

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-517263

(P2020-517263A)

(43) 公表日 令和2年6月18日 (2020.6.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 5 0
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-556956 (P2019-556956)
 (86) (22) 出願日 平成30年4月19日 (2018. 4. 19)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年11月26日 (2019. 11. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/028427
 (87) 国際公開番号 W02018/195348
 (87) 国際公開日 平成30年10月25日 (2018. 10. 25)
 (31) 優先権主張番号 62/487, 358
 (32) 優先日 平成29年4月19日 (2017. 4. 19)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 508230226
 ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス サウス オリーブ ストリート
 1 1 5 0 スイート 2 3 0 0
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんを治療するための組成物及び方法

(57) 【要約】

本明細書には、キメラ抗原受容体 (CAR) 及びチェックポイント阻害剤をコードする核酸を含む遺伝子改変された組成物、及びがんを治療するための組成物の使用方法が記載されている。

【選択図】 図 4 D

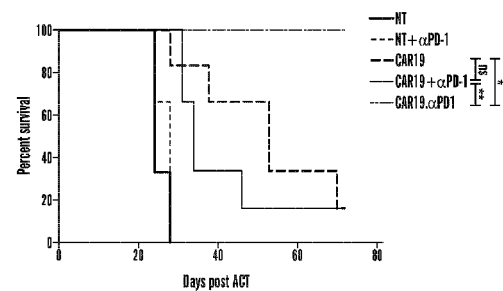


FIG. 4D

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体 (CAR) 及びチェックポイント阻害剤 (CPI) をコードする核酸、または CAR 及び CPI をコードする複数の核酸を含む、細胞。

【請求項 2】

前記 CAR が、分化クラスター (CD) 19、CD 22、CD 23、骨髓増殖性白血病タンパク質 (MPL)、CD 30、CD 32、CD 20、CD 70、CD 79b、CD 99、CD 123、CD 138、CD 179b、CD 200R、CD 276、CD 324、Fc 受容体様 5 (FcRH5)、CD 171、CS-1 (シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリー 7、SLAMF7)、C 型レクチン様分子 1 (CLL-1)、CD 33、カドヘリン 1、カドヘリン 6、カドヘリン 16、カドヘリン 17、カドヘリン 19、上皮成長因子受容体変異体 III (EGFRviii)、ガングリオシド GD2、ガングリオシド GD3、ヒト白血球抗原 A2 (HLA-A2)、B 細胞成熟抗原 (BCMA)、Tn 抗原、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、オーファン受容体 1 のような受容体チロシンキナーゼ (ROR1)、FMS 様チロシンキナーゼ 3 (FLT3)、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、腫瘍関連糖タンパク質 (TAG) - 72、CD 38、CD 44v6、がん胎児性抗原 (CEA)、上皮細胞接着分子 (EPCAM)、B7-H3 (CD 276)、KIT、インターロイキン - 13 受容体サブユニットアルファ - 2 (IL-13Ra2)、インターロイキン - 11 受容体サブユニットアルファ (IL11Ra)、メソセリン、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、血管上皮成長因子受容体 2 (VEGFR2)、ルイス Y、CD 24、血小板由来成長因子受容体ベータ (PDGFR-ベータ)、プロテアーゼセリン 21 (PRSS21)、シアリル糖脂質段階特異的胚抗原 4 (SSEA-4)、CD 20、免疫グロブリンの Fc 領域、組織因子、葉酸受容体アルファ、上皮成長因子受容体 2 (ERBB2)、ムチン 1 (MUC1)、上皮成長因子受容体 (EGFR)、神経小付着分子 (NCAM)、プロスターゼ、前立腺酸性ホスファターゼ (PAP)、伸長因子 2 変異 (ELF2M)、エフリン B2、インスリン様成長因子 I 受容体 (IGF-I 受容体)、炭酸脱水酵素 IX (CAIX)、潜伏膜タンパク質 2 (LMP2)、メラニン細胞タンパク質 gp100、bcr-abl、チロシナーゼ、エリスロポエチン産生肝細胞がん A2 (EphA2)、フコシル化モノシアロガングリオシド (フコシル GM1)、シアリルルイス a (sLea)、ガングリオシド GM3、トランスグルタミナーゼ 5 (TGS5)、高分子量メラノーマ関連抗原 (HMWMAA)、o-アセチル-GD2 ガングリオシド、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD 248、腫瘍内皮マーカー 7 関連 (TEM7R)、クローディン 6 (CLDN6)、甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR)、T 細胞受容体 (TCR) - ベータ 1 定常鎖、TCR ベータ 2 定常鎖、TCR ガンマ - デルタ、G タンパク質共役受容体クラス C グループ 5 メンバー D (GPRC5D)、CXORF61 タンパク質、CD 97、CD 179a、未分化リンパ腫キナーゼ (ALK)、ポリシアル酸、胎盤特異的 1 (PLAC1)、炭水化物抗原 GloboH、乳房分化抗原 NY-BR-1、ウロプラキン - 2 (UPK2)、A 型肝炎ウイルス細胞受容体 1 (HAVCR1)、アドレナリン受容体ベータ 3 (ADRB3)、パネキシン 3 (PANX3)、G タンパク質共役受容体 20 (GPR20)、リンパ球抗原 6 ファミリーメンバー K (LY6K)、嗅覚受容体ファミリー 51 サブファミリー E メンバー 2 (OR51E2)、T 細胞受容体鎖代替リーディングフレームタンパク質 (TARP)、ウィルムス腫瘍抗原 1 タンパク質 (WT1)、がん精巣抗原 NY-ESO-1、がん精巣抗原 LAGE-1a、レグマイン、ヒトパピローマウイルス (HPV) E6、HPV E7、ヒト T リンパ球向性ウイルス (HTLV1) - Tax、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス糖タンパク質 (KSHV) K8.1 タンパク質、エプスタイン - バーウイルス (EBV) にコードされた糖タンパク質 350 (EBB gp350)、HIV1 - エンベロープ糖タンパク質 gp120、マルチプレックス自動ゲノムエンジニアリング (MAGE) - A1、転座 - Ets - 白血病ウイルス (ETV) タンパク質 6 - AML、精子タンパク質 17、X 抗原ファミリーメンバー (XAGE) 1、膜貫通型チロシントタンパク質キナーゼ受容体 Tie2、黒色腫がん

10

20

30

40

50

精巢抗原 M A D - C T - 1、黒色腫がん精巢抗原 M A D - C T - 2、F o s 関連抗原 1、p 5 3、p 5 3 変異体、プロスタイン、サバイピン及びテロメラゼ、前立腺がん腫瘍抗原 - 1 (P C T A - 1) / ガレクチン 8、メラニン A / M A R T 1、R a s 変異体、ヒトテロメラゼ逆転写酵素 (h T E R T)、デルタ様 3 (D L L 3)、トロホブラスト細胞表面抗原 2 (T R O P 2)、タンパク質チロシンキナーゼ - 7 (P T K 7)、グアニル酸シクラゼ C (G C C)、アルファフェトプロテイン (A F P)、肉腫転座ブレークポイント、メラノーマ - アポトーシス阻害剤 (M L - I A P)、E R G (T M P R S S 2 E T S 融合遺伝子)、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (N A 1 7)、ペアボックスタンパク質 P a x - 3 (P A X 3)、アンドロゲン受容体、サイクリン B 1、v - m y c 鳥類骨髄細胞腫ウイルスがん遺伝子神経芽細胞腫由来ホモログ (M Y C N)、R a s ホモログファミリーメンバー C (R h o C)、チロシナーゼ関連タンパク質 2 (T R P - 2)、チトクローム P 4 5 0 1 B 1 (C Y P 1 B 1)、C C C T C 結合因子 (亜鉛フィンガータンパク質) 様 (B O R I S またはブラザー・オブ・ザ・レギュレーター・オブ・インプリンテッド・サイト)、T 細胞 3 によって認識される扁平上皮がん抗原 (S A R T 3)、P A X 5、プロアクロシン結合タンパク質 s p 3 2 (O Y - T E S 1)、リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ (L C K)、キナーゼアンカータンパク質 4 (A K A P - 4)、滑膜肉腫、X ブレークポイント 2 (S S X 2)、高度糖化最終産物受容体 (R A G E - 1)、腎臓 1 (R U 1)、R U 2、腸内カルボキシエステラーゼ、熱ショックタンパク質 7 0 - 2 変異体 (m u t h s p 7 0 - 2)、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 7 2、白血球関連免疫グロブリン様受容体 1 (L A I R 1)、I g A 受容体の F c フラグメント (F C A R)、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリー A メンバー 2 (L I L R A 2)、C D 3 0 0 分子様ファミリーメンバー f (C D 3 0 0 L F)、C 型レクチンドメインファミリー 1 2 メンバー A (C L E C 1 2 A)、骨髄間質細胞抗原 2 (B S T 2)、E G F 様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様 2 (E M R 2)、リンパ球抗原 7 5 (L Y 7 5)、グリピカン 3 (G P C 3)、F c 受容体様 5 (F C R L 5)、免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド 1 (I G L L 1)、F I T C、黄体形成ホルモン受容体 (L H R)、卵巣刺激ホルモン受容体 (F S H R)、絨毛性ゴナドトロピンホルモン受容体 (C G H R)、C C ケモカイン受容体 4 (C C R 4)、ガングリオシド G D 3、シグナリングリンパ球活性化分子 (S L A M) ファミリーメンバー 6 (S L A M F 6)、S L A M F 4、黄体形成ホルモン受容体 (L H R)、卵巣刺激ホルモン受容体 (F S H R)、絨毛性ゴナドトロピンホルモン受容体 (C G H R)、またはそれらの組み合わせを標的とする、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

前記チェックポイント阻害剤が P D - 1 を標的とする、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 4】

前記チェックポイント阻害剤が抗 P D - 1 s c F v である、請求項 4 に記載の細胞。

【請求項 5】

前記チェックポイント阻害剤が、P D - 1、L A G - 3、T I M 3、B 7 - H 1、C D 1 6 0、P 1 H、2 B 4、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3、C E A C A M - 5、T I G I T、C T L A - 4、B T L A、及び L A I R 1 のいずれか 1 つ以上を標的とする、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 6】

前記細胞が T リンパ球細胞 (T 細胞) である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 7】

前記細胞がナチュラルキラー (N K) 細胞である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 8】

前記 C P I が構成的に発現される、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 9】

前記抗 P D - 1 s c F v が構成的に発現される、請求項 5 に記載の細胞。

【請求項 10】

キメラ抗原受容体（CAR）をコードする第1のポリヌクレオチドと、チェックポイント阻害剤（CPI）をコードする第2のポリヌクレオチドとを含む、核酸。

【請求項11】

請求項10に記載の核酸によりコードされる、ポリペプチド。

【請求項12】

請求項10に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項13】

請求項1～9のいずれか一項に記載の細胞を含む、医薬組成物。

【請求項14】

それを必要とする対象に、治療有効量の、請求項1～9のいずれか一項に記載の細胞を投与することを含む、がんを治療する方法。

10

【請求項15】

前記がんが肺がんである、請求項15に記載の方法。

【請求項16】

治療有効量の、化学療法または放射線照射を含む既存の療法を前記対象に施すことをさらに含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記細胞及び前記既存の療法が連続的または同時に施される、請求項17に記載の方法

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願には、2017年4月19日に出願された米国仮特許出願第62/487,358号に対する米国特許法第35条§119(e)に基づく優先権の主張が含まれ、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究または開発に関する声明

本発明は、国立衛生研究所により授与された助成金番号A1068978及びEB017206の下での政府支援によりなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

30

【0003】

技術分野

本明細書には、キメラ抗原受容体（CAR）及びチェックポイント阻害剤（CPI）を含むT細胞を含む組成物、ならびにがんを治療するために組成物を使用する方法が記載されている。

【背景技術】

【0004】

背景

本明細書のすべての刊行物は、各個々の刊行物または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示された場合と同じ程度に参照により組み込まれる。以下の説明には、本発明を理解するのに有用な情報が含まれる。本明細書で提供される情報のいずれかが先行技術であるか、または現在請求されている発明に関連すること、または具体的または暗黙的に参照される刊行物が先行技術であることを認めるものではない。

40

【0005】

がんの免疫療法の様式としての養子細胞移植（ACT）は、血液悪性腫瘍及び悪性黒色腫の治療において顕著な成功を実証している。キメラ抗原受容体（CAR）を発現する遺伝子改変T細胞を用いて、CD19やGD2などの腫瘍関連抗原（TAA）を特異的に標的とするACTの特に効果的な形態は、B細胞悪性腫瘍や神経芽細胞腫などの疾患を治療するための臨床試験で有望な結果が示されている。

【0006】

50

天然の T 細胞受容体 (T C R) とは異なり、 C A R は、細胞内 T 細胞シグナル伝達及び共刺激ドメインと融合した細胞外抗原認識ドメインからなる人工受容体である。 C A R は、主要組織適合性クラス (M H C) に依存しない方法で、細胞表面の T A A を直接的及び選択的に認識できる。血液悪性腫瘍患者における C A R T 細胞療法の成功が実証されているにもかかわらず、固形腫瘍ではわずかな反応のみが観察されている。これは、一部には、固形腫瘍における免疫抑制性微小環境の確立に起因し得る。このような環境には、腫瘍内の同族リガンドと反応する T 細胞の抑制性受容体 (I R) の発現の増加によって媒介される多くの内因性抑制経路のアップレギュレーションが含まれる。

【 0 0 0 7 】

これまでに、 C T L A - 4 、 T 細胞免疫グロブリンムチン 3 (T I M - 3) 、リンパ球活性化遺伝子 3 (L A G - 3) 、及びプログラム死 - 1 (P D - 1) などのいくつかの I R が T 細胞において特徴付けられてきた。これらの分子は、慢性疾患及びがんにおける T 細胞の持続的活性化に続いてアップレギュレートされ、T 細胞の機能不全と消耗を促進し、免疫監視から腫瘍を逃す。他の I R とは異なり、 P D - 1 は T 細胞活性化の直後にアップレギュレートされ、その 2 つのリガンド P D - L 1 または P D - L 2 との相互作用を介して T 細胞エフェクター機能を発揮する。 P D - L 1 は、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞 (D C) に恒常的に発現している。 P D - L 1 は、様々な固形腫瘍で豊富に発現することも示されている。対照的に、正常組織における P D - L 1 の発現は検出できない。免疫抑制におけるその重要な役割の結果として、 P D - 1 は T 細胞に対するその負の効果を中和し、抗腫瘍応答を強化することを目指して、最近の研究の焦点となっている。臨床研究により、 P D - 1 の遮断は、結腸、腎臓、肺のがん及び黒色腫の腫瘍退縮を有意に増強することが実証されている。

【 0 0 0 8 】

従って、本発明の目的は、 C A R T 細胞の腫瘍誘発性機能低下を調節し、阻害性受容体を逆転または阻害し得る組成物を提供することである。

【 0 0 0 9 】

本発明の別の目的は、 C A R T 細胞の腫瘍誘発性機能低下を調節または回避する組成物を作製及び使用するプロセスを提供することである。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 0 】

概要

以下の実施形態及びその態様は、範囲を限定するものではなく、模範的かつ例示的であることを意味するシステム、組成物、及び方法と併せて説明及び図示される。

【 0 0 1 1 】

キメラ抗原受容体 (C A R) 及びチェックポイント阻害剤 (C P I) の両方をコードする核酸を含む、または C A R をコードする核酸及び C P I をコードする核酸を含む細胞が提供される。様々な実施形態において、チェックポイント阻害剤を分泌する C A R - T 細胞が提供される。

【 0 0 1 2 】

種々の実施形態において、 P D - 1 を標的とするチェックポイント阻害剤 (C P I) を分泌する C A R - T 細胞 (C A R . P D 1 - T 細胞として示される) が提供され、ヒト肺がん異種移植マウスモデルにおけるそれらの有効性が示される。血液悪性腫瘍患者における、キメラ抗原受容体 (C A R) 操作 T 細胞療法の良好な反応にもかかわらず、結果は、部分的には免疫抑制性腫瘍微小環境の発達により、固形腫瘍の治療において満足のいくものではなかった。いくつかの態様では、 C A R T 細胞における P D - 1 シグナル伝達の阻害効果を克服するために、抗 P D - 1 抗体の単鎖可変断片 (s c F v) 型を継続的に産生する能力を備えた遺伝子操作された C A R T 細胞が使用される。腫瘍モデルでは、抗 P D - 1 s c F v の発現と分泌により、 P D - 1 とそのリガンドである P D - L 1 との結合が妨げられ、 C A R T 細胞の抑制と枯渇が防止される。 C D 1 9 腫瘍モデルでは、 C A R T 細胞による抗 P D - 1 s c F v の分泌により、確立された固形腫瘍の根絶

10

20

30

40

50

におけるCAR T細胞の能力が大幅に改善される。

【0013】

典型的には、CAR⁺PD1⁺T細胞は、抗原特異的刺激後のIFN- γ の産生及びT細胞増殖により測定されるエフェクター機能及び拡大能力を示す。異種移植マウスモデルを使用した場合のCAR⁺PD1⁺T細胞の抗腫瘍効果は、CAR-T細胞単独、または抗PD-1抗体と組み合わせたCAR-T細胞よりも優れている。CAR⁺PD1⁺T細胞の腫瘍根絶の強化は、腫瘍浸潤リンパ球の拡大と機能的能力によってさらにサポートされている。

【0014】

種々の実施形態において、CAR⁺PD1⁺T細胞は、PD-1に効率的に結合しT細胞機能に対するPD-1/PD-L1相互作用の阻害効果を逆転させるヒト抗PD-1CPIを分泌する。継続的に分泌される抗PD-1によるPD-1の遮断は、T細胞の枯渇を防ぎ、*in vitro*及び*in vivo*の両方でT細胞の拡大とエフェクター機能を大幅に強化する。異種移植マウスモデルでは、抗PD-1の分泌によりCAR-T細胞の抗腫瘍活性が増強され、全体的な生存期間が延長される。構成的な抗PD-1分泌により、CAR⁺PD1⁺T細胞は、親のCAR-T細胞よりも消耗が少なく、機能的で拡張性が高く、腫瘍根絶においてより効率的である。

【0015】

CAR及びCPIをコードする核酸を含む細胞を、それを必要とする対象に投与して、抗腫瘍免疫を増強し、及び/またはがんを治療する(特に固形腫瘍を減らす)プロセスが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

例示的な実施形態は、参照図に示されている。本明細書で開示される実施形態及び図は、限定的ではなく例示的であると見なされることを意図している。

【0017】

【図1】1A~1Eは、CAR19及びCAR19⁺PD1の構築及び特徴付けを示す。1Aは、親の抗CD19CAR(CAR19)及び抗PD-1分泌抗CD19CAR(CAR19⁺PD1)構築物の模式図を示す。1Bは、ヒトT細胞における両方のCARの発現を示す。CAR⁺T細胞の2つの群をビオチン化プロテインLで染色し、続いてFITC結合ストレプトアビジンで染色して、細胞表面のCAR発現を検出した。実行可能なCD3⁺リンパ球ゲーティング戦略が使用された。NTは、対照として使用された非形質導入T細胞を示す。1C及び1Dは、ウエスタンブロット(1C)及びELISA(1D)で解析したCAR19またはCAR19⁺PD1T細胞培養液のいずれかの上清における分泌型抗PD-1抗体の発現を示す。1Eは、指定された処理による総CD8⁺T細胞に対するIFN- γ を産生するCD8⁺T細胞の割合を示す(n=4、平均値 \pm SEM; **P<0.01)。

【図2】2A~2Dは、抗PD-1の発現がCAR⁺T細胞の抗原特異的免疫応答を増強したことを示す。2Aは、CAR19とCAR19⁺PD1T細胞の両方を、異なる期間H292-CD19細胞と共培養したことを示す。IFN- γ 産生は、ELISAで測定した(n=5、平均値 \pm SEM; ns、有意ではない、P>0.05; *P<0.05)。2Bは、標的細胞に対する両方のCARの細胞毒性を示す。CAR⁺T細胞の2つの群を、H292-CD19細胞と1:1、5:1、10:1、及び20:1のエフェクター対標的比で6時間共培養し、H292-CD19に対する細胞毒性を測定した。非形質導入(NT)T細胞を対照として使用した。2Cは、抗原特異的刺激後の両方のCARの増殖を示す。CAR⁺T細胞の2つの群はCFSEで事前染色された。次いで、染色されたT細胞を1対1のエフェクター対標的比でH292-CD19細胞と96時間共培養し、CFSEの強度を測定した。非形質導入(NT)T細胞を対照として使用した。2Dは、2Cに対応する非形質導入(NT)T細胞、CAR19⁺T細胞、及びCAR19⁺PD1⁺T細胞の増殖率の棒グラフで要約された統計を示す(n=4、平均 \pm SEM;

