

(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2017-528433

(P2017-528433A)

(43) 公表日 平成29年9月28日 (2017.9.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B 0 6 3
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/436	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 245 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-503485 (P2017-503485)	(71) 出願人	504389991
(86) (22) 出願日	平成27年7月21日 (2015.7.21)		ノバルティス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月16日 (2017.3.16)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセル
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/041330		3 5
(87) 国際公開番号	W02016/014530	(71) 出願人	500429103
(87) 国際公開日	平成28年1月28日 (2016.1.28)		ザ トラストィーズ オブ ザ ユニバー
(31) 優先権主張番号	62/027, 152		シティ オブ ペンシルバニア
(32) 優先日	平成26年7月21日 (2014.7.21)		アメリカ合衆国 ペンシルバニア 1 9 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		0 4 - 6 2 8 3, フィラデルフィア,
(31) 優先権主張番号	62/076, 197		チェスナット ストリート 3 1 6 0,
(32) 優先日	平成26年11月6日 (2014.11.6)		スイート 2 0 0
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	62/164, 357		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成27年5月20日 (2015.5.20)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 低い免疫増強用量のmTOR阻害剤とCARの組み合わせ

(57) 【要約】

本発明は、一部、対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤およびCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞を投与することを含む、対象を処置する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の処置に使用するための m T O R 阻害剤であって、該 m T O R 阻害剤は対象の免疫応答を増強し、ここで、該対象は、C A R を発現するように操作した免疫エフェクター細胞を受け入れているか、受け入れようとしているか、または受ける予定である、m T O R 阻害剤。

【請求項 2】

m T O R 阻害剤が低い免疫増強用量である、請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 3】

次に掲げる工程を含む、C A R をコードする核酸がその中に配置された、場合により T 細胞である免疫エフェクター細胞を製造する方法： 10

c) 場合により T 細胞である免疫エフェクター細胞と m T O R 阻害剤を接触させる工程および

d) C A R をコードする核酸を免疫エフェクター細胞に導入する工程；

これらにより C A R をコードする核酸がその中に配置された、場合により T 細胞である免疫エフェクター細胞を製造し、

ここで、工程 a) の該接触は、該工程 b) の挿入の前、同時または後に行い；

ここで、m T O R 阻害剤は次に掲げる結果の 1 以上をもたらす：

1 a) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞の集団の増加；

1 b) P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞の集団の減少； 20

1 c) 場合により T 細胞である P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞／場合により T 細胞である P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞比の増加；

1 d) ナイーブ T 細胞数の増加；

1 e) 1 以上の次に掲げるマーカーの発現の増加：C D 6 2 L^高、C D 1 2 7^高、C D 2 7⁺ および B C L 2 (これは、場合により、記憶 T 細胞前駆体である記憶 T 細胞上である)；

1 f) 例えば、記憶 T 細胞、例えば、記憶 T 細胞前駆体の、K L R G 1 の発現減少；または

1 g) 場合により次の特徴の 1 つまたは組み合わせを有する細胞である、記憶 T 細胞前駆体数の増加：増加した C D 6 2 L^高、増加した C D 1 2 7^高、増加した C D 2 7⁺、減少した K L R G 1 および増加した B C L 2； 30

ここで、1 a)、1 b)、1 c)、1 d)、1 e)、1 f) または 1 g) は、場合により、免疫エフェクター細胞の非接触集団と比較して、場合により、少なくとも一過性に、生じる。

【請求項 4】

接触がエクスピボで行われる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

C A R をコードする核酸がその中に配置された、場合により T 細胞である免疫エフェクター細胞を製造する方法であって、

a) 次のとおり製造された、場合により T 細胞である、免疫エフェクター細胞を提供し 40

i) 次に掲げる現象の 1 以上が生じるのに十分な時間、場合により R A D 0 0 1 またはラパマイシンである m T O R 阻害剤を対象に投与し：

1 a) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞の集団の増加；

1 b) P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞の集団の減少；

1 c) 場合により T 細胞である P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞／場合により T 細胞である P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞比の増加；

1 d) ナイーブ T 細胞数の増加；

1 e) 次に掲げるマーカーの 1 以上の発現の増加：C D 6 2 L^高、C D 1 2 7^高、C D 2 7⁺ および B C L 2 (これは、場合により、場合により記憶 T 細胞前駆体である記 50

憶 T 細胞上である)；

1 f) 例えば、記憶 T 細胞、例えば、記憶 T 細胞前駆体の、K L R G 1 の発現減少；または

1 g) 場合により次の特徴の 1 つまたは組み合わせを有する細胞である、記憶 T 細胞前駆体数の増加：増加した C D 6 2 L^高、増加した C D 1 2 7^高、増加した C D 2 7⁺、減少した K L R G 1 および増加した B C L 2；

ここで、1 a)、1 b)、1 c)、1 d)、1 e)、1 f) または 1 g) は、対象または対象から採取した場合により T 細胞である免疫エフェクター細胞の調製物において、場合により、非処置対象と比較して、場合により、少なくとも一過性に生じる；そして

(ii) 対象から、場合により T 細胞である免疫エフェクター細胞を採取し；そして

b) C A R をコードする核酸を、採取した、場合により T 細胞である免疫エフェクター細胞に導入し、
それにより C A R をコードする核酸がその中に配置された、場合により T 細胞である免疫エフェクター細胞を製造する。

【請求項 6】

C A R が抗原結合ドメイン(これは場合により抗体または抗体フラグメント、T C R または T C R フラグメント)、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン(これは場合により共刺激ドメインおよび／または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン)を含む、請求項 1～5 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 7】

抗原結合ドメインが腫瘍マーカーに結合する、請求項 6 に記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 8】

腫瘍マーカーが固形腫瘍マーカーまたは血液癌マーカーである、請求項 7 に記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 9】

m T O R 阻害剤の投与を、C A R を発現するように操作した免疫エフェクター細胞の投与前に開始する、請求項 1、2 または 6～8 のいずれかに記載の使用のための組成物。

【請求項 10】

m T O R 阻害剤の投与が C A R を発現するように操作した免疫エフェクター細胞の投与前に完了する、請求項 1、2 または 6～9 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 11】

m T O R 阻害剤の投与が C A R を発現するように操作した免疫エフェクター細胞の投与と重複する、請求項 1、2 または 6～9 のいずれかに記載の使用のための組成物。

【請求項 12】

C A R を発現するように操作した免疫エフェクター細胞を、場合により T 細胞である P D 1 陰性免疫エフェクター細胞レベルまたは場合により T 細胞である P D 1 陰性免疫エフェクター細胞／場合により T 細胞である P D 1 陽性免疫エフェクター細胞比が、少なくとも一過性に、増加するように、m T O R 阻害剤の十分な時間または十分な用量投薬後に投与する、請求項 1 または 2 に記載の使用のための組成物。

【請求項 13】

C A R を発現するように操作する免疫エフェクター細胞を、対象または対象からの採取物における場合により T 細胞である P D 1 陰性免疫エフェクター細胞のレベルまたは場合により T 細胞である P D 1 陰性免疫エフェクター細胞／場合により T 細胞である P D 1 陽性免疫エフェクター細胞比が、少なくとも一過性に、増加するように、m T O R 阻害剤の十分な時間または十分な用量投薬後に採取する、請求項 1～2 のいずれかに記載の使用のための組成物。

【請求項 14】

mTOR阻害剤の投与を、対象がCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞を受けた後継続する、請求項1、2、6～9または11～13のいずれかに記載の使用のための組成物。

【請求項15】

mTOR阻害剤がアロステリックmTOR阻害剤である、請求項1～14のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項16】

mTOR阻害剤がRAD001である、請求項1～15のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項17】

mTOR阻害剤がラパマイシンある、請求項1～15のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項18】

mTOR阻害剤が触媒的阻害剤であり、場合によりキナーゼ阻害剤である、請求項1～14のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項19】

キナーゼ阻害剤がmTORに選択的である、請求項18に記載の使用のための組成物または方法。

【請求項20】

キナーゼ阻害剤がBEZ235およびCCG168から選択される、請求項18に記載の使用のための組成物または方法。

【請求項21】

処置または接触が、複数のmTOR阻害剤での処置または接触を含む、請求項1～20のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項22】

mTOR阻害剤を、対象の末梢血または対象から単離したT細胞の調製物におけるPD-1陽性T細胞の比率の減少、PD-1陰性T細胞の比率の増加またはPD-1陰性T細胞／PD-1陽性T細胞比の増加のために十分な時間投与または接触させる、請求項1～21のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項23】

処置または接触がPD-1とPD-L1またはPD-L2の結合が介在する負の免疫応答の阻害を含む、請求項1～22のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項24】

処置または接触が増殖可能なT細胞の数の増加を含む、請求項1～23のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項25】

処置または接触が細胞毒性機能が可能なT細胞の数、サイトカイン分泌または活性化の増加を含む、請求項1～24のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項26】

mTOR阻害剤を、次に掲げる現象の1以上が生じるのに十分な時間、CARを発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞(例えば、免疫エフェクター細胞の採取前または後)の投与前に投与する：

i) PD-1陽性免疫エフェクター細胞の数の減少；

ii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞の数の増加；

iii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞／PD-1陽性免疫エフェクター細胞比の増加；

iv) ナイーブT細胞の数の増加；

v) 次に掲げるマーカーの1以上の発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；

vi) 例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；また

10

20

30

40

50

は

vii) 次の特徴の 1 つまたは組み合わせを有する記憶 T 細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加した CD 6 2 L^高、増加した CD 1 2 7^高、増加した CD 2 7⁺、減少した K L R G 1 および増加した B C L 2；および

i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi) または vii) は、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に、生じる、請求項 1、2 および 6～25 のいずれかに記載の使用のための組成物。

【請求項 27】

mTOR 阻害剤が、例えば、p70 S6K 阻害により測定して、少なくとも 5 の、しかし、90%を超えない mTOR 阻害と関係する用量である、請求項 1～26 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

10

【請求項 28】

mTOR 阻害剤が、例えば、p70 S6K 阻害により測定して、少なくとも 10%の、しかし、80%を超えない mTOR 阻害と関係する用量である、請求項 1～27 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 29】

mTOR 阻害剤が、例えば、p70 S6K 阻害により測定して、少なくとも 10%の、しかし、40%を超えない mTOR 阻害と関係する用量である、請求項 1～28 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 30】

mTOR 阻害剤が、場合により週に 1 回、場合により持続放出性剤形で、0.3～60 mg、1.5～30 mg、7.5～22.5 mg、9～18 mg または約 15 mg の用量であり、mTOR 阻害剤が RAD001 である、請求項 1～29 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

20

【請求項 31】

mTOR 阻害剤が RAD001 以外の mTOR 阻害剤であり、mTOR 阻害剤が場合により週に 1 回、場合により持続放出性剤形で、週に 1 回、持続放出性剤形の 0.3～60 mg、1.5～30 mg、7.5～22.5 mg、9～18 mg または約 15 mg の RAD001 と生物学的同等の用量である、請求項 1～30 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

30

【請求項 32】

mTOR 阻害剤が、場合により 1 日 1 回、場合により即時放出剤形で、0.005～1.5 mg、0.01～1.5 mg、0.1～1.5 mg、0.2～1.5 mg、0.3～1.5 mg、0.4～1.5 mg、0.5～1.5 mg、0.6～1.5 mg、0.7～1.5 mg、0.8～1.5 mg、1.0～1.5 mg、0.3～0.6 mg または約 0.5 mg の用量であり、ここで、mTOR 阻害剤が RAD001 である、請求項 1～30 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 33】

mTOR 阻害剤が RAD001 以外の mTOR 阻害剤であり、mTOR 阻害剤が、場合により 1 日 1 回、場合により即時放出剤形で、1 日 1 回、即時放出剤形の 0.005～1.5 mg、0.01～1.5 mg、0.1～1.5 mg、0.2～1.5 mg、0.3～1.5 mg、0.4～1.5 mg、0.5～1.5 mg、0.6～1.5 mg、0.7～1.5 mg、0.8～1.5 mg、1.0～1.5 mg、0.3～0.6 mg または約 0.5 mg の RAD001 と生物学的同等である用量である、請求項 1～30 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

40

【請求項 34】

mTOR 阻害剤が RAD001 であり、約 0.1～3 ng/ml、0.3 ng/ml 未満～3 ng/ml または 0.3 ng/ml 未満～1 ng/ml の範囲の RAD001 のトラフレベルを提供する用量である、請求項 1～30 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 35】

mTOR 阻害剤は RAD001 以外であり、約 0.1～3 ng/ml、0.3 ng/ml 未満～3 ng/ml または 0.3 ng/ml 未満～1 ng/ml の範囲の RAD001 のトラフレベルを提供す

50

る R A D 0 0 1 の用量と生物学的同等である用量である、請求項 1 ～ 3 0 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 3 6】

対象が癌を有し、方法が癌に対する対象の免疫応答の促進を含む、請求項 1、2 または 6 ～ 3 5 のいずれかに記載の使用のための組成物。

【請求項 3 7】

癌における細胞が P D - L 1 または P D - L 2 を発現する、請求項 3 6 に記載の使用のための組成物。

【請求項 3 8】

癌において微小環境における細胞が P D - L 1 または P D - L 2 を発現する、請求項 3 6 に記載の使用のための組成物。

10

【請求項 3 9】

癌が固形腫瘍を含む、請求項 3 6 に記載の使用のための組成物。

【請求項 4 0】

癌が血液癌である、請求項 3 6 に記載の使用のための組成物。

【請求項 4 1】

癌が C L L であり、場合により C A R の抗原結合ドメインが C D 1 9 を標的とする、請求項 3 6 に記載の使用のための組成物。

【請求項 4 2】

癌が黒色腫である、請求項 3 6 ～ 3 8 のいずれかに記載の使用のための組成物。

20

【請求項 4 3】

対象がヒトである、請求項 3 6 ～ 4 2 のいずれかに記載の使用のための組成物。

【請求項 4 4】

免疫エフェクター細胞が T 細胞である、請求項 1 ～ 4 3 のいずれかに記載の使用のための組成物または方法。

【請求項 4 5】

C A R をコードする核酸が配置された、場合により T 細胞である免疫エフェクター細胞を対照に導入することをさらに含み、対象は場合により、免疫エフェクター細胞が由来するまたは異なる対象である、請求項 3 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

対象でまたは対象から採った T 細胞で、P D 1 陰性または場合により T 細胞である P D 1 陽性免疫エフェクター細胞のレベルを評価することをさらに含む、請求項 3 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、米国特許出願 6 2 / 0 2 7 1 5 2 号 (2 0 1 4 年 7 月 2 1 日出願)、米国特許出願 6 2 / 0 7 6 1 9 7 号 (2 0 1 4 年 1 1 月 6 日出願) および米国特許出願 6 2 / 1 6 4 3 5 7 号 (2 0 1 5 年 5 月 2 0 日出願) に基づく優先権を主張し、これらの内容をその全体を引用により本明細書に包含させる。

40

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、電子的に ASCII 形式で提出している配列表を含み、その全体を引用により本明細書に包含させる。該 ASCII コピーは、2 0 1 5 年 7 月 2 1 日に作成し、N2067-7065W0_SL.txt の名称であり、1 6 9 , 2 5 6 バイトサイズである。

【0 0 0 3】

発明の分野

本発明は、一般に疾患、例えば、腫瘍マーカーの発現と関係する疾患を処置するために、低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤と、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように操

50

作された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の組み合わせの投与に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

機能的かつ有効なT細胞応答は、例えば、感染症および癌に対する有効な免疫応答において重要な役割を有する。しかしながら、慢性感染または癌のようなある状況下で、エフェクターT細胞は、プログラム細胞死リガンド-1(PD-L1)/プログラム細胞死1(PD-1)相互作用を含む種々の免疫抑制性機構により抑制され得て、T細胞枯渇に至る(Pen et al. Gene Therapy 21, 262-271, 2014)。プログラム細胞死リガンド-1(PD-L1)は、通常大部分の細胞型により発現され、一方その受容体PD-1は、活性化T細胞および制御性T(T_{reg})細胞のようなある免疫細胞にしか存在しないと考えられる。また、PD-L1/PD-1結合は、自己免疫性応答を阻止する末梢T細胞耐受性の維持に重要であるとも考えられる。他方で、高レベルのPD-1発現は、一般にT細胞機能喪失と相関し、ウイルス感染の場合はウイルス負荷の増加に至る(Pen et al. Gene Therapy 21, 262-271, 2014)。

【発明の概要】

【0005】

発明の要約

ここに開示する方法および組成物は、疾患、例えば、癌関連抗原(または腫瘍マーカー)の発現と関係する疾患を処置するための、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤とキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の投与に関する。

【0006】

例えば、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、RAD001のようなアロステリックmTOR阻害剤での部分的mTOR阻害が、対象における免疫機能の改善に有効であり、該対象の処置にCAR治療と組み合わせることができることが判明した。理論に縛られることを望まないが、低い免疫増強用量(例えば、免疫系を完全に抑制するには不十分であるが、免疫機能の改善には十分である用量)のmTOR阻害剤での処置は、PD-1陽性T細胞の減少またはPD-1陰性細胞の増加を伴うと考えられる。PD-1陰性T細胞ではなく、PD-1陽性T細胞は、PD-1リガンド、例えば、PD-L1またはPD-L2を発現する細胞との結合により枯渇させ得る。これに加えてまたはこれとは別に、同様に理論に縛られることを望まないが、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤での処置により、例えば、少なくとも一過性に、例えば、非処置対象と比較して、ナイーブT細胞数を増加できると考えられる。これに加えてまたはこれとは別に、同様に理論に縛られることを望まないが、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤での処置は、十分な時間または十分な投与の後、次のマーカーの1以上の発現の増加をもたらすと考えられる：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、 $CD62L^{高}$ 、 $CD127^{高}$ 、 $CD27^{+}$ およびBCL2；

例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；および次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加した $CD62L^{高}$ 、増加した $CD127^{高}$ 、増加した $CD27^{+}$ 、減少したKLRG1および増加したBCL2；ここで、上記のいずれかの変化は、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に生じる。それゆえに、本発明の態様は、少なくとも一部、例えば、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤での、部分的mTOR阻害が、プログラム細胞死(PD)-1陽性CD4およびCD8 Tリンパ球のパーセンテージの減少と関係するとの認識に基づく。

【0007】

ある態様において、この試みは、対象における、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の性能の最適化に使用できる。理論に縛られることを望まないが、ある態様において、

内在性、非修飾免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の性能が改善されると考えられる。理論に縛られることを望まないが、ある態様において、CARを発現するように操作するために採取した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の性能が改善すると考えられる。他の態様において、CARを発現するように操作されているまたは操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の数を増やすまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比を増やす量のmTOR阻害剤と接触させることにより、エキスビボで処理できる。

【0008】

よって、ある面において、本発明は、対象、例えば、ヒト対象の免疫応答を処置する、例えば促進する方法であって、

a)対象に低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、RAD001またはラパマイシンを投与し、そして

b)対象にCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を投与することを含み、

それにより、対象の免疫応答を処置する、例えば増強する、方法に関する。

【0009】

ある態様において、CARは、抗原結合ドメイン(例えば、抗体または抗体フラグメント、TCRまたはTCRフラグメント)、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメインおよび／または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン)を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、癌関連抗原(または腫瘍マーカー)に結合する。ある態様において、癌関連抗原(または腫瘍マーカー)は、固形癌関連抗原(または固形腫瘍マーカー)である。ある態様において、癌関連抗原(または腫瘍マーカー)は、血液癌マーカーである。

【0010】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与を、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の投与前に開始する。

【0011】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与を、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の投与前に完了する。

【0012】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の投与と重複して行う。

【0013】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与を、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の投与後も継続する。

【0014】

ある態様において、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベルまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比が少なくとも一過性に、増加するように、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の十分な時間または十分な用量の投与後に投与する。

【0015】

ある態様において、CARを発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベルまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T

10

20

30

40

50

細胞の比が少なくとも一過性に、増加するように、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の十分な時間または十分な用量投与の後に採取する。

【0016】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤を、対象の末梢血または対象から単離したT細胞の調製物における、PD-1陽性T細胞の比率の減少、PD-1陰性T細胞の比率の増加またはPD-1陰性T細胞／PD-1陽性T細胞比の増加に十分な時間の後に投与する。

【0017】

ある態様において、対象、例えば、ヒト対象における免疫応答を処置する、例えば促進する方法は、PD-1とPD-L1またはPD-L2の結合が介在する負の免疫応答の阻

10

【0018】

ある態様において、対象、例えば、ヒト対象における免疫応答を処置する、例えば促進する方法は、増殖が可能なT細胞の数の増加を含む。

【0019】

ある態様において、対象、例えば、ヒト対象における免疫応答を処置する、例えば促進する方法は、細胞毒性機能が可能なT細胞の数、サイトカイン分泌または活性化の増加を含む。

【0020】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、少なくとも1日、5日、10日、20日、30日または60日、部分的な、しかし完全ではない、mTORの阻害をもたらす。

20

【0021】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤を、次の1以上が生じるのに十分な時間、CARを発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞(例えば、免疫エフェクター細胞の採取前または後)の投与の前に投与する：

i) PD-1陽性免疫エフェクター細胞の数の減少；

ii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞の数の増加；

iii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞／PD-1陽性免疫エフェクター細胞比の増加

30

；

iv) ナイーブT細胞の数の増加；

v) 1以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；

vi) 例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；または

vii) 次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加したCD62L^高、増加したCD127^高、増加したCD27⁺、減少したKLRG1および増加したBCL2；

そして、i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi)またはvii)は、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に、生じる。ある態様において、CARを発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与の開始または完了後、少なくとも5日、10日、15日、20日、25日、30日、35日、40日、45日、50日、55日または60日に採取する。

40

【0022】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤を、次の1以上が、例えば、採取細胞または操作細胞(または非採取細胞または両者)で起こるのに十分な時間、CARを発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の採取前に投与する：

i) PD-1陽性免疫エフェクター細胞の数の減少；

ii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞の数の増加；

iii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞／PD-1陽性免疫エフェクター細胞比の増加

50

;

iv) ナイーブ T 細胞の数の増加;

v) 1 以上の次のマーカーの発現の増加: 例えば、記憶 T 細胞、例えば、記憶 T 細胞前駆体の、CD 6 2 L^高、CD 1 2 7^高、CD 2 7⁺ および B C L 2 ;

vi) 例えば、記憶 T 細胞、例えば、記憶 T 細胞前駆体の、K L R G 1 の発現減少; または

vii) 次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶 T 細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加: 増加した CD 6 2 L^高、増加した CD 1 2 7^高、増加した CD 2 7⁺、減少した K L R G 1 および増加した B C L 2 ;

そして、i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi) または vii) は、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に、生じる。ある態様において、R C A R を発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞を、低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤の投与の開始または完了後、少なくとも 5 日、10 日、15 日、20 日、25 日、30 日、35 日、40 日、45 日、50 日、55 日または 60 日に採取する。

【0023】

ある態様において、低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤を、C A R を発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞の採取後、次の 1 以上が生じるのに十分な時間投与する:

i) P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞の数の減少;

ii) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞の数の増加;

iii) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞 / P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞比の増加;

iv) ナイーブ T 細胞の数の増加;

v) 1 以上の次のマーカーの発現の増加: 例えば、記憶 T 細胞、例えば、記憶 T 細胞前駆体の、CD 6 2 L^高、CD 1 2 7^高、CD 2 7⁺ および B C L 2 ;

vi) 例えば、記憶 T 細胞、例えば、記憶 T 細胞前駆体の、K L R G 1 の発現減少; または

vii) 次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶 T 細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加: 増加した CD 6 2 L^高、増加した CD 1 2 7^高、増加した CD 2 7⁺、減少した K L R G 1 および増加した B C L 2 ;

そして、i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi) または vii) は、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に、生じる。

【0024】

ある態様において、低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤を、C A R を発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞の投与後、次の 1 以上が生じるのに十分な時間投与する:

i) P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞の数の減少;

ii) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞の数の増加;

iii) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞 / P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞比の増加;

iv) ナイーブ T 細胞の数の増加;

v) 1 以上の次のマーカーの発現の増加: 例えば、記憶 T 細胞、例えば、記憶 T 細胞前駆体の、CD 6 2 L^高、CD 1 2 7^高、CD 2 7⁺ および B C L 2 ;

vi) 例えば、記憶 T 細胞、例えば、記憶 T 細胞前駆体の、K L R G 1 の発現減少; または

vii) 次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶 T 細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加: 増加した CD 6 2 L^高、増加した CD 1 2 7^高、増加した CD 2 7⁺、減少した K L R G 1 および増加した B C L 2 ;

そして、i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi) または vii) は、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に、生じる。

10

20

30

40

50

【0025】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤を、RCARを発現するように操作しているまたは操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞に、エキスピボで次の1以上が生じるのに十分な時間投与する：

i) PD-1陽性免疫エフェクター細胞の数の減少；

ii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞の数の増加；

iii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞／PD-1陽性免疫エフェクター細胞比の増加；

iv) ナイーブT細胞の数の増加；

v) 1以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；

vi) 例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；または

vii) 次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加したCD62L^高、増加したCD127^高、増加したCD27⁺、減少したKLRG1および増加したBCL2；

そして、i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi)またはvii)は、例えば、非処理細胞と比較して、例えば、少なくとも一過性に、生じる。

【0026】

ある態様において、mTOR阻害剤はアロステリックmTOR阻害剤である。ある態様において、mTOR阻害剤はRAD001である。ある態様において、mTOR阻害剤はラパマイシンある。

【0027】

ある態様において、mTOR阻害剤は、触媒的阻害剤、例えば、キナーゼ阻害剤である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、mTORに選択的である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、BEZ235およびCCG168から選択される。

【0028】

ある態様において、低い免疫増強用量は、複数のmTOR阻害剤を含む。ある態様において、用量は、アロステリックおよび触媒的mTOR阻害剤を含む。

【0029】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤は、例えば、p70S6K阻害により測定して、少なくとも5%の、しかし、90%を超えないmTOR阻害と関係する。ある態様において、mTOR阻害剤は、RAD001を含む。

【0030】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤は、例えば、p70S6K阻害により測定して、少なくとも10%の、しかし、80%を超えないmTOR阻害と関係する。ある態様において、mTOR阻害剤は、RAD001を含む。

【0031】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤は、例えば、p70S6K阻害により測定して、少なくとも10%の、しかし、40%を超えないmTOR阻害と関係する。ある態様において、mTOR阻害剤は、RAD001を含む。

【0032】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、週に1回、例えば、即時放出剤形で、0.1～20mg、0.5～10mg、2.5～7.5mg、3～6mgまたは約5mgのRAD001の投与を含む。

【0033】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、即時放出剤形で、約5mgのRAD001の投与を含む。

【0034】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回の

10

20

30

40

50

、即時放出剤形の0.1～20mg、0.5～10mg、2.5～7.5mg、3～6mgまたは約5mgのRAD001と生物学的同等量のRAD001以外のmTOR阻害剤の量の、例えば、週に1回、例えば、即時放出剤形での投与を含む。

【0035】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、即時放出剤形の約5mgのRAD001と生物学的同等である、RAD001以外のmTOR阻害剤の量の、週に1回、即時放出剤形での投与を含む。

【0036】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、週に1回、例えば、徐放性剤形で、0.3～60mg、1.5～30mg、7.5～22.5mg、9～18mgまたは約15mgのRAD001の投与を含む。

10

【0037】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、徐放性剤形で、約15mgのRAD001の投与を含む。

【0038】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、徐放性剤形の0.3～60mg、1.5～30mg、7.5～22.5mg、9～18mgまたは約15mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、例えば、週に1回、例えば、徐放性剤形での投与を含む。

【0039】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、徐放性剤形の約15mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、週に1回、徐放性剤形での投与を含む

20

【0040】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、1日1回、例えば、即時放出剤形で、0.005～1.5mg、0.01～1.5mg、0.1～1.5mg、0.2～1.5mg、0.3～1.5mg、0.4～1.5mg、0.5～1.5mg、0.6～1.5mg、0.7～1.5mg、0.8～1.5mg、1.0～1.5mg、0.3～0.6mgまたは約0.5mgのRAD001の投与を含む。

【0041】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、1日1回、即時放出剤形で、約0.5mgのRAD001の投与を含む。

30

【0042】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、1日1回、即時放出剤形の0.005～1.5mg、0.01～1.5mg、0.1～1.5mg、0.2～1.5mg、0.3～1.5mg、0.4～1.5mg、0.5～1.5mg、0.6～1.5mg、0.7～1.5mg、0.8～1.5mg、1.0～1.5mg、0.3～0.6mgまたは約0.5mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、例えば、1日1回、例えば、即時放出剤形での投与を含む。

【0043】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、1日1回、即時放出剤形の約0.5mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、1日1回、即時放出剤形での投与を含む。

40

【0044】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、1日1回、例えば、徐放性剤形で、0.015～4.5mg、0.03～4.5mg、0.3～4.5mg、0.6～4.5mg、0.9～4.5mg、1.2～4.5mg、1.5～4.5mg、1.8～4.5mg、2.1～4.5mg、2.4～4.5mg、3.0～4.5mg、0.9～1.8mgまたは約1.5mgのRAD001の投与を含む。

【0045】

50

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、1日1回、徐放性剤形の0.015～4.5mg、0.03～4.5mg、0.3～4.5mg、0.6～4.5mg、0.9～4.5mg、1.2～4.5mg、1.5～4.5mg、1.8～4.5mg、2.1～4.5mg、2.4～4.5mg、3.0～4.5mg、0.9～1.8mgまたは約1.5mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、例えば、1日1回、例えば、徐放性剤形での投与を含む。

【0046】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、週に1回、例えば、徐放性剤形で、0.1～30mg、0.2～30mg、2～30mg、4～30mg、6～30mg、8～30mg、10～30mg、1.2～30mg、14～30mg、16～30mg、20～30mg、6～12mgまたは約10mgのRAD001の投与を含む。 10

【0047】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、徐放性剤形の0.1～30mg、0.2～30mg、2～30mg、4～30mg、6～30mg、8～30mg、10～30mg、1.2～30mg、14～30mg、16～30mg、20～30mg、6～12mgまたは約10mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、例えば、週に1回、例えば、徐放性剤形での投与を含む。

【0048】

ある態様において、mTOR阻害剤はRAD001であり、用量は、約0.1～3ng/ml、0.3ng/ml未満～3ng/mlまたは0.3ng/ml未満～1ng/mlの範囲のRAD001のトラフレベルを提供する。 20

【0049】

ある態様において、mTOR阻害剤はRAD001以外であり、用量は、約0.1～3ng/ml、0.3ng/ml未満～3ng/mlまたは0.3ng/ml未満～1ng/mlの範囲のRAD001のトラフレベルを提供するRAD001の用量と生物学的同等である。

【0050】

ある態様において、対象は癌を有し、方法は、癌に対する対象の免疫応答の促進を含む。ある態様において、対象は、癌を有することに基づき選択した。ある態様において、癌の細胞はPD-L1またはPD-L2を発現する。ある態様において、癌微小環境における細胞はPD-L1またはPD-L2を発現する。 30

【0051】

ある態様において、癌は固形腫瘍を含む。ある態様において、癌は血液癌である。ある態様において、癌は白血病である。ある態様において、癌は慢性リンパ性白血病(CLL)である。ある態様において、癌はCLLであり、ここで、CARの抗原結合ドメインは、CD19を標的とする。ある態様において、癌は黒色腫である。

【0052】

ある態様において、方法は、対象へのさらなる処置、例えば、化学療法、放射線、細胞治療、骨髄移植の適用をさらに含む。ある態様において、方法は、T細胞を殺すさらなる処置、例えば、放射線または細胞毒性化学療法の適用をさらに含む。ある態様において、方法は、対象にビタミンE、ビタミンA、抗細菌抗生物質、抗酸化剤、L-カルニチン、リボ酸、メトホルミン、レスベラトロール、レプチン、非ステロイド抗炎症剤またはCOX阻害剤のようなmTOR経路阻害剤を投与することをさらに含む。ある態様において、方法は、対象にメトホルミンを投与することをさらに含む。ある態様において、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量を、さらなる処置開始の前または後に投与する。ある態様において、方法は、さらに、癌のさらなる処置の適用を含む 40

【0053】

ある態様において、対象は免疫不全である。ある態様において、対象はHIV+またはAIDSである。ある態様において、対象は感染性疾患を有する。

【0054】

ある態様において、対象は、免疫応答障害を有する。ある態様において、対象は免疫老 50

化である。ある態様において、対象は、加齢関連状態を有する。

【0055】

ある態様において、対象、例えば、ヒト対象における免疫応答を処置する、例えば促進する方法は、さらに、対象における抗体に対する免疫応答の増強を含む。ある態様において、方法は、さらに、対象への抗原またはワクチンの投与を含む。ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与の過程の前に、方法は、抗原に対する免疫応答障害を有する対象を特定する過程を含む。

【0056】

ある態様において、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞は、ここに記載する細胞、例えば、ヒトT細胞またはヒトNK細胞、例えば、ここに記載するヒトT細胞またはここに記載するヒトNK細胞である。ある態様において、ヒトT細胞は、CD8⁺ T細胞である。

【0057】

他の態様において、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞は、さらに、他の薬剤、例えば、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤を発現できる。例えば、ある態様において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であり得る。阻害分子の例は、例えば、ここに記載するような、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータを含む。ある態様において、阻害分子を阻害する薬剤は、細胞に正のシグナルを提供する第二ポリペプチド、例えば、ここに記載する細胞内シグナル伝達ドメインに結合した、第一ポリペプチド、例えば、阻害分子を含む。ある態様において、薬剤は、例えば、PD-1、PD-L1、PD-L2、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、CTLA4、VISTA、CD160、BTLA、LAIR1、TIM3、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTIGITのような、阻害分子の第一ポリペプチドまたはこれらのいずれかのフラグメントおよびここに記載する細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメイン(例えば、ここに記載するような、例えば、4-1BB、CD27、ICOSまたはCD28)および/または一次シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載するCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む)である第二ポリペプチドを含む。ある態様において、薬剤は、PD-1の第一ポリペプチドまたはそのフラグメントおよびここに記載する細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載するCD28、CD27、OX40、ICOSまたは4-1BBシグナル伝達ドメインおよび/またはここに記載するCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)の第二ポリペプチドを含む。

【0058】

ある態様において、単離CAR分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインを含む。ある態様において、単離CAR分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、単離CAR分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0059】

ある態様において、共刺激ドメインは、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B

10

20

30

40

50

7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、共刺激ドメインは4-1BB、CD27、CD28またはICOSを含む。ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号14の配列を含む。ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾(例えば、置換)を有するが、修飾(例えば、置換)が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号14のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。

10

20

【0060】

ある態様において、一次シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインは、配列番号18または配列番号20を含む。

【0061】

他の態様において、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞は、さらに1以上のCARを発現し得る(例えば、T細胞は2以上のCARを含む)。ある態様において、本発明の免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)は、ここに記載するような腫瘍マーカーに結合する抗原結合ドメインを含む第一CARおよびPD1細胞外ドメインまたはそのフラグメントを含む第二CARを含む。

30

【0062】

ある態様において、方法は、さらに、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、他の薬剤と組み合わせて投与することを含む(低い免疫増強用量のmTOR阻害剤に加えて)。ある態様において、薬剤は、キナーゼ阻害剤、例えば、CDK4/6阻害剤、BTK阻害剤、mTOR阻害剤(例えば、ここに記載する低い免疫増強用量より高用量で、例えば、抗癌効果を提供する用量で投与する)、MNK阻害剤またはデュアルmTOR/P13Kキナーゼ阻害剤およびこれらの組み合わせ)であり得る。

【0063】

ある態様において、方法は、哺乳動物に抗腫瘍免疫を提供することを含む。ある態様において、細胞は自己T細胞または自己NK細胞である。ある態様において、細胞は同種異系T細胞または同種異系NK細胞である。ある態様において、哺乳動物は、ヒトである。

40

【0064】

ある態様において、方法は、癌関連抗原または腫瘍マーカーの発現と関係する疾患を有する哺乳動物の処置を含む。

【0065】

ある態様において、方法は、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の効果を増強する薬剤、例えば、ここに記載する薬剤の投与を含む。

【0066】

50

ある態様において、方法は、C A R分子を発現する細胞、C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の投与と関係する1以上の副作用を軽減する薬剤、例えば、ここに記載する薬剤の投与を含む。

【0067】

ある態様において、方法は、ここに記載するような癌関連抗原と関係する疾患を処置する薬剤、例えば、ここに記載する薬剤の投与を含む。

【0068】

ある態様において、C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞は2以上のC A R分子を発現し、例えば、癌を処置するために、それを必要とする対象に投与する。

10

【0069】

ある態様において、C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞を、ここに記載する用量および／または投薬スケジュールで投与する。

【0070】

ある態様において、C A R分子を、例えば、インビトロ転写を使用して、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)に導入し、対象(例えば、ヒト)は、C A R分子を含む細胞の最初の投与およびC A R分子を含む細胞の1以上のその後の投与を受け、ここで、1以上のその後の投与を、先の投与の15日未満、例えば、14日、13日、12日、11日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日または2日後に受ける。ある態様において、C A R分子を含む細胞の1を超える投与を、週あたりに対象(例えば、ヒト)に投与し、例えば、C A R分子を含む細胞の2、3または4投与を週あたりに対象(例えば、ヒト)に投与し、例えば、C A R分子を含む細胞の2、3または4投与を週あたりに対象(例えば、ヒト)に投与する。ある態様において、対象(例えば、ヒト)は、週あたりC A R分子を含む細胞の1を超える投与を受け(例えば、週あたり2、3または4投与)(ここではサイクルとも称する)、続いて、1週間C A R分子を含む細胞を投与せず、その後C A R分子を含む細胞の1以上のさらなる投与(例えば、週あたりC A R分子を含む細胞の1を超える投与)を対象に投与する。他の態様において、対象(例えば、ヒト)は、1を超えるサイクルのC A R分子を含む細胞を受け、各サイクルの間の時間は10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日または3日未満である。ある態様において、C A R分子を含む細胞を、週あたり、隔日で3投与で投与する。ある態様において、C A R分子を含む細胞を、少なくとも2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週またはそれ以上投与する。

20

30

【0071】

ある態様において、C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞、例えば、ここに記載するC A R分子を、疾患、例えば、癌、例えば、ここに記載する癌の第一選択処置として投与する。他の態様において、C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞、例えば、ここに記載するC A R分子を、疾患、例えば、癌、例えば、ここに記載する癌の第二、第三、第四選択処置として投与する。

【0072】

ある態様において、ここに記載する細胞の集団を投与する。

40

【0073】

ある態様において、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤(例えば、R A D O O 1またはラパマイシン)およびC A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は単一組成物に存在し、例えば、単一組成物として投与する。ある態様において、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤(例えば、R A D O O 1またはラパマイシン)およびC A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は別々の組成物で存在し、例えば、別々の組成物として投与する。

【0074】

他の面において、本発明は、医薬として使用するための、本発明のC A Rをコードする単離核酸分子、本発明のC A Rの単離ポリペプチド分子、本発明のC A Rを含むベクター

50

、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の製剤および本発明のCARを含む細胞に関する。

【0075】

他の面において、本発明は、ここに記載のような癌関連抗原を発現する疾患の処置に使用するための、本発明のCARをコードする単離核酸分子、本発明のCARの単離ポリペプチド分子、本発明のCARを含むベクター、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の製剤および本発明のCARを含む細胞に関する。

【0076】

ある面において、本発明は、対象の処置に使用するためのmTOR阻害剤を提供し、ここで、該mTOR阻害剤は該対象の免疫応答を増強し、ここで、該対象は、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞を受けているか、受けるか、または受ける予定である。ある態様において、mTOR阻害剤は、低い免疫増強用量である。ある態様において、mTOR阻害剤を、低い免疫増強用量で投与する。

10

【0077】

ある面において、本発明は、対象の処置に使用するためのCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞を提供し、ここで、該対象は、該対象の免疫応答を増強するmTOR阻害剤を受けているか、受けるか、または受ける予定である。ある態様において、mTOR阻害剤は、低い免疫増強用量である。ある態様において、mTOR阻害剤を、低い免疫増強用量で投与する。

【0078】

ある態様において、単離核酸分子は、さらに共刺激ドメインをコードする配列、例えば、ここに記載する共刺激ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む。

20

【0079】

ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、例えば、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群から選択される、例えば、ここに記載する、タンパク質から得られる機能的シグナル伝達ドメインである。ある態様において、コードされた共刺激ドメインは4-1BB、CD27、CD28またはICOSを含む。

30

40

【0080】

ある態様において、コードされた4-1BBの共刺激ドメインは、配列番号14の配列を含む。ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、配列番号14のアミノ酸配

50

列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号14のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、共刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号15のヌクレオチド配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。他の態様において、コードされたCD28の共刺激ドメインは、配列番号91のアミノ酸配列を含む。ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、配列番号91のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号91のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、CD28の共刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号92のヌクレオチド配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。他の態様において、コードされたCD27の共刺激ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含む。ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号16のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、CD27の共刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号17のヌクレオチド配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。他の態様において、コードされたICOSの共刺激ドメインは、配列番号93のアミノ酸配列を含む。ある態様において、コードされたICOSの共刺激ドメインは、配列番号93のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号93のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、ICOSの共刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号94のヌクレオチド配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。

【0081】

ある態様において、コードされた一次シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインは、配列番号18の配列(変異体CD3ゼータ)または配列番号20(野生型ヒトCD3ゼータ)またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。

【0082】

ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD27の機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28の機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ICOSの機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【0083】

ある面において、本発明は、例えば、ここに記載するような、CAR分子をコードする核酸分子を含むベクターでトランスフェクトまたは形質導入した自己細胞の集団を含む。ある態様において、ベクターは、レトロウイルスベクターである。ある態様において、ベクターは、本明細書の他の箇所に記載する自己不活性化レンチウイルスベクターである。ある態様において、ベクターは、細胞、例えば、T細胞またはNK細胞に送達され(例えば、トランスフェクトまたは電気穿孔により)、そこで、ベクターは、ここに記載するような本発明のCARをコードする核酸分子を含み、これはmRNA分子のように転写され、本発明のCARはRNA分子から翻訳され、細胞表面に発現される。

【0084】

他の面において、本発明は、CAR発現細胞、例えば、CAR発現T細胞(CART細胞)またはCAR発現NK細胞の集団を提供する。ある態様において、CAR発現細胞の集団は、種々のCARを発現する細胞の混合物を含む。例えば、ある態様において、CAR発現細胞の集団は、ここに記載するような第一腫瘍マーカーに結合する抗原結合ドメイン

ンを有するCARを発現する第一細胞およびここに記載するような第二腫瘍マーカーに結合する異なる抗原結合ドメインを有するCARを発現する第二細胞を含み得る。他の例として、CAR発現細胞の集団は、ここに記載するような腫瘍マーカーに結合する抗原結合ドメインを含むCARを発現する第一細胞およびここに記載するような腫瘍マーカー以外の標的に結合する抗原結合ドメインを含むCARを発現する第二細胞を含み得る。ある態様において、CAR発現細胞の集団は、例えば、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むCARを発現する第一細胞および二次シグナル伝達ドメインを含むCARを発現する第二細胞を含む。

【0085】

他の面において、本発明は細胞の集団を提供し、ここで、集団内の少なくとも1細胞は、ここに記載するような腫瘍マーカーに結合する抗原結合ドメインを有するCARを発現し、第二細胞は他の薬剤、例えば、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤を発現する。例えば、ある態様において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であり得る。阻害分子の例は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータを含む。ある態様において、阻害分子を阻害する薬剤は、例えば、ここに記載する分子であり、例えば、細胞に正のシグナルを提供する第二ポリペプチド、例えば、ここに記載する細胞内シグナル伝達ドメインに結合した、第一ポリペプチド、例えば、阻害分子を含む薬剤である。ある態様において、薬剤は、例えば、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータのような阻害分子の、第一ポリペプチドまたはこれらのいずれかのフラグメントおよびここに記載する細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメイン(例えば、ここに記載するような、例えば、4-1BB、ICOS、CD27またはCD28)および/または一次シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載するCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む))である第二ポリペプチドを含む。ある態様において、薬剤は、PD-1の第一ポリペプチドまたはそのフラグメントおよびここに記載する細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載するCD28、CD27、ICOS、OX40または4-1BBシグナル伝達ドメインおよび/またはここに記載するCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)の第二ポリペプチドを含む。

【0086】

ある態様において、例えば、ここに記載するような、本発明のCARをコードする核酸分子は、mRNA分子として発現される。ある態様において、遺伝的に修飾された本発明のCAR発現細胞、例えば、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、細胞に所望のCARをコードするRNA分子(例えば、ベクター配列を伴わず)をトランスフェクトまたは電気穿孔により産生できる。ある態様において、本発明のCAR分子は、取り込まれたらRNA分子から翻訳され、組み換え細胞表面に発現される。

【0087】

ある面において、本発明はまた、CARをコードする核酸がその中に配置された免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を製造する方法であって、

a) 次のものにより産生した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を提供する：

i) 対象に、次のものの1以上が生じる十分な時間、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、RAD001またはラパマイシンを投与する：

1 a) PD-1 陰性免疫エフェクター細胞の集団の増加；

10

20

30

40

50

1 b) P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞の集団の減少；

1 c) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比の増加；

1 d) ナイーブT細胞数の増加；

1 e) 1 以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、C D 6 2 L^高、C D 1 2 7^高、C D 2 7⁺およびB C L 2；

1 f) 例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、K L R G 1 の発現減少；または

1 g) 次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加したC D 6 2 L^高、増加したC D 1 2 7^高、増加したC D 2 7⁺、減少したK L R G 1 および増加したB C L 2；

ここで、1 a)、1 b)、1 c)、1 d)、1 e)、1 f)または1 g)は、対象でまたは対象から採取した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の集団で、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に生じる；および

(ii) 対象から免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を採取する；そして

b) C A R をコードする核酸を、採取した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞に挿入し、それによりC A R をコードする核酸がその中に配置された免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を産生する

ことを含む、方法を提供する。

【0088】

ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の提供は、次の一方または両方を含む：

対象に、次のものの1以上が生じる十分な時間、低い免疫増強用量のm T O R 阻害剤、例えば、R A D 0 0 1 またはラパマイシンを投与する：

a) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞の集団の増加；

b) P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞の集団の減少；

c) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比の増加；

d) ナイーブT細胞数の増加；

e) 1 以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、C D 6 2 L^高、C D 1 2 7^高、C D 2 7⁺およびB C L 2；

f) 例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、K L R G 1 の発現減少；または

g) 次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加したC D 6 2 L^高、増加したC D 1 2 7^高、増加したC D 2 7⁺、減少したK L R G 1 および増加したB C L 2；

ここで、a)、b)、c)、d)、e)、f)またはg)は、対象でまたは対象から採取した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の集団で、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に生じる；そして

