び2日目）、その後、細胞は増殖し始める。セロメーターカウントによれば、細胞数は、エレクトロポレーション後2日目に59% ~ 76%まで減少する（生存率24 ~ 41%）。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0034】

所望の特異性を有するように遺伝子改変されたT細胞を受けた患者における抗腫瘍効果が、臨床試験により実証されている。ここで、c G M Pに従って抗原特異的C A R<sup>+</sup>T細胞を製造する新規のアプローチについて詳述する。システムは、トランスポゾン及びトランスポゼスシステムC A R遺伝子組み込と併用して、高効率のトランスフェクションシステムを用いる。臨床等級C A R<sup>+</sup>T細胞が追加のウイルス配列を好ましくは含むべきではないため、これらの非ウイルスアプローチは、ウイルス媒介形質導入に代わる方法として著しい利点を有する。高品質のc G M P C A R T細胞は、スリーピングビューティまたはp i g g y B a c由来などのトランスポゾンシステム由来のDNAプラスミドの電気導入、及びa A P C上の遺伝子改変T細胞の増殖により達成した。これらの標的抗原（例えば、C D 1 9）に特異性を示したC A R<sup>+</sup>T細胞を臨床的に魅力的な数に増殖することが、本アプローチによりもたらされた。重要なのは、臨床試験で用いるためにF D Aにより確立された放出基準を細胞が満たしたことである。ウイルス媒介形質導入による遺伝毒性、及びウイルスの使用による免疫原性が、これらの方法により回避される。 30

##### 【0035】

キメラ抗原受容体（C A R）は、ヒト白血球抗原（H L A）に依存しない細胞表面腫瘍関連抗原を認識し、殺傷、増殖、及びサイトカイン産生用の遺伝子改変T細胞を活性化するために1つ以上のシグナル伝達分子を用いる（J e n a l a 、 2 0 1 0 ）。C A Rを発現するT細胞の養子導入は、複数の臨床試験で効果を発揮している。臨床等級遺伝子改変T細胞を製造するためにモジュラーアプローチを用いることが可能である。ある実施形態では、本明細書で開示されているプラットフォーム技術は、（i）エレクトロポレーション装置（例えば、ヌクレオフェクター）を用いた非ウイルス遺伝子導入、（ii）転位（例えば、S Bトランスポゾン、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,489, 40

458号を参照されたい)、(iii)エンドドメインを介して伝達するCAR(例えば、CD28/CD3-、CD137/CD3-、または他の組み合わせ)、(iv)抗原認識ドメインを細胞表面に連結させる可変長の細胞外ドメインを持つCAR、場合によつては、(v)CAR<sup>+</sup>T細胞ロバストかつ数値的に増殖させることが可能な、K562由来の人工抗原提示細胞(aAPC)(Singhら、2008; Singhら、2011; Huangら、2012)を含む。

#### 【0036】

いくつかの実施形態では、現時点で開示されたプロセスを用いて、末梢血液及び/または臍帯血由来のT細胞を遺伝的に改変し、aAPCを用いてin vitroで数値的に増殖させることが可能なCARを発現することができる(Singhら、2008; Singhら、2011)。このプロセスは、DNAプラスミド産生、エレクトロポレーション、解凍済照射マスターバンクaAPCの使用が比較的容易なことにより、細胞及び遺伝子治療に対する影響があり、かつ、フェーズI/II試験用の現行の医薬品製造管理及び品質管理基準(cGMP)に従つて動作する施設に容易に移すことができる。T細胞を製造する開示の方法は、(i)ウイルス形質導入または(ii)裸のDNAエレクトロポレーションを使用せずに、PBMC/LCLフィーダー層上で急速に増殖する点において少なくとも特有である。一例として、HLAに依存せずにCD19を認識するCARの強制発現を介してCD19を標的にする方法を開示する。これらのT細胞は、無菌状態、表現型、生存率、及び細胞数で定義した放出基準を満たす。電気穿孔した/増殖させたT細胞が、メモリー/ナイーブ集団中でCARを発現し、正常核型の保存TCR Vレパートリーを有し、かつCAR依存的にCD19<sup>+</sup>腫瘍標的を認識し溶解することが可能であることが、処理中試験により分かった。

#### 【0037】

組み換えGMP級のウイルスのおおよそ1/10のコストでDNA種を臨床等級に作製することができるため、非ウイルスプラスミドの電気導入は、形質導入の魅力的な代替選択肢である。組み込み効率を改善するため、発明者らは、ヒト応用のためのスリーピングビューティ(SB)トランスポゾン及びトランスポゼースを適合させた(Aronovichら、2011; Hackettら、2010; Izsvakら、2010; Kebriaeiら、2012; Williams、2008)。さらに、発明者らは、CARの発現を強制するためにpiggy Bacトランスポゾン/トランスポゼースシステムを使用した(Manuriら、2010)。発明者のSB系は、注目の遺伝子(例えば、指定CD19RCDF28などの第2世代CD19特異的CAR導入遺伝子)及びトランスポゼース(例えば、SB11)のトランスポゾンコーディングを含む2つのDNAプラスミドを使用し、これにより、導入遺伝子を標的細胞ゲノム中のTAジヌクレオチド反復に挿入する(Geurttsら、2006; Ivicsら、1997; Izsvak及びIvics、1997)。治療潜在力を改善するため、発明者の第2世代CAR(Kowolikら、2006)は、これによりT細胞増殖を維持し、in vivoでエフェクター機能が再循環されるという見込みで、CD28及びCD3-を介してシグナルを送る。さらに、細胞外長さが変わり、かつ異なるエンドドメインシグナル伝達モチーフを持つCARは、SB系を用いて発現することができる。

#### 【0038】

T細胞を回収するため、CAR、K562 aAPC(クローン#4)を安定的に発現する組み込み体を開発し、CD86、CD137L、膜結合型バージョンのインターロイキン(IL)-15(改変IgG4Fc領域に融合したペプチドまたはIL-15受容体

に融合したサイトカインペプチド)、及びCD64(Fc-受容体1)などの共刺激分子と共に所望の抗原(例えば、CD19)を発現し、CAR媒介増殖を維持することができるT細胞をin vitroで選択した。この強力な技術により、ヒト応用に適した臨床的に意義のある数(最大10<sup>10</sup>)のCAR<sup>+</sup>T細胞の製造が可能となった。必要に応じて、より大きな数の遺伝子改変T細胞を生成するために追加の刺激サイクルを実施することができる。さらに、より少数のCAR<sup>+</sup>T細胞が必要な場合、エレクトロポレーシ

10

20

30

40

50

ヨン及び増殖のアプローチにより、より少数のキュベットを用い、かつ、a A P C（各刺激サイクルの開始時に追加）上で0回、1回、またはそれ以上の増殖ラウンドで数値的に増殖させたT細胞のサブセットのみを繰り越すことで規模を小さくすることができる。一般に、増殖させたT細胞の少なくとも90%がC A Rを発現し、注入用に凍結保存される。さらに、このアプローチを利用して、導入されたC A Rの特異性を、a A P C上のC A Rにより認識された腫瘍関連抗原（T A A）の発現と対応させることで多様な腫瘍型に対するT細胞を生成することができる。e x v i v o 増殖プラットフォームは、N K細胞、N K T細胞、及びT細胞の製造にも適合されている。

## 【0039】

第2世代C A Rを発現するC D 4<sup>+</sup>及びC D 8<sup>+</sup>T細胞の増殖には、幹細胞/メモリー/ナイーブ表現型を持つ細胞が含まれ、再指向特異性の3つの特徴を示す。まず、遺伝子改変T細胞は、C D 1 9<sup>+</sup>標的を特異的に溶解する。第2に、遺伝子改変T細胞は、C D 1 9<sup>+</sup>刺激細胞に応答してサイトカイン（例えば、I F N - ）を产生する。第3に、遺伝子改変T細胞は、全てC A R依存的にC D 1 9<sup>+</sup>刺激に応答して増殖する（S i n g h ら、2 0 1 1；S i n g h ら、2 0 0 8）。a A P C及び組織培養環境（例えば、I L - 2 1の追加）は、造血幹細胞移植後に注入するための患者-及びドナー-由来C D 1 9特異的T細胞を生成するために改変されている（S i n g h ら、2 0 1 1；S i n g h ら、2 0 0 8）。発明者らは、静脈穿刺により簡単に得られた末梢血液からC A R<sup>+</sup>T細胞を作製することができ、これにより、アフェレーシスにより単核球を得るコスト、不快感、及び不便さを回避する。少数の単核球から多数のC A R<sup>+</sup>T細胞を生じる能力は、同種臍帯血移植後にT細胞を注入するのに特に魅力的である。サイズの小さいかつ匿名の新生児ドナーは、後の時点での個体への再アクセスを不可能にし、限られた数の採取単核球しか、造血障害を避けるためにT細胞製造用の出発物質として入手できない。さらに、製造プロセスの進歩には、取り扱いを最小限にするために、完全閉鎖型のW A V Eバイオリアクターと連結した高スループットエレクトロポレーション装置が含まれる。

## 【0040】

本製造アプローチには、作業負荷を軽減するための処理及び培養システム、並びに無菌状態の破損に対する対抗手段の実施が含まれる。この目的のために、発明者らは、フラスコではなくバイオリアクター及び/またはバッグ内でT細胞を照射a A P Cと共に培養した。この遷移は、一般に、エレクトロポレーションしてから14日後に生じる。さらに、原材料としてのa A P Cをバイオリアクター及び/またはバッグ内で数値的に増殖させ、発明者らは、凍結保存用にa A P Cを処理するためにS e p a x装置を適合させた。S e p a x採取手順は、マニュアル処理により要求される追加の遠心分離工程を軽減するため、大量の培養培地（> 9 0 0 m L）を用いる際に自動化よりもさらなる利点を有する。

## I. 定義

## 【0041】

本明細書で使用する場合、用語「キメラ抗原受容体（C A R）」とは、例えば、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、またはキメラ免疫受容体のことを言い、特定の免疫エフェクター細胞の上に人工特異性を移植する遺伝子操作された受容体を包含する。C A Rを用いて、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に与えることで、多数の特異的T細胞を、例えば、養子細胞療法で用いるために生成することができる。特定の実施形態では、C A Rは、細胞の特異性を、例えば、腫瘍関連抗原に仕向ける。いくつかの実施形態では、C A Rは、細胞内活性化ドメイン、膜貫通領域、及び腫瘍関連抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含む。特定の態様では、C A Rは、C D 3 ゼータ膜貫通領域及びエンドドメインに融合した、モノクローナル抗体由来の単鎖可変断片（s c F v）の融合を含む。他のC A R設計の特異性は、受容体（例えば、ペプチド）のリガンド由来またはデクチンなどのパターン認識受容体由来であってもよい。特定の実施形態では、B系列分子であるC D 1 9に特異的なC A Rを用いることによりT細胞の特異性を再指向することで悪性腫瘍B細胞を標的にすることができる。場合によっては、抗原認識ドメインの間隔を改変することで、活性化誘発性の細胞死を減少させることができる。場合によっては、C A Rは、C

10

20

30

40

50

D3ゼータ、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10、及び/またはOX40などの、追加の共刺激シグナル伝達用ドメインを含む。場合によっては、分子は、共刺激分子を含むCAR、イメージング(例えば、陽電子放射断層撮影法)用のレポーター遺伝子、プロドラッグの追加時にT細胞を条件付きでアブレーションする遺伝子産物、ホーミング受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカイン、及びサイトカイン受容体と共に発現させることができる。

【0042】

本明細書で使用する場合、用語「T細胞受容体(TCR)」とは、いくつかの細胞では、該TCRは、ガンマ及びデルタ(γ/δ)鎖からなるが、アルファ(α)及びベータ(β)鎖のヘテロダイマーからなるT細胞上のタンパク質受容体のことを言う。本発明の実施形態では、TCRは、TCRを含む任意の細胞、例えば、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、及びガンマデルタT細胞上で改変されていてもよい。10

【0043】

用語「腫瘍関連抗原」及び「がん細胞抗原」とは、本明細書では交換可能に使用される。それぞれの場合において、用語は、がん細胞により特異的または優先的に発現されるタンパク質、糖タンパク質、または糖質のことを言う。

I I . キメラ抗原受容体

【0044】

本明細書中で使用される場合、用語「抗原」とは、抗体またはT細胞受容体に結合することが可能な分子である。抗原はさらに、体液性免疫応答及び/または細胞性免疫応答を誘導し、B及び/またはTリンパ球の産生をもたらすことができる。20

【0045】

本発明の実施形態は、核酸、例えば、1つ以上のシグナル伝達モチーフを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、膜貫通領域、及び細胞外ドメインを含む、免疫原性(hCAR)を減らすためヒト化されているCARを含む抗原特異的キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドをコードする核酸を伴う。ある実施形態では、CARは、1つ以上の抗原間の共用空間からなるエピトープを認識してもよい。デクチン-1などのパターン認識受容体を用いて、糖鎖抗原に対する特異性を引き出してもよい。ある実施形態では、結合領域は、モノクローナル抗体の相補性決定領域、モノクローナル抗体の可変領域、及び/またはその抗原結合断片を含み得る。別の実施形態では、その特異性は、受容体に結合するペプチド(例えば、サイトカイン)由来である。相補性決定領域(CDR)は、抗原を補足することで、その特定の抗原に対する特異性を持つ受容体を提供する抗原受容体(例えば、免疫グロブリン及びT細胞受容体)タンパク質の可変ドメインで見られる短アミノ酸配列である。抗原受容体の各ポリペプチド鎖は、3つのCDR(CDR1、CDR2、及びCDR3)を含有する。抗原受容体は一般に、2つのポリペプチド鎖からなるため、抗原と接触することが可能な各抗原受容体には6つのCDRが存在し、重鎖及び軽鎖の各々は、3つのCDRを含有する。免疫グロブリン及びT細胞受容体と関連する配列変異のほとんどは、CDRで見つかるため、これらの領域は、超可変ドメインと言われることもある。これらのうち、CDR3は、VJ(重鎖及びTCR鎖の場合におけるVDJ)領域の組み換えによりコードされるため、最も大きな可変性を示す。30

【0046】

ヒトCAR核酸は、ヒト患者に対する細胞性免疫療法を高めるためのヒト遺伝子であると考えられる。特定の実施形態では、本発明は、全長CAR cDNAまたはコード領域を含む。抗原結合領域またはドメインは、特定のヒトモノクローナル抗体由来の単鎖可変断片(scFv)のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>鎖の断片を含み得、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,109,304号に記載されるものである。断片は、ヒト抗原特異的抗体の任意の数の異なる抗原結合ドメインであってもよい。さらに特定の実施形態では、断片は、ヒト細胞内で発現するためのヒトコドン使用頻度を最適化する配列によりコードされる抗原特異的scFvである。40

## 【0047】

配置は、ダイアボディまたはマルチマーなどの多重結合であってもよい。マルチマーは、軽鎖及び重鎖の可変部分を、Wintersによりダイアボディと言われているものに交差対合させることで最も形成されやすい。構築物のヒンジ部分は、完全に欠失しているものから、第1システインが維持されているもの、セリン置換ではなくプロリン、第1システインまで切断されているものまで多数の代替選択肢を有し得る。Fc部分は、欠失していてもよい。安定であり及び/または二量化する任意のタンパク質は、この目的を果たし得る。Fcドメインの1つのみ、例えば、ヒト免疫グロブリンからのCH2またはCH3ドメインのいずれかを使用してもよい。二量化を改善するために改変されているヒト免疫グロブリンのヒンジ、CH2、及びCH3領域を使用してもよい。免疫グロブリンのヒンジ部分のみを使用してもよい。CD8の一部分を使用してもよい。

10

## 【0048】

本発明のキメラ受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、キメラ受容体が中に入れられている免疫細胞の正常エフェクター機能の少なくとも1つを活性化する役割を担っている。用語「エフェクター機能」とは、分化細胞の特殊化した機能のことを言う。例えば、T細胞のエフェクター機能は、サイトカインの分泌を含む細胞溶解活性またはヘルパー活性であってもよい。ナイーブ、メモリー、またはメモリー型のT細胞におけるエフェクター機能は、抗原依存性増殖を含む。従って、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」とは、エフェクター機能シグナルを形質導入し、特殊化した機能を行うように細胞を仕向けるタンパク質の部分のことを言う。通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体が用いられるが、多くの場合、細胞内ポリペプチド全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分の利用を見出す程度まで、そのような切断部分は、エフェクター機能シグナルを依然として形質導入する限り、無傷鎖の代わりに使用してもよい。従って、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」とは、エフェクター機能シグナルを形質導入するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断部分を含むことを意味する。例としては、T細胞受容体のゼータ鎖またはその任意のホモログ（例えば、エータ、デルタ、ガンマ、またはイプシロン）、MB1鎖、B29、Fc RIII、Fc RI、及びシグナル伝達分子の組み合わせ、例えば、CD3及びCD28、CD27、4-1BB、DAP-10、OX40、及びその組み合わせ、並びに他の同様の分子及び断片が挙げられる。活性化タンパク質ファミリーの他のメンバーの細胞内シグナル伝達部分、例えば、Fc RIII及びFc RIを使用してもよい。これらの代替膜貫通及び細胞内ドメインを用いたcTCRの開示については、Grossら（1992）、Stancovskil（1993）、Moritzら（1994）、Hwuら（1995）、Weijtensら（1996）、及びHekele（1996）を参照されたい。好ましい実施形態では、ヒトCD3細胞内ドメインを活性化に用いた。

20

## 【0049】

抗原特異的細胞外ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトIgG<sub>4</sub>Fcヒンジ及びFc領域などの膜貫通領域により結合してもよい。代替物としては、ヒトCD4膜貫通領域、ヒトCD28膜貫通領域、膜貫通ヒトCD3ドメイン、またはシステイン変異ヒトCD3ドメイン、もしくはCD16及びCD8及びエリスロポエチン受容体などの他のヒト膜貫通シグナル伝達タンパク質からの他の膜貫通領域が挙げられる。

30

## 【0050】

いくつかの実施形態では、CAR核酸は、膜貫通領域及び改変CD28細胞内シグナル伝達ドメインなどの他の共刺激受容体をコードする配列を含む。他の共刺激受容体としては、限定的ではないが、1つ以上のCD28、CD27、OX-40（CD134）、DAP10、及び4-1BB（CD137）が挙げられる。CD3主導の一次シグナルに加えて、ヒトCARに挿入されたヒト共刺激受容体により提供された追加のシグナルは、T細胞の完全活性化にとって重要であり、in vivo持続性、及び養子免疫療法による治療の成功を改善するのに役立ち得る。

40

## 【0051】

50

特定の実施形態では、本発明は、CARをコードするDNA配列を組み込んだ単離核酸セグメント及び発現カセットに関する。本発明のベクターは、主として、調節真核生物プロモーター、例えば、MNDU3プロモーター、CMVプロモーター、EF1プロモーター、またはユビキチンプロモーターの制御下で、所望の遺伝子を免疫細胞、好ましくはT細胞に送達するように設計されている。ベクターは、他には何の理由がなくとも、これらのin vitro操作を促進するための選択可能なマーカーを含んでいてもよい。他の実施形態では、CARは、DNA鑄型からin vitro転写したmRNAから発現することができる。

## 【0052】

キメラ抗原受容体分子は、組み換えであり、抗原に結合する能力と、これらの細胞質尾部に存在する免疫受容体活性化モチーフ(ITAM)を介して活性化シグナルを形質導入する能力の両方により区別される。抗原結合部分(例えば、単鎖抗体(sCFv)から生成)を利用した受容体構築物は、HLAに依存しない形で標的細胞表面上の天然抗原に結合する「万能」であるという追加の利点を有する。例えば、いくつかの研究所は、CD3複合体のゼータ鎖( )、Fc受容体ガンマ鎖、及びskyチロシンキナーゼの細胞内部分をコードする配列に融合したsCFv構築物について報告している(Eshharら、1993; Fitzer-Attasら、1998)。CTLによる腫瘍認識及び溶解を含む再指向T細胞エフェクター機構は、いくつかのマウス及びヒト抗原-sCFv:系で裏付けられている(Eshhar、1997; Alten Schmidtら、1997; Brockerら、1998)。

## 【0053】

今まで、キメラ抗原受容体の構築には、非ヒト抗原結合領域が一般に用いられる。マウスモノクローナル抗体などの非ヒト抗原結合領域を用いることの潜在的な問題は、ヒトエフェクター機能性の欠如と、腫瘍塊に貫通できないことである。言い換えると、そのような抗体は、補体依存性の溶解を媒介するか、または抗体依存性細胞毒性もしくはFc受容体媒介食作用を介してヒト標的細胞を溶解して、CARを発現する細胞を破壊することができない場合がある。さらに、非ヒトモノクローナル抗体は、異種タンパク質としてヒト宿主により認識されるため、そのような異種抗体を繰り返し注入することで、有害な過敏性反応をもたらす免疫応答を誘導することができる。マウスに基づくモノクローナル抗体では、これは、ヒト抗マウス抗体(HAMA)応答と呼ばれることが多い。従って、ヒト抗体はマウス抗体ほど強いHAMA応答を引き起こさないため、ヒト抗体の使用がより好ましい。同様に、CAR内にヒト配列を使用することで、免疫介在性認識を回避できることにより、受容者に存在し、かつ、HLAとの関連において処理抗原を認識する内因性T細胞を排除することができる。

## 【0054】

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、抗原結合領域を含むa)細胞内シグナル伝達ドメイン、b)膜貫通領域、及びc)細胞外ドメインを含む。

## 【0055】

特定の実施形態では、CARの細胞内受容体シグナル伝達ドメインには、例えば、CD3のゼータ鎖、Fc R III共刺激シグナル伝達ドメイン、CD28、CD27、DAP10、CD137、OX40、CD2を単独もしくはCD3ゼータと組み合わせた、T細胞抗原受容体複合体のものが挙げられる。特定の実施形態では、細胞内ドメイン(細胞質ドメインとも呼ばれる)は、1つ以上のTCRゼータ鎖、CD28、CD27、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc RI、ICOS/CD278、IL-2R/CD122、IL-2R/CD132、DAP10、DAP12、及びCD40の一部または全部を含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインにおける内因性T細胞受容体複合体のどこか一部を用いる。いわゆる第3世代CARは、例えば、相加もしくは相乗効果のために一緒に融合した少なくとも2つまたは3つのシグナル伝達ドメインを有するので、1つまたは複数の細胞質ドメインを使用してもよい。

## 【0056】

10

20

30

40

50

キメラ抗原受容体のある実施形態では、受容体（抗原結合領域を含む細胞外ドメインとも呼ばれる）の抗原特異的部分は、腫瘍関連抗原、またはデクチン-1などのパターン認識受容体により認識された糖鎖抗原を含む病原体特異的抗原結合ドメインを含む。腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞の細胞表面上で発現する限り任意の種類であってもよい。腫瘍関連抗原の例示実施形態としては、CD19、CD20、がん胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮腫瘍抗原、メラノーマ関連抗原、変異p53、変異rasなどが挙げられる。ある実施形態では、CARは、膜結合型サイトカインと共に発現させて、少量の腫瘍関連抗原が存在する場合の持続性を改善することができる。例えば、CARは、膜結合型IL-15と共に発現させることができる。

10

#### 【0057】

ある実施形態では、HA-1、スルビシン、WT1、及びp53などの細胞内腫瘍関連抗原を標的にしてもよい。これは、HLAとの関連において細胞内腫瘍関連抗原から説明した処理ペプチドを認識する万能T細胞上で発現したCARにより達成することができる。さらに、万能T細胞を遺伝子改変し、HLAとの関連において細胞内処理腫瘍関連抗原を認識するT細胞-受容体ペアを発現してもよい。

#### 【0058】

病原体は、任意の種類であってもよいが、特定の実施形態では、病原体は、例えば、真菌、細菌、またはウイルスである。例示ウイルス病原体としては、アデノウイルス科、エンタシス・バーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、JCウイルス、BKウイルス、HSV、ウイルスのHHV科、ピコルナウイルス科、ヘルペスウイルス科、ヘパドナウイルス科、フラビウイルス科、レトロウイルス科、オルトミクソウイルス科、パラミクソウイルス科、パボバウイルス科、ポリオーマウイルス、ラブドウイルス科、及びトガウイルス科のものが挙げられる。例示病原性ウイルスは、天然痘、インフルエンザ、おたふく風邪、麻疹、水痘、エボラ、及び風疹を引き起こす。例示病原性真菌としては、カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカス、ヒストプラスマ、ニューモシスチス、及びスタキボトリスが挙げられる。例示病原性細菌としては、連鎖球菌、シュードモナス菌、シゲラ、カンピロバクター、ブドウ球菌、ヘリコバクター、大腸菌、リケッチャ、バチルス、ボルデテラ、クラミジア、スピロヘータ、及びサルモネラが挙げられる。一実施形態では、病原体受容体であるデクチン-1を用いて、菌類の細胞壁の糖鎖構造を認識するCARを生成してもよい。デクチン-1の特異性に基づいてCARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は、アスペルギルス及び標的菌糸増殖を認識することができる。別の実施形態では、CARは、ウイルス決定因子（例えば、CMV及びEbolaからの糖タンパク質）を認識してウイルス感染及び病変を遮断する抗体に基づいて作ることができる。

20

#### 【0059】

いくつかの実施形態では、病原性抗原は、CARの細胞外ドメインが真菌病原体の細胞壁の糖質パターンを、例えば、デクチン-1を介して認識するアスペルギルス糖鎖抗原である。

30

#### 【0060】

本発明によるキメラ免疫受容体は、組み換えDNA技術を用いて作製するのが好ましいが、当該技術分野において周知の任意の手段により作製することができる。キメラ受容体のいくつかの領域をコードする核酸配列は、標準技術の分子クローニング（ゲノムライブラリースクリーニング、PCR、プライマー補助ライゲーション、酵母及び細菌からのscFvライブラリー、部位特異的突然変異誘発法など）により調製し、完全コード配列に組み立てることができる。得られたコード領域は、発現ベクターに挿入し、適切な発現宿主同種T細胞株を形質転換するのに用いることができる。

40

#### 【0061】

本明細書中で使用される場合、核酸構築物または核酸配列もしくはポリヌクレオチドは、T細胞に形質転換するかまたは導入して、転写され、翻訳されて、産物（例えば、キメ

50

ラ抗原受容体)を産生することができるDNA分子を意味するものである。

#### 【0062】

本発明で用いられる例示核酸構築物(ポリヌクレオチド)では、プロモーターは、本発明のキメラ受容体をコードする核酸配列に作動可能に連結される、即ち、キメラ受容体をコードするDNAからメッセンジャーRNAの転写を促進するように位置している。プロモーターは、ゲノム起源であっても、または合成により生成してもよい。T細胞で用いられる種々のプロモーターは、当該技術分野において周知である(例えば、Marodonら(2003)により開示されたCD4プロモーター)。プロモーターは、構造性または誘導性であってよく、ここで、誘導は、例えば、特定の細胞型または特定の成熟レベルと関連する。あるいは、多数の周知のウイルスプロモーターも適している。対象プロモーターとしては、-アクチンプロモーター、SV40前期及び後期プロモーター、免疫グロブリンプロモーター、ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、レトロウイルスプロモーター、及びフレンド脾臓フォーカス形成ウイルスプロモーターが挙げられる。プロモーターは、エンハンサーと関連していても関連していないくともよく、ここで、エンハンサーは、特定のプロモーターと自然に関連していてもよく、あるいは異なるプロモーターと関連していてもよい。

#### 【0063】

キメラ受容体をコードするオープンリーディングフレームの配列は、ゲノムDNAソース、cDNAソースから得てもよく、または合成してもよく(例えば、PCR経由)、もしくはその組み合わせでもよい。イントロンがmRNAを安定させ、T細胞特異的発現をもたらすことが分かっているため、ゲノムDNAのサイズ及びイントロンの数に応じて、cDNAまたはその組み合わせを使用するのが望ましい場合もある(Barthel及びGoldfeld、2003)。mRNAを安定させるために内因性または外因性の非コード領域を使用するのがさらに有利な場合もある。

#### 【0064】

本発明のキメラ抗原受容体の発現には、キメラ受容体のN末端成分をコードする核酸配列の、自然に存在している、つまり内因性の転写開始領域を使用して、標的宿主内でキメラ受容体を生成することができる。あるいは、外因性の転写開始領域を使用することで、構造性または誘導性の発現が可能になり、ここで、発現は、標的宿主、所望の発現レベル、標的宿主の性質などに応じて制御することができる。

#### 【0065】

同様に、キメラ受容体を表面膜に仕向けるシグナル配列は、キメラ受容体のN末端成分の内因性シグナル配列であってもよい。必要に応じて、場合によっては、この配列を異なるシグナル配列に交換するのが望ましい場合もある。しかしながら、選択されたシグナル配列は、キメラ受容体がT細胞の表面上に存在するように、T細胞の分泌経路に適合していないくてはならない。

#### 【0066】

同様に、終端領域は、キメラ受容体のC末端成分をコードする核酸配列の、自然に存在している、つまり内因性の転写終端領域により提供してもよい。あるいは、終端領域は、異なるソース由来であってもよい。大部分において、終端領域のソースは、組み換えタンパク質の発現に重要であるとは一般的に考えず、広範囲の終端領域を、発現に悪影響を及ぼすことなく用いることができる。

#### 【0067】

当業者が理解するように、場合によっては、CAR中の抗原結合ドメインの末端のアミノ酸のいくつか、例えば、通例的には10個以下、より通例的には5個以下の残基は、欠失していてもよい。少数のアミノ酸、通例的には10個以下、より通例的には5個以下の残基を境界に導入するのが望ましい場合もある。アミノ酸の欠失または挿入は、便利な制限部位の提供、操作し易さ、発現レベルの改善など構築の必要性の結果であってもよい。さらに、1つ以上のアミノ酸の異なるアミノ酸への置換について、通例的には、任意の1つのドメインでは約5個を超えるアミノ酸を置換しないが、同様の理由で発生し得る。

## 【0068】

本発明によるキメラ受容体をコードするキメラ構築物は、従来の方法で調製してもよい。大部分において、天然の配列を使用してもよいため、種々の成分を適正に連結することができるよう、天然遺伝子を適宜、単離して、操作してもよい。従って、キメラ受容体のN末端及びC末端タンパク質をコードする核酸配列は、遺伝子の望ましくない部分の欠失をもたらす適当なプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用することで単離することができる。あるいは、クローン遺伝子の制限酵素による消化物を使用して、キメラ構築物を生成してもよい。いずれの場合でも、鈍端であるかまたは、相補的オーバーラップを持つ制限部位を提供するように、配列を選択することができる。

## 【0069】

キメラ構築物を調製するための種々の操作を *in vitro* で行うことができ、特定の実施形態では、キメラ構築物は、標準の形質転換またはトランスフェクション方法を用いて、適当な宿主内でクローニング及び発現するようにベクターに導入する。従って、各操作後、DNA配列の連結から得られた構築物をクローンし、ベクターを単離し、配列をスクリーニングすることで、配列が所望のキメラ受容体をコードすることを保証する。制限分析、シークエンシングなどにより配列をスクリーニングしてもよい。

## 【0070】

本発明のキメラ構築物は、がんを有するかまたはがんを有すると疑われる対象における腫瘍のサイズを減少させるかまたは、腫瘍の増殖もしくは再増殖を防ぐことで、これらの対象に応用される。従って、本発明はさらに、本発明のキメラ構築物を対象の単離T細胞に導入し、形質転換T細胞を対象に再導入することで、対象の腫瘍を減少もしくは排除する抗腫瘍応答をもたらす、対象の腫瘍の増殖を減少させるかまたは腫瘍形成を防ぐ方法に関する。使用してもよい適切なT細胞としては、細胞傷害性リンパ球（CTL）、または破壊する必要があるT細胞受容体を持つ任意の細胞が挙げられる。当該技術分野では既知のように、これらの細胞を対象から単離するには、種々の方法がすぐに利用できる。例えば、細胞表面マーカー発現を用いるか、あるいは市販のキット（例えば、Pierce、Rockford、ILLからのISOCELL（商標））を用いることである。

## 【0071】

キメラ構築物は、裸のDNAとして対象自身のT細胞に導入するか、または適切なベクターに導入することができると考えられる。裸のDNAを用いたエレクトロポレーションによってT細胞を安定的にトランスフェクトする方法は、当該技術分野において周知である。例えば、米国特許第6,410,319号を参照されたい。裸のDNAは、一般に、発現用に正しく配向したプラスミド発現ベクターに含有される本発明のキメラ受容体をコードするDNAのことを言う。裸のDNAを用いることで、本発明のキメラ受容体を発現するT細胞の產生に要する時間が短縮されることが有利である。

## 【0072】

あるいは、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、またはレンチウイルスベクター）を使用して、キメラ構築物をT細胞に導入してもよい。本発明の方法により使用される適切なベクターは、対象のT細胞で複製しない。ウイルスに基づく多数のベクターが知られており、細胞で維持されるウイルスのコピー数は、細胞の生存率を維持する程度に十分低い。例示ベクターとしては、本明細書で開示されているpFB-neoベクター（STRATAGENE（登録商標））のみならず、HIV、SV40、EBV、HSV、またはBPVに基づくベクターが挙げられる。

## 【0073】

トランスフェクトまたは形質導入T細胞が、所望の調節及び所望のレベルで表面膜タンパク質としてキメラ受容体を発現できることが確認されると、キメラ受容体が所望のシグナル誘導をもたらすように宿主細胞内で機能的であるかどうか判断することができる。次に、形質導入T細胞を対象に再導入するかまたは投与して、対象の抗腫瘍応答を活性化させる。投与し易くするため、本発明による形質導入T細胞を、さらに医薬的に許容され得

10

20

30

40

50

る適当な担体または希釈剤と共に、医薬組成物にしてもよいし、あるいは *in vivo* 投与に適当なインプラントにしてもよい。そのような組成物またはインプラントを作製する手段は、当該技術分野において記載されている（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Mack編（1980）を参照されたい）。必要に応じて、形質導入T細胞を、カプセル、溶液、注射液、吸入剤、またはエアロゾルなどの半固体または液状の調製物に、これらの各自の投与経路用に通常の方法で製剤化してもよい。当該技術分野において周知の手段を利用して、組成物が標的組織または臓器に到達するまで、組成物の放出及び吸収を防ぐかまたは最小限にする、あるいは組成物の持続放出を保証することができる。しかしながら、キメラ受容体を発現する細胞を無効にしない医薬的に許容される形態を用いるのが望ましい。従って、形質導入T細胞を、平衡塩類溶液、好ましくは、ハンクス液、または生理食塩水を含有する医薬組成物にすることが望ましい。10

### I I I . 実施形態に関する方法及び組成物

#### 【0074】

ある態様では、本発明は、hCARをコードするDNA構築物を含有する発現ベクターでT細胞をトランスフェクトすることと、その後、必要に応じて、抗原陽性細胞、組み換え抗原、または受容体に対する抗体で細胞を刺激して、細胞を増殖させることを含む、抗原特異的再指向T細胞を作製及び/または増殖させる方法を含む。

#### 【0075】

別の態様では、エレクトロポレーション、または裸のDNAを用いた他の非ウイルス遺伝子導入（限定的ではないが、ソノポレーションなど）によってT細胞を安定的にトランスフェクトし、再指向させる方法を提供する。ほとんどの研究者らは、異種遺伝子をT細胞に運搬するためにウイルスベクターを使用している。裸のDNAを用いることで、再指向T細胞を產生するのに必要な時間を短縮することができる。「裸のDNA」とは、発現用に正しく配向した発現カセットまたはベクターに含有されるキメラT細胞受容体（cTcR）をコードするDNAを意味する。本発明のエレクトロポレーション方法は、キメラTcR（cTcR）を発現し、その表面上にそれを運搬する安定したトランスフェクタントを作製する。20

#### 【0076】

「キメラTcR」とは、T細胞により発現され、かつ、細胞内シグナル伝達、膜貫通、及び細胞外ドメインを含む受容体のことを意味し、ここで、細胞外ドメインは、MHC非制限方式で、通常その方式ではT細胞受容体に結合しない抗原に特異的に結合することができる。T細胞を適切な条件下にて抗原で刺激することで、細胞の増殖（増殖）及び/またはIL-2の產生がもたらされる。即時応用可能なCD19-及びHERV-K特異的キメラ受容体の例は、キメラTcRの例である。しかしながら、本方法は、他の標的抗原に特異的なキメラTcR、例えば、HER2/Neu（Stancovskil、1993）、ERBB2（Moritzら、1994）、葉酸結合タンパク質（Hwuら、1995）、腎細胞がん（Weitjensら、1996）、及びHIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120及びgp41（Robertsら、1994）に特異的なキメラTcRによるトランスフェクションに適用可能である。他の細胞表面標的抗原としては、限定的ではないが、CD20、がん胎児性抗原、メソテリン、ROR1、c-Met、CD56、GD2、GD3、アルファフェトプロテイン、CD23、CD30、CD123、IL-11R、鎖、鎖、CD70、CA-125、MUC-1、EGFR、及び変異体、上皮腫瘍抗原などが挙げられる。30

#### 【0077】

ある態様では、T細胞は、ヒト末梢血液単核球（PBMC）由来のT細胞などの一次ヒトT細胞であり、ここで、PBMCは、G-CSF、骨髄、または臍帯血で刺激後に回収した。条件には、mRNA及びDNAの使用、及びエレクトロポレーションが含まれる。トランスフェクション後、細胞を直ちに注入してもよいし、あるいは保存してもよい。ある態様では、トランスフェクション後、細胞を何日間、何週間、または何ヶ月も *ex-v*40

i v o でバルク集団として増殖させ、約 1、2、3、4、5 日以内、またはそれ以上の期間以内で細胞に遺伝子導入してもよい。別の態様では、トランスフェクション後、トランスフェクタントをクローンし、クローンには、単一に組み込まれたかまたはエピソームに保持された発現力セットまたはプラスミドが存在することが示され、キメラ受容体を ex

v i v o で増殖発現させる。増殖用に選択されたクローンは、標的細胞を発現する C D 19 を特異的に認識して溶解する能力を示している。組み換え T 細胞は、 I L - 2 、または共通ガンマ鎖（例えば、 I L - 7 、 I L - 12 、 I L - 15 、 I L - 21 、及び他のもの）に結合する他のサイトカインで刺激することにより増殖させてもよい。組み換え T 細胞は、人工抗原提示細胞で刺激することにより増殖させてもよい。組み換え T 細胞は、人工抗原提示細胞上で増殖させてもよく、あるいは T 細胞表面上で C D 3 を架橋する O K T 3 などの抗体で増殖させてもよい。組み換え T 細胞のサブセットは、人工抗原提示細胞上で欠失させてもよく、あるいは T 細胞表面上で C D 52 に結合するキャンパスなどの抗体で増殖させてもよい。別の態様では、遺伝子改変細胞は、凍結保存してもよい。