10

20

30

40

50

* $P < 0.05$)。

【図3】3A～3Fは、抗PD-1 s c F vを分泌することにより、CAR T細胞が使い果たされないように保護することを示す。CAR19及びCAR19・PD1 T細胞の両方をH292-CD19細胞と24時間共培養した。3Aは、フローサイトメトリーにより測定されたPD-1の発現を示す。CD8⁺T細胞が各パネルに示された。PD-1を発現するCD8⁺T細胞をゲーティングし、各散布図で総CD8⁺T細胞に対する割合を示した。3Bは、3連の要約した統計を棒グラフで示す ($n = 3$ 、平均値 \pm SEM、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$)。3Cは、フローサイトメトリーにより測定されたLAG-3の発現を示す。総CD8⁺T細胞に対するLAG-3発現CD8⁺T細胞の割合を棒グラフで示した ($n = 3$ 、平均値 \pm SEM; ns、有意ではない、 $P > 0.05$; ** $P < 0.01$)。3Dは、フローサイトメトリーで測定したTIM-3の発現を示す。合計CD8⁺T細胞に対するTIM-3発現CD8⁺T細胞の割合を棒グラフで示した ($n = 3$ 、平均値 \pm SEM; ns、有意ではない、 $P > 0.05$)。3E及び3Fは、CAR19及びCAR19・PD1 T細胞の両方がH292-CD19またはSKOV3-CD19細胞のいずれかと24時間共培養されたことを示す。PD-L1発現は、フローサイトメトリーにより測定された。総CD8⁺T細胞に対するPD-L1発現CD8⁺T細胞の割合 (3E) 及び総CD4⁺T細胞に対するPD-L1発現CD4⁺T細胞の割合 (3F) を棒グラフで示した ($n = 3$ 、平均値 \pm 標準誤差; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

10

【図4】4A～4Dは、抗PD-1 s c F vを分泌するCAR T細胞の養子移入が、確立された腫瘍の成長阻害を増強したことを示す。4Aは、腫瘍負荷、T細胞養子移入及び抗体治療の実験手順の概略図を示す。NSGマウスには、 3×10^6 のH292-CD19腫瘍細胞をs.c.で負荷した。20日目に、腫瘍が約 100 mm^3 に成長すると、 1×10^6 個のCAR19またはCAR19・PD1 T細胞がi.v.注入を通じて養子移入された。T細胞注入の1日後、抗PD-L1抗体治療が開始され、指定された日に治療が継続された。腫瘍体積は1日おきに測定された。4Bは、非形質導入 (NT)、NTプラス抗PD-1注射、CAR19、CAR19プラス抗PD-1注射、またはCAR19・PD1で処置したマウスの腫瘍成長曲線を示す。データは、示された時点での平均腫瘍体積 \pm 平均の標準誤差 (SEM) として提示された ($n = 8$; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)。4Cは、様々な治療群の治療後17日目の腫瘍縮小のウォーターフォールプロット解析を示す。4Dは、指示された治療後のH292-CD19腫瘍を有するNSGマウスの生存を示す。カプラン・マイヤー法を用いて全生存曲線をプロットし、ログランク (マンテルコックス) テストを用いて比較した ($n = 6$; ns、有意ではない、 $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

20

30

【図5】5A～5Cは、抗PD-1を分泌するCAR T細胞が、in vivoで親のCAR T細胞よりも効率的に増殖したことを示す。非形質導入 (NT)、CAR19、またはCAR19・PD1 T細胞を養子移入したH292-CD19腫瘍保有マウスの腫瘍、血液、脾臓、及び骨髄におけるヒトCD45⁺T細胞の割合を治療後2日目 (5A) または10日目 (5B) にフローサイトメトリーで調査した ($n = 3$ 、平均値 \pm SEM; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)。5Cは、異なる群の腫瘍、血液、脾臓、及び骨髄におけるヒトCD45⁺T細胞の割合の代表的なFACS散布図を示す。

40

【図6】6A～6Gは、抗PD-1を分泌するCAR T細胞が、局所腫瘍部位で親のCAR T細胞よりも機能的であることを示す。6Aは、腫瘍負荷、T細胞養子移入及び抗体治療の実験手順の概略図を示す。NSGマウスには、 3×10^6 のH292-CD19腫瘍細胞をs.c.で負荷した。20日目に、 3×10^6 のCAR19またはCAR19・PD1 T細胞がi.v.注入を通じて養子移入された。T細胞養子移植の1日後、抗PD-1抗体治療が開始され、治療は指定された日数継続された。次いで、解析のために8日目にマウスを安楽死させた。6Bは、フローサイトメトリーによって特徴付けられる、CAR19またはCAR19・PD1 T細胞で養子移入された、または抗PD-1抗体の注射とともにCAR19 T細胞で処理されたH292-CD19腫瘍保有マウ

50

スの腫瘍、血液、脾臓及び骨髓におけるヒトCD45⁺T細胞の割合を示す。6Cは、腫瘍におけるCD8⁺TILとCD4⁺TILの比率を示す(n=3、平均値±SEM; ns、有意ではない、P>0.05; *P<0.05; ***P<0.001)。6Dは、総CD8⁺TILに対するPD-1発現CD8⁺TILの割合を示す(n=3、平均値±SEM; *P<0.05)。TILを回収し、抗CD3/抗CD28抗体(6E)または標的細胞H292-CD19(6F)のいずれかによりex vivoで6時間刺激した。細胞内IFN- γ を発現している腫瘍内のCAR⁺T細胞の割合をフローサイトメトリーで調べた(n=3、平均±SEM; *P<0.05; **P<0.01)。6Gは、ELISAを用いて評価された血清中の分泌された抗PD-1 scFvと注射された抗PD-1抗体を示す(n=3、平均±SEM; **P<0.01; ***P<0.001)。

【図7】7Aは、ブレフェルジンAを含むまたは含まない24時間培養後のCAR19⁺PD1⁺T細胞(1×10^6)からの抗PD-1 scFvの産生を示す。7Bは、CAR19⁺PD1⁺T細胞の増殖過程における抗PD-1 scFvの発現を示す。分泌されたscFvの濃度は、4、7、10及び12日目を含む、T細胞形質導入後の4つの異なる時点で測定された。T細胞の増殖中、細胞密度は1mLあたり2~4×10⁶個程度維持された。7Cは、ヒトT細胞を抗CD3/CD28ビーズで48時間活性化し、10ng/mLのヒトIL-2を添加したT細胞培地で2週間培養したことを示す。次いで、活性化されたT細胞を、アイソタイプ対照抗体または抗PD-1抗体で染色した。7Dは、活性化されたヒトT細胞が1mLのCAR19⁺PD1⁺T細胞培養上清と30分間インキュベートされたことを示す。T細胞をPBSで1回洗浄した後、抗HA抗体で染色した。

【図8】フローサイトメトリーにより決定されたH292-CD19及びSKOV3-CD19上のPD-L1の発現を示す。

【図9】9Aは、CAR19及びCAR19⁺PD1⁺T細胞の両方が異なる期間にわたってSKOV3-CD19細胞と共培養されたことを示す。IFN- γ 産生はELISAで測定した(n=5、平均値±SEM; ns、有意ではない、P>0.05; *P<0.05)。9Bは、抗PD-1(0.6μg/mL)を含むまたは含まないCAR19⁺T細胞を示し、CAR19⁺PD1⁺T細胞は、H292-CD19細胞と24時間または72時間共培養された。IFN- γ 産生はELISAで測定した(n=4、平均±SEM; ns、有意ではない、P>0.05; ***P<0.001)。

【図10】3日間の抗原特異的刺激による非形質導入(NT)、CAR19及びCAR19⁺PD1⁺T細胞の集団倍加を示す(n=3、平均±SEM; **P<0.01)。

【図11】11Aは、PD-1検出抗体の結合に対する抗PD-1 scFvの遮断活性を示す。ヒトT細胞を抗CD3/CD28ビーズで48時間活性化し、次いで、10ng/mLのヒトIL-2を補充したTCMで2週間培養した。次いで、活性化されたT細胞を1mLのCAR19⁺PD1⁺T細胞培養上清または対照培地とともに30分間インキュベートした。T細胞をPBSで1回洗浄した後、抗PD-1抗体で染色した。11Bは、24時間の抗原特異的刺激時のCAR19及びCAR19⁺PD1⁺T細胞上のPD-1の相対的転写発現を示す(n=3、平均±SEM、***P<0.001)。

【図12】12A及び12Bは、24時間の抗原特異的刺激後のCD8⁺PD-L1⁺T細胞(12A)ならびにCD8⁺LAG-3⁺及びCD8⁺TIM-3⁺T細胞(12B)の代表的なゲーティングスキーム及びプロットを示す。

【図13】13A-13Eは、CAR19及びCAR19⁺PD1⁺T細胞の両方がH292-CD19細胞と24時間共培養されたことを示す。PD-1(13A)、LAG-3(13B)、及びTIM-3(13C)の発現をフローサイトメトリーで測定した。総CD4⁺T細胞に対するPD-1⁺、LAG-3⁺またはTIM-3⁺発現CD4⁺T細胞の割合を棒グラフで示した(n=3、平均値±SEM、ns、有意ではない、P>0.05; **P<0.01)。T細胞の増殖過程のCAR19及びCAR19⁺PD1⁺T細胞の両方のPD-1(13D)及びLAG-3(13E)の発現(T活性化及び形

10

20

30

40

50

質導入後)。

【図14】14Aは、それらがマウスに養子移入される前の、CD8⁺T細胞とCD4⁺T細胞の比率を示す。14Bは、CAR19⁺PD1⁺T細胞で処理したマウスのCD8⁺T細胞とCD4⁺T細胞の比率を示す(n=3、平均±SEM、**P<0.01)。14Cは、血清中のIFN- γ の発現がELISAにより測定されたことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

詳細な説明

本明細書に引用されるすべての参考文献は、完全に記載されているかのように、その全体が参照により組み込まれる。別に定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。Allen et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22nd ed., Pharmaceutical Press (September 15, 2012); Hornyak et al., Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, CRC Press (2008); Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 7th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, Dictionary of DNA and Genome Technology 3rd ed., Wiley-Blackwell (November 28, 2012); 及びGreen and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012)は、本出願で使用される用語の多くに対する一般的なガイドを当業者に提供する。抗体の調製方法については、Greenfield, Antibodies A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Kohler and Milstein, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7):511-9; Queen and Selick, Humanized immunoglobulins, U. S. Patent No. 5,585,089 (1996 Dec); 及びRiechmann et al., Reshaping human antibodies for therapy, Nature 1988 Mar 24, 332(6162):323-7を参照されたい。

【0019】

当業者は、本明細書に記載されるものと類似または同等の多くの方法及び材料を認識し、それらは本発明の実施において使用され得る。本発明の他の特徴及び利点は、本発明の実施形態の様々な特徴を例として示す添付の図面と併せて、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。実際、本発明は、記載された方法及び材料に決して限定されない。便宜上、本明細書、実施例、及び添付の特許請求の範囲で使用される特定の用語は、ここに集められている。

【0020】

特に明記しない限り、または文脈から暗黙的である場合を除き、以下の用語及び語句は

10

20

30

40

50

、以下に提供される意味を含む。特に明記しない限り、または文脈から明らかでない限り、以下の用語及び語句は、その用語または語句が関連する技術分野で獲得した意味を排除しない。本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ制限されるため、定義は特定の実施形態の説明を支援するために提供され、特許請求される発明を限定することを意図するものではない。特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

【0021】

定義

本明細書で使用される場合、用語「含む (comprising)」または「含む (comprises)」は、実施形態に有用であるか有用でないかどうかにかかわらず、不特定の要素の包含に対して開かれている組成物、方法、及びそれぞれの構成要素（複数可）に関して使用される。一般に、本明細書で使用される用語は一般に「オープン」用語として意図されていることを当業者は理解するであろう（例えば、用語「含む (including)」は「含むが、これに限定されない」と解釈されるべきであり、用語「持っている」は「少なくとも持っている」と解釈されるべきであり、用語「含む (includes)」は「含むがこれに限定されない」などと解釈されるべきである。）。

【0022】

特に断りのない限り、出願の特定の実施形態を説明する文脈で（特に請求項の文脈で）使用される用語「1つの (a)」及び「1つの (an)」及び「その (the)」及び類似的の参照は、単数形と複数形の両方をカバーすると解釈され得る。本明細書における値の範囲の列挙は、その範囲内に入る個々の各値を個別に参照する速記方法として機能することのみを意図している。本明細書で特に明記しない限り、個々の値は、あたかも本明細書で個別に引用されているかのように明細書に組み込まれている。本明細書で説明されるすべての方法は、本明細書で特に指示がない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施され得る。本明細書の特定の実施形態に関して提供されるありとあらゆる例、または例示的な言葉（例えば、「など」）の使用は、単に本出願をより良く照らすことを意図しており、他に請求される本出願の範囲を限定するものではない。略語「e.g.」はラテン語の *exempli gratia* に由来し、非限定的な例を示すためにここで使用される。従って、略語「e.g.」は用語「例えば」と同義である。

【0023】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、量、持続時間などのような測定可能な値をいい、指定値から $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、または $\pm 0.1\%$ の変動が含まれる。

【0024】

本明細書で使用される「キメラ抗原受容体」または「CAR」または「CAR（複数可）」は、抗原特異性を細胞（例えば、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞またはそれらの組み合わせなどのT細胞）に移植する操作された受容体のことをいう。CARは、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としても知られている。種々の実施形態において、CARは、抗原特異的ドメイン (ASD)、ヒンジ領域 (HR)、膜貫通ドメイン (TMD)、共刺激ドメイン (CS D) 及び細胞内シグナル伝達ドメイン (IS D) を含む組換えポリペプチドである。

【0025】

「抗原特異的ドメイン」(ASD) は、標的細胞上の抗原に特異的に結合するCARの部分のことをいう。いくつかの実施形態において、CARのASDは、抗体またはその機能的等価物またはその断片またはその誘導体を含む。標的指向領域は、完全長重鎖、Fabフラグメント、単鎖Fv (scFv) フラグメント、二価の一本鎖抗体またはダイアボディを含んでもよく、これらはそれぞれ標的抗原に特異的である。いくつかの実施形態に

において、当業者に理解されるように、所定の抗原に高親和性で結合するほぼすべての分子を A S D として使用され得る。いくつかの実施形態において、A S D は T 細胞受容体 (T C R) またはその部分を含む。

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用される「ヒンジ領域」(H R) は、A S D と T M D との間にある親水性領域のことをいう。ヒンジ領域には、抗体またはそのフラグメントまたは誘導体の F c フラグメント、抗体またはそのフラグメントまたは誘導体のヒンジ領域、抗体の C H 2 領域、抗体の C H 3 領域、人工スパーサー配列またはその組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。ヒンジ領域の例には、C D 8 a ヒンジ、及び、例えば I g G の G 1 y 3 または C H 1 及び C H 3 ドメイン (ヒト I g G 4 など) ほど小さくてもよいポリペプチドで作られた人工スパーサーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域は、(i) I g G 4 のヒンジ、C H 2 及び C H 3 領域、(i i) I g G 4 のヒンジ領域、(i i i) I g G 4 のヒンジ及び C H 2、(i v) C D 8 a のヒンジ領域、(v) I g G 1 のヒンジ、C H 2 及び C H 3 領域、(v i) I g G 1 のヒンジ領域、または (v i i) I g G 1 のヒンジ及び C H 2 領域の 1 つ以上である。他のヒンジ領域は当業者には明らかであり、本発明の代替実施形態に関連して使用され得る。

10

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される「膜貫通ドメイン」(T M D) は、原形質膜を通過する C A R の領域のことをいう。本発明の C A R の膜貫通ドメインは、膜貫通タンパク質 (例えば、I 型膜貫通タンパク質)、人工疎水性配列またはそれらの組み合わせの膜貫通領域である。他の膜貫通ドメインは、当業者には明らかであり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。いくつかの実施形態において、C A R の T M D は、T 細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖の膜貫通ドメイン、C D 2 8、C D 3 イプシロン、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C D 1 5 4、K I R D S 2、O X 4 0、C D 2、C D 2 7、L F A - 1 (C D 1 1 a、C D 1 8)、I C O S (C D 2 7 8)、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、G I T R、C D 4 0、B A F F R、H V E M (L I G H T R)、S L A M F 7、N K p 8 0 (K L R F 1)、C D 1 6 0、C D 1 9、I L 2 R ベータ、I L 2 R ガンマ、I L 7 R a、I T G A 1、V L A 1、C D 4 9 a、I T G A 4、I A 4、C D 4 9 D、I T G A 6、V L A - 6、C D 4 9 f、I T G A D、C D 1 1 d、I T G A E、C D 1 0 3、I T G A L、C D 1 1 a、L F A - 1、I T G A M、C D 1 1 b、I T G A X、C D 1 1 c、I T G B 1、C D 2 9、I T G B 2、C D 1 8、L F A - 1、I T G B 7、T N F R 2、D N A M 1 (C D 2 2 6)、S L A M F 4 (C D 2 4 4、2 B 4)、C D 8 4、C D 9 6 (触覚)、C E A C A M 1、C R T A M、L y 9 (C D 2 2 9)、C D 1 6 0 (B Y 5 5)、P S G L 1、C D 1 0 0 (S E M A 4 D)、S L A M F 6 (N T B - A、L y 1 0 8)、S L A M (S L A M F 1、C D 1 5 0、I P O - 3)、B L A M E (S L A M F 8)、S E L P L G (C D 1 6 2)、L T B R、P A G / C b p、N K p 4 4、N K p 3 0、N K p 4 6、N K G 2 D、及び / または N K G 2 C から選択される膜貫通ドメインを含む。

20

30

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用される「共刺激ドメイン」(C S D) は、メモリー細胞の増殖、生存及び / または発生を増強する C A R の部分のことをいう。本発明の C A R は、1 つ以上の共刺激ドメインを含み得る。各共刺激ドメインは、例えば、T N F R スーパーファミリー、C D 2 8、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 1 3 4 (O X 4 0)、D a p 1 0、C D 2 7、C D 2、C D 5、I C A M - 1、L F A - 1 (C D 1 1 a / C D 1 8)、L c k、T N F R - I、T N F R - I I、F a s、C D 3 0、C D 4 0、またはそれらの組み合わせのいずれか 1 つ以上の共刺激ドメインを含む。他の共刺激ドメイン (例えば、他のタンパク質由来) は、当業者には明らかであり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

40

【 0 0 2 9 】

50

本明細書で使用する「細胞内シグナル伝達ドメイン」(ISD)または「細胞質ドメイン」は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞にその特殊な機能を実行するよう指示するCARの部分のことをいう。エフェクター機能シグナルを伝達するドメインの例には、T細胞受容体複合体の α 鎖またはそのホモログ、(例えば、h鎖、Fc ϵ R1 α 及びb鎖、MB1(Ig α)鎖、B29(Ig β)鎖など)、ヒトCD3ゼータ鎖、CD3ポリペプチド(D、d及びe)、sykファミリーチロシンキナーゼ(Syk、ZAP70など)、srcファミリーチロシンキナーゼ(Lck、Fyn、Lynなど)、及びCD2、CD5、CD28などのT細胞形質導入に関連する他の分子のいずれかが含まれるが、これらに限定されない。他の細胞内シグナル伝達ドメインは、当業者には明らかであり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

10

【0030】

本明細書で使用する「リンカー」(L)または「リンカードメイン」または「リンカー領域」は、長さ約1~100アミノ酸のオリゴまたはポリペプチド領域のことをいい、これは、本発明のCARのドメイン/領域のいずれかをリンクする。リンカーは、グリシンやセリンなどの柔軟な残基で構成されているため、隣接するタンパク質ドメインは互いに自由に移動できる。2つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないようにすることが望ましい場合は、より長いリンカーが使用され得る。リンカーは、切断可能または切断不能であり得る。切断可能なリンカーの例には、2Aリンカー(例えばT2A)、2A様リンカーまたはその機能的同等物、及びその組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態において、リンカーは、ピコルナウイルス2A様リンカー、プタテスコウイルスのCHYSEL配列(P2A)、テセアアシグナウイルス(T2A)、またはそれらの組み合わせ、バリエーション及び機能的等価物を含む。他の実施形態において、リンカー配列は、Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly^(2A)-Pro^(2B)(配列番号1)モチーフを含み、これにより、2Aグリシンと2Bプロリンとの間で切断される。他のリンカーは、当業者には明らかであり、本発明の代替実施形態に関連して使用され得る。