対象から免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を採取する。

【0089】

ある面において、本発明はまた次のものを含む、C A R をコードする核酸がその中に配置された、場合によりT細胞である免疫エフェクター細胞を製造する方法を提供する：

a) 場合によりT細胞である免疫エフェクター細胞とm T O R 阻害剤を接触させる；そして

b) C A R をコードする核酸を免疫エフェクター細胞に導入する；

それによりC A R をコードする核酸がその中に配置された、場合によりT細胞である免疫エフェクター細胞を製造し、

ここで、工程a)の該接触は、該工程b)の挿入の前、同時または後に起こり；

ここで、m T O R 阻害剤は次のものの1以上を生じさせる：

10

20

30

40

50

- 1 a) P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞の集団の増加；
 - 1 b) P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞の集団の減少；
 - 1 c) 場合により T 細胞である P D - 1 陰性免疫エフェクター細胞／場合により T 細胞である P D - 1 陽性免疫エフェクター細胞比の増加；
 - 1 d) ナイーブ T 細胞数の増加；
 - 1 e) 1 以上の次のマーカーの発現の増加：C D 6 2 L^高、C D 1 2 7^高、C D 2 7⁺ および B C L 2 (これは、記憶 T 細胞上にあり、場合により、記憶 T 細胞前駆体上にある)；
 - 1 f) 例えば、記憶 T 細胞上、例えば、記憶 T 細胞前駆体上の、K L R G 1 の発現減少；または
 - 1 g) 場合により次の特徴の任意の 1 つまたは組み合わせを有する細胞である、記憶 T 細胞前駆体数の増加：増加した C D 6 2 L^高、増加した C D 1 2 7^高、増加した C D 2 7⁺、減少した K L R G 1 および増加した B C L 2；
- ここで、1 a)、1 b)、1 c)、1 d)、1 e)、1 f) または 1 g) は、場合により、免疫エフェクター細胞の非接触集団と比較して、場合により、少なくとも一過性に、生じる。

10

【0090】

ある態様において、C A R は、抗原結合ドメイン (例えば、抗体または抗体フラグメント、T C R または T C R フラグメント)、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、共刺激ドメインおよび／または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン) を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、腫瘍マーカーに結合する。ある態様において、腫瘍マーカーは、固形腫瘍マーカーである。

20

【0091】

ある態様において、C A R をコードする核酸がその中に配置された免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞を産生する方法は、さらに、対象、例えば、免疫エフェクター細胞が由来した対象と異なる対象に、その中に C A R をコードする核酸が配置された免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞または N K 細胞を導入することを含み。ある態様において、対象は、免疫エフェクター細胞が由来した対象である。ある態様において、対象は異なる対象である。ある態様において、免疫エフェクター細胞は T 細胞である。ある態様において、免疫エフェクター細胞は N K 細胞である。

30

【0092】

ある態様において、方法は、さらに、対象でまたは対象から採った T 細胞で、P D 1 陰性または P D 1 陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞のレベルを評価することを含む。

【0093】

ある態様において、ここに開示する製造法は、さらに、免疫エフェクター細胞の集団とテロメラーゼサブユニットをコードする核酸、例えば、h T E R T を接触させることを含む。テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は D N A であり得る。

【0094】

ある態様において、ここに開示する製造法は、さらに、2 % h A B 血清を含む血清中の免疫エフェクター細胞の集団の培養を含む。

40

【0095】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤の投与を、T 細胞採取の少なくとも 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、10 日、15 日、20 日、25 日または 30 日前に開始する。

【0096】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤の投与は対象からの免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞の採取少なくとも少なくとも 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、10 日、15 日、20 日、25 日または 30 日前に部分的な、しかし完全ではない、m T O R の阻害をもたらす。

50

【0097】

ある態様において、mTOR阻害剤はアロステリックmTOR阻害剤である。ある態様において、mTOR阻害剤はRAD001である。ある態様において、mTOR阻害剤はラパマイシンである。ある態様において、mTOR阻害剤は、触媒的阻害剤、例えば、キナーゼ阻害剤である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、mTORに選択的である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、BEZ235およびCCG168から選択される。

【0098】

ある態様において、CARをコードする核酸がその中に配置された免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を産生する方法は、増殖が可能なT細胞の数の増加を含む。

【0099】

ある態様において、CARをコードする核酸がその中に配置された免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を産生する方法は、細胞毒性機能が可能なT細胞の数、サイトカイン分泌または活性化の増加を含む。

【0100】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、少なくとも1日、5日、10日、20日、30日または60日、部分的な、しかし完全ではない、mTORの阻害をもたらす。

【0101】

ある態様において、mTOR阻害剤の用量は、例えば、p70 S6K阻害により測定して、少なくとも5%の、しかし、90%を超えないmTOR阻害と関係する。ある態様において、mTOR阻害剤は、RAD001を含む。

【0102】

ある態様において、mTOR阻害剤の用量は、例えば、p70 S6K阻害により測定して、少なくとも10%の、しかし、80%を超えないmTOR阻害と関係する。ある態様において、mTOR阻害剤は、RAD001を含む。

【0103】

ある態様において、mTOR阻害剤の用量は、例えば、p70 S6K阻害により測定して、少なくとも10%の、しかし、40%を超えないmTOR阻害と関係する。ある態様において、mTOR阻害剤は、RAD001を含む。

【0104】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、週に1回、例えば、即時放出剤形で、0.1~20mg、0.5~10mg、2.5~7.5mg、3~6mgまたは約5mgのRAD001の投与を含む。

【0105】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、即時放出剤形で、約5mgのRAD001の投与を含む。

【0106】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、即時放出剤形の0.1~20mg、0.5~10mg、2.5~7.5mg、3~6mgまたは約5mgのRAD001と生物学的同等である、RAD001以外のmTOR阻害剤の、例えば、週に1回、例えば、即時放出剤形での投与を含む。

【0107】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、即時放出剤形の約5mgのRAD001と生物学的同等である量の、RAD001以外のmTOR阻害剤の、週に1回、即時放出剤形での投与を含む。

【0108】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、週に1回、例えば、徐放性剤形で、0.3~60mg、1.5~30mg、7.5~22.5mg、9~18mgまたは約15mgのRAD001の投与を含む。

【0109】

10

20

30

40

50

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、徐放性剤形で、約15mgのRAD001の投与を含む。

【0110】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、徐放性剤形の0.3～60mg、1.5～30mg、7.5～22.5mg、9～18mgまたは約15mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、例えば、週に1回、例えば、徐放性剤形で投与を含む。

【0111】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回、徐放性剤形の約15mgのRAD001と生物学的同等である量の、RAD001以外のmTOR阻害剤の、週に1回、徐放性剤形で投与を含む。 10

【0112】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、1日1回、例えば、即時放出剤形で、0.005～1.5mg、0.01～1.5mg、0.1～1.5mg、0.2～1.5mg、0.3～1.5mg、0.4～1.5mg、0.5～1.5mg、0.6～1.5mg、0.7～1.5mg、0.8～1.5mg、1.0～1.5mg、0.3～0.6mgまたは約0.5mgのRAD001の投与を含む。

【0113】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、1日1回、即時放出剤形で、約0.5mgのRAD001の投与を含む。 20

【0114】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、1日1回、即時放出剤形の0.005～1.5mg、0.01～1.5mg、0.1～1.5mg、0.2～1.5mg、0.3～1.5mg、0.4～1.5mg、0.5～1.5mg、0.6～1.5mg、0.7～1.5mg、0.8～1.5mg、1.0～1.5mg、0.3～0.6mgまたは約0.5mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、例えば、1日1回、例えば、即時放出剤形で投与を含む。

【0115】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、1日1回、即時放出剤形の約0.5mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、1日1回、即時放出剤形で投与を含む。 30

【0116】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、1日1回、例えば、徐放性剤形で、0.015～4.5mg、0.03～4.5mg、0.3～4.5mg、0.6～4.5mg、0.9～4.5mg、1.2～4.5mg、1.5～4.5mg、1.8～4.5mg、2.1～4.5mg、2.4～4.5mg、3.0～4.5mg、0.9～1.8mgまたは約1.5mgのRAD001の投与を含む。

【0117】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、1日1回、徐放性剤形の0.015～4.5mg、0.03～4.5mg、0.3～4.5mg、0.6～4.5mg、0.9～4.5mg、1.2～4.5mg、1.5～4.5mg、1.8～4.5mg、2.1～4.5mg、2.4～4.5mg、3.0～4.5mg、0.9～1.8mgまたは約1.5mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、例えば、1日1回、例えば、徐放性剤形で投与を含む。 40

【0118】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、週に1回、例えば、徐放性剤形で、0.1～30mg、0.2～30mg、2～30mg、4～30mg、6～30mg、8～30mg、10～30mg、1.2～30mg、14～30mg、16～30mg、20～30mg、6～12mgまたは約10mgのRAD001の投与を含む。

【0119】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、週に1回徐放性剤形の0.1～30mg、0.2～30mg、2～30mg、4～30mg、6～30mg、8～30mg、10～30mg、1.2～30mg、14～30mg、16～30mg、20～30mg、6～12mgまたは約10mgのRAD001と生物学的同等である量のRAD001以外のmTOR阻害剤の、例えば、週に1回、例えば、徐放性剤形で投与を含む。

【0120】

ある態様において、mTOR阻害剤はRAD001であり、用量は、約0.1～3ng/ml、0.3ng/ml未満～3ng/mlまたは0.3ng/ml未満～1ng/mlの範囲のRAD001のトラフレベルを提供する。

【0121】

ある態様において、mTOR阻害剤はRAD001以外であり、用量は、約0.1～3ng/ml、0.3ng/ml未満～3ng/mlまたは0.3ng/ml未満～1ng/mlの範囲のRAD001のトラフレベルを提供するRAD001の用量と生物学的同等である。

【0122】

ある態様において、対象は癌を有する。ある態様において、癌の細胞はPD-L1またはPD-L2を発現する。ある態様において、癌微小環境における細胞はPD-L1またはPD-L2を発現する。ある態様において、癌は固形腫瘍を含む。ある態様において、癌は血液癌である。ある態様において、癌は慢性リンパ性白血病(CLL)である。ある態様において、癌はCLLであり、CARの抗原結合ドメインは、CD19を標的とする。ある態様において、癌は、ここに記載する癌から選択される。ある態様において、癌は黒色腫である。

【0123】

ある態様において、対象は免疫不全である。

【0124】

ある態様において、対象はHIV+またはAIDSである。

【0125】

ある態様において、対象は感染性疾患を有する。

【0126】

ある態様において、対象は、免疫応答障害を有する。

【0127】

ある態様において、対象は免疫老化である。

【0128】

ある態様において、対象は、加齢関連状態を有する。

【0129】

ある面において、ヒト免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の調製物もここに記載し、ここで、ヒトエフェクター細胞の調製物ここに記載する方法のいずれかにより製造したCARをコードする核酸をその中に配置している。ある態様において、対象は癌を有するかまたは免疫不全である。

【0130】

タイトル、サブタイトルまたは番号または文字表記、例えば、(a)、(b)、(i)などは、読みやすくするためだけのものである。本明細書におけるタイトルまたは番号または文字表記の使用は、当該工程または要素がアルファベット順で実施すべきであることまたは工程もしくは要素が必ず互いに分離していることを必要とするものではない。

【0131】

ここに記載するすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体を引用により本明細書に包含させる。

【0132】

本発明の他の特性、目的および利点は、明細書および図面ならびに特許請求の範囲から明らかである。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0133】

【図1】図1 Aおよび1 Bはプラセボと比較したインフルエンザワクチン株に対する力価の増強を示すグラフである。図1 Aにおいて、ワクチン接種4週間後、プラセボコホートの増加に対する3インフルエンザワクチン株(H1N1 A/California/07/2009、H3N2 A/Victoria/210/2009、B/Brisbane/60/2008)の各々に対するインフルエンザ幾何平均力価のベースラインを超える増加が、治療企図集団におけるRAD001投薬コホートの各々で示される。太黒線は、治験の一次エンドポイントを満たすために、3インフルエンザワクチン株中2株で満たすことが要求されるプラセボに対する力価の1.2倍増加を示す。星印“*”プラセボに対するGMT力価の増加が、少なくとも80%の事後確率で1を超えることを示す。図1 Bは、ベースラインインフルエンザ力価 $\leq 1:40$ を有する対象のサブセットについて図1 Aと同じデータのグラフである。

10

【0134】

【図2】図2はワクチン接種4週間後、各インフルエンザワクチン株に対するRAD001濃度対幾何平均力価の増加倍率の散布図を示す。RAD001濃度(投与1時間後)を、対象が4週間投与された後に測定した。薬物動態測定した全対象を解析セットに包含した。ベースラインに対するワクチン接種4週間の幾何平均力価増加倍率をy軸に示す。

【0135】

【図3】図3はプラセボと比較して、異種インフルエンザ株に対する力価の増加を示すグラフである。Tワクチン接種4週間後、プラセボコホートの増加と比較した、インフルエンザワクチンに含まれていない2異種インフルエンザ株(A/H1N1株A/New Jersey/8/76およびA/H3N2株A/Victoria/361/11)に対するインフルエンザ幾何平均力価のベースラインを超える増加が、治療企図集団におけるRAD001投薬コホートの各々について示される。*は、プラセボに対する力価増加が、事後確率少なくとも80%で1を超えることを示す。

20

【0136】

【図4】図4 Aおよび4 Bはインフルエンザワクチン接種前後の、IgGおよびIgMレベルのグラフである。抗A/H1N1/California/07/2009インフルエンザIgGおよびIgMのレベルを、インフルエンザワクチン接種前および4週間後に得た対象の血清で測定した。RAD001とプラセボコホートで、抗H1N1インフルエンザIgGおよびIgMレベルにおけるワクチン接種4週間後のベースラインからの変化で有意差は見られなかった(全p値>クラスカル・ウォリス順位和検定で0.05)。

30

【0137】

【図5】図5 A、5 Bおよび5 CはRAD001処置後のPD-1陽性CD4パーセント減少およびPD-1陰性CD4 T細胞増加のグラフ表示である。PD-1陽性CD4、CD8およびPD-1陰性CD4 T細胞のパーセントを、ベースライン、治験薬処置6週間後(6週目)および治験薬中止6週間かつインフルエンザワクチン接種4週間後(12週目)にFACS分析により決定した。図5 Aは、用量レベル0.5mg/日(n=25)、5mg/週(n=29)および20mg/週(n=30)でRAD001を受けているコホートにおいて、プラセボコホート(n=25)と比較して、それぞれ0.002(0.02)、p=0.003(q=0.03)およびp=0.01(q=0.05)で、12週目にPD-1陽性CD4 T細胞の有意な減少(-37.1~-28.5%)があったことを示す。図5 Bは、プラセボコホート(n=25)と比較して、RAD001(n=109)を用量レベル0.5mg/日(n=25)、5mg/週(n=29)および20mg/週(n=30)で受けているコホートで12週目にPD-1陽性CD8 T細胞が、それぞれp=0.01(0.05)、p=0.007(q=0.04)およびp=0.01(q=0.05)で有意に減少した(-43.3~-38.5%)ことを示す。図5 Cは、プラセボコホート(n=25)と比較して、RAD001(n=109)を用量レベル0.5mg/日(n=25)、5mg/週(n=29)および20mg/週(n=30)で受けているコホートで12週目にPD-1陰性CD4 T細胞が、それぞれp=0.0007(0.02)、p=0.03(q=0.07)およびp=0.03(q=0.07)で有意に減少した(-43.3~-38.5%)ことを示す。

40

50

08)で有意増加した(3.0~4.9%)ことを示す。

【0138】

【図6】図6Aおよび6BはベースラインPD-1発現の差異で調節したRAD001処置後のPD-1陽性CD4パーセント減少およびPD-1陰性CD4 T細胞増加のグラフである。PD-1陽性CD4、CD8およびPD-1陰性CD4 T細胞のパーセントを、ベースライン、治験薬処置6週間後(6週目)および治験薬中止6週間かつインフルエンザワクチン接種4週間後(12週目)にFACS分析により決定した。図6Aは、プラセボコホート(n=25)と比較して、 $p=0.03$ ($q=0.13$)で、貯留RADコホート(n=84)において6週目にPD-1+ CD4 T細胞の30.2%の有意な減少があることを示す。プラセボコホートと比較した貯留RADにおける12週目のPD-1陽性CD4 T細胞の減少は、32.7%で $p=0.05$ ($q=0.19$)である。図6Bは、プラセボコホート(n=25)と比較して、 $p=0.008$ ($q=0.07$)で、貯留RAD001コホート(n=84)における6週目のPD-1陽性CD8 T細胞の37.4%の有意な減少を示す。プラセボコホートと比較した貯留RAD001における12週目のPD-1陽性CD8 T細胞の減少は、41.4%で $p=0.066$ ($q=0.21$)である。図6Aおよび6Bは、図5A、5Bおよび5Cの種々のRAD001用量群を、図6Aおよび6Bにおいて単一RAD001処置群に貯留した以外、図5A、5Bおよび5Cにおけるデータを表す。

10

【0139】

【図7】図7は高齢対象におけるRAD001に応答した運動およびエネルギーの増加を示す。

20

【0140】

【図8】図8Aおよび8Bは細胞におけるP70 S6K活性に対するRAD001の予測効果を示す。図8Aは、高用量の毎週および連日のRAD001でのP70 S6キナーゼ阻害を示す；図8Bは、低用量の毎週RAD001でのP70 S6キナーゼ阻害を示す。

【0141】

【図9】図9はPDL-1とのPD1相互作用は、Jurkat細胞表面でPD1のクラスタリングをもたらすのに十分であり、NFAT経路の強い活性化を誘発することを示す。

30

【0142】

【図10】図10はCAR発現、形質導入T細胞の増殖が、細胞培養系における低用量のRAD001により増強されることを示す。CARTを、種々の濃度のRAD001(nM)の存在下、NALM6(Nalm-6)細胞と共培養した。CAR陽性CD3陽性T細胞(黒色)および総T細胞(白色)の数を、共培養4日後に評価した。

【0143】

【図11】図11は、0.3、1、3および10mg/kg(mpk)での連日RAD001投薬または媒体投薬を用いるNALM6-luc細胞の腫瘍増殖測定を示す。丸は媒体を示す；四角は10mg/kg用量のRAD001を示す；三角は3mg/kg用量のRAD001を示し、逆三角は1mg/kg用量のRAD001を示す；菱形は0.3mg/kg用量のRAD001を示す。

40

【0144】

【図12】図12Aおよび12BはNALM6腫瘍を有するNSGマウスの血中のRAD001の量を示す薬物動態曲線を示す。図12Aは、最初の用量のRAD001後の0日目のPKを示す。図12Bは、最終RAD001用量のちの14日目のPKを示す。菱形は10mg/kg用量のRAD001を示す；四角は1mg/kg用量のRAD001を示す；三角は3mg/kg用量のRAD001を示す；xは10mg/kg用量のRAD001を示す。

【0145】

【図13】図13Aおよび13BはRAD001投薬したまたはしていないヒト化CD19 CART細胞のインビボ増殖を示す。低用量のRAD001(0.003mg/kg)連日

50

は、正常レベルの h u C A R 1 9 増殖を超える、C A R T 細胞増殖の増強に至る。図 1 3 A は C D 4 + C A R T 細胞を示す；図 1 3 B は C D 8 + C A R T 細胞を示す。丸は P B S を示す；四角は h u C T L 0 1 9 を示す；三角は 3 mg/kg R A D 0 0 1 を伴う h u C T L 0 1 9 を示す；逆三角は 0.3 mg/kg R A D 0 0 1 を伴う h u C T L 0 1 9 を示す；菱形は 0.03 mg/kg R A D 0 0 1 を伴う h u C T L 0 1 9 を示す；丸は 0.003 mg/kg R A D 0 0 1 を伴う h u C T L 0 1 9 を示す。

【発明を実施するための形態】

【0146】

詳細な記載

定義

特記しない限り、ここで使用する全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者により共通して理解される意味を有する。

【0147】

単数表現は、文法上の目的が 1 個以上(すなわち、少なくとも 1)をいう。例として、“要素”は、1 個の要素または 1 を超える要素を意味する。

【0148】

用語“約”は、量、期間などのような測定可能な値をいうとき、特定した値からの±20%またはある場合±10%またはある場合±5%またはある場合±1%またはある場合±0.1%を、このようなばらつきが開示された方法の実施において妥当であるために、包含することを意味する。

【0149】

用語“受けようとしている”は、ここで、第一治療剤を受けており、第二治療剤を受けようとしている患者の文脈で使用する時、患者が、障害(例えば、癌)のための第一治療を受けているかまたは受けたことがあり、ここで患者は、その障害に対する処置過程で第二の治療を受ける予定である、状況をいう。

【0150】

用語“アジュバント”は、製剤において特定の免疫原、例えば、ワクチン免疫原と組み合わせ使用したとき、得られる免疫応答を増強するかまたは他に改変、修飾もしくは亢進する化合物をいう。

【0151】

用語“同種”は、物質が導入される個体と同じ主の異なる動物に由来する何らかの物質をいう。2 以上の個体は、1 以上の座位の遺伝子が同一でないとき、互いに同種異系といわれる。ある面において、同じ種の個体由来の同種異系物質は、抗原性に相互作用するのに十分遺伝的に似ていない可能性がある。

【0152】

用語“抗癌効果”は、例えば、腫瘍体積減少、癌細胞数減少、転移数減少、余命延長、癌細胞増殖減少、癌細胞生存減少または癌性状態に付随する種々の生理学的症状改善を含むが、これらに限定されない、種々の手段により顕在化され得る生物学的効果をいう。“抗癌効果”は、本発明の化合物(例えば、m T O R 阻害剤)、ペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および抗体が、そもそも癌の発生を予防する能力によっても顕在化され得る。用語“抗腫瘍効果”は、例えば、腫瘍体積減少、腫瘍細胞数減少、腫瘍細胞増殖減少または腫瘍細胞生存減少を含むが、これらに限定されない種々の手段により顕在化され得る生物学的効果をいう。

【0153】

ここで使用する用語“抗体”は、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン分子由来のタンパク質またはポリペプチド配列をいう。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル、複数または一本鎖または完全免疫グロブリンであってよく、天然源由来でも組み換え源由来でもよい。抗体は、免疫グロブリン分子の四量体であり得る。

【0154】

用語“抗体フラグメント”は、完全抗体またはその組み換えバリエーションの少なくとも一

10

20

30

40

50

つの部分をいい、抗原のような標的に対する抗体フラグメントの認識および特異的結合を与えるのに十分である、抗原結合ドメイン、例えば、完全抗体の抗原性決定可変領域をいう。抗体フラグメントの例は、F a b、F a b'、F(a b')₂、F v フラグメント、s c F v 抗体フラグメント、ジスルフィド結合 F v(s d F v)、V H および C H 1 ドメインからなる F d フラグメント、線形抗体、s d A b のような単一ドメイン抗体(V L または V H のいずれか)、ラクダ科 V H H ドメイン、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結した 2 個以上、例えば、2 個の F a b フラグメントまたは 2 個以上、例えば、2 個の単離 C D R を含む二価フラグメントのような抗体フラグメントから形成される多特異性分子または連結した抗体の他のエピトープ結合フラグメントを含むが、これらに限定されない。抗体フラグメントは、単一ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、二重特異性抗体、トリアボディ、テトラボディ、v-N A R およびビス-s c F v にも取り込まれ得る(例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005 参照)。抗体フラグメントは、フィブロネクチン III 型(F n 3)のようなポリペプチドに基づくスキャフォールドに移植もできる(フィブロネクチンポリペプチドミニボディを記載する米国特許 6,703,199 号参照)。

10

【0155】

用語“s c F v”は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも 1 抗体フラグメントおよび重鎖の可変領域を含む少なくとも 1 抗体フラグメントを含む融合タンパク質をいい、ここで、軽鎖および重鎖可変領域は、短柔軟性ポリペプチドリinker により隣接して連結され、単一鎖ポリペプチドとして発現されることが可能であり、s c F v はそれが由来する完全抗体の特異性を保持する。特記しない限り、ここで使用する、s c F v は、いずれの順番で V L および V H 可変領域を含んでもよく、例えば、ポリペプチドの N 末端および C 末端に関して s c F v は V L-リンカー-V H を含んでも、V H-リンカー-V L を含んでもよい。

20

【0156】

ここで使用する用語“相補性決定領域”または“C D R”は、抗原特異性および結合親和性を与える、抗体可変領域内のアミノ酸の配列をいう。例えば、一般に、各重鎖可変領域に 3 C D R (例えば、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3) および各軽鎖可変領域に 3 C D R (L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) が存在する。ある C D R の厳密なアミノ酸配列境界は、Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (“K a b a t” 番号付けスキーム)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (“C h o t h i a” 番号付けスキーム) またはこれらの組み合わせにより記載のものを含む多くの周知のスキームのいずれかを使用して決定できる。K a b a t 番号付けスキーム下、ある態様において、重鎖可変ドメイン(V H)の C D R アミノ酸残基は 31~35 (H C D R 1)、50~65 (H C D R 2) および 95~102 (H C D R 3) と番号付けされ；そして軽鎖可変ドメイン(V L)における C D R アミノ酸残基は 24~34 (L C D R 1)、50~56 (L C D R 2) および 89~97 (L C D R 3) と番号付けされる。C h o t h i a 番号付けスキーム下、ある態様において、V H における C D R アミノ酸は 26~32 (H C D R 1)、52~56 (H C D R 2) および 95~102 (H C D R 3) と番号付けされ；そして V L における C D R アミノ酸残基は 26~32 (L C D R 1)、50~52 (L C D R 2) および 91~96 (L C D R 3) と番号付けされる。複合 K a b a t および C h o t h i a 番号付けスキームにおいて、ある態様において、C D R は、K a b a t C D R、C h o t h i a C D R または両者の一部であるアミノ酸残基に対応する。例えば、ある態様において、C D R は、V H、例えば、哺乳動物 V H、例えば、ヒト V H におけるアミノ酸残基 26~35 (H C D R 1)、50~65 (H C D R 2) および 95~102 (H C D R 3)；および V L、例えば、哺乳動物 V L、例えば、ヒト V L におけるアミノ酸残基 24~34 (L C D R 1)、50~56 (L C D R 2) および 89~97 (L C D R 3) に対応する。

30

40

【0157】

50

抗体またはその抗体フラグメントを含む本発明の C A R の部分は、例えば、単一ドメイン抗体フラグメント(s d A b)、一本鎖抗体(s c F v)または例えば、ヒト化抗体または二特異性抗体を含む、例えば、抗原結合ドメインがポリペプチド鎖の一部として発現される、多種多様な形態で存在し得る(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。ある面において、本発明の C A R 組成物の抗原結合ドメインは、抗体フラグメントを含む。さらなる面において、C A R は、s c F v を含む抗体フラグメントを含む。ある C D R の厳密なアミノ酸配列境界は、Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (“K a b a t” 番号付けスキーム)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (“C h o t h i a” 番号付けスキーム)またはこれらの組み合わせにより記載のものを含む多くの周知のスキームのいずれかを使用して決定できる。

10

【0158】

ここで使用する用語“結合ドメイン”または“抗体分子”は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む、タンパク質、例えば、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントをいう。用語“結合ドメイン”または“抗体分子”は、抗体および抗体フラグメントを包含する。ある態様において、抗体分子は多特異性抗体分子であり、例えば、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、ここで、複数の中の第一免疫グロブリン可変ドメイン配列は第一エピトープに対する結合特異性を有し、複数の中の第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は第二エピトープに対する結合特性を有する。ある態様において、多特異性抗体分子は二特異性抗体分子である。二特異性抗体は、2以下の抗原に特異性を有する。二特異性抗体分子は、第一エピトープに対する結合特異性を有する第一免疫グロブリン可変ドメイン配列および第二エピトープに対する結合特異性を有する第二免疫グロブリン可変ドメイン配列により特徴付けられる。

20

【0159】

用語“抗体重鎖”は、天然に存在する立体構造の抗体分子に存在する2タイプのポリペプチド鎖の大きいほうをいい、通常、当該抗体が属するクラスを決定する。

【0160】

用語“抗体軽鎖”は、天然に存在する立体構造の抗体分子に存在する2タイプのポリペプチド鎖の小さいほうをいう。カッパ(κ)およびラムダ(λ)軽鎖は、2つの主用抗体軽鎖アイソタイプをいう。

30

【0161】

用語“抗原”または“A g”は、免疫応答を惹起する分子をいう。この免疫応答は、抗体産生または特異的免疫適格細胞の活性化または両者が関与し得る。当業者は、実質的に全タンパク質またはペプチドを含むあらゆる巨大分子が抗原として働き得ることを理解する。さらに、抗原は組み換えまたはゲノム D N A に由来し得る。当業者は、免疫応答を惹起するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的ヌクレオチド配列を含むあらゆる D N A が、それゆえに、“抗原”を、当該用語がここで使用される限り、コードすることを理解する。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によってのみコードされる必要がないことを理解する。本発明が、1を超える遺伝子の部分的ヌクレオチド配列の使用を含むが、これらに限定されず、これらのヌクレオチド配列が所望の免疫応答を惹起するポリペプチドをコードするように種々の組み合わせで配置されることが容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原が全く“遺伝子”によりコードされる必要がないことを理解する。抗原を合成により製造できるかまたは生物学的サンプルに由来し得るかまたはポリペプチド以外の巨大分子であるかもしれないことは容易に明らかである。このような生物学的サンプルは、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞または他の生物学的成分を伴う液体を含み得るが、これらに限定されない。

40

【0162】

50

用語“抗原提示細胞”または“APC”は、表面に主要組織適合抗原(MHC)と複合体化した外来抗原を呈示するアクセサリ細胞(例えば、B細胞、樹状細胞など)のような免疫系細胞をいう。T細胞は、そのT細胞受容体(TCR)を使用してこれらの複合体を認識し得る。APCは抗原を処理し、それらをT細胞に提示する。

【0163】

用語“自己”は、後に再導入される個体と同じ個体由来のあらゆる物質をいう。

【0164】

用語“生物学的同等”は、対照化合物(例えば、RAD001)の対照用量または対照量により産生される効果と同等な効果を産生するのに必要な対照化合物(例えば、RAD001)以外の薬剤の量をいう。ある態様において、効果は、例えば、インビボまたはインビトロアッセイにおいて評価した、例えば、ここに記載するアッセイ、例えば、Boulayアッセイで測定した、例えば、P70 S6キナーゼ阻害により測定した、mTOR阻害のレベルまたはウェスタンブロットによるリン酸化S6レベルの測定である。ある態様において、効果は、細胞選別により測定した、PD-1陽性/PD-1陰性T細胞比の改変である。ある態様において、mTOR阻害剤の生物学的同等量または用量は、対照化合物の対照用量または対照量と同じレベルのP70 S6キナーゼ阻害を達成する量または用量である。ある態様において、mTOR阻害剤の生物学的同等量または用量は、対照化合物の対照用量または対照量と同じレベルのPD-1陽性/PD-1陰性T細胞比の改変を達成する量または用量である。

【0165】

用語“キメラ抗原受容体”または代替的に“CAR”は、少なくとも細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび下に定義するような刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン(ここでは“細胞内シグナル伝達ドメイン”とも呼ぶ)を含む、組み換えポリペプチド構築物をいう。ある態様において、CARポリペプチド構築物におけるドメインは同じポリペプチド鎖にあり、例えば、キメラ融合タンパク質を含む。他の態様において、CARポリペプチド構築物におけるドメインは互いに隣接しておらず、例えば、ここに記載するRCARにおいて提供されるように、例えば、異なるポリペプチド鎖にある。

【0166】

ある面において、CARの刺激性分子は、T細胞受容体複合体と関係するゼータ鎖である。ある面において、細胞質シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3ゼータの一次シグナル伝達ドメイン)を含む。ある面において、細胞質シグナル伝達ドメインは、さらに、下に定義するような少なくとも1つの共刺激性分子に由来する1以上の機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある面において、共刺激性分子は、41BB(すなわち、CD137)、CD27および/またはCD28から選択される。ある面において、CARは、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある面において、CARは、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインならびに共刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメインおよび刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある面において、CARは、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインならびに1以上の共刺激性分子および刺激性分子由来の2つの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある面において、CARは、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインならびに1以上の共刺激性分子および刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメイン由来の少なくとも2つの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある面において、CARは、CAR融合タンパク質のアミノ末端(N-ter)に任意のリーダー配列を含む。ある面において、CARは、さらに、細胞外抗原結合ドメインのN末端にリーダー配列を含み、ここで、リーダー配列は、場合により細胞プロセッシングおよびCARの細胞膜への局在化の間に抗原結合ドメイン(例えば、scFv)から開裂されてよい。ある態様

において、CARは抗原結合ドメインを含む。ある態様において、CARはカウンターリガンドに特異的な細胞外リガンドドメインを含む。

【0167】

ここに記載するような特異的腫瘍マーカーXを標的とする抗原結合ドメイン(例えば、scFv、単一ドメイン抗体またはTCR(例えば、TCRアルファ結合ドメインまたはTCRベータ結合ドメイン))を含むCARをXCARと称す。例えば、CD19を標的とする抗原結合ドメインを含むCARはCD19CARと称す。CARはあらゆる細胞、例えば、ここに記載するような免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)において発現できる。

【0168】

用語“癌”は、異常細胞の未制御の増殖により特徴付けられる疾患をいう。癌細胞は、局所的にまたは血流およびリンパ系により体の他の部分に拡散できる。種々の癌の例はここに記載され、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎癌、肝癌、脳腫瘍、リンパ腫、白血病、肺癌などを含むが、これらに限定されない。ある態様において、癌は、癌細胞または腫瘍微小環境へのPD-1リガンド、例えば、PD-L1またはPD-L2の発現により特徴付けられる。用語“癌”は、病理組織学的タイプまたは侵襲性の段階と無関係に、全ての癌性増殖または発癌過程、転移組織または悪性に添加した細胞、組織または臓器をいう。用語“腫瘍”および“癌”は、ここでは交換可能に使用し、例えば、両用語は固形および液性、例えば、拡散もしくは循環腫瘍を含む。ここで使用する用語“癌”または“腫瘍”は、前悪性ならびに悪性癌および腫瘍を含む。

【0169】

用語“癌関連抗原”または“腫瘍マーカー”は、交換可能に、正常細胞と比較して、癌細胞の表面上に、全体的であれフラグメンとしてであれ(例えば、MHC/ペプチド)、優勢に発現される分子(一般にタンパク質、炭水化物または脂質)をいい、これは、薬物の癌細胞への優先的ターゲティングに有用である。ある態様において、癌関連抗原は、正常細胞と比較して癌細胞で過発現されている、例えば、正常細胞と比較して1倍過発現、2倍過発現、3倍過発現またはそれ以上過発現されている、細胞表面分子である。ある態様において、癌関連抗原は、正常細胞で発現される分子と比較して、癌細胞で不適切に合成される細胞表面分子、例えば、欠失、付加または変異を含む分子である。ある態様において、癌関連抗原は、癌細胞の表面上に、全体的であれフラグメンとしてであれ(例えば、MHC/ペプチド)、排他的に発現され、正常細胞の表面には合成または発現されない。

【0170】

ここで使用する用語“CD19”は、白血病前駆体細胞で検出可能な抗原決定基である、表面抗原分類19タンパク質をいう。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protのような公的データベースに見ることができる。例えば、ヒトCD19のアミノ酸配列は、UniProt/Swiss-Prot受託番号P15391として見ることができ、ヒトCD19をコードするヌクレオチド配列は、受託番号NM_001178098として見る事ができる。ここで使用する“CD19”は、完全長野生型CD19の変異、例えば、点変異、フラグメント、挿入、欠失およびスプライスバリエントを含むタンパク質を含む。CD19は、例えば、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病および非ホジキンリンパ腫を含む、大部分のB細胞系譜癌で発現される。CD19を発現する他の細胞は、“CD19の発現と関係する疾患”の定義において下に提供する。これはB細胞前駆細胞の初期マーカーでもある。例えば、Nicholson et al. Mol. Immun. 34(16-17): 1157-1165(1997)参照。ある面において、CARの抗原結合部分は、CD19タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、結合する。ある面において、CD19タンパク質は癌細胞に発現される。

【0171】

ここで使用する用語“CD20”は、B細胞で検出可能であることが知られる抗原決定基をいう。ヒトCD20は、膜貫通4ドメイン、サブファミリーA、メンバー1(MS4A1)とも呼ばれる。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、

UniProtおよびSwiss-Protのような公的データベースに見ることができる。例えば、ヒトCD20のアミノ酸配列は、受託番号NP_690605.1およびNP_068769.2として見ることができ、ヒトCD20の転写バリエーション1および3をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ受託番号NM_152866.2およびNM_021950.3として見る事ができる。ある面において、CARの抗原結合部分は、CD20タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、結合する。ある面において、CD20タンパク質は癌細胞に発現される。

【0172】

ここで使用する用語“CD22”は、白血病前駆体細胞で検出可能であることが知られる抗原決定基をいう。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protのような公的データベースに見ることができる。例えば、アイソフォーム1〜5ヒトCD22のアミノ酸配列は受託番号NP_001762.2、NP_001172028.1、NP_001172029.1、NP_001172030.1およびNP_001265346.1としてそれぞれ見る事ができ、ヒトCD22のバリエーション1〜5をコードするヌクレオチド配列は、受託番号NM_001771.3、NM_001185099.1、NM_001185100.1、NM_001185101.1およびNM_001278417.1としてそれぞれ見る事ができる。ある面において、CARの抗原結合部分は、CD22タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、結合する。ある面において、CD22タンパク質は癌細胞に発現される。

【0173】

ここで使用する用語“ROR1”は、白血病前駆体細胞で検出可能であることが知られる抗原決定基をいう。ヒトおよびマウスアミノ酸および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protのような公的データベースに見ることができる。例えば、ヒトROR1のアイソフォーム1および2前駆体のアミノ酸配列は受託番号NP_005003.2およびNP_001077061.1としてそれぞれ見る事ができ、それらをコードするmRNA配列は、受託番号NM_005012.3およびNM_001083592.1としてそれぞれ見る事ができる。ある面において、CARの抗原結合部分は、ROR1タンパク質の細胞外ドメイン内の抗原を認識し、結合する。ある面において、ROR1タンパク質は癌細胞に発現される。

【0174】

用語“保存的配列修飾”は、当該アミノ酸配列を含む抗体または抗体フラグメントの結合特性に顕著に影響しないまたは変えないアミノ酸修飾をいう。このような保存的修飾は、アミノ酸置換、付加および欠失を含む。部位特異的変異誘発およびPCR介在変異誘発のような当分野で知られる標準技術により、本発明の抗体または抗体フラグメントに修飾を導入できる。保存的置換は、アミノ酸残基が類似側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。類似側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非電荷極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分枝側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸を含む。それゆえに、本発明のCAR内の1以上のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えてよく、改変したCARを、ここに記載する機能的アッセイを使用して試験できる。

【0175】

用語“構成的プロモーター”は、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結したとき、細胞のほとんどのまたは全ての生理学的条件下で、当該細胞内で遺伝子産物の産生を誘発するヌクレオチド配列をいう。

【0176】

ここで使用する用語“由来する”は、第一分子と第二分子の関係を示す。一般に第一分子と第二分子の構造的類似性をいい、第二分子に由来する第一分子の過程または源限定を暗示または包含しない。例えば、CD3ゼータ分子に由来する細胞内シグナル伝達ドメインの場合、細胞内シグナル伝達ドメインは、必要な機能、すなわち、適切な条件下でシグナルを発生させる能力を有するように、十分なCD3ゼータ構造を保持する。細胞内シグナル伝達ドメインを産生する特定の過程の限定を暗示または包含しない、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインを提供するために、CD3ゼータ配列から出発し、細胞内シグナル伝達ドメインに到達するために望まない配列を削除するかまたは変異させなければならないことを意味しない。

【0177】

用語“ここに記載するような腫瘍マーカーの発現と関係する疾患”は、例えば、癌もしくは悪性腫瘍または骨髄異形成、骨髄異形成症候群もしくは前白血病のような前癌状態のような増殖性疾患を含む、ここに記載するような腫瘍マーカーを発現する細胞と関係する疾患またはここに記載するような腫瘍マーカーを発現するまたはいずれかの時点で発現した細胞と関係する状態；またはここに記載するような腫瘍マーカーを発現する細胞と関係する非癌関連徴候を含むが、これらに限定されない。ある面において、ここに記載するような腫瘍マーカーの発現と関係する癌は血液癌である。ある面において、ここに記載するような腫瘍マーカーの発現と関係する癌は固形癌である。さらにここに記載するような腫瘍マーカーの発現と関係する疾患は、例えば、ここに記載するような腫瘍マーカーの発現と関係する非定型および／または非古典的癌、悪性腫瘍、前癌状態または増殖性疾患を含むが、これらに限定されない。ここに記載するような腫瘍マーカーの発現と関係する非癌関連徴候は、例えば、自己免疫性疾患(例えば、狼瘡)、炎症性障害(アレルギーおよび喘息)および移植を含むが、これらに限定されない。

【0178】

用語“CD19の発現と関係する疾患”は、例えば、癌もしくは悪性腫瘍または骨髄異形成、骨髄異形成症候群もしくは前白血病のような前癌状態のような増殖性疾患を含むCD19を発現する細胞と関係する疾患またはCD19を発現するまたはいずれかの時点で発現した細胞と関係する状態；またはCD19を発現する細胞と関係する非癌関連徴候を含むが、これらに限定されない。誤解を避けるために、CD19の発現と関係する疾患は、例えば、CD19発現が、例えば、CD19を標的とする分子、例えば、CD19 CARでの処置により下方制御されているために、現在CD19を発現しないが、かつてCD19を発現した細胞と関係する状態を含み得る。ある面において、CD19の発現と関係する癌は血液癌である。ある面において、血液癌は白血病またはリンパ腫である。ある面において、CD19の発現と関係する癌は、例えば、B細胞急性リンパ性白血病(BALL)、T細胞急性リンパ性白血病(TALL)、急性リンパ性白血病(ALL)を含むが、これらに限定されない、1以上の急性白血病；例えば、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)を含むが、これらに限定されない1以上の慢性白血病を、例えば含むが、これらに限定されない、癌および悪性腫瘍を含む。CD19の発現と関係するさらなる癌または血液状態は、例えば、B細胞前リンパ球性白血病、芽細胞性形質細胞様樹状細胞新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞—または大細胞—濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖状態、MALTLリンパ腫、マントル細胞リンパ腫(MCL)、周辺帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成および骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、血漿芽細胞性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症および骨髄血液細胞の無効な産生(または異形成)により一体化される血液状態の雑多なコレクションである“前白血病”などを含むが、これらに限定されない。さらにCD19の発現と関係する疾患発現は、例えば、CD19の発現と関係する非定型および／または非古典的癌、悪性腫瘍、前癌状態または増殖性疾患を含むが、これらに限定されない。CD19の発現と関係する非癌関連徴候は、例えば、自己免疫性疾患(例えば、狼瘡)、炎症性障害(アレルギーおよび喘息)および移植を含むが、これらに限定されない。ある態様において

、腫瘍抗原発現細胞は、腫瘍抗原をコードする mRNA を発現するまたは何れかの時点で発現した。ある態様において、腫瘍抗原発現細胞は腫瘍抗原タンパク質(例えば、野生型または変異体)を産生し、腫瘍抗原タンパク質は正常レベルまたは減少したレベルで存在し得る。ある態様において、腫瘍抗原発現細胞は、検出可能なレベルの腫瘍抗原タンパク質をある時点で産生しており、その後、実質的に検出可能な腫瘍抗原タンパク質を産生していない。

【0179】

用語“有効量”または“治療有効量”は、ここでは相互交換可能に使用し、特定の生物学的結果を達成するのに有効な、ここに記載するような化合物、製剤、物質または組成物の量をいう。

【0180】

用語“コードする”は、ヌクレオチドの規定された配列(例えば、rRNA、tRNA および mRNA)またはアミノ酸の規定された配列のいずれかを有する生物学的過程において他のポリマーおよび巨大分子の合成の鋳型として役立つ、遺伝子、cDNA または mRNA のようなポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドの特定の配列の固有の特性およびそれ由来の生物学的特性をいう。それゆえに、遺伝子、cDNA または RNA は、その遺伝子に対応する mRNA の転写および翻訳が、細胞または他の生物系においてタンパク質を産生するならば、タンパク質をコードする。遺伝子または cDNA の転写の鋳型として使用される、ヌクレオチド配列が mRNA 配列と同一であり、通常配列表に提供されるコード鎖および非コード鎖の両者を、タンパク質または該遺伝子または cDNA の他の産物をコードするとしていうことができる。

【0181】

用語“内在性”は、生物、細胞、組織または系に由来するまたはそれらの中で産生されるあらゆる物質をいう。

【0182】

用語“外来性”は、生物、細胞、組織または系の外から導入されたまたはそれらの外で産生されるあらゆる物質をいう。

【0183】

用語“発現”は、プロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳をいう。

【0184】

用語“発現ベクター”は、発現するヌクレオチド配列に操作可能に連結した発現制御配列を含む組み換えポリヌクレオチドを含む、ベクターをいう。発現ベクターは、発現のための十分なシス作用領域を含み、発現のための他の要素は宿主により細胞またはインビトロ発現系において供給され得る。発現ベクターは、組み換えポリヌクレオチドを取り込むコスミド、プラスミド(例えば、裸のまたはリボソームに含まれた)およびウイルス(例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)を含む、当分野で知られる全てのこのようなものを含む。

【0185】

scFv の文脈においてここで使用する用語“柔軟性ポリペプチドリンカー”または“リンカー”は、可変重鎖領域と可変軽鎖領域と一緒に連結するために、単独でまたは組み合わせて使用されるグリシンおよび／またはセリン残基のようなアミノ酸からなるペプチドリンカーをいう。ある態様において、柔軟性ポリペプチドリンカーは Gly / Ser リンカーであり、アミノ酸配列 $(Gly-Gly-Gly-Ser)_n$ (ここで、 n は 1 以上の正の整数である)を含む。例えば、 $n=1$ 、 $n=2$ 、 $n=3$ 、 $n=4$ 、 $n=5$ および $n=6$ 、 $n=7$ 、 $n=8$ 、 $n=9$ および $n=10$ (配列番号 28)。ある態様において、柔軟性ポリペプチドリンカーは、 $(Gly_4Ser)_4$ (配列番号 29) または $(Gly_4Ser)_3$ (配列番号 30) を含むが、これらに限定されない。他の態様において、リンカーは、 (Gly_2Ser) 、 $(GlySer)$ または (Gly_3Ser) (配列番号 31) の複数反復を含む。WO 2012 / 138475 号 (引用により本明細書に包含させる) に記載のリンカ

10

20

30

40

50

一も本発明の範囲内に含まれる。

【0186】

“完全ヒト”は、分子全体がヒト起源または抗体もしくは免疫グロブリンのヒト形態と同一のアミノ酸配列からなる、抗体または抗体フラグメントのような免疫グロブリンをいう。

【0187】

用語“相同”または“同一性”は、2ポリマー分子間、例えば、2核酸分子間、例えば、2DNA分子または2RNA分子間または2ポリペプチド分子間のブユニット配列同一性をいう。2分子の両者におけるサブユニットが同じモノマーサブユニットで占拠されているとき；例えば、2DNAの各々におけるある位置がアデニンで占拠されているならば、それらは、その位置で相同または同一である。2配列間の相同性は、マッチしたまたは相同な位置の数の直接関数である；例えば、2配列の位置の半分(例えば、10サブユニット長ポリマー中5位置)が相同であるならば、2配列は50%相同である；位置の90%(例えば、10中9)がマッチするまたは相同であるならば、2配列は90%相同である。