#### 【 0 0 7 8 】

注入後の T 細胞増殖（生存）は、（ i ） C A R に特異的なプライマーを用いた q - P C R ；（ i i ） C A R に特異的な抗体を用いたフローサイトメトリー；及び / または（ i i i ）可溶性 T A A により評価してもよい。

#### 【 0 0 7 9 】

本発明の実施形態は、再指向免疫 T 細胞を用いて、 C D 19 特異的な細胞表面エピトープを持つ B 細胞を含む B 細胞悪性腫瘍または B 細胞疾患を標的にすることにも関する。 B 細胞は T 細胞に対して免疫刺激性抗原提示細胞として機能し得るため、悪性 B 細胞は、再指向 T 細胞の優れた標的である。ヒトまたはヒト化 C A R を持つドナー由来の C D 19 特異的 T 細胞による養子療法の抗腫瘍活性を支持する前臨床研究には、（ i ） C D 19<sup>+</sup> 標的の再指向殺傷、（ i i ） C D 19<sup>+</sup> 標的 / 刺激細胞と共にインキュベーション後のサイトカインの再指向分泌 / 発現、及び（ i i i ） C D 19<sup>+</sup> 標的 / 刺激細胞と共にインキュベーション後の持続増殖が含まれる。

#### 【 0 0 8 0 】

本発明のある実施形態では、 C A R 細胞を、それを必要とする個体、例えば、がんまたは感染を有する個体に送達する。その後、細胞が個体の免疫系を強化し、それぞれのがんまたは病原性細胞を攻撃する。場合によっては、個体には、抗原特異的 C A R T 細胞を 1 回以上の用量で提供する。抗原特異的 C A R T 細胞を 2 回以上の用量で個体に提供する場合、投与間隔は、個体内で増殖できるのに十分な時間でなければならず、特定の実施形態では、投与間隔は、 1 日、 2 日、 3 日、 4 日、 5 日、 6 日、 7 日、またはそれ以上の日数である。

#### 【 0 0 8 1 】

キメラ抗原受容体と機能的 T C R が欠けたものの両方を含むように改変された同種 T 細胞のソースは、任意の種類であってもよく、特定の実施形態では、細胞は、例えば、臍帯血、末梢血液、ヒト胚性幹細胞、または誘導多能性幹細胞のバンクから得る。治療効果に適切な用量は、 1 用量当たり、例えば、好ましくは、一連の投薬サイクルで少なくとも 1 0<sup>5</sup> または約 1 0<sup>5</sup> ~ 約 1 0<sup>10</sup> 細胞である。一例の投薬計画は、用量を段階的に増加させる、 0 日目に少なくとも約 1 0<sup>5</sup> 細胞で始め、例えば、患者内の用量漸増計画法を開始する数週間以内に約 1 0<sup>10</sup> 細胞の標的用量まで漸増させる 4 回の 1 週間投薬サイクルからなる。適当な投与方式には、静脈内、皮下、腔内（例えば、レザバー接近装置による）、腹腔内、及び腫瘍塊中への直接注射が含まれる。

#### 【 0 0 8 2 】

本発明の医薬組成物を単独で、またはがんの治療に有用な他の既知の薬剤との組み合わせで使用してもよい。単独の送達であろうが、他の薬剤との組み合わせの送達であろうが、本発明の医薬組成物を、種々の経路を介して、哺乳動物、特に、ヒトの身体の種々の部位に送達し、特定の効果を得ることができる。当業者には、投与には 2 つ以上の経路を使用してもよいが、特定の経路が別の経路よりもより即時かつより効果的な反応をもたらし

10

20

30

40

50

得ることが分かるであろう。例えば、黒色腫の治療には、吸入よりも皮内送達を使用することが有利であり得る。局所または全身送達は、製剤を体腔に塗布または点滴、エアロゾルの吸入または送気を含む投与、あるいは筋肉内、静脈内、門脈内、肝内、腹膜、皮下、または皮内投与を含む非経口導入により達成できる。

【 0 0 8 3 】

本発明の組成物は、単位投薬形態で提供してもよく、ここで、各投薬単位、例えば、注射液には、所定量の組成物が、単独で、または他の活性剤との適当な組み合わせで含まれる。本明細書で使用する場合、用語「単位投薬形態」とは、ヒト及び動物対象に対する単位投薬として適当な物理的に離散した単位のことを言い、各単位には、本発明の組成物を、必要に応じて医薬的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤と関連して所望の効果をもたらすのに十分な量に計算された所定量で、単独で、または、他の活性剤との組み合わせで含まれる。本発明の新規の単位投薬形態の仕様は、特定の対象において医薬組成物と関連する特定の薬力学に依存する。

10

【 0 0 8 4 】

長期の特異的な抗腫瘍応答が確立されて、腫瘍のサイズを減少させるかまたはそのような治療が不在下であればもたらされるであろう腫瘍増殖または再増殖を排除するように、有効量または十分な数の単離形質導入T細胞が組成物に存在し、対象に導入されることが望ましい。形質導入T細胞が存在しない以外は同一条件の場合と比較した際、対象に再導入された形質導入T細胞の量により、腫瘍サイズを10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または100%減少させることができること

20

【 0 0 8 5 】

従って、投与される形質導入T細胞の量は、投与経路を考慮すべきであり、十分な数の形質導入T細胞が導入されて所望の治療応答を達成するようにすべきである。さらに、本明細書に記載の組成物に含まれる各活性剤の量（例えば、接触する各細胞当たりの量またはある体重当たりの量）は、異なる用途で変わり得る。一般に、形質導入T細胞の濃度は、治療される対象に提供するのに十分でなければならず、少なくとも約 $1 \times 10^6$ ～約 $1 \times 10^9$ 個の形質導入T細胞が望ましく、約 $1 \times 10^7$ ～約 $5 \times 10^8$ 個の形質導入T細胞がさらにより望ましいが、上、例えば、 $5 \times 10^8$ 個の細胞を超える、または下、例えば、 $1 \times 10^7$ 個の細胞未満のいずれかの任意の適切な量を利用してもよい。投薬スケジュールは、既知の細胞ベース療法に基づいてよく（例えば、Topalian及びRosenberg、1987；米国特許第4,690,915号を参照されたい）、または代替の持続注入戦略を用いてもよい。

30

【 0 0 8 6 】

これらの価値は、本発明の実施に本発明の方法を最適化する際に医師によって利用される形質導入T細胞の範囲についての一般的なガイダンスを提供することである。そのような範囲の本明細書の記載は、決して、特定の用途で保証され得るようより多くの量またはより少ない量の成分の使用を不可能にするものではない。例えば、実際の用量及びスケジュールは、組成物を他の医薬組成物と組み合わせて投与するのかどうかに応じて、または薬物動態、薬物の体内動態、及び代謝における個体差に応じて変化し得る。当業者であれば、特定の状況の緊急事態に従って任意の必要な調節を容易に行えるであろう。

40

I V . 例示のヒトCD19特異的キメラ抗原受容体T細胞

【 0 0 8 7 】

CD19、免疫グロブリンスーパーファミリーの細胞表面糖タンパク質は、B細胞関連悪性腫瘍の抗体療法に潜在的に魅力のある標的である。この抗原は、造血幹細胞には存在せず、健康な個体では、その存在は、B系列及び恐らくはいくつかの濾胞樹状細胞に排他的に限定される（Scheuermannら、1995）。実際には、この抗原は、B芽細胞に発達中の最も初期の認識可能なB系列細胞からのB細胞に存在しているが、プラズマ細胞に成熟時には失われている。さらに、CD19は、細胞表面からは分離されず、悪性形質転換中にはほとんど失われない（Scheuermannら、1995）。タンパ

50

ク質は、最も悪性のB系列細胞、例えば、慢性リンパ性白血病（C L L）、非ホジキンリンパ腫（N H L）、及び急性リンパ球性白血病（A L L）を持つ患者からの細胞上で発現される（U c k u n l a、1988）。CD 19は、CD 21及びCD 81と結合してB細胞共受容体として主に働く。活性化時に、CD 19の細胞質尾部がリン酸化されることで、S r c 科キナーゼ及びP I - 3 キナーゼの補充による結合を招く。

【0088】

一態様では、実施形態の組成物及び方法は、細胞内シグナル伝達ドメイン、膜貫通領域、及びヒトCD 19結合領域を含む細胞外ドメインを含む、ヒトCD 19特異的キメラT細胞受容体（またはキメラ抗原受容体、C A R）ポリペプチド（h C D 1 9 C A Rと指定）に関する。別の態様では、CD 19結合領域は、F (a b') 2、F a b'、F a b、F v、またはs c F vである。結合領域は、野生型アミノ酸配列に少なくともせいぜい約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み得る。細胞内ドメインは、ヒトCD 3の細胞内シグナル伝達ドメインを含み得、ヒトCD 28細胞内セグメントをさらに含み得る。ある態様では、膜貫通領域は、CD 28膜貫通領域である。

【0089】

別の態様では、本発明の組成物は、上述のポリペプチドをコードする核酸を含む。ある態様では、核酸配列は、ヒトコドン使用に最適化される。

【0090】

さらに別の態様では、本発明の組成物は、本明細書に記載のポリペプチドを発現する細胞を含む。T細胞は、h C D 1 9 C A Rポリペプチドをコードする発現力セットを含み得る。発現力セットは、トランスポゾン、またはヒトトランスポゾン、もしくはその組み換え変異体などの非ウイルスベクターに含まれ得る。発現力セットは、ウイルスベクターまたはその組み換え変異体に含まれ得る。発現力セットは、ゲノム的に組み込まれても、またはエピソームに保持されても、あるいはm R N Aから発現してもよい。

【0091】

さらに別の態様では、本発明は、発現力セットを細胞に導入することを含む、ヒトCD 19特異的C A Rを発現するT細胞の作製方法を含み、ここで、発現力セットは、ヒト細胞外CD 19結合ドメイン、膜貫通領域、及び1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドをコードする。本方法は、CD 1 9<sup>+</sup>細胞、組み換えCD 1 9、または受容体に対する抗体で細胞を刺激し、該細胞にサイトカインを増殖させる、殺傷させる、及び/または作製させることをさらに含み得；例えば、細胞を刺激して、CD 1 9<sup>+</sup>人工抗原提示細胞を増殖するかまたは増殖させてもよい。

【0092】

ある態様では、本発明は、病態の治療に十分なヒトCD 19特異的C A Rを発現する組み換え細胞の量を患者に注入することを含む、内因性CD 19を発現する細胞と関連するヒト疾患病態の治療方法を含み、ここで、ヒトCD 19特異的C A Rは、ヒトCD 1 9細胞外結合ドメイン、膜貫通領域、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む。病態は、例えば、リンパ腫、白血病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性リンパ性白血病、またはB細胞関連自己免疫疾患であり得る。

【0093】

本発明は、ヒトCD 19特異的キメラ抗原受容体（h C D 1 9 R C D 2 8またはh C A R）の生成に関する。ある態様では、h C A Rを発現する組み換え細胞は、i n v i v o持続性及び抗腫瘍効果が改善されている。ヒトh C A Rは、マウスCD 1 9特異的モノクローナル抗体（m A b）由来のs c F vセグメントを含むマウスh C A Rと比較して免疫原性が減少している。抗腫瘍効果は、CD 1 9に特異的な状態にした遺伝子改変細胞によって増すことができる。一般に、T細胞特異性は、h C A Rをコードする発現力セットの電気移送により達成される。

【0094】

h C A Rは、CD 3 - 由来活性化ドメインなどの活性化エンドドメインを1つ以上含

10

20

30

40

50

むキメラ受容体であってもよい。追加のT細胞活性化モチーフとしては、限定的ではないが、CD28、CD27、OX-40、DAP10、及び4-1BBが挙げられる。ある態様では、活性化ドメインは、CD28膜貫通及び/または活性化ドメインも含み得る。別の態様では、ヒト細胞及び対象中の発現用にコドン最適化されたhCARコード領域及び/または発現カセットは、例えば、一実施形態では、CD19特異的ヒト抗体のVH及びVL配列から得たscFv領域は、hCARのCD19結合セグメントに組み込まれる（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,109,304号を参照されたい）。別の実施形態では、hCAR発現カセットは、エピソームに保持されるかまたは、組み換え細胞のゲノム中に組み込まれる。ある態様では、発現カセットは、インテグラーゼ機構、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクター、またはトランスポゾン機構などの非ウイルスベクターを用いて組み込むことが可能な核酸に含まれる。別の実施形態では、発現カセットは、トランスポゾンベースの核酸に含まれる。特定の実施形態では、発現カセットは、強化非ウイルス遺伝子導入用にトランスポゾン及びトランスポゼースを利用する2成分スリーピングビューティ（SB）またはpiggylBac系の一部である。10

#### 【0095】

組み換えhCAR発現細胞を数値的に増殖させて、臨床的に意味のある数にしてもよい。そのような増殖の一例には、人工抗原提示細胞（aAPC）を用いる。組み換えhCAR発現細胞は、フローサイトメトリー及びウエスタンプロット分析により検証し同定することができる。CD19特異的CARを発現する組み換えhCAR発現T細胞は、標的細胞を発現するCD19を認識し殺傷することができる。別の態様では、hCARは、免疫原性の防止を助けるために移植障壁にわたって注入することができる万能細胞中で発現することができる。hCARは、細胞毒性の場合には、T細胞のイメージング（例えば、陽電子放射断層撮影法、PET）および条件的な消失用のヒト遺伝子と共に使用してもよい。本発明の組み換え細胞を、CD19特異的細胞療法で使用してもよい。20

#### V. 例示のHERV標的キメラ抗原受容体T細胞

#### 【0096】

ヒトゲノム計画中に、ヒト内因性レトロウイルス（HERV）と名付けられた一連の古代レトロウイルスが、ヒトゲノム全体の8.5%を形成するヒトゲノム中に安定して組み込まれることが発見された。HERVのうち、HERV-Kは、多発性硬化症及び関節リウマチのような種々の自己免疫疾患と共に黒色腫、乳がん、卵巣がん、奇形がん、及び前立腺がんに関与する発がん対立遺伝子変異体として見出された（Buschelら、2005；Dreyfus、2011；Seifarthら、1995）。HERV-Kの発がん性は、エンベロープ（env）及びGAGタンパク質（Rec）により寄与される。HERV-Kエンベロープタンパク質が、正常皮膚細胞上ではなく腫瘍細胞表面上で排他的に発現することが最近の研究により分かった（Wang-Johanningら、2008；Liら、2010）。HERV-Kエンベロープタンパク質の発現は、より侵攻性が低く局在型Iの黒色腫よりも、より侵攻性が高く転移型II及II-Vの黒色腫で増えることが分かった（Buschelら、2005；Hahnら、2008；Serafiniら、2009）。黒色腫細胞上のHERV-Kエンベロープタンパク質のこの選択的な発現は、難治性または転移性の黒色腫を持つ患者に対する治療戦略として利用することができる。転移性黒色腫を持つ患者は、化学療法、放射線、及び手術などの従来の治療に抵抗性を示すために予後が悪い（Bhatiaら、2009）。従って、治療結果を改善するために新規の標的治療戦略が必要である。30

#### 【0097】

黒色腫に対するT細胞療法を生成するため、発明者らは、そのゲノムは何百万年も前にヒトに安定して組み込まれたHERV由来のTAAを標的にした。HERV-Kを標的にするため、CD19特異的CARの抗原結合細胞外ドメインを抗HERV-Kエンベロープ特異的モノクローナル抗体の単鎖抗体（scFv）配列に置換することでエンベロープタンパク質に特異的なCARを発現するように、T細胞を遺伝子操作した。この新規のC40

A R は、 S B 系中にトランスポゾンとしてクローンした。 H E R V - K エンベロープ特異的 C A R 及び S B トランスポゼースをコードする D N A プラスミドを一次ヒト T 細胞に電気的に導入させ、遺伝子改変 C A R <sup>+</sup> T 細胞を、 H E R V - K エンベロープ及び所望の T 細胞共刺激分子を発現する照射人工抗原提示細胞 ( a A P C ) 上で選択的に増殖させた。

照射 a A P C 上で共培養後、 9 5 % の C D 3 <sup>+</sup> T 細胞が C A R を発現し、これらの C A R <sup>+</sup> T 細胞は、 C A R <sup>+</sup> T 細胞とは異なり、 *in vitro* で H E R V - K エンベロープ <sup>+</sup> 腫瘍標的を特異的に殺傷することができたが、 H E R V - K エンベロープ <sup>-</sup> 腫瘍標的を特異的に殺傷することはできなかった。これらの C A R <sup>+</sup> T 細胞の特異性は、 H E R V - K エンベロープ <sup>-</sup> E L 4 親細胞と比較して優先的に殺傷された抗原陰性 E L 4 マウス細胞中で H E R V - K エンベロープタンパク質を発現することで証明され、 A 8 8 8 - m e 10 1 細胞上の s h R N A ( H E R V - K エンベロープ R N A に対する特異的標的) による H E R V - K ノックダウンにより、親と比較して殺傷力が減少した。 C A R <sup>+</sup> T 細胞は、肺から肝臓への *in vivo* での A 3 7 5 高転移性 ( S M ) 腫瘍細胞の腫瘍増殖及び転移を減少させることにも成功した。 C A R <sup>+</sup> T 細胞を受けた腫瘍を持つマウスは、腫瘍のみのマウス群よりも長く生き、かつより健康的であった。従って、活性レトロウイルスを標的にする T 細胞は、臨床試験の翻訳にも魅力的なアプローチを用いて、黒色腫の免疫療法として用いることができる。

#### 【 0 0 9 8 】

腫瘍認識には M H C 複合体に依存しているため、黒色腫細胞のクローン進化により、 T C R 療法が効かなくなる場合がある。 C A R は、 T C R ベース T 細胞療法とは異なり、 M H N から独立した方法で細胞死を媒介することで黒色腫細胞のクローン進化を克服することができる。 H E R V - K 抗原は、腫瘍細胞表面上でしか発現せず、正常細胞上では発現されない。従って、 H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞は、任意の有害な副作用を伴うことなく腫瘍細胞を特異的に標的にし、破壊することができる。 H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞を注入することで、微小残存病変から巨大腫瘍、従来の治療では難治性の疾患までがんスペクトルに沿った多くのステージで H E R V - K <sup>+</sup> 悪性腫瘍を治療し得る。

#### 【 0 0 9 9 】

H E R V - K は、多くの腫瘍型、例えば、限定期的ではないが、黒色腫 ( M u s t e r ら、 2 0 0 3 ; B u s c h e r ら、 2 0 0 5 ; L i ら、 2 0 1 0 ; R e i c h e ら、 2 0 1 0 ; S e r a f i n o ら、 2 0 0 9 ) 、乳がん ( P a t i e n c e ら、 1 9 9 6 ; W a n g - J o h a n n i n g ら、 2 0 0 3 ; S e i f a r t h ら、 1 9 9 5 ) 、卵巣がん ( W a n g - J o h a n n i n g ら、 2 0 0 7 ) 、リンパ腫 ( C o n t r e r a s - G a l i n d o ら、 2 0 0 8 ) 、及び奇形がん ( B i e d a ら、 2 0 0 1 ; L o w e r ら、 1 9 9 3 ) 上で発現される。さらに、感染細胞、例えば、 H I V により感染したもの ( J o n e s ら、 2 0 1 2 ) も H E R V - K を発現する。これは、 H E R V - K を標的にする 1 つの C A R 設計を用いて、種々のがん及び感染を治療することができるという魅力的な機会を提供する。

V I . 最小残存疾患を標的にするためのキメラ抗原受容体 T 細胞を共発現する例示の膜結合 I L - 1 5

#### 【 0 1 0 0 】

成人及び小児の B 系列急性リンパ芽球性白血病 ( B - A L L ) の化学療法治療は、薬物耐性の残存疾患により、それぞれ 6 5 % 及び 2 0 % の疾患再発率を有する。特に予後不良群において B - A L L 再発する頻度が高いことで、同種造血幹細胞移植 ( H S C T ) を用いた免疫ベース療法の使用が促進されている。この療法は、残存白血病細胞または微小残存病変を根絶して無病生存率を改善するためにドナー移植片に存在する同種反応性細胞に依存している。移植 T 細胞が同種 H S C T 後に残存 B - A L L を標的にする能力を強化するためにドナーリンパ球注入が用いられているが、そのような患者に対するこの治療アプローチは、 1 0 % 未満の寛解率であり、移植片対宿主疾患 ( G V H D ) の頻度及び重症度から高度の罹患率及び死亡率と関連する。これらの難治性悪性腫瘍の再発における共通の致死問題では、 H S C T 後に末梢血液単核球 ( P B M C ) 由来 T 細胞を用いた養子療法を 40 50

用いて、ドナーT細胞の特異性を腫瘍関連抗原（TAA）に再標的化することで、抗腫瘍効果または移植片対白血病（GVL）効果を増すことができる。

#### 【0101】

標的抗原に特異的なCARの製剤が多数開発されており、CD19特異的CARが、B-ALLの細胞表面上のCD19抗原を標的にする。CAR<sup>+</sup>細胞の長期持続性を観察し、異なる臨床試験プロトコルにわたって患者内の持続的応答を達成するには、CARベース療法の治療効果を妨げる重大な問題が残されている。

#### 【0102】

現在、CAR改変T細胞は、腫瘍抗原と出くわした時にだけ発生する、CAR経由の生存シグナル伝達を得ることに依存している。これらのCAR改変T細胞を巨大病変を持つ患者に注入する臨床状況では、CARを介して十分な活性化及び生存シグナル伝達を提供するのに十分な腫瘍抗原が存在する。しかしながら、再発したB-ALLを持つ患者は、HSCTに続いて骨髄機能廃絶化学療法で調子を整えている事が多く、微小残存病変（MRD）が存在している。この場合、患者は、腫瘍量が低く、微小レベルのTAAが、注入されたT細胞を支持するのに必要なCAR媒介シグナル伝達を著しく制限してしまい、その結果、治療潜在力が損なわれる。T細胞持続性を改善するための別のCARに依存しない手段は、CAR改変T細胞の生着を改善することが期待されている。

10

#### 【0103】

共通ガンマ鎖受容体科（C）におけるサイトカインは、リンパ球機能、生存、及び増殖に重要なT細胞における重要な共刺激分子である。IL-15は、養子療法に望ましいいくつかの特性を有する。IL-15は、長寿命メモリー細胞傷害性T細胞の生存を支持し、腫瘍常在細胞の機能的抑制を軽減することで定着腫瘍の根絶を促進し、かつAICDを阻害する恒常性サイトカインである。

20

#### 【0104】

IL-15は、組織特異的であり、病的状態下でのみ、血清または全身において任意のレベルで観測される。周囲環境に分泌される他のCサイトカインとは異なり、IL-15は、産生細胞によってIL-15受容体アルファ（IL-15R）との関連においてT細胞にトランス提示される。このサイトカインをT細胞及び他の応答細胞に送達する機構の特有さは：（i）高度に標的化かつ局所化されること、（ii）IL-15の安定性及び半減期を増すこと、及び（iii）可溶性IL-15により達成されるよりも質的に異なるシグナル伝達を生成することである。

30

#### 【0105】

一実施形態では、本発明は、例えば、微小残存病変（MRD）を示す白血病患者を治療する目的で、in vivoで長寿命の可能性を持つキメラ抗原受容体（CAR）改変T細胞の生成方法を提供する。全体として、この方法には、サイトカインなどの可溶性分子がどのように細胞表面に融合して治療潜在力を増すことができるかが述べられている。この方法の核心は、CAR-T細胞をインターロイキン-15（IL-15）のヒトサイトカインムテイン（これ以降、mIL15と呼ぶ）で共改変することに依存している。mIL15融合タンパク質は、フレキシブルなセリン-グリシンリンカーを介して全長IL15受容体アルファに融合したIL-15のコドン最適化cDNA配列からなる。このIL-15ムテインは、（i）CAR<sup>+</sup>T細胞の表面へのmIL15発現を制限し、in vivo環境にてサイトカインが非標的に拡散するのを限定することで、外因性可溶性サイトカイン投与が毒性をもたらすような安全性プロフィールを潜在的に改善することと；及び（ii）IL-15Rとの関連においてIL-15が存在し、生理的に適切かつ定性的なシグナル伝達を模倣するのみならず、サイトカイン半減期を延長させるためにIL-15/mIL15Ra複合体を安定化及び再利用するような形で設計された。mIL15を発現するT細胞は、注入後のT細胞の生存に重要なサイトカインシグナル伝達を持続的に支持することができる。非ウイルススリーピングビューティ系遺伝子改変及びその後の臨床応用可能なプラットフォーム上でのex vivo増殖により生成されたmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞により、腫瘍量が高い、低い、または腫瘍量が無いマウスモデルに注入

40

50

後の持続性が強化されたT細胞注入産物が得られた。さらに、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、腫瘍量が高いまたは低いモデルの両方においても抗腫瘍効果の改善を実証した。

#### 【0106】

高腫瘍量モデルにおけるCAR<sup>+</sup>T細胞上のmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の持続性及び抗腫瘍活性が改善されたことで、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、腫瘍量が有病率している活動性疾患を持つ白血病患者の治療において、CAR<sup>+</sup>T細胞よりもより有効であり得ることを示す。従って、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、広い意味の応用における養子療法において、CAR<sup>+</sup>T細胞に取って代わることができる。CARを介した生存シグナル伝達に依存せずにmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が生存する能力により、腫瘍抗原の欠如にかかわらず、これらの改変T細胞を注入後に持続させることができる。その結果、これにより、特に、骨髄機能廃絶化学療法及び造血幹細胞移植を受けた患者のMRD治療設定において治療効果に最も大きな影響を生成することができる。これらの患者は、これらのMRDを治療し、再発予防のために、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞と共に養子T細胞移入を受けるであろう。

10

#### 【0107】

mIL15などの膜結合型サイトカインは、広範囲にわたる影響を持つ。膜結合型IL-15に加えて、他の膜結合型サイトカインが考えられる。膜結合型サイトカインは、ヒト応用に用いる細胞の活性化及び増殖と関連する他の分子の細胞表面発現に拡張することもできる。これらとしては、限定的ではないが、サイトカイン、ケモカイン、及びヒト応用に用いる細胞の活性化及び増殖に寄与する他の分子が挙げられる。

20

#### 【0108】

mIL15などの膜結合型サイトカインは、ヒト応用のための細胞の調製にex vivoで使用してもよく、かつ、ヒト応用に用いる注入細胞（例えば、T細胞）上であってもよい。例えば、膜結合型IL-15は、例えば、K562由来の人工抗原提示細胞（aAPC）上で発現して、T細胞及びNK細胞（のみならず他の細胞）を刺激して活性化及び/または増殖させることができる。aAPC上でmIL15により活性化/増殖させたT細胞の集団には、遺伝子改変リンパ球だけでなく、腫瘍浸潤リンパ球、及び他の免疫細胞が含まれる。これらのaAPCは注入されない。これに対し、mIL15（及び他の膜結合型分子）は、注入されるT細胞及び他の細胞上で発現することができる。

30

#### 【0109】

CAR改変T細胞によるMRD治療の治療効果は、T細胞の養子導入後の持続性の欠如により妨げられる。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が腫瘍抗原に関わらずにin vivoで長期生存できる能力は、MRDを持つ患者の治療に大きな可能性を示している。この場合、MRD患者に対する現在のアプローチが不十分であるため、MRDを支持するmIL15及び持続性T細胞は、ニーズに対応するであろう。MRDを持つ患者に注入されるT細胞及び他のリンパ球の持続性は、CAR<sup>+</sup>T細胞を越えて適用する。持続的治療効果を達成する場合、悪性腫瘍、感染、または自己免疫疾患の治療及び予防に用いられる任意の免疫細胞は、長期にわたって持続できなければならない。従って、T細胞を活性化させて、内因性T細胞受容体または導入免疫受容体由来のシグナルよりも持続させることは、養子免疫療法の多くの態様において重要である。従って、膜結合型サイトカインの発現を用いて、種々の病的状態に対して注入されたT細胞及び他の免疫細胞の治療潜在力及び持続性を増すことができる。

40

#### 【0110】

発明者らは、CAR<sup>+</sup>T細胞上でIL-15及びIL-15R（mIL15）の膜結合型融合タンパク質として発現されるIL-15のムテインを生成した。mIL15構築物を、CD19特異的CAR（0日目）と共に、スリーピングビューティDNAトランスポゾンプラスミドとしての一次ヒトT細胞中に共電気導入した。CD19<sup>+</sup>人工抗原提示細胞及び補充IL-21上での共培養により、臨床的に意義のある数のmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が生成された。遺伝子改変T細胞中のIL-15受容体複合体を介したシグナル伝達は、STAT5（pSTAT5）のリン酸化により検証され、これらのT細胞によ

50

り、CAR<sup>+</sup> T細胞と等しいCD19<sup>+</sup>腫瘍標的の再指向特異的溶解が実証された。さらに、抗原離脱後、mIL15により生成されたシグナル伝達により、特異的細胞表面マーカー、転写因子、及びIL-2の分泌能力を含むメモリー関連特性を有する低分化／若々しい表現型のT細胞の有病率が増した。これらの特徴は、in vivoで長期持続する能力を示したT細胞サブセットと相關しているため、養子導入で用いたT細胞に望ましい特性である。播種CD19<sup>+</sup>白血病を有する免疫不全NSGマウスでは、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、持続性及び抗腫瘍効果の両方が実証されたが、そのCAR<sup>+</sup>T細胞対応物は、TAAの存在にかかわらず、有意な持続性を維持できなかった。mIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>T細胞をまず6日間生着した後、播種CD19<sup>+</sup>白血病を導入した予防マウス(NSG)モデルでは、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のみが、持続するのみならず腫瘍生着を防止することがわかった。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が、TAAからの刺激に依存せずに持続することができたかどうか試験するため、mIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>T細胞を、腫瘍のないNSGマウスに養子導入した。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のみが、外因性サイトカインサポートまたはCD19<sup>+</sup>TAAの存在がないin vivo環境で持続することができた。mIL15がCAR<sup>+</sup>T細胞上で共発現されることで、TAAまたは外因性サイトカインサポートの必要なくin vivo持続性を強化できたことが、これらのデータにより実証される。要するに、このサイトカイン融合分子は：(i) pSTAT5を介して刺激性シグナルを提供することでin vivoのT細胞持続性を増す一方、腫瘍特異的機能性を維持し、(ii)メモリー様表現型を促進するT細胞サブセットを維持し、(iii) in vitro及びin vivoでのT細胞増殖及び持続性に対する臨床等級IL-2の必要性及びコストを排除し、(iv)臨床等級可溶性IL-15の必要性を軽減する。

### VII. 免疫系及び免疫療法

#### 【0111】

いくつかの実施形態では、内科的疾患は、特異的免疫応答を引き起こす再指向T細胞の移動によって治療される。本発明の一実施形態では、B細胞系統悪性腫瘍または疾患は、特異的免疫応答を引き起こす再指向T細胞の移動によって治療される。従って、免疫応答の基本的な理解が必要である。

#### 【0112】

養子免疫系の細胞は、リンパ球と呼ばれる白血球の型である。B細胞及びT細胞は、主要型のリンパ球である。B細胞及びT細胞は、同じ多能性造血幹細胞由来であり、活性化されるまで互いに区別ができない。B細胞は、体液性免疫応答において大きな役割を果たすが、T細胞は、細胞媒介免疫応答と密接に関わっている。B細胞及びT細胞は、T細胞受容体(TCR)と呼ばれるこれらの細胞表面上の特殊な受容体の存在によって、B細胞及びNK細胞などの他のリンパ球型から区別することができる。ほとんど全ての他の脊椎動物では、B細胞及びT細胞は、骨髄の幹細胞により產生される。T細胞は、胸腺に入り、そこで成熟することが、T細胞の名前の由来である。ヒトでは、およそ1%~2%のリンパ球プールが、1時間毎に再循環して、抗原特異的リンパ球の機会を最適にし、二次リンパ組織内のこれらの特異的抗原を見つける。

#### 【0113】

Tリンパ球は、骨髄の造血幹細胞から生じ、一般に、胸腺に移動して成熟する。T細胞は、これらの膜(T細胞受容体)上で独特の抗原結合受容体を発現し、これは、他の細胞の表面上の主要組織適合複合体(MHC)分子と関連した抗原しか認識できない。Tヘルパー細胞及びT細胞傷害性細胞として知られる少なくとも2つのT細胞集団がある。Tヘルパー細胞及びT細胞傷害性細胞は、それぞれ、膜結合型糖タンパク質CD4及びCD8の表示によって主に区別される。Tヘルパー細胞は、免疫系のB細胞、T細胞傷害性細胞、マクロファージ、及び他の細胞の活性化に不可欠な種々のリンホカインを分泌する。これに対し、抗原-MHC複合体を認識するT細胞傷害性細胞は、増殖し、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)と呼ばれるエフェクター細胞に分化する。CTLは、細胞溶解をもたらす物質を產生することで、ウイルス感染細胞及び腫瘍細胞などの、本体を表示している抗

10

20

30

40

50

原の細胞を排除する。ナチュラルキラー細胞（即ち、NK細胞）は、自然免疫系の主成分を構成する細胞傷害性リンパ球の型である。NK細胞は、ウイルスに感染した腫瘍及び細胞の拒絶に主要な役割を果たす。細胞は、標的細胞をアポトーシスにより死滅させるペーフォリン及びグランザイムと呼ばれるタンパク質の細胞質の小顆粒を放出することで殺傷する。

【0114】

マクロファージ、Bリンパ球、及び樹状細胞を含む抗原提示細胞は、特定のMHC分子の発現により区別される。APCは、抗原を内在化し、その抗原の一部を、これらの細胞の外膜上のMHC分子と共に再発現する。主要組織適合複合体（MHC）は、多数の遺伝子座を持つ大きな遺伝子複合体である。MHC遺伝子座は、クラスI及びクラスII MHCと呼ばれる2つの主要なクラスのMHC膜分子をコードする。Tヘルパリンパ球は、一般に、MHCクラスII分子と関連する抗原を認識し、T細胞傷害性リンパ球は、MHCクラスI分子と関連する抗原を認識する。MHCは、ヒトではHLA複合体、マウスではH-2複合体と呼ばれる。

【0115】

T細胞受容体、即ち、TCRは、Tリンパ球（またはT細胞）の表面に見られ、一般に、主要組織適合複合体（MHC）分子と結合した抗原の認識に関与する分子である。TCRは、T細胞の95%においてアルファ鎖及びベータ鎖からなるヘテロダイマーであるが、T細胞の5%は、ガンマ鎖及びデルタ鎖からなるTCRを有している。抗原及びMHCに対するTCRの関与は、関連した酵素、共受容体、および特殊化したアクセサリー分子によって媒介された一連の生化学的事象を通して、結果的にそのTリンパ球の活性化を招く。免疫学では、CD3抗原（「CD」とは、cluster of differentiationの略である）は、哺乳動物では4本の異なる鎖（CD3、CD3、及び2本のCD3）からなるタンパク質複合体であり、T細胞受容体（TCR）及び鎖として知られる分子と関連してTリンパ球内で活性化シグナルを生成する。TCR、鎖、及びCD3分子は、TCR複合体と共に含む。CD3、CD3、及びCD3鎖は、単一の細胞外免疫グロブリンドメインを含有する免疫グロブリンスーパーファミリーの関連性の高い細胞表面タンパク質である。CD3鎖の膜貫通領域は、負に帯電しており、それにより、これらの鎖は正に帯電したTCR鎖（TCR及びTCR）と関連することができる特徴を持つ。CD3分子の細胞内尾部には、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ、即ち、略してITAMとして知られる单一保存モチーフが含まれ、これは、TCRのシグナル伝達能力に必須である。

【0116】

CD28は、T細胞活性化に必要な共刺激シグナルを提供するT細胞上で発現した分子の1つである。CD28は、B7.1（CD80）及びB7.2（CD86）に対する受容体である。トール様受容体リガンドより活性化される場合、B7.1発現は、抗原提示細胞（APC）で上方調節される。抗原提示細胞上のB7.2発現は、構造性である。CD28は、ナイーブT細胞上で構造的に発現される唯一のB7受容体である。TCRに加えてCD28を介した刺激により、強力な共刺激シグナルをT細胞にもたらし、種々のインターロイキン（特に、IL-2及びIL-6）を産生することができる。

【0117】

ヒト疾患に対する治療的介入として抗原特異的T細胞を単離し増殖させる戦略は、臨床試験で実証されている（Riddellら、1992；Walterら、1995；Heslopら、1996）。

【0118】

B細胞は、T細胞の免疫刺激性抗原提示細胞として機能し得るため、悪性B細胞は、再指向T細胞の優れた標的になると思われる（Glimcherら、1982）。リンパ腫は、そのリンパ節指向性のおかげで、T細胞媒介の認識及び排除において解剖学的に理想的な位置にある。注入されたT細胞がリンパ節に多数局在化することは、HIV特異的CD8<sup>+</sup> CTLクローニングの注入を受けたHIV患者で裏付けられている。これらの患者では

10

20

30

40

50

、リンパ節生検材料の評価により、注入されたクローンは、リンパ節のおおよそ 2 % ~ 8 % の C D 8 <sup>+</sup> 細胞を構成したことが分かった。構造性プロモーター（接着分子）が、循環している T 細胞をリンパ節に戻るように仕向け、in vitro 増殖により下方調節されるので、リンパ節ホーミングは、この構造性プロモーター下で L 選択分子をコードする c D N A 構築物に T 細胞を共トランスフェクトすることでさらに改善され得る（Chaoら、1997）。本発明は、上述のような組み換えヒト C D 19 特異的 C A R 発現細胞の治療有効量を患者に注入することを含む、内因性 C D 19 を発現する細胞と関連するヒト疾患病態の治療方法を提供し得る。内因性 C D 19 を発現する細胞と関連するヒト疾患病態は、リンパ腫、白血病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、及び B 細胞関連自己免疫疾患からなる群から選択され得る。10

#### 【 0 1 1 9 】

白血病は、血液または骨髄のがんであり、血液細胞、通例的には、白血球細胞（白血球）の異常増殖（増殖による產生）を特徴とする。血液学的腫瘍と呼ばれる大きな群の疾患の一部である。白血病は、一連の疾患を包含する幅広い用語である。白血病は、臨床的及び病理的に急性型及び慢性型に分けられる。

#### 【 0 1 2 0 】

急性白血病は、幼若血液細胞の急速な増加を特徴とする。そのような密集によって骨髄は健常な血液細胞を產生できなくなる。急性型の白血病は、小児及び若年成人で起こり得る。実際には、米国において、いずれの他の型の悪性腫瘍疾患よりもより一般的な小児の死亡原因である。急性白血病は、悪性腫瘍細胞が急速に進行及び集積し、その後、血流に乗って身体の他の臓器に広がってしまうため緊急治療を要する。この疾患は、脳神経まひを時折引き起こすが、中枢神経系（C N S）の関与はまれである。慢性白血病は、比較的成熟しているがやはり異常な血液細胞の過剰な蓄積により区別される。通常、進行に数ヶ月から数年かかり、細胞は正常細胞よりもさらに高い率で生成され、血液中の異常な白血球細胞が増加する。慢性白血病は、高齢者に生じるのがほとんどであるが、理論的にはどの年齢層でも起こり得る。急性白血病は直ちに治療しなければならないが、慢性型では、療法の効果を最大限にするため治療前にしばらくの間モニタリングすることがある。20