20

【0031】

本明細書で使用する「自己」細胞は、細胞が後に再投与されるのと同じ個体に由来する細胞のことをいう。

【0032】

本明細書で使用する「遺伝子改変細胞(genetically modified cells)」、「リダイレクト細胞」、「遺伝子操作細胞(engineered cells)」または「改変細胞」は、CAR及びチェックポイント阻害剤を発現する細胞のことをいう。いくつかの実施形態において、遺伝子改変細胞は、CARをコードするベクター及び1つ以上のチェックポイント阻害剤をコードするベクターを含み、2つのベクターは異なる。いくつかの実施形態において、遺伝子改変細胞は、CAR及び1つ以上のチェックポイント阻害剤をコードするベクターを含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変細胞は、CARをコードする第1のベクター及びチェックポイント阻害剤をコードする第2のベクターを含む。一実施形態において、遺伝子改変細胞は、Tリンパ球細胞(T細胞)である。一実施形態において、遺伝子改変細胞はナチュラルキラー(NK)細胞である。

30

40

【0033】

本明細書で使用する「免疫細胞」は、抗原提示細胞、B細胞、好塩基球、細胞傷害性T細胞、樹状細胞、好酸球、顆粒球、ヘルパーT細胞、白血球、リンパ球、マクロファージ、マスト細胞、メモリー細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、好中球、食細胞、形質細胞、及びT細胞を含むがこれらに限定されない哺乳動物免疫系の細胞のことをいう。

【0034】

本明細書で使用する「免疫エフェクター細胞」は、T細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞のことをいう。

【0035】

50

本明細書で使用される「免疫応答」は、自然免疫、体液性免疫、細胞性免疫、免疫、炎症反応、後天性（適応）免疫、自己免疫、及び／または過活動免疫を含むがこれらに限定されない免疫のことをいう。

【0036】

本明細書で使用される「CD4リンパ球」は、CD4を発現するリンパ球、すなわちCD4⁺であるリンパ球のことをいう。CD4リンパ球は、CD4を発現するT細胞であり得る。

【0037】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、インタクトな免疫グロブリン、または本明細書で「Fcフラグメント」または「Fcドメイン」というFc（結晶化可能断片）領域またはFc領域のFcRn結合断片を有するモノクローナルまたはポリクローナル抗原結合断片のことをいう。抗原結合フラグメントは、組換えDNA技術によって、またはインタクトな抗体の酵素的または化学的切断によって生成され得る。抗原結合フラグメントには、とりわけ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAb、及び相補性決定領域（CDR）フラグメント、単鎖抗体（scFv）、単ドメイン抗体、キメラ抗体、ダイアボディ、及びポリペプチドに特異的な抗原結合を付与するのに十分な免疫グロブリンの少なくとも一部を含むポリペプチドが含まれる。Fcドメインは、抗体の2つまたは3つのクラスに寄与する2つの重鎖の部分を含む。Fcドメインは、組換えDNA技術により、または酵素（例えばパパイン切断）により、またはインタクトな抗体の化学的切断により生成され得る。

【0038】

本明細書で使用される「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体の一部のみを含むタンパク質断片のことをいい、一般にインタクトな抗体の抗原結合部位を含み、従って抗原に結合する能力を保持する。本定義に含まれる抗体フラグメントの例には、以下が含まれる：(i) VL、CL、VH及びCH1ドメインを有するFabフラグメント、(ii) Fab'断片、CH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を有するFab断片、(iii) VH及びCH1ドメインを有するFdフラグメント、(iv) VH及びCH1ドメインと、CH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を有するFd'フラグメント、(v) 抗体の単アームのVL及びVHドメインを有するFvフラグメント、(vi) VHドメインからなるdAbフラグメント（Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)）、(vii) 分離されたCDR領域、(viii) F(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab'フラグメントを含む二価フラグメント、(ix) 単鎖抗体分子（例えば、単鎖Fv；scFv）（Bird et al., Science 242: 423-426 (1988)；and Huston et al., PNAS (USA) 85: 5879-5883 (1988)）、(x) 同じポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメイン（VL）に接続された重鎖可変ドメイン（VH）を含む2つの抗原結合部位を有する「ダイアボディ」（例えば、EP 404,097；WO 93/11161；and Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)）、(xi) 一対のタンデムFdセグメント（VH-CH1-VH-CH1）を含み、相補的な軽鎖ポリペプチドとともに、一対の抗原結合領域を形成する「直線状抗体」（Zapata et al. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)；及びU.S. Pat. No. 5,641,870）。

【0039】

本明細書で使用される「単鎖可変断片」、「単鎖抗体可変断片」または「scFv」抗体は、リンカーペプチドによって接続された重（V_H）鎖及び軽（V_L）鎖のみの可変領域を含む抗体の形態のことをいう。scFvは、単鎖ポリペプチドとして発現されることが可能である。scFvは、それが由来するインタクトな抗体の特異性を保持する。軽鎖及び重鎖は、標的抗原に対するscFvの特異性が保持される限り、例えばV_H-リンカ

10

20

30

40

50

ー - V_L または V_L - リンカー - V_H などの任意の順序であってよい。

【0040】

本明細書で使用される「治療薬」とは、例えば、治療、阻害、予防、効果の緩和、重症度の低減、発症の可能性の低減、進行の遅延、及び/または治療法、病気に使用される薬剤のことをいう。治療薬が対象とする疾患には、感染症、がん腫、肉腫、リンパ腫、白血病、胚細胞腫瘍、芽細胞腫、様々な免疫細胞に発現する抗原、及び様々な血液疾患に関連する細胞に発現する抗原、及び/または炎症性疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【0041】

「がん」及び「がん性」とは、典型的には無秩序な細胞増殖を特徴とする哺乳動物の生理学的状態のことをいうかまたは説明する。「がん」という用語は、組織病理学的タイプまたは侵襲性の段階に関係なく、すべてのタイプのがん性増殖または発がんプロセス、転移組織または悪性に形質転換された細胞、組織、または臓器を含むことを意味する。固形腫瘍の例には、肝臓、肺、乳房、リンパ系、胃腸（例えば、結腸）、泌尿生殖路（例えば、腎、尿路上皮細胞）、前立腺及び咽頭に影響を及ぼすものなど、様々な臓器系の悪性腫瘍、例えば、肉腫、腺がん、及びがん腫が含まれる。腺がんには、ほとんどの結腸がん、直腸がん、腎細胞がん、肝臓がん、肺の非小細胞がん、小腸がん、及び食道がんなどの悪性腫瘍が含まれる。一実施形態において、がんは黒色腫、例えば、進行期黒色腫である。前述のがんの転移性病変も、本発明の方法及び組成物を用いて治療または予防され得る。治療可能な他のがんの例には、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門部がん、胃がん、精巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟部組織の肉腫、尿道がん、陰茎がん、急性骨髄性白血病を含む慢性または急性白血病、慢性骨髄白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、小児固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎がん、中枢神経系（CNS）の新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮がん、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘発されるものを含む環境的に誘発されるがん、及びこれらのがんの組み合わせが含まれる。転移性がん、例えば、PD-L1を発現する転移性がん（Iwai et al., (2005) Int. Immunol., 17: 133-144）の治療は、本明細書に記載の抗体分子を用いて行われ得る。

【0042】

本明細書で使用される「単離された」という用語は、他の材料を実質的に含まない分子または生物学的材料または細胞材料のことをいう。一態様において、「単離された」という用語は、自然源に存在する、DNAまたはRNAなどの核酸、またはタンパク質またはポリペプチド（例えば、抗体またはその誘導体）、または他のDNAまたはRNAから分離された細胞または細胞小器官、または組織または臓器、またはタンパク質またはポリペプチド、または細胞または細胞小器官、または組織または臓器それぞれのことをいう。「単離された」という用語は、組換えDNA技術によって産生される場合、細胞材料、ウイルス材料、または培地を実質的に含まない核酸またはペプチド、または化学合成される場合、化学前駆体または他の化学物質のことをいう。さらに、「単離された核酸」は、断片として天然に存在せず、自然状態では見られない核酸断片を含むことを意味する。本明細書で使用される「単離された」という用語も、他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチドのことをいい、精製及び組換えポリペプチドの両方を包含することを意味する。本明細書で使用される「単離された」という用語も、他の細胞または組織から単離された細胞または組織のことをいい、培養及び操作された細胞または組織の両方を包含することを意味する。

【0043】

本明細書で使用される「裸のDNA」は、発現のための適切な方向で適切な発現ベクタ

ーにクローン化されたC A RをコードするD N Aのことをいう。使用され得るウイルスベクターには、S I Nレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、フォーミーウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター、ハイブリッドベクター及び/またはプラスミドトランスポゾン（例えば、スリーピングビューティートランスポゾンシステム）またはインテグラーゼベースのベクターシステムが含まれるが、これらに限定されない。本発明の代替実施形態に関連して使用され得る他のベクターは、当業者には明らかであろう。

【0044】

本明細書で使用される「標的細胞」は、疾患に関与し、本発明の遺伝子改変細胞の標的となり得る細胞（遺伝子改変T細胞、NK細胞、造血幹細胞、多能性幹細胞、及び胚性幹細胞）のことをいう。他の標的細胞は、当業者には明らかであり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

10

【0045】

用語「T細胞」及び「Tリンパ球」は交換可能であり、本明細書で同義的に使用される。例には、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0046】

本明細書で使用される「ベクター」、「クローニングベクター」及び「発現ベクター」は、ポリヌクレオチド配列（例えば、外来遺伝子）を宿主細胞に導入して宿主を形質転換し、導入された配列の発現（例えば、転写及び翻訳）を促進することができる媒体のことをいう。ベクターには、プラスミド、ファージ、ウイルスなどが含まれる。

20

【0047】

本明細書で使用される「投与する」という用語は、所望の部位での薬剤の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法または経路による、本明細書で開示される薬剤の対象への配置のことをいう。

【0048】

「有益な結果」には、病状の重症度の軽減または緩和、病状の悪化の防止、病状の治癒、病状の発症の防止、患者が病状を発症する可能性の低下、及び患者の寿命または平均余命の延長が含まれるが、これらに限定されない。非限定的な例として、「有益な結果」または「望ましい結果」は、1つ以上の症状（複数可）の緩和、欠損の程度の減少、安定した（すなわち、悪化していない）がんの進行状態、転移または浸潤の遅延または減速、及びがんに関連する症状の改善または緩和であり得る。

30

【0049】

本明細書で使用される「治療する（t r e a t）」、「治療」、「治療する（t r e a t i n g）」、または「改善」という用語は、目的が、疾患または障害に関連する状態の進行または重症度を逆転、緩和、改善、阻害、減速または停止することである治療的行為のことをいう。「治療する」という用語は、がんなどの状態、疾患または障害の少なくとも1つの有害作用または症状を軽減または緩和することを含む。1つ以上の症状または臨床マーカーが減少した場合、治療は一般に「効果的」である。あるいは、疾患の進行が減少または停止した場合、治療は「有効」である。すなわち、「治療」には、症状またはマーカーの改善だけでなく、治療の非存在下で予想される症状の少なくとも進行の減速または悪化の停止も含まれる。有益なまたは望ましい臨床結果には、1つ以上の症状（複数可）の緩和、疾患の程度の減少、疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しない）、疾患の進行の遅延または減速、疾患状態の改善または緩和、及び寛解（部分的または全体的）、検出可能または検出不能が含まれるが、これらに限定されない。疾患の「治療」という用語には、疾患の症状または副作用の緩和（緩和治療を含む）も含まれる。いくつかの実施形態において、がんの治療には、腫瘍体積の減少、がん細胞数の減少、がん転移の阻害、平均余命の増加、がん細胞増殖の減少、がん細胞の生存の減少、またはがん状態に関連する様々な生理学的症状の改善が含まれる。

40

【0050】

50

本明細書で使用される「条件」及び「疾患状態」には、がん、腫瘍または感染症が含まれ得る。例示的な実施形態において、状態には、悪性新生物細胞増殖性障害または疾患の任意の形態が含まれるが、決してこれらに限定されない。例示的な実施形態において、状態には、腎がん、黒色腫、前立腺がん、乳がん、膠芽腫、肺がん、結腸がん、または膀胱がんのいずれか1つ以上が含まれる。

【0051】

本明細書で使用される「有効量」または「治療有効量」という用語は、疾患または障害の少なくとも1つ以上の症状を軽減するため、本明細書で開示される1つ以上のペプチドまたはその変異体 (mutant)、パリアント (variant)、類似体または誘導体を含む医薬組成物の量のことをいい、望ましい効果を提供するのに十分な量の薬理的組成物に関する。本明細書で使用される語句「治療有効量」は、任意の医学的治療に適用可能な合理的な利益/リスク比で障害を治療するのに十分な組成物の量を意味する。

10

【0052】

症状の治療的または予防的に有意な減少は、対照または治療していない対象、または本明細書に記載のオリゴペプチドを投与する前の対象の状態と比較した測定パラメーターにおいて、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約125%、少なくとも約150%以上である。測定または測定可能なパラメーターには、臨床的に検出可能な疾患マーカー、例えば、生物学的マーカーのレベルの上昇または低下、ならびに臨床的に認められた症状のスケールまたは糖尿病のマーカーに関連するパラメーターが含まれる。しかしながら、本明細書に開示されている組成物及び製剤の総1日使用量は、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されることが理解されよう。必要な正確な量は、治療する疾患の種類、性別、年齢、対象の体重などの要因によって異なる。

20

【0053】

本明細書で使用される「哺乳動物」は、ヒト、及びチンパンジー及び他の類人猿及びサル種などの非ヒト霊長類、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウマなどの家畜、イヌやネコなどの家畜、マウス、ラット、モルモットなどのげっ歯類を含む実験動物を含むがこれらに限定されない哺乳類のクラスの任意のメンバーのことをいう。前記用語は、特定の年齢や性別を示すものではない。従って、成人(成体)または新生児(新生仔)の対象、及び胎児(胎仔)は、雄性であろうと雌性であろうと、この用語の範囲内に含まれることが意図される。

30

【0054】

抗腫瘍活性を有するCAR-T細胞は、免疫抑制性腫瘍微小環境で頻繁に使い果たされる。PD-1受容体は、T細胞の消耗を媒介する主要なエフェクターである。以前の研究では、同系乳がんマウスモデルで抗HER2 CAR-T細胞と組み合わせた場合、抗PD-1抗体治療により抗腫瘍活性が増強されることが示された。しかしながら、実質的かつ持続的な有効性を達成するには、継続的な投与と大量の抗体が必要であり、しばしば重度の全身毒性を引き起こす。そのため、抗PD-1抗体を全身投与する代わりに、抗PD-1自己分泌型CAR-PD1-T細胞を作製した。これはCAR-T細胞のみの注射、またはCAR-T細胞と抗PD-1抗体の併用注射と比較して、消耗が少なく、より機能的で拡張性があり、腫瘍根絶の媒介においてより効率的である。本発明者らの研究は、固形腫瘍の免疫療法のためのCPI治療とCAR-T細胞療法を組み合わせるための効率的で安全な戦略を提供する。

40

【0055】

従って、本明細書で提供されるのは、キメラ抗原受容体(CAR)及びチェックポイント阻害剤の両方をコードする核酸、またはそれぞれCAR及びCPIをコードする核酸を含む細胞(例えば、遺伝子改変細胞)である。様々な実施形態において、細胞はCAR及びチェックポイント阻害剤を発現する。一実施形態において、細胞はTリンパ球細胞(T細胞)である。一実施形態において、細胞はナチュラルキラー(NK)細胞である。様々

50

な実施形態において、チェックポイント阻害剤（例えば、抗PD-1 s c F v）は構成的に発現される。

【0056】

いくつかの実施形態において、細胞（例えば、遺伝子改変細胞）は、CD19、CD22、CD23、MPL、CD30、CD32、CD20、CD70、CD79b、CD99、CD123、CD138、CD179b、CD200R、CD276、CD324、FcRH5、CD171、CS-1、CLL-1 (CLECL1)、CD33、CDH1、CDH6、CDH16、CDH17、CDH19、EGFRviii、FcRH5、GD2、GD3、HLA-A2、BCMA、TnAg、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、IL11Ra、メソセリン、PSCA、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-ベータ、PRSS21、SSEA-4、CD20、免疫グロブリンのFc領域、組織因子、葉酸受容体アルファ、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1EGFR、NCAM、Prostate、PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-I受容体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、チロシナーゼ、EphA2、フコシルGM1、sLea、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、TCR-beta1定常鎖、TCRベータ2定常鎖、TCRガンマ-デルタ、GPCR5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、レグマイン、HPV E6、E7、HTLV1-Tax、KSHV K8.1タンパク質、EBB gp350、HIV1-エンベロープ糖タンパク質 gp120、MAGE-A1、MAGE A1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロスタイン、サバイピンテロメラーゼ、PCTA-1/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras変異体、hTERT、DLL3、TROP2、PTK7、GCC、AFP、肉腫転位置ブレイクポイント、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、Cyclin B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-YES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、RU1、RU2、腸内カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、FITC、黄体形成ホルモン受容体 (LHR)、卵胞刺激ホルモン受容体 (FSHR)、絨毛性ゴナドトロピンホルモン受容体 (CGHR)、CCR4、GD3、SLAMF6、SLAMF4、FITC、黄体形成ホルモン受容体 (LHR)、卵胞刺激ホルモン受容体 (FSHR)、絨毛性ゴナドトロピンホルモン受容体 (CGHR)、CCR4、GD3、SLAMF6、SLAMF4、またはそれらの組み合わせを含むがこれに限定されない疾患原因細胞または疾患関連細胞で発現される1つ以上の標的を標的とするCARを発現する。

【0057】

一実施形態において、細胞（例えば、遺伝子改変細胞）は、CD19を標的とするCARを発現する。

【0058】

いくつかの実施形態において、細胞（例えば、遺伝子改変細胞）は、PD-1、LAG-3、TIM3、B7-H1、CD160、P1H、2B4、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3、及び/またはCEACAM-5）、TIGIT、CTLA-4、BTLA、及びLAIR1のいずれか1つ以上を標的とするチェックポイント阻害剤を発現する。いくつかの実施形態において、チェックポイント阻害剤は、PD-1、LAG-3、TIM3、B7-H1、CD160、P1H、2B4、CEACAM（

C E A C A M - 1、C E A C A M - 3、及び／またはC E A C A M - 5)、T I G I T、C T L A - 4、B T L A、及びL A I R 1のいずれか1つ以上を標的とする抗体またはその断片である。

【0059】

一実施形態において、細胞（例えば、遺伝子改変細胞）は、P D - 1を標的とするチェックポイント阻害剤を発現する。一実施形態において、チェックポイント阻害剤は抗P D - 1 s c F vである。

【0060】

一実施形態において、細胞（例えば、遺伝子改変細胞）は、C D 1 9を標的とするC A R、及びP D - 1を標的とするチェックポイント阻害剤を発現し、P D - 1を標的とするチェックポイント阻害剤は抗P D - 1 - s c F vである。

10

【0061】

本明細書に記載のC A Rをコードする第1のポリヌクレオチド及び本明細書に記載のチェックポイント阻害剤をコードする第2のポリヌクレオチドを含む核酸も本明細書に提供される。本明細書に記載される1つ以上の核酸によってコードされるポリペプチドも本明細書に提供される。本明細書にさらに提供されるのは、本明細書に記載の1つ以上の核酸を含むベクターである。

【0062】

本明細書ではさらに、がんの治療、阻害、転移の予防、及び／またはがんの重症度の軽減を必要とする対象のがんの治療、阻害、転移の予防、及び／またはがんの重症度の軽減のための方法が提供される。該方法は、該対象のがんの治療、阻害、転移の予防、及び／またはがんの重症度を軽減するために、処置を必要とする対象に、キメラ抗原受容体及びチェックポイント阻害剤をコードする核酸（つまりそれぞれC A R及びC P Iをコードする核酸）を含む治療有効量の細胞を投与することを含む。例示的な実施形態において、がんは肺がんである。

20

【0063】

本明細書でさらに提供されるのは、がんの治療、阻害、転移の予防、及び／またはがんの重症度の軽減を必要とする対象におけるがんの治療、阻害、転移の予防、及び／またはがんの重症度の軽減のための方法である。該方法は、該対象のがんの治療、阻害、転移の予防、及び／またはがんの重症度を軽減するために、該対象に、キメラ抗原受容体（C A R）及びチェックポイント阻害剤の両方をコードする核酸を含む細胞、またはそれぞれC A R及びチェックポイント阻害剤をコードする核酸を含む細胞を含む組成物の治療的有效量を投与することを含む。例示的な実施形態において、がんは肺がんである。

30

【0064】

本明細書では、肺がんの治療、阻害、転移の予防、及び／または肺がんの重症度の軽減を必要とする対象の肺がんの治療、阻害、転移の予防、及び／または肺がんの重症度の軽減のための方法がさらに提供される。該方法は、該対象のがんの治療、阻害、転移の予防、及び／または肺がんの重症度を軽減するために、該対象に、C D 1 9特異的キメラ抗原受容体及びP D - 1特異的チェックポイント阻害剤（例えば、抗P D - 1 - s c F v）の両方をコードする核酸、または、それぞれC D 1 9特異的C A R及びP D - 1特異的チェックポイント阻害剤をコードする核酸を含む細胞を含む組成物の治療的有效量を投与することを含む。