10

【0188】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の“ヒト化”形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最少配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列)である。大部分について、ヒト化抗体および抗体そのフラグメントは、レシピエントの相補性決定領域(CDR)からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギのような非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体または抗体フラグメント)である。ある例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基により置き換えられる。さらに、ヒト化抗体/抗体フラグメントは、レシピエント抗体にも移入されたCDRまたはフレームワーク配列にも見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体または抗体フラグメント性能をさらに精錬および最適化できる。一般に、ヒト化抗体または抗体そのフラグメントは、CDR領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンものに対応し、FR領域の全てまたは相当部分がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1および一般に2可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体または抗体フラグメントは、一般にヒト免疫グロブリンのものである、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部も含み得る。さらなる詳細に関して、Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992を参照のこと。

20

30

【0189】

ここで使用する用語“免疫エフェクター細胞”は、免疫応答、例えば、免疫エフェクター応答の増強に参与する細胞をいう。免疫エフェクター細胞の例は、T細胞、例えば、アルファ/ベータT細胞およびガンマ/デルタT細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、肥満細胞および骨髓由来貪食細胞を含む。

【0190】

ここで使用する用語“免疫エフェクター機能または免疫エフェクター応答”は、標的細胞の免疫攻撃を増強または促進する、例えば、免疫エフェクター細胞の、機能または応答をいう。例えば、免疫エフェクター機能または応答は、標的細胞の死滅を促進するまたは成長もしくは増殖を阻害するT細胞またはNK細胞の特性をいう。T細胞の場合、一次刺激および共刺激は免疫エフェクター機能または応答の例である。

40

【0191】

用語“エフェクター機能”は、細胞の特殊化された機能をいう。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。

【0192】

50

用語“免疫老化”は、数ある中で、例えば、癌、ワクチン接種、感染性病原体に対する免疫応答の障害をもたらす、免疫機能の減少をいう。これは、感染に応答する宿主の能力および、特にワクチン接種による、長期記憶の発達の両者を含む。この免疫欠損は偏在性であり、経過時間よりむしろ寿命に対する年齢の関数として、長命種および短命種の両者で見られる。高齢者の罹病率および死亡率の頻度を高める主用貢献因子と考えられる。免疫老化は、無作為な低下性現象ではなく、むしろ進化パターンを逆に繰り返すように見え、免疫老化により影響を受けるパラメータの大部分が遺伝子制御下にあるように見える。免疫老化はまたウイルスおよび細菌のような多様な抗原への避けられない暴露の連続的攻撃の結果として考えられ得る場合もある。免疫老化は、例えば、高齢集団に多くの病理学的に顕著な健康問題を起こす、多因子性状態である。造血幹細胞枯渇、貪食細胞およびNK細胞の総数減少および液性免疫の減少のような年齢依存性生物学的変化が、免疫老化の発生に貢献する。ある面において、免疫老化は、免疫細胞におけるテロメア長の測定により、個々に測定できる(例えば、US 5 7 4 1 6 7 7号参照)。免疫老化はまた、個々に、65歳以上の対象におけるナイーブCD4および／またはCD8 T細胞、T細胞レパトリまたはワクチン接種に対する応答の正常より低い数値を実証することによっても決定できる。

【0193】

用語“免疫応答障害”は、対象が、数あるなかで、例えば、癌、ワクチン接種、病原体感染に対する、適切な免疫応答を有しない状態をいう。ある態様において、免疫応答障害を有する対象は、予防的ワクチン接種後に保護的抗体力価レベルに達すると予測されないまたは患者は療的ワクチン接種後疾患負荷減少を有しない。対象は、対象が、高齢、化学療法処置を受けている対象、無脾症対象、免疫不全対象またはHIV/AIDSを有する対象のような、免疫機能低下が知られる集団のメンバーであるかまたは免疫機能低下の病歴を有するならば、免疫応答障害も有し得る。ここに記載する方法は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、RAD001のようなアロステリックmTOR阻害剤の投与により、免疫応答障害の処置を可能にする。

【0194】

用語“誘導性”プロモーターは、遺伝子産物をコードするまたは特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結したとき、遺伝子産物を、実質的に細胞にプロモーターに対応するインデューサーが存在するときのみ細胞において産生させる、ヌクレオチド配列をいう。

【0195】

ここで使用する用語“細胞内シグナル伝達ドメイン”は、分子の細胞内部分をいう。ある態様において、細胞内シグナルドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊化された機能の実施を指示する。細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達の切断された一部を使用する範囲内で、このような切断された一部を、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、完全鎖の代わりに使用してよい。用語細胞内シグナル伝達ドメインは、それゆえに、エフェクター機能シグナルの伝達に十分な細胞内シグナル伝達ドメインのあらゆる切断された一部を含むことを意図する。

【0196】

ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは一次細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。一次細胞内シグナル伝達ドメインの例は、一次刺激または抗原依存的刺激を担う分子に由来するものを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激性細胞内ドメインを含み得る。共刺激性細胞内シグナル伝達ドメインの例は、共刺激性シグナルまたは抗原非依存的刺激を担う分子に由来するものを含む。例えば、CAR Tの場合、一次細胞内シグナル伝達ドメインはT細胞受容体の細胞質配列を含むことができ、共刺激性細胞内シグナル伝達ドメインは共受容体または共刺激性分子の細胞質配列を含むことができる。

【0197】

一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまた

は I T A M として知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。I T A M 含有一次細胞質シグナル伝達配列の例は、C D 3 ゼータ、F c R ガンマ、F c R ベータ、C D 3 ガンマ、C D 3 デルタ、C D 3 イプシロン、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 2 7 8 (“ I C O S ” としても知られる)、F c ε R I および C D 6 6 d 由来のものを含むが、これらに限定されない。本発明で特に有用である一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む分子のさらなる例は、D A P 1 0、D A P 1 2 および C D 3 2 のものを含む。

【0198】

用語“ゼータ”または代替的にゼータ鎖”、“C D 3 ゼータ”または“T C R ゼータ”は、G e n B a n k 受託番号 B A G 3 6 6 6 4 . 1 として提供されるタンパク質または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な塩基として定義され、
 “ゼータ刺激性ドメイン”または代替的に“C D 3 ゼータ刺激性ドメイン”または“T C R ゼータ刺激性ドメイン”は、T細胞活性化に必要な初期シグナルを機能的に伝達するのに十分であるゼータ鎖の細胞質ドメイン由来のアミノ酸残基として定義する。ある面において、ゼータの細胞質ドメインは、G e n B a n k 受託番号 B A G 3 6 6 6 4 . 1 の残基 5 2 ~ 1 6 4 または、その機能的オルソログである非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基を含む。ある面において、“ゼータ刺激性ドメイン”または“C D 3 ゼータ刺激性ドメインは配列番号 1 8 として提供される配列である。ある面において、“ゼータ刺激性ドメイン”または“C D 3 ゼータ刺激性ドメインは配列番号 2 0 として提供される配列である。

【0199】

用語“共刺激性分子”は、共刺激性リガンドと特異的に結合するT細胞上の同族結合パートナーをいい、それにより、増殖のような、しかし、それに限定されないT細胞による共刺激性応答が仲介される。共刺激性分子は、効率的免疫応答に必要な抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。共刺激性分子は、M H C クラス I 分子、T N F 受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子(S L A M タンパク質)、活性化NK細胞受容体、B T L A、T o l l リガンド受容体、O X 4 0、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D S、I C A M - 1、L F A - 1 (C D 1 1 a / C D 1 8)、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、B 7 - H 3、C D S、I C A M - 1、I C O S (C D 2 7 8)、G I T R、B A F F R、L I G H T、H V E M (L I G H T R)、K I R D S 2、S L A M F 7、N K p 8 0 (K L R F 1)、N K p 4 4、N K p 3 0、N K p 4 6、C D 1 9、C D 4、C D 8 アルファ、C D 8 ベータ、I L 2 R ベータ、I L 2 R ガンマ、I L 7 R アルファ、I T G A 4、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、N K G 2 D、N K G 2 C、T N F R 2、T R A N C E / R A N K L、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 (T a c t i l e)、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)、C D 6 9、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、L A T、G A D S、S L P - 7 6、P A G / C b p、C D 1 9 a および C D 8 3 と特異的に結合するリガンドを含むが、これらに限定されない。

【0200】

共刺激性細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激性分子の細胞内部分をいう。

【0201】

細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来する分子の細胞内部分全体または天然細胞内シグナル伝達ドメイン全体または機能的そのフラグメントを含み得る。

【0202】

用語“4 - 1 B B”は、G e n B a n k 受託番号 A A A 6 2 4 7 8 . 2 として提供され

るアミノ酸配列または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基を有するTNFRスーパーファミリーのメンバーをいう；そして“4-1BB共刺激ドメイン”は、GenBank受託番号AAA62478.2のアミノ酸残基214～255または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基として定義される。ある面において、“4-1BB共刺激ドメイン”は、配列番号14として提供される配列または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基である。

【0203】

ここで使用する“インビトロ転写RNA”は、インビトロで合成されている、RNA、好ましくはmRNAをいう。一般に、インビトロ転写RNAは、インビトロ転写ベクターから産生される。インビトロ転写ベクターは、インビトロ転写RNAを産生するために使用する鋳型を含む。

10

【0204】

用語“単離”は、自然な状態から変えられたまたは除かれたことを意味する。例えば、生存動物に天然に存在する核酸またはペプチドは“単離”されていないが、その自然な状態の併存物質から部分的にまたは完全に離された同じ核酸またはペプチドは、“単離”されている。単離核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在でき、または、例えば、宿主細胞のような、非天然環境で存在できる。

【0205】

本発明の文脈において、一般的に生じる核酸塩基について次の略語を使用する。“A”はアデノシンをいい、“C”はシトシンをいい、“G”はグアノシンをいい、“T”はチミジンをいい、そして“U”はウリジンをいう。

20

【0206】

用語“レンチウイルス”は、レトロウイルス科ファミリーの属をいう。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染できるという点で、レトロウイルスの中でも独特である；それらは、相当量の遺伝情報を宿主細胞のDNAに送達でき、それゆえに、それらは遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の一つである。HIV、SIVおよびFIVは、全てレンチウイルスの例である。

【0207】

用語“レンチウイルスベクター”は、少なくとも一部レンチウイルスゲノムに由来するベクターをいい、特に、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464(2009)において提供されるような自己不活性化レンチウイルスベクターを含む。臨床で使用し得るレンチウイルスベクターの他の例は、Oxford BioMedicaからのLENTIVECTOR(登録商標)遺伝子送達テクノロジー、LentigenからのLENTIMAXTMを含むが、これらに限定されない。非臨床タイプのレンチウイルスベクターも利用可能であり、当業者に知られる。

30

【0208】

用語“低い免疫増強用量”は、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001またはラパマイシンまたは触媒的mTOR阻害剤と組み合わせて使用したとき、例えば、P70S6キナーゼ活性の阻害により測定して、mTOR活性を一部、しかし完全ではなく、阻害するmTOR阻害剤の用量をいう。例えば、P70

40

S6キナーゼの阻害により、mTOR活性を評価する方法は、ここに記載する。本用量は、完全な免疫抑制を生じるには不十分であるが、免疫応答の増強に十分である。ある態様において、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量は、PD-1陽性T細胞数減少および／またはPD-1陰性T細胞数増加またはPD-1陰性T細胞／PD-1陽性T細胞比増加をもたらす。ある態様において、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量は、ナイーブT細胞の数の増加をもたらす。ある態様において、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量は、次の1以上をもたらす：

1以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；

50

例えば、記憶 T 細胞、例えば、記憶 T 細胞前駆体の、K L R G 1 の発現減少；および次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶 T 細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加した C D 6 2 L^高、増加した C D 1 2 7^高、増加した C D 2 7⁺、減少した K L R G 1 および増加した B C L 2；

ここで、上記の何れかの変化は、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に、生じる。

【0209】

ある態様において、m T O R 阻害剤の用量は、少なくとも 5 % であるが、90 % を超えない、少なくとも 10 % であるが、90 % を超えない、少なくとも 15 % であるが、90 % を超えない、少なくとも 20 % であるが、90 % を超えない、少なくとも 30 % であるが、90 % を超えない、少なくとも 40 % であるが、90 % を超えない、少なくとも 50 % であるが、90 % を超えない、少なくとも 60 % であるが、90 % を超えないまたは少なくとも 70 % であるが、90 % を超えない m T O R 阻害と関係するまたは提供する。

10

【0210】

ある態様において、m T O R 阻害剤の用量は、少なくとも 5 % であるが、80 % を超えない、少なくとも 10 % であるが、80 % を超えない、少なくとも 15 % であるが、80 % を超えない、少なくとも 20 % であるが、80 % を超えない、少なくとも 30 % であるが、80 % を超えない、少なくとも 40 % であるが、80 % を超えない、少なくとも 50 % であるが、80 % を超えないまたは少なくとも 60 % であるが、80 % を超えない m T O R 阻害と関係するまたは提供する。ある態様において、m T O R 阻害剤の用量は、少なくとも 5 % であるが、70 % を超えない、少なくとも 10 % であるが、70 % を超えない、少なくとも 15 % であるが、70 % を超えない、少なくとも 20 % であるが、70 % を超えない、少なくとも 30 % であるが、70 % を超えない、少なくとも 40 % であるが、70 % を超えないまたは少なくとも 50 % であるが、70 % を超えない m T O R 阻害と関係するまたは提供する。

20

【0211】

ある態様において、m T O R 阻害剤の用量は、少なくとも 5 % であるが、60 % を超えない、少なくとも 10 % であるが、60 % を超えない、少なくとも 15 % であるが、60 % を超えない、少なくとも 20 % であるが、60 % を超えない、少なくとも 30 % であるが、60 % を超えないまたは少なくとも 40 % であるが、60 % を超えない m T O R 阻害と関係するまたは提供する。

30

【0212】

ある態様において、m T O R 阻害剤の用量は、少なくとも 5 % であるが、50 % を超えない、少なくとも 10 % であるが、50 % を超えない、少なくとも 15 % であるが、50 % を超えない、少なくとも 20 % であるが、50 % を超えない、少なくとも 30 % であるが、50 % を超えないまたは少なくとも 40 % であるが、50 % を超えない m T O R 阻害と関係するまたは提供する。

【0213】

ある態様において、m T O R 阻害剤の用量は、少なくとも 5 % であるが、40 % を超えない、少なくとも 10 % であるが、40 % を超えない、少なくとも 15 % であるが、40 % を超えない、少なくとも 20 % であるが、40 % を超えない、少なくとも 30 % であるが、40 % を超えないまたは少なくとも 35 % であるが、40 % を超えない m T O R 阻害と関係するまたは提供する。

40

【0214】

ある態様において、m T O R 阻害剤の用量は、少なくとも 5 % であるが、30 % を超えない、少なくとも 10 % であるが、30 % を超えない、少なくとも 15 % であるが、30 % を超えない、少なくとも 20 % であるが、30 % を超えないまたは少なくとも 25 % であるが、30 % を超えない m T O R 阻害と関係するまたは提供する。

【0215】

50

ある態様において、mTOR阻害剤の用量は、少なくとも1%、2%、3%、4%または5%であるが、20%を超えない、少なくとも1%、2%、3%、4%または5%であるが、30%を超えない、少なくとも1%、2%、3%、4%または5%であるが、35%を超えない、少なくとも1%、2%、3%、4%または5%であるが、40%を超えないまたは少なくとも1%、2%、3%、4%または5%であるが、45%を超えないmTOR阻害と関係するまたは提供する。

【0216】

ある態様において、mTOR阻害剤の用量は、少なくとも1%、2%、3%、4%または5%であるが、90%を超えないmTOR阻害と関係するまたは提供する。

【0217】

ここに記載するように、mTOR阻害の程度はP70 S6K阻害の程度として表すことができ、例えば、mTOR阻害の程度を、P70 S6K活性の減少レベル、例えば、P70 S6K基質のリン酸化の減少により決定できる。mTOR阻害のレベルは、ここに記載する方法、例えばBoulayアッセイにより評価できる。

【0218】

特に断らない限り、“アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列”は、互いの縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードする全ヌクレオチド配列を含む。用語タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列はまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、あるバージョンにおいて、イントロンを含み得る限り、イントロンも含み得る。

【0219】

本発明の文脈において、一般的に生じる核酸塩基について次の略語を使用する。“A”はアデノシンをいい、“C”はシトシンをいい、“G”はグアノシンをいい、“T”はチミジンをいい、そして“U”はウリジンをいう。

【0220】

用語“核酸”または“ポリヌクレオチド”は、一本鎖または二本鎖形態いずれかのデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)およびそのポリマーをいう。特に限定しない限り、本用語は、対照核酸と類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似する方法で代謝される、天然ヌクレオチドの既知アナログを含む核酸を包含する。特に断らない限り、特定の核酸配列はまた、默示的に保存的に修飾されたそのバリエーション(例えば、縮重コドン置換)、アレル、オルソログ、SNPおよび相補的配列ならびに明示的に示される配列も包含する。具体的に、縮重コドン置換は、1以上の選択した(または全)コドンの3位が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を賛成することにより達成し得る(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); およびRossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

【0221】

用語“操作可能に連結”または“転写制御”は、制御配列と異種核酸配列の間の、後者の発現を生じる機能的連結をいう。例えば、第一核酸配列は、第一核酸配列が第二核酸配列と機能的関係におかれたとき、操作可能に連結している。例えば、プロモーターは、プロモーターがコーディング配列の転写または発現に影響するならば、コーディング配列に操作可能に連結する。操作可能に連結したDNA配列は互いに隣接してよく、そして、例えば、2タンパク質コーディング領域を合わせる必要があるとき、同じリーディングフレーム内にある。

【0222】

免疫原性組成物の“非経腸”投与なる用語は、例えば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)または胸骨内、腫瘍内注射または点滴技術を含む。

【0223】

用語“ペプチド”、“ポリペプチド”および“タンパク質”は相互交換可能に使用し、ペプチド結合により共有結合したアミノ酸残基からなる化合物をいう。タンパク質また

10

20

30

40

50

はペプチドは少なくとも2アミノ酸を含まなければならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸数の上限の設定はない。ポリペプチドは、互いにペプチド結合により連結した2以上のアミノ酸を含むあらゆるペプチドまたはタンパク質を含む。ここで使用する本用語は、例えば、ペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとしても一般に呼ばれる短鎖および一般にタンパク質として当分野で呼ばれ、多くのタイプが存在する長鎖の両者をいう。“ポリペプチド”は、とりわけ、例えば、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同ポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導体、アナログ、融合タンパク質を含む。ポリペプチドは天然ペプチド、組み換えペプチドまたはこれらの組み合わせを含む。

【0224】

10

ここで使用する“ポリ(A)”は、ポリアデニル化によりmRNAに結合した一連のアデノシンである。一過性発現のための構築物の好ましい態様において、ポリAは50〜5000(配列番号34)、好ましくは64を超え、より好ましくは100を超え、最も好ましくは300または400を超える。ポリ(A)配列は、局在化、安定性または翻訳効率のようなmRNA機能性を調節するために、化学的にまたは酵素的に修飾できる。

【0225】

ここで使用する“ポリアデニル化”は、メッセンジャーRNA分子への、ポリアデニル部分またはその修飾バリエーションの共有結合をいう。真核生物において、ほとんどのメッセンジャーRNA(mRNA)分子は、3'末端でポリアデニル化されている。3'ポリ(A)テイルは、酵素、ポリアデニル酸ポリメラーゼの作用によりプレmRNAに添加されたアデニンヌクレオチドの長い配列(しばしば数百)である。高等真核生物において、ポリ(A)テイルは、特異的配列、ポリアデニル化シグナルを含む転写物に添加される。ポリ(A)テイルおよびそれに結合したタンパク質は、mRNAをエキソヌクレアーゼによる分解から守るのに役立つ。ポリアデニル化は、転写終結、mRNAの核からの排出および翻訳にも重要である。ポリアデニル化は、核でDNAのRNAへの転写直後だけでなく、さらに、細胞質で後に起こり得る。転写が中絶された後、mRNA鎖は、RNAポリメラーゼと結合したエンドヌクレアーゼ複合体の作用により開裂される。開裂部位は、通常、開裂部位近くの塩基配列AAUAAA(配列番号40)の存在により特徴付けられる。mRNAが開裂された後、アデノシン残基は、開裂部位の遊離3'末端に付加される。

20

【0226】

30

“プロドラッグ”または“プロ・ドラッグ”は、対象体内で、薬物に変換される化合物をいう。ある態様において、変換は、結合、例えば、共有結合の切断または形成を含む。一般に、共有結合の切断が、薬物を遊離させる。

【0227】

免疫応答の文脈における用語“促進”または“増強”は、とりわけ、免疫細胞が癌細胞を標的とするおよび／または殺す、病原体および病原体感染細胞を標的とするおよび／または殺す能力およびワクチン接種後の防御免疫の増加のような免疫応答の増加をいう。ある態様において、防御免疫は、同じ抗原を発現する病原体によるその後の感染に対する防御に十分な免疫応答(例えば抗体力価)の存在をいう。

【0228】

40

用語“プロモーター”は、ポリヌクレオチド配列の特定の転写の開始に必要な、細胞の合成機能または導入された合成機能により認識されるDNA配列をいう。

【0229】

用語“プロモーター／制御配列”は、該プロモーター／制御配列に操作可能に連結した遺伝子産物の発現に必要な核酸配列をいう。ある例において、この配列はコアプロモーター配列であってよく、他の例において、この配列はまた遺伝子産物の発現に必要なエンハンサー配列および他の制御要素も含んでよい。プロモーター／制御配列は、例えば、組織特異的方法で遺伝子産物を発現するものであり得る。

【0230】

用語“予防”は、疾患または疾患状態に対する予防または防御的処置を意味する。予防

50

は、完全、例えば、疾患または疾患状態の完全な欠如であり得る。予防は、対象における疾患または疾患状態を発症する可能性が、対象が予防処置を受けていなかったときより低いように、部分的でもあり得る。

【0231】

ここで使用する用語“ラパログ”は、ラパマイシンの小分子アナログをいう。

【0232】

用語“組み換え抗体”は、例えば、バクテリオファージまたは酵母発現系により発現させた抗体のような、組み換えDNAテクノロジーを使用して産生させる抗体をいう。本用語はまた抗体をコードするDNA分子の合成により産生され、そのDNA分子が抗体タンパク質または抗体を特定するアミノ酸配列を発現するものである抗体を意味するとも解釈すべきであり、ここで、DNAまたはアミノ酸配列は、当分野で利用可能であり、知られる組み換えDNAまたはアミノ酸配列テクノロジーを使用して得られている。

10

【0233】

ここで使用する5'キャップ(別名RNAキャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップまたはRNA m⁷Gキャップ)は、転写開始直後に真核メッセンジャーRNAの“前面”または5'末端に付加されている修飾グアニンヌクレオチドである。5'キャップは、第一転写ヌクレオチドに連結した末端基からなる。その存在は、リボゾームによる認識およびRNAseからの保護に重要である。キャップ付加は転写と結びつき、互に影響し合うように共転写的に生じる。転写開始直後、合成中のmRNAの5'末端は、RNAポリメラーゼと結合したキャップ合成複合体により結合される。この酵素複合体は、mRNAキャッピングに必要な化学反応を触媒する。合成は、多工程生化学反応として進行する。キャッピング部分は、安定性または翻訳効率のようなmRNAの機能性を調節するために修飾できる。

20

【0234】

用語“シグナル伝達経路”は、細胞のある部分から細胞の他の部分へのシグナルの伝達に役割を有する多様なシグナル伝達分子間の生化学的関係をいう。用語“細胞表面受容体”は、シグナルを受け、細胞膜を通してシグナルを伝達できる分子および分子複合体を含む。

【0235】

用語“シグナル伝達ドメイン”は、第二メッセンジャーの産生によりまたはこのようなメッセンジャーに応答することによりエフェクターとして機能することにより、規定されたシグナル伝達経路を経て細胞活性を制御するために、細胞内で情報を伝達することにより作用する、タンパク質の機能的部分をいう。

30

【0236】

用語“実質的に精製された”細胞は、他の細胞型を本質的に含まない細胞をいう。実質的に精製された細胞はまた、天然に存在する状態では通常関係している他の細胞型から離されている細胞もいう。ある例において、実質的に精製された細胞の集団は、細胞の均一集団をいう。他の例において、この用語は、単に、その天然の状態で本来関係している細胞から離されている細胞をいう。ある面において、細胞は、インビトロで培養される。他の面において、細胞は、インビトロで培養されない。

40

【0237】

用語“特異的に結合”は、サンプルに存在する同族結合パートナー(例えば、T細胞に存在する刺激性および/または共刺激性分子)タンパク質を認識し、結合する抗体またはリガンドをいうが、その抗体またはリガンドはサンプルにおける他の分子を実質的に認識または結合しない。

【0238】

用語“刺激”は、刺激性分子(例えば、TCR/CD3複合体またはCAR)とその同族リガンド(またはCARの場合腫瘍抗原)の結合により誘発され、それにより、TCR/CD3複合体を経るシグナル伝達または適切なNK受容体もしくはCARのシグナル伝達ドメインを経るシグナル伝達を含むが、これらに限定されないシグナル伝達事象を仲介する

50

、一次応答をいう。刺激は、ある分子の発現変更を仲介できる。

【0239】

用語“刺激性分子”は、T細胞シグナル伝達経路の少なくともある面では刺激性方向にTCR複合体の一次活性化を制御する、一次細胞質シグナル伝達配列を提供するT細胞により発現される分子をいう。ある面において、一次シグナルは、例えば、TCR／CD3複合体と、ペプチドを載せたMHC分子の結合により開始され、これは、増殖、活性化、分化などを含むが、これらに限定されないT細胞応答の仲介に至る。刺激性方向に作用する一次細胞質シグナル伝達配列(“一次シグナル伝達ドメイン”とも呼ばれる)は、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。本発明において特に有用であるITAM含有一次細胞質シグナル伝達配列の例は、CD3ゼータ、共通FcRガンマ(FcER1G)、FcRベータ(FcイプシロンR1b)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、DAP10、DAP12、CD278(“ICOS”としても知られる)、FcεRI、CD66d、DAP10およびDAP12由来のものを含むが、これらに限定されない。本発明の特定のCARにおいて、任意の1以上の本発明のCARにおける細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内シグナル伝達配列、例えば、CD3ゼータの一次シグナル伝達配列を含む。本発明の特定のCARにおいて、CD3ゼータの一次シグナル伝達配列は、配列番号18として提供される配列または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基である。本発明の特定のCARにおいて、CD3ゼータの一次シグナル伝達配列は、配列番号20として提供される配列または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基である。

10

20

【0240】

用語“対象”は、免疫応答を惹起できるあらゆる生存生物をいう(例えば、哺乳動物、ヒト)。ある態様において、対象は、ヒトである。対象は、あらゆる年齢であり得る。ある態様において、対象は高齢ヒト対象、例えば、65歳以上である。ある態様において、対象は、高齢ではない、例えば、65歳未満のヒト対象である。ある態様において、対象は、ヒト小児科対象、例えば、18歳以下である。ある態様において、対象は、成人対象、例えば、18歳を超える。

【0241】

ここで使用する用語“治療”は、処置を意味する。治療効果は、疾患状態の軽減、抑制、寛解または消失により得られる。

30

【0242】

用語“転移ベクター”は、単離核酸を含み、単離核酸の細胞内部への送達に使用できる組成物をいう。多数のベクターが当分野で知られ、直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と結合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを含むが、これらに限定されない。それゆえに、用語“転移ベクター”は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。本用語はまた、例えば、ポリリシン化合物、リボソームなどのような、核酸の細胞への転移を促進する非プラスミドおよび非ウイルス化合物をさらに含むとも解釈すべきである。ウイルス転移ベクターの例は、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどを含むが、これらに限定されない。

40

【0243】

用語“組織特異的”プロモーターは、遺伝子によりコードされるまたは特定化されるポリヌクレオチドと操作可能に連結したとき、実質的に、細胞がプロモーターに対応する組織タイプの細胞であるときにのみ、細胞において遺伝子産物を産生させる、ヌクレオチド配列をいう。

【0244】

用語“遺伝子導入”または“形質転換”または“形質導入”は、外来性核酸が宿主細胞に伝達または導入される過程をいう。“遺伝子導入”または“形質転換”または“形質導入”細胞は、外来性核酸が遺伝子導入、形質転換または形質導入されているものである。

50

細胞は、初代対象細胞およびその子孫を含む。

【0245】

ここで使用する“一過性”は、数時間、数日または数週間の期間の非統合導入遺伝子の発現をいい、ここで、発現の期間は、宿主細胞におけるゲノムに統合されたときまたは安定プラスミドレプリコン内に含まれるときの遺伝子の発現期間より短い。

【0246】

本発明の文脈において、“腫瘍抗原”または“過増殖性障害抗原”または“過増殖性障害と関係する抗原”は、特定の過増殖性障害に共通する抗原をいう。ある面において、本発明の過増殖性障害抗原は、原発性または転移黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎癌および乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などのような腺癌を含むが、これらに限定されない癌由来である。

【0247】

用語“ワクチン”は、能動免疫を産生するように注射または他の方法で体内に導入される、通常抗原(例えば、とりわけ不活性化感染因子または感染因子、腫瘍抗原のある部分)を含む、抗原または抗原性部分の懸濁液または溶液のような組成物である。ワクチンを構成する抗原または抗原性部分は、生存または死滅微生物または微生物または腫瘍細胞を含むが、これに限定されない他の細胞から精製された天然産物、合成産物、遺伝子操作したタンパク質、ペプチド、ポリサッカライドまたは類似産物またはアレルゲンであり得る。抗原または抗原性部分はまたタンパク質、ペプチド、ポリサッカライドまたは類似産物のサブユニットでもよい。

【0248】

ここで使用する用語“制御可能キメラ抗原受容体(RCAR)”は、一連のポリペプチド、一般に最も単純な態様で2ポリペプチドをいい、RCARX細胞にあるとき、標的細胞、一般に癌細胞に対する特異性および制御可能細胞内シグナル産生または増殖を有するRCARX細胞を提供し、これはRCARX細胞の免疫エフェクター特性を最適化できる。RCARX細胞は、少なくとも一部、抗原結合ドメインにより結合される抗原を含む標的細胞に対する特性を提供するのを抗原結合ドメインに頼る。ある態様において、RCARは、二量体化分子の存在下、細胞内シグナル伝達ドメインを抗原結合ドメインに結合できる、二量体化スイッチを含む。

【0249】

ここで使用する用語“膜アンカー”または“膜繫留ドメイン”は、細胞外または細胞内ドメインを原形質膜に繫留するのに十分なポリペプチドまたは部分、例えば、ミリストイル基をいう。

【0250】

ここで使用する“スイッチドメイン”は、例えば、RCARをいうとき、二量体化分子の存在下、他のスイッチドメインと結合する物、一般にポリペプチドベースの物をいう。結合は、第一スイッチドメインに結合、例えば融合した第一の物と、第二スイッチドメインに結合、例えば融合した第二の物の機能的カップリングをもたらす。第一および第二スイッチドメインは、まとめて二量体化スイッチとして呼ばれる。ある態様において、第一および第二スイッチドメインは互いに同一であり、例えば、同じ一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、集合的にホモ二量体化スイッチと呼ばれる。ある態様において、第一および第二スイッチドメインは互いに異なり、例えば、異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、集合的にヘテロ二量体化スイッチと呼ばれる。ある態様において、スイッチは細胞内である。ある態様において、スイッチは細胞外である。ある態様において、スイッチドメインはポリペプチドベースの物、例えば、FKBPまたはFRBベースの物であり、二量体化分子は小分子、例えば、ラバログである。ある態様において、スイッチドメインはポリペプチドベースの物、例えば、mycペプチドに結合するscFvであり、二量体化分子は、1以上のmyc scFvと結合するポリペプチド、そのフラグメントまたはポリペプチドの多量体、例えば、mycリガンドまたはmycリガンド

の多量体である。ある態様において、スイッチドメインはポリペプチドベースの物、例えば、m y c 受容体であり、二量体化分子は抗体またはそのフラグメント、例えば、m y c 抗体である。

【0251】

ここで使用する用語“二量体化分子”は、例えば、R C A Rをいうとき、第一スイッチドメインと第二スイッチドメインの結合を促進する分子をいう。ある態様において、二量体化分子は対象に天然に存在しないか、または顕著な二量体化をもたらす濃度で生じない。ある態様において、二量体化分子は小分子、例えば、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、R A D 0 0 1である。

【0252】

ここで使用する“難治性”は、処置に応答しない疾患、例えば、癌をいう。ある態様において、難治性癌は、処置前または開始時点で処置に耐性であり得る。他の態様において、難治性癌は、処置中に耐性になり得る。難治性癌は、耐性癌とも呼ばれる。

【0253】

ここで使用する“再発した”または“再発”は、一定期間の改善または応答後、例えば、先の治療、例えば、癌治療の処置後の、疾患(例えば、癌)または癌のような疾患の兆候および症状の再出現をいう。例えば、応答期間は、癌細胞のレベルの、ある閾値未満、例えば、20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満への低下を含む。再出現は、癌細胞のレベルの、ある閾値を越える、例えば、20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%または1%を超える増加を含み得る。

【0254】

範囲：本開示をとおして、本発明の種々の面は、範囲形式で示され得る。範囲形式での記載は単に便宜さおよび簡潔さのためであり、本発明の範囲上の確固たる限定として解釈してはならないと理解されるべきである。よって、範囲の記載は、具体的に記載された全ての可能な下位範囲ならびにその範囲内の個々の数値を有すると考慮すべきである。例えば、1～6のような範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などのような具体的に開示された下位範囲、ならびにその範囲内の個々の数値、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を有すると解釈すべきである。他の例として、95～99%同一性のような範囲は、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有する何かを含み、96～99%、96～98%、96～97%、97～99%、97～98%および98～99%同一性のような下位範囲を含む。これは、範囲の広さと無関係に適用される。

【0255】

用語“T細胞の製剤”は、少なくとも1つのT細胞を含む製剤をいう。ある態様において、末梢血と比較してT細胞が富化されている。

【0256】

用語“異種”は、異なる種の動物由来の移植片をいう。

【0257】

ここで使用する用語“アフエレーシス”は、ドナーまたは患者の血液をドナーまたは患者から採り、選択した特定の成分を分ける装置を通し、残りをドナーまたは患者の循環に、例えば、輸血により戻す、当分野で認められている体外過程をいう。それゆえに、“アフエレーシスサンプル”は、アフエレーシスを使用して得たサンプルをいう。

【0258】

m T O R 阻害剤

ここで使用する用語“m T O R 阻害剤”は、細胞におけるm T O R キナーゼを阻害する、化合物またはリガンドまたはその薬学的に許容される塩をいう。ある態様において、m T O R 阻害剤は、アロステリック阻害剤である。ある態様において、m T O R 阻害剤は、触媒的阻害剤である。

【0259】

アロステリックm T O R 阻害剤は、中性三環式化合物ラパマイシン(シロリムス)、例え

10

20

30

40

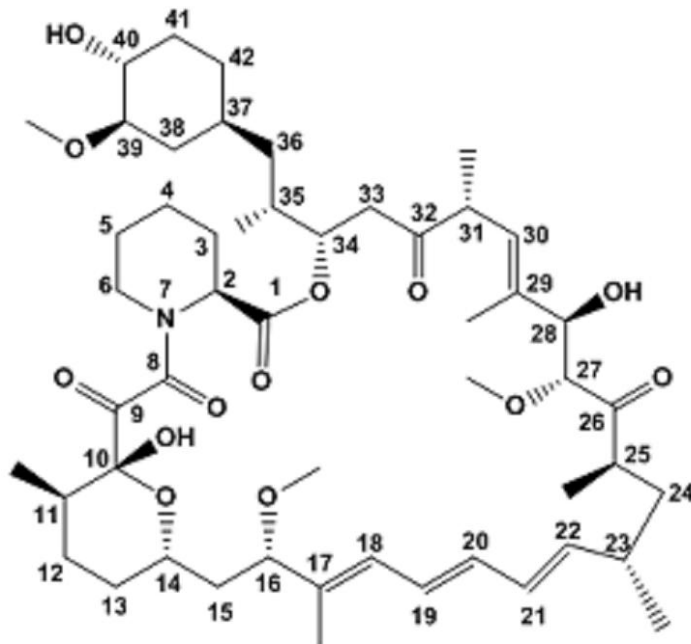
50

ば、ラパマイシン誘導体、ラパマイシンアナログ(ラパログとも称する)およびmTOR活性を阻害する他のマクロライド化合物を含む、ラパマイシンと構造的および機能的類似性を有する化合物であるラパマイシン関連化合物を含む。

【0260】

ラパマイシンは、式Aに示す構造を有する、ストレプトミセス・ハイグロスコピクスにより産生されるマクロライド抗生物質である。

【化1】



(A)

【0261】

例えば、McAlpine, J.B., et al., J. Antibiotics (1991) 44: 688; Schreiber, S.L., et al., J. Am. Chem. Soc. (1991) 113: 7433; 米国特許 3,929,992号参照。ラパマイシンについて種々のナンバリングスキームが提唱されている。混乱を避けるため、特定のラパマイシンアナログをここで命名するとき、名称は、式Aのナンバリングスキームを使用したラパマイシンを参照して付与する。

【0262】

本発明において有用なラパマイシンアナログは、例えば、ラパマイシンのシクロヘキシル環上のヒドロキシ基がOR₁(ここで、R₁はヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルコキシアルキル、アシルアミノアルキルまたはアミノアルキルである)で置き換えられているO-置換アナログ; 例えば引用によりその内容を本明細書に包含させるUS5,665,772号およびWO94/09010号に記載のような、エベロリムスとしても知られるRAD001である。他の適当なラパマイシンアナログは、26位または28位が置換されたものを含む。ラパマイシンアナログは、例えば、内容を引用により本明細書に包含させるUS6,015,815号、WO95/14023号およびWO99/15530号に記載のような、上記アナログのエピマー、特に40位、28位または26位が置換され、場合によりさらに水素化されていてよいアナログのエピマーであってよく、例えばゾタロリムスとしても知られるABT578またはその内容を引用により本明細書に包含させるUS7,091,213号、WO98/02441号およびWO01/14387号に記載のラパマイシンアナログ、例えばリダフォロリムスとしても知られるAP23573である。

【0263】

US5,665,772号からの、本発明における使用に適するラパマイシンアナログの例は、40-O-ベンジル-ラパマイシン、40-O-(4'-ヒドロキシメチル)ベンジ

ルーラパマイシン、40-O-[4'-(1,2-ジヒドロキシエチル)]ベンジルルーラパマイシン、40-O-アリルルーラパマイシン、40-O-[3'-(2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4(S)-イル)-プロプ-2'-エン-1'-イル]ルーラパマイシン、(2'E,4'S)-40-O-(4',5'-ジヒドロキシペン-2'-エン-1'-イル)ルーラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシ)エトキシカルボニルメチルルーラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシ)エチルルーラパマイシン、40-O-(3-ヒドロキシ)プロピルルーラパマイシン、40-O-(6-ヒドロキシ)ヘキシルルーラパマイシン、40-O-[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチルルーラパマイシン、40-O-[(3S)-2,2-ジメチルジオキソラン-3-イル]メチルルーラパマイシン、40-O-[(2S)-2,3-ジヒドロキシプロプ-1-イル]ルーラパマイシン、40-O-(2-アセトキシ)エチルルーラパマイシン、40-O-(2-ニコチノイルオキシ)エチルルーラパマイシン、40-O-[2-(N-モルホリノ)アセトキシ]エチルルーラパマイシン、40-O-(2-N-イミダゾリルアセトキシ)エチルルーラパマイシン、40-O-[2-(N-メチル-N'-ピペラジニル)アセトキシ]エチルルーラパマイシン、39-O-デスメチル-39,40-O, O-エチレンルーラパマイシン、(26R)-26-ジヒドロ-40-O-(2-ヒドロキシ)エチルルーラパマイシン、40-O-(2-アミノエチル)ルーラパマイシン、40-O-(2-アセトアミノエチル)ルーラパマイシン、40-O-(2-ニコチンアミドエチル)ルーラパマイシン、40-O-(2-(N-メチル-イミダゾ-2'-イルカルベトキサミド)エチル)ルーラパマイシン、40-O-(2-エトキシカルボニルアミノエチル)ルーラパマイシン、40-O-(2-トリルスルホンアミドエチル)ルーラパマイシンおよび40-O-[2-(4',5'-ジカルボエトキシ-1',2',3'-トリアゾール-1'-イル)-エチル]ルーラパマイシンを含むが、これらに限定されない。

10

20

【0264】

本発明において有用な他のラパマイシンアナログは、ラパマイシンのシクロヘキシル環上のヒドロキシ基および／または28位のヒドロキシ基がヒドロキシエステル基で置き換えられたアナログが知られ、例えば、USRE 44,768号に見られるラパマイシンアナログ、例えばテムシロリムスである。

【0265】

本発明において有用な他のラパマイシンアナログは、16位のメトキシ基が他の置換基、好ましくは(場合によりヒドロキシ置換)アルキニルオキシ、ベンジル、オルトメトキシベンジルまたはクロロベンジルにより置き換えられているおよび／または39位のメトキシ基が39炭素と共に除去され、ラパマイシンのシクロヘキシル環が39位のメトキシ基を欠くシクロペンチル環になるものを含む；例えばその内容を引用により本明細書に包含させるWO 95/16691号およびWO 96/41807号に記載。アナログは、ラパマイシンの40位のヒドロキシがアルキル化されおよび／または32-カルボニルが還元されるようにさらに修飾され得る。

30

【0266】

WO 95/16691号からの本発明における使用に適するラパマイシンアナログの例は、16-デメトキシ-16-(ペン-2-イニル)オキシルーラパマイシン、16-デメトキシ-16-(ブ-2-イニル)オキシルーラパマイシン、16-デメトキシ-16-(プロパルギル)オキシルーラパマイシン、16-デメトキシ-16-(4-ヒドロキシブ-2-イニル)オキシルーラパマイシン、16-デメトキシ-16-ベンジルオキシ-40-O-(2-ヒドロキシエチル)ルーラパマイシン、16-デメトキシ-16-ベンジルオキシルーラパマイシン、16-デメトキシ-16-オルト-メトキシベンジルルーラパマイシン、16-デメトキシ-40-O-(2-メトキシエチル)-16-ペン-2-イニル)オキシルーラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-ホルミル-42-ノルルーラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-ヒドロキシメチル-42-ノルルーラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-カルボキシ-42-ノルルーラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)カルボニル-42-ノルルーラパマイシン、39-デメトキシ-4

40

50

0-デスオキシ-39-(モルホリン-4-イル)カルボニル-42-ノル-ラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-[N-メチル、N-(2-ピリジン-2-イル-エチル)]カルバモイル-42-ノル-ラパマイシンおよび39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-(p-トルエンスルホニルヒドラゾノメチル)-42-ノル-ラパマイシンを含むが、これらに限定されない。

【0267】

WO96/41807号からの本発明における使用に適するラパマイシンアナログの例は、32-デオキソ-ラパマイシン、16-O-ペント-2-イニル-32-デオキソ-ラパマイシン、16-O-ペント-2-イニル-32-デオキソ-40-O-(2-ヒドロキシ-エチル)-ラパマイシン、16-O-ペント-2-イニル-32-(S)-ジヒドロ-40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン、32(S)-ジヒドロ-40-O-(2-メトキシ)エチル-ラパマイシンおよび32(S)-ジヒドロ-40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンを含むが、これらに限定されない。

【0268】

他の適当なラパマイシンアナログは、その内容を引用により本明細書に包含させるUS2005/0101624号に記載のようなウミロリムスである。

【0269】

哺乳動物細胞において、ラパマイシンの標的(mTOR)キナーゼは、mTORC1複合体またはmTORC2複合体として記載される多タンパク質複合体として存在し、これは栄養素およびエネルギーの利用能を感知し、増殖因子からのインプットを統合し、シグナル伝達を強める。mTORC1複合体はラパマイシンのようなアロステリックmTOR阻害剤に感受性であり、mTOR、GβLおよびmTORの制御性結合タンパク質(raptor)からなり、ペプチジル-プロリルイソメラーゼFKBP12タンパク質(FK506-結合タンパク質1A、12kDa)に結合する。対照的に、mTORC2複合体は、mTOR、GβLおよびmTORのラパマイシン非感受性コンパニオンタンパク質(rictor)からなり、インビトロでFKBP12タンパク質に結合しない。

【0270】

mTORC1複合体は、成長および増殖制御のための増殖因子および栄養素感受性装置として作用する、タンパク質翻訳制御に関与することが示されている。mTORC1は、2つの重要な下流基質によりタンパク質翻訳を制御する：順番にリボソームタンパク質P70S6をリン酸化するP70S6キナーゼおよびeIF4E制御キャップ依存性翻訳の調節に重要な役割を有する真核生物翻訳開始因子4E結合タンパク質1(4EBP1)。mTORC1複合体は、細胞のエネルギーおよび栄養素ホメオスタシスに応答して細胞増殖を制御し、mTORC1の脱制御は多種多様なヒト癌で共通する。mTORC2の機能は、Aktのリン酸化およびアクチン細胞骨格動態の調節により細胞生存の制御に関与する。

【0271】

mTORC1複合体は、大部分、FKBP12との細胞内複合体形成およびmTORのFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメインへの結合を含む、ラパマイシンの作用機序により、ラパマイシンおよび誘導体のようなアロステリックmTOR阻害剤に感受性である。これは、mTORC1の立体構造を起こし、これが、その足場タンパク質raptorとの相互作用を、変え、かつ弱化させ、続いてP70S6K1のような基質がmTORに近づき、リン酸化されるのを妨害すると考えられる。ラパマイシンおよびRAD001のようなラパログは、良性および悪性両者の増殖障害と関係するmTORの過活性の阻害により、臨床的関連が増加している。

【0272】

エベロリムス(アフィニトール(登録商標))としても知られるRAD001は、化学名(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-12-{(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチルエチル

10

20

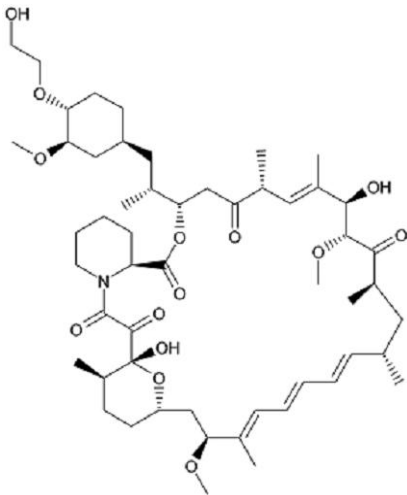
30

40

50

}-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.04,9]ヘキサトリアコンター-16,24,26,28-テトラエン-2,3,10,14,20-ペンタオンを有し、次の化学構造を有する。

【化2】



10

【0273】

エベロリムスは、進行型腎癌についてFDAが承認した薬剤であり、腫瘍学におけるいくつかの他のフェーズIII臨床試験において試験されている。前臨床試験は、エベロリムスがインビトロおよびインビボの両方で、恐らく、ラパマイシン感受性mTORC1機能の抑制により、広範な腫瘍細胞株の増殖を阻害できることを示している。エベロリムスは、ラパマイシンの誘導体として、mTORC1機能の一部、すなわちP70 S6キナーゼ(P70 S6K)および下流P70 S6K基質P70 S6の阻害に極めて強力なアロステリックmTOR阻害剤である。エベロリムス(および他のラパマイシンアナログ)のようなアロステリックmTOR阻害剤は、TORC2経路またはその結果的なAktシグナル伝達の活性化の阻害にはほとんどまたは全く効果を有しない。アロステリックmTOR阻害剤のさらなる例は、シロリムス(ラパマイシン、AY-22989)、40-[3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロパノエート]-ラパマイシン(テムシロリムスまたはCCI-779とも呼ばれる)およびリダフォロリムス(AP-23573/MK-8669)を含む。アロステリックmTOR阻害剤のさらなる例は、ゾタロリムス(ABT578)およびウミロリムスを含む。