#### 【 0 1 2 1 】

さらに、この疾患は、通常ではリンパ球を形成に進む種類の骨髄細胞でがん性変化が発生したことを示すリンパ性またはリンパ芽球性、及び、通常では赤血球、白血球の一種、及び血小板の形成に進む種類の骨髄細胞でがん性変化が発生したことを示す骨髄性または骨髄に分類される（リンパ球様細胞対骨髄細胞を参照されたい）。30

#### 【 0 1 2 2 】

急性リンパ性白血病（急性リンパ芽球性白血病または A L L としても知られる）は、若年小児における最も一般的な種類の白血病である。この疾患には、成人、特に 65 歳以上の成人もかかる。慢性リンパ性白血病（C L L）には、55 歳以上の成人が最も頻繁にかかる。これはしばしば、より若い成人も発症するが、小児はほとんどかからない。急性骨髄性白血病（急性骨髓性白血病または A M L としても知られる）は、小児よりも成人に、より一般的に生じる。この種類の白血病は、以前は、「急性非リンパ性白血病」と呼ばれていた。慢性骨髄性白血病（C M L）は、主に成人に生じる。非常に少数の小児もこの疾患を発症する。40

#### 【 0 1 2 3 】

リンパ腫は、リンパ球（脊椎動物免疫系における種類の白血球細胞）で起こる種類のがんである。リンパ腫には多くの種類がある。米国立衛生研究所によれば、リンパ腫は、米国におけるがんの全症例中約 5 % を占め、特に、ホジキンリンパ腫は、米国におけるがんの全症例中 1 % 未満を占める。リンパ系は身体の免疫系の一部であるため、H I V 感染またはある薬物もしくは薬剤により免疫力が低下している患者も、リンパ腫の発生率が高い。50

#### 【 0 1 2 4 】

19世紀及び20世紀には、この疾患は、1832年にトマス・ホジキンにより発見されたため、ホジキン病と呼ばれていた。口語的には、リンパ腫は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫（他の全ての種類のリンパ腫）として広く分類される。リンパ腫の種類の科学的分類についてより詳述する。旧分類では組織球性リンパ腫と呼ばれていたが、これらは、新規分類ではB、T、またはNK細胞系として認識される。

#### 【0125】

自己免疫疾患または自己免疫は、生物体が自身の構成部分を（サブ分子レベルに至るまで）「自己」と認識できないことであり、生物体自身の細胞および組織に対する免疫応答がもたらされる。かかる異常な免疫応答に起因する任意の疾患を自己免疫疾患と称する。顕著な例としては、セリック病、1型糖尿病（IDDm）、全身性エリテマトーデス（SLE）、シェーグレン症候群、多発性硬化症（MS）、橋本甲状腺炎、グレーブス病、特発性血小板減少性紫斑病、及び関節リウマチ（RA）が挙げられる。

10

#### 【0126】

自己免疫疾患を含む炎症性疾患は、B細胞疾患と関連するクラスの疾患もある。自己免疫疾患の例としては、限定的ではないが、急性特発性血小板減少性紫斑病、慢性特発性血小板減少性紫斑病、皮膚筋炎、シデナム舞蹈病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多内分泌腺症候群、水疱性類天疱瘡、糖尿病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌感染後腎炎、紅斑結節炎、高安動脈炎、アジソン病、関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発動脈炎、強直性関節炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血管血栓炎、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、甲状腺機能亢進症、強皮症、慢性的活動性肝炎、多発筋炎／皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性触覚錯誤症、ヴェーゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎／多発筋痛、ペミシオウサネミア、急速進行性糸球体腎炎、乾癬、及び線維化性肺胞炎が挙げられる。最も一般的な治療は、コルチコステロイド及び細胞毒性薬であり、これは猛毒になり得る。これらの薬剤は、免疫系全体を抑制し、重篤な感染症をもたらし、骨髄、肝臓、及び腎臓に悪影響を及ぼす。クラスII自己免疫疾患の治療に今まで用いられてきた他の治療は、T細胞及びマクロファージに対して向けられている。自己免疫疾患、特に、クラスIII自己免疫疾患をより効果的に治療する方法が必要とされている。

20

VIII. 人工抗原提示細胞

30

#### 【0127】

場合によっては、aAPCは、実施形態の治療組成物及び細胞治療剤の調製に有用である。調製物及び抗原提示系の使用に関する一般的なガイドラインには、例えば、米国特許第6,225,042号、同第6,355,479号、同第6,362,001号、及び同第6,790,662号；米国特許出願公開第2009/0017000号及び同第2009/0004142号；及び国際公開第WO2007/103009号を参照されたい。

。

#### 【0128】

aAPCは、一般に、ペプチドをMHC分子に追加の処理をすることなく直接結合することができる最適な長さのペプチドでインキュベートされる。あるいは、細胞は、対象の抗原を発現することができる（即ち、MHC非依存性抗原認識の場合）。ペプチド-MHC分子または対象の抗原に加えて、aAPC系はまた、少なくとも1つの外因性補助分子も含んでもよい。任意の好適な数及び組み合わせの補助分子を使用してもよい。補助分子は、共刺激分子及び接着分子などの補助分子から選択してもよい。例示の共刺激分子としては、CD70及びB7.1（B7.1は、以前はB7として知られており、CD80としても知られる）が挙げられ、特にT細胞表面上のCD28及び/またはCTLA-4分子に結合し、これにより、例えば、T細胞増殖、Th1分化、T細胞短期間生存、及びインターロイキン（IL）-2などのサイトカイン分泌に作用する（Kimmら、2004, Nature, Vol. 22(4), pp. 403~410を参照されたい）。接着分子としては、セレクチンなどの炭水化物結合糖タンパク質、インテグリンなどの膜貫通型結

40

50

合糖タンパク質、カドヘリンなどのカルシウム依存性タンパク質、及び細胞間接着分子（I C A M）などの単回膜貫通型免疫グロブリン（I g）スーパーファミリータンパク質などを挙げることができ、これらは、例えば、細胞対細胞、または細胞対マトリックスの接触を促進する。例示の接着分子としては、L F A - 3 及び I C A M - 1 などの I C A M が挙げられる。共刺激分子及び接着分子を含む例示の補助分子の選択、クローニング、調製、及び発現に有用な技術、方法、及び試薬は、例えば、米国特許第 6,225,042 号、同第 6,355,479 号、及び同第 6,362,001 号に例示されている。

#### 【0129】

a A P C になるように選択された細胞は、好ましくは細胞内抗原プロセシング、細胞内ペプチド輸送、及び／または細胞内 M H C クラス I 若しくはクラス I I 分子 - ペプチドローディングが欠失しているか、または変温性（即ち、温度攻撃に対して哺乳類細胞株よりも感受性が低い）であるか、またはこれら欠失と変温性特性の両方を保有している。好ましくは、a A P C になるように選択された細胞はまた、外因性 M H C クラス I またはクラス I I 分子、及び細胞内に導入される補助分子要素に対して、少なくとも 1 つの内因性対応物（例えば、内因性 M H C クラス I 若しくはクラス I I 分子、及び／または上記内因性補助分子）を発現する能力をも欠失している。さらに、a A P C は、好ましくは、a A P C 生成のためのそれらの改変以前に細胞が保有していた欠失及び変温性特性を保持する。例示の a A P C は、昆虫細胞株などの抗原プロセシング関連トランスポーター（T A P）- 欠失細胞株を構成するか、もしくはその細胞株由来である。例示の変温性昆虫細胞株は、Schneider 2 細胞株などのショウジョウバエ細胞株である（例えば、Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 1972 Vol. 27, pp. 353 ~ 365 を参照されたい）。Schneider 2 細胞の調製、増殖、培養に関する実例となる方法は、米国特許第 6,225,042 号、同第 6,355,479 号、及び同第 6,362,001 号に記載されている。

#### 【0130】

一実施形態では、a A P C は、凍結解凍サイクルにも曝される。例示の凍結解凍サイクルにおいて、a A P C を収容する好適な容器を、適量の液体窒素、固体二酸化炭素（即ち、ドライアイス）、または急速に凍結を起こすような同様の低温材料と接触させることにより、a A P C を凍結してもよい。その後、低温材料を a A P C から除去して周囲室温条件に曝すことにより、または、微温湯浴若しくは温かい手を用いて解凍時間の短縮を促進する促進化解凍プロセスのいずれかにより、凍結した a A P C を解凍する。さらに、a A P C を凍結し、解凍まで長期間保存してもよい。また、凍結した a A P C を解凍した後、更に用いるまで凍結乾燥してもよい。好ましくは、ジメチルスルホキシド（D M S O）、ポリエチレングリコール（P E G）、及び他の防腐剤などの凍結解凍手順に悪影響を及ぼし得る防腐剤は、本質的にそのような防腐剤を欠く培地に a A P C を移すことなどにより、凍結解凍サイクルを受ける a A P C を含む培地には含まれず、または本質的に除去される。

#### 【0131】

他の好ましい実施形態では、不活化後に、細胞増殖、核酸の複製または発現が本質的に起こらないように、異種核酸及び a A P C 内因性の核酸を架橋により不活化してもよい。一実施形態では、外因性 M H C 及び補助分子の発現、このような分子の a A P C 表面上への提示、並びに選択された単一のペプチドまたは複数のペプチドによる提示された M H C 分子のローディングに続く点で、a A P C が不活化される。従って、このような不活化されて選択したペプチドロード a A P C は、本質的に増殖不能または複製不能にされているものの、選択したペプチド提示機能を保持している。好ましくは、架橋によっても、a A P C の抗原提示細胞機能を実質的に低下させることなく、細菌及びウイルスなどの微生物汚染が本質的でない a A P C がもたらされる。従って、架橋は、a A P C の重要な A P C 機能を維持する一方で、a A P C を用いて開発された細胞療法生成物の安全性に関する懸念を軽減するのに役立つ。架橋及び a A P C に関する方法については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2009/0017000 号を参照された

10

20

30

40

50

い。

### I X . 本発明のキット

#### 【 0 1 3 2 】

本明細書に記載の組成物のどれもがキットに含まれ得る。いくつかの実施形態では、同種CAR-T細胞をキットに提供し、これには、培地などの細胞の増殖に適した試薬、aAPC、増殖因子、抗体(例えば、CAR-T細胞を選別または特徴付けするためのもの)、及び/またはCARまたはトランスポゼースをコードするプラスミドも含み得る。

#### 【 0 1 3 3 】

非限定例では、キメラ受容体発現構築物、キメラ受容体発現構築物を生成するための1つ以上の試薬、発現構築物のトランスフェクションのための細胞、及び/または、発現構築物のトランスフェクションのために同種細胞を得るための1つ以上の器具(そのような器具は、シリング、ピペット、鉗子、及び/または、いずれかのそのような医療承認された装置であり得る)。

#### 【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、内因性TCR / 発現を排除するための発現構築物、構築物を生成するための1つ以上の試薬、及び/またはCAR<sup>+</sup>T細胞がキットに提供される。いくつかの実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする発現構築物が含まれる。

#### 【 0 1 3 5 】

いくつかの態様では、キットは、細胞をエレクトロポレーションするための試薬または装置を含む。

#### 【 0 1 3 6 】

キットは、本発明の組成物を生成するために、1つ以上の好適に等分された本発明の組成物または試薬を含み得る。キットの構成成分は、水性媒体または凍結乾燥形態のいずれかで包装され得る。キットの容器手段には、成分を入れることができ、好ましくは好適に等分して入れることができる少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、びん、シリングまたは他の容器手段が含まれ得る。2つ以上の成分がキットに存在する場合、キットは、追加の成分を別々に入れることができる第2、第3、または他の追加の容器も一般に含有するであろう。しかしながら、成分の種々の組み合わせがバイアルに含まれてもよい。本発明のキットはまた典型的には、キメラ受容体構築物を含有するための手段、及び、商業用販売のために厳重に閉じ込められている何らかの他の試薬容器を含むであろう。そのような容器には、例えば、所望のバイアルが保持される射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器が含まれ得る。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 3 7 】

### X . 実施例

下記の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含められる。下記の実施例において開示される技術は、本発明の実施において十分に機能することが本発明者によって発見された技術を表しているため、その実施のための好ましい態様を構成すると見なされ得ることが当業者によって理解されるはずである。しかしながら、当業者は本開示に照らして、多くの変化が、開示される具体的な実施形態において行われ得ること、そして、多くの変化により、同様な結果または類似する結果が依然として、本発明の精神および範囲から逸脱することなく得られ得ることを理解しなければならない。

実施例1 - 末梢血及び臍帯血からのT細胞を遺伝的に変更するためのスリーピングビューティ及び人工抗原提示細胞の臨床応用 - 材料及び方法

#### 【 0 1 3 8 】

PB及びUCBからの単核球(MNC)の単離。0日目またはその前に、等容積のPBと4容積のPBS-EDTAを持つUCBを希釈する。50mL遠心分離管内で希釈血液(25mL)をフィコール(12mL)の上にゆっくり重層し、400×gで30~40分間(ブレーキなし)遠心分離する。移送ピペットを用いて単核球分画(界面)を回収し

10

20

30

40

50

、新しい50mL遠心分離管に移す。容積をPBS-EDTAで50mLまでにし、450×gで10分間遠心分離する。上清を吸引し、50mLの完全培養培地（CCM）中で細胞ペレットを穩やかに再懸濁させる。400×gで10分間遠心分離する。CCM中の細胞ペレットを穩やかに再懸濁させ、プールし、トリパンブルー色素排除（セロメーター、PBMCプログラム）を用いて細胞計数を行う。MNCをエレクトロポレーション（ヌクレオフェクション）に用いてもよいし、あるいは将来使うために凍結保存してもよい。

#### 【0139】

0日目にエレクトロポレーションするT細胞の調製。凍結保存MNCを用いる場合、大規模なエレクトロポレーションのために十分な細胞を、37の水浴で速やかに解凍する（遠心分離及び2時間のインキュベーション中の細胞喪失は $2 \times 10^8$ プラス～20%）。穩やかに再懸濁させ、予熱した完全無フェノールRPMI培養培地（PF-RPMI）を含有する適当なサイズの遠心分離管に細胞を移し、200×gで10分間（ブレーキなし）遠心分離し、上清を吸引する。次に、新鮮分離したMNCを用いる場合、PF-RPMI中でMNCを再懸濁させ、細胞計数（セロメーター）を行い、細胞を適当なサイズの細胞培養容器に $10^6$ 個の細胞/mL濃度で移す。加湿した37/5%のCO<sub>2</sub>インキュベーターで細胞を2時間±30分インキュベートする。MNCを滅菌遠心分離管に移し、200×gで5分間（ブレーキなし）回転させ、上清を吸引し、穩やかに再懸濁させ、細胞ペレットをPF-RPMI中で組み合わせる。細胞計数（セロメーター）を行い、必要な細胞懸濁液（ $2 \times 10^8$ MNC）の容量を算出する。算出した容量を50mLの滅菌遠心分離管に移し、200×gで10分間（ブレーキなし）回転させる。残存培地が残らないように上清を吸引し、管の側面を軽くたたくことで穩やかに再懸濁させる。

#### 【0140】

0日のMNC（10個のキュベットを用いたフルスケールプロセス）のエレクトロポレーション（ヌクレオフェクション）。加湿した37/5%のCO<sub>2</sub>インキュベーターで、4mLの温かなPF-RPMIを含有する10ウェルで滅菌12ウェルプレートをブレインキュベートする。ロンザヌクレオフェクター溶液ヒトT細胞キット（製造者指示ごとに再構築した、www.lonzaroma.com）を調製し、バイオセーフティーキャビネット（BSC）内で外気温度に予熱する。反応/キュベット当たり100μLの補充ヌクレオフェクター溶液、15μgのトランスポゾン（CD19RC28/pSBSOとして指名された超らせんDNAプラスミド）、及び5μgのトランスポゼース（pCMV-SB11として指名された超らせんDNAプラスミド）を添加して、ヌクレオフェクター溶液/DNAマスターMixを調製する。遠心分離管の側面を軽くたたくことでMNC細胞ペレットを分散させ、 $2 \times 10^7$ 細胞/100μLの最終細胞濃度でヌクレオフェクション溶液/DNAマスターMixを再懸濁させる。100μLの細胞懸濁液を10本のロンザヌクレオフェクションキュベットの各々に気泡を避けながら慎重に移す。キュベットを1回軽くたたいて、プログラムU-014（非刺激T細胞用）を用いて電気穿孔する。キュベット及び12ウェルプレートをBSCに移す。対応するウェルから～500μLの予熱した培養培地を加えることで、Amamaxa社製の先の細い移送ピペットを用いて各キュベットから電気穿孔細胞を採取し、プレートを2時間±30分の加湿した37/5%のCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻す。2時間のインキュベーション後、細胞を全てのウェルから採取し、滅菌遠心分離管に移す。140×gで8分間、外気温度で、ブレーキなしで遠心分離して細胞を洗浄し、残存培地が細胞ペレットを覆わないように上清を吸引し、廃棄する。遠心分離管の側面を軽くたたくことで細胞ペレットを分散させ、CCM中で穩やかに再懸濁させ、単細胞懸濁液を得る。細胞計数を行い、細胞濃度をCCM中で $10^6$ 個の細胞/mLに調整する。細胞懸濁液を細胞培養フラスコに移し、インキュベーター中に一晩置く。同じプロセスを、対照EGFPトランスクレクト細胞（5μgのAmamaxa対照EGFP超らせんプラスミド、pmaxGFPを持つ $5 \times 10^6$ 個の細胞/キュベット）に用いてもよい。

#### 【0141】

1回目及びそれに続く刺激サイクルの1日目にフローサイトメトリーによるCAR発現

10

20

30

40

50

の分析。電気穿孔細胞を採取し、トリパンブルー色素排除（血球計）を用いて細胞計数を行う。CAR発現の計測としてCD3、CD4、CD8、及びヒトIgGFcに特異的な抗体を持つ細胞（ $1 \sim 2 \times 10^6$ ）を染色する。FACSカリバー上の細胞を得、FCS Expressソフトウェアを用いてデータを分析し、CARの発現を算出する。式：（総生細胞数）×（% CAR<sup>+</sup>細胞）= CAR<sup>+</sup>細胞数によって、培養中のCAR<sup>+</sup>細胞を算出する。

#### 【0142】

1回目及びそれに続く刺激サイクルの1日目のaAPC（クローン#4）の調製。aAPC（クローン#4）をK562細胞（米国菌培養収集所から得た親株）から得て、所望のT細胞共刺激分子を共発現した。凍結した100Gy照射aAPCの等分量を37の水浴で解凍する。細胞を、 $400 \times g$ で10分間CCM中に遠心分離することで2回洗浄し、セロメーター（トリパンブルー色素排除）を用いてカウントする。刺激に必要な生存aAPCの数：（CAR<sup>+</sup>細胞数）×2=必要な照射aAPCの数を算出する。

#### 【0143】

1回目及びそれに続く刺激サイクルの1日目のCAR<sup>+</sup>T細胞のaAPC媒介刺激。滅菌容器中で電気穿孔細胞（CARを発現）と照射aAPC（クローン#4）とを、CCM中で1:2（CAR<sup>+</sup>細胞：生存aAPC）の比率でミックスする。aAPC比率は、エレクトロポレーションの次の日のフローサイトメトリーに基づいて、CARを発現するために調整されることに留意されたい。IL-21（30ng/mL）を細胞懸濁液に加える。 $10^6$ 個の細胞/mLの濃度で、T-75cm<sup>2</sup>フラスコ及び/またはVueli<sup>f</sup>e培養バッグ中に等分し、インキュベーターに戻す。

#### 【0144】

3日目及び5日目のCAR<sup>+</sup>T細胞の継続培養。半培地交換を行い、IL-21を補充し、T細胞を $10^6$ 個の細胞/mLの濃度で維持する。

#### 【0145】

7日目の第1aAPC-媒介刺激サイクルの終了。細胞を採取し、計数し、CD3、CD4、CD8、及びFc（CAR）を染色する。

#### 【0146】

エレクトロポレーション後7日目～14日目のCD56<sup>+</sup>細胞の枯渇。CD56<sup>+</sup>CD3<sup>neg</sup>リンパ球 $10\%$ の場合、常磁性粒子を用いてCD56枯渇を行う。

#### 【0147】

8日目 14日目、15日目 21日目、及び22日目 28日目に対応する刺激サイクル#2、#3、及び#4中にT細胞を臨床的に十分な数に増殖するためのaAPCの反復追加。刺激プロセスを4回まで繰り返す。7日目、14日目、及び21日目の始めにIL-2（50U/mL）を培養に加えた後、各培地を交換する（月、水、金スケジュールで、1週間で3回）。放出試験及び注入用のコントロールドレートフリーザーを用いて、必要に応じて過剰T細胞を冷凍保存する（アーカイブ保存する）。

実施例2-末梢血及び臍帯血からT細胞を遺伝的に変更するためのスリーピングビューティ及び人工抗原提示細胞の臨床応用-結果

#### 【0148】

DNAプラスミドの電気移動、及び照射aAPC上のT細胞の増殖を用いて、ヒト応用のためのPB及びUCB由来の臨床的に魅力的な数のT細胞を生成する。これらの遺伝子変換T細胞は、主要組織適合複合体に依存しないTAA CD19を認識する導入CARを発現する。（i）トランスポゾン、CD28及びCD3-<sup>14</sup>を介してシグナルを送る第2世代CAR（CD19RCDF28）、及び（ii）トランスポゼス、SB11（Jinら、2011；Daviesら、2010；Kebriaeilら、2012）。現在の研究で用いるプラスミドは、Waisman Clinical Biomanufacturing Facility（Madison、WI）により商用に生産された。aAPC（クローン#4）は、前述したように、K562細胞（米国菌培養収集所

10

20

30

40

50

から得た親株)から得て、所望のT細胞共刺激分子(各分子は、aAPCの細胞表面上に90%で導入した)を共発現した(Manurilら、2010)。ここで、CD19特異的T細胞は、SB転位を用いてPBまたはUCB由来の単核球(MNC)から生成し、CARに導入した後、aAPCを追加することで、CAR依存的にT細胞を数値的に増殖させることができた(図1及び図4)(Singhら、2011; Singhら、2008)。トランスポゾン(CAR)をコードするDNAプラスミド(CD19RCD28/pSBSO)15μgと、トランスポゼース(SB11)をコードするDNAプラスミド(pCMV-SB11)5μgとを用いて、各受容者に10本のキュベット(2×10<sup>7</sup>MNC/キュベット)を電気穿孔した。MNCが研究室での作業のために制限されていたり、あるいは規模が小さい場合、キュベットの数を減らしてもよい。エレクトロポレーションの日は、刺激サイクル#1の「0日目」として定義する。フローサイトメトリー及び培養条件の対照として、自己T細胞を模擬電気穿孔し(DNAプラスミド無)、OKT3でプレロードした照射aAPC(クローン#4)上で数値的に増殖させ、CD3を架橋させて、T細胞増殖を維持した。エレクトロポレーションの翌日に、電気移送の効率及びT細胞の生存率を定期的に評価した(図2B)。この初期時点での対照DNAプラスミド(指定されたpmaxGFP)及びCARからのEGFPの発現は、組み込みプラスミド及びエピソームプラスミドからのタンパク質発現を反映している。一般に、EGFP発現は、エレクトロポレーションの翌日には60%と測定し、CAR発現は、40%~50%のT細胞生存率で~40%(図2A)と測定した。可溶性組み換えヒトIL-2及びIL-21の存在下で照射aAPCの反復追加により、CARを安定的に発現するT細胞(CD19RCD28)を回収する。これらのNK細胞の百分率が10%、特に、T細胞上で発現したCARの百分率が低い場合、CD3<sup>neg</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞は、CD56特異的常磁性粒子を用いて培養から枯渇される。この枯渇により、CAR<sup>+</sup>T細胞の増殖を維持するaAPCの能力に干渉するNK細胞の急速な異常増殖が防止される。時々、CAR<sup>+</sup>T細胞からのNK細胞を最後の2回の刺激サイクル中に枯渇させるが、これにより、いくつかのCAR<sup>+</sup>T細胞上のCD56の共発現により所望の細胞の喪失がもたらされる。14日目を過ぎて、Vuelife培養バッグを用いて機能的閉鎖システムでT細胞を増殖させた。将来の分析のためにアーカイブ保存した材料のソースとして機能し、かつ、予期しない問題がその後製造プロセス中に発生した場合に解凍するために、遺伝子改変され増殖させたT細胞のサブセットは、一般に、aAPC上の共培養の14日目または21日目(刺激サイクル#2または#3の最後)に凍結保存する。T細胞は、通常、>90%のCARを定期的に発現し、かつ、>80%の生存がある培養(図3)の28日目または約28日目に採取する(図2C及び2D)。aAPC上で共培養して4週間後に、CD3<sup>+</sup>T細胞の平均倍数増殖は、CAR<sup>+</sup>発現が90%±7.5%で19,800±11,313である(Singhら、2011)。これらのT細胞を凍結保存し、製造した生成物の安全性及び治療潜在力を知らせるインプロセス及び放出試験を行う。放出試験は、臨床検査室改善法(CLIA)に従って実施し、臨床試験で受容者に注入する前に分析証明書を作成する。

実施例3 - スリーピングビューティ及び人工抗原提示細胞を用いて、キメラ抗原受容体を安定的に発現する臨床等級CD19特異的T細胞の製造 - 材料及び方法

#### 【0149】

臨床等級DNAプラスミドの生成。SBトランスポゾンであるc.<sub>o</sub><sub>o</sub><sub>p</sub>CD19RCD28/pSBSOは、伸長因子-1(EF-1)(Kimら、1990)及びヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)の5'非翻訳領域(Singhら、2011; Daviesら、2010)からなるEF-1/HTLVハイブリッド複合体プロモーター(InvivoGen)下で、ヒトコドン最適化(CoOp)第2世代c.<sub>o</sub><sub>o</sub><sub>p</sub>CD19RCD28CAR(配列番号1)を発現する。このDNAプラスミドの誘導については、図10に記載される。SBトランスポゼース、SB11は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター下で、DNAプラスミドpCMV-SB11からc<sub>i</sub>sで発現された(Singhら、2011)。このDNAプラスミドの誘導については、図11に記載される。

プラスミドは両方とも、これら全体にわたって配列を決定し、菌株大腸菌DH5を選択するためのカナマイシンを用いて、Waisman Clinical Biomanufacturing Facility (Madison, WI)により製造した。DNAプラスミドCD19 coop-F2A-Neo/pSBSOを用いて、CD19を発現した(図12)。

【表1】

表1: SBトランスポゾン及びトランスポゼースをコードするDNAプラスミドの放出基準。

試験	仕様
外観	透明無色の液体
制限酵素マッピング&アガロースゲル	トランスポゾン用のNdeI; AfI III & NheI; HindIII & AvrII; XbaI & NcoIで消化。トランスポゼース用のNdeI; XhoI & PvuII; AfI III; NcoIで消化
シークエンシング	配列は、起源コードに適合する
吸光度を介した濃度	2.0±0.2mg/mL
A260/A280吸光度比	1.8~2.0
細菌内毒素の動態LAL試験	<50EU/mg
プラスミド形態(HPLCを介した%超らせん)	>90%超らせん
無菌試験	増殖は観察されなかった
ELISAを介した大腸菌宿主タンパク質	<0.3%
HPLCを介した大腸菌RNA	<10%

【0150】

細胞計数。トリパンブルー色素排除を用いて、生細胞を死細胞と区別し、セロメーター(Nexcelom Bioscience)を用いて計数した(Singhら、2011)。

【0151】

PBMCの単離。2人の男性ボランティアの健康なドナーからの白血球除去産物を、Key Biologics LLC (Memphis, TN)から購入した。末梢血液単核球(PBMC)を、cGMPに準じて行うように Biosafe Sepaxシステム(Eysins, Switzerland)を適応させて単離した。簡単に言えば、CS-900キット上の全てのクランプを閉じた後、100mLのフィコール(GE Health care)を、60mLのシリングを介して、ルアーロックコネクタを介した密度勾配培地バッグ(「フィコールバッグ」)に無菌で移し、手持ち式シーラー(Sebra、モデル#2380)を用いてチューブを熱融着させた。キットを、Clinical MACS緩衝液(PBS/EDTA、Miltenyi、Cat#70026)を洗浄用の20mLの25%ヒト血清アルブミン(HSA)(Baxter)(2%v/v、洗浄緩衝液)と共に含有する1,000mLバッグと、最終生成物バッグ[カップラー付き300mL移動パック(Baxter/Fenwal 4R2014)]と、試薬/血液バッグとにスパイク連結した。密度勾配ベース分離プロトコル(v126)を用いて、シリングビストンを遠心分離器に装填し、Sepax装置のカバーを閉じた。試薬/血液バッグと及び生成物バッグを吊り下げ、全ての栓を「T」位置で回転ピン上にはめた。圧力センサーラインを接続した後、キットを自動使い捨て試験により検証し、重力流を用いて手作業でプライムした。サイクルの完了後、最終生成物を遠心分離管に無菌で移し、400gの洗浄緩衝液、及びリン酸緩衝生理食塩水(PBS)ごとに1回10分間で洗浄した。計数後、

10

20

30

40

50

コントロールドレートフリーザー (Planner Kryo 750) 内で、BM5プログラム (-2 / 分の割合で 4 ~ -4 、 -35 / 分の割合で -4 ~ -60 、 8 / 分の割合で -60 ~ 20 、 -2.5 / 分の割合で -20 ~ -45 、 -10 / 分の割合で -45 ~ -80) を用いた CryoMACS Freeze バッグ (Miltenyi) 及びバイアル (Nunc) 中の凍結保存培地 (50%のHSA、40%のプラズマライト、10%のDMSO) を用いて、細胞を凍結保存した。

#### 【0152】

aAPC (クローン #4) マスター及び作業用細胞バンクの製造。ペンシルベニア大学でレンチウイルスにより K562 を形質導入し、ビストロニックベクターとしての (i) CD19、(ii) CD64、(iii) CD86、(iv) CD137L、及び (v) 膜結合型 IL-15 (mIL15) を EGFPと共に共発現する aAPC (クローン #4、CJK64.86.41BBL.GFP.IL-15.CD19 として指定) を生成した。10%の熱不活性化した規定の FBS (Hyclone) を含有する HyQ RPMI 1640 (Hyclone) 中で aAPC を数値的に増殖させ、2 mM の Glutamax-1 (Life Technologies - Invitrogen) 培養培地 (CM) で細胞を  $5 \times 10^5$  個の細胞 / mL で維持した。320 バイアルのマスター細胞バンク (MCB) を、Production Assistance of Cellular Therapies (PACT) を介して作製した (表2)。MCB 由来のクローン 4 aAPC の 200 バイアル作業用細胞バンク (WCB) を、MDACC で生成し、試験した (表3)。

10

20

【表2】

表2：K562由来aAPC（クローン#4）マスター細胞バンクの放出基準

試験	仕様	
複製可能レンチウイルス	陰性	
レトロウイルスの検出用の生成物強化逆転写酵素	陰性	
内毒素LAL	陰性	
寒天培養可能及び非寒天培養可能なマイコプラズマ	陰性	
PCRによるHIV-1/2プロウイルスDNA	陰性	10
PCRによるHBV DNA	陰性	
RT-PCRによるHCV RNA	陰性	
PCRによるCMV DNA	陰性	
パルボウイルスB19	陰性	
PCRによるHTLV-I/IIプロウイルスDNA	陰性	
PCRによるEBV DNA	陰性	20
PCRによるHHV-6 DNA	陰性	
PCRによるHHV-7 DNA	陰性	
PCRによるHHV-8 DNA	陰性	
アデノ関連ウイルス	陰性	
In vivo不顯性ウイルス	陰性	
	陰性	
9 CFRによるウシウイルス	陰性	
改変9 CFR PT-1によるブタウイルス	陰性	
アデノ関連ウイルス	陰性	
アイソザイム分析	ヒト由来	30
透過電子顕微鏡法による形態	識別可能なウイルス様粒子も任意の他の微生物因子も無し	
免疫表現型検査：		
CD19	90%	
CD64	90%	
CD86	90%	
CD137L	90%	
EGFP-mIL15	90%	
静菌&静菌作用	陰性	
21 CFR 610.2による不穏性	陰性	40

## 【表3】

表3：K562由来aAPC（クローン#4）作業用細胞バンクの放出基準

試験	研究所	仕様
静菌及び静菌作用	AppTec Laboratory Services	陰性
21 CFR 610.12による不稳定性	AppTec Laboratory Services	陰性
寒天培養可能及び非寒天培養可能なマイコプラズマ	BioReliance	陰性
In vitro 外来性ウイルス試験	BioReliance	陰性
同一性アイソザイム分析	BioReliance	ヒト由来
表現型	MDACC GMP Flow Cytometry Laboratory	≥80%GFP <sup>+</sup> ≥80%CD19 <sup>+</sup> ≥80%CD86 <sup>+</sup> ≥80%CD137L <sup>+</sup> ≥80%CD64 <sup>+</sup> ≥80%CD32 <sup>+</sup>
内毒素(LAL) Endotoxin	MDACC GMP Quality Control Laboratory	≤5EU/mL
トリパンブルーによる生存率	MDACC GMP Quality Control Laboratory	≥60%

## 【0153】

CAR<sup>+</sup>T細胞を選択的に増殖させるためのaAPC（クローン#4）。照射aAPCを用いて、遺伝子改変T細胞を数値的に増殖させた。WCBからの解凍aAPCを、Vuelife細胞培養バッグで最大60日間CMで増殖させ、Biosafe Sepax II採取手順を用いて採取した。簡単に言えば、CS-490.1キットを、ルアーロックコネクタを介して300mLの出力バッグ（移動パック）に接続した。分離チャンバをピットに設置し、チューブを光センサに挿入し、栓を「T」位置で整列させた。圧力センサーラインを接続した後、生成物バッグ及び上清／血漿バッグをホルダーに吊り下げた。改変プロトコルPBS CV302をSepaxメニューから選択し、処理される入力生成物の容量（初期容量）を、840mLに設定した。検証及びキット試験後、手順を開始した。完了後、バッグを除去し、クランプを閉じ、キットを除去した。最終生成物バッグからの細胞を無菌除去し、洗浄培地（プラズマライト中で10%HSA）で2回洗浄し、計数した。CIS BIO International社製ラジエーター（IBL-437C#09433）を用いて、aAPCを照射（100Gy）し、コントロールドレートフリーザー（Planer Kryo 750）を用いて、凍結保存培地中に後々の使用のために凍結保存した。

## 【0154】

aAPCのOKT3-ローディング。OKT3をロードした（CD64を介して）aAPC（クローン#4）を用いて、遺伝子改変していない対照（CAR<sup>neg</sup>）自己制御性T細胞を増殖させた。培養から得たaAPCを、ローディング培地（LM）と呼ばれる、0.2%アセチルシスティン（Acetadote、Cumberland Pharmaceuticals）を含有する無血清X-Vivo15（cat#04-744Q、Lonza）で一晩インキュベートした。翌日、細胞を洗浄し、Gamma Cell 1000 Elite Cs-137ラジエーター（MDS Nordion）を用いて照射（100Gy）し、機能等級の精製抗ヒトCD3（クローン-OKT3、16-003

10

20

30

40

50

7 - 8 5、e B i o s c i e n c e ) の  $1 \mu\text{g} / 10^6$  個の細胞と共に  $10^6$  個の細胞 / mL の濃度で LM 中に再懸濁させ、4 で 30 分間 3 - D 回転子 (Lab - Line) で 穏やかに攪拌してインキュベートした。LM で 3 回洗浄後、細胞を実験で用いたか、あるいは後々の使用のために蒸気層の液体窒素で等分に凍結した。

#### 【0155】

C A R<sup>+</sup> T 細胞の製造。解凍 P B M C を、(i) ヒト T 細胞キット (cat # V P A - 1002、Lonza; 1 キュベットに  $2 \times 10^7$  個の細胞当たり  $100 \mu\text{L}$ ) で、(ii) C D 1 9 R C D 2 8 C A R トランスポゾン (キュベット当たり  $2 \times 10^7$  個の P B M C 当たり  $15 \mu\text{g}$  の超らせんDNA) をコードする DNA プラスミド (c o o C D 1 9 R C D 2 8 / p S B S O) と、(iii) S B 1 1 トランスポゼース (1 キュベット当たり  $2 \times 10^7$  個の P B M C 当たり  $5 \mu\text{g}$  の超らせんDNA) をコードする DNA プラスミド (p C M V - S B 1 1) と共に再懸濁させた。この混合物をキュベット (Lonza) に直ちに移し、ヌクレオフェクター II (A m a x a / Lonza) を用いて電気穿孔し (培養 0 日目と定義)、10% R P M I 完全培地で 2 ~ 3 時間放置し、半培地交換、37 で 5% C O<sub>2</sub> 下で一晩インキュベートした。翌日、細胞を採取し、計数し、フローサイトメトリーにより表現型を生じ、照射 a A P C と 1 : 2 の比率 (C A R<sup>+</sup> T 細胞 : a A P C) で共培養し、培養 1 日目、及び 7 日間の刺激サイクルの開始と印を付けた。I L - 2 1 (cat # A F - 2 0 0 - 2 1、P e p r o T e c h) 及び I L - 2 (cat # N D C 6 5 4 8 3 - 1 1 6 - 0 7、N o v a r t i s) を、月、水、金スケジュールでそれぞれ、1 日目及び 7 日目以降に追加した。特に、これらの異常増殖が組織培養プロセスの初期に生じた場合、N K 細胞は、C A R<sup>+</sup> T 細胞の数的増殖を防ぐことができる。従って、25% H S A ( $80 \mu\text{L} / 10^7$  細胞) を含有する C l i n i M A C S 緩衝液中の L S カラム (cat # 1 3 0 - 0 4 2 - 4 0 1、M i l t e n y i B i o t e c h) 上で、C D 5 6 ビーズ (cat # 7 0 2 0 6、M i l t e n y i B i o t e c h、 $20 \mu\text{L}$  ビーズ /  $10^7$  細胞) を用いて C D 3<sup>neg</sup> C D 5 6<sup>+</sup> 細胞 10% の場合、C D 5 6 枯渇を行った。上述のようなコントロールドレートフリーザー (P l a n e r K r y o 7 5 0) を用いて、エレクトロポレーション後の培養 21 日目、及び第 3 刺激サイクルの最後に、T 細胞をバックアップとして凍結保存し、液体窒素 (蒸気層) 中に保存した。全ての C D 3<sup>+</sup> 及び C A R<sup>+</sup> T 細胞の細胞計数を経時的にプロットし、線型回帰を用いて傾きを決定した。スチューデント t 検定を用いて倍数増殖結果を比較した。各時点及び検証ランごとに C D 4 / C D 8 比率を算出し、平均化した。