40

【0065】

様々な実施形態において、前記方法は、治療有効量の既存の療法（既存の治療薬）を対象に施すことをさらに含み、前記既存の療法は、本明細書に記載の組成物と連続してまたは同時に施される。

【0066】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の細胞（遺伝子改変細胞）は、手術、化学療法、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸、及びF K 5 0 6などの免疫抑制剤、C A M P A T H、抗C D 3抗体または他の抗体療

50

法などの抗体または他の免疫除去剤、サイトキシン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、及びIzumoto et al., 2008 J Neurosurg 108: 963-971に記載されているような照射、ペプチドワクチンを含むがこれらに限定されない既存の治療法と組み合わせて治療計画で使用されてもよい。一実施形態において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、化学療法剤と組み合わせて使用され得る。例示的な化学療法薬には、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン（例えば、リボソームドキソルビシン））、ビンカルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、デカルバジン、メルファラン、イフォスファミド、テモゾミド）、免疫細胞抗体（例えば、アレムツザマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブ、トシツモマブ、ブレンツキシマブ）、代謝拮抗剤（例えば、葉酸拮抗薬、ピリミジン類似体、プリン類似体、及びアデノシンデアミナーゼ阻害剤（例えば、フルダラビン）を含む）、mTOR阻害剤、TNFR糖質コルチコイド誘発TNFR関連タンパク質（GITR）アゴニスト、プロテアソーム阻害剤（例えば、アクラシノマイシンA、グリオトキシン、またはボルテゾミブ）、サリドマイドまたはサリドマイド誘導体（例えば、レナリドミド）などの免疫調節剤を含む。

10

【0067】

「治療的有効量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、年齢、体重、腫瘍の大きさ、感染または転移の程度、及び患者（対象）の状態の個人差を考慮して医師によって決定され得る。いくつかの実施形態において、治療的に有効な量の遺伝子改変細胞は、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg体重、場合によっては $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重の用量で投与され、これらの範囲内のすべての整数値を含む。T細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与され得る。細胞は、免疫療法で一般的に知られている注入技術を用いて投与され得る（例えば、Rosenberg et al., New Eng J. of Med. 319:1676, 1988を参照）。細胞は、病変部位への注射（例えば、腫瘍内注射）により投与され得る。

20

【0068】

一実施形態において、CAR及びCPIは、例えばin vitro転写を用いて免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）に導入され、対象（例えば、ヒト）は、本発明のCAR及びCPIを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の初期投与、及び本発明のCAR及びCPIを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の1回以上のその後の投与を受け、ここで、1回以上のその後の投与は、15日未満、例えば、前の投与の14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、または2日後に投与される。一実施形態において、週に本発明のCAR及びCPIを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の1回以上の投与が、例えば、週に投与される本発明のCAR及びCPIを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）が2、3または4回である投与で、対象（例えば、ヒト）に投与される。一実施形態において、対象（例えば、ヒト対象）は、週に本発明のCAR及びCPIを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の1回以上の投与（例えば、週に2、3または4回の投与）（ここではサイクルともいう）を受け、その後、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を1週間投与し、次いで、本発明のCAR及びCPIを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）が1回以上追加投与される（例えば、週に1回以上の免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の投与が対象に投与される）。別の実施形態において、対象（例えば、ヒト対象）は、CAR及びCPIを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の1回より多いサイクルを受け、各サイクル間の時間は10、9、8、7、6、5、4、または3日未満である。一実施形態において、CAR及びCPIを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）は、週に3回投与するために一日おきに投与される。一実施形態において、本発明のCAR及びCPIを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の週の間投与される。

30

40

50

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の治療方法は、対象に、既存の療法を順次または同時に投与することをさらに含む。既存のがん治療の例には、積極的監視、観察、外科的介入、化学療法、免疫療法、放射線療法（外部ビーム放射線、定位放射線手術（ガンマナイフ）、及び分割定位放射線療法（F S R）など）、局所療法、全身療法、ワクチン療法、ウイルス療法、分子標的療法、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変細胞（本明細書に記載の1つ以上のC A R及び1つ以上のC P Iをコードする1つ以上の核酸を含む）を調製する方法は、細胞集団を得て、任意の1つ以上のC D 3、C D 2 8、C D 4、C D 8、C D 4 5 R A、及び/またはC D 4 5 R Oを発現する細胞を選択することを含む。特定の実施形態において、提供される免疫エフェクター細胞の集団はC D 3 + 及び/またはC D 2 8 + である。

10

【 0 0 7 1 】

一実施形態において、遺伝子改変細胞（本明細書に記載の1つ以上のC A R及び1つ以上のC P Iをコードする1つ以上の核酸を含む）を調製する方法は、例えば、C D 2 5 に特異的な抗体を用いて、細胞集団を得て、C D 2 5 + T 調節細胞を濃縮することを含む。細胞集団からC D 2 5 + T 調節細胞を濃縮する方法は、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態において、T r e g 濃縮細胞は、3 0 % 未満、2 0 %、1 0 %、5 % 以下の非T r e g 細胞を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のC A R及びC P Iをコードするベクターは、T r e g 濃縮細胞にトランスフェクトされる。C A R及びC P Iを発現するT r e g 濃縮細胞を用いて、C A Rが標的とする抗原に対する寛容性を誘導してもよい。

20

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態において、前記方法は、本明細書に記載のC A R及びC P Iをコードする核酸を含むベクターが細胞にトランスフェクトされた後、細胞集団を拡大することをさらに含む。実施形態において、細胞の集団は、8 日以下の期間にわたって拡大される。特定の実施形態において、細胞の集団は、5 日間の培養で拡大され、得られた細胞は、同じ培養条件下で9 日間の培養で拡大された同じ細胞よりも強力である。他の実施形態において、細胞の集団は、5 日間の培養で拡大され、同じ培養条件下で9 日間の培養で拡大された同じ細胞と比較して、抗原刺激時に細胞の倍加が少なくとも1、2、3または4 倍増加することを示す。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、フローサイトメトリーによる測定通り、1 4 日間の拡大期間にわたって、細胞の少なくとも2 0 0 倍、2 5 0 倍、3 0 0 倍、または3 5 0 倍の増加をもたらす1つ以上のインターロイキンを含む適切な培地で拡大される。

30

【 0 0 7 3 】

様々な実施形態において、拡大された細胞は、本明細書に記載の1つ以上のC A R及び1つ以上のC P Iを含む。

【 0 0 7 4 】

医薬組成物

様々な実施形態において、本発明は医薬組成物を提供する。医薬組成物は、本明細書に記載されるように、C A R及びチェックポイント阻害剤をコードする核酸を含む細胞を含む。本発明の医薬組成物は、任意の薬学的に許容される賦形剤を含み得る。「薬学的に許容される賦形剤」とは、一般に安全、非毒性、及び望ましい医薬組成物の調製に有用な賦形剤を意味し、獣医学的使用及びヒトの薬学的使用に許容される賦形剤を含む。そのような賦形剤は、固体、液体、半固体、またはエアロゾル組成物の場合は気体であってもよい。賦形剤の例には、デンプン、糖、微結晶セルロース、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤、湿潤剤、乳化剤、着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味料、香料（f l a v o r i n g a g e n t s）、香料（p e r f u m i n g a g e n t s）、防腐剤、酸化防止剤、可塑剤、ゲル化剤、増粘剤、硬化剤、硬化剤、懸濁剤、界面活性剤、保湿剤、

40

50

担体、安定剤、及びそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0075】

様々な実施形態において、本発明による医薬組成物は、任意の投与経路を介した送達に製剤化され得る。「投与経路」は、エアロゾル、鼻腔、経口、経粘膜、経皮、非経口または経腸を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の投与経路のことをいい得る。「非経口」とは、眼窩内、注入、動脈内、嚢内、心臓内、皮内、筋肉内、腹腔内、肺内、脊髄内、胸骨内、くも膜下腔内、子宮内、静脈内、くも膜下、嚢下、皮下、経粘膜、または経気管を含む、一般的に注射に関連する投与経路のことをいう。非経口経路を介して、組成物は、注入または注射用の溶液または懸濁液の形態、または凍結乾燥粉末の形態であり得る。非経口経路を介して、組成物は、注入または注射用の溶液または懸濁液の形態であり得る。経腸経路を介して、医薬組成物は、錠剤、ゲルカプセル、糖衣錠、シロップ、懸濁液、溶液、粉末、顆粒、エマルジョン、ミクロスフェアまたはナノスフェア、制御放出を可能にするまたは脂質小胞またはポリマー小胞の形態であり得る。典型的には、組成物は注射により投与される。これらの投与の方法は、当業者に知られている。

10

【0076】

本発明による医薬組成物は、任意の薬学的に許容される担体を含むことができる。本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」は、ある組織、器官、または身体の一部から別の組織、器官、または身体の一部へ目的の化合物の運搬または輸送に關与する薬学的に許容される材料、組成物、または媒体のことをいう。例えば、担体は、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、またはカプセル化材料、またはそれらの組み合わせであり得る。担体の各成分は、製剤の他の成分と適合しなければならないという点で「薬学的に許容される」ものでなければならない。また、接触する可能性のある組織または臓器との接触での使用に適している必要があり、毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性、または治療上の利点を過度に上回るその他の合併症のリスクを負わないことを意味する。

20

【0077】

本発明の医薬組成物は、経口投与のために、カプセル化、錠剤化、またはエマルジョンまたはシロップに調製され得る。薬学的に許容される固体または液体の担体は、組成物を強化または安定化するため、または組成物の調製を容易にするために、添加され得る。液体担体には、シロップ、落花生油、オリーブ油、グリセリン、生理食塩水、アルコール、水が含まれる。固体担体には、デンプン、乳糖、硫酸カルシウム、二水和物、白土、ステアリン酸マグネシウムまたはステアリン酸、タルク、ペクチン、アカシア、寒天またはゼラチンが含まれる。担体はまた、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートなどの徐放性物質を単独でまたはワックスとともに含み得る。

30

【0078】

医薬製剤は、必要に応じて、錠剤形態については、製粉、混合、造粒、及び圧縮、または硬ゼラチンカプセル形態については、製粉、混合、及び充填を含む薬学の従来技術に従って作製される。液体担体を使用される場合、製剤は、シロップ、エリキシル、エマルジョン、または水性または非水性懸濁液の形態である。そのような液体製剤は、経口で直接投与されるか、またはソフトゼラチンカプセルに充填され得る。

【0079】

本発明による医薬組成物は、治療有効量で送達され得る。正確な治療有効量とは、所定の対象における治療の有効性に関して、最も効果的な結果をもたらす組成物の量である。この量は、治療化合物の特性（活性、薬物動態、薬力学、及び生物学的利用能を含む）、対象の生理学的状態（年齢、性別、病気の種類と病期、一般的な健康状態、所定の投与量に対する反応性、及び薬物の種類を含む）、薬学的に許容される担体または製剤中の担体の性質、及び投与経路を含むがこれらに限定されない、様々な要因によって異なる。臨床及び薬理学の分野の当業者は、例えば化合物の投与に対する対象の反応をモニターし、それに応じて投与量を調整するなど、日常的な実験を通じて治療有効量を決定することができる。追加のガイダンスについては、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed., 20

40

50

th edition, Williams & Wilkins PA, USA)
(2000)を参照されたい。

【0080】

患者への投与の前に、製剤は、rAAVベクター、rAAVベクターをトランスフェクトされた細胞、またはトランスフェクトされた細胞で調整された上清に添加され得る。液体製剤が好ましい場合がある。例えば、これらの製剤には、油、ポリマー、ビタミン、炭水化物、アミノ酸、塩、緩衝液、アルブミン、界面活性剤、増量剤またはそれらの組み合わせが含まれ得る。

【0081】

炭水化物製剤には、単糖類、二糖類、または多糖類などの糖または糖アルコール、または水溶性グルカンが含まれる。糖類またはグルカンには、フルクトース、デキストロース、ラクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、スクロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、アルファ及びベータシクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、及びカルボキシメチルセルロース、またはそれらの混合物を含み得る。「糖アルコール」は、-OH基を有するC4～C8炭化水素として定義され、ガラクトール、イノシトール、マンニトール、キシリトール、ソルビトール、グリセロール、及びアラビトールを含む。上記のこれらの糖または糖アルコールは、個々にまたは組み合わせて使用されてもよい。糖または糖アルコールが水性製剤に可溶である限り、使用量に一定の制限はない。一実施形態において、糖または糖アルコール濃度は、1.0w/v%～7.0w/v%の間、より好ましくは2.0～6.0w/v%の間である。

10

20

【0082】

アミノ酸製剤は、カルニチン、アルギニン、及びベタインの左旋性(L)型を含むが、他のアミノ酸が追加されてもよい。

【0083】

いくつかの実施形態において、処方剤としてのポリマーは、平均分子量が2,000～3,000のポリビニルピロリドン(PVP)、または平均分子量が3,000～5,000のポリエチレングリコール(PEG)を含む。

【0084】

組成物中に緩衝液を用いて、凍結乾燥前または再構成後の溶液のpH変化を最小限にすることも好ましい。クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、及びグルタミン酸塩緩衝液またはそれらの混合物を含むがこれらに限定されない、ほとんどの生理学的緩衝液が使用され得る。いくつかの実施形態において、濃度は、0.01～0.3モルである。製剤に添加され得る界面活性剤は、欧州特許第270,799号及び第268,110号に示される。

30

【0085】

循環半減期を延長するための別の薬物送達システムはリボソームである。リボソーム送達システムの調製方法は、Gabizon et al., Cancer Research (1982) 42:4734; Cafiso, Biochem Biophys Acta (1981) 649:129; 及びSzoka, Ann Rev Biophys Eng (1980) 9:467で議論されている。他の薬物送達システムは当技術分野で知られており、例えば、Poznansky et al., DRUG DELIVERY SYSTEMS (R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y. 1980), pp. 253-315; M. L. Poznansky, Pharm Revs (1984) 36:277に記載されている。

40

【0086】

液体医薬組成物が調製された後、分解を防止し、無菌性を維持するために凍結乾燥され得る。液体組成物を凍結乾燥する方法は、当業者に知られている。使用の直前に、組成物は、追加の成分を含み得る滅菌希釈剤(例えば、リンゲル液、蒸留水、または滅菌生理食

50

塩水)で再構成され得る。再構成すると、組成物は、当業者に知られている方法を用いて対象に投与される。

【0087】

キット

様々な実施形態において、本発明は、本明細書に記載の1つ以上のCAR及び1つ以上のCPIをコードする核酸を含む細胞を含む組成物を含む、がんを治療するためのキットを提供する。

【0088】

キットは、本発明の組成物(例えば、本明細書に記載の1つ以上のCAR及び1つ以上のCPIをコードする核酸を含む遺伝子改変細胞)の少なくとも1つを含む材料または成分の集合体である。従って、いくつかの実施形態において、キットは、上記のように、治療薬と複合体化した薬物送達分子を含む組成物を含む。

10

【0089】

本発明のキットで構成される構成要素の正確な性質は、その意図する目的に依存する。一実施形態において、キットは、特にヒト対象のために構成される。さらなる実施形態において、キットは、家畜(farm animals)、家畜(domestic animals)、及び実験動物などであるが、これらに限定されない対象を治療する獣医学用途向けに構成される。

【0090】

使用説明書は、キットに含まれていてもよい。「使用説明書」は、通常、キットの構成要素を用いて、対象のがんを治療、重症度を軽減、阻害するなど、所望の結果をもたらすために使用される技術を説明する具体的な表現を含む。さらに本発明によれば、「使用説明書」は、通常は意図された目的のために、組成物の調製、及び/または組成物の相対量、投与量要件、及び投与説明書などの少なくとも1つの方法パラメーターを記述する有形表現を含み得る。任意選択で、キットは、測定ツール、希釈剤、緩衝液、薬学的に許容される担体、注射器、または当業者によって容易に認識される他の有用な道具など、他の有用な成分も含む。

20

【0091】

キットに組み立てられた材料または構成要素は、それらの操作性及び有用性を維持する任意の便利で適切な方法で保管され、施術者に提供され得る。例えば、成分は、溶解、脱水、または凍結乾燥された形であり得、それらは、室温、冷蔵または冷凍温度で提供され得る。構成要素は、通常、適切な包装材料に含まれる。本明細書で使用される「包装材料」という語句は、本発明の組成物などのキットの内容物を収容するために使用される1つ以上の物理的構造のことをいう。包装材料は、好ましくは、無菌の、汚染物質のない環境を提供するために、よく知られた方法で構築される。本明細書で使用される「パッケージ」という用語は、ガラス、プラスチック、紙、ホイルなど、個々のキット構成要素を保持することができる適切な固体マトリックスまたは材料のことをいう。従って、例えば、パッケージは、ある量のAAV1-P0-ICEベクターを含む適切な量の組成物を含むために使用されるガラスバイアルであり得る。梱包材には一般に、キット及び/またはその構成要素の内容及び/または目的を示す外部ラベルが付いている。

30

40

【実施例】

【0092】

以下の実施例は、特許請求の範囲を本発明に限定することを意図するものではなく、特定の実施形態を例示することを意図するものである。当業者が思いつく例示された方法のあらゆる変形は、本発明の範囲内に含まれることが意図される。

【0093】

実施例1

実験方法

マウス

6~8週齢の雌NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2Rg^{tm1Wj1}.Sz(N

50

SG)マウスは、Jackson Laboratory (Farmington, CT)から購入した。すべての動物実験は、NIHの動物管理及び使用委員会のガイドラインに従って実施され、NCIの動物管理及び使用委員会によって承認されたプロトコルの下で実施された。

【0094】

細胞培養及び抗体

細胞株SKOV3及び293TはATCCから入手した。肺がん株NCI-H292は、Dr. Ite Laird-Offringa (University of Southern California, Los Angeles, CA)から提供された。H292-CD19及びSKOV3-CD19細胞株は、親NCI-H292及びSKOV3細胞に、ヒトCD19のcDNAをコードするレンチウイルスベクターで形質導入することにより生成された。形質導入されたH292及びSKOV3細胞を抗ヒトCD19抗体 (BioLegend, San Diego, CA) で染色し、選別してCD19過剰発現細胞の比較的純粋な集団を得た。SKOV3、SKOV3-CD19、NCI-H292、及びH292-CD19細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS)、2 mM L-グルタミン、10 mM HEPES、100 U/ml ペニシリン及び100 µg/ml ストレプトマイシンを補充したRPMI-1640培地からなるR10培地で維持された。293T細胞は、10%FBS、2 mM L-グルタミン、10 mM HEPES、100 U/ml ペニシリン及び100 µg/ml ストレプトマイシンを補充したDMEM培地からなるD10培地で培養した。上記のすべての細胞培養培地及び補充物は、Hyclone (Logan, UT) から購入した。ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) は、5%ヒトAB血清 (GemCell, West Sacramento, CA)、1%HEPES (Gibco, Grand Island, NY)、1%Pen-Str (Gibco)、1%GlutaMax (Gibco)、及び0.2%N-アセチルシステイン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を補充したX-Vivo 15培地 (Lonza, Walkersville, MD) で構成されるT細胞培地 (TCM) で培養した。

【0095】

この研究で使用される一次抗体は、ビオチン化タンパク質L (GeneScript, Piscataway, NJ)、PE-抗CD45、PE-Cy5.5-抗CD3、FITC-抗CD4、Pacific Blue (商標)-抗CD8、FITC-抗CD8、PE-抗IFN-、Brilliant Violet 421 (商標)-抗PD-1、PE-抗PD-L1、PerCP/Cy5.5-抗LAG-3、及びPE-抗TIM-3 (BioLegend, San Diego, CA)、及びウサギ抗HAタグ抗体 (Abcam, Cambridge, MA) を含む。使用した二次抗体は、FITC結合ストレプトアビジン (BioLegend, San Diego, CA) 及びヤギ抗ウサギIgG-HRP (Santa Cruz, San Jose, CA) であった。ウエスタンブロット解析に使用されたSuperSignal (登録商標) West Femto Maximum Sensitivity Substrateは、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) 製であった。

【0096】

プラスミド構築

抗CD19 CAR (CAR) をコードするレトロウイルスベクターは、前述のようにWolfgang Uckert教授から頂いたMP71レトロウイルスベクターに基づいて構築された (Engels B, et al. 2003. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. Hum Gene Ther 14: 1155-68)。次いで、抗PD-1 scFv (CAR, PD1) を含む抗CD19 CARをコードするベクターを、抗CD19 CARに基づいて生成した。CA