20

30

【0274】

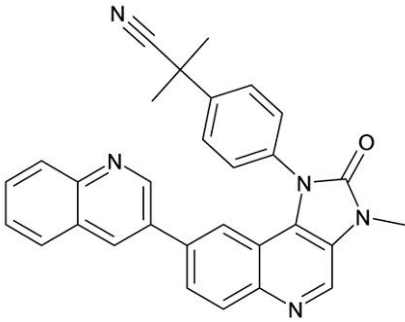
これとは別にまたはこれに加えて、触媒的、ATP競合的mTOR阻害剤が、mTORキナーゼドメインを直接標的とし、かつmTORC1およびmTORC2の両者を標的とすることが判明している。これらはまた、4EBP1-T37/46リン酸化およびキャップ依存性翻訳のようなラパマイシン耐性mTORC1アウトプットを調節するために、ラパマイシンのようなアロステリックmTOR阻害剤よりもmTORC1の効果的な阻害剤である。

40

【0275】

BEZ235は、2-メチル-2-[4-(3-メチル-2-オキソ-8-キノリン-3-イル-2,3-ジヒドロイミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)-フェニル]-プロピオニトリルを有し、次の化学構造を有する触媒的mTOR阻害剤である。

【化 3】



10

【0276】

BEZ 235は、モノトシル酸塩形態としても使用され得る。BEZ 235の合成は、WO 2006/122806号に記載されている。

【0277】

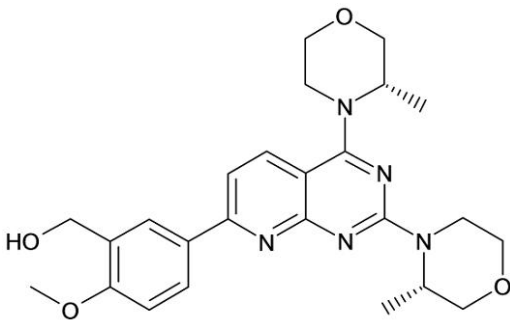
触媒的mTOR阻害剤として、BEZ 235は、ラパマイシン感受性(P70 S6Kのリン酸化および続くP70 S6の)機能およびラパマイシン非感受性(4EBP1のリン酸化)機能の両者を含む、mTORC1複合体の完全機能を廃止できる。BEZ 235は、使用する濃度により差次的効果を有し、それによってmTOR阻害は低濃度(100 nmol/L未満)で、しかし、デュアルPI3K/mTOR阻害が比較的高濃度(約500 nmol/L)で優勢である(Serra et al., 2008)。

20

【0278】

文献に記載されている他の触媒的mTOR阻害剤は、CCG 168(AZD-8055)としても知られる、Chresta, C.M., et al., Cancer Res, 2010, 70(1), 288-298)であり、これは、化学名{5-[2,4-ビス-((S)-3-メチルモルホリン-4-イル)-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル]-2-メトキシフェニル}-メタノールを有し、次の化学構造を有する。

【化 4】



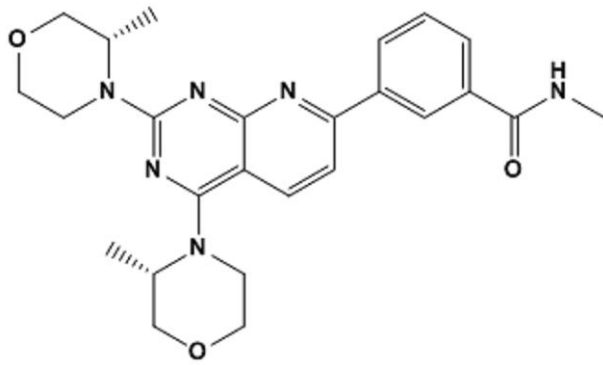
30

【0279】

文献に記載されている他の触媒的mTOR阻害剤は、次の化学構造を有する3-[2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル]-N-メチルベンズアミド(WO 09104019号)である。

40

【化 5】

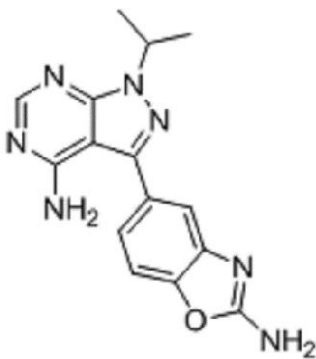


10

【0280】

文献に記載されている他の触媒的mTOR阻害剤は、次の化学構造を有する3-(2-アミノベンゾ[d]オキサゾール-5-イル)-1-イソプロピル-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-アミン(WO10051043号およびWO2013023184号)である。

【化 6】



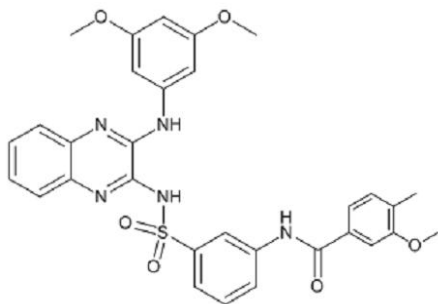
20

【0281】

文献に記載されている他の触媒的mTOR阻害剤は、次の化学構造を有するN-(3-(N-(3-((3,5-ジメトキシフェニル)アミノ)キノキサリン-2-イル)スルファモイル)フェニル)-3-メトキシ-4-メチルベンズアミド(WO07044729号およびWO12006552号)である。

30

【化 7】

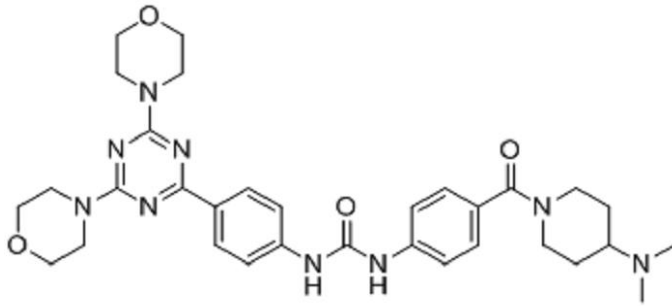


40

【0282】

文献に記載されている他の触媒的mTOR阻害剤は、PKI-587 (Venkatesan, A.M., J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645)であり、これは、化学名1-[4-[4-(ジメチルアミノ)ピペリジン-1-カルボニル]フェニル]-3-[4-(4,6-ジモルホリノ-1,3,5-トリアジン-2-イル)フェニル]尿素および次の化学構造を有する。

【化 8】

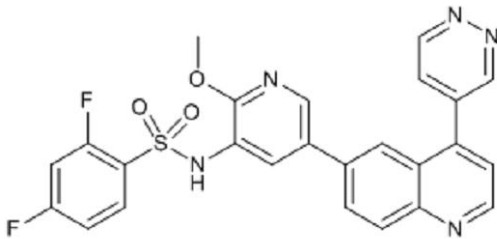


10

【0283】

文献に記載されている他の触媒的mTOR阻害剤は、GSK-2126458 (ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43)であり、これは、化学名2,4-ジフルオロ-N-{2-メトキシ-5-[4-(4-ピリダジニル)-6-キノリニル]-3-ピリジニル}ベンゼンスルホンアミドおよび次の化学構造を有する。

【化 9】

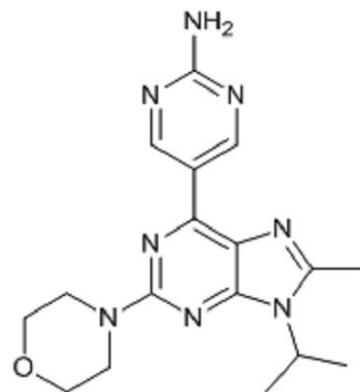


20

【0284】

文献に記載されている他の触媒的mTOR阻害剤は、次の化学構造を有する5-(9-イソプロピル-8-メチル-2-モルホリノ-9H-プリン-6-イル)ピリミジン-2-アミン(WO 10114484号)である。

【化 10】



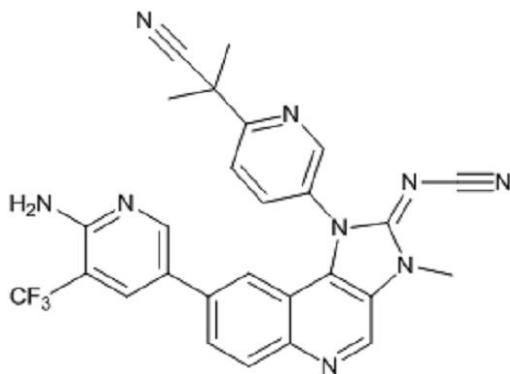
30

【0285】

文献に記載される他の触媒的mTOR阻害剤は、次の化学構造を有する(E)-N-(8-(6-アミノ-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-イル)-1-(6-(2-シアノプロパン-2-イル)ピリジン-3-イル)-3-メチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-2(3H)-イリデン)シアナミド(WO 12007926号)である。

40

【化 1 1】



10

【0 2 8 6】

触媒的mTOR阻害剤のさらなる例は、8-(6-メトキシピリジン-3-イル)-3-メチル-1-(4-ピペラジン-1-イル-3-トリフルオロメチルフェニル)-1,3-ジヒドロイミダゾ[4,5-c]キノリン-2-オン(WO 2006/122806号)およびKu-0063794(Garcia-Martinez JM, et al., Biochem J., 2009, 421(1), 29-42)を含む。Ku-0063794は、哺乳動物ラパマイシンの標的(mTOR)の特異的阻害剤である。WYE-354は、触媒的mTOR阻害剤の他の例である(Yu K, et al. (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15): 6232-6240)。

20

【0 2 8 7】

本発明によって有用なmTOR阻害剤はまた、前記のいずれかのプロドラッグ、誘導体、薬学的に許容される塩そのアナログも含む。

【0 2 8 8】

RAD001のようなmTOR阻害剤は、ここに記載する特定の用量に基づき、当分野で十分に確立された方法に基づき送達用に製剤され得る。特に、米国特許6,004,973号(引用により本明細書に包含させる)は、ここに記載するmTOR阻害剤で利用できる製剤例を提供する。

30

【0 2 8 9】

mTOR阻害剤の例は、例えば、テムシロリムス；リダフォロリムス(以前はデフェロリムスとして知られた、(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンタ-16,24,26,28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネート、AP23573およびMK8669としても知られ、PCT公開WO 03/064383に記載)；エベロリムス(アフィニトール(登録商標)またはRAD001)；ラパマイシン(AY22989、シロリムス(登録商標))；セマピモド(CAS 164301-51-3)；エムシロリムス、(5-{2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル)メタノール(AZD8055)；2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチルピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF04691502、CAS 1013101-36-4)；およびN²-[1,4-ジオキソ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル]-L-アルギニルグリシル-L-α-アスパルチル-L-セリン-(配列番号90)、分子内塩(SF1126、CAS 936487-67-1)およびXL765を含む。

40

50

【0290】

他の態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、非処置CAR発現細胞または非処置対象と比較して、例えば、培養または対象における、CAR発現細胞の増殖の増加もしくは延長または持続をもたらす。ある態様において、増殖の増加または持続は、CAR発現細胞の数の増加と関係する。増殖の増加または持続を測定する方法は、実施例6および7に記載する。他の態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、非処置CAR発現細胞または非処置対象と比較して、例えば、培養または対象における、CAR発現細胞による癌細胞死を増加させる。ある態様において、癌細胞死増加は、腫瘍体積減少と相関する。癌細胞死増加を測定する方法は、例えば、国際出願WO2014/153270号に記載され、これは、引用によりその全体を本明細書に包含させる。

10

【0291】

あるmTOR阻害を測定する方法、用量、処置レジメンおよび適当な医薬組成物は、引用により本明細書に包含する米国特許出願2015/01240036に記載する。

【0292】

下流阻害剤

ここに記載する方法の多くは、例えば、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベル増加、PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベル低減、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比増加、ナイーブT細胞のレベル増加または記憶T細胞前駆体数もしくは記憶T細胞前駆体マーカーの発現レベル増加のために、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の使用に頼る。これらの方法のいずれも低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の代わりに、経路の下流要素の阻害剤、例えば、P70 S6KまたはTORC1の投与でも実施できる。P70 S6Kの阻害剤の例は、PF-4708671 (Pfizer) またはLY2584702 トシレート (Eli Lilly) を含む。mTORC1の阻害剤の例は、mTORC1を特異的に阻害するが、mTORC2を阻害しないアロステリックmTOR阻害剤を含む。ある態様において、下流阻害剤を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベル増加、PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベル低減、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比増加、ナイーブT細胞のレベル増加または記憶T細胞前駆体数もしくは記憶T細胞前駆体マーカーの発現レベル増加に有効な用量で投与する。

20

30

【0293】

mTOR阻害の評価

mTORはキナーゼ P70 S6 をリン酸化し、それにより P70 S6 K を活性化し、その基質をリン酸化させる。mTOR阻害の程度は P70 S6 K 阻害の程度として表すことができ、例えば、mTOR阻害の程度を、P70 S6 K 活性の減少のレベル、例えば、P70 S6 K 基質のリン酸化の減少により決定できる。mTOR阻害のレベルを、阻害剤非存在下、例えば、阻害剤投与前および阻害剤存在下または阻害剤投与後に、P70 S6 K 活性 (P70 S6 K が基質をリン酸化する能力) を測定することにより、mTOR阻害のレベルを決定できる。P70 S6 K の阻害のレベルは、mTOR阻害レベルを示す。それゆえに、P70 S6 K が40%阻害されたならば、mTOR活性は、P70 S6 K 活性で測定して、40%阻害される。ここでいう阻害の程度またはレベルは、投与間隔全体の阻害レベルの平均である。例として、阻害剤を週に1回与えるならば、阻害のレベルは、その間隔全体、すなわち1週間の平均阻害レベルにより示す。

40

【0294】

引用によりここに包含させる Boulay et al., Cancer Res, 2004, 64:252-61 は、mTOR阻害のレベルの評価に使用できるアッセイを教示する (ここで、Boulay アッセイと称す)。ある態様において、アッセイは、mTOR阻害剤、例えば、RAD001 の投与前後の生体サンプルからの P70 S6 キナーゼ活性の測定に頼る。サンプルは、mTOR阻害剤処置後予め選択した時間、例えば、処置24時間、48時間および72時間後

50

に採ることができる。物学的サンプル、例えば、皮膚または末梢血単核細胞(PBMC)からの生体サンプルを使用できる。総タンパク質抽出物を、サンプルから調製する。P70 S6キナーゼを、P70 S6キナーゼを特異的に認識する抗体を用いる免疫沈降により、タンパク質抽出物から単離する。単離P70 S6キナーゼの活性を、インビトロキナーゼアッセイで測定できる。単離キナーゼを、40S リボソームサブユニット基質(P70 S6Kの内在性基質)およびガンマー³²Pと、基質のリン酸化を可能とする条件下インキュベートする。次いで、反応混合物をSDS-PAGEゲルで分解し、³²PシグナルをPhosphorImagerを使用して分析する。40Sリボソームサブユニットサイズに対応する³²Pシグナルは、基質リン酸化およびP70 S6Kの活性を示す。キナーゼ活性の増加および減少を、リン酸化基質の³²Pシグナルの面積および強度を定量し(例えば、ImageQuant、Molecular Dynamics使用)、任意の単位値を定量したシグナルに割り当て投与後の値を投与前の値または対照値と比較することにより計算する。例えば、キナーゼ活性の阻害パーセントは、次の式で計算できる： $1 - (\text{投与後得た値} / \text{投与前得た値}) \times 100$ 。上記のように、ここでいう阻害の程度またはレベルは、投与間隔全体の阻害レベルの平均である。

10

【0295】

キナーゼ活性、例えば、P70 S6キナーゼ活性を評価する方法は、また、引用により本明細書に包含させるUS7,727,950号にも提供される。

【0296】

mTOR阻害のレベルは、PD1陰性対PD1陽性T細胞の比の変化によっても評価できる。末梢血からのT細胞を、当分野で知られる方法によりPD1陰性または陽性として同定できる。

20

【0297】

低用量mTOR阻害剤

ここに記載する方法は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、RAD001のようなラパログを含むアロステリックmTOR阻害剤を使用する。対照的に、mTOR経路を完全にまたはほぼ完全に阻害する阻害剤のレベルは免疫抑制性であり、例えば、臓器移植拒絶の予防に使用する。加えて、mTORを完全に阻害する高用量のラパログはまた腫瘍細胞増殖も阻害し、多様な癌の処置に使用される(例えば、Antineoplastic effects of mammalian target of rapamycin inhibitors. Salvadori M. World J Transplant. 2012 Oct 24;2(5):74-83; Current and Future Treatment Strategies for Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: Role of mTOR Inhibition. Finn RS. Liver Cancer. 2012 Nov;1(3-4):247-256; Emerging Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. Moeini A, Cornella H, Villanueva A. Liver Cancer. 2012 Sep;1(2):83-93; Targeted cancer therapy - Are the days of systemic chemotherapy numbered? Joo WD, Visintin I, Mor G. Maturitas. 2013 Sep 20.; Role of natural and adaptive immunity in renal cell carcinoma response to VEGFR-TKIs and mTOR inhibitor. Santoni M, Berardi R, Amantini C, Burattini L, Santini D, Santoni G, Cascinu S. Int J Cancer. 2013 Oct 2参照)。

30

【0298】

本発明は、少なくとも一部、現在の臨床の現場で使用されるよりはるかに低い用量のmTOR阻害剤が、対象における免疫応答の増加およびPD-1陰性T細胞/PD-1陽性T細胞比の増加に優れた効果を有するとの驚くべき発見に基づく。部分的mTORの阻害活性しか生じない低用量のmTOR阻害剤が、効率的にヒト対象における免疫応答の改善およびPD-1陰性T細胞/PD-1陽性T細胞比の増加ができることは驚きであった。

40

【0299】

これとは別にまたはこれに加えて、何らかの理論に縛られることを望まないが、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤が、例えば、少なくとも一過性に、例えば、非処置対象と比較して、ナイーブT細胞数を増加できると考えられる。これとは別にまたはこれに加えて、また理論に縛られることを望まないが、mTOR阻害剤の処置の十分な時間または十分

50

な投与の後、次の1以上をもたらすと考えられる：

1以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；

例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；および次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加したCD62L^高、増加したCD127^高、増加したCD27⁺、減少したKLRG1および増加したBCL2；

ここで、上記のいずれかの変化は、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に生じる(Araki, K et al. (2009) Nature 460:108-112)。記憶T細胞前駆体は、分化プログラムの早期にある記憶T細胞である。例えば、記憶T細胞は、次の1以上の特徴を有する：増加したCD62L^高、増加したCD127^高、増加したCD27⁺、減少したKLRG1および／または増加したBCL2。

【0300】

よって、ある面において、本発明は、約0.005～1.5mg、約0.005～1.5mg、約0.01～1mg、約0.01～0.7mg、約0.01～0.5mgまたは約0.1～0.5mgの濃度で、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001を含む、例えば、単位剤形で提供される、組成物を提供する。さらなる面において、本発明は、0.005～1.5mg、0.005～1.5mg、0.01～1mg、0.01～0.7mg、0.01～0.5mgまたは0.1～0.5mgの濃度で、mTOR阻害剤、例えば、RAD001を含む組成物を提供する。より詳細には、ある面において、本発明は、約0.005mg、0.006mg、0.007mg、0.008mg、0.009mg、0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、0.6mg、0.7mg、0.8mg、0.9mgまたは1.0mgの用量で、mTOR阻害剤、例えば、RAD001を含む組成物を提供する。ある面において、mTOR阻害剤、例えば、RAD001は、0.5mg以下の用量である。なおさらなる面において、mTOR阻害剤、例えば、RAD001は、約0.5mgの用量である。さらなる面において、本発明は、0.005mg、0.006mg、0.007mg、0.008mg、0.009mg、0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、0.6mg、0.7mg、0.8mg、0.9mgまたは1.0mgの用量で、mTOR阻害剤、例えば、RAD001を含む組成物を提供する。ある面において、mTOR阻害剤、例えば、RAD001は、0.5mg以下の用量である。なおさらなる面において、mTOR阻害剤、例えば、RAD001は、0.5mgの用量である。

【0301】

さらなる面において、本発明は、RAD001について特定した特定の量または用量と生物学的同等である量でRAD001ではないmTOR阻害剤を含む組成物に関する。

【0302】

さらなる面において、本発明は、P70 S6キナーゼを80%以下阻害するのに十分な量のmTOR阻害剤を含む組成物に関する。さらなる面において、ここに記載の組成物は、P70 S6キナーゼを38%以下阻害するのに十分な量のmTOR阻害剤を含む。

【0303】

ある態様において、本発明は、選択した投薬レジメン、例えば、1日1回または週に1回で投与したとき、完全なまたは顕著な免疫抑制とは関係しないが、免疫応答の増強と関係するmTOR阻害のレベルと関係する、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、ラパログ、ラパマイシンまたはRAD001または触媒的mTOR阻害剤の組成物または剤形に関する。

【0304】

さらなる面において、本発明は、対象にmTOR阻害剤を投与する過程を含む、免疫応答を増強する、例えば、免疫老化を処置する方法を提供する。ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001は、約0.0

0.5～1.5mg連日、約0.01～1mg連日、約0.01～0.7mg連日、約0.01～0.5mg連日または約0.1～0.5mg連日の用量で投与できる。さらなる面において、mTOR阻害剤、例えば、RAD000は、約0.1～20mg毎週、約0.5～15mg毎週、約1～10mg毎週または約3～7mg毎週の用量で投与できる。ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、RAD001は、0.005～1.5mg連日、0.01～1mg連日、0.01～0.7mg連日、0.01～0.5mg連日または0.1～0.5mg連日の用量で投与できる。ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、RAD001は、約0.1～20mg毎週、0.5～15mg毎週、1～10mg毎週、3～7mg毎週または5mg毎週の用量で投与できる。

【0305】

さらなる面において、本発明は、RAD001ではないmTOR阻害剤を、RAD001についてここに記載した特定の量または用量と生物学的同等である量で投与する過程を含む、免疫応答を増強する、例えば、免疫老化を処置する方法に関する。

10

【0306】

ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、例えば、RAD001を、約0.005mg連日、0.006mg連日、0.007mg連日、0.008mg連日、0.009mg連日、0.01mg連日、0.02mg連日、0.03mg連日、0.04mg連日、0.05mg連日、0.06mg連日、0.07mg連日、0.08mg連日、0.09mg連日、0.1mg連日、0.2mg連日、0.3mg連日、0.4mg連日、0.5mg連日、0.6mg連日、0.7mg連日、0.8mg連日、0.9mg連日または1.0mg連日の用量で投与できる。ある態様において、RAD001を、24時間で約0.7mg以下の用量で投与できる。ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001を、24時間で約0.5mg以下の用量で投与できる。ある態様において、RAD001を、連日0.5mg以下の用量で投与できる。ある態様において、RAD001を、0.5mg連日の用量で投与できる。

20

【0307】

さらなる面において、本発明は、RAD001以外のmTOR阻害剤を、RAD001について特定した特定の量または用量と生物学的同等である量で使用できる。

【0308】

ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001を、0.1mg毎週、0.2mg毎週、0.3mg毎週、0.4mg毎週、0.5mg毎週、0.6mg毎週、0.7mg毎週、0.8mg毎週、0.9mg毎週、1mg毎週、2mg毎週、3mg毎週、4mg毎週、5mg毎週、6mg毎週、7mg毎週、8mg毎週、9mg毎週、10mg毎週、11mg毎週、12mg毎週、13mg毎週、14mg毎週、15mg毎週、16mg毎週、17mg毎週、18mg毎週、19mg毎週または20mg毎週の用量で投与できる。ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001を、毎週5mg以下の用量で投与する。ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001を、5mg毎週の用量で投与する。

30

【0309】

ある態様において、本発明は、RAD001以外のmTOR阻害剤を、RAD001について特定した特定の量または用量と生物学的同等である量で使用できる。

40

【0310】

mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、ラパログ、ラパマイシンまたはRAD001または触媒的mTOR阻害剤を、持続放出製剤で提供できる。ここに記載する組成物または単位剤形のいずれかを、持続放出製剤で提供できる。ある態様において、持続放出製剤は、即時放出製剤より低いバイオアベイラビリティを有する。例えば、ある態様において、即時放出製剤に類する治療効果を達成するために、持続放出製剤は、即時放出製剤に提供される阻害剤の量の約2～約5倍、約2.5～約3.5倍または約3倍の量を有する。

【0311】

ある態様において、単位剤形あたり、0.1～20mg、0.5～10mg、2.5～7.5mg

50

、3～6mgまたは約5mgを有する、一般に週1回投与に使用される、例えば、RAD001の即時放出形態が提供される。週1回投与について、これらの即時放出製剤は、それぞれ、0.3～60mg、1.5～30mg、7.5～22.5mg、9～18mgまたは約15mgのmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を有する、持続放出形態に対応する。ある態様において、両形態を週1回ベースで投与する。

【0312】

ある態様において、単位剤形あたり、0.005～1.5mg、0.01～1.5mg、0.1～1.5mg、0.2～1.5mg、0.3～1.5mg、0.4～1.5mg、0.5～1.5mg、0.6～1.5mg、0.7～1.5mg、0.8～1.5mg、1.0～1.5mg、0.3～0.6mgまたは約0.5mgを有する、一般に1日1回投与に使用される、例えば、RAD001の即時放出形態が提供される。1日1回投与について、これらの即時放出形態は、それぞれ、0.015～4.5mg、0.03～4.5mg、0.3～4.5mg、0.6～4.5mg、0.9～4.5mg、1.2～4.5mg、1.5～4.5mg、1.8～4.5mg、2.1～4.5mg、2.4～4.5mg、3.0～4.5mg、0.9～1.8mgまたは約1.5mgのmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を有する、持続放出形態に対応する。週1回投与について、これらの即時放出形態は、それぞれ、0.1～30、0.2～30、2～30、4～30、6～30、8～30、10～30、1.2～30、1.4～30、1.6～30、2.0～30、6～12または約10mg/sのmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を有する、持続放出形態に対応する。

【0313】

ある態様において、単位剤形あたり、0.01～1.0mgを有する、一般に1日1回投与に使用される、例えば、RAD001の即時放出形態が提供される。1日1回投与について、これらの即時放出形態は、それぞれ、0.03～3mg/sのmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を有する、持続放出形態に対応する。週1回投与について、これらの即時放出形態は、それぞれ、0.2～20mg/sのmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を有する、持続放出形態に対応する。

【0314】

ある態様において、単位剤形あたり、0.5～5.0mg有する、一般に週1回投与に使用する、例えば、RAD001の即時放出形態が提供される。週1回投与について、これらの即時放出形態は、それぞれ、1.5～15mg/sのmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を有する、持続放出形態に対応する。

【0315】

上記のように、mTOR経路の標的の一つはP70 S6キナーゼである。それゆえに、ここに記載の方法および組成物に有用なmTOR阻害剤の用量は、例えば、ここに記載するアッセイ、例えば、Boulayアッセイにより測定して、mTOR阻害剤非存在下のP70 S6キナーゼの活性に対して、P70 S6キナーゼ活性の80%以下の阻害を達成するのに十分なものである。さらなる面において、本発明は、例えば、ここに記載するアッセイ、例えば、Boulayアッセイにより測定して、mTOR阻害剤非存在下のP70 S6キナーゼ活性と比較して、P70 S6キナーゼ活性の38%以下の阻害を達成するのに十分なmTOR阻害剤の量を提供する。ある面において、本発明の方法および組成物において有用な用量のmTOR阻害剤は、例えば、ここに記載するアッセイ、例えば、Boulayアッセイにより測定して、例えば、ヒト対象に投与したとき、P70 S6キナーゼ活性の90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、5

4 %、5 3 %、5 2 %、5 1 %、5 0 %、4 9 %、4 8 %、4 7 %、4 6 %、4 5 %、4 4 %、4 3 %、4 2 %、4 1 %、4 0 %、3 9 %、3 8 %、3 7 %、3 6 %、3 5 %、3 4 %、3 3 %、3 2 %、3 1 %、3 0 %、2 9 %、2 8 %、2 7 %、2 6 %、2 5 %、2 4 %、2 3 %、2 2 %、2 1 %、2 0 %、1 9 %、1 8 %、1 7 %、1 6 %、1 5 %、1 4 %、1 3 %、1 2 %、1 1 %または1 0 %以下の阻害を達成するのに十分である。

【0316】

ある面において、本発明の方法および組成物において有用な用量のmTOR阻害剤は、例えば、ここに記載するアッセイ、例えば、Boulayアッセイにより測定して、例えば、ヒト対象に投与したとき、P70 S6キナーゼ活性の $90 \pm 5\%$ (すなわち、 $85 \sim 95\%$)、 $89 \pm 5\%$ 、 $88 \pm 5\%$ 、 $87 \pm 5\%$ 、 $86 \pm 5\%$ 、 $85 \pm 5\%$ 、 $84 \pm 5\%$ 、 $83 \pm 5\%$ 、 $82 \pm 5\%$ 、 $81 \pm 5\%$ 、 $80 \pm 5\%$ 、 $79 \pm 5\%$ 、 $78 \pm 5\%$ 、 $77 \pm 5\%$ 、 $76 \pm 5\%$ 、 $75 \pm 5\%$ 、 $74 \pm 5\%$ 、 $73 \pm 5\%$ 、 $72 \pm 5\%$ 、 $71 \pm 5\%$ 、 $70 \pm 5\%$ 、 $69 \pm 5\%$ 、 $68 \pm 5\%$ 、 $67 \pm 5\%$ 、 $66 \pm 5\%$ 、 $65 \pm 5\%$ 、 $64 \pm 5\%$ 、 $63 \pm 5\%$ 、 $62 \pm 5\%$ 、 $61 \pm 5\%$ 、 $60 \pm 5\%$ 、 $59 \pm 5\%$ 、 $58 \pm 5\%$ 、 $57 \pm 5\%$ 、 $56 \pm 5\%$ 、 $55 \pm 5\%$ 、 $54 \pm 5\%$ 、 $53 \pm 5\%$ 、 $52 \pm 5\%$ 、 $51 \pm 5\%$ 、 $50 \pm 5\%$ 、 $49 \pm 5\%$ 、 $48 \pm 5\%$ 、 $47 \pm 5\%$ 、 $46 \pm 5\%$ 、 $45 \pm 5\%$ 、 $44 \pm 5\%$ 、 $43 \pm 5\%$ 、 $42 \pm 5\%$ 、 $41 \pm 5\%$ 、 $40 \pm 5\%$ 、 $39 \pm 5\%$ 、 $38 \pm 5\%$ 、 $37 \pm 5\%$ 、 $36 \pm 5\%$ 、 $35 \pm 5\%$ 、 $34 \pm 5\%$ 、 $33 \pm 5\%$ 、 $32 \pm 5\%$ 、 $31 \pm 5\%$ 、 $30 \pm 5\%$ 、 $29 \pm 5\%$ 、 $28 \pm 5\%$ 、 $27 \pm 5\%$ 、 $26 \pm 5\%$ 、 $25 \pm 5\%$ 、 $24 \pm 5\%$ 、 $23 \pm 5\%$ 、 $22 \pm 5\%$ 、 $21 \pm 5\%$ 、 $20 \pm 5\%$ 、 $19 \pm 5\%$ 、 $18 \pm 5\%$ 、 $17 \pm 5\%$ 、 $16 \pm 5\%$ 、 $15 \pm 5\%$ 、 $14 \pm 5\%$ 、 $13 \pm 5\%$ 、 $12 \pm 5\%$ 、 $11 \pm 5\%$ または $10 \pm 5\%$ の阻害を達成するのに十分である。

【0317】

対象におけるP70 S6キナーゼ活性は、例えば、米国特許7,727,950号に記載の方法のような当分野で知られる方法、ホスホP70 S6Kレベルおよび／またはホスホP70 S6レベルのイムノブロット分析またはインビトロキナーゼ活性アッセイにより測定し得る。

【0318】

さらなる面において、本発明は、mTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001のようなmTOR阻害剤を含む組成物に関する。このような組成物中のmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001の用量は、約30pM～4nMの範囲であり得る。ある面において、mTOR阻害剤の用量、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001は、約50pM～2nM、約100pM～1.5nM、約200pM～1nMまたは約300pM～500pMの範囲である。ある面において、RAD001の用量は、50pM～2nM、100pM～1.5nM、200pM～1nMまたは300pM～500pMの範囲である。さらなる面において、RAD001の用量は、約30pM、40pM、50pM、60pM、70pM、80pM、90pM、100pM、150pM、200pM、250pM、300pM、350pM、400pM、450pM、500pM、550pM、600pM、650pM、700pM、750pM、800pM、850pM、900pM、950pM、1nM、1.5nM、2nM、2.5nM、3nM、3.5nMまたは4nMである。

【0319】

さらなる面において、本発明は、RAD001以外のmTOR阻害剤を、RAD001について特定した特定の量または用量と生物学的同等である量で使用できる。

【0320】

本発明は、さらに対象にmTOR阻害剤を投与することを含む、方法に関する。このような方法は、約30pM～4nMの範囲の用量のmTOR阻害剤RAD001を用い得る。さらなる面において、RAD001の用量は、約50pM～2nM、約100pM～1.5nM、約200pM～1nMまたは約300pM～500pMの範囲であり得る。ある面において、RAD001の用量は、50pM～2nM、100pM～1.5nM、200pM～1nMまたは300pM～500pMの範囲である。さらなる面において、RAD001の用量は、約30pM、40pM

、50 pM、60 pM、70 pM、80 pM、90 pM、100 pM、150 pM、200 pM、250 pM、300 pM、350 pM、400 pM、450 pM、500 pM、550 pM、600 pM、650 pM、700 pM、750 pM、800 pM、850 pM、900 pM、950 pM、1 nM、1.5 nM、2 nM、2.5 nM、3 nM、3.5 nMまたは4 nMである。

【0321】

さらなる面において、本発明の方法は、RAD001以外のmTOR阻害剤を、RAD001について特定した特定の量または用量と生物学的同等である量で使用する。

【0322】

mTOR阻害剤の用量に関してここで使用する用語“約”は、mTOR阻害剤の量の最大±10%ばらつきだけでなく、記載された特定用量付近において可変領域がないものを含み得る。

【0323】

ある態様において、本発明は、対象に、標的トラフレベル内の用量でmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001を投与することを含む、方法を提供する。ある態様において、トラフレベルは、臓器移植および癌患者で使用する投薬レジメンと関係するトラフレベルより有意に低い。ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、RAD001またはラパマイシンを、免疫抑制または抗癌効果を生じるトラフレベルの1/2、1/4、1/10または1/20未満であるトラフレベルをもたらすように投与する。ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、RAD001またはラパマイシンを、免疫抑制または抗癌適応に使用するための、FDA承認添付文書に示されるトラフレベルの1/2、1/4、1/10または1/20未満であるトラフレベルを生じるように投与する。

【0324】

ある態様において、ここに開示する方法は、0.1~10 ng/ml、0.1~5 ng/ml、0.1~3 ng/ml、0.1~2 ng/mlまたは0.1~1 ng/mlの標的トラフレベルを提供する用量で、mTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001を対象に投与することを含む。

【0325】

ある態様において、ここに開示する方法は、0.2~10 ng/ml、0.2~5 ng/ml、0.2~3 ng/ml、0.2~2 ng/mlまたは0.2~1 ng/mlの標的トラフレベルを提供する用量で、mTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001を対象に投与することを含む。

【0326】

ある態様において、ここに開示する方法は、0.3~10 ng/ml、0.3~5 ng/ml、0.3~3 ng/ml、0.3~2 ng/mlまたは0.3~1 ng/mlの標的トラフレベルを提供する用量で、mTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001を対象に投与することを含む。

【0327】

ある態様において、ここに開示する方法は、0.4~10 ng/ml、0.4~5 ng/ml、0.4~3 ng/ml、0.4~2 ng/mlまたは0.4~1 ng/mlの標的トラフレベルを提供する用量で、mTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001を対象に投与することを含む。

【0328】

ある態様において、ここに開示する方法は、0.5~10 ng/ml、0.5~5 ng/ml、0.5~3 ng/ml、0.5~2 ng/mlまたは0.5~1 ng/mlの標的トラフレベルを提供する用量で、mTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001を対象に投与することを含む。

【0329】

ある態様において、ここに開示する方法は、1~10 ng/ml、1~5 ng/ml、1~3 ng/mlまたは1~2 ng/mlの標的トラフレベルを提供する用量で、mTOR阻害剤、例え

10

20

30

40

50

ば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001を対象に投与することを含む。

【0330】

ここで使用する用語“トラフレベル”は、次の投与の直前の血漿中の薬物濃度または2投与間の最小薬物濃度をいう。

【0331】

ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、約0.1～4.9 ng/mlの範囲である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、約0.1～3 ng/mlの範囲である。ある態様において、標的トラフレベルは3 ng/ml以下、例えば、0.3 ng/ml未満～3 ng/mlである。ある態様において、標的トラフレベルは3 ng/ml以下、例えば、0.3 ng/ml未満～1 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは約2.4～3 ng/mlの範囲である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは約0.1～2.4 ng/mlの範囲である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは約0.1～1.5 ng/mlの範囲である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは0.1～3 ng/mlの範囲である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは2.4～3 ng/mlの範囲である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは0.1～2.4 ng/mlの範囲である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは0.1～1.5 ng/mlの範囲である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、0.1 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、0.2 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、0.3 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、0.4 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、0.5 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、0.6 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、0.7 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、0.8 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、0.9 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、1.0 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、1.1 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、1.2 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、1.3 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、1.4 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、1.5 ng/mlである。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、5 ng/ml以下である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、2.5 ng/ml以下である。ある態様において、RAD001の標的トラフレベルは、3 ng/ml、2 ng/ml、1.9 ng/ml、1.8 ng/ml、1.7 ng/ml、1.6 ng/ml、1.5 ng/ml、1.4 ng/ml、1.3 ng/ml、1.2 ng/ml、1.1 ng/ml、1.0 ng/ml、0.9 ng/ml、0.8 ng/ml、0.7 ng/ml、0.6 ng/ml、0.5 ng/ml、0.4 ng/ml、0.3 ng/ml、0.2 ng/mlまたは0.1 ng/ml以下である。。

【0332】

さらなる面において、本発明は、RAD001について特定した標的トラフレベルと生物学的同等である標的トラフレベルと関係する量のRAD001以外のmTOR阻害剤を使用できる。ある態様において、RAD001以外のmTOR阻害剤の標的トラフレベルは、ここに記載するRAD001のトラフレベルと同じmTOR阻害のレベルをもたらすレベルである(例えば、ここに記載する方法、例えば、P70 S6Kの阻害で測定して)。

【0333】

低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与と共に使用するCARおよびCAR発現細胞

ここに記載するのは、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤とCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞を組み合わせた、組み合わせ投与の方法である(細胞は、CARを発現するように操作され、ある態様において、それが対象に

投与されるまでにCARを発現する。他の態様において、発現は、投与後に開始する)。ある態様において、細胞は、CARを発現するように操作したT細胞であり、ここで、CAR T細胞(“CAR T”)は抗癌特性を示す。

【0334】

ここに提供されるのは、CARで操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を低い、免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤の投与と組み合わせて使用する、癌のような疾患の処置に使用する組成物および方法である。

【0335】

ここに提供されるのは、ここに記載するような腫瘍マーカーへの結合が増強されるように操作した抗原結合ドメイン(例えば、抗体または抗体フラグメント、TCRまたはTCRフラグメント)を含む、多数のキメラ抗原受容体(CAR)である。ここに提供されるのは、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)であり、ここで、操作した免疫エフェクター細胞は、抗腫瘍特性を示す。ある面において、細胞はCARで形質転換され、CARは細胞表面に発現される。ある態様において、細胞(例えば、T細胞、NK細胞)は、CARをコードするウイルスベクターで形質導入される。ある態様において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。ある態様において、ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。あるこのような態様において、細胞はCARを安定に発現し得る。他の態様において、細胞(例えば、T細胞、NK細胞)は、CARをコードする核酸、例えば、mRNA、cDNA、DNAで遺伝子導入される。あるこのような態様において、細胞は、CARを一過性に発現し得る。

【0336】

ある面において、ここに記載するCARの抗原結合ドメインは、scFv抗体フラグメントである。ある面において、このような抗体フラグメントは、例えば、由来するIgG抗体と等価な結合親和性を保持する、同等な親和性で同じ抗原に結合する点で、機能的である。ある面において、このような抗体フラグメントは、当業者に理解されるように、免疫応答活性化、その標的抗原からのシグナル伝達開始阻害を含むが、これらに限定されない生物学的応答を提供する点で、機能的である。ある面において、CARの抗原結合ドメインは、それが由来するマウス配列のscFvと比較して、ヒト化されているscFv抗体フラグメントである。ある面において、親マウスscFv配列は、PCT公開WO2012/079000号(引用により本明細書に包含させる)に提供されるCAR19構築物であり、ここに配列番号43として提供する。ある態様において、抗CD19結合ドメインは、WO2012/079000号に記載されるscFvであり、配列番号43に提供する。

【0337】

ある面において、本発明の抗体は、キメラ抗原受容体(CAR)に取り込まれる。ある面において、CARは、PCT公開WO2012/079000号における配列番号12として提供され、ここに配列番号42で低児湯するポリペプチド配列を含み、ここで、scFvドメインは、配列番号44～55から選択される1以上の配列で置換される。ある面において、配列番号44～55のscFvドメインは、配列番号43のscFvドメインのヒト化バリエーションであり、これは、ヒトCD19に特異的に結合するマウス起源のscFvフラグメントである。このマウスscFvのヒト化はマウス特異的残基が、CAR T19処置、例えば、CAR19構築物で形質導入したT細胞での処置を受けている患者におけるヒト-抗マウス抗原(HAMA)応答を誘発し得るところの臨床の現場で望まれ得る。

【0338】

PCT公開WO2012/079000号における配列番号12として提供されるCD19 CARは
MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqtsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyyqqkpdgtvkllyhtsrhlhsgvp
srfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevkqlqesgpglvapsqs

lsvtctvsgvslpdygvswirqprrkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnksqvflkmnslqtddtaiyyca
hyyyggsyamdwygqgtsvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcg
vlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnllynelnl
grreedydldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdttydalhm
qalppr (配列番号42)

である。

【0339】

ある面において、本発明のCARの抗原結合ドメイン(例えば、scFv)は、配列が哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化されている導入遺伝子によりコードされる。ある面において、本発明のCAR構築物全体は、配列全体が哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化されている導入遺伝子によりコードされる。コドン最適化は、コーディングDNAにおける同義コドン(すなわち、同じアミノ酸をコードするコドン)の出現頻度が、種によって偏っているとの発見をいう。このようなコドン縮退は、同一ポリペプチドが多様なヌクレオチド配列によりコードされることを可能にする。種々のコドン最適化方法が当分野で知られ、例えば、少なくとも米国特許5,786,464号および6,114,148号に開示された方法を含む。

10

【0340】

ある面において、本発明のCARは、特異的抗体の抗原結合ドメインと細胞内シグナル伝達分子をあわせる。例えば、ある面において、細胞内シグナル伝達分子は、CD3ゼータ鎖、4-1BBおよびCD28シグナル伝達モジュールおよびこれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。ある面において、抗原結合ドメインは、ここに記載するような腫瘍マーカーと結合する。

20

【0341】

さらに、本発明は、数ある疾患の中で、癌またはここに記載するような腫瘍マーカーを発現する細胞または組織が関与するあらゆる悪性腫瘍または自己免疫性疾患を処置するための、CAR発現細胞組成物およびmTOR阻害剤の低い免疫増強用量、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびその医薬における使用または方法を提供する。

【0342】

ある面において、本発明のCARは、ここに記載するような腫瘍マーカーを発現する正常細胞を根絶し、それにより、細胞移植前に細胞コンディショニング治療としての使用が適用可能であるように、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与と使用できる。ある面において、ここに記載するような腫瘍マーカーを発現する正常細胞は正常幹細胞であり、細胞移植は幹細胞移植である。

30

【0343】

ある面において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供し、ここで、操作した免疫エフェクター細胞は、抗癌特性を示す。好ましい抗原は、ここに記載するような癌関連抗原(すなわち、腫瘍マーカー)である。ある面において、CARの抗原結合ドメインは、部分的にヒト化した抗体フラグメントを含む。ある面において、CARの抗原結合ドメインは、部分的にヒト化したscFvを含む。よって、本発明は、ヒト化抗原結合ドメインを含み、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞に設計されたCARおよび養子治療のためのその使用方法を提供する。

40

【0344】

ある面において、本発明のCARは、CD137(4-1BB)シグナル伝達ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータシグナルドメインおよび任意のこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも一つの細胞内ドメインを含む。ある面において、本発明のCARは、CD137(4-1BB)またはCD28以外の1以上の共刺激性分子由来である少なくとも一つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0345】

50

本発明のCARの種々の要素の配列のいくつかの例を表1に記載し、ここで、aaはアミノ酸を意味し、naは対応するペプチドをコードする核酸を意味する。

【0346】

【表1】

表1. CARの種々の要素の配列(aaーアミノ酸、naー対応するタンパク質をコードする核酸)

配列番号	明細	配列	H u C D 19への 対応
1	EF-1 プロモーター	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTC GGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGG TAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCCTT TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAG TAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCC GCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCT TGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGA TCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCG AGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCTCGTGCTTG AGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCGTG CGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGTATGACCTG CTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAT GCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGG GGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGC ACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCAC CGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCC TGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCC CGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAGT TGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCT GCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAG AGCGGGCGGGTGAGTCACCACACAAAGGAAAAGGGC CTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGG AGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCG AGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGG GGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTG GAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATT CTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGGATCTTGATT CATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCT TCCATTTTCAGGTGTCTGTA	100
2	リター(aa)	MALPVTALLLPLALLLHAARP	13
3	リター(na)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGC	54

10

20

30

40

【表 2】

		TCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCC	
4	CD8 ヒンジ [*] (aa)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACD	14
5	CD8 ヒンジ [*] (na)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGC CCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAG GCGTGCCGGGCCAGCGGGGGGGGCGCAGTGCACACGA GGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT	55
6	Ig4 ヒンジ [*] (aa)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTVCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SL GKM	102
7	Ig4 ヒンジ [*] (na)	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGC CCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCTGTTC CCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGAC CCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAG GAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGA GGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGG AATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGC AGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAA GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCC TGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAG ACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGG CAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGAGCCTGAGC CTGTCCCTGGGCAAGATG	103
8	IgD ヒンジ [*] (aa)	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTG RGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLT PAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVP TGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTC TLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEA ASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPP	47