#### 【0156】

C A R<sup>neg</sup> 対照 T 細胞の生成。対照として、 $5 \times 10^6$  個の模擬トランسفェクトした P B M C を、照射及び抗 C D 3 (O K T 3) をロードした K 5 6 2 由来 a A P C クローン # 4 と 7 日間の刺激サイクルで 1 : 1 の比率で共培養した。全ての培養を、培養 1 日目以降に I L - 2 1 ( $30 \text{ng} / \text{mL}$ ) で補充し、培養の開始後 7 日目に I L - 2 ( $50 \text{U} / \text{mL}$ ) で補充した。その後、全てのサイトカインを月、水、金スケジュールで追加した。

#### 【0157】

細胞株。C D 1 9<sup>+</sup> D a u d i 2 m [2] ミクログロブリンを共発現するバーキットリンパ腫 (R a b i n o v i c h ら、2 0 0 8) ]、及び C D 1 9<sup>+</sup> N A L M - 6 (プレ B 細胞) を、前述のように培養した (S i n g h ら、2 0 1 1)。A T C C からの E L - 4 細胞 (マウス T 細胞リンパ腫株) は、C D 1 9<sub>c o o p</sub> - F 2 A - N e o / p S B S O 構築物を用いて C D 1 9 を発現するように改変した。簡単に言えば、 $5 \times 10^6$  個の E L - 4 細胞を、S B トランスポゾン (C D 1 9<sub>c o o p</sub> - F 2 A - N e o / p S B S O、 $3 \mu\text{g}$ ) 及び S B トランスポゼース (p C M V - S B 1 1、 $1 \mu\text{g}$ ) を持つ  $100 \mu\text{L}$  の A m a x a M o u s e T 細胞ヌクレオフェクターキット (カタログ # V P A - 1 0 0 6) 中で再懸濁し、ヌクレオフェクター II (Lonza) を用いて電気穿孔した (プログラム X - 0 0 1)。トランسفェクタントを細胞破壊濃度の G 4 1 8 ( $0.8 \text{mg} / \text{mL}$ ) 中で培養し、C D 1 9 を均一に発現するために蛍光活性化細胞選別 (F A C S) を

を行い、クローン（クローン#17）を得た。Jurkat細胞をATCCから得て、Amaxa/Lonzaヌクレオフェクター溶液（Kit V）を用いて、coppCD19RCDS28mz（CoOp）/pSBSOを電気穿孔した（Program T-14、ヌクレオフェクターII、Lonza）。エレクトロポレーションしてから2週間後に、CARを安定的に発現するJurkat細胞に、CARを均一に発現するためにFACSを行い、クローン（クローン#12）を得た（Maitiら、2013）。2mMのG1utamax-1（Invitrogen）及び10%熱失活ウシ胎仔血清（FCS）（Hyclone；10%RPMI）で補充したHyQ RPMI 1640（Hyclone）中で細胞株を維持した。制度的細胞株認証ポリシーに従ったSTRプロファイリングまたは染色体分析を用いて、全ての細胞株を確認した。 10

#### 【0158】

細胞の免疫表現型。100μLのFACS緩衝液（2%FBS、0.1%アジ化ナトリウム）中の抗体（表4）を用いて、細胞を4℃で30分間染色した。細胞内染色では、20分間固定／透過化後、適当な抗体を持つPerm/Wash緩衝液中で、細胞を4℃で30分間染色した。FACSCalibur（BD Bioscience）を用いて獲得を行い、Cell Quest（BD Bioscience）またはFCS Express 3.00.0612（De Novo Software、Thornhill、Ontario、Canada）を用いて分析した。

表4：フローサイトメトリーに用いた抗体。

【表4】

細胞	抗体／蛍光色素	ベンダー	カタログ番号
T細胞	CD3-PE	BD Biosciences	347347
	CD4-APC	BD Biosciences	340443
	CD8-PerCPCy5.5	BD Biosciences	341051
	CD16-PE	BD Biosciences	347616
	CD25-APC	BD Biosciences	555434
	CD28-PerCPCy5.5	BD Biosciences	337181
	CD32-FITC	BD Biosciences	555448
	CD39-FITC	eBioscience	11-0399-42
	CD45TA-APC	BD Biosciences	550855
	CD45RO-PE	BD Biosciences	555489
	CD57-FITC	BD Biosciences	555619
	CD56-APC	BD Biosciences	555518
	CD62L-PE	BD Biosciences	555544
	CD69-PE	BD Biosciences	555531
	CD127 (IL-7Ra) – Alexa Fluor 647	BD Biosciences	558598
	CD150-PE	BD Biosciences	559592
	CD279 (PD-1) -PE	BD Biosciences	557946
	CCR7-PerCPCy5.5	BioLegend	335605
K562 aAPC (クローン#4)	グランザイムB-Alexa Fluor 647	BD Biosciences	560212
	HLA-DR-PerCPCy5.5	BD Biosciences	339205
	ペーフォリン-FITC	BD Biosciences	556577
	抗ヒトFcγ-PE	Invitrogen	H10104
	CD19-PE	BD Biosciences	555413
	CD19-APC	BD Biosciences	555415
30	CD64-PE	BD Biosciences	558592
	CD86-PE	BD Biosciences	555658
30	CD137L-PE	BD Biosciences	559446
	ヤギ抗マウスIgGのF(ab')2断片、 F(ab')2断片特異的PE (OKT3 ローディングに対して)	Jackson Immunoresearch	115-116-072

## 【0159】

ウエスタンプロット法。CD19 R C D 2 8由来のキメラCD3- (73 kDa)のタンパク質発現を前述のように評価した (Singhら、2008)。簡単に言えば、i Blot Dryプロッティングシステム (Invitrogen)を用いて、タンパク質溶解物をニトロセルロース膜の上に移し、マウス抗ヒトCD3-モノクローナル抗体 (cat # 551033、0.5 μg / mL、BD Biosciences、CA)、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)共役ヤギ抗マウスIgG (cat # 1858413、1:10,000; Pierce、IL)でインキュベートし、Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce、IL)を用いて成長させ、VersaDocTM 4000ゲルドキュメンテーションシステム (BioRad、CA)を用いて、化学発光を捕捉した。

## 【0160】

in situハイブリダイゼーション及びフローサイトメトリー (Flow-FISH)での蛍光によるテロメア長分析。製造者の指示に従って、フローサイトメトリー (DAKO)用のテロメアPNAキット / FITCを用いて、T細胞のテロメア長を測定した。簡単に言えば、単離細胞 (CD4またはCD8) 及び対照細胞 (cat # 851121

10

20

30

40

50

05、CEM-1301細胞株；ECAACC)を、FITC標識テロメアPNAプローブの有無に関わらないハイブリダイゼーション溶液で82にて10分間同等に混合し；室温にて遮光下で一晩ハイブリダイズし；40にて洗浄液で2回洗浄し；2%FCS及びヨウ化プロピジウム(1μg/mL)を含有するPBS中で再懸濁させ；FACSCalibur(BD Biosciences)で分析した。FITC標識蛍光較正ビーズ(cat#824A、Quantum(商標) FITC MESF、Bangs Laboratories)を用いて、フローサイトメトリー装置を較正した。T細胞をCEM-1301細胞株と比較することで、相対テロメア長(RTL)を決定した：

RTL = ((プローブ有りの平均FL1試料細胞 - プローブ無しの平均FL1試料細胞) × 2 × 100) / (プローブ有りの平均FL1参照細胞 - プローブ無しの平均FL1参照細胞) 10

#### 【0161】

クロム遊離アッセイ。<sup>51</sup>Cr標識標的細胞を用いた標準4時間クロム遊離アッセイでT細胞の細胞毒性について評価した。96ウェルV底プレート(Costar)中に5×10<sup>3</sup>個の標的細胞を持つ1×10<sup>5</sup>個、0.5×10<sup>5</sup>個、0.25×10<sup>5</sup>個、0.125×10<sup>5</sup>個及び0.0625×10<sup>5</sup>個の細胞/ウェルで、T細胞を3通りで被覆した。インキュベーション後、50μLの上清をLumaPlate(Perkin Elmer)の上に採取し、TopCount NXT(Perkin Elmer)で読み、及び特異的溶解率を算出した：

(実験的<sup>51</sup>Cr放出 - 自発的<sup>51</sup>Cr放出) / (最大<sup>51</sup>Cr放出 - 自発的<sup>51</sup>Cr放出) × 100 20

自発的放出及び最大放出は、CMまたは0.1%トリトンX-100(Sigma)でそれぞれインキュベートされた標的細胞からの馴化上清中のクロムを測定することにより判断した。

#### 【0162】

内毒素試験。最終生成物の内毒素レベルは、製造者のガイドライン通り、Endosafe(登録商標)-PTSポータブル・テスト・システム(Charles River Laboratories)を用いて判断した。試験は、0.01~10EU/mLの検出限界を有し、これは、EU/患者の体重に変換することができる。

#### 【0163】

マイコプラズマ試験。製造者の指示に従って、Takaraマイコプラズマ検出キット(CloneTech)を用いてPCRによるマイコプラズマ検出を行った。

#### 【0164】

T細胞受容体Vレパートリー。CD3特異的mAb(cat#340949、BD Biosciences、10μL)及びアイソタイプ適合対照mAb(cat#552834、BD Biosciences)と関連して用いた24個のTCR V特異的mAb(cat#IM3497、IOTEST Beta Mark TCR-Vレパートリーキット、Beckman Coulter)のパネルを用いて、培養28日目及び35日目のCAR<sup>+</sup>T細胞のT細胞受容体(TCR)-V使用について判断した。

#### 【0165】

組み込みCARのコピー数を判断するためのリアルタイムPCR。遺伝子改変T細胞中の組み込みCD19RCRD28CARのコピー数を判断するため、以下のプライマー：フォワード(5'-CAGCGGACGGCAGCTTCTT-3'；配列番号8)、リバース(5'-TGCATCACGGAGCTAAA-3'；配列番号9)、及びプローブ(5'-AGAGCCGGTGGCAGG-3'；配列番号10)を用いて、StepOneplusリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を用いたPCR反応(50で2分間、95で10分間、続いて、95で15秒、及び60で1分を40サイクル)で、50~100ngのゲノムDNA(cat#80204、AllPrep DNA/RNAミニキット、Qiagen)を増殖させた。RNase P遺伝子のプライマー(Cat#4316844、Applied Biosyst 40

ems)を内部対照として用いた。CD19RC28mz(CoOp)/pSBSO DNAプラスミドからのCARを1コピー含有する遺伝子改変Jurkat細胞(クローニング#12)からの段階希釈ゲノムDNAを用いて、標準曲線を生成した(Maitiら、2013)。全てのプライマー、プローブ、及びTaqMan遺伝子発現マスターMixスは、Applied Biosystemsから購入した。

#### 【0166】

SB11トランスポゼースのPCR。フォワード(5' - ATGGGAAATACAA AAGAAATC - 3'; 配列番号11)及びリバース(5' - CTAGTATTGG TAGCATTGC - 3'; 配列番号12)プライマーを用いて、サーマルサイクラー(PTC-200、DNA Engine、BioRad)を用いたPCR反応(95で5分間; 95で15秒、58で40秒、72で60秒を25サイクル; 続いて、72で7分間最終伸張)で、CAR<sup>+</sup>T細胞から単離したDNA(20ng)(Al1P rep DNA/ RNAミニキット、Qiagen)を増殖させた。GAPDHは、ハウスキーピング遺伝子として使用し、プライマー: フォワード(5' - TCTCCAGAACATCATTCCCTGCCAC - 3'; 配列番号13)及びリバース(5' - TGGGCCATGAGGTCCACCAACCTG - 3'; 配列番号14)を用いた同じPCR反応で増殖させた。SB11及びEGFP(DNAプラスミドSB11-IRES2-EGFPから発現)を安定的に発現する遺伝子改変Jurkat細胞からの線状化pCMV-SB11プラスミドDNA(1ng)及びゲノムDNA(20ng)(Maitiら、2013)は、陽性対照として用いた。模擬電気穿孔(無DNA)T細胞及びOKT3-aAPC増殖T細胞は、陰性対照として用いた。

#### 【0167】

望ましくない自律的T細胞増殖を評価するためのアッセイ。異常なT細胞増殖を監視するため、4回のaAPC媒介刺激サイクル(エレクトロポレーションしてから28日後)後に採取した2×10<sup>5</sup>個のCAR<sup>+</sup>T細胞を、24ウエル組織培養プレートでさらに18日間3通りで培養した。(i)陽性対照:aAPC及びサイトカイン(50U/mL IL-2及び30ng/mL IL-21)の存在。(ii)試験:aAPC及びサイトカインの不在。18日目の全生存細胞が、(i)aAPC及びサイトカインと共に培養したCAR<sup>+</sup>T細胞の2×10<sup>5</sup>個の細胞よりも多く、かつ、(ii)aAPC及びサイトカイン無しで培養したCAR<sup>+</sup>T細胞の2×10<sup>4</sup>個の細胞よりも少ない場合、遺伝子改変T細胞は、アッセイをパスした。

#### 【0168】

Gバンド染色体分析。共培養の最後でCAR<sup>+</sup>T細胞を採取し、標準手順を用いてギムザ染色によりスライドを染色した。全部で20個のGバンド中期を分析した。

実施例4 - スリーピングビューティ及び人工抗原提示細胞を用いて、キメラ抗原受容体を安定的に発現する臨床等級CD19特異的T細胞の製造 - 結果

#### 【0169】

aAPC(クローニング#4)。aAPC(クローニング#4)として機能するK562を用いて、CAR<sup>+</sup>T細胞を選択的に増殖させた。減容手順を用いて、Sepax II装置により培養aAPCをVueLifeバッグから採取した。これは、約40分かかった。平均の処理前容量及びaAPC計数は、それぞれ、575mL(500~700mLの範囲)及び4.9×10<sup>8</sup>(3.2×10<sup>8</sup>~7.7×10<sup>8</sup>の範囲)であった。Sepax IIで処理後、細胞の平均回収は、108%(75%~136%の範囲)であり、出力容量は、125mL(50~200mLの範囲)であり、平均減容は、78.3%(60%~91.6%の範囲、図5A及び5B)であった。自動細胞回収は、マニュアルの減容手順(82%)と同様であり、持続オペレータ時間で45分かかり、91%の減容をもたらした。CD19、CD64、CD86、CD137L、及びEGFP(mIL15を発現するためのマーカーとして)をコードする導入されたトランプ遺伝子の発現が>80%のものについて、フローサイトメトリーによりaAPCを定期的に監視した。MCB及びWCBの生成時、及び照射aAPCをT細胞培養(各刺激サイクルの開始と印を付けた、

図 5 C ) に加えるごとに、免疫表現型検査を実施した。試験した a A P C ( クローン 4 ) の M C B 及び W C B は、無菌状態、及び、細胞及び細胞上清上のマイコプラズマに対して陰性であった。バイオセーフティ試験では、外来性ウイルス試験、複製可能レトロウイルス試験、及び様々なヒト病原性ウイルスのスクリーニングによるウイルスは検出されなかつた。フィンガープリンティングに基づいて a A P C ( クローン # 4 ) が K 5 6 2 由来であることが試験により確認された ( 表 5 ) 。

表 5 : K 5 6 2 a A P C ( クローン # 4 ) の S T R フィンガープリンティング

【表 5 】

STR	K562 aAPC(クローン4)
AMEL	X
CSF1PO	9, 10
D13S317	8
D16S539	11, 12
D18S51	15, 16
D19S433	14, 14.2
D21S11	29, 30, 31
D2S1338	17
D3S1358	16
D5S818	11
D7S820	9, 11
D8S1179	12
FGA	21
TH01	9.3
TPOX	8, 9
vWA	16

【 0 1 7 0 】

C A R <sup>+</sup> T 細胞の製造。 P B M C を電気穿孔し、臨床的に意味のある数 ( H u l s ら、 2 0 1 3 ) ( 図 6 ) に増殖させ、かつ、予め決められた放出基準 ( 表 6 ) を満たすことができることを確立するために、 C D 1 9 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞の大規模な産生について検証研究を実施した。 2 名の健常ドナーのアフェレーシス生成物を処理して、 S e p a x 細胞処理システムを用いて単核球 ( M N C ) を単離した。アフェレーシス生成物 2 0 1 m L ( ドナー 1 ) 及び 2 0 2 m L ( ドナー 2 ) を 2 つのバッチ ( 約 1 0 0 m L / バッチ ) で処理し、 5 0 m L の出力生成物を生成した。処理前計数は、アフェレーシス生成物の処理後計数と同様であった。ドナー 1 及びドナー 2 からそれぞれ 4 0 . 5 % 及び 5 1 % の C D 3 <sup>+</sup> T 細胞を含有する、全部で 5 . 3 × 1 0 <sup>9</sup> 個及び 7 . 1 × 1 0 <sup>9</sup> 個の細胞を単離した。その後、細胞を、後々の使用のために C r y o M A C S 凍結バッグ ( 1 0 m L ) 及び参照凍結バイアル ( 1 m L ) 中に等分 ( 4 × 1 0 <sup>7</sup> 個の細胞 / m L ) で凍結保存した。 3 つの別々の検証実験を行い、表 6 にまとめた。検証ラン 1 及び 2 ( V 1 、 V 2 ) では、ドナー 1 からの細胞を、検証 3 ( V 3 ) では、ドナー 2 からの細胞を用いた。各ランでは、新たに解凍した P B M C を電気穿孔し、別々の培養手順で e x v i v o にて数値的に増殖させた ( 表 7 ) 。培養 0 日目に、 3 × 1 0 <sup>8</sup> ( V 1 ) 及び 8 × 1 0 <sup>8</sup> ( V 2 、 V 3 ) 個の細胞を解凍し ( 生存率、 8 8 . 9 % ~ 9 7 . 6 % ) 、エレクトロポレーション前に 2 時間放置した。 2 ~ 3 × 1 0 <sup>8</sup> 個の細胞 ( V 1 = 2 × 1 0 <sup>8</sup> ; V 2 及び V 3 = 3 × 1 0 <sup>8</sup> ) を、キュベット当たり 2 × 1 0 <sup>7</sup> 個の細胞で、 C D 1 9 R C D 2 8 m z ( C o O p ) / p S B S O トランスポゾン及び p C M V - S B 1 1 トランスポゼース D N A プラスミドを電気穿孔し、翌日 ( 培養 1 日目 ) に、 C A R 発現に基づいて a A P C クローン # 4 と共に培養した。 3 つの検証ランのエレクトロポレーション効率は、 C A R の発現 ( 3 3 . 7 % 、 2 5 . 5 % 及び 4 7 . 1 % ) により計測された培養 1 日目に評価した。共培養の最後 ( 培養 2 8 日目 ) の C A R 発現は、 9 2 % 、 9 9 . 2 % 、及び 9 6 . 7 % であり、培養には、平均 9 5 % ± 5 . 3 % の C D 3 <sup>+</sup> T 細胞とごく少量の汚染 C D 1 9 <sup>+</sup> 細胞 ( 平均 = 0 . 7 % ± 0 10

10

20

30

40

50

. 15 %) 及び CD32<sup>+</sup> aAPC (平均 = 0.6% ± 0.6%、図7A、表6) とが含まれていた。発明者らは、期待した 73kDa キメラ鎖を表す CD3-鎖特異的 mAb を用いて、電気穿孔し / 増殖させた T 細胞の全細胞溶解物をウエスタンプロット法により CAR 発現をさらに確認した (Singhら、2008) (図7B)。aAPC 上の T 細胞増殖の動態を検査時、発明者らは、培養の第2週目の最後 (刺激サイクル2の終わり) に、T 細胞増殖が加速度的に上昇したことが観察され、これは、刺激の第1週目における倍数増殖と比較して、全 (p = 0.01) T 細胞及び CD3<sup>+</sup> (p = 0.01) T 細胞の倍数増殖が増したことと一致する。全 (p = 0.01, p < 0.001) T 細胞、CD3<sup>+</sup> (p = 0.03, p < 0.001) T 細胞、CAR<sup>+</sup> (p = 0.02, p < 0.001) T 細胞の第3週目及び第4週目の最後の週間倍数増殖は、1週目のものよりもそれ一貫して高かった (図13)。 10

表6：電気穿孔し増殖させたT細胞を放出するための合否判定基準

【表6-1】

試験	仕様	結果		
		検証ラン#1	検証ラン#2	検証ラン#3
無菌状態 - 細菌及び菌類	陰性 (14日目の増殖無し)	14日目の増殖無し	14日目の増殖無し	14日目の増殖無し
マイコプラズマ	PCRにより陰性	陰性	陰性	陰性
目視検査	汚染の証拠無し	汚染の証拠無し	汚染の証拠無し	汚染の証拠無し
生存率 (トリパンブルーまたは7AAD)	≥70%	99%	99%	98%

【表6-2】

試験	仕様	結果		
		検証ラン#1	検証ラン#2	検証ラン#3
ゲート免疫表現型検査	≥80% CD3 <sup>+</sup> ≥10% CAR <sup>+</sup> <5% CD32 <sup>+</sup> <5% CD19 <sup>+</sup>	89% CD3 <sup>+</sup> 92% CAR <sup>+</sup> 1.3% CD32 <sup>+</sup> 0.75% CD19 <sup>+</sup>	97% CD3 <sup>+</sup> 99% CAR <sup>+</sup> 0.04% CD32 <sup>+</sup> 0.49% CD19 <sup>+</sup>	99% CD3 <sup>+</sup> 96% CAR <sup>+</sup> 0.51% CD32 <sup>+</sup> 0.78% CD19 <sup>+</sup>
内毒素LAL	内毒素標識 <5 EU/ 受容者体重 (検証用、 1mL当たり)	<0.004 EU/mL	<0.667 EU/mL	<0.089 EU/mL
望ましくない 自律的増殖の スクリーニング	18日目での サイトカイン または aAPC 無しの細胞が、 <2 × 10 <sup>4</sup> 個の 細胞 / mL	<2 × 10 <sup>4</sup> 個の細胞 / mL	<2 × 10 <sup>4</sup> 個の細胞 / mL	<2 × 10 <sup>4</sup> 個の細胞 / mL

【表7】

実験	アフエレーシス				エレクトロポレーション後1日目				共培養28日目									
	CD3	CD4: CD8	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4: CD8	CD3	CD4: CD8	CD3 <sup>+</sup> CAR <sup>+</sup>	CD4: CAR <sup>+</sup>	CD3	CD4: CD8	CD3 <sup>+</sup> CAR <sup>+</sup>	CD4: CAR <sup>+</sup>	生存率					
V1	40.5	1.65	18.5	11.2	64.7	2.4	33.7	41.0	28.0	11.1	88.9	0.02	92.0	97.7	2.46	87.2	99%	82.6
V2					59.8	4.1	25.5	17.1	25.9	3.8	97.1	0.01	99.2	97.4	1.77	91.2	99%	536.7
V3	51.2	1.59	29.1	18.3	87.7	2.3	47.1	45.0	20.1	31.5	99.2	0.8	96.0	96.0	43.4	51.4	98%	561.2

\*全(推定)生存細胞

表7: γ照射 a APC上で共培養前後のT細胞の特性化。

【0 1 7 1】

10

20

30

40

50

刺激してから 1 週間後の C D 3 <sup>+</sup> 及び C A R <sup>+</sup> T 細胞については同様の週間倍数増殖したことを発明者らは観察した。照射 a A P C 上の共培養の 4 週間後に、平均で、 C D 3 <sup>+</sup> T 細胞は 545 倍に数的増殖し、 C A R <sup>+</sup> T 細胞は 1,111 倍に数的増殖した。 ex vivo 増殖（培養 28 日目）により、平均で  $2.86 \times 10^{10}$  個の C D 3 <sup>+</sup> T 細胞が得られ、そのほとんどは、 C A R <sup>+</sup> ( $2.65 \times 10^{10}$  個) であった。3つの検証ランの全 (p = 0.18) T 細胞、 C D 3 <sup>+</sup> (p = 0.17) T 細胞、及び C A R <sup>+</sup> (p = 0.2) T 細胞の増殖動態は同様であった（図 8 A、8 B、8 C）。 a A P C の反復追加により、 C D 19 特異的 T 細胞が選択的に増殖されたことをこれらのデータは支持している。

## 【 0172 】

10

電気穿孔し増殖させた C A R <sup>+</sup> T 細胞の免疫表現型。3つの検証ランの 2 つにより、 C D 4 <sup>+</sup> C A R <sup>+</sup> T 細胞（平均 16% ± 24%）（図 7 C）と比較して C D 8 <sup>+</sup> C A R <sup>+</sup> T 細胞（平均 76% ± 22%）が優先的に増殖され、これは、 I L - 21 の含有により予測された（Singhら、2011）。共培養の経過中に改変された C A R <sup>+</sup> T 細胞の平均 C D 4 / C D 8 比率は、 a A P C（培養 1 日目、比率 = 3.3）上の共培養の開始時には C D 4 <sup>+</sup> C A R <sup>+</sup> T 細胞が優勢であり、培養 14 日目（比率 = 0.9）に C D 4 <sup>+</sup> C A R <sup>+</sup> T 細胞及び C D 8 <sup>+</sup> C A R <sup>+</sup> T 細胞の量は等しくなり、その後、比率は減少した（培養 21 日目、比率 = 0.4；培養 28 日目、比率 = 0.3）。全ての C D 4 / C D 8 比率は、同様のトレンドに沿い、経時的に減少した（表 7）。増殖期間の最後（培養 28 日目）の C A R <sup>+</sup> T 細胞は、活性化され（C D 69 発現、平均 43.6%； H L A - D R 発現、平均 61.2%）、細胞溶解することができ（グランザイム B 発現、平均 92.3%）、メモリー / ナイーブ T 細胞のマーカーを発現した（C D 62 L 発現、平均 45.6%； C D 28 発現、平均 66.4%； C D 27 発現、平均 77.5%、 C D 45 R A 発現、平均 99.7%）。発明者らは、枯渇 / 老化の細胞表面マーカーを検出することができなかつた（P D - 1 発現、平均 2.7%； C D 57 発現、平均 3.3%）（図 7 D）。これらのデータは、 a A P C が C A R <sup>+</sup> T 細胞の不均一集団の増殖を支持していることと一致する。

## 【 0173 】

20

C A R <sup>+</sup> T 細胞の再指向特異性。3つ全ての検証ランから生成した T 細胞は、 C D 19 <sup>+</sup> 腫瘍標的を特異的に溶解することができた。平均で、 57% ± 4% (平均 ± 標準偏差、 61.2% ~ 53.8% の範囲) の D a u d i 2 m 及び 49% ± 7% (平均 ± 標準偏差、 41% ~ 54% の範囲) の N A L M - 6 が、エフェクター対標的の比率 20 : 1 で溶解した。 C D 19 特異的殺傷は、 C A R <sup>n e g</sup> (模擬電気穿孔) 対照による 1.4 ± 1 (平均 ± 標準偏差) 倍のバックグラウンド C D 19 特異的溶解において、エフェクター / 標的比率が 20 : 1 の C D 19 <sup>n e g</sup> 親 E L - 4 細胞と比較して、 C D 19 <sup>+</sup> E L - 4 の殺傷は平均して 6.2 ± 2.6 (平均 ± 標準偏差) 倍 (4.2 ~ 9.2 倍の範囲) 高いことが実証された（図 8 D、図 14）。これは、電気穿孔し増殖させた T 細胞中の C A R が C D 19 に殺傷を再指向したことを意味する。

## 【 0174 】

30

遺伝子改変され増殖させた T 細胞による望ましくない自律的な増殖の欠如。発明者らは、 K 562 a A P C 及びサイトカイン (I L - 2 及び I L - 21) の存在下 / 不在下での C A R <sup>+</sup> T 細胞の増殖を評価し、 S B 転位に起因する強力な遺伝毒性による異常な T 細胞増殖を除外した。培養 18 日目の最後に、サイトカイン及び a A P C を受けていない遺伝子改変 T 細胞では、  $< 2 \times 10^4$  個の細胞（平均 2,800、 0.0 ~ 5.6 × 10<sup>3</sup> の範囲）、サイトカイン及び a A P C を受けた対照群では、平均 7.6 × 10<sup>7</sup> 個の細胞 (4.12 × 10<sup>7</sup> ~ 12.8 × 10<sup>7</sup> の範囲) に数値的に増殖したことを発明者らは観察した（表 8）。 C A R <sup>+</sup> T 細胞が、増殖因子及び抗原刺激の離脱時に増殖を維持できないことが、これらのデータにより示される。

表 8 : 遺伝子改変 T 細胞による自律的な細胞増殖の欠如。

40

【表8】

実験	培養日数 <sup>a</sup>	播種したT細胞数 <sup>b</sup>	T細胞数(18日目)		T細胞の%倍数変化 <sup>e</sup>
			サイトカイン及びaAPC無し <sup>c</sup>	サイトカイン及びaAPC有り <sup>d</sup>	
V1	28	$2 \times 10^5$	0	$12.80 \times 10^7$	0.000%
V2	28	$2 \times 10^5$	$5.6 \times 10^3$	$5.88 \times 10^7$	0.009%
V3	28	$2 \times 10^5$	$2.8 \times 10^3$	$4.12 \times 10^7$	0.007%

10

a T細胞を播種した場合の培養日数

b 実験の開始時に培養で播種した全T細胞数

c サイトカイン及びaAPC不在下で計数した全T細胞数

d サイトカイン及びaAPC(陽性対照)の存在下で計数した全T細胞(推定)数

e 倍数変化率 = [(c / b) ÷ (d / b)] \* 100

表9：電気穿孔し増殖させたT細胞の処理中試験

【表9】

発現 細胞表面CAR発現 全CAR発現	フローサイトメトリー ウエスタンプロット分析
機能性 細胞毒性	クロム遊離アッセイ
持続性 メモリー/ナイーブ表現型 テロメア長	フローサイトメトリー フローFISH
安全性 CARコピー数 S B 1 1 検出 TCR Vβレパートリー 染色体分析	Q-PCR PCR フローサイトメトリー G-バンド

20

## 【0175】

30

CAR<sup>+</sup>T細胞のテロメア長。テロメア長は、細胞分化及び老化の進行の重要な測度である。従って、テロメア長でのCAR<sup>+</sup>T細胞のS B 転位及び $\text{ex vivo}$ 数的増殖を評価するため、発明者らは、Flow-FISHアッセイを用いて、CAR<sup>+</sup>T細胞(培養28日目)のテロメア長を、これらの適合非操作対照(エレクトロポレーション前)のテロメア長と比較した。V1及びV2ではCD8<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞、V3ではCD4<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞を主に生成したため、発明者らは、V1及びV2のCD8<sup>+</sup>T細胞並びにV3のCD4<sup>+</sup>T細胞のテロメア長を、CD8<sup>+</sup>及びCD4<sup>+</sup>T細胞のテロメア長と増殖前から比較した(図9A)。ex vivo数的増殖(培養28日目、8.93% ± 1.33%)後のT細胞の平均テロメア長は、非操作対照T細胞(0日目、7.77% ± 1.21%)のものと同様であった。これらの結果は、CAR<sup>+</sup>T細胞のエレクトロポレーション及び増殖がテロメア長の浸食をもたらさないことを示すものである。

40

## 【0176】

CARトランス遺伝子のコピー数。組み込みCD19RCDF28トランス遺伝子のコピー数は、CD19RCDF28<sup>+</sup>Jurkat細胞クローン#12を参照として、内因性RNase Pを正規化群として用いて判断した(Maitiら、2013)。検証ランで生成したT細胞当たりの平均トランス遺伝子コピーは、0.96 ± 0.09(0.75 ~ 1.07)の範囲、図9B)であった。S B 転位が、T細胞ゲノム当たりおよそ1つの組み込みコピーのCARがもたらされたことがこれらのデータにより示される。

## 【0177】

TCR V 使用。T細胞のエレクトロポレーション及び増殖は、選択的な増殖を示す

50

ことができ、そのため遺伝毒性イベントの指標になり得るT細胞のオリゴクローナルまたはクローナル集団の発生をもたらし得る。従って、発明者らは、レパートリーの多様性を評価するための手段として、フローサイトメトリーによりT C R V 使用を評価した。試験した24個全てのT C R V ファミリーは、a A P C上で共培養28日後にT細胞中に保存し、エレクトロポレーション前のレパートリーと同様であった。さらに、T C R V ファミリーは、長期培養時（培養35日目、図9C）に保存した。培養されたC A R + T細胞のT C R レパートリーの広範な多様性のメンテナンスが、T C R 配列の使用における不均衡をもたらさないことをこれらのデータは示している。

## 【0178】

C A R + T細胞中のS B 1 1 トランスポゼースの欠如。S B 1 1 トランスポゼースの持続発現は、組み込みC A Rトランス遺伝子の再移動をもたらし得る。従って、発明者らは、ゲノムP C Rを行い、C A R + T細胞中のS B 1 1 をコードするD N A プラスミドの非正統的な相同意組み換えを排除した。アッセイの範囲内で、発明者らは、28日間培養し、S B 1 1 特異的プライマーを用いて増殖させたC A R + T細胞からのD N A を含有するP C R 反応においてバンド（約1 k b ）を検出することができなかった（図9D）。電気穿孔し増殖させたT細胞中でS B 1 1 トランスポゼースの組み込みが欠如していたことが、これらのデータにより示される。

## 【0179】

C A R + T細胞の核型。染色体構造の完全性を評価して、S B 転位と関連する包括的な遺伝毒性を排除した。3つ全ての検証ランからのC A R + T細胞（エレクトロポレーションしてから28日後に採取）のG - バンディングにより、分析した全ての分裂中期展開において正常な（雄の）核型が示された（図9E、図15）。

実施例5 - キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子操作された養子T細胞を用いた、がん及び感染に発現した古代レトロウイルスの標的化 - 方法

## 【0180】

免疫組織化学。U . S . B i o m a x ( R o c k v i l l e , M D ) から得た組織マイクロアレイ (# M E 1 0 0 4 a , M E 2 0 8 2 b , F D A 9 9 8 t ) をD i H <sub>2</sub> Oで水和させた。E D T A を含まないp H 6 のクエン酸緩衝液を用いて抗原回復を行った。スライドを、3%過酸化水素 ( B i o c a r e M e d i c a l , C o n c o r d , C A ) 、アビジン ( B i o c a r e M e d i c a l ) 、ビオチン ( B i o c a r e M e d i c a l ) 、及び多価全血清 ( B i o c a r e M e d i c a l ) でブロッカした。各々のスライドを、H E R V - K m A b ( 0 . 6 m g / m l ) で1:20希釈にして30分間インキュベートした後、抗マウスI g G ( B i o c a r e M e d i c a l ) 及びストレプトアビジンH R P ( S i g m a - A l d r i c h , S t L o u i s , M O ) でビオチン化し、M a y e r のヘマトキシリン対比染色 ( S i g m a - A l d r i c h ) で視覚化した。アイソタイプ対照マウスI g G 2 a ( 0 . 2 5 m g / m l ) 抗体 ( B D P h a r m i n g e n , F r a n k l i n L a k e s , N J ) を持つスライド上でも同様の染色手順を行った。

## 【0181】

プラスミド。H E R V - K エンベロープタンパク質に対するs c F v 配列 ( m A b クローン6 H 5 由来 ) をコドン最適化 ( C o O p ) し ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) 、ヒト伸長因子 - 1 ( h E F - 1 ) プロモーターの制御下でS B トランスポゾンにクローニングし、c o o p 6 H 5 C D 2 8 / p S B S O を形成するS B 逆方向反復によりフランクした。

## 【0182】

H E R V - K 抗原は、両方向性プロモーターh E F - 1 及びサイトメガロウイルス ( C M V ) を含有するS B プラスミドから発現した。ウイルス膜貫通領域を含むコドン最適化全長抗原配列を、h E F - 1 プロモーターの制御下でクローニングし、ネオマイシン遺伝子を、両方向性ベクターのC M V プロモーターの制御下で転写した。トランスポゼス ( S B 1 1 ) は、プラスミドp C M V - S B 1 1 からc i s で発現した ( D a v i e s 50

ら、2010)。

【0183】

T細胞のSBプラスミドのin vivoイメージングを生成するため、コドン最適化萤ルシフェラーゼをmyc tagに融合し、CMVプロモーターの制御下で発現した。eEF1プロモーターの制御下でmKateウミシイタケルシフェラーゼをコードするレンチウイルスベクターを、in vivoでの黒色腫瘍細胞のイメージングベクターとして用いた。

【0184】

細胞株及びこれらの増殖。A375-mel及びA888-melは、テキサス州立大学MDアンダーソンがんセンター(Houston, TX)のLazlo Radvany博士からの親切な贈り物だった。A624-mel及びEL4親は、米国菌培養収集所(Rockville, MD)から得た。A375-SM(高転移性黒色腫細胞株)は、テキサス州立大学MDアンダーソンがんセンター(Houston, TX)のCCGSコア施設から受け取った。全ての細胞株は、10%FBS(Thermo Scientific)及び5%グルタマックス(Gibco Life Technologies, Grand Island, NY)を含む RPMI(Thermo Scientific, Rockford, IL)中で培養した。全ての細胞株は、形態学、細胞フィンガープリンティング、及び/またはフローサイトメトリーにより検証した。全ての細胞株は、マイコプラズマに対して試験し、研究用細胞バンクに保存した。

【0185】

T細胞を発現するHERV-K特異的CARの生成及び増殖。健康なドナーからのPBMCを、フィコール・パック密度勾配遠心分離(GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ)により単離し、Amaxaエレクトロポレーションシステムを用いてHERV-K SBトランスポゾン及びSB11トランスポゼースを電気穿孔した。簡単に言えば、 $2 \times 10^7$ 個のPBMC細胞を洗浄し、10%ウシ胎仔血清血清(Thermo Scientific)及び1%グルタマックス(Gibco Life Technologies)を補充した完全RPMI中で2時間インキュベートした。その後、これらの細胞をHERV-K CARトランスポゾン(6H5CD28/pSBSO, 15μg)及びSBトランスポゼース(pCMV-SB11, 5μg)と共に、100μlのAmaxaヌクレオフェクター溶液(ヒトT細胞キット)中で再懸濁させ、単一のキュベットに移し、Amaxaエレクトロポレーター(Loznaz, USA)のU-14プログラムを用いて電気穿孔した。電気穿孔したT細胞を、完全無フェノールRPMI(Thermo Scientific)中で4時間37でインキュベートし、その後、半培地交換を行った。