R. PD1ベクターの挿入物は、インフレーションの5'末端から3'末端において以下の成分：抗CD19 CAR、EcoRI部位、ヒトIL-2由来のリーダー配列、抗PD-1 scFv軽鎖可変領域、GSリンカー、抗PD-1 scFv重鎖可変領域、HAタグ配列、及びNotI部位、から構成された。

【0097】

CAR. PD1ベクターの抗PD-1 scFv部分は、ヒトPD-1に特異的なヒトモノクローナル抗体5C4のアミノ酸配列に由来した(Alan J. Korman MS, Changyu Wang, Mark J. Selby, Bingliana Chen, Josephine M. Cardarelli, 2011. United States.)。scFvの対応するDNA配列は、オンラインコード最適化ツールを用いて、ヒト細胞での最適な発現のためにコドン最適化され、Integrated DNA Technologies(Coralville, IA)によって合成された。次いで、抗PD-1 scFvをGibsonアセンブリー法によりEcoRI部位を介してCD19 CARベクターに連結した。

10

【0098】

レトロウイルスベクター産生

標準的なリン酸カルシウム沈殿プロトコルを用いて、293T細胞の一過性トランスフェクションによりレトロウイルスベクターを調製した。15cm組織培養皿で培養した293T細胞に、37.5 µgのレトロウイルスバックボーンプラスミド、18.75 µgのエンベローププラスミドpGALV、及び30 µgのgag-polをコードするパッケージングプラスミドをトランスフェクトした。ウイルス上清をトランスフェクションの48時間後に回収し、使用前に0.45 µmフィルター(Corning, Corning, NY)で濾過した。

20

【0099】

T細胞の形質導入及び拡大

凍結ヒトPBMCは、All Cells(Alameda, CA)から入手した。PBMCをTCMで解凍し、一晩休ませた。レトロウイルス形質導入の前に、50 ng/ml OKT3、50 ng/ml抗CD28抗体、及び10 ng/ml組換えヒトIL-2(PeproTech, Rocky Hill, NJ)と培養することにより、PBMCを2日間活性化させた。ウェルあたり15 µgのレトロネクチン(Clontech Laboratories, Mountain View, CA)でコーティングした、組織培養処理が無い12ウェルプレートに、新鮮に回収したレトロウイルスの上清を、形質導入のために32で2000×gで2時間遠心分離することによってスピンロードした。新鮮なウイルス上清を用いて、ベクターのスピンローディングを1回繰り返した。活性化されたPBMCを5×10⁵細胞/mlの濃度で、10 ng/mlの組換えヒトIL-2を補充した新しいTCMで再懸濁し、ベクターをロードしたプレートに加えた。プレートを1000×g、32で10分間回転させ、37、5%CO₂で一晩インキュベートした。同じ形質導入手順が翌日に繰り返された。ex vivoでの増殖中、培地を補充し、細胞密度を2日ごとに5×10⁵/mlに調整した。

30

【0100】

表面免疫染色及びフローサイトメトリー

細胞表面の抗CD19 CAR発現を検出するために、細胞をプロテインLで染色した。FACS染色の前に、5×10⁵個の細胞を回収し、FACSバッファー(5%ウシ血清アルブミン画分Vを含むPBS)で3回洗浄した。次いで、細胞を1 µgのビオチン化プロテインLで4で30分間染色した。細胞をFACSバッファーで3回洗浄した後、FACSバッファー中の0.1 µgのFITC結合ストレプトアビジンとともに4で10分間インキュベートした。細胞を洗浄し、TransFix細胞抗原安定化試薬(Thermo Scientific, Waltham, MA)で4で10分間固定した。次いで、細胞を2回洗浄し、4で10分間、抗CD3、抗CD4、及び抗CD8で染色した。細胞を洗浄し、PBSに再懸濁した。MACSquantサイトメーター(M

50

iltenyi Biotec, San Diego, CA)を用いて蛍光を評価し、FlowJoソフトウェア(Tree Star, Ashland, OR)を用いてすべてのFACSデータを解析した。

【0101】

細胞内サイトカイン染色

T細胞(1×10^6)を、96ウェル丸底プレートで、GolgiPlug(BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて、37℃、5%CO₂で6時間、1:1の比率で標的細胞とともに培養した。細胞内染色には、PE-Cy5.5-抗CD3、FITC-抗CD4、パシフィックブルー-CD8、PE-抗IFN- γ 及びPE-抗Ki67抗体を用いた。Cytofix/Cytoperm Fixation及びPermeabilizationキット(BD Biosciences)を用いて、細胞膜を透過性にし、製造元の指示に従って細胞内染色を行った。

10

【0102】

ウエスタンブロット解析

細胞培養上清を回収し、製造元の指示に従って、Pierce(商標)抗HA磁気ビーズ(Thermo Scientific, Waltham, MA)で抗PD-1 s c F vを精製した。次いで、精製された抗体をSDS-PAGEに供し、ウエスタンブロット解析のためにニトロセルロース膜(Thermo Scientific, Waltham, MA)に移した。前述のように、抗HAタグ抗体(Abcam, Cambridge, MA)でウエスタンブロットを解析した(Xu S et al. 2012. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 16348-53)。

20

【0103】

ELISA

IFN- γ は、製造元の指示に従って、ヒトIFN- γ ELISAキット(BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて測定した。手短に言えば、96ウェルELISAプレート(Thermo Scientific, Waltham, MA)を4℃で一晩、示されたタンパク質に対する捕捉抗体200 ng/ウェルでコーティングした。翌日、プレートを洗浄バッファー(0.05% Tween 20を含むPBS)で洗浄し、室温で2時間、アッセイバッファー(10% FBSを含むPBS)でブロックした。等量の血清または細胞培養上清をプレートに加え、室温で2時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄し、検出抗体とともに室温で1時間インキュベートした。抗PD-1抗体及び分泌された抗PD-1 s c F vを測定するために、組換えヒトPD-1(rhPD-1)を用いてプレートをプレコートした。ヤギ抗マウスIgG1-HRP及び抗HAタグ抗体を、それぞれ検出抗体として用いた。

30

【0104】

競合的ブロッキングアッセイ

96ウェルアッセイプレート(Thermo Scientific, Waltham, MA)に3 μ g/mlの抗ヒトCD3抗体を4℃で一晩コーティングした。2日目に、ウェルの上清を吸引し、ウェルあたり100 μ lのPBSで、ウェルを1回洗浄した。100 μ lのPBS中の10 μ g/mlのrhPD-L1/Fc(R&D Systems, Minneapolis, MN)を添加した。次いで、各ウェルに、10 μ lのPBS中の100 μ g/mlのヤギ抗ヒトIgG Fc抗体を加えた。アッセイプレートを37℃で4時間インキュベートした。ヒトT細胞を採取し、1回洗浄し、次いで、TCMで 1×10^6 細胞/mlに再懸濁した。アッセイプレートのウェルを吸引した。次いで、100 μ lのヒトT細胞懸濁液(1×10^5)と、GolgiPlug(BD Biosciences)を補充した、形質導入3日後のCARまたはCAR-PD1 T

40

50

細胞培養物の上清 $100\ \mu\text{l}$ を各ウェルに加えた。プレートを覆い、 37°C 、 $5\%\ \text{CO}_2$ で一晩インキュベートした。インキュベーション後、T細胞を回収し、細胞内でIFN- γ で染色した。

【0105】

特定の細胞溶解アッセイ

標的細胞の溶解 (H292 - CD19) は、標的細胞の生存を陰性対照細胞 (NCI - H292) の生存と比較することにより測定された。この方法は、以前に記載されている (Kochenderfer JN, et al 2009. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. J Immunother 32: 689 - 702)。NCI - H292細胞は、濃度 1.5×10^6 細胞/mLで、細胞運動をモニターする (Invitrogen, Carlsbad, CA) ために、蛍光色素である $5\ \mu\text{M}$ Cell Tracker Orange (5- (及び-6) - ((4 - クロロメチル) ベンゾイル) アミノ) テトラメチルローダミン) (CMTMR) を有するR10培地に懸濁することにより標識された。細胞を 37°C で30分間インキュベートし、次いで、2回洗浄し、新鮮なR10培地に懸濁した。H292 - CD19細胞は、 0.1% BSAと $5\ \mu\text{M}$ カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CFSE) 蛍光色素を伴うPBSに、 1×10^6 細胞/mLの濃度で懸濁することにより標識された。細胞を 37°C で30分間インキュベートした。インキュベーション後、同量のFBSを細胞懸濁液に添加し、室温で2分間インキュベートした。次いで、細胞を2回洗浄し、新鮮なR10培地に懸濁した。等量のNCI - H292及びH292 - CD19細胞 (各 5×10^4 個) を、エフェクターCAR - T細胞を有する各培養の同じウェルで組み合わせた。共培養は、次のエフェクター対標的比、 $1:1$ 及び $5:1$ で、丸底96ウェルプレートに3連でセットアップされた。培養物を 37°C で4時間インキュベートした後、製造元の指示 (BD Biosciences) に従って、7 - AAD標識を行った。フローサイトメトリー解析を行って、残りの生 (7 - AAD陰性) 標的細胞を定量化した。それぞれの共培養について、H292 - CD19生細胞の割合をNCI - H292生細胞の割合で割ることにより、H292 - CD19細胞のパーセント生存率を決定した。エフェクター細胞を含まない標的細胞と陰性対照細胞のみを含むウェルでは、H292 - CD19細胞の割合とNCI - H292細胞の割合の比を計算し、開始細胞数と自発的な細胞死の変動を補正するために使用した。細胞毒性を3回測定し、平均 \pm SEMで示した。

【0106】

細胞増殖

3×10^5 個のH292 - CD19細胞をD10培地に懸濁し、6ウェルプレートに播種した。標的細胞が付着したら、非形質導入T細胞、CAR及びCAR \cdot PD1 T細胞を回収し、PBSで2回洗浄した。次いで、細胞を、 $10\ \mu\text{M}$ CFSEを含むPBSに 1×10^6 細胞/mLの濃度で懸濁することにより標識し、 37°C で60分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を2回洗浄し、新鮮なTCMに懸濁した。共培養のために、同数のT細胞を標的細胞に加えた。共培養は、エフェクター対標的比、 $1:1$ で、3連で設定された。培養物を 37°C で96時間インキュベートした。フローサイトメトリー解析を実施して、T細胞上のCFSEの強度を定量化した。増殖率を3回測定し、平均 \pm SEMで示した。

【0107】

腫瘍モデル及び養子移入

6 ~ 8週齢で、マウスに 3×10^6 のH292 - CD19細胞を皮下接種し、10 ~ 13日後、平均腫瘍サイズが $100 \sim 120\ \text{mm}^3$ に達したら、マウスを $100\ \mu\text{l}$ PBS中の 1×10^6 または 3×10^6 CAR形質導入T細胞のi.v.による養子移入で治療した。CAR発現は、ドナーに適合した非形質導入T細胞の添加により、両方のCAR群において20%に正規化された。腫瘍の成長を週に2回モニターした。腫瘍サイズを

キャリパーで測定し、次の式で計算した： $W^2 \times L / 2$ 。明らかな体重減少、腫瘍の潰瘍形成、または腫瘍サイズが 1000 mm^3 を超えた場合に、マウスを安楽死させた。

【0108】

統計解析

GraphPad Prismバージョン5.01で統計解析を実行した。Tukeyの多重比較による一元配置分散分析を実行して、*in vitro*アッセイで異なる群間の違いを評価した。腫瘍成長曲線は、反復測定による一元配置分散分析を用いて解析した（Tukeyの多重比較法）。マウス生存曲線は、カプラン・マイヤー解析（ボンフェローニ補正によるロジランク検定）によって評価した。P値が0.05未満の場合、統計的に有意と見なされた。調査結果の有意性は次のように定義された。ns = 有意ではない、 $P > 0.05$ ；*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ 。

10

【0109】

抗PD-1抗体を分泌する抗CD19 CAR-T細胞の特性評価

この研究で使用したレトロウイルスベクター構築物の概略図を図1Aに示す。抗CD19 scFv、CD8ヒンジ、CD28膜貫通及び細胞内共刺激ドメイン、ならびに細胞内CD3ドメインから構成される抗CD19 CARをコードするレトロウイルスベクターをCAR19と命名した。抗CD19 CAR及び分泌抗PD-1 scFvの両方をコードするレトロウイルスベクターをCAR19-PD1と命名した。ヒトPBMCに各構築物を形質導入して、初代リンパ球におけるCARの発現をテストした。図1Bに見られるように、CAR発現はヒトT細胞の両方の構築物で観察されたが、抗PD-1分泌CAR19 T細胞は細胞表面でわずかに低いレベルのCARを発現した。抗PD-1の発現及び分泌を、形質導入の3日後に細胞上清でウェスタンブロット解析及びELISAを行うことにより評価した。CAR19-PD1で形質導入されたT細胞により、抗PD-1が正常に発現及び分泌されることが観察された（図1C及び図1D）。

20

【0110】

CAR19-PD1 T細胞によって分泌される抗PD-1 scFvの結合活性及びブロック機能の評価するために、競合的結合及びブロックアッセイを実施した。T細胞の活性を評価するために、細胞内IFN- γ を測定した。図1Eに示すように、T細胞が抗CD3抗体によって刺激されるとIFN- γ の発現がアップレギュレートされたが、組換えヒトPD-L1（rhPD-L1）の存在はIFN- γ の発現を著しく低下させた。しかしながら、CAR19-PD1 T細胞の細胞培養上清を加えると、T細胞に対するrhPD-L1の阻害効果が効果的に逆転し、IFN- γ 産生が著しく増加した（図1E）。

30

【0111】

抗PD-1抗体を分泌すると、CAR-T細胞の抗原特異的免疫応答が向上する

抗原特異的刺激を通じて抗PD-1分泌CAR19 T細胞のエフェクター機能をさらに評価するために、CAR19及びCAR19-PD1 T細胞の両方を、H292-CD19またはSKOV3-CD19標的細胞と異なる期間共培養し、どちらもPD-L1の表面発現が高いことが示された（図8）。次いで、異なる時点のT細胞を採取し、上清中の細胞機能マーカーIFN- γ をELISAで測定した。24時間抗原刺激すると、抗PD-1の分泌の有無にかかわらず、CAR19及びCAR19-PD1 T細胞の両方に同程度のIFN- γ 分泌が見られた（図2A及び図9A）。しかしながら、72時間後、CAR19-PD1 T細胞は、H292-CD19細胞による刺激後、親のCAR19 T細胞と比較して、有意に高いIFN- γ を分泌した（図2A）。同様に、96時間の抗原刺激後、抗PD-1を分泌するCAR19 T細胞は、親のCAR19 T細胞によって発現されるものよりも有意に多くのIFN- γ を発現した（図2A及び図9A）。

40

【0112】

次に、操作されたT細胞の細胞溶解機能を、6時間の細胞毒性アッセイにより調べた。H292-CD19細胞に対するCAR19及びCAR19-PD1 T細胞の細胞傷

50

害活性を、エフェクター／標的（E／T）比、1、5、10及び20で評価した。CAR 19及びCAR 19．PD1 T細胞の両方が、特に非形質導入T細胞と比較してより高いE／T比で、標的細胞の顕著な細胞溶解を媒介することがわかった。しかしながら、細胞溶解活性の点でCAR 19とCAR 19．PD1 T細胞との間にはほとんど違いは見られなかった（図2B）。次いで、標的H292-CD19細胞と操作されたT細胞の96時間共培養後、カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル（CFSE）ベースの増殖アッセイによりT細胞増殖を評価した。CAR 19及びCAR 19．PD1 T細胞の両方の抗原特異的刺激により、非形質導入T細胞と比較して著しく高いレベルの増殖がもたらされることが観察された。さらに、CAR 19 T細胞（ $57.9 \pm 10.2\%$ ）と比較して、CAR 19．PD1 T細胞（ $75.9 \pm 5.5\%$ ）の増殖率は有意に高かった（図2C及び図2D）。細胞増殖の可能性は、細胞増殖によりさらに評価された。抗原特異的刺激により、CAR 19及びCAR 19．PD1 T細胞の両方が非形質導入T細胞と比較して有意に拡大することが示された。驚くべきことに、親のCAR 19 T細胞（ 2.4 ± 0.2 ）と比較して、細胞倍加の数はCAR 19．PD1 T細胞（ 3.2 ± 0.3 ）で有意に高かった（図10）。

10

【0113】

抗PD-1の分泌は、抗原刺激後のCAR T細胞の消耗を緩和する

ヒトGD2及びマウスHER2 CAR T細胞でのPD-1の発現は、抗原特異的活性化後に増加することが示されており、PD-1の遮断はT細胞でPD-1の発現をダウンレギュレートすることがわかった。分泌された抗PD-1 scFvがヒトT細胞を消耗から保護する効果を評価するために、操作されたCAR T細胞を、H292-CD19またはSKOV3-CD19標的細胞と24時間共培養し、T細胞消耗マーカーのPD-1について染色した。PD-1の発現は、抗原特異的刺激後、CAR 19及びCAR 19．PD1 T細胞の両方で有意にアップレギュレートされることがわかった。比較すると、CAR 19．PD1 T細胞でのアップレギュレートされたPD-1の発現は、親のCAR 19 T細胞での発現よりも有意に低かった（図3A、図3B、及び図13A-13C）。しかしながら、抗原特異的刺激なしでは、CAR 19及びCAR 19．PD1 T細胞の両方でPD-1の発現は、T細胞増殖の過程で同様の安定したレベルを維持した（図13D及び13E）。

20

【0114】

CAR 19．PD1 T細胞におけるPD-1のより低い発現が、PD-1検出抗体の結合またはPD-1のダウンレギュレーションに対する分泌された抗PD-1 scFvの遮断機能に起因するかどうかをさらに決定するために、活性化T細胞を対照培地またはCAR 19．PD1 T細胞培養上清と30分間インキュベートした後、抗PD-1抗体で染色した。分泌された抗PD-1 scFvは、PD-1検出抗体の結合の約20%をブロックできることがわかった（図11A）。タンデムで、CAR 19またはCAR 19．PD1 T細胞のいずれかと、標的細胞H292-CD19を24時間共培養した。次いで、両方のT細胞を回収し、PD-1の転写発現をq-PCRで測定した。CAR 19．PD1 T細胞におけるPD-1の発現は、親のCAR 19 T細胞におけるPD-1の発現よりも有意に低かったことが観察された（図11B）。これは、CAR 19．PD1 T細胞がPD-1の発現をダウンレギュレートしたことを確かに確認する。

30

40

【0115】

PD-1に加えて、リンパ球活性化遺伝子3タンパク質（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンドメイン、及びムチンドメイン含有タンパク質3（TIM-3；HAVCR2としても知られる）を含む他の細胞表面阻害分子、及び細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）は、T細胞の消耗を誘発し、CAR-T細胞療法の抗腫瘍効果を制限する上でも重要な役割を果たす。他のT細胞消耗マーカーの発現がCAR刺激によって調節されているかどうかを評価するために、CAR操作T細胞のLAG-3及びTIM-3の発現を測定した。PD-1と同様に、LAG-3及びTIM-3の発現は、形質導入

50

されていないT細胞と比較して、抗原刺激後に、CAR19及びCAR19. PD1 T細胞の両方で有意にアップレギュレートされることがわかった。CAR19 T細胞と比較して、CAR19. PD1 T細胞は、H292-CD19細胞による刺激後にわずかに低いLAG-3とTIM-3を発現した。さらに、SKOV3-CD19刺激では、CAR19. PD1 T細胞はLAG-3発現がCAR19 T細胞よりも有意に低かったのに対し、同様のTIM-3発現を示した(図3C、3D、12A、13A-13C)。比較すると、抗原特異的刺激なしでは、CAR19及びCAR19. PD1 T細胞のLAG-3は同様のレベルで発現し、T細胞増殖の過程で安定したままであった(図13D及び13E)。

【0116】

PD-1の遮断は、PD-L1陰性標的細胞での活性化後、GD2 CAR T細胞の生存を促進できることが示されており、PD-1を発現するT細胞とPD-L1などのPD-1リガンドを発現するT細胞との相互作用がT細胞機能の抑制に寄与している可能性があることを示す(Gargett T, et al 2016. GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade. Molecular Therapy 24: 1135-49)。従って、この実験では、CAR19及びCAR19. PD1 T細胞の両方でPD-L1の発現も測定し、抗原特異的刺激後に有意に増加することがわかった。しかしながら、CAR19. PD1 T細胞でのPD-L1の発現は、CAR19 T細胞での発現よりも有意に低かった(図3E、3F、及び12B)。