10

20

30

40

【表 3】

		PQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT LLNASRSLEVSIVTDH	
9	IgD ヒンジ (na)	AGGTGGCCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTG TTCCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCC AAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGG CCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAA GAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAAT GTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTG ACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGC CACCTTTACATGTTTCGTCTGGGCTCTGACCTGAAGG ATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAGGTACCC ACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATT CCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCCCT CCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTCACATG TACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGA TGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAA GCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCCAG AGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCGGGCTTT AGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCA GCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGG CCCCACCCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTG GAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCCAGC CAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGC AGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTC CTACGTGACTGACCATT	48
10	GS ヒンジ / リンカー (aa)	GGGSGGGGS	49
11	GS ヒンジ / リンカー (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC	50
12	CD8TM (aa)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	15
13	CD8 TM (na)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGT CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC	56
14	4-1BB 細胞内 ドメイン (aa)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL	16
15	4-1BB 細胞内 ドメイン (na)	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACA ACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGG AGGATGTGAACTG	60

10

20

30

40

【表 4】

16	CD27 (aa)	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDY RKPEPACSP	51
17	CD27 (na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACA TGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAA GCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAG CCTATCGCTCC	52
18	CD3 セ [*] -タ (aa)	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	17
19	CD3 セ [*] -タ (na)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGT ACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGA GACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACG ATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGAC ACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG C	101
20	CD3 セ [*] -タ (aa)	RVKFSRSADAPAYQGGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	43
21	CD3 セ [*] -タ (na)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGT ACCAGCAGGGCCAG AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGA GGAGTACGATGTTT TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGG AAAGCCGAGAAGGA AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAA GATAAGATGGCGG AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG GAGGGGCAAGGGGC ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG GACACCTACGACGC CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC	44
22	リンカー	GGGGS	18
23	リンカー	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC	50

【 0 3 4 8 】

10

20

30

40

0

20

30

40

【表 6】

		gccaccaaggacacatacatgatgcctgcacatgcaggccctccccctgc	
28	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Ser) _n , where n = 1-10	105
29	リンカー	(Gly ₄ Ser) ₄	106
30	リンカー	(Gly ₄ Ser) ₃	107
31	リンカー	(Gly ₃ Ser)	108
32	ホ°リ A	(A) ₂₀₀₀	118
33	ホ°リ A	(A) ₁₅₀	104
34	ホ°リ A	(A) ₅₀₀₀	109
35	ホ°リ T	(T) ₁₀₀	110
36	ホ°リ T	(T) ₅₀₀₀	111
37	ホ°リ A	(A) ₅₀₀₀	112
38	ホ°リ A	(A) ₄₀₀	113
39	PD1 CAR(aa)	<u>pgwflsdprpwnpptfspallvvtgednatftcsfsntsesfvlnwyrmspsn</u> <u>qtdklaafpedrsqpgqdcfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaisla</u> <u>pkaqikesraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprpptpapti</u> <u>asqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr</u> <u>kklliyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgg</u> <u>nqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqdkmae</u> <u>ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</u>	
91	CD28 細胞内ト° メイン(アミノ酸配 列)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA YRS	
92	CD28 細胞内ト° メイン(ヌクレオチド° 配列)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACAT GAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAG CATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGC CTATCGCTCC	
93	ICOS 細胞内ト° メイン(アミノ酸配 列)	T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L	
94	ICOS 細胞内ト° メイン(ヌクレオチド° 配列)	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAA CGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCA AAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA	

【0349】

ある態様において、CAR s c F v フラグメントは、単一コーディングフレーム内に完全長 CAR 構築物を作るためにレンチウイルスベクター内にコーディングされ、発現のためにプロモーター、例えば、EF1 アルファプロモーター(配列番号 1)を使用する。

【0350】

癌関連抗原

本発明は、低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤の投与と組み合わせて投与するための、免疫エフェクター細胞を癌に向ける 1 以上の CAR を含むように操作された免疫エフェクター細胞(例えば、T 細胞、NK 細胞)を提供する。これは、癌関連抗原に特異的である CAR 上の結合ドメインにより達成される。本発明の CAR により標的とされ得る 2 クラスの癌関連抗原(腫瘍マーカーまたは抗原)がある：(1)癌細胞の表面に発現する癌関連抗原；および(2)それ自体細胞内であるが、このような抗原(ペプチド)のフラグメントは、M

HC (主要組織適合遺伝子複合体) により癌細胞の表面に存在する癌関連抗原。

【0351】

よって、本発明は、次の癌関連抗原(腫瘍マーカー)を標的とするCAR Tを提供する：CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、IL-11Ra、PSCA、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-ベータ、SSEA-4、CD20、葉酸受容体アルファ、ERBB2(HER2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、プロスターゼ、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、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、オアセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARPP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、レグマイン、HPV E6、E7、MAGE-A1、MAGE A1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロステイン、サバイビンおよびテロメラゼ、PCTA-1/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-1AP、ERG(TMPPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5およびIGLL1。

【0352】

ある態様において、腫瘍抗原は、その全体を引用により本明細書に包含させる国際出願PCT/US2015/020606号に記載の腫瘍抗原である。ある態様において、腫瘍抗原は、次の1以上から選択される：CD19；CD123；CD22；CD30；CD171；CS-1(CD2サブセット1、CRACC、SLAMF7、CD319および19A24とも呼ばれる)；C型レクチン様分子-1(CLL-1またはCLECL1)；CD33；上皮細胞増殖因子受容体バリエーションIII(EGFRvIII)；ガングリオシドG2(GD2)；ガングリオシドGD3(aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer)；TNF受容体ファミリーメンバーB細胞成熟(BCMA)；Tn抗原((Tn Ag)または(GalNAcα-Ser/Thr))；前立腺特異的膜抗原(PSMA)；受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(ROR1)；Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3)；腫瘍関連糖タンパク質72(TAG72)；CD38；CD44v6；癌胎児性抗原(CEA)；上皮性細胞接着分子(EPCAM)；B7H3(CD276)；KIT(CD117)；インターロイキン-13受容体sub単位アルファ-2(IL-13Ra2またはCD213A2)；メソテリン；インターロイキン11受容体アルファ(IL-11Ra)；前立腺幹細胞抗原(PSCA)；プロテアーゼセリン21(スベルミンまたはPRSS21)；血管内皮細胞増殖因子受容体2(VEGFR2)；ルイス(Y)抗原；CD24；血小板由来増殖因子受容体ベータ(PDGFR-ベータ)；ステージ特異的胚性抗原-4(SSEA-4)；CD20；葉酸受容体アルファ；受容体チロシン-タンパク質キナーゼERBB2(HER2/neu)；ムチン1、細胞表面関連(MUC1)；上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)；神経細胞接着分子(NCAM)；プロスターゼ；前立腺酸ホスファターゼ(PAP)；伸長因子2変異(ELF2M)；エフリンB2；線維芽細胞活性化タンパク質アルファ(FAP)；インシュリン様増殖因子1受容体(

I G F - I 受容体)、炭酸脱水酵素IX(C A IX) ; プロテアソーム(Prosome, Macropain)サブユニット、ベータ型、9(L M P 2) ; 糖タンパク質100(g p 100) ; 易切断領域(B C R)およびアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1(A b l)からなる癌遺伝子融合タンパク質(b c r - a b l) ; チロシナーゼ ; エフリン t y p e - A 受容体2(E p h A 2) ; フコシル G M 1 ; シアリルルイス接着分子(s L e) ; ガングリオシド G M 3(a N e u 5 A c(2-3)b D G a l p(1-4)b D G l c p(1-1)C e r) ; トランスグルタミナーゼ5(T G S 5) ; 高分子量黒色腫関連抗原(H M W M A A) ; o - アセチル - G D 2 ガングリオシド(O A c G D 2) ; 葉酸受容体ベータ ; 腫瘍内皮マーカー1(T E M 1 / C D 2 4 8) ; 腫瘍内皮マーカー7 関連(T E M 7 R) ; クローディン6(C L D N 6) ; 甲状腺刺激ホルモン受容体(T S H R) ; 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(G P R C 5 D) ; 染色体X オープンリーディングフレーム61(C X O R F 61) ; C D 9 7 ; C D 1 7 9 a ; 未分化リンパ腫キナーゼ(A L K) ; ポリシアル酸 ; 胎盤特異的1(P L A C 1) ; g l o b o H グリコセラミド(G l o b o H)のヘキササッカライド部分 ; 乳腺分化抗原(N Y - B R - 1) ; ウロプラキン2(U P K 2) ; A 型肝炎ウイルス細胞受容体1(H A V C R 1) ; アドレナリン受容体ベータ3(A D R B 3) ; パネキシン3(P A N X 3) ; G タンパク質共役受容体20(G P R 2 0) ; リンパ球抗原6 複合体、座位K 9(L Y 6 K) ; O 1 因子y 受容体51E 2(O R 51E 2) ; T C R ガンマ選択的リーディングフレームタンパク質(T A R P) ; ウィルムス腫瘍タンパク質(W T 1) ; 癌 / 精子抗原1(N Y - E S O - 1) ; 癌 / 精子抗原2(L A G E - 1 a) ; 黒色腫関連抗原1(M A G E - A 1) ; 染色体12 p に位置するE T S 転座 - バリエーション遺伝子6(E T V 6 - A M L) ; 精子タンパク質17(S P A 17) ; X 抗原ファミリー、メンバー1A(X A G E 1) ; アンギオポエチン結合細胞表面受容体2(T i e 2) ; 黒色腫癌精子抗原 - 1(M A D - C T - 1) ; 黒色腫癌精子抗原 - 2(M A D - C T - 2) ; F o s 関連抗原1 ; 腫瘍タンパク質p 53(p 53) ; p 53 変異体 ; プロステイン ; サバイビン ; テロメラゼ ; 前立腺癌腫瘍抗原 - 1(P C T A - 1 またはガレクチン8)、T 細胞1 により認識される黒色腫抗原(M e l a n A またはM A R T 1) ; ラット肉腫(R a s) 変異体 ; ヒトテロメラゼ逆転写酵素(h T E R T) ; 肉腫転座切断点 ; アポトーシスの黒色腫阻害剤(M L - I A P) ; E R G (膜貫通プロテアーゼ、セリン2(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ートランスフェラーゼV(N A 17) ; ペアード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 トリ骨髄骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子神経芽腫由来ホモログ(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) ; シトクロムP 450 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Brother of the regulator of imprinted sites)、T 細胞により認識される扁平上皮細胞癌抗原3(S A R T 3) ; ペアードボックスタンパク質P a x - 5(P A X 5) ; プロアクロシン結合タンパク質p 32(O Y - T E S 1) ; リンパ球特異的タンパク質チロシキナーゼ(L C K) ; A キナーゼアンカータンパク質4(A K A P - 4) ; 滑膜肉腫、X 切断点2(S S X 2) ; 終末糖化産物受容体(R A G E - 1) ; 腎臓遍在性1(R U 1) ; 腎臓遍在性2(R U 2) ; レグマイン ; ヒト乳頭腫ウイルスE 6(H P V E 6) ; ヒト乳頭腫ウイルスE 7(H P V E 7) ; 腸カルボキシルエステラーゼ ; ヒートショックタンパク質70 - 2 変異(m u t h s p 70 - 2) ; C D 79 a ; C D 79 b ; C D 72 ; 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 またはC D 89) ; 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 300 分子様ファミリーメンバーf(C D 300 L F) ; C 型レクチンドメインファミリー12 メンバーA(C L E C 12 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75(L Y 75) ; グリピカン - 3(G P C 3) ; F c 受容体様5(F C R L 5) ; および免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1(I G L L 1)。

【0353】

ある態様において、コードされたC A R 分子により結合される腫瘍抗原は、次の1 以上

10

20

30

40

50

から選択される：TSHR、CD171、CS-1、CLL-1、GD3、Tn Ag、FLT3、CD38、CD44v6、B7H3、KIT、IL-13Ra2、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-ベータ、SSEA-4、MUC1、EGFR、NCAM、CAIX、LMP2、EphA2、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、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、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変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG(TMPRSS2-ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5およびIGLL1。

【0354】

ある態様において、コードされたCAR分子により結合される腫瘍抗原は、次の1以上から選択される：TSHR、CLDN6、GPCR5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6KおよびOR51E2。

【0355】

ここに記載するようなCARは、MHC提示ペプチドに結合する抗原結合ドメイン(例えば、抗体または抗体フラグメント)を含むCARを含む。通常、内在性タンパク質由来のペプチドは主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI分子のポケットを満たし、CD8⁺ Tリンパ球のT細胞受容体(TCR)により認識される。MHCクラスI複合体は、全有核細胞により構成的に発現される。癌において、ウイルス特異的および/または腫瘍特異的ペプチド/MHC複合体は、免疫療法のための細胞表面標的の独特なクラスを表す。ヒト白血球抗原(HLA)-A1またはHLA-A2の状況におけるウイルスまたは腫瘍抗原由来のペプチドを標的とするTCR様抗体は記載されている(例えば、Sastry et al., J Virol. 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Bood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther 2001 8(21):1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176):176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100参照)。例えば、TCR様抗体は、ヒトscFvファージ提示ライブラリーのようなライブラリーのスクリーニングにより特定できる。よって、本発明は、細胞内に発現される上記のあらゆる腫瘍抗原、例えば、p53、BCR-Ab1、Ras、K-rasおよびc-metから選択される分子のMHC提示ペプチドに結合する、抗原結合ドメインを含むCAR、例えば、ここに記載するRCARを艇庫油する。

【0356】

キメラ抗原受容体(CAR)

本発明は、CARを含む免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞と合わせた、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の使用を包含する。免疫エフェクター細胞は、CARをコードする配列を含む組み換えDNA構築物の挿入によりCARを発現するように操作でき、ここで、CARはここに記載するような癌関連抗原に特異的に結合する抗原結合ドメイン(例えば、抗体または抗体フラグメント、TCRまたはTCRフラグメント)を含み、ここで、抗体フラグメントの配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と同じリーディングフレームと隣接するかその中にある。細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激性シグナル伝達ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメイン、例

えば、ゼータ鎖を含むことができる。共刺激性シグナル伝達ドメインは、共刺激性分子の少なくとも細胞内ドメインの部分を含むC A Rの部分を用いる。ある態様において、抗原結合ドメインは、ここに記載するマウス抗体または抗体フラグメントである。ある態様において、抗原結合ドメインは、ヒト化抗体または抗体フラグメントである。

【0357】

特定の面において、本発明のC A R構築物はs c F vドメインを含み、ここで、s c F vの前に配列番号2に提供されるような任意のリーダー配列があり、後ろに配列番号4または配列番号6または配列番号8または配列番号10に提供されるような任意のヒンジ配列、配列番号12に提供するような膜貫通領域、配列番号14または配列番号16を含む細胞内シグナル伝達ドメインおよび配列番号18または配列番号20を含むC D 3ゼータ配列があつてよく、ここで、ドメインは、単一融合タンパク質を形成するように同じリーディングフレームに隣接するかその中にある。また本発明に包含されるのは、s c F vフラグメントの各々のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。ある面において、C A R構築物の例は、任意のリーダー配列、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメインおよび細胞内刺激性ドメインを含む。ある面において、C A R構築物の例は、任意のリーダー配列、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメインおよび細胞内刺激性ドメインを含む。

【0358】

リーダー配列の例は、配列番号2として提供される。ヒンジ／スペーサー配列の例は、配列番号4または配列番号6または配列番号8または配列番号10として提供される。膜貫通ドメイン配列の例は、配列番号12として提供される。4-1 B Bタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインの配列の例は、配列番号14として提供される。C D 27の細胞内シグナル伝達ドメインの配列の例は、配列番号16として提供される。C D 3ゼータドメイン配列の例は、配列番号18または配列番号20として提供される。

【0359】

ある面において、本発明は、C A Rをコードする核酸分子を含む組み換え核酸構築物を包含し、ここで、核酸分子は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と同じリーディングフレームと隣接するかその中にある、例えば、ここに記載する抗原結合ドメインをコードする核酸配列を含む。

【0360】

ある面において、本発明は、C A Rをコードする導入遺伝子を含む組み換え核酸構築物の使用を包含し、ここで、核酸分子は抗原結合ドメインをコードする核酸配列を含み、ここで、配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と同じリーディングフレームに隣接するかその中にある。C A Rにおいて使用できる細胞内シグナル伝達ドメインの例は、例えば、C D 3ゼータ、C D 28、4-1 B Bなどの、1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含むが、これらに限定されない。ある例において、C A Rは、C D 3ゼータ、C D 28、4-1 B Bなどの任意の組み合わせを含み得る。

【0361】

所望の分子をコードする核酸配列は、標準技術を使用して、例えば遺伝子を発現する細胞からのライブラリーのスクリーニングにより、それを含むことが知られるベクターからの遺伝子を誘導化することによりまたはそれを含むことが知られる細胞および組織から直接単離することによるような、組み換え当分野で知られる方法を使用して得ることができる。あるいは、目的の核酸を、クローン化より合成により産生できる。

【0362】

本発明は、細胞に直接形質導入できるC A Rを発現するレトロウイルスおよびレンチウイルスベクター構築物の使用を含む。

【0363】

本発明はまた細胞に直接遺伝子導入できるR N A構築物の使用を含む。トランスフェクションに使用するためのm R N Aを産生する方法は、特異的に設計したプライマーの鋳型のインビトロ転写(I V T)、続くポリA付加を含み、3'および5'非翻訳配列(“U T

R”）、5'キャップおよび／または配列内リボソーム進入部位(IRES)、発現させる核酸およびポリAテイル、一般に50～2000塩基長を含む構築物を産生する(配列番号32)。このように産生されたRNAは、異なる種の細胞において効率的に翻訳され得る。ある態様において、鋳型は、CARの配列を含む。ある態様において、RNA CARベクターは、電気穿孔法によりT細胞に形質導入する。

【0364】

抗原結合ドメイン

ある面において、本発明において使用するCARは、抗原結合ドメインとも呼ばれる標的特異的結合要素を含む。選り抜きの部分は、標的細胞の表面を規定するリガンドのタイプおよび数による。例えば、抗原結合ドメインは、特定の疾患状態と関係する標的細胞の細胞表面マーカーとして作用する抗原を認識するよう選択し得る。それゆえに本発明のCARにおいて抗原結合ドメインのためのリガンドとして作用し得る細胞表面マーカーの例は、ウイルス、細菌および寄生虫感染症、自己免疫性疾患および癌細胞と関係するものを含む。

10

【0365】

ある面において、CAR介在T細胞応答は、所望の抗原と特異的に結合する抗原結合ドメインをCARに操作する目的で、目的の抗原に指向させ得る。

【0366】

ある面において、CARの抗原結合ドメインを含む部分は、上記のような腫瘍マーカーを標的とする抗原結合ドメインを含む。

20

【0367】

ある態様において、CARの抗原結合ドメインを含む部分は、CD19を標的とする抗原結合ドメインを含む。ある面において、抗原結合ドメインは、ヒトCD19を標的とする。ある面において、CARの抗原結合ドメインは、Nicholson et al. Mol. Immun. 34(16-17): 1157-1165(1997)に記載のFMC63 scFvフラグメントと同じまたは類似する結合特異性を有する。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、Nicholson et al. Mol. Immun. 34(16-17): 1157-1165(1997)に記載のscFvフラグメントを含む。CD19抗体分子は、例えば、引用によりその全体を本明細書に包含させるWO2014/153270号に記載の抗体分子(例えば、ヒト化抗CD19抗体分子)である。WO2014/153270号はまた、種々のCAR構築物の結合および効力をアッセイする方法も記載する。

30

【0368】

抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組み換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体および重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)およびラクダ科由来ナノボディの可変ドメイン(VHH)のような単ドメイン抗体を含むが、これらに限定されないその機能的フラグメントならびに組み換えフィブロネクチンドメイン、T細胞受容体(TCR)またはそのフラグメント、例えば、一本鎖TCRなどのような、当分野で抗原結合ドメインとして機能することが知られる代替天然スキャフォールドを含むが、これらに限定されない、抗原に結合するあらゆるドメインであり得る。ある例において、抗原結合ドメインがCARを最終的に使用するのと同じ種由来であることは有利である。例えば、ヒトにおける使用のために、CARの抗原結合ドメインが、抗体または抗体フラグメントの抗原結合ドメインについてヒトまたはヒト化残基を含むことが有利であり得る。

40

【0369】

ある態様において、CD22に対する抗原結合ドメインに対する抗原結合ドメインは、例えば、Haso et al., Blood, 121(7): 1165-1174 (2013); Wayne et al., Clin Cancer Res 16(6): 1894-1903 (2010); Kato et al., Leuk Res 37(1):83-88 (2013); Creative BioMart (creativebiomart.net): MOM-18047-S(P)に記載のような抗体由来である。

【0370】

ある態様において、CS-1に対する抗原結合ドメインは、エロツズマブ(BMS)由来

50

であり、例えば、Tai et al., 2008, Blood 112(4):1329-37; Tai et al., 2007, Blood 110(5):1656-63参照。

【0371】

ある態様において、CLL-1に対する抗原結合ドメインは、R&D、ebiosciences、Abcamから入手可能な抗体由来である、例えば、PE-CLL1-hu Cat # 353604 (BioLegend) ; および PE-CLL1 (CLEC12A) Cat # 562566 (BD)。

【0372】

ある態様において、CD33に対する抗原結合ドメインに対する抗原結合ドメインは、例えば、Bross et al., Clin Cancer Res 7(6):1490-1496(2001)(ゲムツズマブオゾガマイシン、hP67.6), Caron et al., Cancer Res 52(24):6761-6767(1992)(リンツズマブ、HuM195), Lapusan et al., Invest New Drugs 30(3):1121-1131 (2012)(AVE9633), Aigner et al., Leukemia 27(5): 1107-1115 (2013) (AMG330, CD33 BiTE), Dutour et al., Adv hematol 2012:683065 (2012)およびPizzitola et al., Leukemia doi:10.1038/Lue.2014.62 (2014)に記載のような抗体由来である。

10

【0373】

ある態様において、GD2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Mujoo et al., Cancer Res. 47(4): 1098-1104 (1987); Cheung et al., Cancer Res 45(6):2642-2649 (1985), Cheung et al., J Clin Oncol 5(9):1430-1440 (1987), Cheung et al., J Clin Oncol 16(9):3053-3060 (1998), Handgretinger et al., Cancer Immunol Immunother 35(3): 199-204 (1992)に記載のような抗体由来である。mAb 14.18、14G2a、ch14.18、hu14.18、3F8、hu3F8、3G6、8B6、60C3、10B8、ME36.1、8H9、例えば、WO2012033885号、WO2013040371号、WO2013192294号、WO2013061273号、WO2013123061号、WO2013074916号およびWO201385552号参照。

20

【0374】

ある態様において、BCMAに対する抗原結合ドメインは、例えば、WO2012163805号、WO200112812号およびWO2003062401号に記載のような抗体由来である。

【0375】

ある態様において、Tn抗原に対する抗原結合ドメインは、例えば、US8,440,798号、Brooks et al., PNAS 107(22):10056-10061 (2010), and Stone et al., OncoImmunology 1(6):863-873(2012)に記載の抗体由来である。

30

【0376】

ある態様において、PSMAに対する抗原結合ドメインは、例えば、Parker et al., Protein Expr Purif 89(2):136-145 (2013)、US20110268656号(J591ScFv); Frigerio et al., European J Cancer 49(9):2223-2232 (2013)(scFvD2B); WO2006125481号(mAbs 3/A12、3/E7および3/F11) および一本鎖抗体フラグメント(scFv A5およびD7)に記載のような抗体由来である。

40

【0377】

ある態様において、ROR1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Hudecek et al., ClinCancer Res 19(12):3153-3164(2013); WO2011159847号; およびUS20130101607号に記載のような抗体由来である。

【0378】

ある態様において、FLT3に対する抗原結合ドメインは、例えば、WO2011076922号、US5777084号、EP0754230号、US20090297529号に記載のような抗体およびいくつかの市販のカatalog抗体(R&D、ebiosciences、Abcam)由来である。

【0379】

50

ある態様において、T A G 7 2 に対する抗原結合ドメインは、例えば、Hombach et al., Gastroenterology 113(4):1163-1170(1997)に記載のような抗体；およびA b c a m a b 6 9 1 由来である。

【0380】

ある態様において、F A P に対する抗原結合ドメインは、例えば、Ostermann et al., Clinical Cancer Research 14:4584-4592(2008)(F A P 5)、米国特許公開2009/0304718号；シブロッズマブ(例えば、Hofheinz et al., Oncology Research and Treatment 26(1), 2003)；およびTran et al., J Exp Med 210(6):1125-1135 (2013)に記載の抗体由来である。

【0381】

10

ある態様において、C D 3 8 に対する抗原結合ドメインに対する抗原結合ドメインは、ダラムマブ(例えば、Groen et al., Blood 116(21):1261-1262(2010)参照)；M O R 2 0 2 (例えば、U S 8,263,74号参照)；またはU S 8,362,211号に記載の抗体由来である。

【0382】

ある態様において、C D 4 4 v 6 に対する抗原結合ドメインは、例えば、Casucci et al., Blood 122(20):3461-3472(2013)に記載のような抗体由来である。

【0383】

ある態様において、C E A に対する抗原結合ドメインは、例えば、Chmielewski et al., Gastroenterology 143(4):1095-1107(2012)に記載のような抗体由来である。

20

【0384】

ある態様において、E P C A M に対する抗原結合ドメインは、M T 1 1 0、E p C A M - C D 3 二特異性A b (例えば、clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00635596参照)；エドレコロマブ；3622W94；I N G - 1；およびアダカツムマブ(M T 2 0 1)由来である。

【0385】

ある態様において、B 7 H 3 に対する抗原結合ドメインは、M G A 2 7 1 (Macrogenics)由来である。

【0386】

ある態様において、K I T に対する抗原結合ドメインは、例えば、U S 7 9 1 5 3 9 1 号、U S 2 0 1 2 0 2 8 8 5 0 6 号に記載のような抗体およびいくつかの市販のカタログ抗体由来である。

30

【0387】

ある態様において、I L - 1 3 R a 2 に対する抗原結合ドメインは、例えば、W O 2 0 0 8 / 1 4 6 9 1 1 号、W O 2 0 0 4 0 8 7 7 5 8 号、いくつかの市販のカタログ抗体およびW O 2 0 0 4 0 8 7 7 5 8 号に記載のような抗体由来である。

【0388】

ある態様において、C D 3 0 に対する抗原結合ドメインに対する抗原結合ドメインは、例えば、U S 7 0 9 0 8 4 3 B 1 号およびE P 0 8 0 5 8 7 1 号に記載のような抗体由来である。

40

【0389】

ある態様において、G D 3 に対する抗原結合ドメインは、例えば、U S 7 2 5 3 2 6 3 号；U S 8,207,308号；U S 2 0 1 2 0 2 7 6 0 4 6 号；E P 1 0 1 3 7 6 1 号；W O 2 0 0 5 0 3 5 5 7 7 号；およびU S 6 4 3 7 0 9 8 号に記載のような抗体由来である。

【0390】

ある態様において、C D 1 7 1 に対する抗原結合ドメインは、例えば、Hong et al., J Immunother 37(2):93-104 (2014)に記載のような抗体由来である。

【0391】

ある態様において、I L - 1 1 R a に対する抗原結合ドメインは、Abcam(cat# ab55262

50

)およびNovus Biologicals(cat# EPR5446)から入手可能な抗体由来である。他の態様において、IL-11Raに対する抗原結合ドメインはペプチドである、例えば、Huang et al., Cancer Res 72(1):271-281 (2012)参照。

【0392】

ある態様において、PSCAに対する抗原結合ドメインは、例えば、Morgenroth et al., Prostate 67(10):1121-1131 (2007) (scFv 7F5); Nejatollahi et al., J of Oncology 2013(2013), article ID 839831 (scFv C5-II); および米国特許公開20090311181号に記載のような抗体由来である。

【0393】

ある態様において、VEGFR2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Chinnasamy et al., J Clin Invest 120(11):3953-3968(2010)に記載のような抗体由来である。 10

【0394】

ある態様において、ルイスYに対する抗原結合ドメインは、例えば、Kelly et al., Cancer Biother Radiopharm 23(4):411-423 (2008)(hu3S193 Ab (scFvs)); Dolezal et al., Protein Engineering 16(1):47-56 (2003)(NC10 scFv)に記載のような抗体由来である。

【0395】

ある態様において、CD24に対する抗原結合ドメインに対する抗原結合ドメインは、例えば、Maliar et al., Gastroenterology 143(5):1375-1384 (2012)に記載のような抗体由来である。 20

【0396】

ある態様において、PDGFR-ベータに対する抗原結合ドメインは、Abcam ab32570由来である。

【0397】

ある態様において、SSEA-4に対する抗原結合ドメインは、MC813(Cell Signaling)および他の市販抗体試薬由来である。

【0398】

ある態様において、CD20に対する抗原結合ドメインに対する抗原結合ドメインは、リツキシマブ、オファツムマブ、オクレリズマブ、ベルツズマブまたはGA101由来である。 30

【0399】

ある態様において、葉酸受容体アルファに対する抗原結合ドメインは、IMGN853、US20120009181号; US4851332号、LK26: US5952484号の抗体要素である。

【0400】

ある態様において、ERBB2(Her2/neu)に対する抗原結合ドメインは、トラストズマブまたはベルツズマブ由来である。

【0401】

ある態様において、MUC1に対する抗原結合ドメインは、SAR566658の抗体要素由来である。 40

【0402】

ある態様において、EGFRに対する抗原結合ドメインは、セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブまたはマツズマブ由来である。

【0403】

ある態様において、NCAMに対する抗原結合ドメインは、クローン2-2B: MAB5324(EMD milipore)由来である。

【0404】

ある態様において、エフリンB2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Abengozar et al., Blood 119(19):4565-4576(2012)に記載のような抗体由来である。

【0405】

ある態様において、IGF-I受容体に対する抗原結合ドメインは、例えば、US 8 3 4 4 1 1 2 B 2号；EP 2 3 2 2 5 5 0 A 1号；WO 2 0 0 6 / 1 3 8 3 1 5号およびPCT / US 2 0 0 6 / 0 2 2 9 9 5号に記載のような抗体由来である。

【0406】

ある態様において、CAIXに対する抗原結合ドメインは、クローン303123 (R&D Systems)由来である。

【0407】

ある態様において、LMP2に対する抗原結合ドメインは、例えば、US 7, 4 1 0, 6 4 0号およびUS 2 0 0 5 0 1 2 9 7 0 1号に記載のような抗体由来である。

【0408】

ある態様において、gp100に対する抗原結合ドメインは、WO 2 0 1 3 1 6 5 9 4 0号またはUS 2 0 1 3 0 2 9 5 0 0 7号に記載のHMB45、NKIベータB由来である。

【0409】

ある態様において、チロシナーゼに対する抗原結合ドメインは、例えば、US 5 8 4 3 6 7 4号；またはUS 1 9 9 5 0 5 0 4 0 4 8号に記載のような抗体由来である。

【0410】

ある態様において、EphA2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Yu et al., Mol Ther 22(1):102-111(2014)に記載のような抗体由来である。

【0411】

ある態様において、GD3に対する抗原結合ドメインは、例えば、US 7 2 5 3 2 6 3号；US 8, 2 0 7, 3 0 8号；US 2 0 1 2 0 2 7 6 0 4 6号；EP 1 0 1 3 7 6 1 A 3号；2 0 1 2 0 2 7 6 0 4 6号；WO 2 0 0 5 0 3 5 5 7 7号；またはUS 6 4 3 7 0 9 8号に記載のような抗体由来である。

【0412】

ある態様において、フコシルGM1に対する抗原結合ドメインは、例えば、US 2 0 1 0 0 2 9 7 1 3 8号；またはWO 2 0 0 7 / 0 6 7 9 9 2号に記載のような抗体由来である。

【0413】

ある態様において、sLeに対する抗原結合ドメインは、G193 (ルイスYについて)由来である、Scott AM et al, Cancer Res 60: 3254-61(2000)を参照し、またNeeson et al, J Immunol May 2013 190(Meeting Abstract Supplement) 177.10にも記載されている。

【0414】

ある態様において、GM3に対する抗原結合ドメインは、CA 2 5 2 3 4 4 9 (mAb 1 4 F 7)由来である。

【0415】

ある態様において、HMWMAAに対する抗原結合ドメインは、例えば、Kmieciak et al., Oncoimmunology 3(1):e27185(2014) (PMID: 24575382) (mAb9.2.27)；US 6 5 2 8 4 8 1号；WO 2 0 1 0 0 3 3 8 6 6号；またはUS 2 0 1 4 0 0 0 4 1 2 4号に記載のような抗体由来である。

【0416】

ある態様において、o-アセチル-GD2に対する抗原結合ドメインは、8B6由来である。

【0417】

ある態様において、TEM1 / CD248に対する抗原結合ドメインは、例えば、Marty et al., Cancer Lett 235(2):298-308 (2006)；Zhao et al., J Immunol Methods 363(2):221-232 (2011)に記載のような抗体由来である。

【0418】

ある態様において、CLDN6に対する抗原結合ドメインは、IMAB027 (Ganymed

10

20

30

40

50

Pharmaceuticals)由来である、例えば、clinicaltrial.gov/show/NCT02054351参照。

【0419】

ある態様において、TSHRに対する抗原結合ドメインは、例えば、US8,603,466号；US8,501,415号；またはUS8,309,693号に記載のような抗体由来である。

【0420】

ある態様において、GPC5Dに対する抗原結合ドメインは、FAB6300A (R&D Systems)；またはLS-A4180 (Lifespan Biosciences)由来である。

【0421】

ある態様において、CD97に対する抗原結合ドメインに対する抗原結合ドメインは、例えば、US6,846,911号；de Groot et al., J Immunol 183(6):4127-4134(2009)に記載のような抗体；R&Dからの抗体：MAB3734由来である。 10

【0422】

ある態様において、ALKに対する抗原結合ドメインは、例えば、Mino-Kenudson et al., Clin Cancer Res 16(5):1561-1571(2010)に記載のような抗体由来である。

【0423】

ある態様において、ポリシアル酸に対する抗原結合ドメインは、例えば、Nagae et al., J Biol Chem 288(47):33784-33796(2013)に記載のような抗体由来である。

【0424】

ある態様において、PLAC1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Ghods et al., Biotechnol Appl Biochem 2013 doi:10.1002/bab.1177に記載のような抗体由来である。 20

【0425】

ある態様において、GloboHに対する抗原結合ドメインは、VK9；または例えば、Kudryashov V et al, Glycoconj J.15(3):243-9(1998), Lou et al., Proc Natl Acad Sci USA 111(7):2482-2487(2014)；MBR1: Bremer E-G et al. J Biol Chem 259:14773-14777(1984)に記載のもの由来である。

【0426】

ある態様において、NY-BR-1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Jager et al., Appl Immunohistochem Mol Morphol 15(1):77-83(2007)に記載のような抗体由来である。 30

【0427】

ある態様において、WT-1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Dao et al., Sci Transl Med 5(176):176ra33(2013)；またはWO2012/135854号に記載のような抗体由来である。

【0428】

ある態様において、MAGE-A1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Willemssen et al., J Immunol 174(12):7853-7858(2005)(TCR様scFV)に記載のような抗体由来である。

【0429】

ある態様において、精子タンパク質17に対する抗原結合ドメインは、例えば、S Song et al., Target Oncol 2013 Aug 14 (PMID: 23943313)；Song et al., Med Oncol 29(4):2923-2931 (2012)に記載のような抗体由来である。 40

【0430】

ある態様において、Tie2に対する抗原結合ドメインは、AB33 (Cell Signaling Technology)由来である。

【0431】

ある態様において、MAD-CT-2に対する抗原結合ドメインは、例えば、PMID: 2450952；US7635753号に記載のような抗体由来である。

【0432】

ある態様において、Fos関連抗原1に対する抗原結合ドメインは12F9 (Novus Bio 50

logicals)由来だえる。

【0433】

ある態様において、MelanA/MART1に対する抗原結合ドメインは、EP2514766A2号；US7,749,719号に記載のような抗体由来である。

【0434】

ある態様において、肉腫転座切断点に対する抗原結合ドメインは、例えば、Luo et al, EMBO Mol. Med. 4(6):453-461(2012)に記載のような抗体由来である。

【0435】

ある態様において、TRP-2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Wang et al, J Exp Med. 184(6):2207-16(1996)に記載のような抗体由来である。

10

【0436】

ある態様において、CYP1B1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Maecker et al, Blood 102(9):3287-3294(2003)に記載のような抗体由来である。

【0437】

ある態様において、RAGE-1に対する抗原結合ドメインは、MAB5328 (EMD milipore)由来である。

【0438】

ある態様において、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素に対する抗原結合ドメインは、カタログ番号LS-B95号100 (Lifespan Biosciences)由来である。

【0439】

ある態様において、腸カルボキシルエステラーゼに対する抗原結合ドメインは、4F12：カタログ番号LS-CB6190-50 (Lifespan Biosciences)由来である。

20

【0440】

ある態様において、mut hsp70-2に対する抗原結合ドメインは、Lifespan Biosciences：モノクローナル：カタログ番号LS-C133261-100 (Lifespan Biosciences)由来である。

【0441】

抗原結合ドメインは、表3からの配列を含み得る。

【0442】

【表 7】

表 3：抗原結合ドメインに関する配列例

配列番号	標的抗原	名称	アミノ酸配列
44	CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKP GQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGG GSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQV SLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTV SS
45	CD19	huscFv2	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl t i s s l q p e d f a vyfcqqgntlp y t f g q g t k l e i k g g g g s g g g g s g v q l qesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e wigviwgsettyyqsslsk r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a dtavyyca k h y y y g g s y a m d y w g g g t l t v t s s
46	CD19	huscFv3	Qvqlqesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g kglewigviwgsettyyssslsk r v t i s k d n s k n q v s l k l s s vtaadtavyyca k h y y y g g s y a m d y w g g g t l t v t s s g g g g s g ggsggggseivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl t i sslqpedfavyfcqqgntlp y t f g q g t k l e i k
47	CD19	huscFv4	Qvqlqesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g kglewigviwgsettyyqsslsk r v t i s k d n s k n q v s l k l s s vtaadtavyyca k h y y y g g s y a m d y w g g g t l t v t s s g g g g s g ggsggggseivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl t i sslqpedfavyfcqqgntlp y t f g q g t k l e i k
48	CD19	huscFv5	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl t i s s l q p e d f a vyfcqqgntlp y t f g q g t k l e i k g g g g s g g g g s g g g g sqvqlqesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p gkglewigviwgsettyyssslsk r v t i s k d n s k n q v s l k l s svtaadtavyyca k h y y y g g s y a m d y w g g g t l t v t s s

10

20

30

【表 8】

49	CD19	huscFv6	Eivmtqspatls slspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgg aprlliyhtsr l hsgiparfsgsgsgtdytl t isslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgggsg sqvqlqesgpglvk psetlsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdn sknqvslkls svtaadtavyyca k hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
50	CD19	huscFv7	Qvqlqesgpglvk psetlsltctvsgvslpdygvswirqppg kglewigviwgsettyysss lksrvtiskdn sknqvslklss vtaadtavyyca k hyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsg ggsgggsgggsgggseivmtqspatls slspgeratlscrasq iskyl nwyqqkpggqaprlliyhtsr l hsgiparfsgsgsgtd ytl t isslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
51	CD19	huscFv8	Qvqlqesgpglvk psetlsltctvsgvslpdygvswirqppg kglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdn sknqvslklss vtaadtavyyca k hyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsg ggsgggsgggsgggseivmtqspatls slspgeratlscrasq iskyl nwyqqkpggqaprlliyhtsr l hsgiparfsgsgsgtd ytl t isslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
52	CD19	huscFv9	Eivmtqspatls slspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgg aprlliyhtsr l hsgiparfsgsgsgtdytl t isslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgggsg sqvqlqesgpglvk psetlsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyynss lksrvtiskdn sknqvslkls svtaadtavyyca k hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
53	CD19	Hu scFv10	Qvqlqesgpglvk psetlsltctvsgvslpdygvswirqppg kglewigviwgsettyynss lksrvtiskdn sknqvslklss vtaadtavyyca k hyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsg ggsgggsgggsgggseivmtqspatls slspgeratlscrasq iskyl nwyqqkpggqaprlliyhtsr l hsgiparfsgsgsgtd ytl t isslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
54	CD19	Hu scFv11	Eivmtqspatls slspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgg aprlliyhtsr l hsgiparfsgsgsgtdytl t isslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgggsgvql qesgpglvk psetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkgle wigviwgsettyynss lksrvtiskdn sknqvslklssvtaa dtavyyca k hyyyggsyamdywgqgtlvtvss

10

20

30

40

【表 9】

55	CD19	Hu scFv12	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppg kglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklss vtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtltvtvssgggsg ggsggggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlti sslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik
43	CD19	muCTL0 19	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdg tvklliyhtsrhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqedia tyfcqqgntlpytfgggtkleitgggsgggsggggsevkl qesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkgle wlgviwgsettyynsalksrliikdnskqvflkmnslqtd dtaiyycahyyyggsyamdywgqgtsvtvss
56	CD123	Mu1172	<u>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGNTFM</u> <u>HWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRT</u> <u>DFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPPTFGAGTKLE</u> <u>LKGGGSGGGSSGGGSGIQLVQSGPELKKPGETV</u> <u>KISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWMGWIN</u> <u>TYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNE</u> <u>DTATYFCARSGGYDPMDYWGQGTSTVTVSS</u>
57	CD123	Mu1176	<u>DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQ</u> <u>EKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTI</u> <u>SSLEPEDFAMYYCQQHNKYPYTFGGGTKEIKGGG</u> <u>GSGGGGSSGGGSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCK</u> <u>ASGYTFTSYWMNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSET</u> <u>HYNQKFQDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY</u> <u>YCARGNWDDYWGQGTTLTVSS</u>
58	CD123	huscFv1	Divltqspdslavslgeratincrasesvdyngntfmhwyqqkpgppkl liyrasnlesgvprdfsgsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptfg qgtkleikgggsgggsgggsgggsgggsggiqlvqsgselkkpgasvkvsc kasgyiftnygmnwvrqapggglewmgwintytgestysadfkgrfvfs ldtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss
59	CD123	huscFv2	Divltqspdslavslgeratincrasesvdyngntfmhwyqqkpgppkl liyrasnlesgvprdfsgsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptfg qgtkleikgggsgggsgggsgggsgggsggiqlvqsgaevkkpgasvkvsc kasgyiftnygmnwvrqapggglewmgwintytgestysadfkgrvtit ldtsastaymelsslrdsedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

【表 1 2】

74	EGFR vIII	Mu310C	eiqlqqsgaelvkpgasvklsetgsgfniedyyihwvkqrteqglewigrd pendetkygpfqgratitadtssntvylqlssltseavyycafrggvyw gpgttltvssggggsgggsgggshmdvmtqspltsvaigqsasisk ssqslldsdgktylnwllqrpqgspkrlislvskldsgvpdrftgsgsgtdftl risrveaedlgiyycwqgthfpgtfgggkcleik
75	メソテリ ン	ss1	Q V Q L Q Q S G P E L E K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y T M N W V K Q S H G K S L E W I G L I T P Y N G A S S Y N Q K F R G K A T L T V D K S S S T A Y M D L L S L T S E D S A V Y F C A R G G Y D G R G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I E L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P G R F S G S G S G N S Y S L T I S S V E A E D D A T Y Y C Q Q W S G Y P L T F G A G T K L E I

10

20

【0 4 4 5】

ある態様において、抗原結合ドメインは、次のいずれか一つを標的とするまたは特異的に結合する、当分野で知られるあらゆる抗体またはそのフラグメント、例えば、s c F vを含む：B C M A (T N F R S F 1 7、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー1 7またはB細胞成熟抗原としても知られる)、C D 3 3、C L L - 1 (C型レクチン様ドメインファミリー1またはC L E C L 1としても知られる)、クローディン-6 (C L D N 6)またはW T - 1 (ウィルムス腫瘍1)。抗体またはそのフラグメントは、マウス、ヒト化または完全ヒト抗体またはそのフラグメントであり得る。

【0 4 4 6】

ある態様において、抗原結合ドメインは、抗C D 1 9抗体またはそのフラグメント、例えば、s c F vを含む。例えば、抗原結合ドメインは、表8に記載の可変重鎖および可変軽鎖を含む。可変重鎖と可変軽鎖を連結するリンカー配列はここに記載するリンカー配列のいずれかであり得るまたは代替的にG S T S G S G K P G S G E G S T K G (配列番号7 6)であり得る。

30

【0 4 4 7】

【表 1 3】

表8：抗C D 1 9抗体結合ドメイン

抗体	V H配列	V L配列
SJ25-C1	QVQLLES GAELVRPGSSVKISCKASGYAFSS YWMNWVKRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNG KFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAV YSCARKTISSVDFYFDYWGQGT T V T (配列 番号77)	ELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSG TDFTLTITNVQSKDLADYFYFCQYNRYPTSGGG TKLEIKRRS (配列番号78)

40

【0 4 4 8】

当分野で知られるC D 1 9 C A R、例えば、任意の既知C D 1 9 C A RのC D 1 9抗原結合ドメインを、本発明に従い使用できる。例えば、L G - 7 4 0；米国特許8, 3 9 9, 6 4 5号；米国特許7, 4 4 6, 1 9 0号；Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54(2): 255-260(2012); Cruz et al., Blood 122(17):2965-2973 (2013); Brentjens et al., Bl

50

ood, 118(18):4817-4828 (2011); Kochenderfer et al., Blood 116(20):4099-102 (2010); Kochenderfer et al., Blood 122 (25):4129-39(2013); および16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15-18, Salt Lake City) 2013, Abst 10に記載のCD19 CAR。

【0449】

ある態様において、抗原結合ドメインは、上記抗体からの1、2、3(例えば、全3)重鎖CDR、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3および／または上記抗体からの1、2、3(例えば、全3)軽鎖CDR、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、上記抗体の重鎖可変領域および／または可変軽鎖領域を含む。

10

【0450】

ある態様において、抗原結合ドメインは、表3に記載の任意の重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、さらにLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、表3に記載の任意の軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

【0451】

ある態様において、抗原結合ドメインは、表3に記載の任意の軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1、2または全ておよび表3に記載の任意の重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2

20

【0452】

ある態様において、CDRは、Kabat番号付けスキーム、Chothia番号付けスキームまたはこれらの組み合わせにより定義される。

【0453】

ある態様において、scFvにおいてVLおよびVHドメインが現れる順番は変わり(すなわち、VL-VHまたはVH-VL配向)、scFvドメイン全体を作るように、各サブユニットが配列GGGGS(配列番号28)(例えば、(G4S)3(配列番号30)または(G4S)4(配列番号29))を含む3または4コピーの“G4S”(配列番号25)サブユニットが可変ドメインを結合する。あるいは、CAR構築物は、例えば、配列GSTSGSGKPGSGEGSTKG(配列番号95)を含むリンカーを含み得る。

30

【0454】

種々のscFvフラグメントおよび他のCAR要素の配列例をここに提供する。リーダー配列(例えば、配列番号2のアミノ酸配列または配列番号3のヌクレオチド配列を伴わない)を伴わないこれらのCAR要素(例えば、配列番号42、26の)もここに提供する。

【0455】

ある態様において、ここに記載するCAR配列は、CD3ゼータ鎖由来の共刺激性ドメインのシグナルドメインにおけるQ/K残基変化を含む。

【0456】

他の面において、抗原結合ドメインは、ヒト化抗体または抗体フラグメントを含む。ある面において、非ヒト抗体は、抗体の特定の配列または領域がヒトにおいて天然に産生される抗体またはそのフラグメントに対する類似性を高めるために修飾され、ヒト化される。ある面において、抗原結合ドメインは、ヒト化される。