【0186】

K562は、内因性HERV-K抗原を発現するため、HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞を増殖させるaAPCとして機能する。10%FBSを含有するRPMIで培養された電気穿孔したT細胞に、照射(100Gy)K562-aAPCをT細胞:aAPCが1:2の比率で補充した。T細胞刺激の毎週最後に、照射aAPCと同じ比率で追加した。可溶性IL-21(eBioscience)及びIL-2(Chiron)サイトカインを、それぞれ30ng/ml及び50U/mlの濃度で補充し、エレクトロポレーション後の培養で1日おきにRPMI培地を完成させた。OKT3をロードしたK562細胞の存在下で増殖させた模擬トランスフェクトした無DNA対照T細胞は、陰性対照として機能した。cloopCD19CARCD28/pSBSO及びSB11トランスポゼースを電気穿孔したCD19CAR<sup>+</sup>T細胞を、CAR<sup>+</sup>T細胞と同じ培養条件下で増殖させ、非特異的CAR<sup>+</sup>T細胞対照として機能した。

【0187】

毎週、T細胞培養をCD3<sup>neg</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の存在について監視し、集団が全集団の10%を超えると枯渇した。この枯渇は、通常、aAPCとの初期共培養の10~14日目に起こった。枯渇は、製造者の指示に従って陽性選択「posse1」を用いて、A

10

20

30

40

50

uto max (Miltenyi Biotech) 上の CD56 ピーズ (Miltenyi Biotech Inc, Auburn, CA) を用いて行った。

#### 【0188】

セロメーター自動細胞計数器 (Auto T4 Cell Counter, Nextcellom Bioscience, Lawrence, MA) を用いて、トリパンブルー色素排除に基づいて T 細胞生存率を評価した。エレクトロポレーション及び共培養期間中に、プログラム「PBMC\_human\_frozen」及び「活性化 T 細胞」を用いて生存率を分析した。個々のドナーに対して共培養 7 日目、14 日目、28 日目、32 日目の最後に、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 及び CAR<sup>+</sup> 細胞の全ての倍数増殖 (1 日目と比較) を算出し、3 人のドナーの平均を、スチューデント t 検定を用いて CD19 CAR<sup>+</sup> T 細胞と無 DNA 対照細胞との間で比較した。 10

#### 【0189】

フローサイトメトリー。全ての試薬は、他に記載がない限り、BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ) から得た。100 万個の細胞を、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、フィコエリトリン (PE)、シアニン染料 (PerCP Cy5.5) に共役したペリジニンクロロフィルタンパク質、またはアロフィコシアニン (APC) と共に染色した。使用した抗体には、抗 CD3 FITC (5 μl)、抗 CD3 PerCP Cy5.5 (2.5 μl)、抗 CD3 PE (2 μl)、抗 CD4 APC (2.5 μl)、抗 CD8 PerCP Cy5.5 (4 μl)、抗 CD56 APC (2.5 μl)、アネキシン V (5 μl)、抗 CD32 FITC (5 μl)、抗 CD45RA FITC (5 μl)、抗 CD45RO APC (2.5 μl)、抗グランザイム B FITC (5 μl)、抗 CD62L APC (2.5 μl)、抗 IFN-APC (2 μl)、抗 CD27 PE (2 μl)、抗 TCR FITC (5 μl)、抗 TCR PE (2 μl)、及び抗 CCR7 PerCP Cy5.5 (2.5 μl、Biologend) が含まれる。ヤギ抗ヒト Fc の FITC 共役 (3 μl, Invitrogen) 及び PE 共役 (2.5 μl, Invitrogen) F(ab')<sub>2</sub> 断片を用いて、HERV-K 特異的 CAR の細胞表面発現を検出した。非特異的抗体結合のブロッキングは、FACS 洗浄緩衝液 (PBS 中の 2% FBS 及び 0.1% アジ化ナトリウム) を用いて達成した。データは、CellQuest バージョン 3.3 (BD Biosciences) を用いて FACS Calibur (BD Biosciences) 上で獲得した。蛍光強度中央値 (MFI) の分析及び算出は、FlowJo バージョン 7.5.5 を用いて実施した。 20

#### 【0190】

nCounter 分析デジタル遺伝子発現システム。HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞と無 DNA 対照 T 細胞との間の遺伝子発現の差を、nCounter 分析システム (モデル番号: NCT-SYST-120, NanoString Technologies; Geissler, 2008) を用いて評価した。簡単に言えば、10<sup>4</sup> 個の HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞または無 DNA T 細胞を RNeasy 溶解緩衝液 (RLT; 5 μl, Qiagen, Gaithersburg, MD) 中に溶解し、nCounter 遺伝子発現アッセイキットを用いて設計させたレポーターコードセット及びキャプチャコードセットカスタムで mRNA を 12 時間 65 でハイブリダイズした。nCounter prep station をポストハイブリダイゼーションプロセスに用いた。Nanostring ソフトウェアを用いて、mRNA レベルを内部対照で正規化した。R プログラム、ツリービュー、及びクラスタービューを用いて、統計分析でデータを出力した。正規化した結果は、相対 mRNA レベルとして表した。Ingenuity Pathway 解析 (IPA) (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) を統計的に有意な遺伝子に行い、文献ソース由来のデータベースに基づいてこれらの生物相互作用を理解した。 40

#### 【0191】

組み込み分析。HERV-K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞からのゲノム DNA を QIAamp 50

D N Aミニキット( Q i a g e n )を用いて単離し、リアルタイムP C Rを前述したように行つた( M a i t i ら、2 0 1 3 )。前述したC A Rコピーの単一組み込みを持つJ u r k a t細胞( クローン# 1 4 )からのゲノムD N Aを陽性対照として用いた( M a i t i ら、2 0 1 3 )。実験については、1 0  $\mu$  lのT a q M a n遺伝子発現マスター-ミックス( A p p l i e d B i o s y s t e m s、F o s t e r C i t y、C A )、I g G 4 F c [ フォワード( 5 ' - G A G G G C A A C G T C T T T A G C T G - 3 ' ; 配列番号1 5 )及びリバース( 5 ' - G A T G A T G A A G G C C A C T G T C A - 3 ' ; 配列番号1 6 )プライマー及びカルボキシフルオレセイン( F A M )標識プローブ( 5 ' - A G A T G T T C T G G G T G C T G G T C - 3 ' ; 配列番号1 7 )]に特異的な1  $\mu$  l( 2 5 0 n Mの1 × プローブと9 0 0 n Mの1 × プライマー)の2 0 × F A M標識C A R特異的T a q M a nプローブプライマーセット、及び1  $\mu$  l( 9 0 0 n Mの1 × プライマー及び2 5 0 n Mの1 × プローブ)の2 0 × V I C 標識T a q M a n R N a s e Pプローブプライマーセット( A p p l i e d B i o s y s t e m s )を、全ての反応容量が2 0  $\mu$  lで混合した1 0 0 n gのゲノムD N Aで3通りで行つた。プライマーハイブリダイゼーションは、C A RのI g G F c 4部分で起こつた。増幅サイクルは、5 0 で2分間、9 5 で1 0 分間、及び、9 5 で1 5 秒と6 0 で1分の4 0 サイクルを含んでいた。S t e p O n e P l u sリアルタイムP C Rシステム( A p p l i e d B i o s y s t e m s )で検出を行つた。2倍体細胞当たり2コピーで存在する常染色体R N a s e P遺伝子を、正規化のための内因性参照として用いた( J i n ら、2 0 1 1 )。C T方法( A p p l i e d B i o s y s t e m s、C A )を用いて、R N a s e P及びJ u r k a tクローンを正規化対照として参照しながら組み込み数を算出した。 10 20

#### 【 0 1 9 2 】

クロム遊離アッセイ( C R A )。C R Aを前述したように行つた( M a i t i ら、2 0 1 3 ; J i n ら、2 0 1 1 )。簡単に言えば、H E R V - K <sup>+</sup> v e 標的を<sup>5 1</sup> C rで2時間処理し、3 5 日目のH E R V - K特異的C A R <sup>+</sup> T細胞または無D N A対照T細胞でインキュベートし、<sup>5 1</sup> C r放出の百分率を、以下の式を用いて算出した：

$$^{51} \text{Cr} \text{ 放出 \%} = (\text{実験的放出} - \text{バックグラウンド放出}) / (\text{最大放出} - \text{バックグラウンド放出}) \times 1 0 0$$

#### 【 0 1 9 3 】

微速度バイオイメージング。( A )腫瘍細胞上での抗原とのC A R結合を視覚化するため、B i o S t a t i o n I M細胞 - S 1 / 細胞 - S 1 - Pシステム( N i k o n、M e l v i l l e、N Y )を用いて微速度イメージングを行つた。K 5 6 2親細胞を抗H E R V - K A P C抗体( 1  $\mu$  g )で染色し、H E R V - K特異的C A R <sup>+</sup> T細胞を、ヤギ抗ヒトF c 抗体のF I T C標識F( a b' )2断片( 5  $\mu$  l、B D B i o s c i e n c e s )を用いてC A R表面発現用に染色した。T細胞及び標的細胞を5 : 1の比率で混合し、T - 3 5 mmガラス底プレート( F i s h e r S c i e n t i f i c、H a m p t o n、N H )上の完全R P M I培養培地に載置した。細胞を直ちに2分ごとに3 7 で8時間まで造影した。各画像を、2 0 × 対物の1 6 0 0 × 1 2 0 0ピクセルで、緑色H E R V - K特異的C A R <sup>+</sup> T細胞を観察するために位相差の蛍光チャネル2を、赤色K 5 6 2細胞を観察するために位相差の蛍光チャネル3を用いて、それぞれ、1 / 1 2 5秒及び1 / 5秒の露光時間で記録した。抗原とのC A R結合は、A P C標識抗原が緑色標識C A Rと重畳した際に見られた。 30 40

#### 【 0 1 9 4 】

( B )H E R V - K特異的C A R <sup>+</sup> T細胞が腫瘍細胞を殺傷するのにかかる時間を視覚化しつつ定量化するため、腫瘍細胞を、1 n g / m g S y t o x ( 登録商標 )( I n v i t r o g e n )を含有する完全R P M Iを持つT - 3 5 mmガラス底プレートにおいてH E R V - K特異的C A R <sup>+</sup> T細胞で被覆した。腫瘍細胞死は、腫瘍細胞壁を穿刺し、B i o s t a t i o n I M細胞 - S 1 - Pシステム( N i k o n )を用いて細胞が緑色に変色した際の時間として記録した。各腫瘍細胞の緑色蛍光強度は、1 5 時間にわたり生細胞イメージングソフトウェア( N i k o n )を用いて記録した。 50

## 【0195】

細胞内IFN- $\gamma$ 放出アッセイ。200  $\mu$ lの完全RPMI培養培地を持つ丸底96ウエルプレートで、HERV-K特異的CAR $^+$ T細胞を、腫瘍細胞と1:10の比率で共培養した。タンパク質輸送阻害剤（ブレフェルジンAを含有するBD Golgi Plug）を全てのウエルに追加し、細胞内のIFN- $\gamma$ をトラップした。共培養を37 $\times$ 4時間インキュベートした後、HERV-K特異的CAR発現のために4 $\times$ 20分間染色した。次いで、細胞を洗浄し、固定し、100  $\mu$ lのCytofix/Cytoperm緩衝液（カタログ番号555028）で4 $\times$ 20分間透過処理した。透過処理した細胞を、サイトカインについて、抗IFN- $\gamma$ APC共役抗体で染色細胞を洗浄し、FACS Caliburにより分析した。PMA（ホルボール12ミリスチン酸13酢酸エステル）-及びイオノマイシン-（BD Biosciences）処理されたT細胞を、本アッセイの陽性対照として用いた。同様のアッセイを無DNA対照T細胞で行った。

## 【0196】

HERV-K $^{+ve}$ EL4細胞株の成長。200万個のEL4細胞を、HERV-K抗原発現SBトランスポゾン及びSB11トランスポゼース（2  $\mu$ gの全DNA）を含むAMAXAマウスT細胞スクレオフェクター溶液（AMAXA、USA）中で懸濁させ、最終容量を100mlにした。この懸濁液を単一のキュベットに移し、AMAXAエレクトロポレーターのC-09プログラムを用いて電気穿孔した。細胞を、10%FBSで補充したキットで供給したエレクトロポレーション培地内で37 $\times$ 4時間インキュベートした（Thermo Scientific Pierce）。その後、細胞をDMEM、10%FBS（Thermo Scientific Pierce）、及び5%グルタマックス（Gibco Life Technologies）に移した。これらの細胞を0.8mg/mlのG418の存在下で増殖させ、HERV-K抗体を用いてネオマイシン-耐性HERV K $^{+ve}$ EL4細胞を選別し、増殖させて、細胞の純粋な集団を得た。

## 【0197】

A888-mel細胞におけるshRNA-媒介HERV-Kノックダウン。A888-mel細胞を、6ウエルプレートにおいて90%コンフルエンスに増殖させた。その後、培地を、100  $\mu$ lのHERV-K特異的shRNAまたはスクランブルshRNAレンチウイルスのいずれかとポリブレン（5  $\mu$ g/ml）とを用いて交換し、37 $\times$ 4時間形質導入し、通常RPMI培地に交換した。細胞を、GFP発現及び増殖に基づいて選別した。スクランブルshRNA形質導入A888-mel細胞を対照として用いた。細胞株溶解物の免疫プロットアッセイを行い、HERV-K shRNAまたはスクランブルshRNAを持つA888-mel細胞または親細胞上でのHERV-K抗原発現を検出した。1,000万個の細胞を、プロテアーゼ阻害剤を含有するRIPA緩衝液（Roche Applied Science、San Francisco、CA）に溶解した。BCAアッセイを行い、タンパク質濃度（Thermo Scientific Pierce）を検出した。4%~20%勾配ゲル（Biorad、Hercules、CA）を用いて、10  $\mu$ gのタンパク質をSDSローディング緩衝液中で煮沸した。その後、タンパク質を、ニトロセルロース膜に移し、PBST中の5%ミルクでブロックし、6H5 HERV-K抗体（mg/ml）でインキュベートした。ヤギ抗マウスFc-HRP（Sigma-Aldrich）により結合を検出し、ECL Western blot substrate（Thermo Scientific Pierce）を用いて成長させた。Versa doc Quantity one（商標）ソフトウェア（Biorad）を用いてプロットを造影し、Image Jソフトウェアを用いてプロットを定量化した。

## 【0198】

In vivo分析。転移性黒色腫モデル：5週齢の雌NOD.Cg-Prkdc<sub>scid</sub>12rgtm1wjl/SzJ(NSG)マウス（Jackson Laboratory）

atories、Bar Harbor、ME)に、 $10^6$  個のA375-SM細胞を0日目に静脈内注射した。A375-SM細胞にmKate-rrRLucを予め安定して形質導入し、細胞を均一集団に選別した。処置コホート( $n=7$ )のマウスには、7日目、14日目、及び21日目の始めに、 $2 \times 10^6$  個のHERV-K特異的CAR-FfLuc<sup>+</sup>T細胞を受け始めた。IL-2(600U; eBioscience)を治療期間中に週3回腹腔内(i.p.)注射した。腫瘍を持つマウス( $n=6$ )の1つのコホートは治療を受けなかつたが、腫瘍のないマウス( $n=3$ )の対照群は、処置群と同様に同様の数のCAR<sup>+</sup>T細胞を受けた。

#### 【0199】

フラックス定量化：生物発光イメージング(BLI)を毎週行い、*in vivo*の腫瘍及びT細胞活性を造影した。マウスに麻酔をかけ、前述したように、Xeno IVIS100シリーズシステム(Caliper Life Sciences)を用いてBLIの前後方向位置に置いた(Singhら、2007)。HERV-K特異的CAR-ffLuc<sup>+</sup>T細胞活性を造影するため、 $150 \mu l$ ( $200 \mu g$ /マウス)のD-ルシフェリンカリウム塩(Caliper Life Sciences)を腹腔内(i.p.)注射した。注射10分後に、放出された光子を、Living Image 2.50.1(Caliper Life Sciences)プログラムを用いて定量化した。腫瘍細胞活性を造影するため、 $100 \mu l$ のEndurin(Promega、Fitchburg、WA)を腹腔内注射した。注射20分後に、腫瘍活性をffLucと同様に定量化した。非対合スチューデントt検定を行い、フラックスの統計的有意性を確立した。

10

#### 【0200】

統計分析。種々のグレード及びステージの黒色腫と正常組織との間の抗原発現における統計的差異を分析するため、スチューデントt検定及びANOVAを用いた。対照対HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞増殖の差異を分析するため、表現型分析、及び機能的アッセイ、スチューデントt検定、平均、標準偏差、及び95%信頼区間(CI)を算出した。*in vivo*の転移性黒色腫モデルでは、スチューデントt検定を用いて、腫瘍と処置群との間のフラックスデータの有意性を分析した。全ての統計的検定は、両側であり、グラフパッドプリズムソフトウェア(GraphPad Software Inc、San Diego、CA)を用いて行った。0.05未満の全てのP値は、統計的に有意であると見なした。

20

実施例6 - キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子操作された養子T細胞を用いた、がん及び感染を発現した古代レトロウイルスの標的化 - 結果

#### 【0201】

黒色腫患者試料におけるHERV-Kの発現。*in vivo*での黒色腫浸潤及び転移中のHERV-Kの生理的関連性を明らかにするため、発明者らは、種々のステージの黒色腫を持つ患者から得た生検中の腫瘍抗原HERV-Kエンベロープタンパク質の発現を評価しようとした。268人の患者からの悪性腫瘍組織と、40人の患者からの良性皮膚及び乳房組織をIHCを用いて分析した。腫瘍組織染色を、HERV-Kに対して陽性の腫瘍細胞の百分率に基づいて等級分けし、染色強度及びこれらの産物を算出して、H指数を得た。腫瘍組織は、多様なレベルの染色強度を示し、同じ組織上でアイソタイプ対照染色と比較した際に、0、1、2、または3(図16A)と採点した。抗原は、実線矢印で示したように細胞表面に沿って断続的な形態があるいは点線矢印で示したように拡散した細胞質染色のいずれかで細胞上で発現した(図16B)。これは、ウイルスタンパク質(REF)を排除する目的で細胞表面上に抗原が循環し集積していることを示唆するものである。腫瘍細胞は、良性腫瘍と比較して、H指数が有意に高いHERV-K抗原を発現した(図16C)。悪性腫瘍と転移性腫瘍との間でH指数に差異はないが、ステージII及びIVの腫瘍と比較して、ステージI及びIIの腫瘍には有意差が見られる(図16D及び16E)。正常細胞ではなく腫瘍細胞でのHERV-K発現の特異性をさらに示すために、3名の健常ドナーから得た33種類の正常臓器からの組織を分析した。正常な臓

30

40

50

器組織のいずれにおいても H E R V - K の有意な発現は観察されなかった（図 2 2）。これらの知見は、腫瘍細胞で特異的に上方調節される H E R V - K が、免疫療法において固有の標的マーカーとして機能し得ることを示唆するものである。

#### 【 0 2 0 2 】

H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞の増殖及び特性化。H E R V - K エンベロープ特異的モノクローナル抗体（m A b）をマウス中で成長させ、6 H 5 m A b クローンが、in vitro で抗原を検出するのに最も感度が高いことが分かった（W a n g - J o h a n n i n g ら、2 0 0 3）。6 H 5 m A b クローンの s c F v 配列を用いて、C A R を構築した。s c F v カセットを、フレキシブルリンカーを介して I g G 4 F c 領域に融合させた後、C D 2 8 膜貫通ドメイン及び C D 2 8 及び C D 3 z 細胞内ドメインに融合させた。その後、これを S B トランスポゾンベクターにクローニングした（図 1 7 A）。

10

#### 【 0 2 0 3 】

H E R V - K エンベロープ抗原に特異的な C A R <sup>+</sup> T 細胞を生成するため、発明者らは、S B 1 1 トランスポゼースと共に S B トランスポゾンを持つ末梢血液単核球（P B M C）に電気穿孔し、内因性由来 H E R V - K <sup>+</sup> v <sup>e</sup> K 5 6 2 a A P C 上の細胞を増殖させた。C A R を安定的に発現させる T 細胞を選択的に増殖させるため、H E R V - K 抗原を内因性発現するこれらの a A P C を、所望の T 細胞共刺激分子 C D 8 6 、4 - 1 B B L 及び膜結合型 I L - 1 5（強化緑色蛍光タンパク質、E G F P と共に発現させた）と共に発現するように遺伝子改変した（S i n g h ら、2 0 0 8）。同じ培養条件下で O K T 3 - をロードした a A P C 上で増殖させた、トランスポゾンを一切電気穿孔していない P B M C は、陰性無 D N A 対照として機能した。

20

#### 【 0 2 0 4 】

C A R の発現は、I g G 4 F c 領域に特異的なポリクローナル F c 抗体を用いて検出した。C A R <sup>+</sup> T 細胞を、培養を照射 a A P C で補う前に、7 日ごとに F c 抗体で染色した。フローデータにより、9 5 % の T 細胞がその表面上で C A R を発現することが分かり、これは、培養 3 5 日目まで検出することができた（図 1 7 B）。無 D N A 対照細胞と比較した際に、H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞の増殖動態に有意差は見られず、全ての H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞は、培養の 1 4 日目には C D 3 <sup>+</sup> T 細胞であった（図 1 7 C 及び 1 7 D）。C A R <sup>+</sup> C D 4 のパーセントの平均数は増加するが、C A R <sup>+</sup> C D 8 細胞は、培養期間に沿って減少する（図 2 3 A）。無 D N A 対照細胞と比較した H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞のゲノム D N A のリアルタイム P C R 分析により、C A R <sup>+</sup> T 細胞ゲノム中の C A R の組み込みは 2 つ未満であることが示された（図 1 7 D）。培養された C A R <sup>+</sup> T 細胞は、エフェクターメモリー表現型を有し、これには、グランザイム B レベルにより観察された溶解能がかなり高い C D 3 <sup>+</sup> C D 5 6 <sup>+</sup> C D 4 5 R O <sup>+</sup> T C R <sup>+</sup> C D 2 7 <sup>n e g</sup> C C R 7 <sup>n e g</sup> 細胞が含まれる（図 1 7 F）。

30

#### 【 0 2 0 5 】

3 名の健常ドナーからの H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞の m R N A レベルを測定し、n C o u n t e r 分析を用いた培養 2 8 日目の無 D N A 対照 T 細胞からの m R N A レベルと比較した。H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞は、有意に高いレベルの化学誘引物質、転写制御因子、及び活性化因子を有した。C A R <sup>+</sup> T 細胞中のパーフォリン 1 及びグランザイム H のレベルの増加は、これらの細胞の溶解能がより高いことを示している（図 2 3 B）。I n g e n u i t y P a t h w a y 解析（I P A）（p < 0 . 0 5）により、H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞中のこれらの上方調節遺伝子のいくつかが N F - B 活性化に関与していることが示唆された。化学誘引物質及びサイトカインは、I L - 1 0 、I F N - 、及び I L - 1 2 の調節に関与した（図 2 3 C）。H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞が中心エフェクター表現型を有するという前回観測が、これらのデータにより強化される。

40

#### 【 0 2 0 6 】

H E R V - K C A R <sup>+</sup> T 細胞機能性の特性化。黒色腫細胞株、例えば、A 8 8 8 、A 3 7 5 、A 3 7 5 - S M 、A 6 2 4 上の抗原発現は、H E R V - K エンベロープタンパク

50

質に対するモノクローナル 6 H 5 抗体を用いて分析した(図 18 A)。黒色腫細胞上の H E R V - K 抗原発現をアイソタイプ対照と比較した(マウス IgG2a)。H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の機能性を分析するため、H E R V - K<sup>+</sup> 腫瘍細胞を放射性クロムでパルスし、H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の比率を変えながら培養した。無DNA 対照を陰性対照として C R A を行った。無DNA 対照 T 細胞と比較した際に、H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞では有意に高いレベルの H E R V - K<sup>+</sup> 腫瘍細胞溶解が観察された(図 18 B)。CD19 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞などの非関連 CAR も用いて C R A を行い、CD19 抗原を持つ EL - 4 細胞などの CD19 抗原陽性腫瘍細胞と比較した際に、基礎レベルの非特異的殺傷が H E R V - K 抗原陽性腫瘍細胞で観察された(図 24 A)。

## 【0207】

10

これらの H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の機能性をさらに証明するため、4 時間 IFN -  $\gamma$  放出を行った。黒色腫腫瘍標的を、H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞または無DNA 対照 T 細胞と 1 : 10 の比率で共培養し、フローサイトメトリーを用いて細胞内サイトカインレベルを分析した。P M A - イオノマイシンで培養した T 細胞は、陽性対照として機能した。H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞は、無DNA 対照 T 細胞(図 18 C)と比較して、高いレベルの IFN -  $\gamma$  放出を示し、この結果は C R A と相関している。

## 【0208】

H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の特異性。H E R - K 特異的 CAR の特異性を示すため、H E R V - K<sup>neg</sup> EL - 4 細胞を、h E F - 1 プロモーター下で H E R V - K 抗原を、C M V プロモーター下でネオマイシン耐性をコードする両方向性 S B ベクターを電気穿孔した(図 25 A)。その後、EL - 4 H E R V - K<sup>+</sup> 細胞を単細胞に選別し、哺乳動物選択マーカーであるネオマイシンの存在下で増殖させ、純粋な H E R V - K エンベロープ発現集団を得た。興味深いことに、これらの細胞は、翻訳後修飾及びタンパク質分解切断により培養 10 日間以内に H E R V - K 抗原発現が失われた。選別 10 日間以内に、これらの EL - 4 H E R V - K<sup>+</sup> 細胞に 4 時間 C R A を行った。クロムパルス EL - 4 H E R V - K<sup>+</sup> 細胞及び H E R V - K<sup>neg</sup> EL 4 親細胞を、H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の濃度を変えながら共培養し、等級分けした腫瘍特異的溶解が抗原特異的な形で観察された(図 19 B)。

20

## 【0209】

特異性をさらに証明するため、H E R V - K エンベロープ抗原を、s h R N A レンチウイルスを用いて A 888 黒色腫細胞でノックダウンした。免疫プロット分析により、A 888 親及び対照スクランブル s h R N A と比較して H E R V - K タンパク質レベルの約 50 % のノックダウンが示された(図 19 C)。H E R V - K ノックダウン細胞、A 888 親、及び A 888 スクランブル s h R N A を持つ H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞の C R A により、親及び対照腫瘍細胞と比較して、H E R V - K ノックダウンによる殺傷の有意な減少が示された(図 19 D)。

30

## 【0210】

C A R<sup>+</sup> T 細胞が腫瘍標的を殺傷するのにかかる時間および 15 時間にわたって殺傷された腫瘍細胞数を視覚化しつつ定量化するために、微速度イメージングを行った。腫瘍細胞及び T 細胞を、S y t o x (登録商標) の存在下で 1 : 5 の比率で培養し、細胞膜が損傷すると細胞は緑色に変色する。黒色腫標的 A 888 及び A 375 細胞が H E R V - K 特異的 CAR<sup>+</sup> T 細胞によって殺傷されたため、緑色蛍光のスパイクが 5 時間あたりで報告され、15 時間にわたり徐々に増加した。H E R V K - K<sup>neg</sup> H E K 293 親標的では殺傷は観察されなかった。約 30 % の A 888 細胞と、約 35 % の A 375 細胞が、15 時間にわたって C A R<sup>+</sup> T 細胞により殺傷された。抗原特異的 C A R 結合を視覚化するため、K 562 細胞は、H E R V - K 抗原に対して赤色にポジティブ染色し、H E R V - K 特異的 C A R は、F c に対して緑色に染色した。C A R と抗原の重なりは、5 時間にわたって見られ、その後、抗体結合抗原及び C A R は、細胞により内在化した(図 26 A)。

40

## 【0211】

in vivo での H E R V - K 特異的 C A R<sup>+</sup> T 細胞の腫瘍殺傷能力。P B M C を、

50

S B 1 1 トランスポゼースにより H E R V - K 特異的 C A R 及び m y c - F F L u c をコードする S B ベクターで 2 回電気穿孔した。m y c - f f L u c 遺伝子を持つ S B ベクターは、リンカーを介して連結したネオマイシン耐性遺伝子を有する(図 2 7 A)。これらの H E R V - K 特異的 C A R - f f L u c <sup>+</sup> T 細胞は、H E R V - K 特異的 - C A R <sup>+</sup> T 細胞と同様の増殖動態を有し、これらの腫瘍殺傷能力及び特異性は同等であった(図 2 7 B 及び 2 7 C)。

#### 【 0 2 1 2 】

A 3 7 5 高転移性( A 3 7 5 - S M )細胞株を N S G マウスの尾静脈を介して注入した転移性黒色腫モデルを成長させた。これらの細胞を肺に生着させ、肝臓に転移させた。腫瘍塊の非侵襲的な減少を視覚化するため、腫瘍細胞は、m K a t e - r R L u c 遺伝子を持つレンチウイルスベクターで形質導入し、m K a t e マーカーを用いて選別し、細胞の純粋な集団を得た(図 2 1 A)。腫瘍細胞生着の 1 週間後、2 0 0 0 万個の C A R <sup>+</sup> T 細胞を、8 日、1 5 日、及び 2 2 日に、I L - 2 ( i . p . )を週 2 回と共に 3 週間静脈内注入した。生物発光イメージング( B L I )を用いて、各群のマウスの r R L u c 活性を評価した。腫瘍細胞を持つマウス群のみが、H E R V - K C A R <sup>+</sup> T 細胞を受けた腫瘍細胞を持つマウス群と比較して、2 5 日目まで有意に高いルシフェラーゼ活性を有した(図 2 1 A 及び 2 1 B)。また、腫瘍のみを持つマウスは、腫瘍が肝臓に高転移性であることにより 2 8 日目までに瀕死状態になったが、C A R <sup>+</sup> T 細胞を受けたマウス群は、旺盛な食欲と活性を示した。腫瘍細胞上の m K a t e の E x v i v o イメージングにより、腫瘍のみのマウスは、処置群よりも肝臓にかなり多い腫瘍コロニーを有したことが示された(図 2 1 C)。腫瘍群が処置群と比較して肝臓に有意に高い転移性コロニーを有したという観察は、病理学検査により証明され、これは、H E R V - K C A R <sup>+</sup> T 細胞の役割が腫瘍増殖及び転移を減少させることを示唆するものである(図 2 1 D)。

#### 【 0 2 1 3 】

議論。これらの結果は、H E R V - K 特異的 C A R <sup>+</sup> T 細胞がウイルス糖タンパク質を正常に標的にすることで、i n v i t r o で抗原特異的な形で H E R V - K <sup>+</sup> 腫瘍細胞を殺傷し、i n v i v o で黒色腫瘍の増殖及び転移を減少させることができることを示している。

#### 【 0 2 1 4 】

H E R V - K エンベロープは、黒色腫転移中に際立って上方調節され、腫瘍細胞上でのみ排他的に存在し、隣接した正常なメラニン細胞上では存在しない。黒色腫では、H E R V - K エンベロープタンパク質は、腫瘍進行に関係する M E K - E R K 及び p 1 6 I N K 4 A - C D K 4 経路活性化と関連する( L i r a 、 2 0 1 0 )。H E R V - K 分子擬態により、グルタチオンペルオキシダーゼレベルも減少することで、組織中の活性酸素種が増加し、黒色腫発生をもたらした( K r o n e 、 2 0 0 5 )。異常なレベルの H E R V - K エンベロープ発現が、黒色腫発症に関与し、形態的及び細胞性改変をもたらし、腫瘍進行をもたらすトリガー因子であると思われる( S e r a f i n o 、 2 0 0 9 )。H E R V - K のウイルス転写の変調により、炎症及び黒色腫細胞の形態的分化が増した( S c i a m a n n a 、 2 0 0 5 )。組織マイクロアレイは、黒色腫進行と相関して抗原発現のレベルが高くなったことを表すが、正常なヒト組織は、H E R V - K 発現が基礎レベルまたは不在である。

#### 【 0 2 1 5 】

黒色腫は、その免疫原性特性により、強力な T 細胞ベース療法を開発するための魅力的なモデル及び標的である。T 細胞ベース療法の主要な限界の 1 つは、T C R 上の H L A ベース制限であり、これは、抗原認識を制限してしまう( G a r r i d o 、 1 9 9 7 )。腫瘍抗原特異的受容体を発現するための遺伝子改変 T 細胞は、この制限を回避し、非 H L A ベース抗原認識をもたらす( G r o s s 、 1 9 8 9 )。T 細胞改変は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターのいずれかを用いてもたらすことができる。スリーピングビューティベクターは、遺伝子を T 細胞に導入するための非ウイルスアプローチである。他のウイルス形質導入方法を上回るスリーピングビューティシステムの主要な利点の 1 つ

10

20

30

40

50

は、レトロウイルス形質導入よりも遺伝的に安全、効率的、及び安価である (Maitiら、2013)。これらのCAR<sup>+</sup>T細胞をIL-2及びIL-21で培養することで、注入目的に十分な細胞が生成される。これは、B系列悪性腫瘍に対してCD19 CAR<sup>+</sup>T細胞を用いた予備臨床試験につながる。HERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞は、同様の方法で臨床等級のCD19 CAR<sup>+</sup>T細胞に増殖させた。これらのHERV-K特異的CAR<sup>+</sup>T細胞は、主にエフェクターメモリー表現型であり、腫瘍細胞を標的にし、殺傷するようによく適合されている。

#### 【0216】

サイトカイン、ホルモン、及び化学物質などの複数の因子が、がんの最中にHERV-Kレベルを調節することが知られている (Taruscio及びMantovani、2004)。HERV-Kエンベロープ抗原は、細胞膜と細胞質との間を循環し、ある腫瘍条件で細胞表面から発芽することが知られている。そのため、養子T細胞療法を用いることは、細胞表面上で一時的な抗原発現のみを必要とする好ましい治療戦略になり得る。

#### 【0217】

HERV-Kエンベロープ抗原は、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、リンパ腫、奇形がん、多発性硬化症などの自己免疫疾患、及びHIVなどの感染性疾患と関連することも知られている (Wang-Johanningら、2003; Contreras-Galindoら、2008; Jonesら、2012; Ono、1986; Wang-Johanningら、2007)。従って、養子T細胞療法を用いてエンベロープ抗原を標的化することは、多数の疾患病態に対する治療選択になり得る。この仮説と一致して、HERV-Kエンベロープは、HERV-K CAR<sup>+</sup>T細胞によりうまくかつ選択的に標的化することができる。これらの遺伝子改変CAR<sup>+</sup>T細胞をin vivoで注入することは、これらの細胞の抗腫瘍活性を示す腫瘍の退縮及び転移の減少と関連した。

実施例7 - 微小残存病変の免疫療法で使用される可能性のあるin vivoで長寿命のT細胞を生成するための膜結合型サイトカインの使用

#### 【0218】

mIL15の生成及び発現。mIL15構築物 (図28) は、セリン-グリシンリンカーにより、IL-15 cDNA配列 (NM\_000585.4) を全長IL-15R (NM\_002189.3) に融合する。IL-15及びIL-15Rのシグナルペプチドは省略し、IgEシグナルペプチド (gb|AAB59424.1) をmIL15構築物に用いた。この構築物は、膜結合型であるが、上述のトランス提示モデルに類似しているIL-15Rとの関連において提示されるIL-15を産生する。DNAプラスミドをGeneArt (Regensburg, Germany) により合成し、その後、スリーピングビューティプラスミドにサブクローニングした (非ウイルス遺伝子導入方法)。一次ヒトT細胞に、mIL15プラスミド及びSB-11トランスポゾンの有無に関わらず、CARプラスミド (CD19に特異的) を共電気穿孔した。遺伝子改変T細胞の増殖及び膨張は、41BBL及びCD86共刺激分子を発現するCD19<sup>+</sup>K562人工抗原提示細胞 (aAPC) 変異体を1週間刺激することで達成した。使用したCARは、CD3及びCD28シグナル伝達細胞質ドメインを含有する第2世代CARである。aAPC上にCD19が存在することで、抗原特異的T細胞を選択的に増殖させができるが、共刺激分子は、in vitro増殖を改善する。mIL15分子は、改変T細胞によりCARと安定して共発現させることができ、共発現させたT細胞は、バルク集団を表す (図29)。さらに、改変T細胞での全CAR発現は、mIL15-CAR改変T細胞に対して90%を超えて到達する (図29)。

#### 【0219】

mIL15の機能性。IL-15受容体複合体シグナル伝達は、転写5のシグナル伝達物質及び活性化因子のリン酸化を主に誘導する。フォスフローを用いてリン酸化されたSTAT5 (pSTAT5) を見ることで、mIL15がサイトカインシグナル伝達経路を誘導することができるかどうか判断することができる。pSTAT5レベルは、これらのレベルでのサイトカイン補充が血清及びサイトカイン飢餓下で無効にされているCAR<sup>+</sup>

10

20

30

40

50

T細胞で上昇した。飢餓条件下で、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のpSTAT5レベルを維持した(図30)。mIL15が機能的であり、サイトカインシグナル伝達経路のpSTAT5部分を活性化することが、これらのデータにより実証される。

#### 【0220】

mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の臨床的に有意な数への増殖。T細胞特異性をCARに再指向させる際に、ex vivo増殖の焦点は、CAR<sup>+</sup>T細胞集団、この場合、mIL15の有無に関わらないCARを活発にすることである。標準CAR<sup>+</sup>T細胞は、可溶性IL-2及びIL-21で増殖させるが、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、IL-15とIL-21との間の報告された相乗効果を利用するため可溶性IL-21で増殖させた。IL-21を補充したmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、標準CAR<sup>+</sup>T細胞のみならず、IL-15及びIL-21を与えられた対照CAR<sup>+</sup>T細胞に同等の増殖が実証された(P=0.53、二元配置ANOVA;図31)。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のex vivo増殖により、臨床的に有意な数の細胞を産生する。

#### 【0221】

mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型及び機能性の評価。ex vivo増殖させたmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の表現型は、IL-7Ra発現を除いてCAR<sup>+</sup>T細胞と同じである。この時点では注入産物を表す細胞の一般的な表現型は大部分が、活性化マーカー-CD45RO及びCD25の発現が中程度から高程度のCD8<sup>+</sup>(細胞傷害性)T細胞である。両方のT細胞群のT細胞メモリー関連マーカー(CD62L、CCR7、CD27、及びCD28)(図32A)の発現レベルは低程度から中程度まで可変であった。改変T細胞のex vivo増殖後、T細胞は、これらの再指向T細胞特異性及び溶解機能を保持する必要がある。クロム遊離アッセイを行い、増殖産物中のT細胞の機能を評価した。CD19<sup>+</sup>及びCD19<sup>-</sup>EL4標的を、エフェクター対標的の比率を変えながら、改変T細胞で被覆した。CD19<sup>+</sup>腫瘍標的の特異的溶解は、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞及びCAR<sup>+</sup>T細胞の両方(P<0.001、二元配置ANOVA、n=3)により、全てのエフェクター対標的の比率にわたって実証され、互いに違いはなかった(P>0.05、二元配置ANOVA)。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞によるCD19<sup>+</sup>標的溶解は、特異的であり、CD19<sup>-</sup>標的のバックグラウンド溶解と有意に異なった(P<0.001、二元配置ANOVA)(図32B)。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、これらの再指向特異性及び溶解能力を保持した。