【0117】

抗PD-1遺伝子操作CAR T細胞は、抗腫瘍反応性の向上を示す

CAR19. PD1 T細胞の抗腫瘍効果を評価するために、確立されたH292-CD19皮下腫瘍(約100mm³)を有するNSGマウスに1×10⁶個のCAR操作T細胞を養子移入した。動物実験の実験手順を図4Aに示す。図4Bのデータは、3つの抗CD19 CAR T細胞群すべてが、実験中に、非形質導入T細胞、または抗PD-1抗体治療と併用した非形質導入T細胞と比較して、腫瘍サイズの減少を示したことを示す。しかしながら、親のCAR19 T細胞、または抗PD-1抗体治療と組み合わせたCAR19 T細胞と比較して、CAR19. PD1 T細胞治療は抗腫瘍効果を有意に増強し、それはT細胞注入後1週間で明らかになった(図4B)。特に、養子細胞移植の17日後、CAR19. PD1 T細胞で処理したマウスの腫瘍がほぼ消失することが観察された。親のCAR19 T細胞群または組み合わせ群では、6匹中4匹のマウス(約70%)が依然として進行性または安定性の病状を示し、30%未満の腫瘍サイズの減少のみを経験した(図4C)。担がんマウスの全生存率も評価された。親のCAR19 T細胞治療単独(17%)、または抗PD-1抗体とCAR19 T細胞治療の組み合わせ(17%)と比較して、CAR19. PD1 T細胞治療が長期生存(100%)を有意に延長したことが示された(図4D)。

【0118】

抗PD-1操作CAR T細胞は、親のCAR T細胞よりもin vivoで拡大し得る

次に、CAR T細胞の生着及び拡大をin vivoで評価した。T細胞注入の2日後、マウスを安楽死させ、腫瘍、血液、脾臓、骨髓を含む様々な臓器や組織をヒトT細胞染色のために採取した。すべての群のT細胞がほとんど増殖せず、検査したすべての組織で2%未満のT細胞しか観察されないことがわかった。ほとんどのT細胞(1~2%)が脾臓に帰巢し、特定の割合のT細胞(0.1~0.5%)が血中を循環していた。転移したT細胞の浸潤レベルは、腫瘍及び骨髓では低かった。さらに、非形質導入T細胞とCAR形質導入T細胞との間のT細胞の割合は、検査したすべての組織でほとんど差がないこ

10

20

30

40

50

とを示した(図5A)。しかしながら、T細胞注入の1週間後の10日目に、検査したすべての組織でCAR T細胞の有意な拡大が観察されたが、非形質導入T細胞はほとんど存在しなかった。特に、*in vitro*データと一致して、CAR19⁺ PD1⁺ T細胞は、特に腫瘍、脾臓、血液において、親のCAR19⁺ T細胞と比較して有意に高い増殖率を示した(図5B及び図5C)。

【0119】

抗PD-1操作CAR T細胞は、確立された腫瘍部位でT細胞の枯渇の反転と、より高いT細胞エフェクター機能をもたらす

CAR19⁺ PD1⁺ T細胞療法後に観察される抗腫瘍効果の増強が腫瘍部位でのCAR T細胞の機能の増加と相関するかどうかをさらに決定するために、 3×10^6 個のCAR T細胞を受ける前に、マウスにH292-CD19腫瘍を負荷した。実験計画を図6Aに示す。T細胞注入の8日後、マウスを安楽死させ、フローサイトメトリーを用いて、腫瘍、血液、脾臓、骨髄のT細胞を解析した。CAR T細胞治療と比較して、注入された抗PD-1抗体は*in vivo*でT細胞の拡大を促進する効果がほとんどないことが観察された。しかしながら、以前の観察結果と一致して(図5B)、CAR19⁺ PD1⁺ レジメンで処理したマウスのT細胞は、腫瘍、血液、脾臓でより高い割合で増殖した(図6B)。腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の中の細胞傷害性CD8⁺ T細胞の集団は、抗腫瘍免疫と自発的な腫瘍制御の誘発に重要であることが示されている。従って、CD8⁺ T細胞とCD4⁺ T細胞の比率をTIL間で解析した。親のCAR19⁺ T細胞と比較して、CAR19⁺ PD1⁺ T細胞はCD8⁺ T細胞とCD4⁺ T細胞の比が有意に高いことが示されたが、併用療法ではCAR T細胞単剤療法と比較してCD8⁺ T細胞とCD4⁺ T細胞の比は同様であった(図6C)。同様に、血液及び脾臓では、CAR19⁺ PD1⁺ T細胞治療におけるCD8⁺対CD4⁺の比率も、親のCAR19⁺ T細胞単剤療法及び併用療法群よりも有意に高かったが(図6C)、T細胞注入前のCAR19⁺とCAR19⁺ PD1⁺ T細胞との間のCD8⁺ T細胞比とCD4⁺ T細胞比との間でほとんど違いはなかった(図14A)。さらに、腫瘍浸潤CD8⁺ T細胞でのPD-1の発現を評価し、注入及び分泌された抗PD-1抗体の両方がPD-1の発現を有意に減少させることができることがわかった(図6D)。また、*ex vivo*培養を行い、抗CD3/CD28抗体または標的細胞H292-CD19でTILを活性化した。親CAR19⁺ T細胞または抗PD-1抗体の全身治療と組み合わせたCAR19⁺ T細胞のいずれかと比較して、養子移入されたCAR19⁺ PD1⁺ T細胞でIFN- γ の有意に高い発現が観察された。CAR T細胞単独療法と併用療法との間でIFN- γ の発現にほとんど差は認められなかった(図6E及び図6F)。さらに、血清中のIFN- γ 及び抗PD-1抗体の発現を測定したところ、すべての群でIFN- γ の発現にほとんど差が見られなかった(図14C)。特に、CAR19⁺ T細胞治療と比較して、CAR19⁺ PD1⁺ T細胞療法は血清中の抗PD-1濃度が有意に高かったが、その濃度は抗PD-1抗体の全身注射の場合よりも15倍以上低かった(図6G)。

【0120】

養子T細胞療法は、免疫療法の有望な方法となっている。造血器腫瘍を有する患者において、成功した応答を達成している。しかしながら、部分的には免疫抑制特性と免疫抑制微小環境の確立のために、固形腫瘍の治療の結果はそれほど期待されていない。PD-1/PD-L1調節経路は、TILの抗腫瘍応答に対する特に拮抗的な効果を実証している。予後不良の固形腫瘍はPD-L1の発現のアップレギュレーションを示したが、TILはPD-1のアップレギュレーションを有することが示された。これら2つの効果が組み合わせられて、腫瘍が消える。しかしながら、これは、PD-1/PD-L1経路を標的とするチェックポイント阻害剤(CPI)の使用により混乱する可能性がある。結果として、その後の研究は、活性化後にPD-1のアップレギュレーションを示した注入CAR T細胞におけるPD-1/PD-L1遮断の効果を調査するために設計された。

【0121】

細胞固有のPD-1 shRNA及びPD-1ドミナントネガティブ受容体などのPD

- 1 / P D - L 1 阻害の他の方法にもかかわらず、P D - 1 または P D - L 1 抗体による治療は長い間関心のあるトピックであり、動物モデルと臨床試験の両方で幅広く研究されている。実際、両方の抗体は、腫瘍成長の顕著な阻害をもたらした。しかしながら、抗体治療には複数の制限がある。例えば、持続的な効果を得るには、抗体を複数回連続して投与する必要がある。また、抗体のサイズが大きいため、抗体が腫瘍塊に入り込み浸潤した P D - 1 陽性 T 細胞に遭遇するのが妨げられる。これらの非効率性を説明するために、免疫調節薬または抗体による複数の高用量治療が必要であるが、これにより、軽度の下痢から自己免疫性肝炎、肺炎、大腸炎に及ぶ副作用が生じる可能性がある。さらに、抗体の F c 部分は、通常 F c R I 及び F c R I I A / F c R I I C をそれぞれ発現するマクロファージ及びナチュラルキラー細胞内の細胞傷害性シグナルを活性化することにより、免疫細胞の枯渇を引き起し得ることが示されている。従って、本研究では、免疫抑制性の腫瘍微小環境を変化させ、腫瘍誘発性機能低下を防ぎ、注入された C A R T 細胞の抗腫瘍免疫を強化することを目的として、P D - 1 に対して高濃度のヒト s c F v を分泌かつ送達を行う C A R T 細胞の操作に注力した。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 2 】

本明細書において、本発明者らは、ヒト抗 P D - 1 s c F v を分泌するヒト抗 C D 1 9 C A R T 細胞を作製し、抗 P D - 1 s c F v が、C A R 1 9 . P D 1 T 細胞によって効率的に発現及び分泌され得ることを実証した。分泌された s c F v は、細胞表面上の P D - 1 にうまく結合し、T 細胞機能に対する P D - 1 / P D - L 1 相互作用の阻害効果を逆転させた。構成的に分泌された抗 P D - 1 s c F v による P D - 1 の遮断は、T 細胞の枯渇を減少させ、i n v i t r o で T 細胞の増殖とエフェクター機能を有意に増強した。異種移植マウスモデルを用いた本発明者らの研究は、親の C A R 1 9 T 細胞と比較した場合、C A R 1 9 . P D 1 T 細胞が抗腫瘍活性をさらに増強し、全生存期間を延長することも実証した。機構的には、本発明者らは、C A R 1 9 . P D 1 T 細胞は i n v i v o での拡大が大きいことを観察した。さらに、局所腫瘍部位では、C A R 1 9 . P D 1 T 細胞は、親の C A R 1 9 T 細胞よりも消耗が少なく機能的であることが示された。

【 0 1 2 3 】

P D - 1 及びそのリガンド P D - L 1 または P D - L 2 の関与は、T C R または B C R 活性化の存在下で阻害シグナルを伝達し、T 細胞機能を抑制する。この研究では、組換えヒト P D - L 1 タンパク質 (r h P D - L 1) の存在が、i n v i t r o 活性化アッセイで T 細胞活性化を有意に抑制した。C A R 1 9 . P D 1 T 細胞によって分泌された抗 P D - 1 s c F v の結合及びブロック活性を調べるために、r h P D - L 1 タンパク質の存在下で、C A R 1 9 T 細胞または C A R 1 9 . P D - 1 T 細胞のいずれかの細胞培養上清とともに T 細胞を培養した。C A R 1 9 . P D 1 T 細胞からの上清が T 細胞機能を救い、I F N - 産生を有意に増加させることが観察され、分泌された抗 P D - 1 が P D - 1 にうまく結合し、T 細胞機能における P D - 1 / P D - L 1 相互作用の阻害効果を逆転させることができることが示された。

【 0 1 2 4 】

P D - 1 / P D - L 1 経路は、T 細胞によるサイトカイン産生の調節を含み、I F N - 、T N F - 及び I L - 2 の産生を阻害する。ヒト G D 2 及び抗 H E R 2 C A R T 細胞の P D - 1 の発現は、抗原特異的活性化後に増加することが示されており、P D - 1 の遮断は T 細胞エフェクター機能を増強し、P D - L 1 + 標的細胞の存在下で I F N - の産生を増加させることが示されている。従って、この研究では、C A R 1 9 T と C A R 1 9 . P D 1 T 細胞の機能的能力を比較するために、本発明者らは、T 細胞を P D - L 1 + がん細胞株、H 2 9 2 - C D 1 9 または S K O V 3 - C D 1 9 と共培養し、抗 P D - 1 分泌 C A R 1 9 T 細胞は、親の C A R 1 9 T 細胞よりも有意に高いレベルの I F N - を産生した。サイトカインの産生に加えて、P D - 1 は T 細胞の増殖も阻害し得る。P D - L 1 + がん細胞の存在下での C A R 特異的刺激により、C A R 1 9 . P D 1 T 細胞は、親の C A R 1 9 T 細胞よりも有意に高い増殖率を示した。まとめると、これ

らのデータは、PD-1/PD-L1シグナル伝達遮断により、CAR19 T細胞単独と比較して、より高い増殖能力を有するより機能的なCAR19、PD1 T細胞がもたらされることを意味する。

【0125】

分泌された抗PD-1がCAR19、PD1 T細胞の機能にどのように影響するかをよりよく理解するために、CAR19 T細胞及びCAR19、PD1 T細胞をPD-L1⁺標的細胞に曝露し、PD-1、LAG-3、及びTIM-3を含む、T細胞消耗マーカーの発現を調べた。本発明者らは、親CAR19 T細胞と比較して、CAR19、PD1 T細胞でのPD-1の発現が有意に低く、LAG-3などの他の消耗マーカーの発現が低いことを観察した。CAR19、PD1 T細胞でのPD-1の発現低下は、抗体遮断とPD-1表面発現のダウンレギュレーションの二重の効果によって引き起こされ得る。腫瘍浸潤性T細胞のPD-1アップレギュレーションは、高PD-L1発現腫瘍におけるT細胞枯渇の主要な原因であると報告された。PD-1のダウンレギュレーションは、CAR19、PD1 T細胞のIFN- γ 産生の増加によってサポートされるT細胞枯渇の回復とT細胞エフェクター機能の強化に寄与し得る。さらに、LAG-3などの他の消耗マーカーの発現レベルが低いことも、抗原刺激時のCAR19、PD1 T細胞の高い機能に寄与し得る。本発明者らの観察は最近の研究と一致しており、複数の抑制性受容体の共発現がT細胞枯渇の主要な特徴であることを示している。さらに、本発明者らは、抗原特異的刺激によりCAR T細胞でPD-L1発現が有意に増加し、T細胞-T細胞相互作用を介してT細胞の枯渇に寄与し得ることを発見した。特に、比較すると、本発明者らは、CAR19、PD1 T細胞上のPD-L1の発現レベルが有意に低いことを観察した。これらのデータは、CAR19、PD1 T細胞上のPD-1及びPD-L1発現の抑制されたアップレギュレーションが、腫瘍細胞誘発性及び/またはT細胞誘発性の消耗の減少に寄与し得、それによってT細胞エフェクター機能とその抗腫瘍免疫をさらに強化する。

【0126】

本発明者らのin vivo研究は、PD-1/PD-L1遮断に関係なく、CAR T細胞処理により腫瘍成長を阻害できることを示した。CAR19 T細胞治療またはCAR19 T細胞と抗PD-1抗体の全身治療を組み合わせたマウスの67%が依然として安定または進行性疾患を有していたのと比較して、本発明者らは、CAR19、PD1 T細胞治療により、約2週間で90%以上の腫瘍根絶が達成されたことを観察した。CAR19、PD1 T細胞の強化された抗腫瘍効果の根底にあるメカニズムを理解するために、本発明者らはin vivoで養子移入されたT細胞の拡大を解析した。本発明者らのin vivoデータと一致して、本発明者らは、腫瘍、血液、脾臓、及び骨髄を含むすべての検査された組織で、抗PD-1分泌CAR T細胞が親CAR T細胞よりも大幅に拡大していることを見出した。さらに、TILの中の細胞傷害性CD8⁺T細胞の集団は、抗腫瘍免疫を引き出すのに重要である。以前の研究では、PD-1シグナル伝達がCD8⁺TILの拡大と機能の調節に関与していることが示された。この研究では、ex vivoで刺激するとCD8⁺TILのより大きな集団がIFN- γ を発現し、CAR19、PD1 T細胞群におけるCD8⁺TILとCD4⁺TILの比率が高いことは、CAR19、PD1 T細胞が親のCAR19 T細胞と比較して、in vivoでより機能的で拡張可能であることを意味する。

【0127】

興味深いことに、この研究では、本発明者らは、抗PD-1抗体の全身注射が、CAR T細胞療法の抗腫瘍効果の増強にほとんど効果がないことを実証した。同系のHER2⁺自己抗原腫瘍モデルにおいて、最近の研究では、高用量(250 μ g/マウスの抗PD-1抗体)PD-1の遮断により、乳がんの治療における抗HER2 CAR T細胞の抗腫瘍活性を増強できることが示された。しかしながら、抗PD-1抗体の投与量が少ない(200 μ g/マウス)場合、CAR T細胞療法への影響は限定的であった。本研究では、低用量(125 μ g/マウス)の注射では、抗PD-1抗体は腫瘍の成長を阻害す

ることも、CAR T細胞の抗腫瘍効果を高めることもできなかった。この観察結果は、実質的な抗腫瘍効果を達成するために、しばしば全身毒性を引き起こす大量の抗PD-1抗体が必要になり得ることを示す。本発明者らは、抗PD-1抗体の循環量を測定したところ、併用治療群で有意な量の、循環している注射された抗体（約0.7 µg/ml）を見出し、CAR19. PD1 T細胞治療群で15倍低い量を見出した。投与及び自己分泌抗PD-1抗体の両方がin vivoでCD8⁺ T細胞におけるPD-1の発現を効率的に減少及び遮断したが、全身注射された抗PD-1抗体は、ex vivo刺激時の細胞溶解性CD8⁺ TILの集団の増加またはTILのIFN- γ 産生の増強にほとんど影響しなかった。この結果は、注入された抗体が、現在の用量で注入されたT細胞機能の増強にほとんど影響を及ぼさないことを示唆する。またこれは、CAR T細胞療法の抗腫瘍活性の増強における注入されたPD-1の遮断についての本発明者らの観察された失敗も説明している。低濃度の分泌抗PD-1と局所腫瘍組織での増強されたエフェクター機能を考えると、CAR T細胞によって分泌される抗PD-1は、PD-1シグナル伝達を遮断し、CAR T細胞の機能的能力を高める上で、より安全で強力なアプローチを提供し得る。

10

20

30

40

50

【0128】

結論として、CAR19. PD1 T細胞は、異種移植マウスモデルにおけるヒト固形腫瘍について、T細胞枯渇の軽減、T細胞拡大の強化、及びCAR T細胞治療の改善を示した。免疫適格条件では、抗PD-1操作CAR T細胞は、腫瘍微小環境の調節に対するPD-1の遮断の永続的な効果を考えると、腫瘍根絶の誘導においてより強力であると推測される。さらに、本発明者らは、通常PD-L1の発現が高い卵巣がんまたは乳がんの治療のために、メソセリンやHER-2などの他の腫瘍関連抗原を標的とするCAR構築物に抗PD-1 scFvを組み込むことが、優れた抗腫瘍免疫療法を達成するために検討すべき次のステップの1つであると想定している。

【0129】

上述の様々な方法及び技術は、本出願を実施するためのいくつかの方法を提供する。もちろん、説明されたすべての目的または利点が、本明細書に説明された特定の実施形態に従って必ずしも達成できるわけではないことを理解されたい。従って、例えば、当業者は、本明細書で教示または示唆される他の目的または利点を必ずしも達成することなく、本明細書で教示される1つの利点または利点群を達成または最適化する方法で実行できることを認識するであろう。様々な選択肢が本明細書で言及されている。いくつかの好ましい実施形態は、具体的に1つ、別の、またはいくつかの特徴を含むが、他のものは具体的に1つ、別の、またはいくつかの特徴を除外し、さらに別のものは1つ、別の、またはいくつかの有利な特徴を含めることにより特定の特徴を緩和することを理解されたい。

【0130】

さらに、当業者は、異なる実施形態からの様々な特徴の適用可能性を認識するであろう。同様に、上記の様々な要素、特徴、及びステップ、ならびにそのような要素、特徴、またはステップのそれぞれの他の既知の同等物は、説明された原理に従って方法を実行するために、当業者によって様々な組み合わせで使用され得る。様々な要素、特徴、及びステップの中で、いくつかは具体的に含まれ、他は様々な実施形態で具体的に除外される。

【0131】

本出願は、特定の実施形態及び実施例の文脈で開示されているが、本出願の実施形態は、具体的に開示された実施形態を超えて、他の代替実施形態及び/またはその使用及び修正ならびに均等物にまで及ぶことを当業者は理解するであろう。

【0132】

本明細書では、本出願を実施するために、本発明者らに知られている最良の形態を含む本出願の好ましい実施形態を説明する。それらの好ましい実施形態の変形は、前述の説明を読むことで当業者に明らかになるであろう。当業者はそのような変形を適宜使用することができ、本明細書に具体的に記載されている以外の用途を実施することができると考えられる。従って、本出願の多くの実施形態は、適用法で許可されるように、本明細書に添

付された特許請求の範囲に列挙された主題のすべての修正及び同等物を含む。さらに、そのすべての可能な変形における上記要素の任意の組み合わせは、本明細書で特に明記しない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限り、本出願に含まれる。

【0133】

本明細書で参照されるすべての特許、特許出願、特許出願の刊行物、及び記事、書籍、仕様書、刊行物、文書、物などのその他の資料は、同じ、現在の文書と一致しない、または競合する同じもののいずれか、または現在または後に本文書に関連付けられる請求の範囲の最も広い範囲に関して限定的な影響を与える可能性のあるものに関連する検索ファイルの履歴を除き、あらゆる目的のために、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例として、組み込まれた資料のいずれかに関連する説明、定義、及び/または用語の使用に矛盾または対立がある場合、本文書に関連するもの、本文書の用語の説明、定義、及び/または使用が優先するものとする。