40

【0457】

ヒト化抗体は、CDR移植(例えば、各々をその全体を引用により本明細書に包含させる、欧州特許EP239,400号;国際公開WO91/09967号;および米国特許5,225,539号、5,530,101号および5,585,089号参照)、ベニアリングまたはリサーフェシング(例えば、各々をその全体を引用により本明細書に包含させる欧州特許EP592,106号およびEP519,596号;Padlan, 1991, Molecular Im

50

munology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; および Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973 参照)、鎖シャッフリング(例えば、その全体を引用により本明細書に包含させる米国特許 5,565,332 号参照)および例えば、各々をその全体を引用により本明細書に包含させる米国特許出願公開 US 2005/0042664 号、米国特許出願公開 US 2005/0048617、米国特許 6,407,213 号、米国特許 5,766,886 号、国際公開 WO 93/17105 号、Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002), Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994) および Pederse-
n et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994) に記載の方法を含むが、これらに限定
されない、当分野で知られる多様な方法を使用して産生できる。しばしば、フレームワー
ク領域におけるフレームワーク残基を、抗原結合を変える、例えば改善するために、C D
R ドナー抗体からの対応する残基で置換する。これらのフレームワーク置換は、当分野で
周知の方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するための C D R とフ
レームワーク残基の相互作用のモデリングおよび特定の位置の異常フレームワーク残基を
同定するための配列比較により、同定される(例えば、引用により本明細書に包含させる Q
ueen et al., 米国特許 5,585,089 号; および Riechmann et al., 1988, Nature, 3
32:323 参照)。

10

20

【0458】

ヒト化抗体または抗体フラグメントは、非ヒトである源から残留している 1 以上のアミ
ノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、一般に“インポート”可
変ドメインからとられる、“インポート”残基という。ここに提供されるように、ヒト化
抗体または抗体フラグメントは、フレームワークが完全にまたは大部分ヒト生殖細胞系に
由来する、非ヒト免疫グロブリン分子およびフレームワーク領域からの 1 以上の C D R を
含む。抗体または抗体フラグメントのヒト化のための多数の技術が当分野で知られ、本質
的に、Winter and co-workers (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann
et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1
988)) の方法に従い、齧歯類 C D R または C D R 配列をヒト抗体の対応する配列に置換す
ることにより、すなわち、C D R 移植(内容を引用によりその全体を本明細書に包含させ
る E P 239,400 号; P C T 公開 WO 91/09967 号; および米国特許 4,816
,567 号; 6,331,415 号; 5,225,539 号; 5,530,101 号; 5,585
,089 号; 6,548,640 号)により実施できる。このようなヒト化抗体および抗体フラ
グメントにおいて、非ヒト種からの対応する配列により置換されるのは実質的に完全よ
り少ないヒト可変ドメインである。ヒト化抗体は、しばしば、ある C D R 残基およびおそ
らくあるフレームワーク(F R)残基が、齧歯類抗体における類似部位からの残基により置
換される、ヒト抗体である。抗体および抗体フラグメントのヒト化は、ベニアリングまた
はリサーフェシング(E P 592,106 号; E P 519,596 号; Padlan, 1991, Molec
ular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):80
5-814 (1994); および Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) または鎖シャッフリ
ング(米国特許 5,565,332 号)によっても達成でき、その内容は、引用によりその全
体を本明細書に包含させる。

30

40

【0459】

ヒト化抗体を製造するために使用する軽および重両者のヒト可変ドメインの選択は、抗
原性を減少するためである。いわゆる“ベストフィット”法により、齧歯類抗体の可変ド
メインの配列を、既知ヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニング
する。齧歯類に最も近いヒト配列を、その後、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク(
F R)として受け入れる(その内容を引用によりその全体を本明細書に包含させる Sims et
al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987))

50

参照)。他の使用は、特定のサブグループの軽鎖または重鎖の全抗体のコンセンサス配列由来の特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークは、数種の異なるヒト化抗体のために使用し得る(例えば、その内容を引用によりその全体を本明細書に包含させる、Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)参照)。ある態様において、フ重鎖可変領域のフレームワーク領域、例えば、全4フレームワーク領域は、VH 4__4-59生殖細胞系配列由来である。ある態様において、フレームワーク領域は、例えば、対応するマウス配列のアミノ酸からの、1、2、3、4または5修飾、例えば、置換を含み得る。ある態様において、軽鎖可変領域のフレームワーク領域、例えば、全4フレームワーク領域は、VK 3__1.25生殖細胞系配列由来である。ある態様において、フレームワーク領域は、例えば、対応するマウス配列のアミノ酸からの、1、2、3、4または5修飾、例えば、置換を含み得る。

10

【0460】

ある面において、本発明のCAR組成物の抗体フラグメントを含む部分は、標的抗原に対する高親和性および他の有利な生物学的特性を維持しながらヒト化される。本発明のある面によって、ヒト化抗体および抗体フラグメントは、親およびヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列および種々の概念的ヒト化産物の分析の過程により製造される。三次元免疫グロブリンモデルは一般に利用可能であり、当業者は熟知している。選択した候補免疫グロブリン配列の可能性のある三次元立体構造的構造を説明および提示するコンピュータープログラムは利用可能である。これらのディスプレイの検査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析、例えば、候補免疫グロブリンの標的抗原への結合能に影響する残基の分析を可能にする。この方法で、FR残基は、標的抗原に対する親和性増加のような、所望の抗体または抗体フラグメント時調が達成されるように、レシピエントおよびインポート配列から選択および組み合わせできる。一般に、CDR残基は、抗原結合の直接的かつ最も実質的な影響に関与する。

20

【0461】

ヒト化抗体または抗体フラグメントは、元の抗体と類似する抗原性特異性、例えば、本発明において、ここに記載するようなヒト癌関連抗原に結合する能力を保持し得る。ある態様において、ヒト化抗体または抗体フラグメントは、ここに記載するようなヒト癌関連抗原への結合の親和性および／または特異性が改善され得る。

30

【0462】

ある面において、本発明の抗原結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントの特定の機能的性質または特性により特徴付けされる。例えば、ある面において本発明のCAR組成物の抗原結合ドメインを含む部分は、ここに記載するような腫瘍マーカーに特異的に結合する。

【0463】

ある面において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメインは、フラグメント、例えば、一本鎖可変フラグメント(scFv)である。ある面において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメインは、Fv、Fab、(Fab')₂または二機能性(例えば二特異性)ハイブリッド抗体である(例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105(1987))。ある面において、本発明の抗体およびそのフラグメントは、ここに記載するような癌関連抗原タンパク質と、野生型のまたは増強した親和性で結合する。

40

【0464】

ある例において、scFvsは、当分野で知られる方法により製造できる(例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883参照)。ScFv分子は、柔軟性ポリペプチドリンカーを使用して、VH領域とVL領域と一緒に連結することにより産生できる。scFv分子は、最適長および／またはアミノ酸組成を有するリンカー(例えば、Ser-Glyリンカー)を含む。リンカー長は、scFvの可変領域がどのように折りたたまれ、相互作用するかに大きく影響し得る。実際、短ポリペプチドリンカーを用いるならば、(例えば、5~10ア

50

ミノ酸)、鎖内折りたたみは阻止される。鎖内折りたたみは、2可変領域が一体となって機能的エピトープ結合部位を形成させるためにも必要である。リンカー配向およびサイズの例は、例えば、引用により本明細書に包含させるHollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448、米国特許出願公開2005/0100543号、2005/0175606号、2007/0014794号およびPCT公開WO2006/020258号およびWO2007/024715号参照。

【0465】

s c F vは、そのV L領域とV H領域の間に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50またはそれ以上のアミノ酸残基のリンカーを含み得る。リンカー配列は、あらゆる天然に存在するアミノ酸を含み得る。ある態様において、リンカー配列は、アミノ酸グリシンおよびセリンを含む。他の態様において、リンカー配列は、(G l y₄ S e r)_n(ここで、nは1以上の正の整数である)のような、一連のグリシンおよびセリン反復を含む(配列番号22)。ある態様において、リンカーは(G l y₄ S e r)₄(配列番号29)または(G l y₄ S e r)₃(配列番号30)であり得る。リンカー長の変動は、活性を維持または増強し、活性試験において優れた有効性を生じ得る。

【0466】

他の面において、抗原結合ドメインは、T細胞受容体(“TCR”)またはそのフラグメント、例えば、一本鎖TCR(s c TCR)である。このようなTCRを製造する方法は、当分野で知られる。例えば、Willemsen RA et al, Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004); Aggen et al, Gene Ther. 19(4):365-74 (2012)参照(引用文献は、その全体を本明細書に包含させる)。例えば、リンカー(例えば、柔軟性ペプチド)により連結されたT細胞クローンからのV α およびV β 遺伝子を含むs c TCRが操作され得る。この方法は、それ自体が細胞内であるが、このような抗原(ペプチド)のフラグメントがMHCにより癌細胞の表面に提示される、癌関連標的に対して極めて有用である。

【0467】

安定性および変異

ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v分子(例えば、可溶性s c F v)の安定性を、慣用の対照s c F v分子または完全長抗体の生物物理学的特性(例えば、熱安定性)を参照して評価できる。ある態様において、ヒト化s c F vは、記載するアッセイにおいて、対照結合分子(例えば慣用のs c F v分子)より、約0.1℃、約0.25℃、約0.5℃、約0.75℃、約1℃、約1.25℃、約1.5℃、約1.75℃、約2℃、約2.5℃、約3℃、約3.5℃、約4℃、約4.5℃、約5℃、約5.5℃、約6℃、約6.5℃、約7℃、約7.5℃、約8℃、約8.5℃、約9℃、約9.5℃、約10℃、約11℃、約12℃、約13℃、約14℃または約15℃高い熱安定性を有する。

【0468】

ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F vの熱安定性の改善は、続いてCART19構築物全体に貢献し、CART19構築物の治療的特性改善に至る。ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F vの熱安定性は、慣用の抗体と比較して少なくとも約2℃または3℃改善され得る。ある態様において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F vは、慣用の抗体に対して1℃改善された熱安定性を有する。他の態様において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F vは、慣用の抗体に対して2℃改善された熱安定性を有する。他の態様において、s c F vは、慣用の抗体に対して4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、11℃、12℃、13℃、14℃、15℃改善された熱安定性を有する。比較は、例えば、ここに記載するs c F v分子と、s c F v V HおよびV Lが由来した抗体のs c F v分子またはF a bフラグメントで行い得る。熱安定性を、当分野で知られる方法を使用して測定できる。例えば、ある態様において、T_mを測定できる。T_mを測定する方法およびタンパク質安定性を決定する他の方法は、下にさらに詳細に記載

する。

【0469】

s c F vにおける変異(可溶性s c F vのヒト化または直接変異誘発に起因)は、s c F vの安定性を変え、s c F vおよびC A R T 1 9構築物の全体的安定性を改善する。ヒト化s c F vの安定性を、T m、変性温度および凝集温度のような測定を使用して、マウスs c F vと比較する。

【0470】

変異体s c F vの結合能力を、実施例に記載するアッセイを使用して決定できる。

【0471】

ある態様において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v変異s c F vがC A R構築物の安定性改善を与えるように、ヒト化過程に起因する少なくとも一つの変異を含む。他の態様において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F vは、変異s c F vがC A R構築物の安定性改善を与えるように、ヒト化過程に起因する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10変異を含む。

10

【0472】

タンパク質安定性を評価する方法

抗原結合ドメインの安定性は、例えば、下記の方法を使用して、評価し得る。このような方法は、最小安定ドメインが最初に変性するまたは協調的に変性する多ドメイン単位(例えば、単一変性遷移を示す多ドメインタンパク質)の全体的安定性閾値を制限する、複数熱的変性遷移の決定を可能にする。最小安定ドメインを、多数のさらなる方法で同定できる。変異誘発を、どのドメインが全体的安定性を制限するか探索するために実施できる。さらに、多ドメインタンパク質のプロテアーゼ抵抗性を、最小安定ドメインが本質的に変性することが知られる条件下、D S Cまたは他のスペクトル方法により実施できる(Fontana, et al., (1997) Fold. Des., 2: R17-26; Dimasi et al. (2009) J. Mol. Biol. 393: 672-692)。最小安定ドメインが同定されたら、このドメインをコードする配列(またはその部分)を、本方法における試験配列として用い得る。

20

【0473】

a) 熱安定性

組成物の熱安定性を、当分野で知られる、多数の非限定的生物物理学的または生化学的技術を使用して分析し得る。ある態様において、熱安定性を、分析的スペクトロスコピーにより評価する。

30

【0474】

分析的スペクトロスコピー法の例は示差走査熱量測定(D S C)である。D S Cは、大部分のタンパク質またはタンパク質ドメインの変性に付随する熱熱吸収性に感受性である熱量計を用いる(例えばSanchez-Ruiz, et al., Biochemistry, 27: 1648-52, 1988参照)。タンパク質の熱安定性を決定するために、タンパク質サンプルを熱量計に入れ、F a bまたはs c F vが変性するまで温度を上げる。タンパク質が変性する温度が、全体的タンパク質安定性の指標である。

【0475】

分析的スペクトロスコピー法の他の例は、円二色性(C D)スペクトロスコピーである。C Dスペクトロメトリーは、組成物の光学活性を温度上昇の関数として測定する。円二色性(C D)スペクトロスコピーは、構造的な不均一性に起因する左手側偏光対右手側偏光の吸収の差異を測定する。障害されたまたは変性した構造は、規則正しいまたは折りたたまれた構造と極めて異なるC Dスペクトルをもたらす。C Dスペクトルは、温度上昇の変性効果に対するタンパク質の感受性を反映し、それゆえに、タンパク質熱安定性の指標である(van Mierlo and Steemsma, J. Biotechnol., 79(3):281-98, 2000参照)。

40

【0476】

熱安定性を測定するための分析的スペクトロスコピー法の他の例は、蛍光発光スペクトロスコピーである(van Mierlo and Steemsma, supra参照)。熱安定性を測定するための分

50

析的スペクトロスコピー法のさらに他の例は、核磁気共鳴(NMR)スペクトロスコピーである(例えば、van Mierlo and Steemsma, supra参照)。

【0477】

組成物の熱安定性は、生化学的に測定できる。熱安定性を評価するための生化学的方法の例は、熱負荷アッセイである。“熱負荷アッセイ”において、組成物を、設定した一定期間、一定範囲の高温に付す。例えば、ある態様において、試験 s c F v 分子または s c F v 分子を含む分子を、例えば、1～1.5時間、一定範囲の温度上昇に付す。その後、タンパク質の活性を、関連する生化学的アッセイによりアッセイする。例えば、タンパク質が結合タンパク質(例えば s c F v または s c F v 含有ポリペプチド)であるならば、結合タンパク質の結合活性を、機能的または定量的 E L I S A により決定できる。

10

【0478】

このようなアッセイは、例えば、大腸菌およびハイスループットスクリーニングを使用するハイスループット形式で行い得る。ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v バリエーションのライブラリーを、当分野で知られる方法を使用して作り得る。ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v 発現を誘発でき、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v を熱負荷に付し得る。負荷試験サンプルを結合についてアッセイでき、安定である、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v をスケールアップし、さらに特徴付けしてよい。

【0479】

熱安定性を、上記技術のいずれかを使用して、組成物の融解温度(T_m)を測定することにより評価する(例えば分析的スペクトロスコピー技術)。融解温度は、組成物の分子の50%が折りたたまれた状態である、温度遷移曲線の中点の温度である(例えば、Dimasi et al. (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692参照)。ある態様において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v の T_m 値は、約40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃、95℃、96℃、97℃、98℃、99℃、100℃である。ある態様において、I g G の T_m 値は、約40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃、95℃、96℃、97℃、98℃、99℃、100℃である。ある態様において、多価抗体の T_m 値は、約40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃、95℃、96℃、97℃、98℃、99℃、100℃である。

20

30

40

【0480】

熱安定性はまた、分析的熱量測定技術(例えばDSC)を使用して組成物の比熱または熱容量(C_p)を測定することによっても評価する。組成物の比熱は、1molの水の温度を1℃上げるのに必要なエネルギー(例えばkcal/mol)である。大きな C_p は、変性または不活性タンパク質組成物の特徴である。組成物の熱容量(ΔC_p)の変化を、温度遷移前後

50

の組成物の比熱の決定により測定する。熱安定性は、変性のギブズ自由エネルギー(ΔG)、変性のエンタルピー(ΔH)または変性のエントロピー(ΔS)を含む、熱力学的安定性の他のパラメータの測定または決定によっても評価し得る。上記生化学的アッセイ(例えば熱負荷アッセイ)の1以上を使用して、組成物の50%がその活性(例えば結合活性)を保持する温度(すなわち T_c 値)を決定する。

【0481】

加えて、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v への変異は、非変異のここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v と比較して、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v の熱安定性を変える。ここに記載するようなヒト化抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v が C A R T 1 9 構築物に取り込まれたとき、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、ヒト化 s c F v は、本発明の抗 C A R 全体に熱安定性を与える。ある態様において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v は、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v に熱安定性を与える単一変異を含む。他の態様において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v は、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v に熱安定性を与える複数変異を含む。ある態様において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v における複数変異は、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、s c F v の熱安定性に相加効果を有する。

【0482】

b)凝集%

組成物の安定性は、その凝集傾向の測定により決定できる。凝集は、多数の非限定的生化学的または生物物理学的技術により測定できる。例えば、組成物の凝集は、クロマトグラフィー、例えばサイズ排除クロマトグラフィー(S E C)を使用して評価し得る。S E C は、サイズに基づき分子を分ける。カラムを、イオンおよび小分子を内側に入れるが、大きいものは入れないポリマーゲルの半固体ビーズで満たす。タンパク質組成物をカラムの上部に適用したとき、小型の折りたたまれたタンパク質(すなわち非凝集タンパク質)は、大タンパク質凝集が利用可能であるより大量の溶媒に分散される。その結果、大きな凝集体はカラムをより速く移動し、この方法で混合物をその要素に分離または分画できる。各フラクションは、ゲルから溶出するに連れて別々に定量できる(例えば、光散乱による)。よって、組成物の凝集%を、フラクションの濃度と、ゲルに適用したタンパク質の総濃度の比較により決定できる。安定組成物は、本質的に単一フラクションとしてカラムから溶出し、溶出プロファイルまたはクロマトグラムにおいて本質的に単一ピークとして見える。

【0483】

c)結合親和性

組成物の安定性を、その標的結合親和性の決定により評価できる。決定結合親和性のための広範な方法が当分野で知られる。結合親和性を決定するための方法の例は、表面プラズモン共鳴を用いる。表面プラズモン共鳴は、例えば、B I A c o r e システム(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)を使用する、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変更の検出により実時間生体分子特異的相互作用の分析を可能にする、光学的現象である。さらなる記載については、U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., i (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; および Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277を参照のこと。

【0484】

ある面において、C A R の抗原結合ドメインは、ここに記載する抗原結合ドメインアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を含み、抗原結合ドメインは、ここに記載する抗体フラグメントの、ここに記載するような抗癌関連抗原の所望の機能的特性を維持する。ある特定の面において、本発明の C A R 組成物は、抗体フラグメントを含む。さらなる面にお

いて、その抗体フラグメントは s c F v を含む。

【0485】

種々の面において、C A R の抗原結合ドメインは、一方または両方の可変領域(例えば、V H および／または V L)内、例えば 1 以上の C D R 領域内および／または 1 以上のフレームワーク領域の、1 以上のアミノ酸の修飾により操作される。ある特定の面において、本発明の C A R 組成物は、抗体フラグメントを含む。さらなる面において、その抗体フラグメントは s c F v を含む。

【0486】

本発明の抗体または抗体フラグメントが、アミノ酸配列が(例えば、野生型から)違うようにさらに修飾されてよいが、所望の活性は修飾されないことは、当業者には理解される。例えば、“非必須”アミノ酸残基でのアミノ酸置換を生じるさらなるヌクレオチド置換を、タンパク質に行ってよい。例えば、分子における非必須アミノ酸残基を同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えてよい。他の態様において、一連のアミノ酸を、側鎖ファミリーメンバーの順番および／または組成が異なる構造的に類似する一連のもので置き換えることができ、例えば、アミノ酸残基が類似側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられた保存的置換をなし得る。

【0487】

塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非電荷極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分枝側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む、類似側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当分野で定義されている。

【0488】

2 以上の核酸またはポリペプチド配列の状況における同一性パーセントは、同じである、2 以上の配列をいう。2 配列は、次の配列比較アルゴリズムの一つを使用してまたは手動アラインメントおよび目視により、比較窓または指定領域にわたり、最大対応を比較およびアラインしたとき、同じであるアミノ酸残基またはヌクレオチドを特定パーセント有するならば、“実質的に同一”である(特定領域、または、特定されていないとき、配列全体にわたり、例えば、60%同一性、場合により70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性)。場合により、同一性は、少なくとも約50ヌクレオチド(または10アミノ酸)長の領域またはより好ましくは100～500または1000またはそれ以上のヌクレオチド(または20、50、200またはそれ以上のアミノ酸)長の領域にわたり、同一性が存在する。

【0489】

配列比較のために、一般に1配列が対照配列として働き、それに対して試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用するとき、試験および対照配列をコンピューターに入力し、必要であれば、部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用でき、または代替パラメータを指定できる。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づき、対照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。比較のために配列をアラインメントする方法は、当分野で周知である。比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cの局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444のサーチのための類似法、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、

BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)または手動アラインメントおよび目視(例えば、Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology参照)により実施できる。

【0490】

配列同一性および配列類似性パーセントの決定に適するアルゴリズムの例はBLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれAltschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; およびAltschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationから公的に入手可能である。

【0491】

2アミノ酸配列間の同一性パーセントは、PAM120荷重残基表、ギャップ長ペナルティ2およびギャップペナルティ4を使用して、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に取り込まれている、Meyers and W. Miller((1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17)アルゴリズムを使用しても決定できる。加えて、2アミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossom 62マトリックスまたはPAM250マトリックスおよびギャップ荷重16、14、12、10、8、6または4および長さ荷重1、2、3、4、5または6を使用する、GCGソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで利用可能)のGAPプログラムに取り込まれているNeedleman and Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)アルゴリズムを使用して決定できる。

【0492】

ある面において、本発明は、機能的に等価な分子を産生する、出発抗体またはフラグメント(例えば、scFv)アミノ酸配列の修飾を企図する。例えば、CARを構成する、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、scFvのVHまたはVLは、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイン、例えば、scFvの出発VHまたはVLフレームワーク領域の少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性を保持するように修飾できる。本発明は、機能的に等価な分子を産生するための、CAR構築物全体の修飾、例えば、CAR構築物における種々のドメインの1以上のアミノ酸配列における修飾を企図する。CAR構築物は、出発CAR構築物の少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性を保持するように修飾され得る。

【0493】

二特異性CAR

ある態様において、多特異性抗体分子は二特異性抗体分子である。二特異性抗体は、2以下の抗原に特異性を有する。二特異性抗体分子は、第一エピトープに対する結合特異性を有する第一免疫グロブリン可変ドメイン配列および第二エピトープに対する結合特異性を有する第二免疫グロブリン可変ドメイン配列により特徴付けられる。ある態様において、第一および第二エピトープは同じ抗原、例えば、同じタンパク質(または多量体タンパク質のサブユニット)である。ある態様において、第一および第二エピトープは重複する。ある態様において、第一および第二エピトープは重複しない。ある態様において、第一および第二エピトープは、異なる抗原、例えば、異なるタンパク質(または多量体タンパク質の異なるサブユニット)にある。ある態様において、二特異性抗体分子は、第一エピトープに結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列ならびに第二エピトープに結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列を含む。ある態様において、二特異性抗体分子は、第一エピトープに結合特異性を有する半抗体および第二エピトープに結合特異性を有する半抗体を含む。ある態様において、二特異性抗体分子は、第一エピトープに結合特異性を有する半抗体またはそのフラグメント

および第二エピトープに結合特異性を有する半抗体またはそのフラグメントを含む。ある態様において、二特異性抗体分子は、第一エピトープに結合特異性を有する s c F v またはそのフラグメントおよび第二エピトープに結合特異性を有する s c F v またはそのフラグメントを含む。

【0494】

ある態様において、抗体分子は、多特異性(例えば、二特異性または三特異性)抗体分子である。二特異性またはヘテロ二量体抗体分子を産生するためのプロトコールは当分野で知られる; 例えば、US 5731168号に記載の、“ノブ・イン・ア・ホール”アプローチ; 例えば、WO 09/089004号、WO 06/106905号およびWO 2010/129304号に記載のような静電的ステアリングFc対形成; 例えば、WO 07/110205号に記載のような鎖交換操作ドメイン(SEED)ヘテロ二量体形成; 例えば、WO 08/119353号、WO 2011/131746号およびWO 2013/060867号に記載のようなFabアーム交換; 例えば、US 4433059号に記載のような、例えば、アミン反応性基とスルフヒドリル反応性基を有するヘテロ二官能性試薬を使用して二特異性構造を製造するための、抗体架橋結合による、二重抗体コンジュゲート; 例えば、US 4444878号に記載のような、2重鎖間のジスルフィド結合の還元および酸化のサイクルを経る異なる抗体からの半抗体(重-軽鎖対またはFab)の組み換えにより産生する二特異性抗体決定基; 例えば、US 5273743号に記載のような、3機能性抗体、スルフヒドリル反応性基により架橋された3Fab'フラグメント; 例えば、US 5534254号に記載のような、生合成結合タンパク質、例えば、C末端テイル、好ましくはジスルフィドまたはアミン反応性化学架橋結合により架橋されたscFvの対; 例えば、US 5582996号に記載のような、二機能性抗体、例えば、置換された定常ドメインを有する、ロイシンジッパー(例えば、c-fosおよびc-jun)により二量体化された異なる結合特性を有するFabフラグメント; 例えば、US 5591828号に記載のような、二特異性およびオリゴ特異性一価およびオリゴ価受容体、例えば、一方の抗体のCH1領域と他方の一般に軽鎖を伴う抗体のVH領域の間のペプチドスパーサーを経て連結した2抗体(2Fabフラグメント)のVH-CH1領域; 例えば、US 5635602号に記載のような、二特異性DNA-抗体コンジュゲート、例えば、二本鎖切片のDNAを経た抗体またはFabフラグメントの架橋; 例えば、US 5637481号に記載のような、二特異性融合タンパク質、例えば、親水性らせん状ペプチドリンカーを間を含み、完全定常領域を含む、2scFvを含む発現構築物; 例えば、US 5837242号に記載のような、多価および多特異性結合タンパク質、例えば、Ig重鎖可変領域の結合領域を有する第一ドメインおよびIg軽鎖可変領域の結合領域を有する第二ドメインを有し、一般に二重特異性抗体(二特異性、三特異性、四特異性の分子を作るための高次構造も包含される)と呼ばれるペプチドの二量体; 例えば、US 5837821号に記載のような、二特異性/多価分子を形成するように二量体できる、ペプチドスパーサーでさらに抗体ヒンジ領域およびCH3領域に結合した、連結VL鎖およびVH鎖を有するミニボディ構築物; 二特異性二重特異性抗体を形成するように二量体を形成できる、いずれかの配向で短ペプチドリンカー(例えば、5または10アミノ酸)またはによりまたはリンカー無しで連結されたVHおよびVLドメイン; 例えば、US 5844094号に記載のような、三量体および四量体; 例えば、US 5864019号に記載のような、一連のFV(またはscFv)を形成するようにさらにVLドメインと結合した、C末端で架橋可能基とのペプチド結合により連結した一連のVHドメイン(またはファミリーメンバーにおけるVLドメイン); および、例えば、US 5869620号に記載のような、scFVまたは二重特異性抗体形態の両者を使用して、例えば、ホモ二価、ヘテロ二価、三価および四価構造を形成するように、非共有または化学架橋により多価構造に合わされている、ペプチドリンカーにより連結してVHドメインおよびVLドメインの両者を有する一本鎖結合ポリペプチドを、例えば、含むが、これらに限定されない。多特異性および二特異性分子およびそれを製造するためのさらなる例は、例えば、US 5910573号、US 5932448号、US 5959083号、US 5989830号、US 600

10

20

30

40

50

5079号、US6239259号、US6294353号、US6333396号、US6476198号、US6511663号、US6670453号、US6743896号、US6809185号、US6833441号、US7129330号、US7183076号、US7521056号、US7527787号、US7534866号、US7612181号、US2002004587A1号、US2002076406A1号、US2002103345A1号、US2003207346A1号、US2003211078A1号、US2004219643A1号、US2004220388A1号、US2004242847A1号、US2005003403A1号、US2005004352A1号、US2005069552A1号、US2005079170A1号、US2005100543A1号、US2005136049A1号、US2005136051A1号、US2005163782A1号、US2005266425A1号、US2006083747A1号、US2006120960A1号、US2006204493A1号、US2006263367A1号、US2007004909A1号、US2007087381A1号、US2007128150A1号、US2007141049A1号、US2007154901A1号、US2007274985A1号、US2008050370A1号、US2008069820A1号、US2008152645A1号、US2008171855A1号、US2008241884A1号、US2008254512A1号、US2008260738A1号、US2009130106A1号、US2009148905A1号、US2009155275A1号、US2009162359A1号、US2009162360A1号、US2009175851A1号、US2009175867A1号、US2009232811A1号、US2009234105A1号、US2009263392A1号、US2009274649A1号、EP346087A2号、WO0006605A2号、WO02072635A2号、WO04081051A1号、WO06020258A2号、WO2007044887A2号、WO2007095338A2号、WO2007137760A2号、WO2008119353A1号、WO2009021754A2号、WO2009068630A1号、WO9103493A1号、WO9323537A1号、WO9409131A1号、WO9412625A2号、WO9509917A1号、WO9637621A2号、WO9964460A1号に見ることができる。上に引用した出願の内容は、引用によりその全体を本明細書に包含させる。

【0495】

二特異性抗体分子の各抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)内で、VHは、VLの上流でも下流でもよい。ある態様において、上流抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)は、そのVL(VL₁)の上流のそのVH(VH₁)と共に配置され、下流抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)は、そのVL(VL₂)の上流のそのVH(VH₂)と共に配置され、その結果全体的二特異性抗体分子は、配置VH₁-VL₁-VL₂-VH₂を有する。他の態様において、上流抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)は、そのVH(VH₁)の上流のそのVL(VL₁)と共に配置され、下流抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)は、そのVH(VH₂)の上流のそのVL(VL₂)と共に配置され、その結果、全体的二特異性抗体分子は配置VL₁-VH₁-VH₂-VL₂を有する。場合により、リンカーは、2抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)の間、例えば、構築物がVH₁-VL₁-VL₂-VH₂として配列されるならば、VL₁とVL₂の間または構築物がVL₁-VH₁-VH₂-VL₂として配置されるならばVH₁とVH₂の間に配置される。リンカーは、ここに記載するリンカー、例えば、(Gly₄-Ser)_nリンカー(ここで、nは1、2、3、4、5または6、好ましくは4である)(配列番号29)であってよい。一般に、2scFv間のリンカーは、2scFvのドメイン間の誤対合を避けるのに十分長くなければならない。場合により、リンカーは、第一scFvのVLとVHの間に配置される。場合により、リンカーは、第二scFvのVLとVHの間に配置される。複数リンカーを有する構築物において、リンカーの任意の2以上は同一でも異なってもよい。よって、ある態様において、二特異性CA

Rは、ここに記載するような配置で、V L、V Hおよび場合により1以上のリンカーを含む。

【0496】

ある面において、二特異性抗体分子は、第一免疫グロブリン可変ドメイン配列、例えば、s c F vにより特徴付けられ、これは、第一癌関連抗原に対する結合特性を有し、例えば、ここに記載のような、例えば、表3に記載のようなs c F vを含むかまたはここに記載するs c F vからの軽鎖C D Rおよび／または重鎖C D Rを含み、そして、異なる抗原上に第二エпитープに対する結合特異性を有する第二免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む。ある面において、第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は、A M L細胞上に発現された抗原に結合特異性を有する。例えば、第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は、C D 1 2 3に対する結合特異性を有する。他の例として、第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は、C D 3 3に対する結合特異性を有する。他の例として、第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は、C L L - 1に対する結合特異性を有する。他の例として、第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は、C D 3 4に対する結合特異性を有する。他の例として、第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は、F L T 3に対する結合特異性を有する。例えば、第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は、葉酸受容体ベータに対する結合特異性を有する。ある面において、第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は、B細胞に発現される抗原、例えば、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2またはR O R 1に対する結合特異性を有する。

【0497】

キメラT C R

ある面において、ここに開示する抗体および抗体フラグメント(例えば、表3に開示のもの)をT細胞受容体(“T C R”)鎖、例えば、T C RアルファまたはT C Rベータ鎖の1以上の定常ドメインに移植して、癌関連抗原に特異的に結合するキメラT C Rを作ることができる。理論に縛られないが、キメラT C Rは、抗原結合によりT C R複合体を経てシグナル伝達すると考えられる。例えば、ここに記載するようなs c F vを、T C R鎖、例えば、T C Rアルファ鎖および／またはT C Rベータ鎖の定常ドメイン、例えば、少なくとも細胞外定常ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの部分に移植できる。他の例として、抗体フラグメント、例えばここに記載するようなV Lドメインを、T C Rアルファ鎖の定常ドメインに移植でき、抗体フラグメント、例えばここに記載するようなV Hドメインを、T C Rベータ鎖の定常ドメインに移植できる(または代替的に、V Lドメインを、T C Rベータ鎖の定常ドメインに移植してよく、V Hドメインを、T C Rアルファ鎖に移植してよい)。他の例として、抗体または抗体フラグメントのC D R、例えば、表3に記載の抗体または抗体フラグメントのC D Rを、T C Rアルファおよび／またはベータ鎖に移植して、癌関連抗原に特異的に結合するキメラT C Rを作り得る。例えば、ここに開示するL C C D RをT C Rアルファ鎖の可変ドメインに移植してよく、ここに開示するH C C D RをT C Rベータ鎖の可変ドメインに移植してよく、またはその逆も可能である。このようなキメラT C Rは、任意の適切な方法により産生し得る(例えば、W illemsen RA et al, Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al, Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al, Gene Ther. 2012 Apr;19(4):365-74)。

【0498】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、種々の態様において、C A Rは、C A Rの細胞外ドメインに結合する膜貫通ドメインを含むように設計できる。膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接した1以上のさらなるアミノ酸、例えば、膜貫通が由来するタンパク質の細胞外領域と関係する1以上のアミノ酸(例えば、細胞外領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10から最大15アミノ酸)および／または膜貫通タンパク質が由来するタンパク質の細胞内領域と関係する1以上のアミノ酸(例えば、細胞内領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10から最大15アミノ酸)を含み得る。ある面において、膜貫通ドメインは、C A Rの他のドメインの一つと関係するものであり、例えば、ある態様において、膜貫通ドメインは、シグナル伝達ドメイン、共刺激ドメインまたはヒンジドメインが由来し

10

20

30

40

50

たのと同じタンパク質由来であり得る。他の面において、膜貫通ドメインは、C A Rの他のドメインのいずれかが由来したのと同じタンパク質に由来しない。ある例において、膜貫通ドメインは、このようなドメインが、同一または異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインと結合するのを避けるように、例えば、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するように選択またはアミノ酸置換による修飾ができる。ある面において、膜貫通ドメインは、C A R発現細胞の細胞表面上の他のC A Rとホモ二量体化できる。異なる面において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同じC A R発現細胞に存在する天然結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小化するように修飾または置換され得る。

【0499】

膜貫通ドメインは、天然由来でも組み換え源由来でもよい。源が天然であるとき、ドメインは、あらゆる膜結合または膜貫通タンパク質由来であり得る。ある面において、膜貫通ドメインは、C A Rが標的に結合したときは常に細胞内ドメインにシグナル伝達できる。本発明において特に有用な膜貫通ドメインは、例えば、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖またはゼータ鎖、C D 2 8、C D 2 7、C D 3 イブシロン、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の少なくとも膜貫通領域を含み得る。ある態様において、膜貫通ドメインは、例えば、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)、N K p 4 4、N K p 3 0、N K p 4 6、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 α、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 (T a c t i l e)、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 G 2 D および N K G 2 C の少なくとも膜貫通領域を含み得る。

【0500】

ある例において、膜貫通ドメインは、ヒンジ、例えば、ヒトタンパク質からのヒンジを介して、C A Rの細胞外領域、例えば、C A Rの抗原結合ドメインに結合できる。例えば、ある態様において、ヒンジは、ヒト I g (免疫グロブリン) ヒンジ (例えば、I g G 4 ヒンジおよび I g D ヒンジ)、G S リンカー (例えば、ここに記載する G S リンカー)、K I R 2 D S 2 ヒンジまたは C D 8 a ヒンジであり得る。ある態様において、ヒンジまたはスパーサーは、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む (例えば、それからなる)。ある面において、膜貫通ドメインは、配列番号 1 2 の膜貫通ドメインを含む (例えば、それからなる)。

【0501】

ある面において、ヒンジまたはスパーサーは、I g G 4 ヒンジを含む。例えば、ある態様において、ヒンジまたはスパーサーは、アミノ酸配列 ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMSIRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGKM (配列番号 6) のヒンジを含む。ある態様において、ヒンジまたはスパーサーは、GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCTG GGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCTGCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTG TGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCC

TGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACC
CCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGA
TG(配列番号7)のヌクレオチド配列によりコードされたヒンジを含む。

【0502】

ある面において、ヒンジまたはスパーサーは、I g Dヒンジを含む。例えば、ある態様
において、ヒンジまたはスパーサーは、アミノ酸配列RWPEPKAQASSVPTAQPPQAEGLAKATTAPA
TTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKV
PTGGVEEGLLRHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVCTLNLHPSLPPQRLMALREPAQAQPVKLSLNLASSDPPEAAS
WLLCEVSGFSPNNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASR
SLEVSIVTDH(配列番号8)のヒンジを含む。ある態様において、ヒンジまたはスパーサーは
、AGGTGGCCCGAAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAA
GCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAAGAGAAAGAAGAACA
GGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTAC
AGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGG
GAGGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCA
CTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCC
CACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGAT
CCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGA
CCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGA
GTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACC
CTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT(配列番号9)のヌクレオチド配列
によりコードされたヒンジを含む。

【0503】

ある面において、膜貫通ドメインは組み換えであってよく、その場合、ロイシンおよび
バリンのような疎水性残基を優勢に含む。ある面において、フェニルアラニン、トリプト
ファンおよびバリンのトリプレットを、組み換え膜貫通ドメインの各末端に見ることがで
きる。

【0504】

場合により、2～10アミノ酸長の短オリゴまたはポリペプチドリンカーが、CARの
膜貫通ドメインと細胞質領域の間に結合を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは特
に適当なリンカーを提供する。例えば、ある面において、リンカーは、GGGSGGGGSのアミ
ノ酸配列(配列番号10)を含む。ある態様において、リンカーは、GGTGGCGGAGGTTCTGGAGG
TGGAGGTTCCのヌクレオチド配列(配列番号11)によりコードされる。

【0505】

ある面において、ヒンジまたはスパーサーは、KIR2DS2ヒンジを含む。

【0506】

細胞質ドメイン

本発明のCARの細胞質ドメインまたは領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。
細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが導入される免疫細胞の正常エフェクター機能の
少なくとも一つの活性化を一般に担う。本発明のCARにおいて使用する細胞内シグナル
伝達ドメインの例は、T細胞受容体(TCR)および抗原受容体結合後にシグナル伝達を開
始するために協調して働く共受容体の細胞質配列ならびにこれらのあらゆる誘導体または
バリエーションおよび同じ機能的な能力を有するあらゆる組み換え配列を含む。

【0507】

TCR単独により産生されたシグナルはT細胞の完全活性化には不十分であり、二次お
よび/または共刺激性シグナルも必要であることが知られる。それゆえに、T細胞活性化
は、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列が介在するということができる：TC
R(一次細胞内シグナル伝達ドメイン)を介して抗原依存性一次活性化を開始するものおよ
び二次または共刺激性シグナル(二次細胞質ドメイン、例えば、共刺激ドメイン)を提供す

るように抗原非依存的方法で作用するもの。

【0508】

一次シグナル伝達ドメインは、TCR複合体の一次活性化を刺激性方向または阻害性方向のいずれかで制御する。刺激性方向で作用する一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。

【0509】

本発明において特に有用であるITAM含有一次細胞内シグナル伝達ドメインの例は、CD3ゼータ、共通FcRガンマ(FCER1G)、FcガンマRIIa、FcRベータ(FcイプシロンR1b)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(“ICOS”としても知られる)、FcεRI、DAP10、DAP12およびCD66dのものを含む。ある態様において、本発明のCARは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ゼータの一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0510】

本発明で特に有用である一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む分子のさらなる例は、DAP10、DAP12およびCD32のものを含む。

【0511】

ある態様において、一次シグナル伝達ドメインは、天然ITAMドメインと比較して改変された(例えば、増加または減少した)活性を有する、修飾ITAMドメイン、例えば、変異ITAMドメインを含む。ある態様において、一次シグナル伝達ドメイン修飾ITAM含有一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、最適化および/または切断されたITAM含有一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、一次シグナル伝達ドメインは、1、2、3、4またはそれ以上のITAMモチーフを含む。

【0512】

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインをそれ自体で含んでよく、またはそれを本発明のCARの状況において有用である任意の他の所望の細胞内シグナル伝達ドメインと組み合わせる。例えば、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ鎖部分および共刺激性シグナル伝達ドメインを含み得る。共刺激性シグナル伝達ドメインは、共刺激性分子の細胞内ドメインを含むCARの部分を含む。共刺激性分子は、リンパ球の抗原に対する効率的応答に必要な、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。このような分子の例は、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3およびCD83と特異的に結合するリガンドなどを含む。例えば、CD27共刺激は、インビトロでヒトCAR T細胞の拡張、エフェクター機能および生存を増強し、インビボでヒトT細胞残留性および抗腫瘍活性を増強することが示されている(Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706)。このような共刺激性分子のさらなる例は、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKP80(KLRF1)、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NK

10

20

30

40

50

G2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELP(LG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドを含む。

【0513】

本発明のCARの細胞質部分内の細胞内シグナル伝達配列は、互いに無作為にまたは特定の順序で連結し得る。場合により、例えば、2〜10アミノ酸(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸)長の短オリゴまたはポリペプチドリンカーは、細胞内シグナル伝達配列間に結合を形成し得る。ある態様において、グリシン-セリンダブレットを適当なリンカーとして使用できる。ある態様において、単一アミノ酸、例えば、アラニン、グリシンを適当なリンカーとして使用できる。

【0514】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、2以上、例えば、2、3、4、5またはそれ以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある態様において、2以上、例えば、2、3、4、5または以上の共刺激性シグナル伝達ドメインは、リンカー分子、例えば、ここに記載するリンカー分子により分けられる。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、2つの共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、リンカー分子はグリシン残基である。ある態様において、リンカー分子はアラニン残基である。

【0515】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータのシグナル伝達ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータのシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、配列番号14のシグナル伝達ドメインである。ある面において、CD3ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号18(変異体CD3ゼータ)または配列番号20(野生型ヒトCD3ゼータ)のシグナル伝達ドメインである。

【0516】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータのシグナル伝達ドメインおよびCD27のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、CD27のシグナル伝達ドメインは、QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP(配列番号16)のアミノ酸配列を含む。ある面において、CD27のシグナル伝達ドメインは、AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC(配列番号17)の核酸配列によりコードされる。

【0517】

ある面において、ここに記載するCAR発現細胞は、さらに第二CAR、例えば、同じ標的(ここに記載するような癌関連抗原)または異なる標的(例えば、CD19、CD123、CD22、CD30、CD34、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、TnAg、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、IL-11Ra、PSCA、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-ベータ、SSEA-4、CD20、葉酸受容体アルファ、ERBB2(Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、プロステアゼ、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、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM

7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、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、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、プロステイン、サバイビンおよびテロメラーゼ、PCTA-1／ガレクチン8、MelanA／MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸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またはIGLL1)に対する、例えば異なる抗原結合ドメインを含む、第二CARを含むことができる。ある態様において、CAR発現細胞が2以上の異なるCARを含むとき、種々のCARの抗原結合ドメインは、抗原結合ドメインが互いに相互作用しないようなものである。例えば、第一および第二CARを発現する細胞は、第二CARの抗原結合ドメイン、例えば、VHHである第二CARの抗原結合ドメインと結合を形成しない、例えば、フラグメント、例えば、scFvとしての第一CARの抗原結合ドメインを有し得る。

【0518】

ある態様において、抗原結合ドメインは、単一ドメイン抗原結合(SDAB)分子を含み、相補的決定領域が単一ドメインポリペプチドの一部である分子を含む。例は、重鎖可変ドメイン、軽鎖を天然に欠く結合分子、慣用の4鎖抗体由来の単一ドメイン、操作されたドメインおよび抗体由来のもの以外の単一ドメインスキフォールドを含むが、これらに限定されない。SDAB分子は、当分野のまたは将来的な単一ドメイン分子であり得る。SDAB分子は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤツメウナギ、魚類、サメ、ヤギ、ウサギおよびウシを含むが、これらに限定されない任意の種由来であり得る。この用語はまたラクダ科およびサメ以外の種由来の天然に存在する単一ドメイン抗体分子も含む。

【0519】

ある面において、SDAB分子は、例えば、サメの血清に見られる新規抗原受容体(NAR)として知られる免疫グロブリンアイソタイプ由来であるような、魚類で見られる免疫グロブリンの可変領域に由来し得る。NAR(“IgNAR”)の可変領域由来の単一ドメイン分子を製造する方法は、WO03/014161号およびStreltsov (2005) Protein Sci. 14:2901-2909に記載されている。

【0520】

他の面によって、SDAB分子は、軽鎖を欠く重鎖として知られる天然に存在する単一ドメイン抗原結合分子である。このような単一ドメイン分子は、例えば、WO9404678号およびHamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448に記載されている。明確化するために、天然に軽鎖を欠く重鎖分子由来のこの可変ドメインは、ここでは、4鎖免疫グロブリンの慣用のVHと区別するために、VHHまたはナノボディとして知られる。このようなVHH分子は、ラクダ科種、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカおよびグアナコ由来であり得る。ラクダ科以外の他の種は天然に軽鎖を欠く重鎖分子を産生し得、このようなVHHは本発明の範囲内である。

【0521】

SDAB分子は、組み換え、CDR移植、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化および／またはインビトロ産生され得る(例えば、ファージディスプレイにより選択)。

【0522】

受容体の抗原結合ドメイン間を相互作用する抗原結合ドメインを含む複数のキメラ膜包

埋受容体を有する細胞は、例えば、抗原結合ドメインの1以上がその同族抗原に結合することを阻止するため、望ましくない可能性があることも判明した。よって、ここに開示されるのは、このような相互作用を最小化する、抗原結合ドメインを含む第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体を有する細胞である。またここに開示されるのは、このような相互作用を最小化する抗原結合ドメインを含む第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体をコードする核酸ならびにこのような細胞および核酸を製造および使用方法である。ある態様において、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の抗原結合ドメインの一方はs c F vを含み、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメもしくはヤツメウナギ単一V Hドメインまたはヒトもしくはマウス配列由来の単一V Hドメインを含む。