#### 【0222】

特異的mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞サブセットは、長期in vitro持続し、機能的なままである。長期のin vitro持続性を評価するため、4つのaAPC刺激で増殖させたmIL15<sup>+</sup>/<sup>-</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞を、抗原再刺激をさらにせずに長期培養した。CAR<sup>+</sup>T細胞は、IL-2、IL-15、または無サイトカインの補充を受けたが、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、外因性サイトカインを受けなかった。予想した通り、サイトカイン補充を受けなかったCAR<sup>+</sup>T細胞は持続しなかった。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のみならず、IL-2またはIL-15を受けたCAR<sup>+</sup>T細胞は、非補充CAR<sup>+</sup>T細胞よりも有意に大きな相対倍数増殖を有した(P<0.0001、反復測定ANOVA、n=3;図33A)。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の相対増殖をほぼ0にメンテナスすることも、これらの改変細胞が非制限的に増殖していないことを示唆するものである。臨床応用に対して有益であるため、CAR<sup>+</sup>T細胞は、抗原に応答性のままでなければならない。したがって、抗原遭遇から75+日目でこれらのT細胞に、無標的、CD19<sup>-</sup>EL-4、CD19<sup>+</sup>EL-4、CD19<sup>+</sup>Na1m-6(ヒト白血病細胞株)、またはリンパ球活性化カクテル(LAC)で抗原投与し、インターフェロン(IFNg)産生を、標的でインキュベーション6時間後に、細胞内サイトカイン染色により評価した。IL-2またはIL-15のいずれかを受けたCAR<sup>+</sup>T細胞と同様に、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞も、CD19<sup>+</sup>標的及びLACに応答するIFNgを産生した(図33B)。別のアッセイでは、これらの75日目の離脱T細胞をaAPCで刺激し、IL-21を補充した。従って、IL-2で培養したCAR<sup>+</sup>T細胞は、IL-2及びIL-21を

10

20

30

40

50

提供し、IL-15 培養 T 細胞は、IL-15 及び IL-21 を受け、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞には、IL-21 のみを補充した。APC 刺激後 8 日目に、アネキシン V 染色を介して T 細胞生存率を評価した。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞は、最も大きな生細胞集団（アネキシン V<sup>neg</sup>）（図 33C）を有することが示され、活性化への耐性が細胞死を誘発したことを見た。

#### 【0223】

持続性 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞は、低分化 T 細胞の特徴を持つ。長期持続性 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞を特徴付けるため、発明者らは、低分化 T 細胞サブセットは長寿命の潜在力があると知られているため、持続性 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞が低分化 T 細胞サブセットと関連する特徴を示すであろうと仮説を立てた。構成的プロモーターの存在により構成的シグナル伝達が可能なため、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞の ex vivo 培養中、発明者らは、これらの T 細胞が、持続性利点を持つ細胞を生み出す低分化状態の分子プログラムを持つかどうか評価した。nCounter 分析システムを用いた多重化デジタル遺伝子プロファイリングの分析を、4 刺激（離脱アッセイ T 細胞入力）からの CAR<sup>+</sup> 及び mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞に行った。正規化 mRNA 計数の分析には、負の 2 項分布ベース統計プログラム（Lohseら、Nucleic Acids Res. (2012) 40、W622-7）を用いた。2 倍を超える特異的な mRNA 計数、P < 0.05、FDR q < 0.05 である場合、遺伝子は、有意に特異的発現をしたと見なした。これらの基準を用いて、5 個の遺伝子しか特異的に発現したと見なされなかつたため、mIL15 により得られた培養または分子プログラミングの利点はないことが示唆された。

#### 【0224】

その後、発明者らは、長期持続性 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞を特徴付けた。まず、CD45RA 及び CCR7 マーカーを用いてこれらの表現型を評価し、これらの分化状態を表現型として記述した。最低から最高の分化状態の細胞は、CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> < CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> < CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> < CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> と表すため、これらのマーカーは、T 細胞の分化状態を特徴付ける。実験（4 刺激した mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞）の開始時に、75 日目離脱 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞をこれらの対応物と比較すると、持続性 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞培養により、CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> 及び CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> T 細胞サブセットの割合が増した（\*\*\*P < 0.001、2-way 反復測定 ANOVA、n = 7；図 34）ことが観察される。CCR7 発現は、CAR<sup>+</sup>T 細胞に対して離脱 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞で有意に強化された。CCR7<sup>neg</sup> 及び CCR7<sup>+</sup> サブセットの生存率は、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞、IL-2 (50U/ml) を受けた CAR<sup>+</sup>T 細胞、及び抗原離脱後に可溶性 IL-15 (5ng/ml) を受けた CAR<sup>+</sup>T 細胞のアネキシン V 染色により評価された。サイトカイン刺激（IL-2、IL-15 複合体、または mIL15）の種類に関わらず、CCR7<sup>neg</sup> T 細胞は、生細胞と等しい周波数を示すことが分かった。これに対し、mIL15 に曝露された CCR7<sup>+</sup> T 細胞は、IL-2 または IL-15 複合体を受けた CAR<sup>+</sup>T 細胞よりも生存率が有意に高かった（両方とも、P < 0.05；図 34）。mIL15 が CCR7<sup>+</sup> 表現型を十分に支持するため、低分化 CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T 細胞サブセットの維持に寄与することを、これらのデータは示している。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞が低分化 T 細胞の持続性を促進する能力は、養子療法の所望の表現型であり、長寿命 T 細胞サブセットが低分化表現型を持つと報告している他の研究を裏付けるものである。さらに、高分化サブセットの生存も観察され、構成的 IL-15 シグナル伝達により支持されたと思われる。

#### 【0225】

長期持続性 mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞は、低分化 T 細胞サブセットと関連するいくつかの分子マーカーを表示する。nCounter 分析システムを用いて T 細胞の遺伝子発現パターンを分析し、4 刺激からの mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T 細胞と離脱後 75 日目に生存しているものとの間の特異的発現遺伝子の階層的にクラスタリングされたヒートマップを

10

20

30

40

50

生成した(>2倍切り捨て、 $P < 0.05$ 、FDR  $q < 0.05$ )。これらの研究により、108個の有意に特異的な発現遺伝子を同定した(>2倍切り捨て、 $P < 0.05$ 、FDR  $q < 0.05$ )。DAVID機能注解を用いて遺伝子オントロジー分類を評価した。特異的発現遺伝子の機能的分類は、広義のカテゴリー：T細胞活性化、分化、増殖、及びアポトーシスに分類される。即ち、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の多数の遺伝子が、正の分化調節、アポトーシス調節、及びアポトーシス誘導を下方調節した。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の多数の遺伝子が、負の分化調節、及びWntシグナル伝達経路を上方調節した(図36)。これは、持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の分子署名が、4刺激のmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞(実験開始時のT細胞)よりも低分化であることを示唆するものである。

10

## 【0226】

選択した遺伝子の発現は、フローサイトメトリーにより検証した。低分化状態(Tcf-7)及びエフェクター機能/分化状態(Blimp-1及びTbet)の獲得と関連する転写因子の発現は、持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が低分化細胞と関連する転写因子バランスを示すことを示すものである。これは、Tcf-7の発現が大きくなり、Blimp-1及びTbetの発現が小さくなることを特徴とする(図37)。細胞表面マーカーIL-7Ra及びCCR7の評価は、低分化T細胞サブセットにより特徴的に発現される際に行った。持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、長寿命T細胞サブセットと関連するこれらのマーカーの発現を増加させた(図38)。T細胞の分化レベルを区別するための1つの追加の尺度は、低分化T細胞がIL-2を産生する能力によるものである。4刺激または75日目離脱培養のいずれかからのmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞を、LACで6時間模擬処置もしくは処理した後、細胞内サイトカイン染色によりIL-2産生を評価した。4刺激T細胞は、IL-2を産生することができなかったが、持続性75日目離脱T細胞は、IL-2を産生する能力を獲得した(図39)。これらの結果は、集合的に、ex vivo増殖させたCAR<sup>+</sup>T細胞またはmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の間に識別可能な差異はないが、得られた長期持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、in vivoでの長期生存を実証する低分化T細胞サブセットと関連する特徴を示唆するものである。

20

## 【0227】

高腫瘍量モデルにおけるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のin vivo持続性及び抗腫瘍効果。in vivo持続性を評価するため、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞及びCAR<sup>+</sup>T細胞を、萤ルシフェラーゼ(fFLuc)を発現するように共変更し、生物発光イメージング(BLI)を用いたin vivoのT細胞の縦方向モニタリングを可能にした。これらの変更T細胞を、 $20 \times 10^6$ 個のCAR<sup>+</sup>T細胞の1回T細胞注入を用いて、播種Nalm-6(CD19<sup>+</sup>)悪性腫瘍を持つNSGマウスに、未処置対照群と共に養子導入した。14日後にマウスを犠牲にした。CAR<sup>+</sup>T細胞が持続するとは分かっていなかったが、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、11日間のイメージング期間を通じて持続することがBLIにより観察された(図40B)。骨髄、脾臓、及び末梢血液を採取し、ヒトCD3をマーカーとして用いて、かつ、マウスリンパ球をゲートアウトして、ヒトT細胞の存在についてフローサイトメトリーにより評価した。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞を注入したマウスには、骨髄(0.49~2.17%、 $P = 0.0001$ 、非対応t検定、 $n = 5$ )、脾臓(1.15~12.38%、 $P < 0.0001$ 、非対応t検定、 $n = 5$ )及び末梢血液(58.39~92.60%、 $P < 0.0001$ 、非対応t検定、 $n = 5$ )に著しいCD3<sup>+</sup>T細胞が検出された(図40C)。評価した組織のいずれにおいても、CAR<sup>+</sup>T細胞処置群(図40C)及び未処置群(腫瘍のみ)からの試料にCD3<sup>+</sup>細胞は検出されなかった。このモデルでは、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、末梢血液で腫瘍制御を実証したが(図40D)、完全な腫瘍消失は観察されなかった。腫瘍抗原の有病率にかかわらず、CAR<sup>+</sup>T細胞は、in vivo持続性が不十分であるが、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、身体を通じて有意なレベルで存在したことが、これらのデータにより示される。

30

40

50

## 【0228】

低腫瘍量モデルにおけるmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のIn vivo持続性及び抗腫瘍効果。発明者らは次に、低腫瘍量の予防モデルにおけるT細胞生着及び抗腫瘍活性を評価した。改変T細胞(mIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>ffLuc<sup>+</sup>)を、外因性サイトカインのないNSGマウスに注入し、ウミシイタケルシフェラーゼ(rLuc)改変Nalm-6の注入前に6日間生着させた。マウスには、30日間にわたってBLIを行った。この予防モデルでは、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、実験期間を通じて持続することが観察され、腫瘍生着を予防した。これは、CAR<sup>+</sup>T細胞及び無T細胞処置群と比較して有意な抗腫瘍効果であった(P < 0.0001、一元配置ANOVA、n = 4~5)(図41C及び41D)。フローサイトメトリーによる臓器及び末梢血液の分析により、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞処置群にヒトCD3<sup>+</sup>T細胞を検出したが、興味深いことに、T細胞は骨髄でしか見つからず(図41E)、腫瘍遭遇後に選択的なホーミングまたは生存を示し得る。同様の実験では、生存を試験し、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞処置マウスは、無T細胞処置マウスまたはCAR<sup>+</sup>T細胞処置マウスと比較して有意に改善された生存を示した[P = 0.045(mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞対CAR<sup>+</sup>T細胞、ログランクマンテル・コックス検定、n = 7~8; 図41)]。

## 【0229】

CAR活性化の不在下でのmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞のIn vivo持続性。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞が、CARシグナル伝達の必要なくin vivoで長期持続が可能かどうか評価するため、改変T細胞(mIL15<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>ffLuc<sup>+</sup>)をマウス(無腫瘍または無外因性サイトカイン)に注入し、最大47日間監視した。この方法でT細胞を試験することで、持続性T細胞が、非制限の増殖を実証するかどうか、あるいは、ホメオスタシスに似た状態でこれらの集団を維持するかどうか明らかになるであろう。CAR<sup>+</sup>T細胞の持続は観察されなかったが、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の存在により、外因性サイトカイン及び抗原の不在下での持続性が示された(図42B)。これは、骨髄、脾臓、及び末梢血液から単離したCD3染色細胞のフローサイトメトリーによりさらに確認された(図43C)。縦方向のT細胞持続性の評価では、フラックス値は、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞レベルが経時に安定するかまたは徐々に低下することを示すが、未制御増殖の発生は示さなかった(図42D)。これらの持続性T細胞を採取し、遺伝子改変T細胞のex vivo増殖で前述したのと同じ方法で、ex vivo増殖させた。これらの細胞は、インターフェロン- $\gamma$ 産生により評価されたように、抗原特異的に活性化することができた(図42E)。mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の抗原特異的応答を保持しながら、CARに依存せずかつホメオスタシスに似た状態でmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の持続性が強化されたことを、このin vivoデータは実証している。

## 【0230】

mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞の細胞増殖及びメモリー動態。フローサイトメトリー分析を用いて、mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞をさらに特徴付けた(結果を図35に示す)。長期持続性mIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、1年を超えて一定で培養されている試料において10日にわたる最小PKH希釀により示されるように、低回転率での培養を維持する。さらに、細胞を分割すると、大部分がCCR7<sup>+</sup>であった。そのようなデータは、T細胞が、非制限の自律的な増殖または成長とは反対に恒常的に維持されることを示している(図35A)。連続的長期培養(1.5~2.45年)のmIL15<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T細胞は、aAPCで活性化され、表現型検査し、染色体分析用に提出された。表現型検査は、これらのT細胞がmIL15を発現したことを示し、提出された全てのドナーの染色体分析の結果は、正常な中期展開を示した(図35B及び35C)。図35Dは、K562-aAPCを用いた細胞の刺激後のメモリー動態を示す:離脱中の刺激1-CAR対mIL15<sup>+</sup>CAR条件:これらの研究では、CAR-T細胞は、刺激の最初の9日間中にはIL-21のみ、Ag離脱中にはIL2のみを得;mIL5<sup>+</sup>CAR-T細胞は、最初の9日間中にはIL-21のみを得、離脱中に外因性サイトカインは得られなかった。CAR及びmIL15<sup>+</sup>CAR-T細胞間の刺激1後19日目にCCR7及びIL-7Ra発現に差

10

20

30

40

50

異はないことを結果は示すものである。CCR7及びIL-7Ra発現は、mIL15-改変T細胞のみの抗原暴露（29日目対19日目）から離れて時間と共に増加する。CAR発現は、抗原に暴露することなく～80%に増加する（刺激1後9日目に、PB522は51%、PB273は53%であった）。図35Eは、CAR及びmIL15<sup>+</sup>CAR

T細胞の刺激1対2のメモリー動態を示す。離脱中の条件：CAR T細胞は、刺激後10日目に策定したAg離脱中にIL2のみを得；mIL15<sup>+</sup>CAR T細胞は、離脱中に外因性サイトカインは得られなかった。刺激1及び刺激2後の同じような時点でCCR7及びIL-7Ra発現を比較することで、19日目の刺激1でCAR対mIL15<sup>+</sup>CARのメモリー差は示されなかった。刺激2では、刺激1と同じ時点で、2回刺激されたCAR T細胞は、刺激1対応物と比較してCCR7ははるかに少なく、IL-7Raはほとんどない。2回刺激されたmIL15<sup>+</sup>CAR T細胞も、メモリーは少ないが、CCR7がいくつか残ったmIL15<sup>+</sup>CAR T細胞を持つCARのみT細胞よりもより多くの「メモリー」を保持する（しかし、IL-7Raはほぼ完全に消失した）。

実施例8 - SBトランスポゼースをコードするmRNAを用いて最小限に操作されたT細胞の生成

#### 【0231】

エレクトロポレーション用のmRNAとして提供されたSBトランスポゼースの使用により、SBトランスポゼースシステムを用いてCAR T細胞産生をさらに強化できたかどうかについての研究を実施した。これらの研究では、トランスポゾン反復によりフランクされたCARをコードするプラスミドと、トランスポゼース（例えば、SB11または100×）をコードするmRNAとの両方を用いて、上に詳述したように細胞を電気穿孔した。研究用のmRNAは、m7GTPがキャップされ、ポリア尾部を含んだ。mRNAとして提供されたmRNA SBトランスポゼースを用いたCAR T細胞作製プロトコルを示す概略を図43に示す。これらの研究では、ドナー#0からの細胞は、SB11mRNAで電気穿孔したが、ドナー#1からの研究細胞は、100×mRNAで電気穿孔した。

#### 【0232】

ドナー#0から作製された細胞は、CAR発現及び細胞増殖のためのフローサイトメトリー分析により特徴付けられた。図44Aに示すように、CARを安定的に発現するT細胞の百分率は、9日目（8.3%）から16日目（66.2%）に有意に増加する。T細胞は、急速に成長し、エレクトロポレーション後16日目に20倍に増殖した（図44B）。さらに、図44Dに示す研究を用いて、エレクトロポレーション後9日目（左側パネル）及び17日目（右側パネル）にセントラルメモリーT細胞数（Tcm）を評価した。これらの結果から、低分化セントラルメモリーT細胞（Tcm）数は9日目～17日目に減少するが、相対的に高い（27%）ことが分かる。次に、クロム遊離アッセイを用いて、細胞の細胞毒性活性を判断した。図44Cに示すように、作製されたCAR T細胞は、標的細胞に対するCD-19特異的細胞毒性をもらしたが、非改変T細胞には細胞毒性活性が本質的に見られなかった。

#### 【0233】

ドナー#1から作製された細胞についても研究した。図45Aに示すように、このドナーから作製されたCAR T細胞も、標的細胞に対するCD-19特異的細胞毒性をもらしたが、非改変T細胞（右側パネル）には細胞毒性活性が本質的に見られなかった。さらに、改変T細胞は、CAR陽性細胞数が異なるにもかかわらず、同様の効率で9日目及び15日目にCD19陽性標的細胞を殺傷する。図45Bでは、CARコピー数及び発現を評価した研究結果を示す。これらの結果は、CAR DNAコピー数が15日目から22日目に1.5から0.9に減少し、その後は安定的であることを示すものである。

#### 【0234】

最後に、フローサイトメトリーを用いて、エレクトロポレーション後の細胞生存率を評価した。図46に示すように、DNA/mRNAでエレクトロポレーション後、全細胞数はまず減少し（1日目及び2日目）、その後、細胞は増殖し始める。セロメーターカウン

10

20

30

30

40

50

トにより、細胞数は、エレクトロポレーション後2日目に59%~76%減少する（生存率24~41%）。

#### 【0235】

従って、トランスポゼースをコードするmRNAを用いるCAR作製技術の使用により、効果的な数の標的特異的細胞傷害性T細胞を極めて短期間かつ最小限の操作で作製できることが、前述のデータにより実証された。mRNAエレクトロポレーションの効率はドナーに依るが、SB100×トランスポゼースはCAR作製においてより効率的であり得ると考えられる。興味深いことに、CARを発現する細胞の百分率が低いエレクトロポレーション後早期であっても（9日目）、全ての細胞集団は、後の段階（15~16日目）からのものとほとんど同じ効率で標的腫瘍細胞を殺傷し、より多くのセントラルメモリー（低分化）細胞を含有する。mRNAをコードするSB11及びSB100×は、試験条件下で、細胞ゲノム当たり約1つのコピーCARコード遺伝子の組み込みをもたらすことも確認された。

#### 【0236】

本書で開示されかつ特許請求の範囲に記載した方法の全てを、本開示を考慮に入れて必要以上の実験なしに構成及び実行することができる。本発明の組成物及び方法を好ましい実施形態に関して説明する一方、本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法及び方法のステップまたはステップの手順の様々な変更を適用してもよいことは、当業者にとって明らかである。さらに、同一または類似の結果を得ながら本明細書に記載の薬剤を化学的及び生理学的に関連する特定の薬剤に置き換えてもよいことに留意されたい。このような当業者に明らかな同様の置換及び変更の全ては、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神、範囲、及び概念の範囲内であると考えられる。

#### 参考文献

以下の参考文献が、本明細書の説明を補助する典型的な手続に関するまた他の詳細を与える限りにおいて、参考することにより本明細書に明確に取り込まれている。

Aronovich et al, The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy. *Hum. Mol. Genet.*, 20:R14-20, 2011.

Bhatia et al, Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology*, 23:488-496, 2009.

Bieda et al, Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. *J. Gen. Virol.*, 82:591-596, 2001.

Brentjens et al, 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.

Brentjens et al, CD 19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 5: 177ral38, 2013.

Buscher et al, Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res.*, 65:4172-41

10

20

30

40

50

- 80, 2005.
- Contreras-Galindo et al, Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J. Virol.*, 82:9329-9336, 2008.
- Cooper and Bolland, Good T cells for bad B cells. *Blood*, 119:2700-2702, 2012.
- Davies et al, Combining CD 19 redirection and alloantigenization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. *Cancer Res.*, 70: 3915-3924, 2010.
- Dreyfus, Autoimmune disease: A role for new anti-viral therapies? *Autoimmunity Reviews*, 11:88-97, 2011.
- Ertl et al, Considerations for the clinical application of chimeric antigen receptor T cells: observations from a recombinant DNA Advisory Committee Symposium held June 15, 2010. *Cancer Res.*, 71:3175-3181, 2011.
- Garrido et al, Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today*, 18:89-95, 1997.
- Geiss et al, Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.*, 26:317-325, 2008.
- Geurts et al., Structure-based prediction of insertion-site preferences of transposons into chromosomes. *Nucleic Acids Res.*, 34:2803-2811, 2006.
- Gross et al, Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody -type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 10024-10028, 1989.
- Hackett et al, A transposon and transposase system for human application. *Mol. Ther.*, 18:674-683, 2010.
- Hackett et al., Efficacy and safety of Sleeping Beauty transposon-mediated gene transfer in preclinical animal studies. *Curr. Gene Ther.*, 11:341-349, 2011.
- Hahn et al, Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 24:717-723, 2008.

Hollis et al, Stable gene transfer to human CD34(+) hematopoietic cells using the Sleeping Beauty transposon. *Exp. Hematol.*, 34: 1333-1343, 2006.

Huang et al, Genetically modified T cells targeting interleukin-11 receptor alpha- chain kill human osteosarcoma cells and induce the regression of established osteosarcoma lung metastases. *Cancer Res.*, 72: 271-281, 2012. 10

Huang et al, Sleeping Beauty transposon-mediated engineering of human primary T cells for therapy of CD 19+ lymphoid malignancies. *Mol. Ther.*, 16: 580-589, 2008.

Huang et al, DNA transposons for modification of human primary T lymphocytes. *Methods Mol. Biol.*, 506: 115-126, 2009.

Huls et al, Clinical application of sleeping beauty and artificial antigen presenting cells to genetically modify T cells from peripheral and umbilical cord blood. *J. Vis. Exp.*, e50070, 2013. 20

Ivics et al, Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tel -like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 91: 501-510, 1997.

Izsvak and Ivics, Sleeping beauty transposition: biology and applications for molecular therapy. *Mol. Ther.*, 9: 147-156, 2004. 30

Izsvak et al., Translating Sleeping Beauty transposition into cellular therapies: victories and challenges. *Bioessays*, 32: 756-767, 2010.

Jena et al., Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 116: 1035-1044, 2010.

Jena et al., Chimeric Antigen Receptor (CAR) - Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T Cells in Clinical Trials. *PLoS ONE*, 8: e57838, 2013. 40

Jin et al, The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. *Gene Ther.*, 18: 849-856, 2011.

Jones et al, HERV-K-specific T cells eliminate diverse HIV-1/2 and SIV primary isolates. *J. Clin. Invest.*, 122: 4473-4489 50

- , 2012.
- Kalos et al, 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.
- Kebriaei et al, Infusing CD 19-directed T cells to augment disease control in patients undergoing autologous hematopoietic stem-cell transplantation for advanced B-lymphoid malignancies. *Hum. Gene Ther.*, 23:444-450, 2012. 10
- Kebriaei et al, CARs: driving T-cell specificity to enhance anti-tumor immunity. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, 4:520-531, 2012.
- Kim et al, Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*, 91:217-223, 1990. 20
- Kim et al, High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. *PLoS ONE*, 6:e18556, 2011.
- Kochenderfer et al, Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD 19. *Blood*, 116:4099-4102, 2010.
- Kochenderfer et al, B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD 19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 119:2709-2720, 2012. 30
- Kohn et al, CARs on track in the clinic. *Mol. Ther.*, 19:432-438, 2011.
- Kowollik et al, CD28 costimulation provided through a CD 19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res.*, 66:10995-11004, 2006. 40
- Krone et al, Protection against melanoma by vaccination with Bacille Calmette-Guerin (BCG) and/or vaccinia: an epidemiology-based hypothesis on the nature of a melanoma risk factor and its immunological control. *Eur. J. Cancer*, 41:104-117, 2005. 50

- Li et al., Expression of HERV-K correlates with status of MEK-ERK and p16INK4A-CDK4 pathways in melanoma cells. *Cancer Invest.*, 28:1031-1037, 2010.
- Lower et al., A general method for the identification of transcribed retrovirus sequences (R-U5 PCR) reveals the expression of the human endogenous retrovirus loci HERV-H and HERV-K in teratocarcinoma cell. *Virology*, 192:501-511, 1993. 10
- Mahmoud et al., Enforced CD 19 expression leads to growth inhibition and reduced tumorigenicity. *Blood*, 94:3551-3558, 1999.
- Maiti et al., Sleeping beauty system to redirect T-cell specificity for human applications. *J. Immunother.*, 36: 112-123, 2013.
- Manuri et al., piggyBac transposon/transposase system to generate CD 19-specific T cells for the treatment of B-lineage malignancies. *Hum. Gene Ther.*, 21:427-437, 2010. 20
- Mates et al., Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat. Genetics*. 41(6):753-61, 2009.
- Muster et al., An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res.*, 63:8735-8741, 2003. 30
- Nakazawa et al., PiggyBac-mediated cancer immunotherapy using EBV-specific cytotoxic T-cells expressing HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol. Ther.*, 19:2133-2143, 2011.
- Ono, Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. *J. Virol.*, 58:937-944, 1986. 40
- Patience et al., Human endogenous retrovirus expression and reverse transcriptase activity in the T47D mammary carcinoma cell line. *J. Virol.*, 70:2654-2657, 1996.
- Porter et al., Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 365:725-733, 2011. 50

- Rabinovich et al, A role for the MHC class I-like Mill molecules in nutrient metabolism and wound healing. *Immunol. Cell Biol.*, 86:489-496, 2008.
- Reiche et al, Differential expression of human endogenous retrovirus K transcripts in primary human melanocytes and melanoma cell lines after UV irradiation. *Melanoma Res.*, 20:435-440, 2010.
- Sciamanna et al, Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene*, 24:3923-3931, 2005. 10
- Seifarth et al, Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences. *J. Virol.*, 69:6408-6416, 1995.
- Serafino et al, The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp. Cell Res.*, 315:849-862, 2009. 20
- Serrano et al, Differentiation of naive cord-blood T cells into CD 19-specific cytolytic effectors for posttransplantation adoptive immunotherapy. *Blood*, 107:2643-2652, 2006.
- Singh et al, Combining adoptive cellular and immunocytokine therapies to improve treatment of B-lineage malignancy. *Cancer Res.*, 67:2872-2880, 2007. 30
- Singh et al, Redirecting specificity of T-cell populations for CD 19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res.*, 68:2961-2971, 2008.
- Singh et al, Reprogramming CD 19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies. *Cancer Res.*, 71:3516-3527, 2011. 40
- Szymczak et al, Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat. Biotechnol.*, 22:589-594, 2004.
- Taruscio and Mantovani, Factors regulating endogenous retroviral sequences in human and mouse. *Cytogenet. Genome Res.*, 105:351-362, 2004. 50

Till et al., Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. Blood, 112:2261-2271, 2008.

Wang - Johanning et al., Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene*, 22:1528 - 1535, 2003.

Wang - Johanning et al., Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. Int. J. Cancer, 120:81-90, 2007.

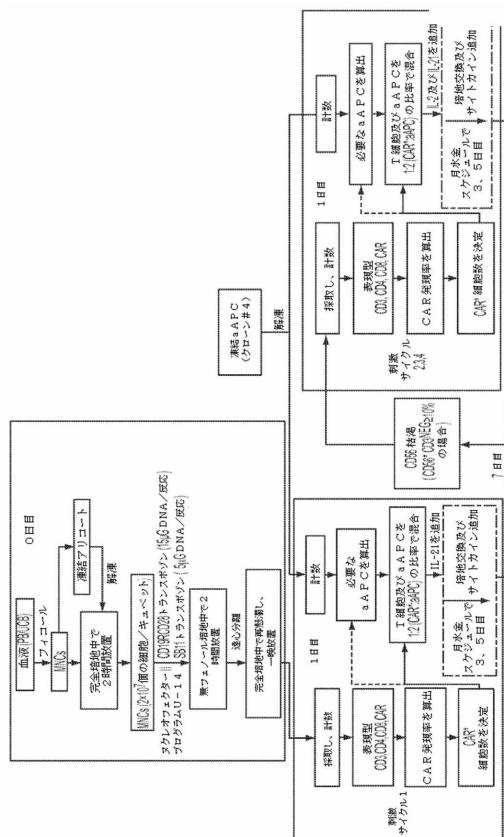
Williams, Sleeping beauty vector system moves toward human trials in the United

States. Mol. Ther., 16: 1515-1516, 2008.  
Yang et al., Development of optimal bicis-

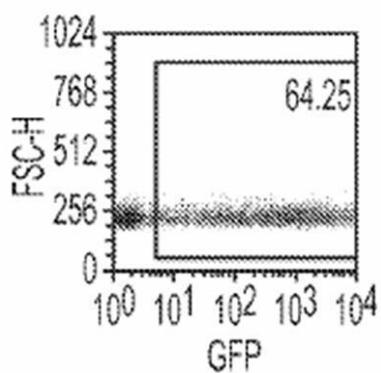
tronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther.*, 15:

$$1 \ 4 \ 1 \quad 1 \ - \ 1 \ 4 \ 2 \ 3 \ , \quad 2 \ 0 \ 0 \ 8 \ .$$

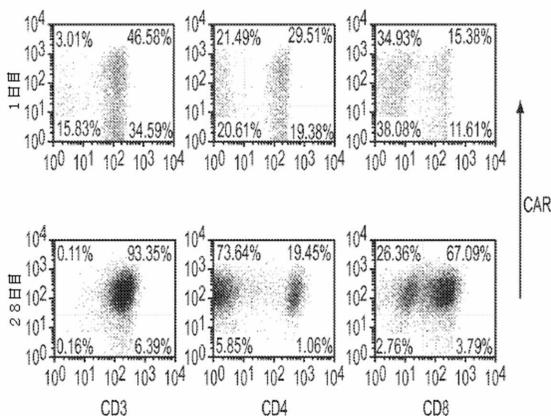
( 1 )