10

【0134】

本明細書に開示される本出願の実施形態は、本出願の実施形態の原理の例示であることを理解されたい。採用できる他の修正は、本出願の範囲内であり得る。従って、限定ではなく例として、本出願の実施形態の代替構成を本明細書の教示に従って利用され得る。従って、本出願の実施形態は、示され説明されたとおりのものに限定されない。

【0135】

本発明の様々な実施形態は、詳細な説明において上述されている。これらの説明は上記の実施形態を直接説明しているが、当業者は、本明細書に示され説明されている特定の実施形態に対する修正及び/または変形を考え得ることが理解される。この説明の範囲内にあるそのような修正または変更は、その中に含まれることも意図されている。特に明記しない限り、明細書及び特許請求の範囲の単語及び語句には、適用可能な分野（複数可）の当業者に通常の慣習的な意味が与えられることが発明者の意図である。

20

【0136】

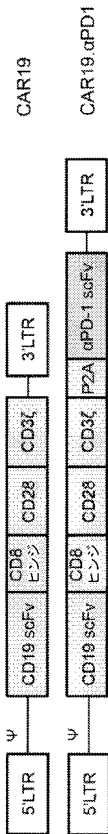
出願を提出した時点で出願人に知られている本発明の様々な実施形態の前述の説明は、提示されており、例示及び説明の目的のために意図されている。本説明は、網羅的であることも、開示された正確な形態に本発明を限定することも意図されておらず、上記の教示に照らして多くの修正及び変形が可能である。記載された実施形態は、本発明の原理及びその実際の応用を説明し、他の当業者が、考えられる特定の用途に適した様々な実施形態及び様々な修正で本発明を利用できるようにする。従って、本発明は、本発明を実施するために開示された特定の実施形態に限定されないことが意図されている。

30

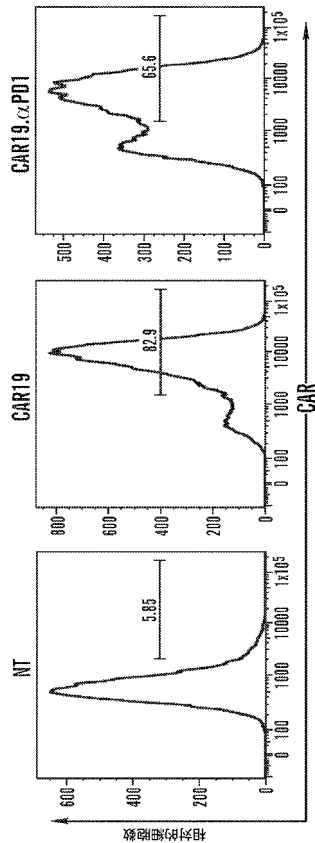
【0137】

本発明の特定の実施形態を示して説明したが、本明細書の教示に基づいて、本発明及びそのより広い態様から逸脱することなく変更及び修正を行うことができることは当業者には明らかであり、従って、添付の特許請求の範囲は、本発明の真の精神及び範囲内にあるすべてのそのような変更及び修正をその範囲内に包含するものである。