10

【0523】

ある態様において、本発明は第一および第二C A Rを含み、ここで、該第一C A Rおよび該第二C A Rの一方の抗原結合ドメインは、可変軽ドメインおよび可変重ドメインを含まない。ある態様において、該第一C A Rおよび該第二C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はs c F vではない。ある態様において、該第一C A Rおよび該第二C A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメもしくはヤツメウナギ単一V Hドメインまたはヒトもしくはマウス配列由来の単一V Hドメインを含む。ある態様において、該第一C A Rおよび該第二C A Rの一方の抗原結合ドメインは、ナノボディを含む。ある態様において、該第一C A Rおよび該第二C A Rの一方の抗原結合ドメインは、ラクダ科V H Hドメインを含む。

20

【0524】

ある態様において、該第一C A Rおよび該第二C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメもしくはヤツメウナギ単一V Hドメインまたはヒトもしくはマウス配列由来の単一V Hドメインを含む。ある態様において、該第一C A Rおよび該第二C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はナノボディを含む。ある態様において、該第一C A Rおよび該第二C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はラクダ科V H Hドメインを含む。

【0525】

ある態様において、細胞の表面上に存在するとき、該第一C A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二C A Rの存在により実質的に低減されない。ある態様において、該第二C A R存在下の該第一C A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二C A R非存在下の該第一C A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合の85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%である。

30

【0526】

ある態様において、細胞の表面上に存在するとき、該第一C A Rおよび該第二C A Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインである場合より少なく互いに結合する。ある態様において、該第一C A Rおよび該第二C A Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインである場合より85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%少なく互いに結合する。

【0527】

他の面において、ここに記載するC A R発現細胞は、他の薬剤、例えば、C A R発現細胞の活性を増強する薬剤をさらに発現できる。例えば、ある態様において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であり得る。阻害分子、例えば、P D 1は、C A R発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例は、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A 4、T I M 3、C E A C A M(例えば、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3および/またはC E A C A M - 5)、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7 - H 3(C D 2 7 6)、B 7 - H 4(V T C N 1)、H V E M(T N F R S F 1 4またはC D 2 7 0)、K I R、A 2 a R、M H CクラスI、M H CクラスII、G A L 9、アデノシンおよびT G F Rベータを含む。ある態様において、阻害分子を阻害する薬剤は、例えば、ここに記載する分

40

50

子、例えば、細胞に正のシグナルを提供する第二ポリペプチド、例えば、ここに記載する細胞内シグナル伝達ドメインに結合した、第一ポリペプチド、例えば、阻害分子を含む薬剤である。ある態様において、薬剤は、例えば、PD 1、PD-L 1、PD-L 2、CTLA 4、TIM 3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG 3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR 1、CD 160、2B 4、CD 80、CD 86、B7-H 3(CD 276)、B7-H 4(VTCN 1)、HVEM(TNFRSF 14またはCD 270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL 9、アデノシンおよびTGFRベータまたはこれらのいずれかのフラグメント(例えば、これらのいずれかの少なくとも細胞外ドメインの部分)のような阻害分子の第一ポリペプチドおよびここに記載する細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメイン(例えば、ここに記載するような、例えば、4-1BB、ICOS、CD 27またはCD 28)および/または一次シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載するCD 3ゼータシグナル伝達ドメインを含む)である第二ポリペプチドを含む。ある態様において、薬剤は、PD 1またはそのフラグメント(例えば、PD 1の少なくとも細胞外ドメインの部分)の第一ポリペプチドならびにここに記載する細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載するCD 28シグナル伝達ドメインおよび/またはここに記載するCD 3ゼータシグナル伝達ドメイン)の第二ポリペプチドを含む。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞は、例えば、引用によりその全体を本明細書に包含させるWO 2013/019615号に記載のような、スイッチ共刺激性受容体を含む。PD 1は、CD 28、CTLA-4、ICOSおよびBTLAも含む受容体のCD 28ファミリーの阻害性メンバーである。PD-1は、活性化B細胞、T細胞および骨髄細胞に発現される(Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75)。PD 1に対する2リガンド、PD-L 1およびPD-L 2は、PD 1への結合によりT細胞活性化を下方制御することが示されている(Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L 1は、ヒト癌において豊富である(Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制は、PD 1とPD-L 1の局所相互作用の阻害により逆転できる。

【0528】

ある態様において、細胞外結合ドメインは、カウンターリガンドに特異的な細胞外ドメインである(例えば、細胞外ドメインはPD 1からであり、カウンターリガンドはPD 1-L 1またはPD 1-L 2である)。

【0529】

ある態様において、阻害分子、例えば、プログラム細胞死1(PD 1)の細胞外ドメイン(ECD)を含む薬剤は、4-1BBおよびCD 3ゼータのような膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに融合できる(ここでは、PD 1 CARと称する)。ある態様において、PD 1 CARは、ここに記載するXCARと組み合わせて使用したとき、T細胞の残留性を改善する。ある態様において、CARは、配列番号26に下線で示すPD 1の細胞外ドメインを含むPD 1 CARである。ある態様において、PD 1 CARは、配列番号26のアミノ酸配列を含む。

Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtegnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdkl
aaafpedrsqpgqdcfrvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpsps
prpagqfqtlytttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyc
 krgkrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkr
 rgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatktdtydalhmqalppr (配列
 番号26)

【0530】

ある態様において、PD 1 CARは、下記アミノ酸配列を含む(配列番号39)。

pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvrtql

pngrdfhmsvvrarrndsgtylclgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprppt
paptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqt
tqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqegly
nelqkdkmaeayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqlppr (配列番号39)

【0531】

ある態様において、薬剤は、PD1 CAR、例えば、ここに記載するPD1 CAR
をコードする核酸配列を含む。ある態様において、PD1 CARの核酸配列を下に示し
、PD1 ECDは下記配列番号27において下線を引く。

atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctcgcaactcctgctccacgccgctagaccacccggatggtttctgga
ctctccggatcgcccggtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttgggtgtgactgagggcgataatgcgaccttca
cgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgctgaactgggtaccgcatgagcccgtaaaaccagaccgacaagctc
gccgcgtttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcgggtccgcgtgactcaactgccgaatggcagagactt
ccacatgagcgtgggtccgcgctaggcgaaacgactccgggacctacctgtgcggagccatctcgttggcgccctaaggccc
aatcaagagagcttgagggccgaactgagagtgaccgagcgcagagctgagggtgccaactgcacatccatccccatcg
cctcggcctgcggggcagtttcagaccctgggtcacgaccactccggcgccgcgccaccgactccggccccaactatcgc
gagccagccctgtcgtgaggccggaagcatgccgcccctgccgcccggagggtgctgtgcatacccggggattggacttcg
catgcgacatctacatttgggctcctctcgcgggaacttgtggcgtgctccttctgtccctggatcacacctgtactgc
aagcggggtcggaaaaagcttctgtacattttcaagcagcccttcatgaggcccggtgcaaaaccacccaggaggaggacgg
ttgctcctgcgggttccccgaagaggaagaaggaggttgcgagctgcgcgtgaagtcttcccgagcgcgcgacgccccg
cctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcggggaagagtacgatgtgctggacaagcgg
cgcgccgggacccccgaaatgggcggggaagcctagaagaaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaagga
caagatggccgaggcctactccgaaattgggatgaaggagagcgcgagggggaaaggggcacgacggcctgtaccaag
gactgtccaccgccaccaaggacacatacgtatgccctgcacatgcaggcccttccccctcgc (配列番号27)

【0532】

他の面において、本発明は、CAR発現細胞の集団、例えば、低い免疫増強用量のmT
OR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤
の投与と共に使用するためのCAR発現細胞を提供する。ある態様において、CAR発現
細胞の集団は、種々のCARを発現する細胞の混合物を含む。例えば、ある態様において
、CAR T細胞の集団は、ここに記載するここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイ
ンを有するCARを発現する第一細胞および異なるここに記載するような抗癌関連抗原結
合ドメイン、例えば、ここに記載する、第一細胞で発現されるCARにおけるここに記載
するような抗癌関連抗原結合ドメインと異なる、ここに記載するような抗癌関連抗原結
合ドメインを有するCARを発現する第二細胞を含む。他の例として、CAR発現細胞の集
団は、例えば、ここに記載するような、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメイ
ンを含むCARを発現する第一細胞およびここに記載するような癌関連抗原以外の標的(
例えば、CD123)に対する抗原結合ドメインを含むCARを発現する第二細胞を含み
得る。ある態様において、CAR発現細胞の集団は、例えば、一次細胞内シグナル伝達ド
メインを含むCARを発現する第一細胞および二次シグナル伝達ドメインを含むCARを
発現する第二細胞を含む。

【0533】

他の面において、本発明は細胞の集団を提供し、ここで、集団内の少なくとも1細胞は
、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメインを有するCARを発現し、第二細胞は
他の薬剤、例えば、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤を発現する。例えば、ある態様
において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であり得る。阻害分子、例えば、PD-1は
、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例
は、PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACA
M-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、
BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4およびTGFRベータを含む。
ある態様において、阻害分子を阻害する薬剤は、例えば、ここに記載する分子、例えば、
細胞に正のシグナルを提供する第二ポリペプチド、例えば、ここに記載する細胞内シグナ

ル伝達ドメインに結合した、第一ポリペプチド、例えば、阻害分子を含む薬剤である。ある態様において、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4またはTGFRベータまたはこれらのいずれかのフラグメントのような阻害分子の第一ポリペプチドおよびここに記載する細胞内シグナル伝達ドメインである第二ポリペプチド(例えば、共刺激ドメイン(例えば、ここに記載するような、例えば、4-1BB、CD27、OX40、ICOSまたはCD28)および/または一次シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載するCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む))。ある態様において、薬剤は、PD-1の第一ポリペプチドまたはそのフラグメント(例えば、PD1の少なくとも細胞外ドメインの部分)およびここに記載する細胞内シグナル伝達ドメインの第二ポリペプチド(例えば、ここに記載するCD28シグナル伝達ドメインおよび/またはここに記載するCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)を含む。

10

【0534】

ある面において、本発明は、CAR発現細胞の集団、例えば、CAR T細胞、例えば、種々のCARを発現する細胞の混合物を、他の薬剤、例えば、ここに記載するキナーゼ阻害剤のようなキナーゼ阻害剤と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。他の面において、本発明は、集団内の少なくとも1細胞がここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメインを有するCARを発現し、第二細胞が他の薬剤、例えば、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤を発現する細胞の集団を、他の薬剤、例えば、ここに記載するキナーゼ阻害剤のようなキナーゼ阻害剤と組み合わせて投与することを含む、方法を提供する。

20

【0535】

ナチュラルキラー細胞受容体(NKR)CAR

ある態様において、ここに記載するCAR分子はナチュラルキラー細胞受容体(NKR)の1以上の成分を含み、それによりNKR-CARを形成する。NKR成分は、次のナチュラルキラー細胞受容体のいずれか由来の膜貫通ドメイン、ヒンジドメインまたは細胞質ドメインであり得る：キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)、例えば、KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、DIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1およびKIR3DP1；天然細胞傷害性受容体(NCR)、例えば、Nkp30、Nkp44、Nkp46；免疫細胞受容体のシグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAM)ファミリー、例えば、CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAMEおよびCD2F-10；Fc受容体(FcR)、例えば、CD16およびCD64；およびLy49受容体、例えば、LY49A、LY49C。ここに記載するNKR-CAR分子は、アダプター分子または細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、DAP12と相互作用し得る。NKR要素を含むCAR分子の配置および配列の例は国際公開WO2014/145252号に記載され、その内容を引用により本明細書に包含させる。

30

【0536】

キメラ抗原受容体を制御するための戦略

40

CAR活性が制御され得る多くの方法がある。ある態様において、CAR活性が制御できる制御可能CAR(RCAR)は、CAR治療の安全性および有効性を最適化するために望ましい。例えば、例えば、二量体化ドメインに融合した、カスパーゼを使用するアポトーシスの誘導(例えば、Di et al., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3; 365(18):1673-1683参照)を、本発明のCAR治療における安全スイッチとして使用できる。他の例において、CAR発現細胞はまた誘導性カスパーゼ-9(iCaspase-9)分子も発現でき、これは、二量体化因子薬物(例えば、rimiducid(AP1903(Bellicum Pharmaceuticals)またはAP20187(Ariad)とも呼ばれる)の投与により、細胞のカスパーゼ-9活性化およびアポトーシスに至る。iCaspase-9分子は、二量体化(CID)結合ドメインの化学誘導因子を含み、これは、CID存在下で二量体化に介在する。これは

50

、CAR発現細胞の誘導的および選択的枯渇に至る。ある場合、iCaspase-9分子は、CARコードベクターと別の核酸分子によりコードされる。ある場合、iCaspase-9分子は、CARコードベクターと同じ核酸分子によりコードされる。iCaspase-9は、CAR発現細胞の何らかの毒性を避けるための安全スイッチを提供できる。例えば、Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963; およびDi Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673-83参照。

【0537】

本発明のCAR治療を制御するための代替的戦略は、例えば、抗体依存性細胞傷害(ADCC)の誘発により、例えば、CAR発現細胞を消失させることにより、CAR活性の脱活性化または遮断する小分子または抗体の利用を含む。例えば、ここに記載するCAR発現細胞は、細胞死、例えば、ADCCまたは補体誘導性細胞死を誘発できる分子により認識される抗原も発現し得る。例えば、ここに記載するCAR発現細胞はまた抗体または抗体フラグメントにより標的化され得る受容体も発現し得る。このような受容体の例は、EpCAM、VEGFR、インテグリン(例えば、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha I 3 / 4 \beta 3$ 、 $\alpha 4 \beta 7$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 αv)、TNF受容体スーパーファミリーのメンバー(例えば、TRAIL-R1、TRAIL-R2)、PDGF受容体、インターフェロン受容体、葉酸受容体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受容体、5T4、GD2、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/ペイシジン、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7およびEGFRおよびその切断バージョン(例えば、1以上の細胞外エピトープを保持するが、細胞質ドメイン内の1以上の領域を欠くバージョン)を含む。例えば、ここに記載するCAR発現細胞は、シグナル伝達能力を欠くが、ADCCを誘発できる分子、例えば、セツキシマブ(アービタックス(登録商標))により認識されるエピトープを保持する切断型上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)も発現し、その結果、セツキシマブの投与がADCCおよび続くCAR発現細胞の枯渇を誘発する(例えば、WO2011/056894号およびJonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860参照)。他の戦略は、例えば、ADCCによりCAR発現細胞の選択的枯渇をもたらす、リツキシマブに結合する、ここに記載するCAR発現細胞におけるCD32およびCD20抗原両者からの標的エピトープをあわせる、高度に小型のマーカー/自殺遺伝子の発現を含む(例えば、Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287参照)。ここに記載するCAR発現細胞を枯渇させる他の方法は、例えば、ADCC誘発により、破壊するために、成熟リンパ球、例えば、CAR発現細胞に選択的に結合し、標的とするモノクローナル抗CD52抗体であるキャンパス(登録商標)の投与を含む。他の態様において、CAR発現細胞は、CARリガンド、例えば、抗イディオタイプ抗体を使用して選択的に標的化され得る。ある態様において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えば、ADCCまたはADCC活性を引き起こし、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。他の態様において、CARリガンド、例えば、抗イディオタイプ抗体は、細胞致死を誘発する薬剤、例えば、トキシシンに結合させ、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。他の態様において、CAR発現細胞は、CARリガンド、例えば、抗イディオタイプ抗体を使用して選択的に標的化され得る。ある態様において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えば、ADCCまたはADCC活性を引き起こし、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。他の態様において、CARリガンド、例えば、抗イディオタイプ抗体は、細胞致死を誘発する薬剤、例えば、トキシシンに結合させ、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。あるいは、CAR分子自体、下記のように、活性が制御され得る、例えば、活性化または遮断され得るように配置できる。

【0538】

ある面において、RCARは、ここに記載する標準的CARの要素、例えば、抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインが、別々のポリペプチドまたはメンバーに配置された、一連の、一般に最も単純な態様において2つの、ポリペプチドを含む。ある態様において、一連のポリペプチドは、二量体化分子存在下、互いにポリペプチドを結合できる、例えば、抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインに結合できる、二量体化スイッチを含む。ある態様において、本発明のCARは、例えば、引用により本明細書に包含させる、WO2014127261号に記載のような二量体化スイッチを利用する。このような制御可能CARのさらなる記載および例示定期配置は、ここにおよび、引用により本明細書にその全体を包含させる国際公開WO2015/090229号に提供される。

10

【0539】

ある面において、RCARは、2ポリペプチドまたはメンバーを含む：1)例えば、ここに記載する一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび第一スイッチドメインを含む胞内シグナル伝達ドメイン、2)例えば、ここに記載するように、CD19を標的とする、抗原結合ドメインおよび第二スイッチドメインを含む抗原結合メンバー。場合により、RCARは、ここに記載する膜貫通ドメインを含む。ある態様において、膜貫通ドメインは、細胞内シグナル伝達メンバー上、抗原結合メンバー上または両者の上に配置できる。(特に断らない限り、RCARのメンバーまたは要素がここに記載されるものであるとき、順番は記載したとおりであり得るが、他の順番も同様に含まれる。換言すると、ある態様において、順番は本書に記載のとおりであるが、他の態様において、順番は異なり得る。例えば、膜貫通領域の一端の要素の順番は例と異なってよく、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインに対するスイッチドメインの配置は異なって、例えば逆でよい)。

20

【0540】

ある態様において、第一および第二スイッチドメインは、細胞内または細胞外二量体化スイッチを形成できる。ある態様において、二量体化スイッチは、例えば、第一および第二スイッチドメインが同一であるホモ二量体化スイッチでも、例えば、第一および第二スイッチドメインが互いに異なるヘテロ二量体化スイッチでもよい。

【0541】

ある態様において、RCARは、“多スイッチ”を含み得る。多スイッチは、ヘテロ二量体化スイッチドメインまたはホモ二量体化スイッチドメインを含み得る。多スイッチは、複数の、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10のスイッチドメインを、独立して、第一メンバー、例えば、抗原結合メンバーおよび第二メンバー、例えば、細胞内シグナル伝達メンバー上に含む。ある態様において、第一メンバーは複数の第一スイッチドメイン、例えば、FKBPベースのスイッチドメインを含んでよく、第二メンバーは複数の第二スイッチドメイン、例えば、FRBベースのスイッチドメインを含んでよい。ある態様において、第一メンバーは第一および第二スイッチドメイン、例えば、FKBPベースのスイッチドメインおよびFRBベースのスイッチドメインを含んでよく、第二メンバーは第一および第二スイッチドメイン、例えば、FKBPベースのスイッチドメインおよびFRBベースのスイッチドメインを含んでよい。

30

40

【0542】

ある態様において、細胞内シグナル伝達メンバーは、1以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび1以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。

【0543】

ある態様において、抗原結合メンバーは、1以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、1以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含み得る。ある態様において、抗原結合メンバーは、複数の、例えば、2または3の、例えば、4-1BB、CD28、CD27、ICOSおよびOX40から選択される、ここに記載する共刺激性シグナル伝達ドメインを含み、ある態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。ある態様にお

50

いて、抗原結合メンバーは、細胞外から細胞内方向で、次の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む：4-1BB-CD27；4-1BB-CD27；CD27-4-1BB；4-1BB-CD28；CD28-4-1BB；OX40-CD28；CD28-OX40；CD28-4-1BB；または4-1BB-CD28。このような態様において、細胞内結合メンバーはCD3ゼータドメインを含む。このような態様において、RCARは、(1)抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび2共刺激ドメインおよび第一スイッチドメインを含む抗原結合メンバー；および(2)膜貫通ドメインまたは膜繫留ドメインおよび少なくとも一つの一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび第二スイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0544】

ある態様は、抗原結合メンバーがCAR細胞表面に繫留されていないRCARを提供する。これは、細胞内シグナル伝達メンバーを有する細胞が、細胞を抗原結合メンバーをコードする配列で形質転換する必要なく、1以上の抗原結合ドメインと好都合に対合することを可能とする。このような態様において、RCARは1)第一スイッチドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび第一スイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；および2)抗原結合ドメインおよび第二スイッチドメインを含む抗原結合メンバーを含み、ここで、抗原結合メンバーは膜貫通ドメインまたは膜繫留ドメインを含まず、場合により細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。ある態様において、RCARは、3)第二抗原結合ドメイン、例えば、抗原結合ドメインにより結合されるのと異なる抗原に結合する第二抗原結合ドメイン；および第二スイッチドメインを含む第二抗原結合メンバーをさらに含み得る。

【0545】

またここで提供されるのは、抗原結合メンバーが二特異性活性化およびターゲティング能を含む、RCARである。この態様において、抗原結合メンバーは、複数の、例えば、2、3、4または5抗原結合ドメイン、例えば、scFvを含んでよく、ここで、各抗原結合ドメインは、標的抗原、例えば異なる抗原または同じ抗原、例えば、同じ抗原の同一または異なるエピトープに結合する。ある態様において、複数の抗原結合ドメインはタンデムであり、場合により、リンカーまたはヒンジ領域が抗原結合ドメインの各々の間に配置される。適当なリンカーおよびヒンジ領域は、ここに記載される。

【0546】

ある態様は、増殖のスイッチングが可能な配置を有するRCARを提供する。この態様において、RCARは1)場合により、膜貫通ドメインまたは膜繫留ドメイン；例えば、4-1BB、CD28、CD27、ICOSおよびOX40およびスイッチドメインから選択される1以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；および2)抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ゼータドメインを含む抗原結合メンバーを含み、ここで、抗原結合メンバーはスイッチドメインを含まないまたは細胞内シグナル伝達メンバー上のスイッチドメインと二量体化するスイッチドメインを含まない。ある態様において、抗原結合メンバーdは、共刺激性シグナル伝達ドメインを含まない。ある態様において、細胞内シグナル伝達メンバーは、ホモ二量体化スイッチからのスイッチドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達メンバーは、ヘテロ二量体化スイッチの第一スイッチドメインを含み、RCARは、ヘテロ二量体化スイッチの第二スイッチドメインを含む第二細胞内シグナル伝達メンバーを含む。このような態様において、第二細胞内シグナル伝達メンバーは、細胞内シグナル伝達メンバーと同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、二量体化スイッチは細胞内である。ある態様において、二量体化スイッチは細胞外である。

【0547】

ここに記載するRCAR配置のいずれかにおいて、第一および第二スイッチドメインは、ここに記載するようなFKBP-FRBベースのスイッチを含む。

【0548】

またここで提供されるのは、ここに記載するRCARを含む細胞である。RCARを発現するように操作したあらゆる細胞を、RCARX細胞として使用できる。ある態様において、RCARX細胞はT細胞であり、RCART細胞と称する。ある態様において、RCARX細胞はNK細胞であり、RCARN細胞と称する。

【0549】

またここで提供されるのは、RCARコード化配列を含む核酸およびベクターである。RCARの種々の要素をコードする配列は、同じ核酸分子、例えば、同じプラスミドまたはベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに配置できる。ある態様において、(i)抗原結合メンバーをコードする配列および(ii)細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列は、同じ核酸、例えば、ベクターに存在できる。対応するタンパク質の産生は、例えば、別々のプロモーターの使用によりまたはバイシストロニック転写産物(これは、単一翻訳産物の開裂または2つの別々のタンパク質産物の翻訳により2タンパク質の産生を生じ得る)の使用により、達成できる。ある態様において、開裂可能ペプチドをコードする配列、例えば、P2AまたはF2A配列を、(i)と(ii)の間に配置する。ある態様において、IRES、例えば、EMCVまたはEV71 IRESをコードする配列を、(i)と(ii)の間に配置する。これらの態様において、(i)および(ii)は、単一RNAとして転写される。ある態様において、は、(i)および(ii)が別々のmRNAとして転写されるように、第一プロモーターは(i)に操作可能に連結し、第二プロモーターは(ii)に操作可能に連結する。

【0550】

あるいは、RCARの種々の要素をコードする配列を、種々の核酸分子、例えば、異なるプラスミドまたはベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに配置できる。例えば、(i)抗原結合メンバーをコードする配列を第一核酸、例えば、第一ベクターに配置でき、(ii)細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列は、第二核酸、例えば、第二ベクターに存在できる。

【0551】

二量体化スイッチ

二量体化スイッチは非共有でも共有でもよい。非共有二量体化スイッチにおいて、二量体化分子は、スイッチドメイン間の非共有相互作用を促進する。共有二量体化スイッチにおいて、二量体化分子は、スイッチドメイン間の共有相互作用を促進する。

【0552】

ある態様において、RCARは、FKBP/FRAPまたはFKBP/FRBベースの二量体化スイッチを含む。FKBP12(FKBPまたはFK506結合タンパク質)は、天然産物免疫抑制剤、ラパマイシンのための最初の細胞内標的として働く、豊富な細胞質タンパク質である。ラパマイシンは、FKBPおよび大PI3KホモログFRAP(RAFFT、mTOR)に結合する。FRBは、FKBP-ラパマイシン複合体の結合のために十分であるFRAPの93アミノ酸部分である(Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J. & Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4947-51.)

【0553】

ある態様において、FKBP/FRAP、例えば、FKBP/FRBベースのスイッチは、二量体化分子、例えば、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログを使用できる。

【0554】

FKBPのアミノ酸配列は次のとおりである。

D V P D Y A S L G G P S S P K K K R K V S R G V Q V E T I S P G D G R T F P K R
G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G
W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V
F D V E L L K L E T S Y (配列番号79)

【0555】

ある態様において、FKBPスイッチドメインは、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、配列番号79の下線部分の存在下、FRBまたはそのフラグメントまたはアナログと結合する能力を有するFKBPのフラグメントを含み、それは

V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D
R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A
Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E T S (配列番号80)

である。

【0556】

FRBのアミノ酸配列は次のとおりである。

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER GPQTLKETSF NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGN
VKDLTQA WDLYYHVFRR ISK (配列番号81)

【0557】

ここで使用する用語“FKBP/FRAP、例えば、FKBP/FRBベースのスイッチ”は、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、RAD001の存在下、FRBまたはそのフラグメントまたはアナログと結合する能力を有するFKBPフラグメントまたはそのアナログを含み、配列番号79または80のFKBP配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有するかまたは30、25、20、15、10、5、4、3、2または1アミノ酸残基を超えて異なる第一スイッチドメイン；およびラパマイシンまたはラパログの存在下に、FRBまたはそのフラグメントまたはアナログと結合する能力を有するFRBフラグメントまたはそのアナログを含み、配列番号81のFRB配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有するかまたは30、25、20、15、10、5、4、3、2または1アミノ酸残基を超えて異なる第二スイッチドメインを含む、二量体化スイッチをいう。ある態様において、ここに記載するRCARは、配列番号79(または配列番号80)に開示するアミノ酸残基を含む1スイッチドメインおよび配列番号81に開示するアミノ酸残基を含む1スイッチドメインを含む。

【0558】

ある態様において、FKBP/FRB二量体化スイッチは、FRBベースのスイッチドメイン、例えば、修飾FRBスイッチドメイン、FKBPベースのスイッチドメインおよび二量体化分子、例えば、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、RAD001の間の複合体形成が変えられた、例えば、増強された、修飾FRBスイッチドメインを含む。ある態様において、修飾FRBスイッチドメインは、アミノ酸位置L2031、E2032、S2035、R2036、F2039、G2040、T2098、W2101、D2102、Y2105およびF2108から選択される、1以上の、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の変異を含み、ここで、野生型アミノ酸は、任意の他の天然に存在するアミノ酸への変異されている。ある態様において、変異体FRBはE2032に変異を含み、ここで、E2032はフェニルアラニン(E2032F)、メチオニン(E2032M)、アルギニン(E2032R)、バリン(E2032V)、チロシン(E2032Y)、イソロイシン(E2032I)、例えば、配列番号82またはロイシン(E2032L)、例えば、配列番号83に変異されている。ある態様において、変異体FRBはT2098に変異を含み、ここで、T2098は、フェニルアラニン(T2098F)またはロイシン(T2098L)、例えば、配列番号84に変異されている。ある態様において、変異体FRBはE2032およびT2098に変異を含み、ここで、E2032は任意のアミノ酸に変異され、T2098は任意のアミノ酸に変異され、例えば、配列番号85である。ある態様において、変異体FRBはE2032IおよびT2098L変異を含み、例えば、配列番号86である。ある態様において、変異体FRBはE2032LおよびT2098L変異を含み、例えば、配列番号87である。

【0559】

【表 1 4】

表 1 0. 二量体化分子に対する増加した親和性を示す変異体 F R B の例

F R B 変異体	アミノ酸配列	配列 番号
E2032I 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSF NQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	82
E2032L 変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSF NQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	83
T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSF NQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	84
E2032, T2098 変異体	ILWHEMWHEGL ~~X~~ EASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSF NQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDL ~~X~~ QAWDLYYHVFRRISKTS	85
E2032I, T2098 L 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSF NQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	86
E2032L, T2098 L 変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSF NQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	87

10

20

【0 5 6 0】

他の適当な二量体化スイッチは、G y r B－G y r B ベースの二量体化スイッチ、ジベレリンベースの二量体化スイッチ、タグ／バインダー二量体化スイッチおよびハロタグ／s n a p タグ二量体化スイッチを含む。ここに提供する手引きに従い、このようなスイッチおよび関連する二量体化分子は、当業者に明らかである。

【0 5 6 1】

二量体化分子

スイッチドメイン間の結合は、二量体化分子により促進される。二量体化分子存在下、スイッチドメイン間の相互作用または結合は、第一スイッチドメインに結合、例えば融合したポリペプチドと、第二スイッチドメインに結合、例えば融合したポリペプチドの間のシグナル伝達を可能にする。非律速レベルの二量体化分子存在下、ここに記載するシステムにおいて測定して、シグナル伝達は 1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2 倍、5 倍、10 倍、50 倍、100 倍増加する。

30

【0 5 6 2】

ラパマイシンおよびラパマイシンアナログ(ラパログと呼ぶこともある)、例えば、R A D 0 0 1 は、ここに記載する F K B P／F R B ベースの二量体化スイッチにおける二量体化分子として使用できる。ある態様において、二量体化分子は、ラパマイシン(シロリムス)、R A D 0 0 1 (エベロリムス)、ゾタロリムス、テムシロリムス、A P－2 3 5 7 3 (リダフォロリムス)、バイオリムスおよび A P 2 1 9 6 7 から選択できる。F K B P／F R B ベースの二量体化スイッチで使用するのに適するさらなるラパマイシンアナログは、“組み合わせ治療”なる表題のサブセクションまたは“m T O R 阻害剤”なる表題のサブセクションにさらに記載する。

40

【0 5 6 3】

スプリット C A R

ある態様において、C A R 発現細胞は、スプリット C A R を使用する。スプリット C A R アプローチは、公報 W O 2 0 1 4／0 5 5 4 4 2 号および W O 2 0 1 4／0 5 5 6 5 7 号により詳細に記載されている。簡潔には、スプリット C A R 系は第一抗原結合ドメイン

50

および共刺激ドメイン(例えば、4-1BB)を有する第一CARを発現する細胞を含み、細胞はまた第二抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3ゼータ)を有する第二CARも発現する。細胞が第一抗原に遭遇したとき、共刺激ドメインが活性化され、細胞が増殖する。細胞が第二抗原に遭遇したとき、細胞内シグナル伝達ドメインが活性化され、殺細胞活性が開始される。それゆえに、CAR発現細胞は、両抗原存在下でのみ完全活性化される。ある態様において、第一抗原結合ドメインはここに記載する癌関連抗原(例えば、CD19、CD123、CD22、CD30、CD34、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、TnAg、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、IL-11Ra、PSCA、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-ベータ、SSEA-4、CD20、葉酸受容体アルファ、ERBB2(HER2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、プロステアゼ、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、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、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、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、プロステイン、サバイビンおよびテロメラーゼ、PCTA-1/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG(TMPRSS2-ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5またはIGLL1)を認識する。

【0564】

RNAトランスフェクション

ここに開示されるのは、インビトロで転写されたRNA CARを産生する方法である。本発明はまた、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤の投与と共に使用するために、細胞に直接遺伝子導入できる、RNA構築物をコードするCARも含む。トランスフェクションに使用するためのmRNAを産生する方法は、一般に50~2000塩基長(配列番号32)の、3'および5'非翻訳配列("UTR")、5'キャップおよび/または配列内リボソーム進入部位(IRES)、発現させる核酸およびポリAテイルを含む構築物を産生するための、特異的に設計したプライマーを用いる鋳型のインビトロ転写(IVT)、続くポリA付加を含む。このように産生されたRNAは、異なる種の細胞において効率的に翻訳され得る。ある面において、鋳型は、CARの配列を含む。

【0565】

ある面において、抗本発明のCARは、メッセンジャーRNA(mRNA)によりコードされる。ある面において、本発明の抗CARをコードするmRNAを、CAR発現細胞、例えば、CART細胞またはCAR-NKの産生のために、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞に導入する。

【0566】

ある態様において、インビトロ転写RNA CARを、一過性トランスフェクションの形として細胞に導入できる。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産生鋳型を使用す

るインビトロ転写により産生される。任意の源からの目的のDNAを、適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを使用してインビトロmRNA合成のための鋳型にPCRにより直接変換できる。DNAの源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列またはDNAのあらゆる他の適切な源であり得る。インビトロ転写のための望ましい鋳型は、本発明のCARである。例えば、RNA CARのための鋳型は、抗腫瘍抗体の単一鎖可変ドメインを含む細胞外領域；ヒンジ領域、膜貫通ドメイン(例えば、CD8aの膜貫通ドメイン)；および例えば、CD3ゼータのシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む、細胞内シグナル伝達ドメインを含む、細胞質領域を含む。

【0567】

ある態様において、PCRに使用するDNAはオープンリーディングフレームを含む。DNAは、生物のゲノムからの天然に存在するDNA配列由来であり得る。ある態様において、核酸は、5'および/または3'非翻訳領域(UTR)のいくぶんかまたは全てを含み得る。核酸はエクソンおよびイントロンを含み得る。ある態様において、PCRに使用するDNAはヒト核酸配列である。他の態様において、PCRに使用するDNAは、5'および3'UTRを含むヒト核酸配列である。DNAは、あるいは、天然に存在する生物で通常発現されない人工DNA配列であり得る。人工DNA配列の例は、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成するようにライゲートされた遺伝子の部分を含むものである。ライゲートされたDNAの部分は、単一生物由来でも1を超える生物由来でもよい。

【0568】

PCRを使用して、トランスフェクションに使用するmRNAのインビトロ転写のための鋳型を産生する。PCRを実施する方法は、当分野で周知である。PCRにおいて使用するプライマーは、PCRのための鋳型として使用するDNAの領域に実質的に相補的である領域を有するように設計する。ここで使用する“実質的に相補的”は、プライマー配列の残基の大部分または全てが相補的であるまたは1以上の塩基が非相補的またはミスマッチである、ヌクレオチドの配列をいう。実質的に相補的配列は、PCRに使用するアニーリング条件下で、DNA標的とアニールまたはハイブリダイズできる。プライマーは、DNA鋳型の任意の部分と実質的に相補的であるように設計できる。例えば、プライマーは、5'および3'UTRを含む、細胞において通常転写される(オープンリーディングフレーム)核酸の部分を増幅するように設計できる。プライマーは、目的の特定のドメインをコードする核酸の部分を増幅するようにも設計できる。ある態様において、プライマーは、5'および3'UTRの全てまたは一部を含む、ヒトcDNAのコーディング領域を増幅するように設計する。PCRに有用なプライマーは、当分野で周知である合成法により産生できる。“順方向プライマー”は、増幅するDNA配列の上流であるDNA鋳型上にヌクレオチドに対して実質的に相補的であるヌクレオチドの領域を含むプライマーである。“上流”は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する5位をいうためにここで使用する。“逆方向プライマー”は、増幅するDNA配列の下流である、二本鎖DNA鋳型に対して実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーである。“下流”は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する3位をいうためにここで使用する。

【0569】

PCRに有用なあらゆるDNAポリメラーゼをここに開示する方法で使用できる。試薬およびポリメラーゼは、多数の業者から市販されている。

【0570】

安定性および/または翻訳効率を促進する能力を有する化学構造も使用し得る。RNAは、好ましくは5'および3'UTRを有する。ある態様において、5'UTRは、1〜3000ヌクレオチド長である。コーディング領域に付加する5'および3'UTR配列の長さは、UTRの異なる領域をアニールするPCRのためのプライマーの設計を含むが、これに限定されない、異なる方法により変わり得る。この試みを使用して、当業者は、転写RNAのトランスフェクション後、最適翻訳効率を達成するのに必要な5'および3

10

20

30

40

50

’ U T R 長を修飾できる。

【 0 5 7 1 】

5 ’ および 3 ’ U T R は、目的の核酸のための天然に存在する、内在性 5 ’ および 3 ’ U T R であり得る。あるいは、目的の核酸に対して内在性ではない U T R 配列を、順方向および逆方向プライマーへの U T R 配列の取り込みによりまたは鋳型の任意の他の修飾により付加できる。目的の核酸に対して内在性ではない U T R 配列の使用は、R N A の安定性および／または翻訳効率の修飾のために有用であり得る。例えば、3 ’ U T R 配列の A U リッチ要素は、m R N A の安定性を低下させることが知られる。それゆえに、3 ’ U T R を、当分野で周知である U T R の特性に基づき、転写された R N A の安定性を増加するように選択および設計できる。

10

【 0 5 7 2 】

ある態様において、5 ’ U T R は、内在性核酸の K o z a k 配列を含み得る。あるいは、目的の核酸に対して内在性ではない 5 ’ U T R を上記のように P C R により付加するとき、コンセンサス K o z a k 配列を、5 ’ U T R 配列の付加により再設計できる。K o z a k 配列は、ある R N A 転写物の翻訳効率を上げることができるが、効率的翻訳を可能とするために全 R N A で必要であるようには見えない。多くの m R N A についての K o z a k 配列に対する必要性は、当分野で知られる。他の態様において、5 ’ U T R は、R N A ゲノムが細胞で安定である R N A ウイルスの 5 ’ U T R であり得る。他の態様において、種々のヌクレオチドアナログを、m R N A のエキソヌクレアーゼ分解を妨害するために、3 ’ または 5 ’ U T R において使用できる。

20

【 0 5 7 3 】

遺伝子クローニングの必要性なしに D N A 鋳型からの R N A の合成を可能にするために、転写のプロモーターは、転写する配列の上流の D N A 鋳型に結合すべきである。R N A ポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列が順方向プライマーの 5 ’ 末端に結合されたとき、R N A ポリメラーゼプロモーターは、転写されるオープンリーディングフレームの上流の P C R 産物に取り込まれる。ある好ましい態様において、プロモーターは、本明細書の他の箇所に記載するような、T 7 ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターは、T 3 および S P 6 R N A ポリメラーゼプロモーターを含むが、これらに限定されない。T 7、T 3 および S P 6 プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列が当分野で知られる。

30

【 0 5 7 4 】

好ましい態様において、m R N A は、リボソーム結合、翻訳開始および細胞における m R N A の安定性を決定する、5 ’ 末端および 3 ’ ポリ (A) テイルの両者にキャップを有する。環状 D N A 鋳型、例えば、プラスミド D N A 上で、R N A ポリメラーゼは真核細胞における発現に適しない長いコンカテマー産物を産生する。3 ’ U T R の末端で直線化されたプラスミド D N A の転写は、転写後ポリアデニル化されても、真核トランスフェクションに有効ではない正常サイズの m R N A を生じる。

【 0 5 7 5 】

直鎖状 D N A 鋳型で、ファージ T 7 R N A ポリメラーゼは鋳型の最後の塩基を越えて転写物の 3 ’ 末端を伸長できる (Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003))。

40

【 0 5 7 6 】

D N A 鋳型に伸びるポリ A / T の組込みの慣用法は分子クローニングである。しかしながらプラスミド D N A に統合されたポリ A / T 配列は、プラスミド不安定性を生じ得て、これが、なぜ細菌細胞から得たプラスミド D N A 鋳型がしばしば欠失および他の異常で高度に汚染されているかの理由である。これによりクローニング工程が骨がおれ、時間かかるだけでなく、しばしば信頼できないものとなる。これが、クローニングを伴わないポリ A / T 3 ’ ストレッチを有する D N A 鋳型の産生を可能にする方法が非常に望まれているかの理由である。

【 0 5 7 7 】

50

転写DNA鋳型のポリA/Tセグメントは、100TテイルのようなポリTテイルを含む逆方向プライマーを使用するPCR中(配列番号35)(サイズは50~5000Tであり得る(配列番号36))またはDNAライゲーションまたはインビトロ組み換えを含むが、これらに限定されない任意の他の方法によりPCR後に産生できる。ポリ(A)テイルはまたRNAに安定性を提供し、その分解を減らす。一般に、ポリ(A)テイルの長さは、転写されたRNAの安定性と正に相関する。ある態様において、ポリ(A)テイルは、100~5000アデノシンである(配列番号37)。

【0578】

RNAのポリ(A)テイルは、大腸菌ポリAポリメラーゼ(E-PAP)のようなポリ(A)ポリメラーゼの使用により、インビトロ転写後さらに伸長できる。ある態様において、ポリ(A)テイルの100ヌクレオチドから300~400ヌクレオチドへの長さの延長(配列番号38)は、RNAの翻訳効率の約2倍増加を生じる。さらに、3'末端への異なる化学基の付加は、mRNA安定性を増加させ得る。このような結合は、修飾/人工ヌクレオチド、アダプターおよび他の化合物を含み得る。例えば、ATPアナログは、ポリ(A)ポリメラーゼを使用してポリ(A)テイルに取り込まれ得る。ATPアナログは、RNAの安定性をさらに高め得る。

【0579】

5'キャップもRNA分子に安定性を提供する。好ましい態様において、ここに開示する方法により産生されたRNAは、5'キャップを含む。5'キャップは当分野で知られ、ここに記載する技術を使用して提供される(Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005))。

【0580】

ここに開示する方法により産生されたRNAは配列内リボソーム進入部位(IRES)配列も含み得る。IRES配列は、mRNAへのキャップ非依存的リボソーム結合を開始し、翻訳開始を促進する、あらゆるウイルス、染色体または人工設計配列であり得る。糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤および界面活性剤のような細胞透過性および生存能を促進する因子を含み得る、細胞電気穿孔法に適する任意の溶質を包含できる。

【0581】

RNAを、多数の異なる方法、例えば、商業的に利用可能な方法のいずれかを使用して、標的細胞に導入でき、これは、電気穿孔法(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)またはGene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを使用するカチオン性リボソーム介在トランスフェクション、ポリマー封入、ペプチド介在トランスフェクションまたは“遺伝子銃”のような微粒子銃粒子送達系(例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)参照)を含むが、これらに限定されない。

【0582】

非ウイルス送達方法

ある面において、非ウイルス方法を使用して、ここに記載するCARをコードする核酸を細胞または組織または対象に送達できる。

【0583】

ある態様において、非ウイルス方法は、トランスポゾン(転位因子とも呼ばれる)の使用を含む。ある態様において、トランスポゾンは、ゲノムの位置にそれ自体挿入できるDNAの断片、例えば、自己複製性であり、そのコピーをゲノムに挿入することができるDNAの断片または長い核酸の外にスプライシングされ、ゲノムの他の場所に挿入されることができるDNAの断片である。例えば、トランスポゾンは、転位のための逆位反復フランキング遺伝子からなるDNA配列を含む

【0584】

トランスポゾンを使用する核酸送達法の例は、Sleeping Beautyトランス

10

20

30

40

50

ポゾン系(SBT S)およびpiggyBac(PB)トランスポゾン系を含む。例えば、Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20.1(2011):R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang et al. Mol. Ther. 16(2008):580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al. Blood. 122.21(2013):166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65; およびDing et al. Cell. 122.3(2005):473-83(これらは全て引用により本明細書に包含させる)を参照のこと。

【0585】

SBT Sは2要素を含む：1)導入遺伝子を含むトランスポゾンおよび2)トランスポサゼ酵素の源。トランスポサゼは、担体プラスミド(または他のドナーDNA)から、宿主細胞染色体/ゲノムのような標的DNAにトランスポゾンを転位できる。例えば、トランスポサゼは、担体プラスミド/ドナーDNAに結合し、トランスポゾン(導入遺伝子含有)をプラスミドの外に切り出し、宿主細胞のゲノムに入れる。例えば、Aronovich et al. supra参照。

【0586】

トランスポゾンの例は、pT2ベースのトランスポゾンを含む。例えば、その全てを引用により本明細書に包含させるGrabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47; およびSingh et al. Cancer Res. 68.8(2008): 2961-2971参照。トランスポサゼの例は、Tc1/mariner型トランスポサゼ、例えば、SB10トランスポサゼまたはSB11トランスポサゼを含む(例えば、サイトメガロウイルスプロモーターから発現できる、機能亢進トランスポサゼ)。例えば、全て引用により本明細書に包含させるAronovich et al.; Kebriaei et al.; およびGrabundzija et al.参照。

【0587】

SBT Sの使用は、導入遺伝子、ここに記載するCARをコードする核酸の効率的組込みおよび発現を可能にする。ここに提供されるのは、例えば、SBT Sのようなトランスポゾン系を使用する、ここに記載するCARを安定に発現する細胞、例えば、T細胞またはNK細胞を産生する方法である。

【0588】

ここに記載する方法によって、ある態様において、SBT S要素を含む1以上の核酸、例えば、プラスミドが細胞に送達される(例えば、T細胞またはNK細胞)。例えば、核酸は、核酸(例えば、プラスミドDNA)送達の標準法、例えば、ここに記載する方法、例えば、電気穿孔法、トランスフェクションまたはリポフェクションにより送達される。ある態様において、核酸は、導入遺伝子、例えば、ここに記載するCARをコードする核酸を含むトランスポゾンを含む。ある態様において、核酸は、導入遺伝子(例えば、ここに記載するCARをコードする核酸)を含むトランスポゾンならびにトランスポサゼ酵素をコードする核酸配列を含む。他の態様において、例えば、デュアルプラスミド系、例えば、第一プラスミドが導入遺伝子を含むトランスポゾンを含み、第二プラスミドがトランスポサゼ酵素をコードする核酸配列を含む、2核酸の系が提供される。例えば、第一および第二核酸は、宿主細胞に共送達される。

【0589】

ある態様において、ここに記載するCARを発現する細胞、例えば、T細胞またはNK細胞が、ヌクレアーゼ(例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Cas系または操作されたメガヌクレアーゼ再操作ホーミングエンドヌクレアーゼ)を使用する、SBT Sおよび遺伝子編集の遺伝子挿入の組合せを使用して産生される。

【0590】

ある態様において、非ウイルス送達方法の使用は、細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の再プログラミングおよび対照への細胞の直接点滴を可能にする。非ウイルスベクターの利点は、患者集団に見合うために必要な十分量の産生が容易かつ比較的安価であること、保存中の安定性および免疫原性の欠如を含むが、これらに限定されない。

【0591】

CARをコードする核酸構築物

本発明はまたここに記載する1以上のCAR構築物をコードする核酸分子を提供する。ある面において、核酸分子は、メッセンジャーRNA転写物として提供される。ある面において、核酸分子は、DNA構築物として提供される。