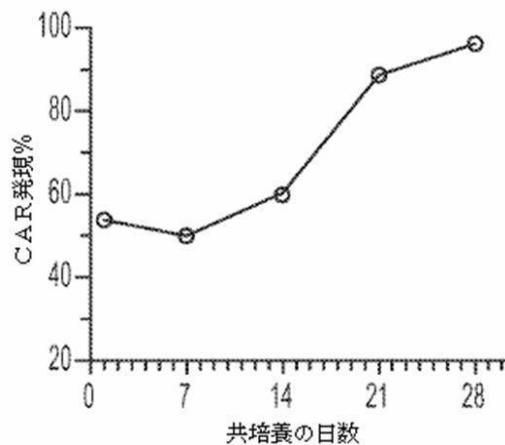
## 【习题 2 A】



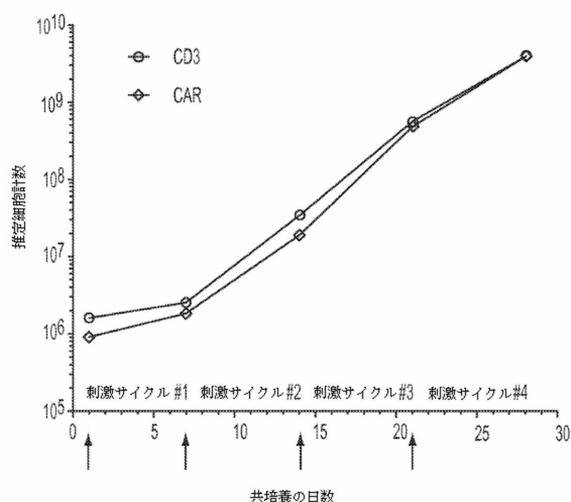
### 【図2B-2C】



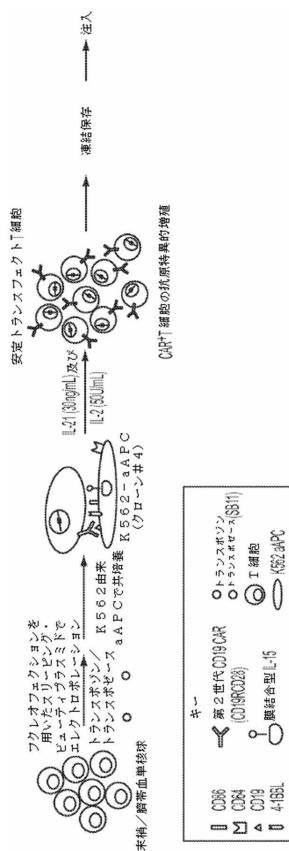
【図2D】



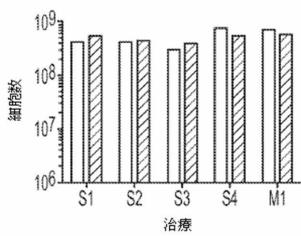
【図3】



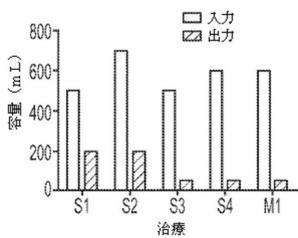
【図4】



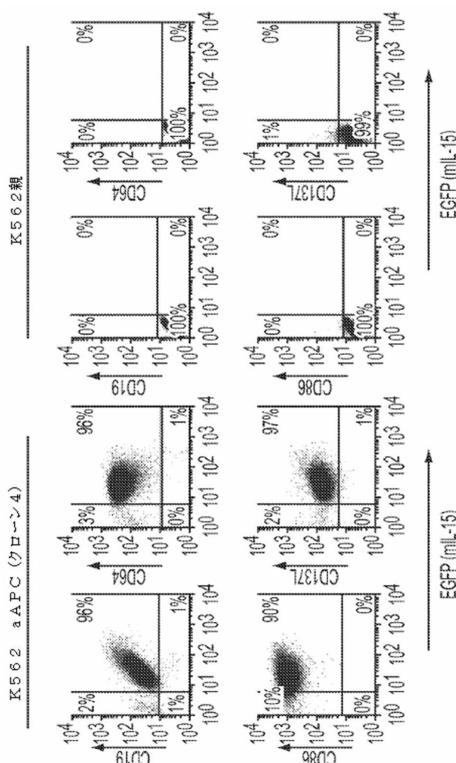
【図5A】



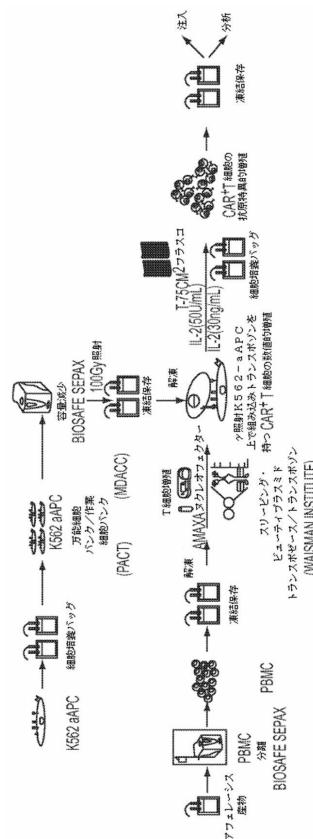
【図5B】



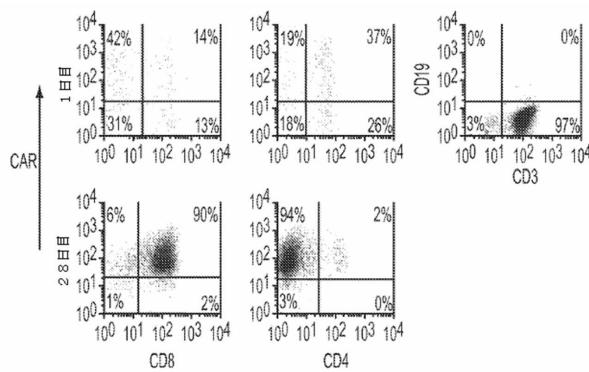
【図 5 C】



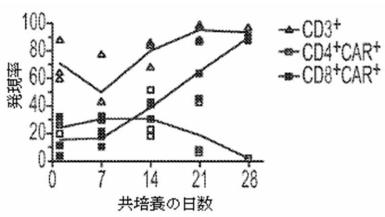
【図 6】



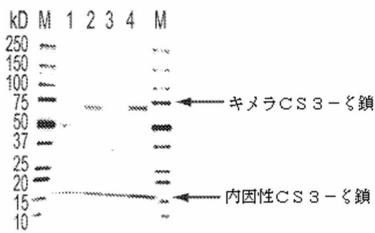
【図 7 A】



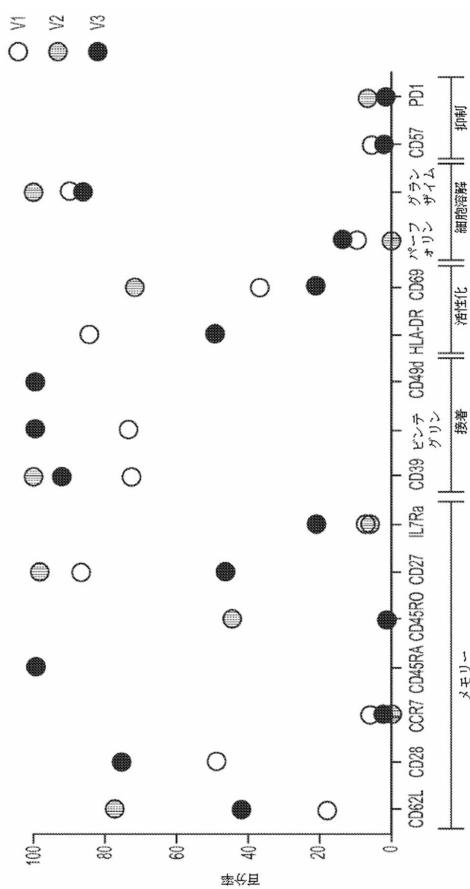
【図 7 C】



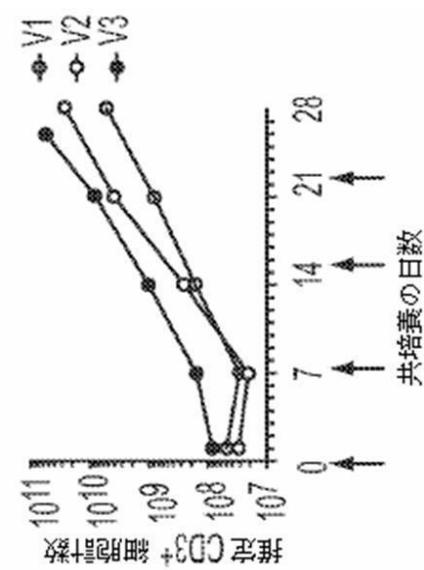
【図 7 B】



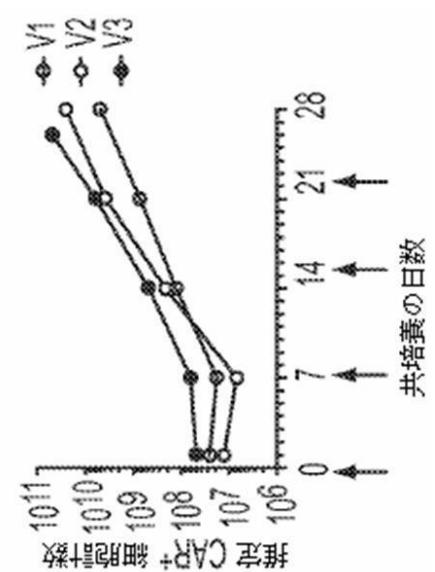
【図 7 D】



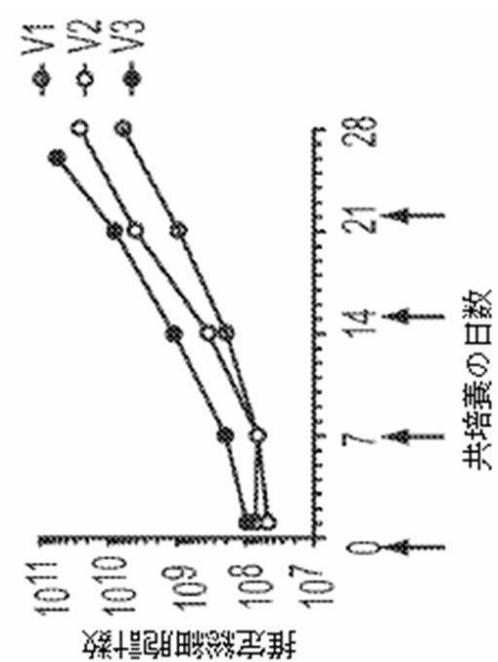
【図 8 B】



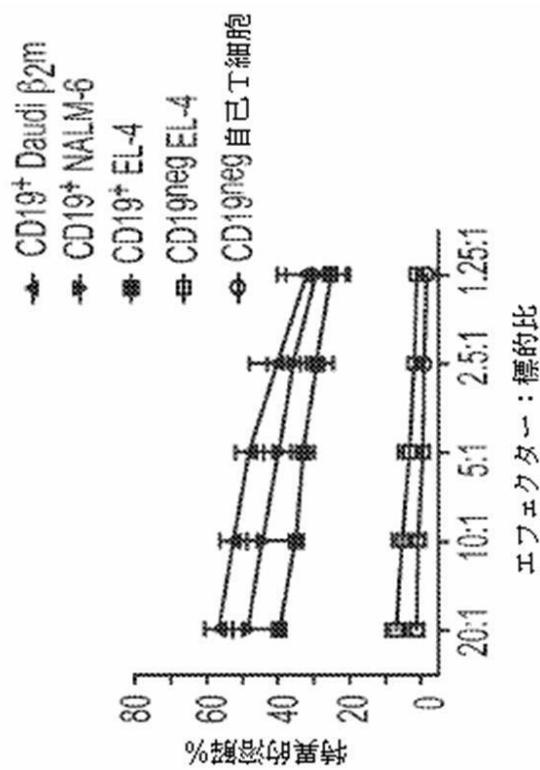
【図 8 A】



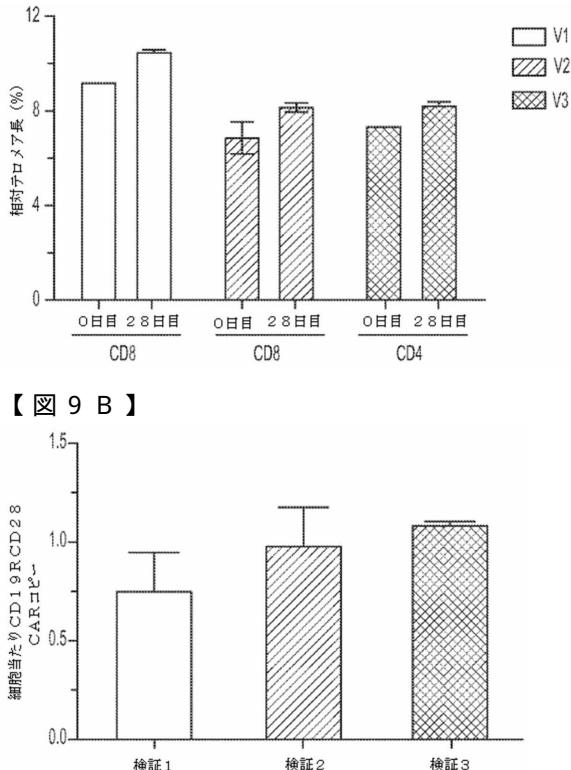
【図 8 C】



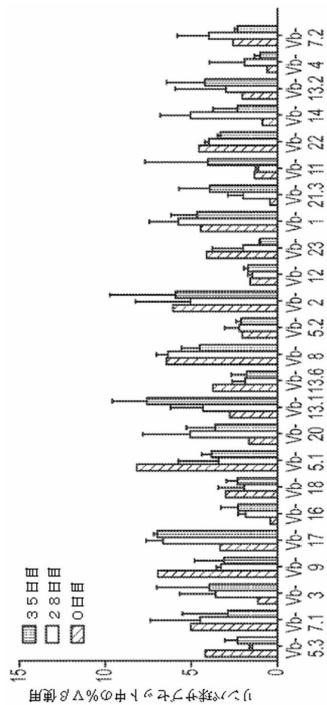
【図 8 D】



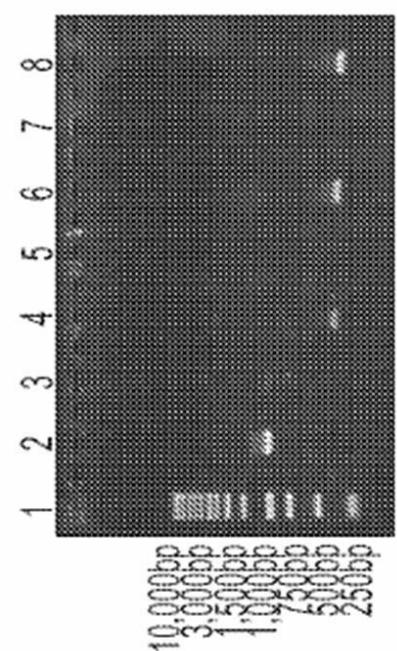
【図 9 A】



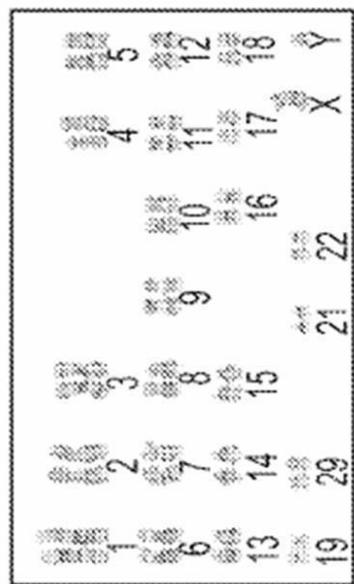
【図 9 C】



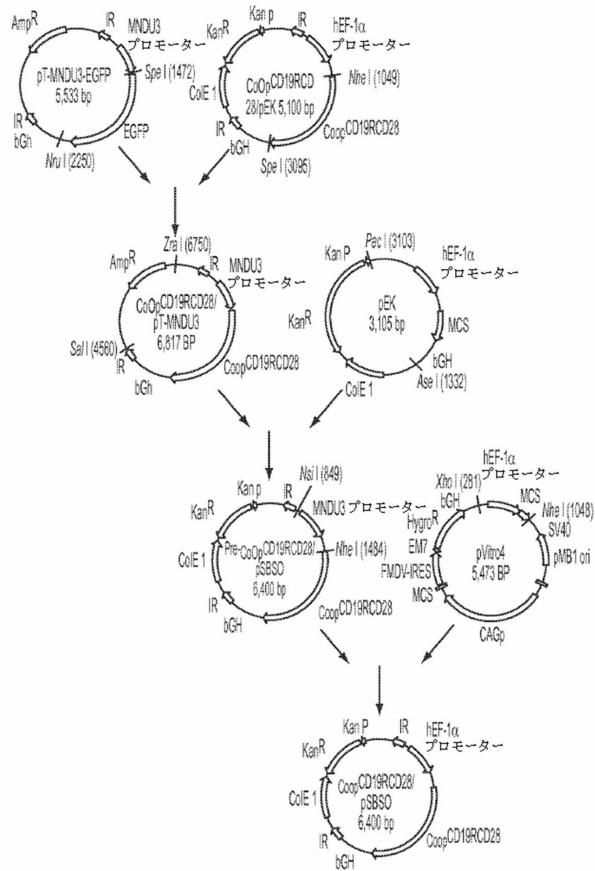
【図 9 D】



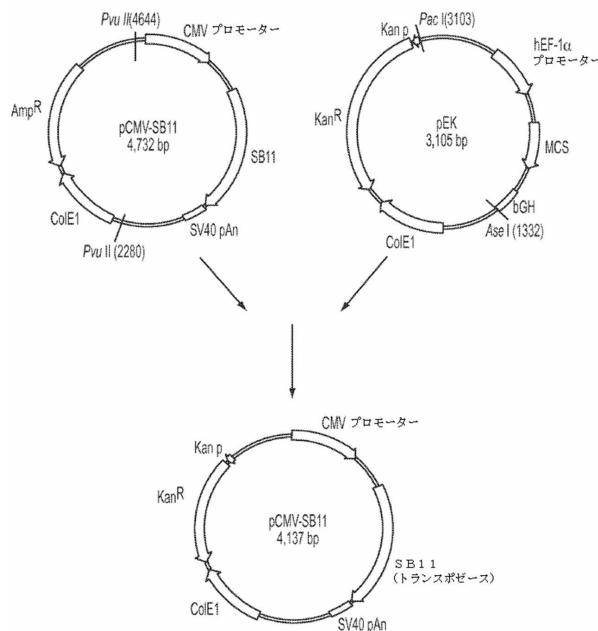
【図 9 E】



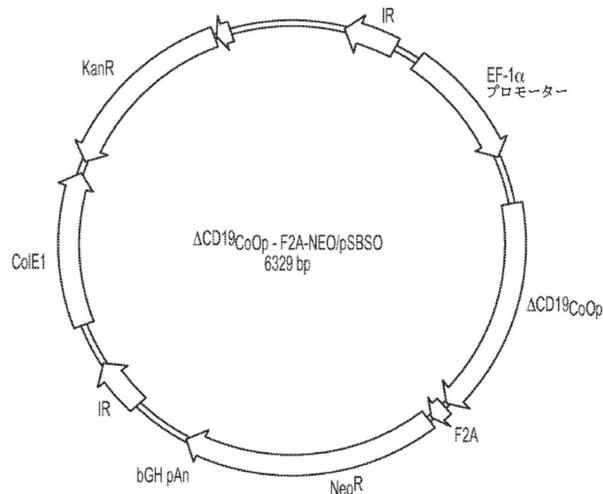
【図 10】



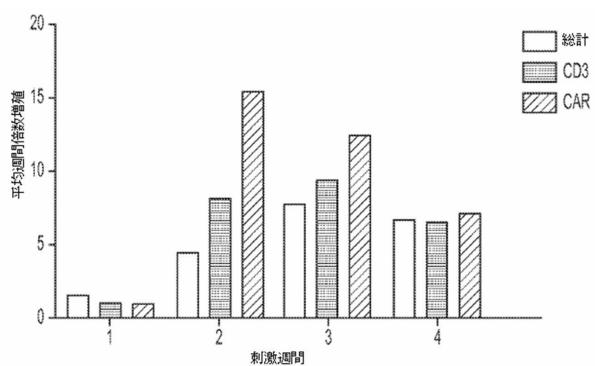
【図 11】



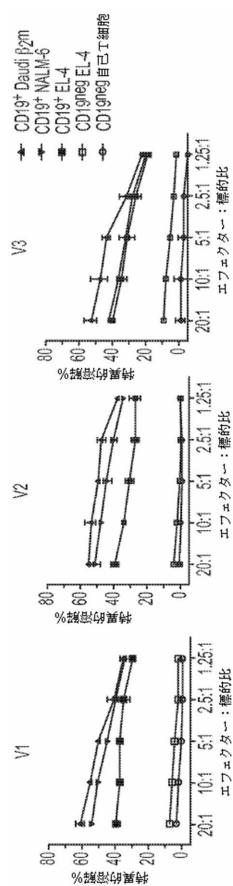
【図 12】



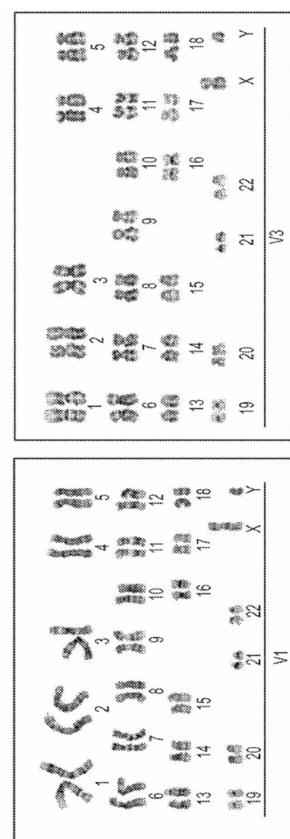
【図 13】



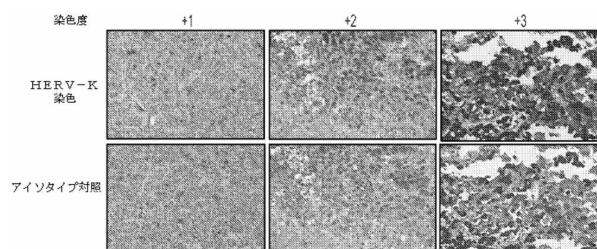
【図14】



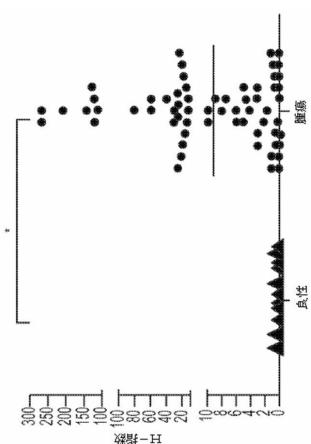
【図15】



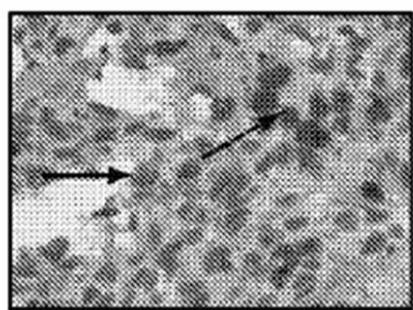
【図16A】



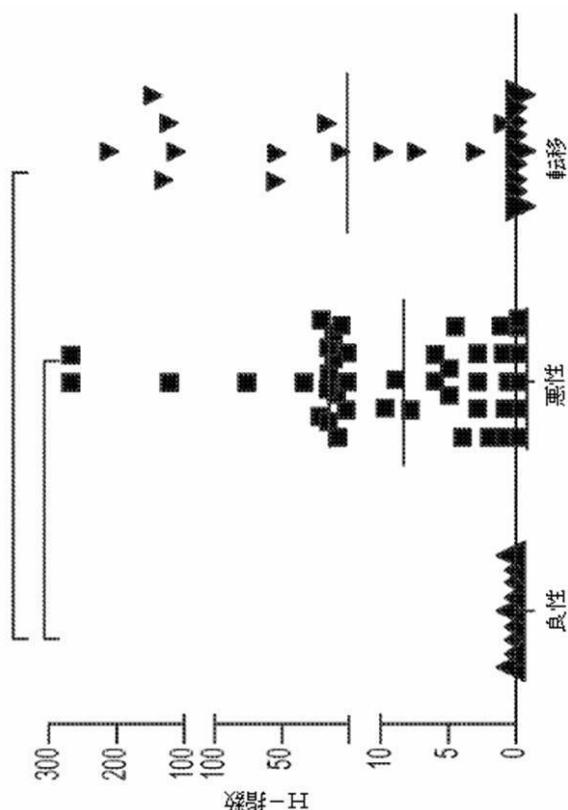
【図16C】



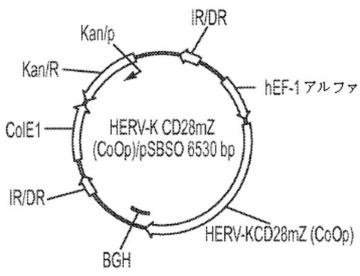
【図16B】



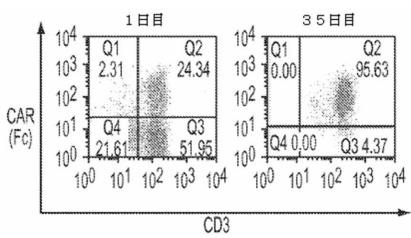
【図 16 D】



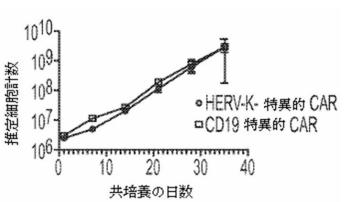
【図 17 A】



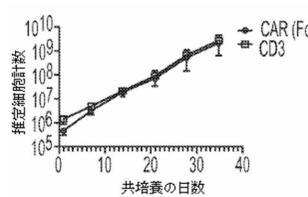
【図 17 B】



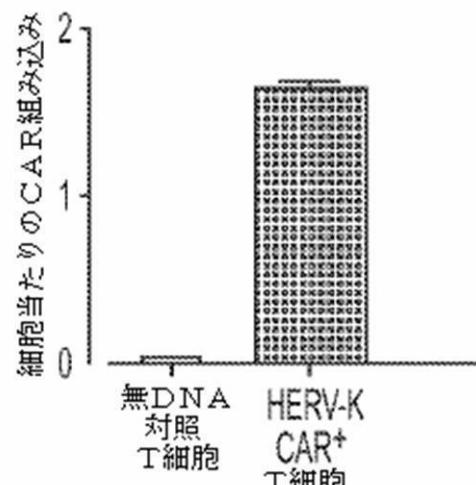
【図 17 C】



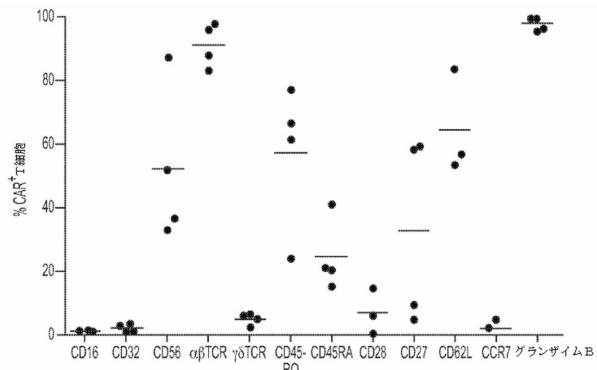
【図 17 D】



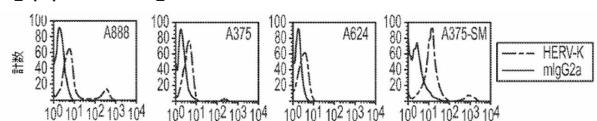
【図 17 E】



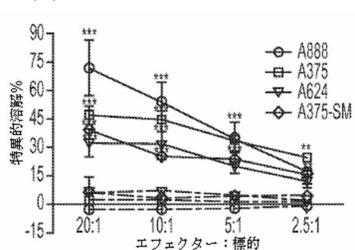
【図 17 F】



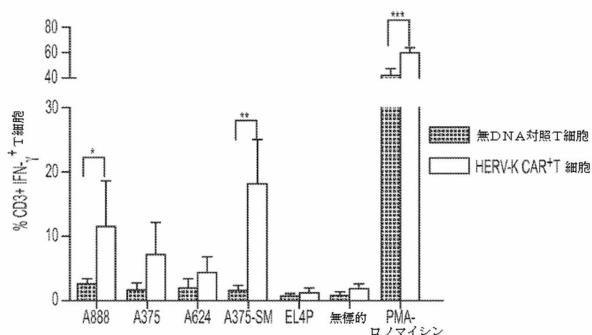
【図 18 A】



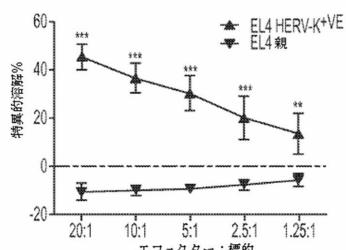
【図 18 B】



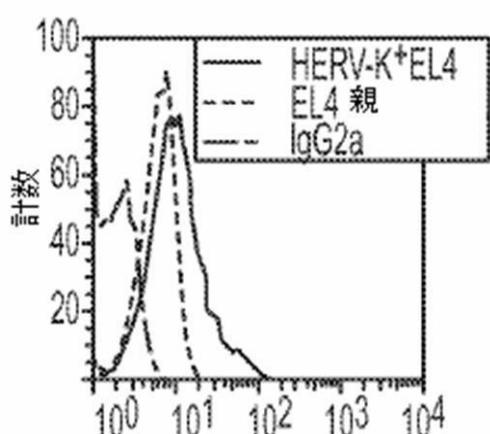
【図 18 C】



【図 19 B】



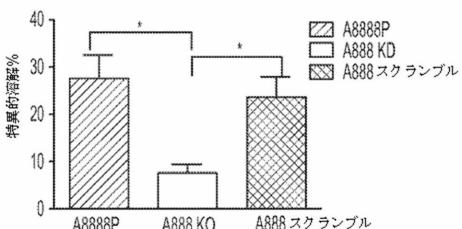
【図 19 A】



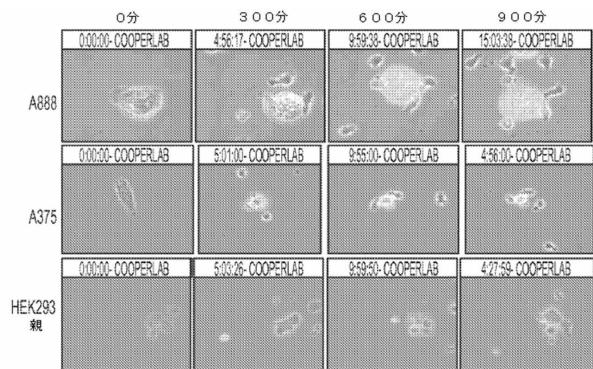
【図 19 C】



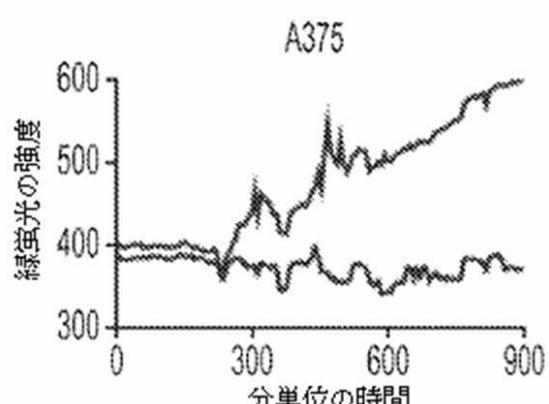
【図 19 D】



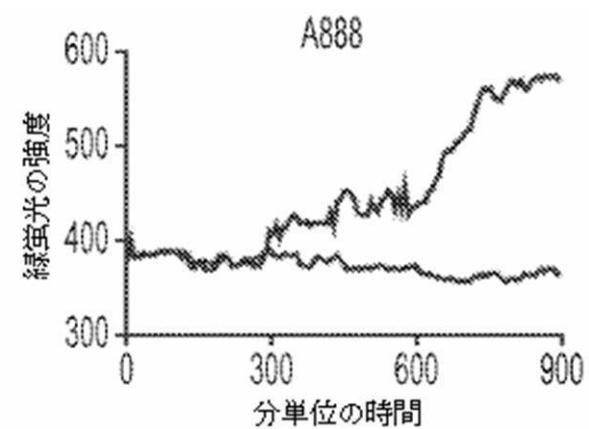
【図 20 A】



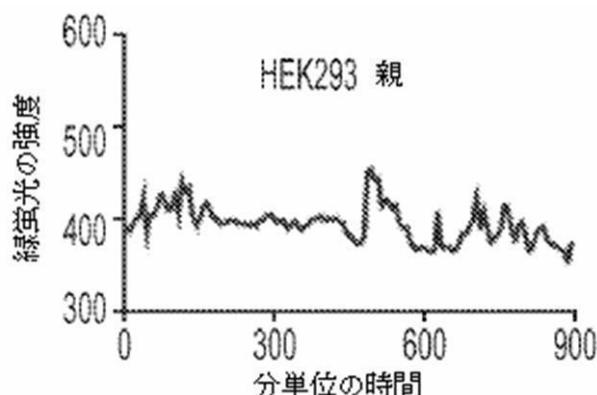
【図 20 C】



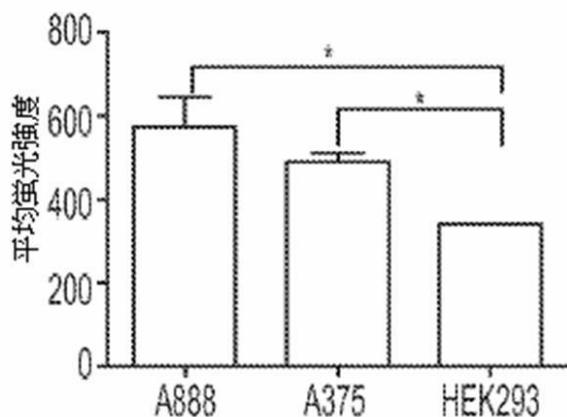
【図 20 B】



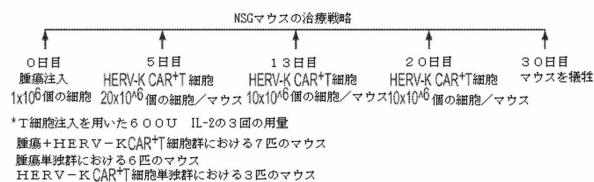
【図 20 D】



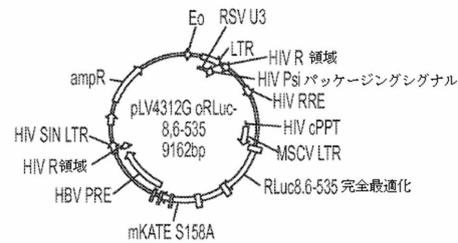
【図20E】



【図21A】



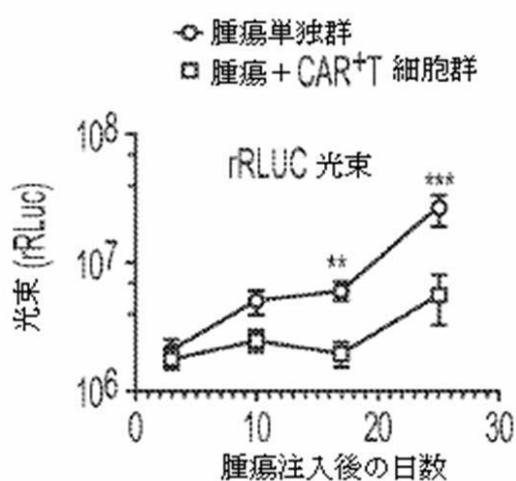
【図21B】



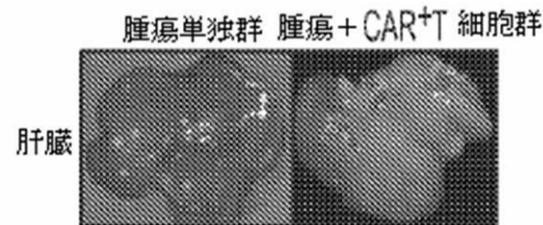
【図21C】



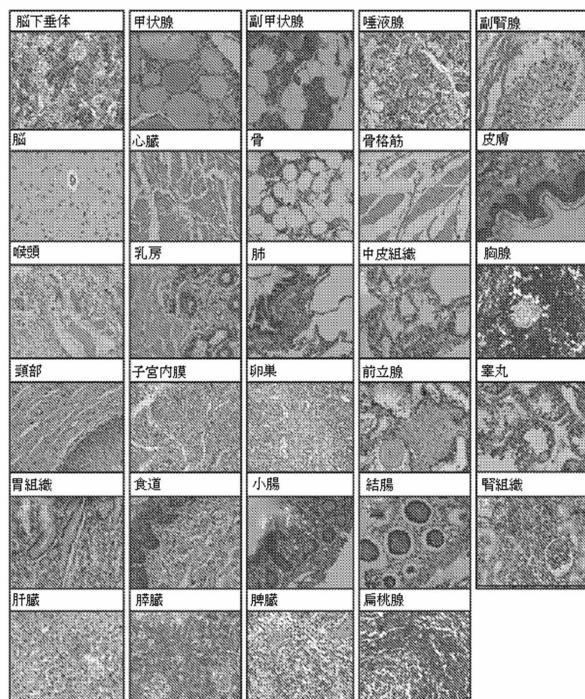
【図21D】



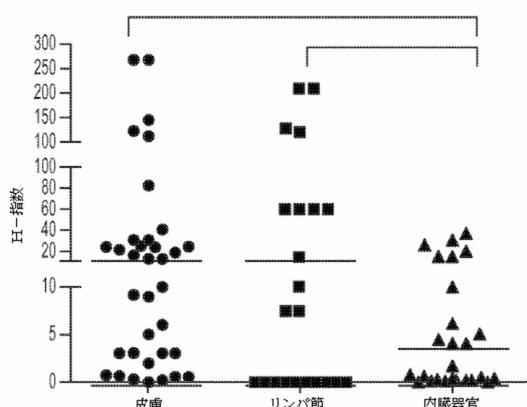
【図21E】



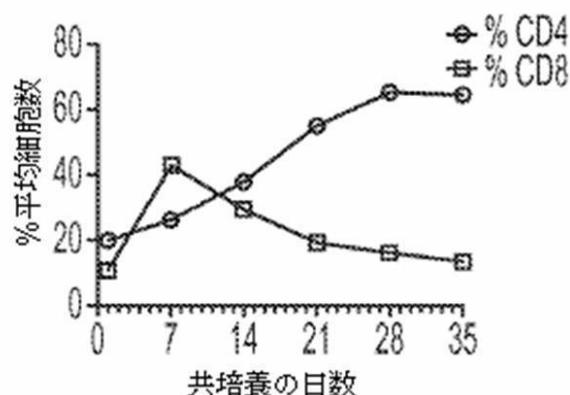
【図22A】



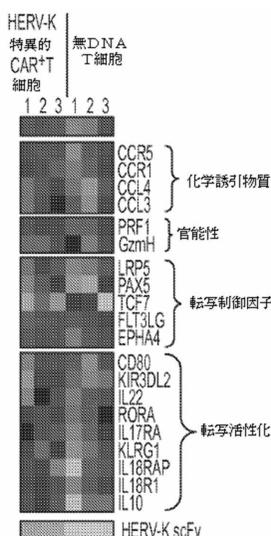
【図 2 2 B】



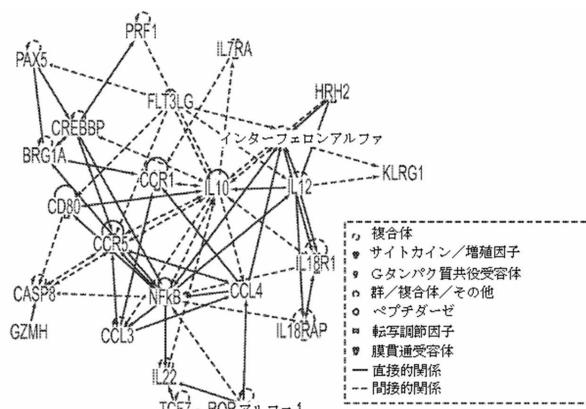
【図 2 3 A】



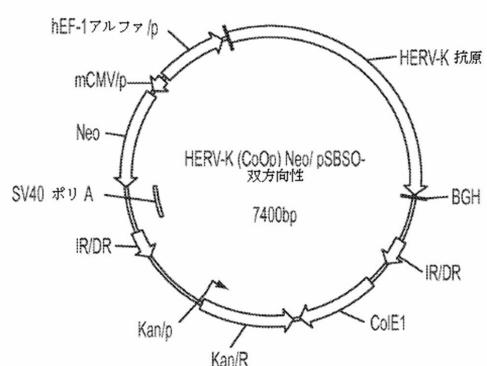
【図 2 3 B】



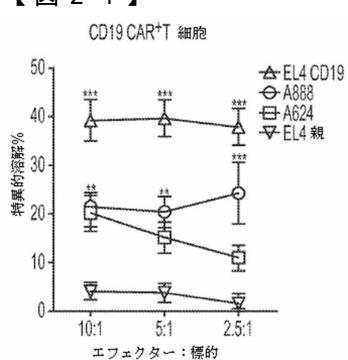
【図 2 3 C】



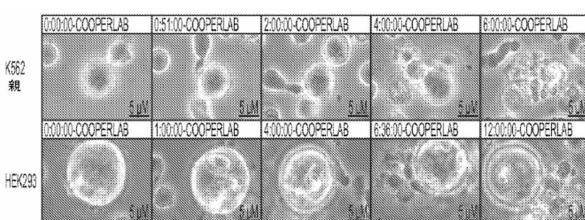
【図 2 5】



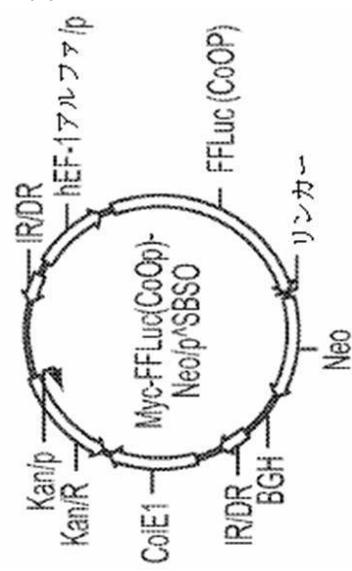
【図 2 4】



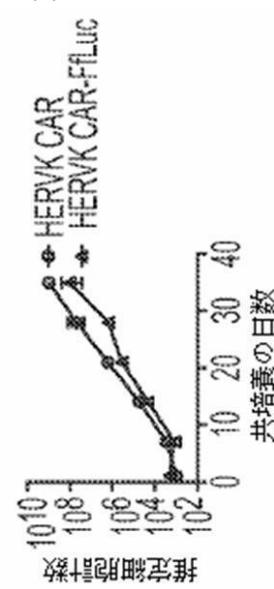
【図 2 6】



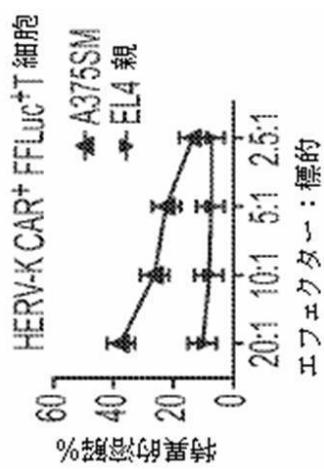
【図 27 A】



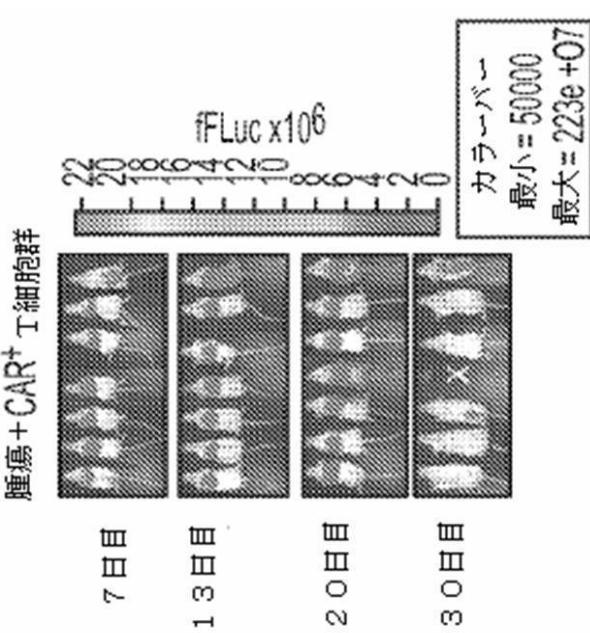
【図 27 B】



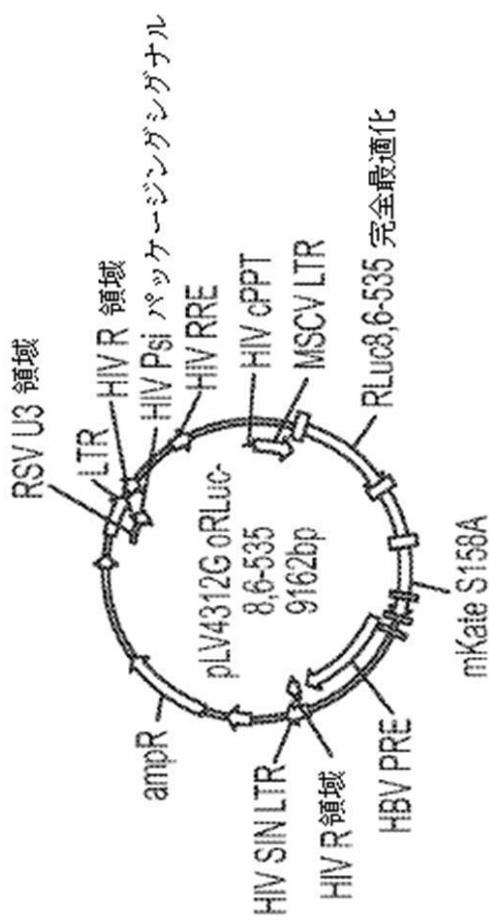
【図 27 C】



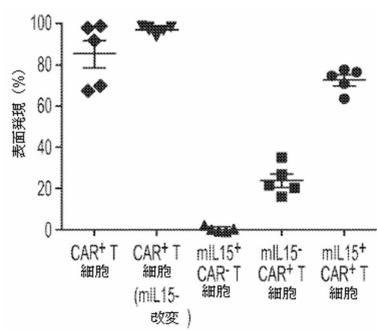
【図 27 D】



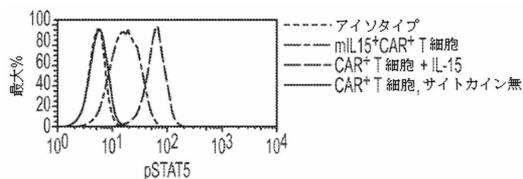
【図 27 E】



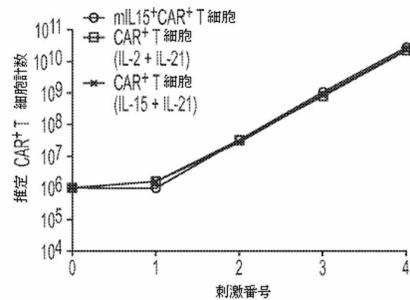
【図 29 B】



【図 30】



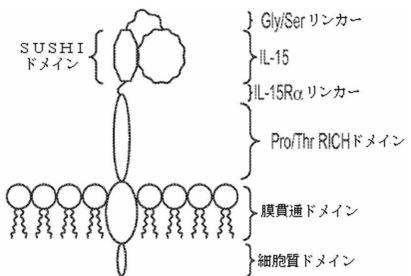
【図 31】



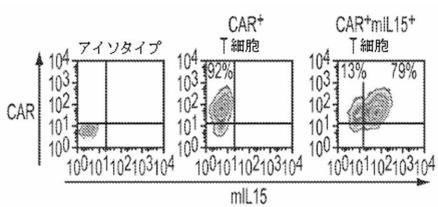
【図 28 A】



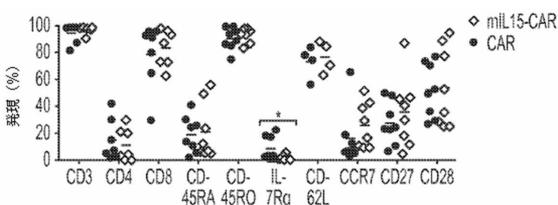
【図 28 B】



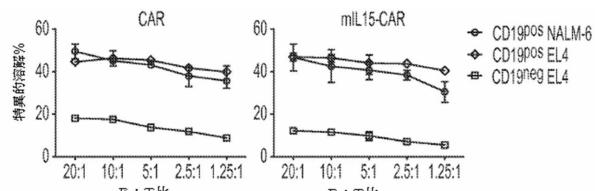
【図 29 A】



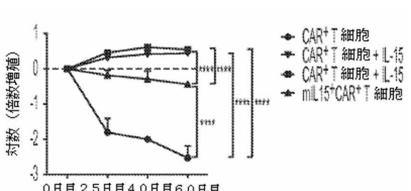
【図 32 A】



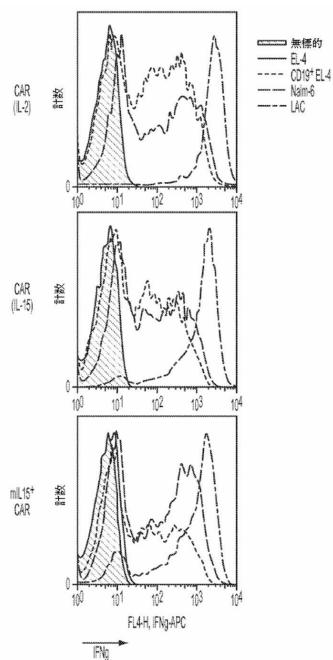
【図 32 B】