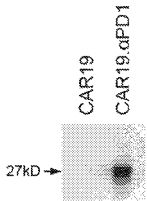
【図 1 A】



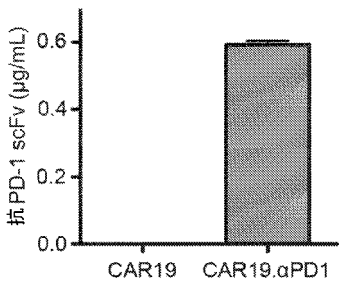
【図 1 B】



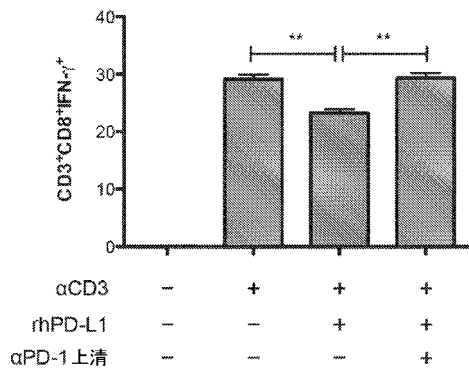
【図 1 C】



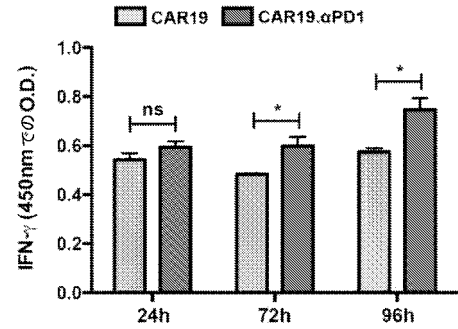
【図 1 D】



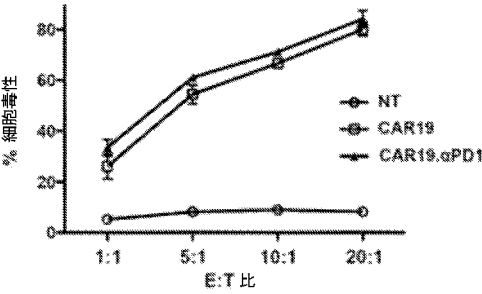
【図 1 E】



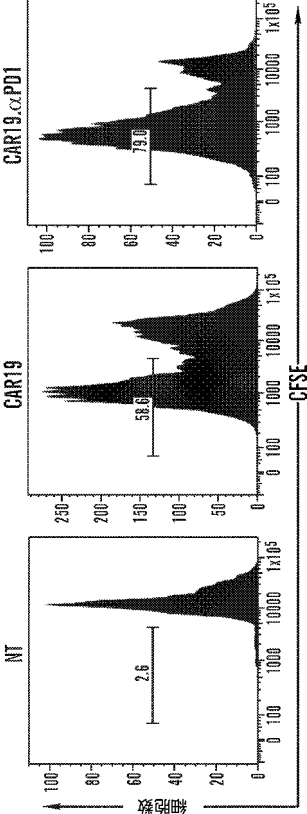
【図 2 A】



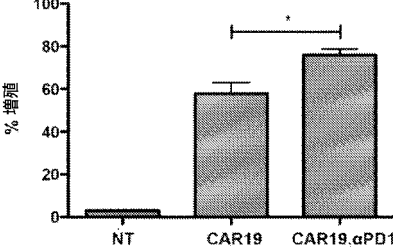
【 図 2 B 】



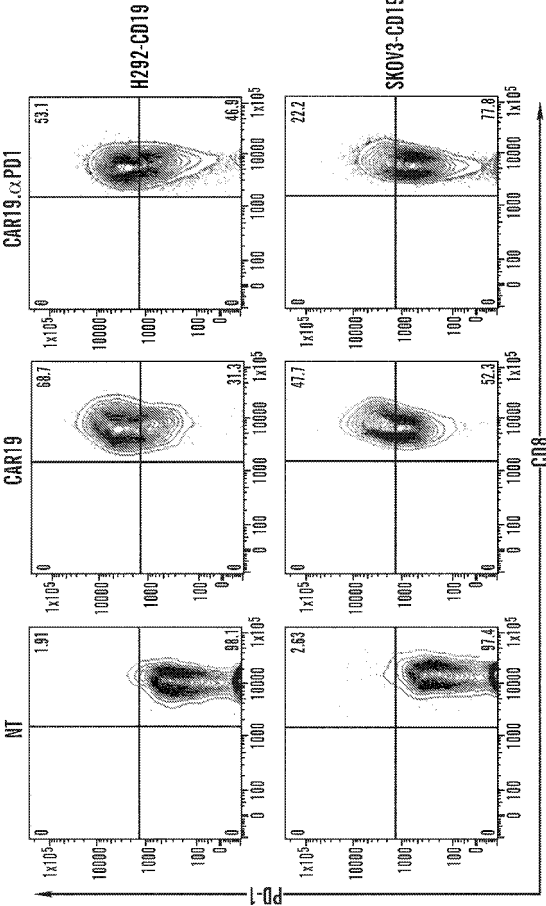
【 図 2 C 】



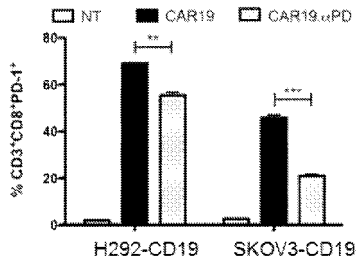
【 図 2 D 】



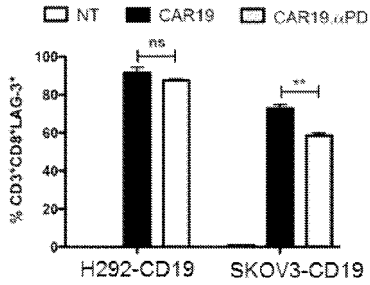
【 図 3 A 】



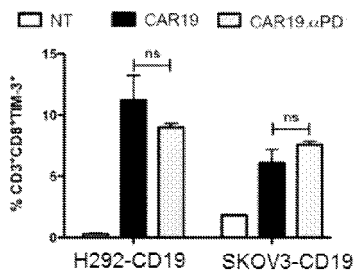
【図 3 B】



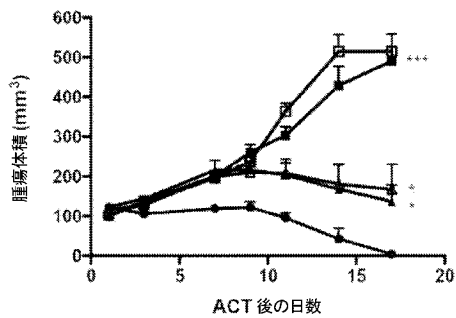
【図 3 C】



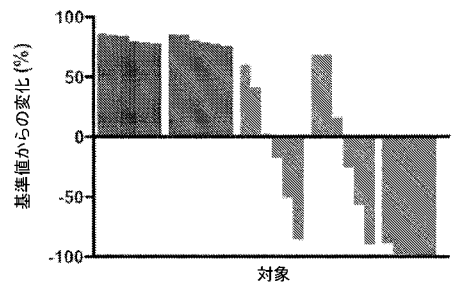
【図 3 D】



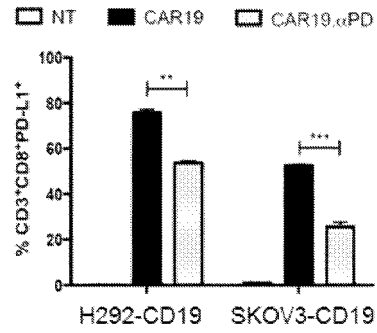
【図 4 B】



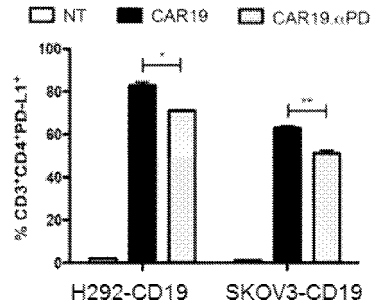
【図 4 C】



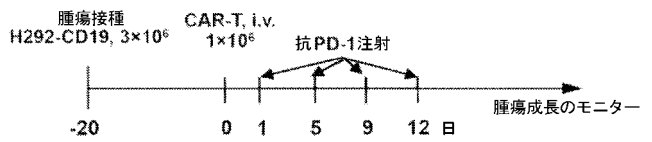
【図 3 E】



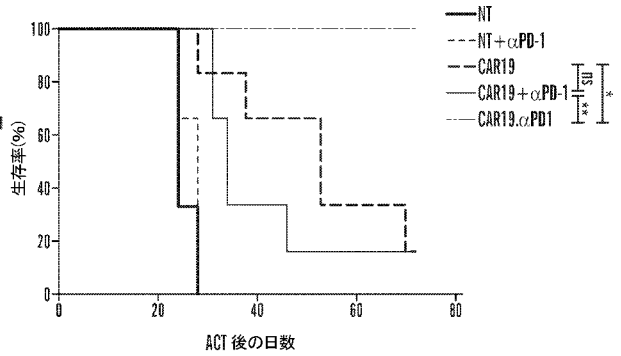
【図 3 F】



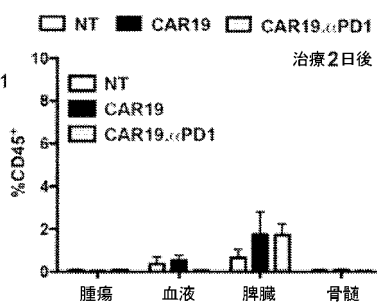
【図 4 A】



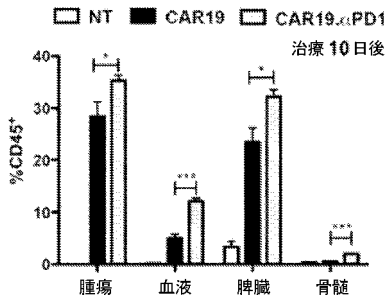
【図 4 D】



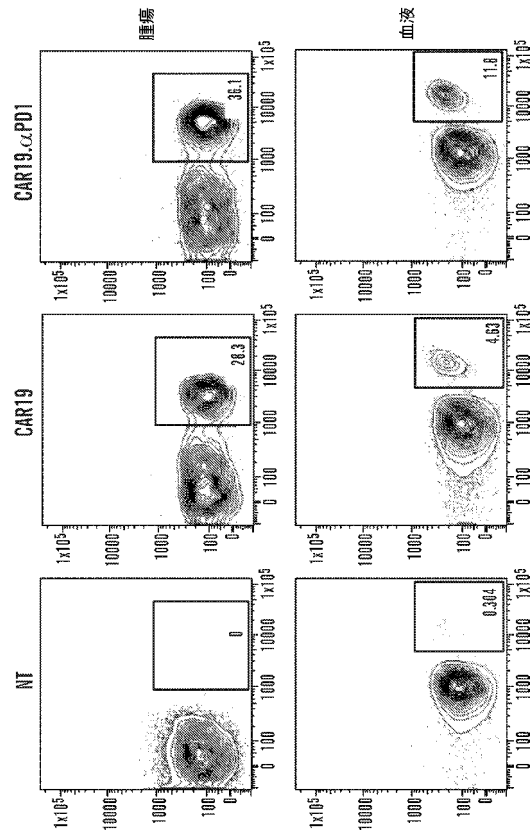
【図 5 A】



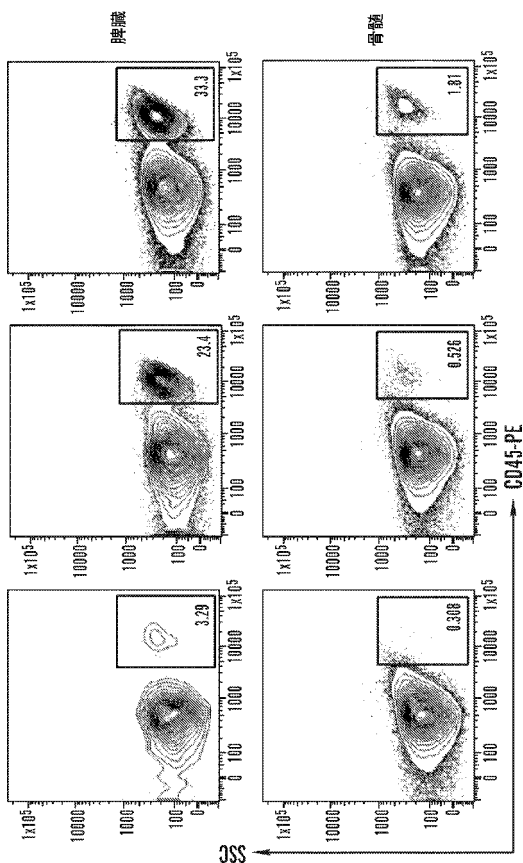
【図 5 B】



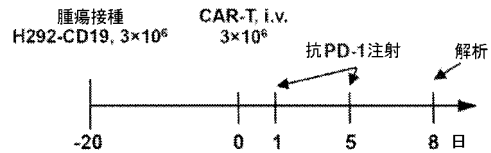
【図 5 C - 1】



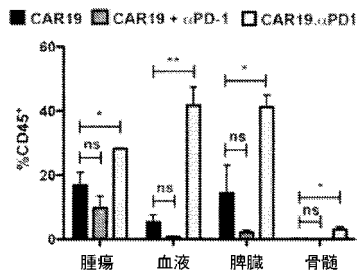
【図 5 C - 2】



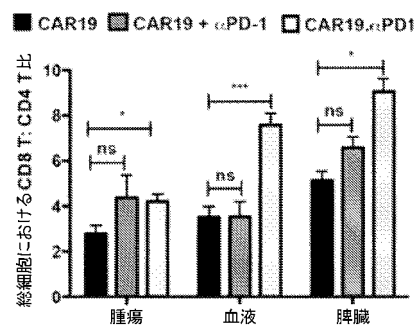
【図 6 A】



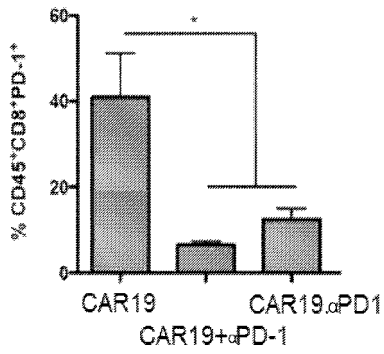
【図 6 B】



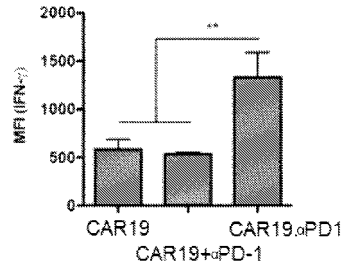
【図 6 C】



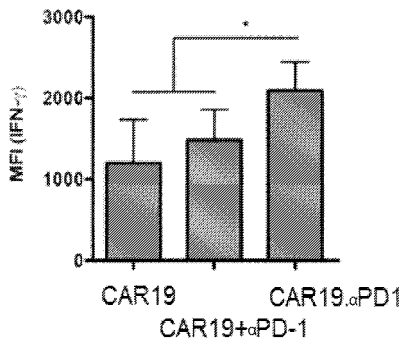
【図 6 D】



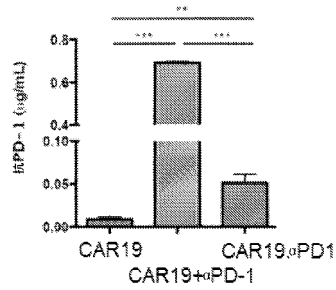
【図 6 F】



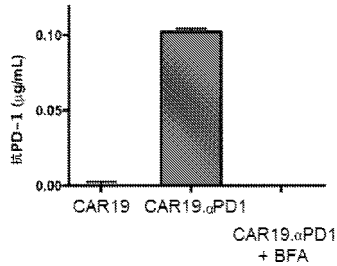
【図 6 E】



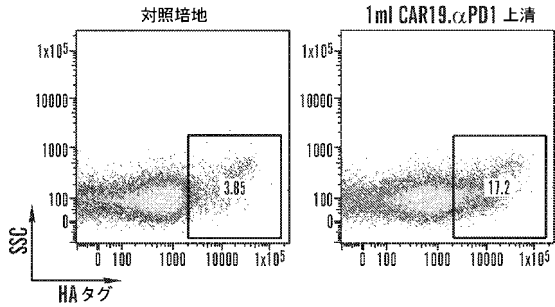
【図 6 G】



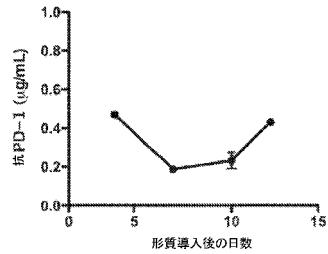
【図 7 A】



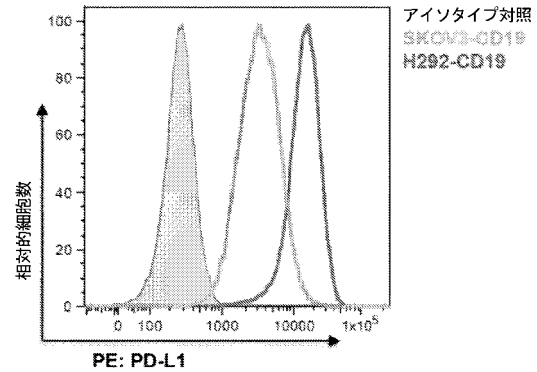
【図 7 D】



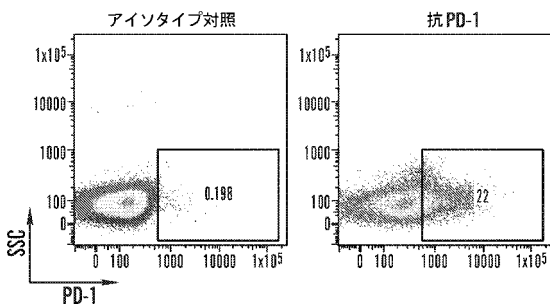
【図 7 B】



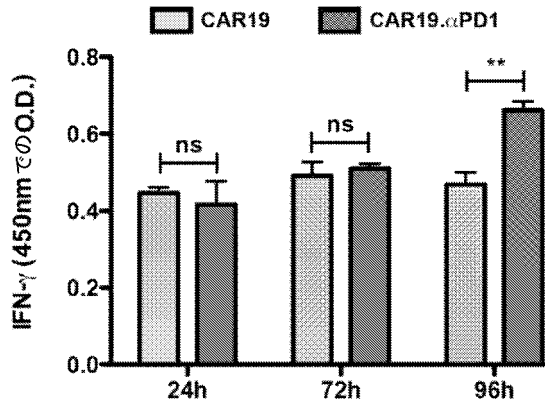
【図 8】



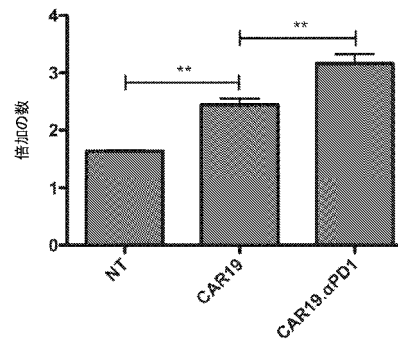
【図 7 C】



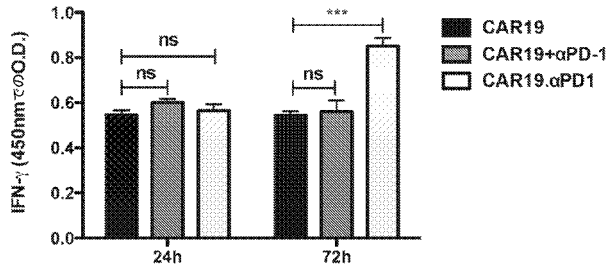
【図 9 A】



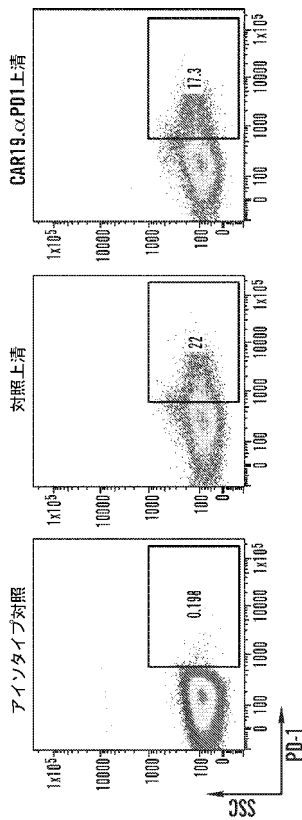
【図 10】



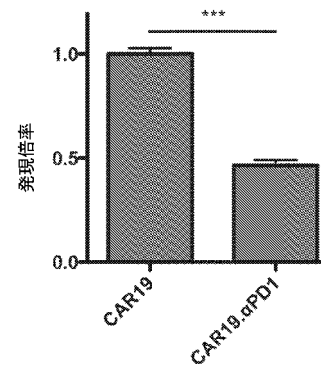
【図 9 B】



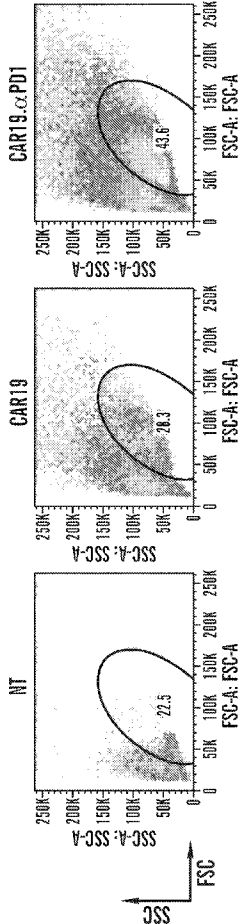
【図 11 A】



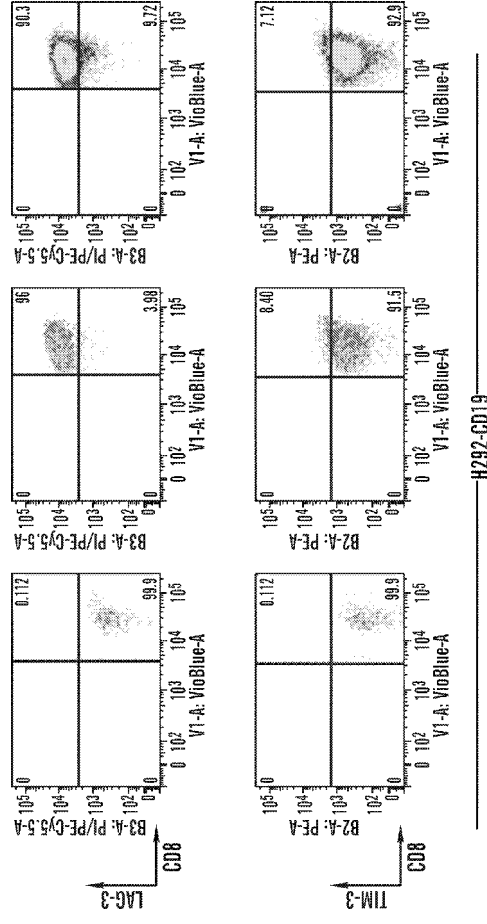
【図 11 B】



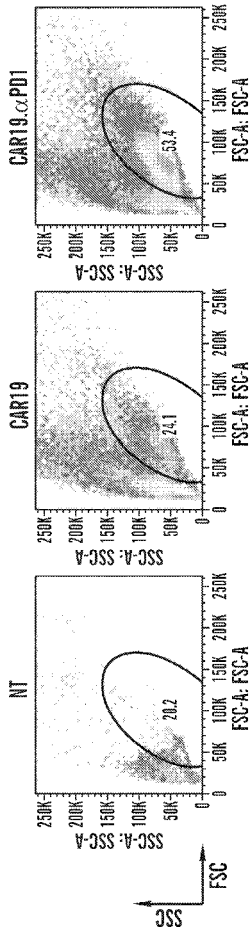
【図 12 A - 1】



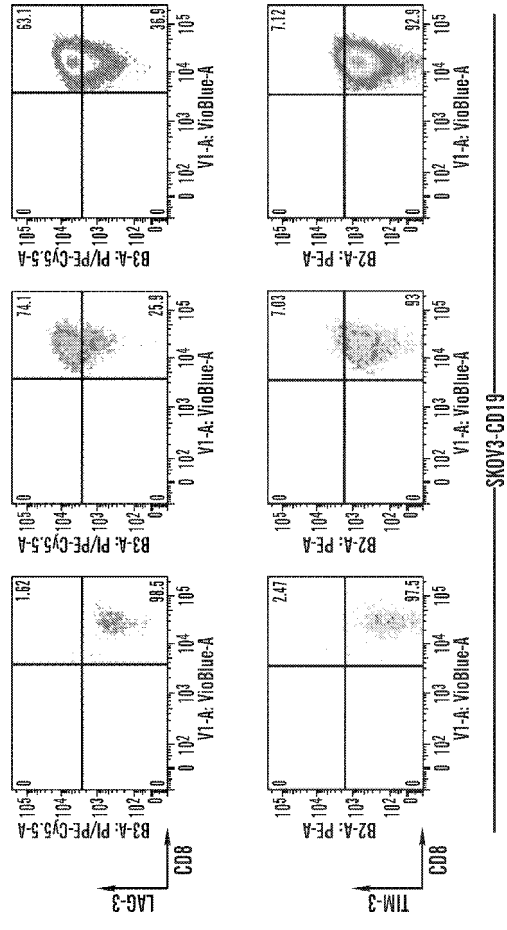
【図 12 A - 2】



【図 12 A - 3】



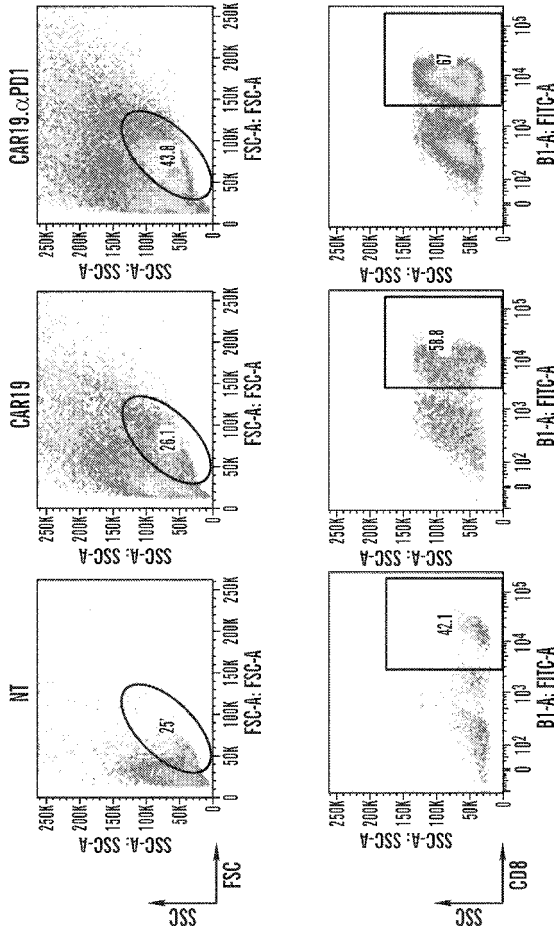
【図 12 A - 4】



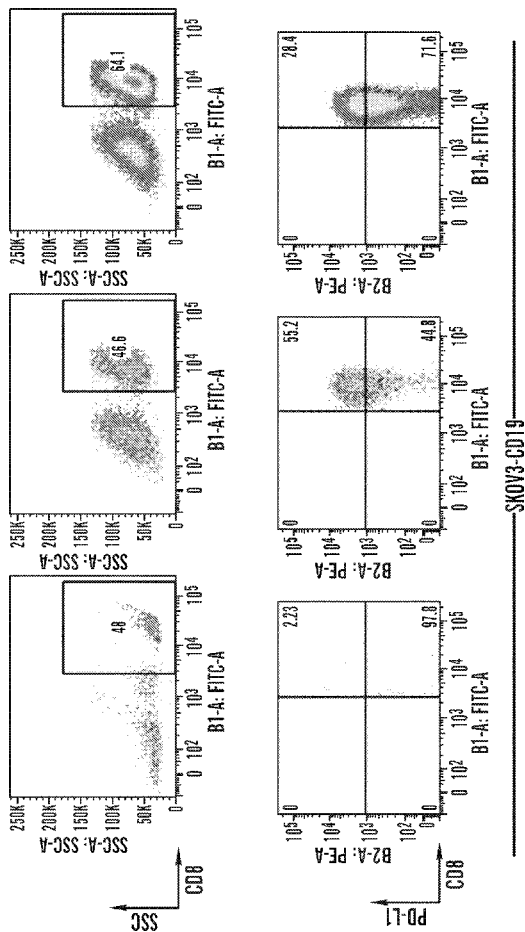
H292-CD19

SKOV3-CD19

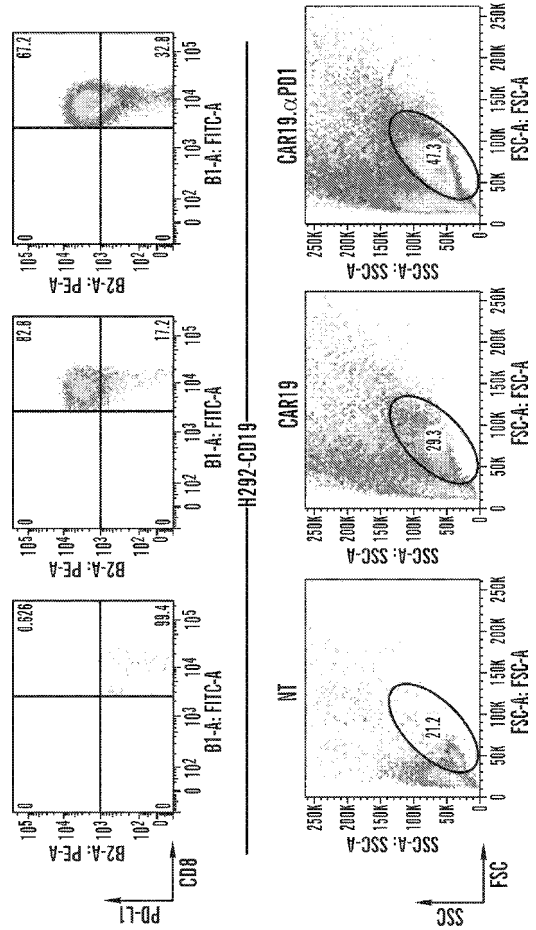
【図 1 2 B - 1】



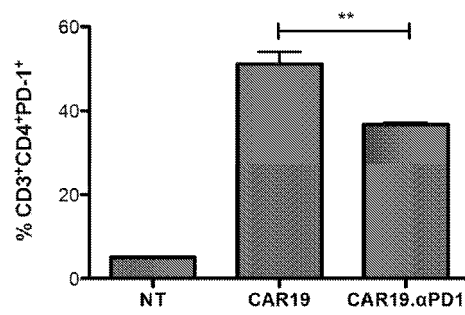
【図 1 2 B - 3】



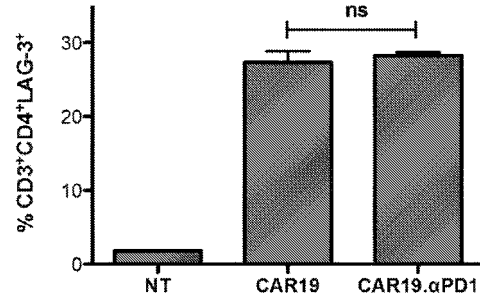
【図 1 2 B - 2】



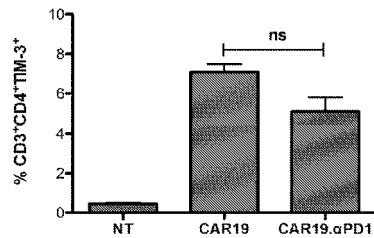
【図 1 3 A】



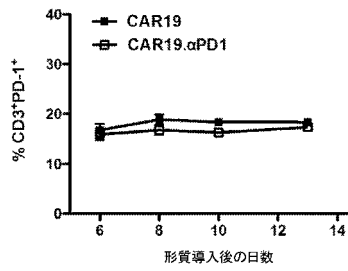
【図 1 3 B】



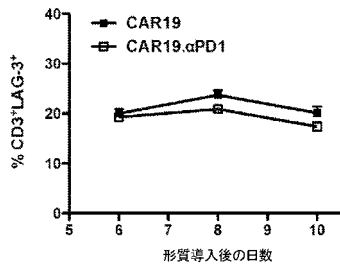
【図 1 3 C】



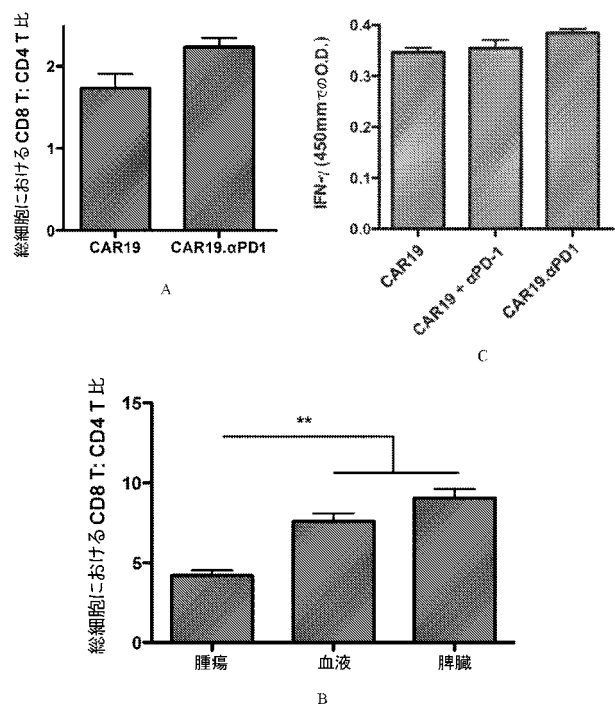
【図 1 3 D】



【図 1 3 E】



【図 1 4】



【配列表】

2020517263000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/028427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 14/705; C07K 14/725; C07K 16/28; C07K 16/3 (2018.01) CPC - A61K 35/17; A61K 38/00; A61K 48/005; A61P 35/00; C07K 7/00; C07K 14/4748; C07K 14/705; C07K 14/70503; C07K 14/7051; C07K 14/70517; C07K 14/70521; C07K 14/70578; C07K 16/00; C07K 16/28; C07K 16/2863; C07K 16/3015; C07K 16/3023; C07K 16/3038; C07K 16/3053; C07K 16/32; C07K 2317/24; C07K 2317/622; C07K 2317/73; C07K 2317/76; C07K 2319/02; C07K 2319/03; C12N 15/86; C12N 2740/16043 (2018.05) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/133.1; 530/387.1 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	WO 2016/172583 A1 (NOVARTIS AG et al) 27 October 2016 (27.10.2016) entire document	1-3, 5-7, 13-17 ----- 4, 8, 9
X -- Y	WO 2016/126608 A1 (NOVARTIS AG et al) 11 August 2016 (11.08.2016) entire document	10-12 ----- 8, 9
Y	WO 2014/134165 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 04 September 2014 (04.09.2014) entire document	4, 9
A	FESNAK et al. "Engineered T Cells: The Promise and Challenges of Cancer Immunotherapy," Nature Reviews Cancer, 23 August 2016 (23.08.2016), Vol. 16, Iss. 9, Pgs. 566-581. entire document.	1-17
A	IRVING et al. "Engineering Chimeric Antigen Receptor T-Cells for Racing in Solid Tumors: Don't Forget the Fuel," Frontiers in Immunology, 03 April 2017 (03.04.2017), Vol. 8, Article 267, Pgs. 1-19. entire document	1-17
A	SUAREZ et al. "Chimeric Antigen Receptor T Cells Secreting Anti-PD-L1 Antibodies More Effectively Regress Renal Cell Carcinoma in a Humanized Mouse Model," Oncotarget, 29 April 2016 (29.04.2016), Vol. 7, No. 23, Pgs. 34341-34355. entire document	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 June 2018		Date of mailing of the international search report 09 JUL 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		C 1 2 N 15/13		
C 1 2 N 15/54 (2006.01)		C 1 2 N 15/54		
C 1 2 N 15/55 (2006.01)		C 1 2 N 15/55		
C 1 2 N 15/53 (2006.01)		C 1 2 N 15/53		
C 1 2 N 15/49 (2006.01)		C 1 2 N 15/49		
C 1 2 N 15/37 (2006.01)		C 1 2 N 15/37		
C 1 2 N 15/38 (2006.01)		C 1 2 N 15/38		
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00		
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28		
C 0 7 K 14/735 (2006.01)		C 0 7 K 14/735		
C 0 7 K 14/71 (2006.01)		C 0 7 K 14/71		
C 0 7 K 14/715 (2006.01)		C 0 7 K 14/715		
C 0 7 K 14/72 (2006.01)		C 0 7 K 14/72		
C 1 2 N 9/12 (2006.01)		C 1 2 N 9/12		
C 1 2 N 9/16 (2006.01)		C 1 2 N 9/16	B	
C 1 2 N 9/06 (2006.01)		C 1 2 N 9/16	Z	
C 0 7 K 14/025 (2006.01)		C 1 2 N 9/06	Z	
C 0 7 K 14/03 (2006.01)		C 0 7 K 14/025		
C 0 7 K 14/16 (2006.01)		C 0 7 K 14/03		
C 1 2 N 15/63 (2006.01)		C 0 7 K 14/16		
		C 1 2 N 15/63	Z	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ワン ピン

アメリカ合衆国 9 0 0 2 4 カリフォルニア州 ロサンゼルス ウィルキンス アベニュー 1
0 6 6 1 # 6

(72)発明者 シリウォン ナトナリー

アメリカ合衆国 9 0 0 0 5 カリフォルニア州 ロサンゼルス サウス アードモア アベニュー
6 2 8 アpartment 2 4

(72)発明者 リ シ

アメリカ合衆国 9 0 0 1 5 カリフォルニア州 ロサンゼルス サウス オリーブ ストリート
1 1 5 0 スイート 2 3 0 0

F ターム(参考) 4B050 CC05 DD11 LL01

4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AA95Y AA97Y AB01 AC14 BA02 CA44

4C084 AA19 NA05 ZB26 ZC75

4C087 AA01 AA02 BB64 NA05 ZB26 ZC75

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA01 CA03 CA04 CA05 CA40

DA50 DA51 DA76 DA86 DA89 EA20 FA74