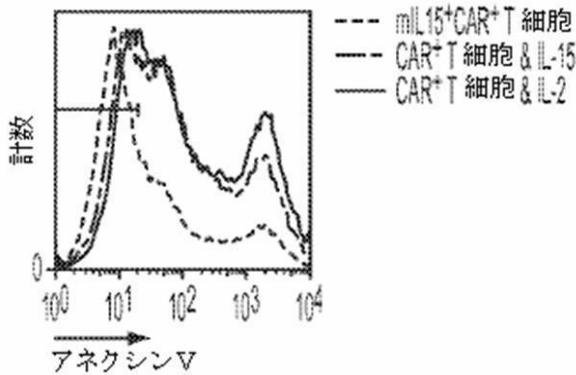
【図 33 A】



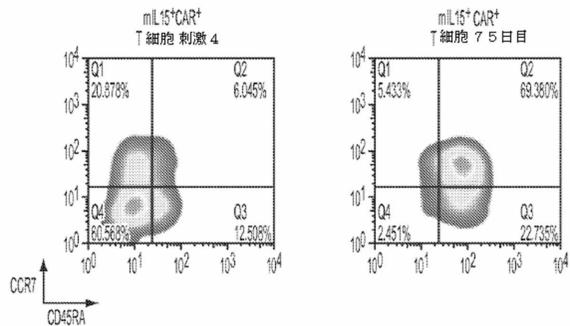
【図 3 3 B】



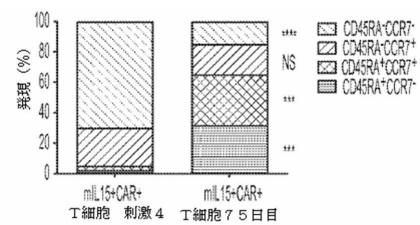
【図 3 3 C】



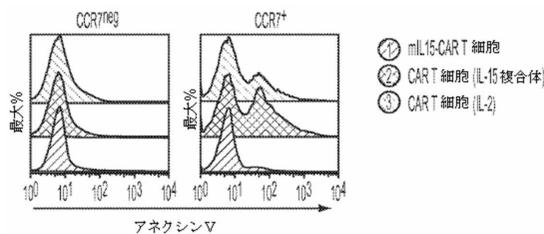
【図 3 4 A】



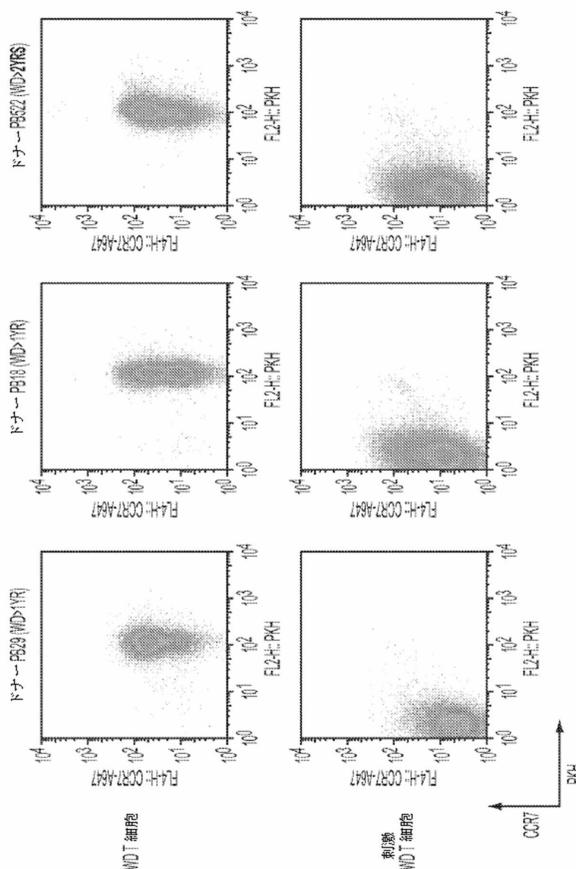
【図 3 4 B】



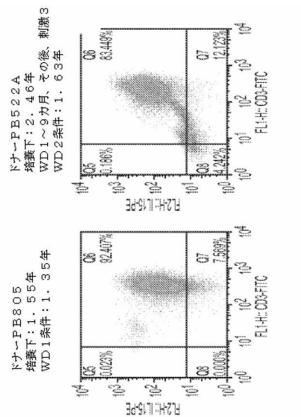
【図 3 4 C】



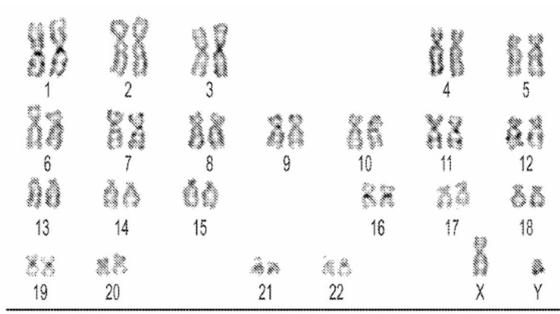
【図 3 5 A】



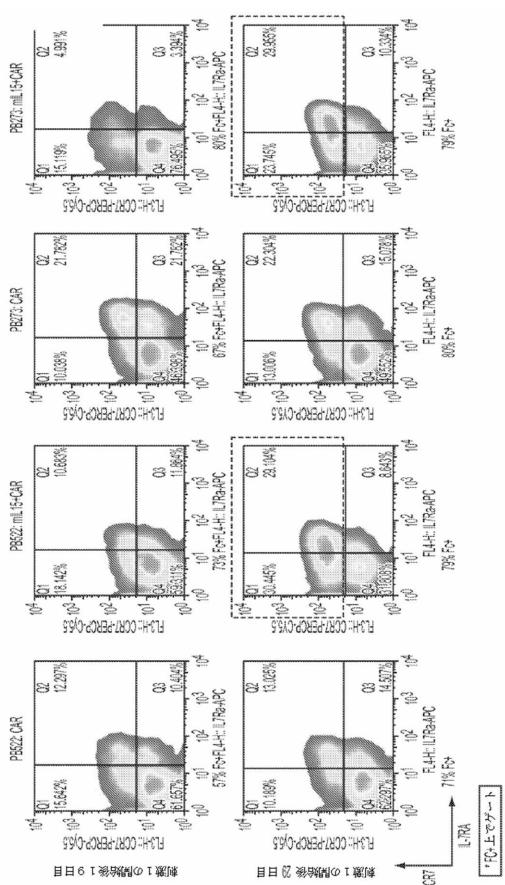
【図35B】



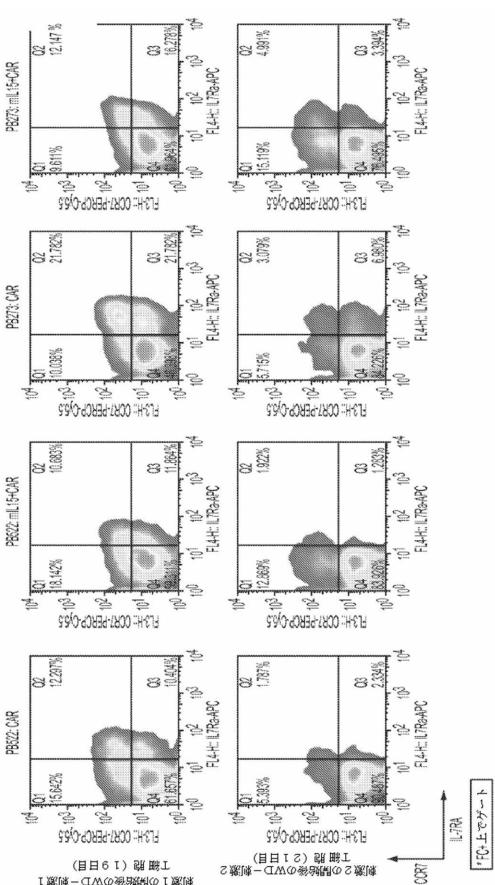
【図35C】



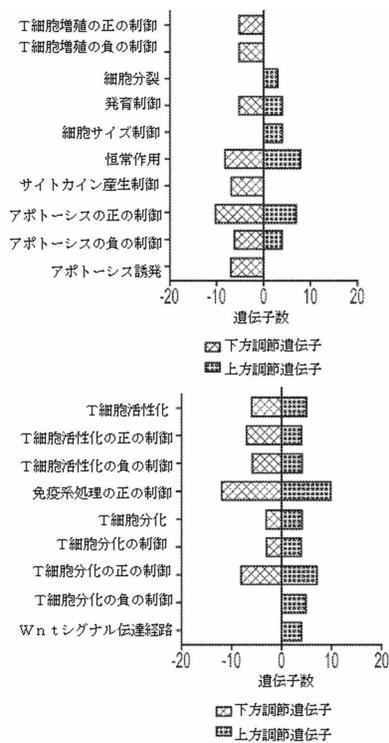
【図35D】



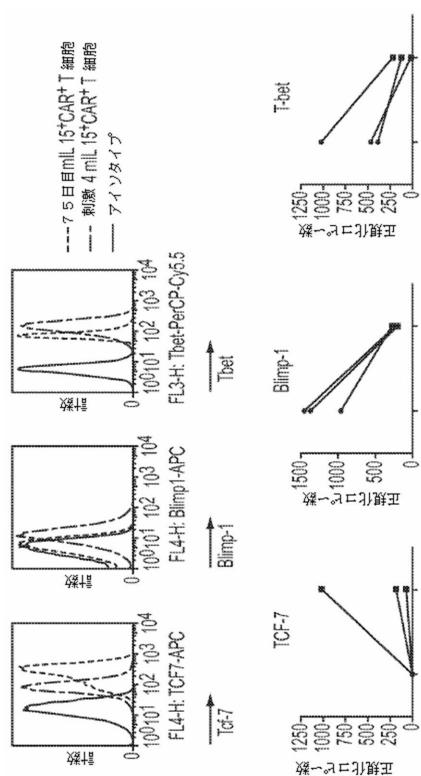
【図35E】



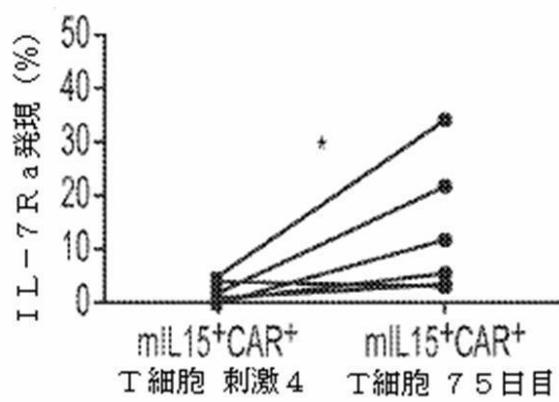
【図36】



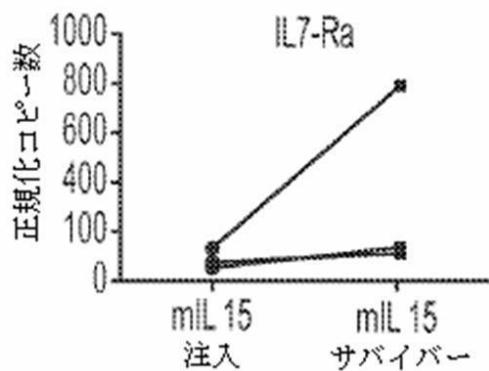
【図37】



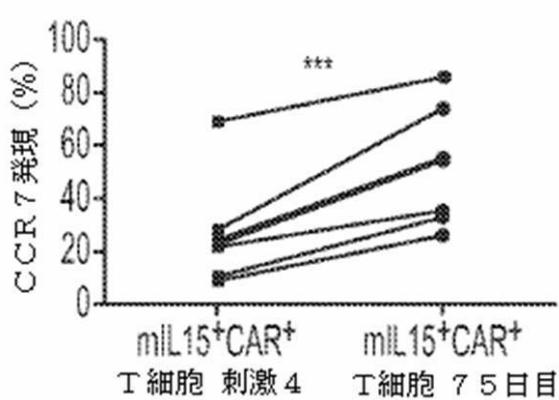
【図38A】



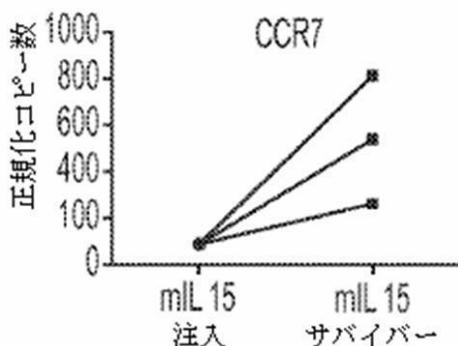
【図38C】



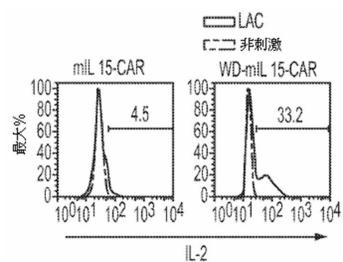
【図38B】



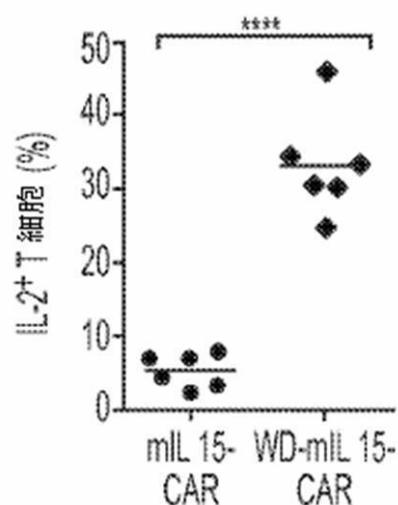
【図38D】



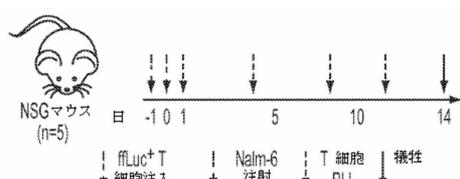
【図 3 9 A】



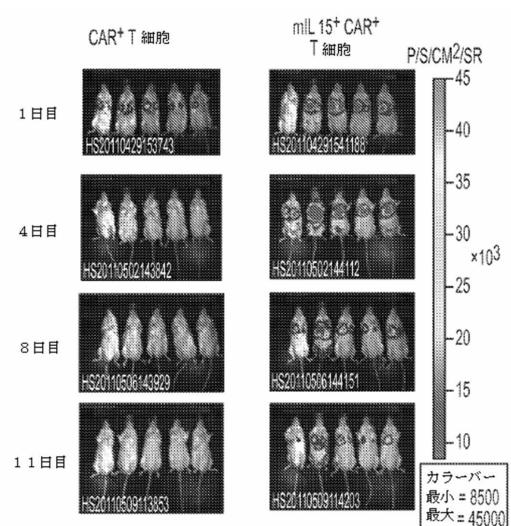
【図 3 9 B】



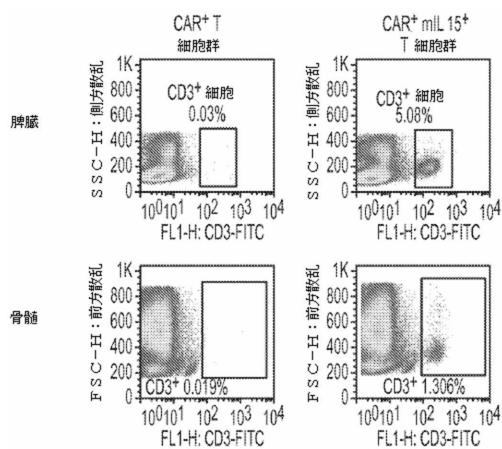
【図 4 0 A】



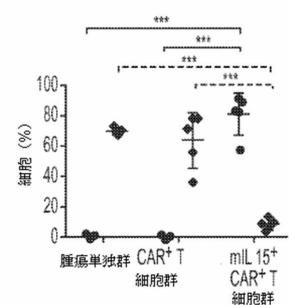
【図 4 0 B】



【図 4 0 C】



【図 4 0 D】

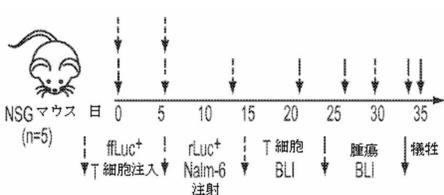


\*\*\* P<0.001, 1元配置 ANOVA

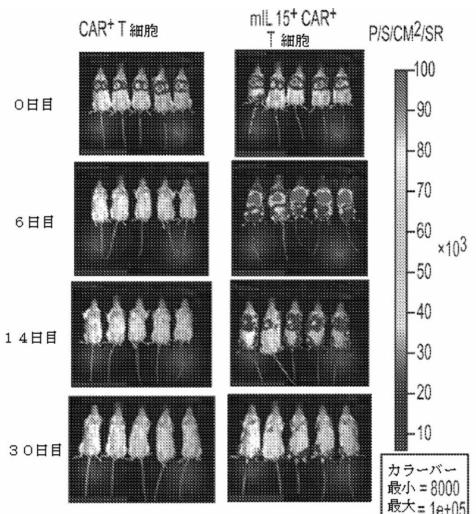
● CD3+ 細胞

◆ CD19+ 細胞

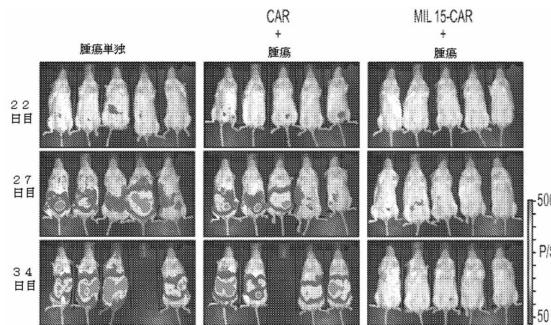
【図 4 1 A】



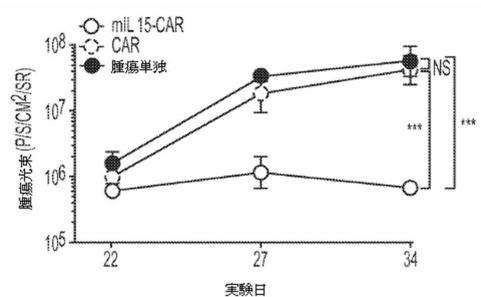
【図 4 1 B】



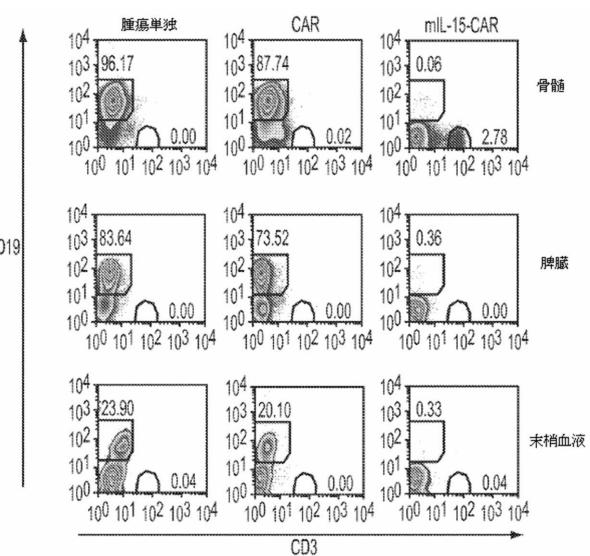
【図 4 1 C】



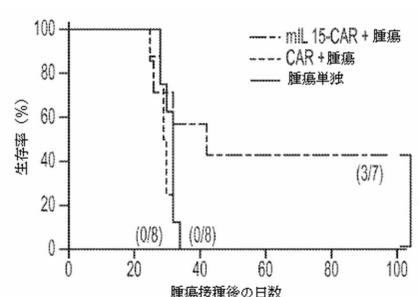
【図 4 1 D】



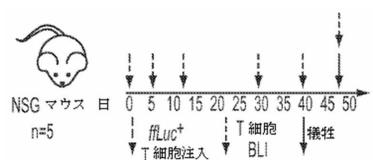
【図 4 1 E】



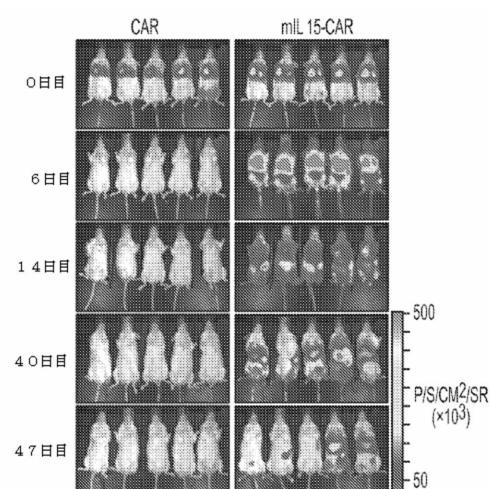
【図 4 1 F】



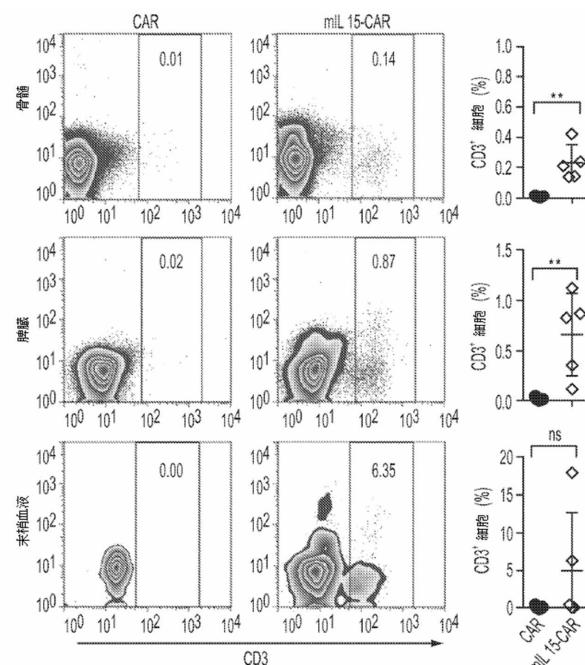
【図 4 2 A】



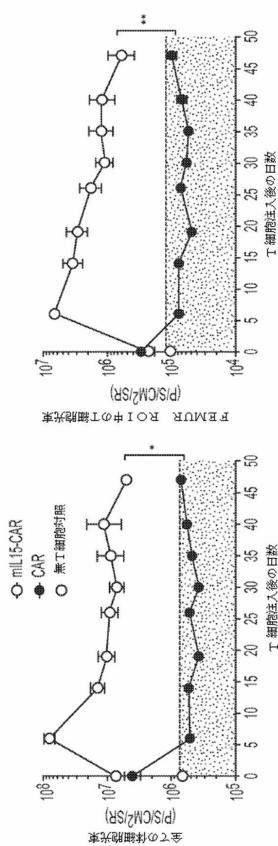
【図 4 2 B】



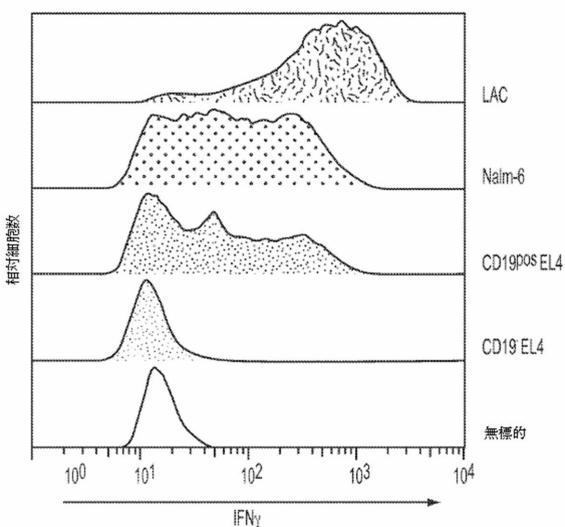
【図 4 2 C】



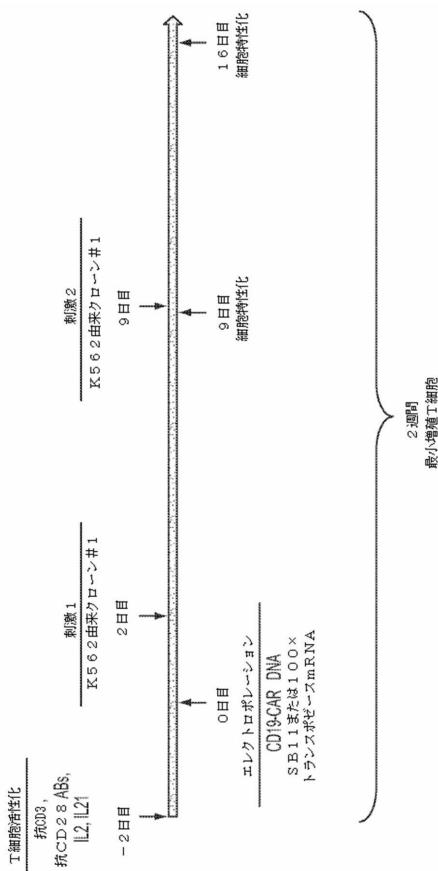
【図42D】



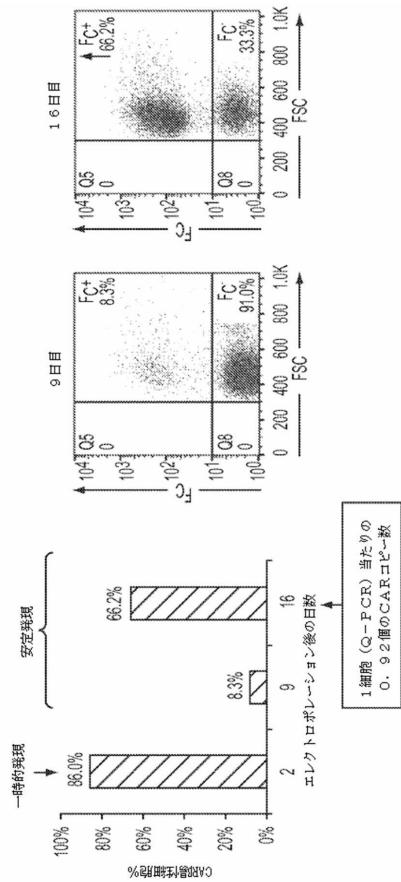
【図42E】



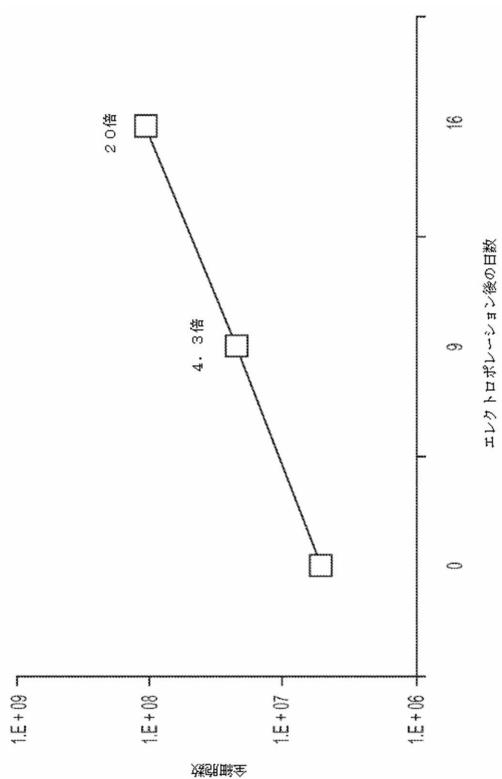
【図43】



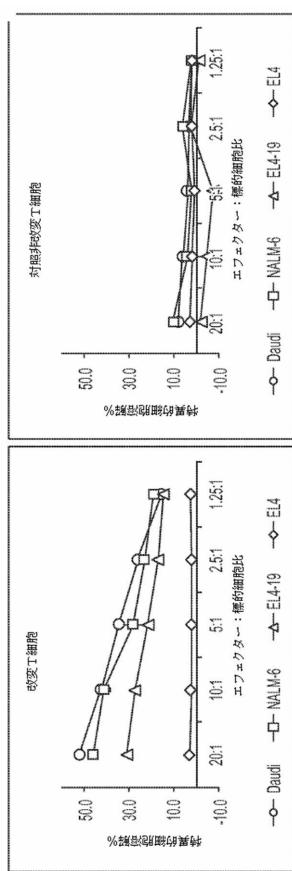
【図44A】



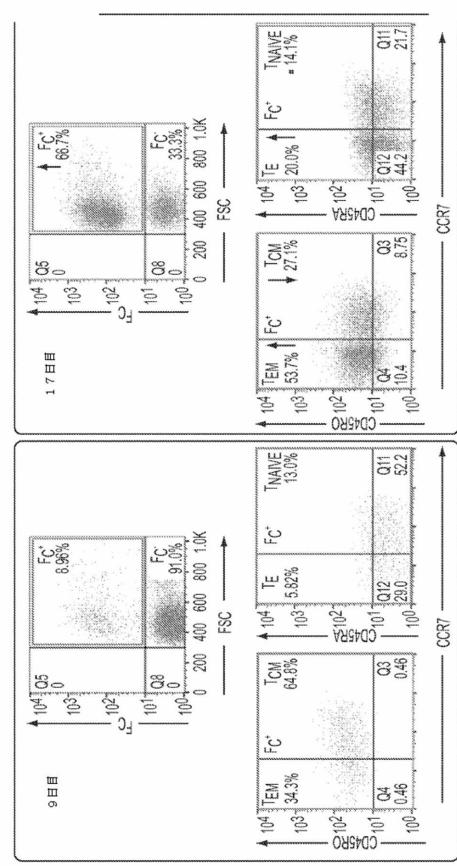
【図44B】



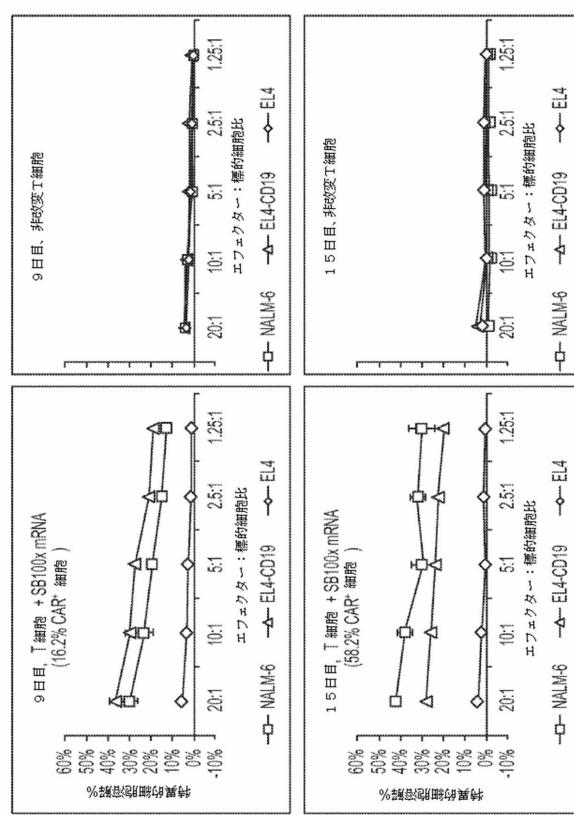
【図44C】



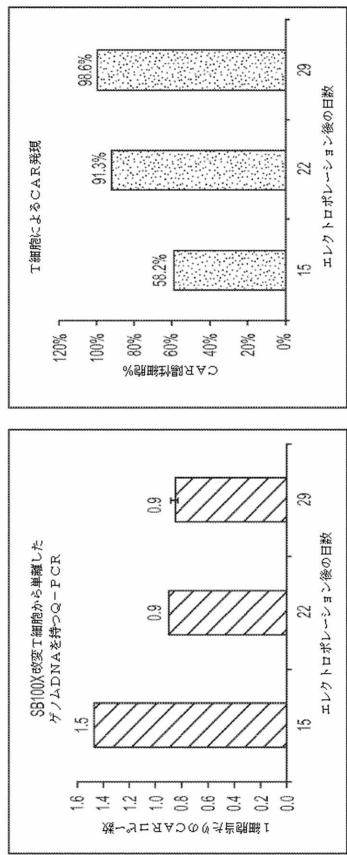
【図44D】



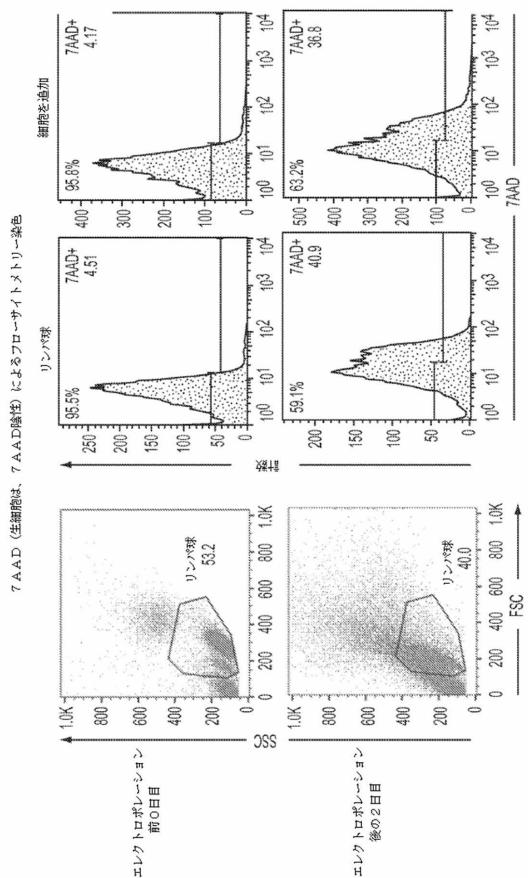
【図45A】



【図 4 5 B】



【図 4 6】



【配列表】

[0006463577000001.app](http://0006463577000001.app)

## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
- |                         |               |
|-------------------------|---------------|
| A 6 1 P 37/06 (2006.01) | A 6 1 P 37/06 |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |
| A 6 1 P 31/00 (2006.01) | A 6 1 P 31/00 |
| A 6 1 K 35/12 (2015.01) | A 6 1 K 35/12 |
- (72)発明者 鳥飼 宏基  
アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515  
, ユニット 907
- (72)発明者 ザン, リン  
アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515  
, ユニット 907
- (72)発明者 ハルズ, ヘレン  
アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515  
, ユニット 907
- (72)発明者 ワン - ヨハンニング, フェン  
アメリカ合衆国 テキサス 78602, バストロップ, クール ウォーター ドライブ 6  
50
- (72)発明者 ハートン, レンカ  
アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515  
, ユニット 907
- (72)発明者 オリバレス, サイモン  
アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515  
, ユニット 907
- (72)発明者 クリシュナマーシー, ジャナニ  
アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515  
, ユニット 907

審査官 上村 直子

- (56)参考文献 特表2010-531878 (JP, A)  
European Journal of Immunology, 2009年, Vol.39, p.491-506  
The Journal of Biological Chemistry, 2006年, Vol.281, No.3, p.1612-1619  
Cancer Research, 2008年, Vol.68, No.8, p.2961-2971

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- |   |
|---|
| C 12 N 15 / 00  |
| C 07 K 19 / 00  |
| J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I ) |
| C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )     |
| G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q                     |
| U n i P r o t / G e n e S e q   |
| W P I D S / W P I X ( S T N )   |