【0592】

よって、ある面において、本発明はキメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸分子に関し、ここで、CARは、ここに記載するような腫瘍マーカーと結合する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび刺激性ドメイン、例えば、共刺激性シグナル伝達ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば、ゼータ鎖を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖またはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインである。ある態様において、膜貫通ドメインは、配列番号12の配列またはそれと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、ヒンジ領域、例えば、ここに記載するヒンジにより膜貫通ドメインに結合する。ある態様において、ヒンジ領域は、配列番号4または配列番号6または配列番号8または配列番号10またはそれと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、単離核酸分子は、さらに共刺激ドメインをコードする配列を含む。ある態様において、共刺激ドメインは、OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインである。ある態様において、共刺激ドメインは4-1BB、CD27、CD28またはICOSを含む。ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号16の配列またはそれと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメインおよびCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号14の配列または配列番号16またはそれと95~99%同一性を有する配列および配列番号18の配列または配列番号20またはそれと95~99%同一性を有する配列を含み、ここで、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同じフレームにおよび単一ポリペプチド鎖として発現される。

【0593】

他の面において、本発明は、配列番号2のリーダー配列、ここに記載するようなscFvドメイン、配列番号4または配列番号6または配列番号8または配列番号10のヒンジ領域(またはそれと95~99%同一性を有する配列)、配列番号12の配列を有する膜貫通ドメイン(またはそれと95~99%同一性を有する配列)、配列番号14の配列を有す

10

20

30

40

50

る 4-1BB 共刺激ドメインまたは配列番号 16 の配列を有する CD27 共刺激ドメイン (またはそれと 95~99% 同一性を有する配列) および配列番号 18 または配列番号 20 の配列を有する CD3ゼータ刺激性ドメイン (またはそれと 95~99% 同一性を有する配列) を含む、CAR 構築物をコードする単離核酸分子に関する。

【0594】

他の面において、本発明は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび刺激性ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) 分子をコードする核酸分子に関し、ここで、該抗原結合ドメインは、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1 (CLECL1)、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、TnAg、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、IL-11Ra、PSCA、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-ベータ、SSEA-4、CD20、葉酸受容体アルファ、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、プロスターゼ、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、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、オアセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、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、MAGE-A1、レグマイン、HPV E6、E7、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、プロステイン、サバイビンおよびテロメラゼ、PCTA-1/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras 変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2-ETS 融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸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 および IGLL1 からなる群から選択される腫瘍マーカーに結合する。

【0595】

ある態様において、コードされた CAR 分子さらに共刺激ドメインをコードする配列を含む。ある態様において、共刺激ドメイン OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18) および 4-1BB (CD137) からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインである。このような共刺激性分子のさらなる例は、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76 および PA

G/Cbpを含む。ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号14の配列を含む。ある態様において、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖またはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインである。ある態様において、膜貫通ドメインは、例えば、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbpの少なくとも膜貫通領域を含み得る。

10

20

【0596】

ある態様において、膜貫通ドメインは、配列番号12の配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメインおよびゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは配列番号14の配列および配列番号18の配列を含み、ここで、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同じフレームにおよび単一ポリペプチド鎖として発現される。ある態様において、ここに記載するような抗癌関連抗原結合ドメインは、ヒンジ領域により膜貫通ドメインに結合される。ある態様において、ヒンジ領域は、配列番号4を含む。ある態様において、ヒンジ領域は、配列番号6または配列番号8または配列番号10を含む。

30

【0597】

所望の分子をコードする核酸配列は、標準技術を使用して、例えば遺伝子を発現する細胞からのライブラリーのスクリーニングにより、それを含むことが知られるベクターからの遺伝子を誘導化することによりまたはそれを含むことが知られる細胞および組織から直接単離することによるような、組み換え当分野で知られる方法を使用して得ることができる。あるいは、目的の遺伝子を、クローン化ではなく、合成により産生できる。

40

【0598】

本発明はまた本発明のDNAが挿入されているベクターも提供する。レンチウイルスのようなレトロウイルス由来のベクターは、それらが導入遺伝子の長期の安定した組み込みおよび娘細胞への伝播を可能にするため、長期遺伝子導入を達成するのに適するツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞のような非増殖細胞を形質導入できる点で、マウス白血病ウイルスのようなオンコレトロウイルス由来のベクターを超えるさらなる利点を有する。さらに低免疫原性であるという付加的利点も有する。レトロウイルスベクターは、例えば、ガンマレトロウイルスベクターでもあり得る。ガンマレトロウイルスベクターは、例えば、プロモーター、パッケージングシグナル(ψ)、プライマー結合部位(PBS)、1以上の(例えば、2)末端反復配列(LTR)および目的の導入遺伝子、例えば、CARをコードする遺伝子を含み得る。ガンマレトロウイルスベクターは、gag、polおよびenvのようなウイルス構造的遺伝子を欠き得る。ガンマレトロウイルスベクターの例は、マウス白血病ウイルス(MLV)、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)および骨髓増殖性肉腫ウイルス(MPSV)およびそれら由来のベクターを含む。他のガンマレトロウイルスベクターは、例えば、Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors:

50

Biology, Technology and Application ” Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713に記載される。

【0599】

他の態様において、所望の本発明のCARをコードする核酸を含むベクターは、アデノウイルスベクター(A5/35)である。他の態様において、CARをコードする核酸の発現は、sleeping beauty、crisper、CAS9および亜鉛フィンガーヌクレアーゼのようなトランスポゾンを使用して達成できる。引用により本明細書に包含する、下記June et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716参照。

【0600】

概説すると、CARをコードする天然または合成核酸の発現は、一般に、CARポリペプチドをコードする核酸またはその一部をプロモーターに操作可能に連結させ、当該構築物を発現ベクターに取り込むことにより達成される。ベクターは、真核生物での複製および組込みに適し得る。典型的クローニングベクターは、所望の核酸配列の発現の制御に有用な転写および翻訳ターミネーター、開始配列およびプロモーターを含む。

10

【0601】

本発明の発現構築物はまた、標準遺伝子送達プロトコルを使用する、核酸免疫化および遺伝子治療にも使用し得る。遺伝子送達のための方法が当分野で知られる。例えば、引用によりその全体を本明細書に包含させる、米国特許5,399,346号、5,580,859号、5,589,466号参照。他の態様において、本発明は、遺伝子治療ベクターを提供する。

20

【0602】

核酸は、多数のタイプのベクターにクローン化できる。例えば、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルスおよびコスミドを含むが、これらに限定されないベクターにクローン化できる。特に興味深いベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プローブ産生ベクターおよびシークエンシングベクターを含む。

【0603】

さらに、発現ベクターは、ウイルスベクターの形で細胞に提供され得る。ウイルスベクターテクノロジーは当分野で周知であり、例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NYおよび他のウイルス学および分子生物学マニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスおよびレンチウイルスを含むが、これらに限定されない。一般に、適当なベクターは、少なくとも1生物で機能的な複製起点、プロモーター配列、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位および1以上の選択可能マーカーを含む(例えば、WO01/96584号; WO01/29058号; および米国特許6,326,193号)。

30

【0604】

多数のウイルスベースの系が、哺乳動物細胞への遺伝子移入のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための簡便なプラットフォームを提供する。選択した遺伝子を、当分野で知られる技術を使用して、ベクターに挿入し、レトロウイルス粒子に包装できる。次いで、組み換えウイルスが単離され、対象の細胞にインビボまたはエクシボで送達され得る。多数のレトロウイルス系が当分野で知られる。ある態様において、アデノウイルスベクターを使用する。多数のアデノウイルスベクターが当分野で知られる。ある態様において、レンチウイルスベクターを使用する。プロモーターの例は、CMV IE遺伝子、EF-1 α 、ユビキチンCまたはホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターを含む。ある態様において、プロモーターは、PGKプロモーター、例えば、ここに記載するような切断PGKプロモーターである。

40

【0605】

さらなるプロモーター要素、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を制御する。一般に、これらは、開始部位の上流30~110bpの領域に位置するが、多数のプロモーターが、同様に開始部位の下流に機能的要素を含むことが示されている。プロモーター要素

50

間のスペースはしばしば柔軟性であり、それゆえに、要素が互いに逆になったり移動したときにプロモーター機能が保持される。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターにおいて、プロモーター要素間の空間は、活性が落ち始める前、50bp離れるまで増加し得る。プロモーターによって、個々の要素は、転写を活性化するために協調的または独立的に機能できるように見える。

【0606】

哺乳動物T細胞においてCAR導入遺伝子の発現ができるプロモーターの例は、EF1aプロモーターである。天然EF1aプロモーターは、アミノアシルtRNAのリボソームへの酵素送達を担う、伸長因子-1複合体のアルファサブユニットの発現を駆動する。EF1aプロモーターは哺乳動物発現プラスミドで広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローン化された導入遺伝子からCAR発現を駆動するのに有効であることが示されている。例えば、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464(2009)参照。ある面において、EF1aプロモーターは、配列番号1として提供する配列を含む。

【0607】

プロモーターの他の例は、最初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに操作可能に連結したあらゆるポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動できる、強い構成的プロモーター配列である。しかしながら、サルウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)末端反復配列(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターを含むが、これらに限定されない他の構成的プロモーター配列ならびにアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、伸長因子-1aプロモーター、ヘモグロビンプロモーターおよびクレアチンキナーゼプロモーターのような、しかしこれらに限定されないヒト遺伝子プロモーターも使用し得る。さらに、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定すべきではない。誘導性プロモーターも本発明の一部であるとして意図される。誘導性プロモーターの使用は、操作可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現を、発現が望まれるときに発現を活性化し、発現が望まれないときに発現を遮断することができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例は、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーターおよびテトラサイクリンプロモーターを含むが、これらに限定されない。

【0608】

プロモーターの他の例は、ホスホグリセラートキナーゼ(PGK)プロモーターである。ある態様において、切断PGKプロモーター(例えば、野生型PGKプロモーター配列と比較したとき、1以上の、例えば、1、2、5、10、100、200、300または400ヌクレオチド欠失を有するPGKプロモーター)が望ましいことがある。PGKプロモーター例のヌクレオチド配列を下に提供する。

【0609】

WT PGKプロモーター

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGACGCGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCCTTGAAGGGCTGAATCCCCGCTCGTCTTCGCAGCGGCCCCCGGGTGTTCCTATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCTTGGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCC

GACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT (配列番号96)

【0610】

切断PGKプロモーター例:

PGK100:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTG (配列番号97)

【0611】

P G K 2 0 0 :

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG (配列番号98)

【0612】

P G K 3 0 0 :

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATC
CCCG (配列番号99)

【0613】

P G K 4 0 0 :

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATC
CCCGCTCGTCTTCGACGCGGCCCCCGGGTGTTCCTATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCT
TACACGCTCTGGGTCCCAGCCG (配列番号100)

【0614】

ベクターは、例えば、分泌を促進するためのシグナル配列、ポリアデニル化シグナルおよび転写ターミネーター(例えば、ウシ成長ホルモン(BGH)遺伝子から)、エピソーム複製および原核生物における複製を可能にする要素(例えばSV40起源およびColE1または当分野で知られるその他)および/または選択を可能にする要素(例えば、アンピシリン耐性遺伝子および/またはゼオシンマーカー)も含み得る。

【0615】

CARポリペプチドまたはその一部の発現を評価するために、細胞に導入する発現ベクター遺伝子導入またはウイルスベクターによる感染が探求される細胞の集団から発現細胞から発現細胞の同定および選択を容易にするために、選択可能マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子または両者も含んでよい。他の面において、選択可能マーカーは、DNAの別の断面に担持され、共トランスフェクション法において使用される。選択可能マーカーおよびレポーター遺伝子のいずれも、宿主細胞における発現が可能であるように、適切な制御配列が隣接し得る。有用な選択可能マーカーは、例えば、neoなどの、抗生物質耐性遺伝子を含む。

【0616】

レポーター遺伝子は、恐らく遺伝子導入されている細胞を同定し、制御配列の機能性を評価するために使用される。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物または組織に存在または発現されず、発現がある容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性により顕在化されるポリペプチドをコードする、遺伝子である。レポーター遺伝子の発現を、DNAがレシピエント細胞に導入されてから適当な時間後にアッセイする。適当なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、ベーターガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼまたは緑色蛍光タンパク質遺伝子をコードする遺伝子を含み得る(例えば、Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82)。適当な発現系は周知であり、既知技術により製造できまたは商業的に入手できる。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小5'フランキング領域を有する構築物をプロモーターとして同定する。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結し、プロモーター駆動転写を調節する能力について薬剤を評価するのに使用し得る。

【0617】

ある態様において、ベクターは、2以上の核酸CARをコードする配列、例えば、ここ

に記載する第一CARおよび第二CAR、例えば、阻害性CARまたは第二抗原、例えば、ここに記載する他の癌関連抗原に特異的に結合するCAR(例えば、CD19、CD123、CD22、CD30、CD34、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、TnAg、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、IL-11Ra、PSCA、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-ベータ、SSEA-4、CD20、葉酸受容体アルファ、ERBB2(HER2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、プロスターゼ、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、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、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、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、プロステイン、サバイビンおよびテロメラゼ、PCTA-1/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG(TMPPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5またはIGLL1)を含み得る。このような態様において、CARをコードする2以上の核酸配列は、同じフレーム内の単一核分子により、かつ単一ポリペプチド鎖としてコードされる。この面において、2以上のCARは、例えば、1以上のペプチド開裂部位により分離され得る。(例えば、自己開裂部位細胞内プロテアーゼのためのまたは基質)。ペプチド開裂部位の例は次のものを含み、ここで、GSG残基は任意である。

T2A:(GSG)EGRGSLTCDGVEENPGP(配列番号101)

P2A:(GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP(配列番号102)

E2A:(GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPGP(配列番号103)

F2A:(GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(配列番号104)

【0618】

細胞に遺伝子を導入し、発現させる方法は当分野で知られる。発現ベクターの状況において、ベクターは、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母または昆虫細胞に、当分野の任意の方法により容易に導入できる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的または生物学的手段により、宿主細胞に移入される。

【0619】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、微量注入、エレクトロポレーションなどを含む。ベクターおよび/または外来性核酸を含む細胞を産生する方法は、当分野で周知である。例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY参照)。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入に好ましい方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0620】

宿主細胞に目的のポリヌクレオチドを導入するための生物学的方法は、DNAおよびRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞への遺伝子挿入に最も広く使用される方法となってきた。他の

ウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス I、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許 5,350,674 号および 5,585,362 号参照。

【0621】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための化学的手段は、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズおよび水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質ベースの系のようなコロイド分散体系を含む。インビトロおよびインビボで送達媒体として使用するための代表的コロイド系は、リポソーム(例えば、人工膜小胞)である。標的化ナノ粒子または他の適当なサブミクロンサイズの送達系を用いるポリヌクレオチドの送達のような、最新式の核酸の標的化送達の他の方法が利用可能である。

10

【0622】

非ウイルス送達系を利用する場合、代表的送達媒体はリポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞への核酸の導入のために意図される(インビトロ、エクスピボまたはインビボ)。他の面において、核酸は、脂質と結合され得る。脂質と結合した核酸は、リポソームの水性内部への被包、リポソームの脂質二重層内への分散、リポソームとオリゴヌクレオチドの両者と結合する連結分子を介するリポソームへの結合、リポソームへの封入、リポソームとの複合体化、脂質含有溶液への分散、脂質との混合、脂質との組み合わせ、脂質中の懸濁液としての包含、ミセル内への包含または複合体化または他の方法で脂質と結合する。脂質、脂質/DNA または脂質/発現ベクター結合組成物は、溶液中の何らかの特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重層構造において、ミセルとしてまたは“崩壊”構造を有して存在し得る。それらはまた単に溶液に分散され、恐らく、サイズまたは形が均一ではない凝集体を形成し得る。脂質は、天然に存在するまたは合成脂質であり得る脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質に天然に生じる脂肪滴ならびに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドのような長鎖脂肪族炭化水素を含む化合物群およびその誘導体を含む。

20

【0623】

使用に適する脂質は、商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(“DMPC”)は、Sigma, St. Louis, MO から得ることができ、リン酸ジセチル(“DCP”)はK & K Laboratories(Plainview, NY)から得ることができ；コレステロール(“Choi”)はCalbiochem-Behringから得ることができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール(“DMPG”)および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.(Birmingham, AL.)から得ることができる。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質の原液を、約-20℃で保存できる。クロロホルムを、メタノールよりも容易に揮発するために、唯一の溶媒として使用する。“リポソーム”は、封入された脂質二重層または凝集体の産生により形成される多様な単および多層状脂質媒体を包含する一般的用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部水性媒体を伴う小胞構造を有することにより特徴付けられる。多層状リポソームは、水性媒体により分離された、複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁されたときに自然に形成される。脂質要素は、閉構造形成前に自己凝集し、水および溶解した溶質を脂質二重層の間に封入する(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10)。しかしながら、通常の小胞構造と異なる構造を溶液で有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造であるかまたは単に脂質分子の不均一凝集体として存在すると考えられ得る。リポフェクタミン-核酸複合体もまた考慮される。

30

40

【0624】

外来性核酸を宿主細胞に導入するまたはそうでなければ細胞を本発明の阻害剤に曝す方法に関係なく、宿主細胞における組み換えDNA配列の存在を確認するために、多様なアッセイを行い得る。このようなアッセイは、例えば、サザンおよびノーザンブロッティング、RT-PCR および PCR のような当業者に周知の“分子生物学的”アッセイ、薬剤の同定に使用するための、例えば、免疫学的手段(ELISAs およびウェスタンブロッ

50

ト)により、特定のペプチドの存在または不在を検出するような“生化学的”アッセイまたは本発明の範囲内に入るここに記載するアッセイを含む。

【0625】

本発明は、さらにCARコード化核酸分子を含むベクターを提供する。ある面において、CARベクターは、細胞、例えば、T細胞またはNK細胞に直接形質導入できる。ある面において、ベクターは、クローニングまたは発現ベクター、例えば、1以上のプラスミド(例えば、発現プラスミド、クローニングベクター、ミニサークル、ミニベクター、二重分染色体)、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクター構築物を含むが、これらに限定されない、ベクターである。ある面において、ベクターは、哺乳動物免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)におけるCAR構築物の発現が可能である。ある面において、哺乳動物T細胞はヒトT細胞である。ある面において、哺乳動物NK細胞はヒトNK細胞である。

10

【0626】

細胞の供給源

増殖および遺伝的修飾または他の修飾の前に、細胞、例えば、T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞の供給源を、対象から得ることができる。用語“対象”は、免疫応答が惹起できる生存生物(例えば、哺乳動物)を含むことを意図する。対象の例は、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、マウス、ラットおよびそのトランスジェニック種を含む。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織および腫瘍を含む、多数の供給源から得ることができる。

20

【0627】

本開示のある面において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、FicollTM分離のような、当業者に知られるあらゆる技術を使用して、対象から採取した血液の単位から得ることができる。ある好ましい面において、個体の循環血液からの細胞をアフエレーシスにより得る。アフエレーシス産物は、一般にT細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含む、リンパ球、赤血球および血小板を含む。ある面において、アフエレーシスにより採取した細胞は血漿画分を除去するために洗浄し、場合により、細胞を続くプロセッシング過程のために適切な緩衝液または媒体に入れることができる。ある態様において、細胞を、リン酸緩衝化食塩水(PBS)で洗浄する。別の態様において、洗浄溶液はカルシウムを欠き、マグネシウムを欠いてよく、または全てではないにしても多くの二価カチオンを欠いてよい。

30

【0628】

カルシウム非存在下の初期活性化過程は、活性化の増強に至り得る。当業者には容易に認識されるように、洗浄工程は、製造業者の指示に従う、半自動化“フロースルー”遠心分離(例えば、Cobe 2991 cell processor、Baxter CytoMateまたはHaemonetics Cell Saver 5)により達成され得る。洗浄後、細胞を、例えば、無Ca、無MgPBS、PlasmaLyte Aまたは他の緩衝剤を含むまたは含まない食塩水溶液のような、多様な生体適合性緩衝液に再懸濁し得る。あるいは、アフエレーシスサンプルの望ましくない要素を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁し得る。

【0629】

本出願の方法は、5%以下、例えば2%の、ヒトAB血清を含む培養培地条件を利用でき、既知培養培地条件および組成物、例えばSmith et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement” Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31に記載のものをを用いることができることは認識される。

40

【0630】

ある面において、T細胞は、赤血球を溶解し、例えば、PERCOLLTM勾配による遠心分離または対向流遠心溶出法により単球を枯渇させることにより、末梢血リンパ球から単離する。

【0631】

50

ここに記載する方法は、例えば、ここに記載する、例えば、陰性選択技術を使用する、例えば、T制御性細胞枯渇集団、CD25⁺ 枯渇細胞である、免疫エフェクター細胞の特異的亜集団、例えば、T細胞の選択を含み得る。好ましくは、T制御性枯渇細胞の集団は30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満のCD25⁺細胞を含む。

【0632】

ある態様において、T制御性細胞、例えば、CD25⁺ T細胞を、抗CD25抗体またはそのフラグメントまたはCD25結合リガンド、IL-2を使用して集団から除去する。ある態様において、抗CD25抗体またはそのフラグメントまたはCD25結合リガンドを、基質、例えば、ビーズにコンジュゲートするかまたは他に基質、例えば、ビーズ上に被覆させる。ある態様において、抗CD25抗体またはそのフラグメントを、ここに記載の基質にコンジュゲートさせる。

10

【0633】

ある態様において、T制御性細胞、例えば、CD25⁺ T細胞を、Miltenyi TMからのCD25枯渇剤を使用して集団から除去する。ある態様において、細胞対CD25枯渇剤の比は1e7細胞対20μLまたは1e7細胞対15μLまたは1e7細胞対10μLまたは1e7細胞対5μLまたは1e7細胞対2.5μLまたは1e7細胞対1.25μLである。ある態様において、例えば、T制御性細胞、例えば、CD25⁺ 枯渇のために、5億細胞/mlを使用する。さらなる面において、6億、7億、8億または9億細胞/mlの細胞濃度を使用する。

20

【0634】

ある態様において、枯渇すべき免疫エフェクター細胞の集団は、約 6×10^9 CD25⁺ T細胞を含む。他の面において、枯渇すべき免疫エフェクター細胞の集団は、約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ (およびその間の任意の整数値) CD25⁺ T細胞を含む。ある態様において、得られたT制御性枯渇細胞集団は、 2×10^9 T制御性細胞、例えば、CD25⁺細胞またはそれ以下(例えば、 1×10^9 、 5×10^8 、 1×10^8 、 5×10^7 、 1×10^7 またはそれ以下のCD25⁺細胞)を含む。

【0635】

ある態様において、T制御性細胞、例えば、CD25⁺細胞を、例えば、チュービング162-01のような、枯渇チュービングセットと共にCliniMAC系を使用して集団から除去する。ある態様において、CliniMAC系を、例えば、DEPLETION 2.1のような、枯渇設定において動かす。

30

【0636】

特定の理論に縛られることを望まないが、アフエレーシス前またはCAR発現細胞産物の製造中の対象における免疫細胞の負のレギュレーターのレベルの減少(例えば、望まない免疫細胞、例えば、T_{REG}細胞の数の減少)は、対象の再発リスクを減らし得る。例えば、T_{REG}細胞を枯渇する方法は当分野で知られる。例えば、T_{REG}細胞を減少させる方法は、シクロホスファミド、抗GITR抗体(抗GITRここに記載する抗体)、CD25枯渇およびそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0637】

ある態様において、製造法は、CAR発現細胞製造前のT_{REG}細胞の数の減少(例えば、枯渇)を含む。例えば、製造法は、例えば、サンプル、例えば、アフエレーシスサンプルと抗GITR抗体および/または抗CD25抗体(またはそのフラグメントまたはCD25結合リガンド)を接触させ、CAR発現細胞(例えば、T細胞、NK細胞)産物の製造前にT_{REG}細胞を枯渇させることを含む。

40

【0638】

ある態様において、対象は、CAR発現細胞産物製造のための細胞採取前にT_{REG}細胞を減らす1以上の治療で前処置されており、それにより対象がCAR発現細胞処置を再び必要とするリスクを軽減する。ある態様において、ある態様において、T_{REG}細胞を低減する方法は、対象へのシクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇またはこ

50

これらの組み合わせの1以上の投与を含むが、これらに限定されない。シクロホスファミド、抗G I T R抗体、C D 2 5 枯渇またはこれらの組み合わせの1以上の投与は、C A R 発現細胞産物注入前、注入中または注入後に行い得る。

【0639】

ある態様において、対象は、C A R 発現細胞産物製造のための細胞の採取前にシクロホスファミドで前処置され、それにより対象がC A R 発現細胞処置を再発するリスクを軽減する。ある態様において、対象は、C A R 発現細胞産物製造のための細胞の採取前に抗G I T R抗体で前処置され、それにより対象がC A R 発現細胞処置を再発するリスクを軽減する。

【0640】

ある態様において、除去すべき細胞の集団は、制御性T細胞または腫瘍細胞ではなく、C A R T細胞の増殖および／または機能に他に負に影響する細胞、例えばC D 1 4、C D 1 1 b、C D 3 3、C D 1 5 または潜在的免疫抑制性細胞により発現される他のマーカーを発現する細胞である。ある態様において、このような細胞は、制御性T細胞および／または腫瘍細胞と同時にまたは該枯渇後にまたは他の順番で除去することが意図される。

【0641】

ここに記載する方法は、1を超える選択工程、例えば、1を超える枯渇工程を含み得る。陰性選択によるT細胞集団の富化は、例えば、陰性に選択される細胞に独特な表面マーカーを指向する抗体の組み合わせにより達成できる。一つの方法は、陰性に選択される細胞に存在する細胞表面マーカーを指向するモノクローナル抗体のカクテルを使用する、陰性磁気免疫付着またはフローサイトメトリーを経る細胞選別および／または選択である。例えば、陰性選択によりC D 4⁺細胞を富化するために、モノクローナル抗体カクテルはC D 1 4、C D 2 0、C D 1 1 b、C D 1 6、H L A - D R およびC D 8 に対する抗体を含み得る。

【0642】

ここに記載する方法は、さらに腫瘍抗原、例えば、C D 2 5 を含まない腫瘍抗原、例えば、C D 1 9、C D 3 0、C D 3 8、C D 1 2 3、C D 2 0、C D 1 4 またはC D 1 1 b を発現する細胞の集団からの除去を含み、それによりC A R、例えば、ここに記載するC A R の発現に適するT制御性枯渇、例えば、C D 2 5⁺枯渇および腫瘍抗原枯渇細胞の集団を提供する。ある態様において、腫瘍抗原発現細胞は、T制御性、例えば、C D 2 5⁺細胞と同時に除去される。例えば、抗C D 2 5 抗体またはそのフラグメントおよび抗腫瘍抗原抗体またはそのフラグメントを同じ基質、例えば、ビーズに結合でき、これを、細胞の除去に使用でき、または抗C D 2 5 抗体またはそのフラグメントおよび抗腫瘍抗原抗体またはそのフラグメントを別のビーズに結合でき、その混合物を細胞の除去に使用できる。他の態様において、T制御性細胞、例えば、C D 2 5⁺細胞の除去および腫瘍抗原発現細胞の除去は逐次的であり、例えば、いずれの順番で生じてもよい。

【0643】

チェックポイント阻害剤、例えば、ここに記載するチェックポイント阻害剤を発現する細胞、例えば、P D 1⁺細胞、L A G 3⁺細胞およびT I M 3⁺細胞の1以上の集団からの除去を含み、それによりT制御性枯渇、例えば、C D 2 5⁺枯渇細胞およびチェックポイント阻害剤枯渇細胞、例えば、P D 1⁺、L A G 3⁺および／またはT I M 3⁺枯渇細胞の集団を提供する方法も提供される。代表的チェックポイント阻害剤は、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A 4、T I M 3、C E A C A M (例えば、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3 および／またはC E A C A M - 5)、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7 - H 3 (C D 2 7 6)、B 7 - H 4 (V T C N 1)、H V E M (T N F R S F 1 4 またはC D 2 7 0)、K I R、A 2 a R、M H C クラス I、M H C クラス II、G A L 9、アデノシンおよびT G F R ベータを含む。ある態様において、チェックポイント阻害剤発現細胞は、T制御性、例えば、C D 2 5⁺細胞と同時に除去される。例えば、抗C D 2 5 抗体またはそのフラグメントおよび抗チェックポイント阻害剤抗体またはそのフラグメントを同じビーズに結

10

20

30

40

50

合でき、それを細胞の除去に使用でき、または抗CD25抗体またはそのフラグメントおよび抗チェックポイント阻害剤抗体またはそのフラグメントを別のビーズに結合でき、その混合物を細胞の除去に使用できる。他の態様において、T制御性細胞、例えば、CD25⁺細胞の除去およびチェックポイント阻害剤発現細胞の除去は逐次的であり、例えば、いずれ順序の順番で生じてよい。

【0644】

ここに記載する方法は、陽性選択工程を含み得る。例えば、T細胞は、DYNABEA DS(登録商標)M-450 CD3/CD28 Tのような抗CD3/抗CD28(例えば、3x28)結合ビーズと、所望のT細胞の陽性選択に十分な時間インキュベーションすることにより単離できる。ある態様において、時間は約30分である。さらなる態様において、時間は30分~36時間またはそれより長い範囲およびその間の任意の整数値である。さらなる態様において、時間は少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間または6時間である。さらに他の態様において、時間は10~24時間、例えば、24時間である。腫瘍組織または免疫不全個体から腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)を単離するような、他の細胞型と比較してT細胞が少ないあらゆる状況において、T細胞を単離するために長いインキュベーション時間が使用され得る。さらに、長いインキュベーション時間の使用は、CD8⁺ T細胞の捕獲効率を高め得る。それゆえに、単にT細胞をCD3/CD28ビーズと結合させる時間を短くするまたは長くするおよび/またはビーズ対T細胞比を増加または減少させる(さらにここに記載するとおり)ことにより、T細胞の亜集団が、培養開始時または工程中の他の時点で優先的に選択される。さらに、ビーズまたは他の表面上の抗CD3および/または抗CD28抗体比を増加または減少させることにより、T細胞の亜集団が、培養開始時または工程中の他の時点で優先的に選択される。

【0645】

ある態様において、T細胞IFN- γ 、TNF α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムBおよびパーフォリンまたは他の適切な分子、例えば、他のサイトカインの1以上を発現するT細胞集団を選択できる。細胞発現についてスクリーニングする方法は、例えば、PCT公開WO2013/126712号に記載する方法により決定できる。

【0646】

陽性または陰性選択により所望の細胞の集団を単離するために、細胞および表面(例えば、ビーズのような粒子)の濃度は変わり得る。ある面において、細胞とビーズの最大接触を確実にするために、ビーズと細胞と一緒に混合する体積を顕著に低下させる(例えば、細胞濃度を増加させる)ことが望まれ得る。例えば、ある面において、100億細胞/ml、90億/ml、80億/ml、70億/ml、60億/mlまたは50億/mlの濃度を使用する。ある面において、10億細胞/mlの濃度を使用する。さらなる面において、1億細胞/ml超を使用する。さらなる面において、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万または5000万細胞/mlの細胞濃度を使用する。さらなる面において、細胞の7500万、8000万、8500万、9000万、9500万または1億細胞/mlの濃度を使用する。さらなる面において、1億2500万または1億5000万細胞/mlの濃度を使用できる。

【0647】

高濃度を使用して、細胞収率、細胞活性化および細胞増殖を増加できる。さらに、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞のような目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞のまたは多くの腫瘍細胞が存在するサンプル(例えば、白血病性血液、腫瘍組織など)からのより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞集団は、治療的価値を有しており、取得することが望ましい。例えば、高濃度細胞の使用は、通常CD28発現が弱いCD8⁺ T細胞のより効率的な選択を可能にする。

【0648】

関連する面において、低濃度の細胞を使用することが望ましいことがある。T細胞と表面(例えば、ビーズのような粒子)の混合物を顕著に希釈することにより、粒子と細胞の相

10

20

30

40

50

相互作用が最小化される。これは、粒子に結合する所望の抗原を高量で発現する細胞で選択する。例えば、 $CD4^+$ T細胞は、高レベルの $CD28$ を発現し、希釈濃度で $CD8^+$ T細胞より効率的に捕獲される。ある面において、使用する細胞の濃度は $5 \times 10^6 / \text{ml}$ である。他の面において、使用する濃度は約 $1 \times 10^5 / \text{ml} \sim 1 \times 10^6 / \text{ml}$ およびその間の任意の整数値であり得る。

【0649】

他の面において、細胞を、種々の長さの時間、種々の速度で、 $2 \sim 10^\circ\text{C}$ または室温でローテータでインキュベートし得る。

【0650】

刺激のためのT細胞はまた洗浄工程後凍結させ得る。理論に縛られることを望まないが、凍結と続く解凍工程は、細胞集団から顆粒球およびある程度単球を除去することにより、より均一な産物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄工程後、細胞を凍結溶液に懸濁し得る。多くの凍結溶液およびパラメータが当分野で知られ、この状況において有用であるが、ある方法は、 20% DMSOおよび 8% ヒト血清アルブミンを含むPBSまたは 10% Dextran 40および 5% デキストロース、 20% ヒト血清アルブミンおよび 7.5% DMSOまたは 31.25% Plasmalyte-A、 31.25% デキストロース 5% 、 0.45% NaCl、 10% Dextran 40および 5% デキストロース、 20% ヒト血清アルブミンおよび 7.5% DMSOを含む培養培地または例えば、HespanおよびPlasmaLyte Aを含む他の適当な細胞凍結媒体を使用し、次いで細胞を $1^\circ / \text{分}$ の速度で -80°C に凍結し、気相の液体窒素貯蔵タンクに保存する制御凍結の他の方法ならびに直ぐに -20°C または液体窒素の非制御凍結も使用できる。。。

【0651】

ある面において、凍結保存細胞をここに記載するように解凍し、洗浄し、本発明の方法を使用する活性化の前に室温で1時間休息させる。

【0652】

本発明の文脈においてまた企図されるのは、ここに記載する増殖させた細胞が必要である時の前の時点での、対象からの血液サンプルまたはアフエーシス産物の採取である。したがって、増殖する細胞の供給源を、必要な任意の時点で採取でき、T細胞のような所望の細胞を、ここに記載するような免疫エフェクター細胞治療により利益を得るあらゆる疾患または状態のための免疫エフェクター細胞治療へのその後の使用のために単離および凍結できる。ある面において、血液サンプルまたはアフエーシスを、一般に健常対象から採取する。ある面において、血液サンプルまたはアフエーシスを、一般に、疾患を発症するリスクにあるが、まだ疾患を発症していない健常対象から採取し、目的の細胞をその後の使用のために単離および凍結する。ある面において、T細胞を、その後の時点で増殖、凍結および使用し得る。ある面において、サンプルを、ここに記載する特定の疾患の診断の直後に、しかし、何らかの処置前に患者から採取する。さらなる面において、細胞を、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法剤、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、ミコフェノレートおよびFK506のような免疫抑制剤、抗体またはキャンパス、抗CD3抗体、シトキサン、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および照射のような他の免疫除去剤のような、手段での処置を含むが、これらに限定されないあらゆる関連する処置モダリティの前に、対象からの血液サンプルまたはアフエーシスから単離する。

【0653】

本発明のさらなる面において、T細胞を、対象に機能的T細胞を残す処置の後、患者から直接得る。ある癌処置、特に免疫系を損傷させる薬物での処置後、処置の直後、患者が通常該処置から回復するまでの間、得られるT細胞の品質がエキスピボで増殖する能力について最適であるまたは改善されていることが観察されている。同様に、ここに記載する方法を使用するエキスピボ操作後、これらの細胞は、生着およびインビボ増殖増強につい

10

20

30

40

50

て好ましい状態であり得る。それゆえに、本発明の状況において、T細胞、樹状細胞または造血細胞系譜の他の細胞を含む血液細胞をこの回復期に採取することが企図される。さらに、ある面において、可動化(例えば、GM-CSFでの可動化)およびコンディショニングレジメンを使用して、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生および／または増殖に好都合である条件を、特に、治療後の定められた時間枠中に、対象に形成できる。細胞型の例には、T細胞、B細胞、樹状細胞および免疫系の他の細胞を含む。

【0654】

ある態様において、免疫エフェクターCAR分子を発現する細胞、例えば、ここに記載するCAR分子は、低い、免疫増強用量のmTOR阻害剤を受けた対象から得る。ある態様において、CARを発現するように操作される免疫エフェクター細胞の集団、例えば、T細胞を、対象または対象から採取したPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベルまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比が少なくとも一過性に増加するように、低い、免疫増強用量のmTOR阻害剤の投薬から十分な時間後または十分な用量の後に、採取する。

10

【0655】

他の態様において、CARを発現するように操作されているまたは操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の集団を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の数を増やすまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比を増やす量のmTOR阻害剤と接触させることにより、エクスピボで処理できる。

20

【0656】

ある態様において、T細胞集団は、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)欠損である。DGK欠損細胞は、DGK RNAまたはタンパク質を発現しないかまたはDGK活性が低下したまたは阻害された細胞である。DGK欠損細胞は、DGK発現を低減または阻止するための遺伝的方法、例えば、RNA干渉剤、例えば、siRNA、shRNA、miRNAの投与により産生できる。あるいは、DGK欠損細胞は、ここに記載するDGK阻害剤での処置により産生できる。

【0657】

ある態様において、T細胞集団は、イカロス欠損である。イカロス欠損細胞は、イカロス RNAまたはタンパク質を発現しないかまたはイカロス活性が低下したまたは阻害された細胞を含み、イカロス欠損細胞は、イカロス発現を低減または阻止するための遺伝的方法、例えば、RNA干渉剤、例えば、siRNA、shRNA、miRNAの投与により産生できる。あるいは、イカロス欠損細胞は、イカロス阻害剤、例えば、レナリドマイドでの処置により産生できる。

30

【0658】

ある態様において、T細胞集団は、DGK欠損およびイカロス欠損であり、例えば、DGKおよびイカロスを発現せずまたはDGKおよびイカロス活性が低下または阻害されている。このようなDGKおよびイカロス欠損細胞は、ここに記載する方法のいずれかにより産生できる。

【0659】

ある態様において、NK細胞を対象から得る。他の態様において、NK細胞は、NK細胞株、例えば、NK-92細胞株(Conkwest)である。

40

【0660】

ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、対象に低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤投与後に対象から得るまたは採取する。

【0661】

ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、PD1陰性免疫エフェクター、例えば、T細胞数増加後またはPD1陰性免疫エフェクター、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター、例えば、T細胞比増加が生じた後に、回収する。

50

【0662】

ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、ナイーブT細胞の数の増加が生じた後に回収する。

【0663】

ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、次の1以上が生じた後に回収する。

1以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；

例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；または次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加したCD62L^高、増加したCD127^高、増加したCD27⁺、減少したKLRG1および増加したBCL2。

10

【0664】

増加または減少は一過性であり得る。増加または減少は、標準、例えば、未処置対象との比較であり得る。

【0665】

ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、mTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤と、エキスピボで接触させる(対象またはドナーから除去した後かつ対象への導入前)。

【0666】

20

ある態様において、接触は、PD1陰性免疫エフェクター、例えば、T細胞数増加またはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞/PD1陽性免疫エフェクター、例えば、T細胞比増加がもたらされるレベルである。

【0667】

ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、ナイーブT細胞の数の増加をもたらすレベルで、エキスピボ(対象またはドナーから除去した後かつ対象への導入前)でmTOR阻害剤と接触させる。

【0668】

ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、次の1以上をもたらすレベルで、エキスピボ(対象またはドナーから除去した後かつ対象への導入前)でmTOR阻害剤と接触させる。

30

1以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；

例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；または次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加したCD62L^高、増加したCD127^高、増加したCD27⁺、減少したKLRG1および増加したBCL2。

【0669】

増加または減少は一過性であり得る。増加または減少は、標準、例えば、未処置対象との比較であり得る。

40

【0670】

ある態様において、T細胞の製造を、PD1陰性免疫エフェクター、例えば、T細胞数増加またはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞/PD1陽性免疫エフェクター、例えば、T細胞比増加のレベルについて評価する。

【0671】

ある態様において、T細胞の製造を、ナイーブT細胞数増加のレベルについて評価する。ある態様において、T細胞の製造を、次の1以上について評価する。

1以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；

例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；または

50

次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加したCD62L^高、増加したCD127^高、増加したCD27⁺、減少したKLRG1および増加したBCL2。

【0672】

増加または減少は一過性であり得る。増加または減少は、標準、例えば、未処置対象との比較であり得る。

【0673】

同種異系CAR

ここに記載するある態様において、免疫エフェクター細胞は、同種免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞であり得る。例えば、細胞は、同種T細胞、例えば、機能的T細胞受容体(TCR)および／またはヒト白血球抗原(HLA)、例えば、HLAクラスIおよび／またはHLAクラスIIの発現を欠く同種T細胞である。

【0674】

機能的TCRを欠くT細胞は、例えば、その表面に何ら機能的TCRを発現しないように操作され、機能的TCRを含む1以上のサブユニットを発現しないように操作され(例えば、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、TCRデルタ、TCRイプシロンおよび／またはTCRゼータの発現がない(または発現の減少を示す)ように操作される)またはその表面に微少の機能的TCRを産生するように操作され得る。あるいは、T細胞は、例えば、TCRのサブユニットの1以上の変異したまたは切断型の発現により、実質的に障害されたTCRを発現する。用語“実質的に障害されたTCR”は、このTCRが、宿主で有害な免疫反応を惹起しないことを意味する。

【0675】

ここに記載するT細胞は、例えば、その表面に機能的HLAを発現しないように操作され得る。例えば、ここに記載するT細胞は、細胞表面発現HLA、例えば、HLAクラスIおよび／またはHLAクラスIIが下方制御されるように操作され得る。ある態様において、HLAの下方制御は、ベーター2ミクログロブリン(B2M)の発現の減少または排除を伴い得る。

【0676】

ある態様において、T細胞は、機能的TCRおよび機能的HLA、例えば、HLAクラスIおよび／またはHLAクラスIIを欠き得る。

【0677】

機能的TCRおよび／またはHLAの発現を欠く修飾T細胞は、TCRまたはHLAの1以上のサブユニットのノックアウトまたはノックダウンを含む、任意の適当な手段により得ることができる。例えば、T細胞は、siRNA、shRNA、群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)または亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を使用して、TCRおよび／またはHLAのノックダウンを含み得る。

【0678】

ある態様において、同種細胞は、阻害分子を発現しないまたは阻害分子を低レベルで発現する細胞、例えば、ここに記載するいずれかの方法により操作された細胞である。例えば、細胞は、例えば、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を低下できる、阻害分子を発現しないまたは阻害分子を低レベルで発現する細胞であり得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータを含む。DNA、RNAまたはタンパク質レベルでの阻害による、阻害分子の阻害はCAR発現細胞性能を最適化できる。ある態様において、例えば、ここに記載する、阻害性核酸、例えば、阻害性核酸、例えば、dsRNA、例

10

20

30

40

50

えば、s i R N A または s h R N A、群生性等間隔短回文反復配列(C R I S P R)、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(T A L E N)または亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(Z F N)を使用できる。

【0679】

T C R または H L A を阻害するための s i R N A および s h R N A

ある態様において、T C R 発現および／または H L A 発現を、T 細胞における T C R および／または H L A および／またはここに記載する阻害分子(例えば、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A 4、T I M 3、C E A C A M(例えば、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3 および／または C E A C A M - 5)、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7 - H 3 (C D 2 7 6)、B 7 - H 4 (V T C N 1)、H V E M (T N F R S F 1 4 または C D 2 7 0)、K I R、A 2 a R、M H C クラス I、M H C クラス II、G A L 9、アデノシンおよび T G F R ベータ)をコードする核酸を標的とする s i R N A または s h R N A を使用して、阻害できる。

【0680】

T 細胞における s i R N A および s h R N A の発現は、例えば、レンチウイルス発現系のような、任意の慣用の発現系を使用して達成できる。

【0681】

T C R の要素の発現を下方制御する代表的 s h R N A は、例えば、米国公開 2 0 1 2 / 0 3 2 1 6 6 7 号に開示されている。H L A クラス I および／または H L A クラス II 遺伝子の発現を下方制御する代表的 s i R N A および s h R N A は、例えば、米国公開 U S 2 0 0 7 / 0 0 3 6 7 7 3 号に開示されている。

【0682】

T C R または H L A を阻害するための C R I S P R

ここで使用する“C R I S P R”または“T C R および／または H L A に対する C R I S P R”または“T C R および／または H L A を阻害するための C R I S P R”は、一連の群生性等間隔短回文反復配列またはこのような一連の反復を含む系をいう。ここで使用する“C a s”は、C R I S P R 関連タンパク質をいう。“C R I S P R / C a s”系は、T C R および／または H L 遺伝子および／またはここに記載する阻害分子(例えば、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A 4、T I M 3、C E A C A M(例えば、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3 および／または C E A C A M - 5)、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7 - H 3 (C D 2 7 6)、B 7 - H 4 (V T C N 1)、H V E M (T N F R S F 1 4 または C D 2 7 0)、K I R、A 2 a R、M H C クラス I、M H C クラス II、G A L 9、アデノシンおよび T G F R ベータ)の発現抑制または変異に使用できる、C R I S P R および C a s 由来の系をいう。

【0683】

天然に存在する C R I S P R / C a s 系は、配列決定された真正細菌ゲノムの約 4 0 % および配列決定された古細菌の 9 0 % に見られる。Grissa et al. (2007) BMC Bioinformatics 8: 172。この系は、プラスミドおよびファージのような外来遺伝的要素に対する抵抗性を付与する 1 種の原核生物免疫系であり、後天性免疫の形態を提供する。Barrangou et al. (2007) Science 315: 1709-1712; Marragini et al. (2008) Science 322: 1843-1845。

【0684】

C R I S P R / C a s 系は、マウスまたは霊長類のような真核生物における遺伝子エディティング(特定の遺伝子のサイレンシング、増強または変更)に使用するために修飾されている。Wiedenheft et al. (2012) Nature 482: 331-8。これは、真核細胞に、特別に設計した C R I S P R および 1 以上の適切な C a s を含むプラスミドを導入することにより達成される。

【0685】

10

20

30

40

50

C R I S P R座位と呼ばれることもあるC R I S P R配列は、交互の反復およびスペーサーを含む。天然に存在するC R I S P Rにおいて、スペーサーは、通常細菌に対して外来であるプラスミドまたはファージ配列のような配列を含み、T C Rおよび／またはH L A C R I S P R／C a s系において、スペーサーはT C RまたはH L A遺伝子配列に由来する。

【0686】

C R I S P R座位からのR N Aは構成的に発現され、C a sタンパク質により小R N Aに加工される。これらは、反復配列が隣接したスペーサーを含む。R N Aは、他のC a sタンパク質を、R N AまたはD N Aレベルで外来性遺伝的要素に対して発現抑制するように導く。Horvath et al. (2010) Science 327: 167-170; Makarova et al. (2006) Biology Direct 1: 7。スペーサーは、それゆえに、s i R N Aに類似して、R N A分子の鋳型として働く。Pennisi (2013) Science 341: 833-836。 10

【0687】

多くの異なるタイプの細菌で自然に生じるように、C R I S P Rの正確な配置および構造、C a s遺伝子の機能および数およびそれらの産物は種毎にいくぶん異なる。Haft et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1: e60; Kunin et al. (2007) Genome Biol. 8: R61; Mojica et al. (2005) J. Mol. Evol. 60: 174-182; Bolotin et al. (2005) Microbiol. 151: 2551-2561; Pourcel et al. (2005) Microbiol. 151: 653-663; and Stern et al. (2010) Trends. Genet. 28: 335-340。例えば、C s e (C a sサブタイプ、大腸菌)タンパク質(例えば、C a s A)は、機能的複合体、C a s c a d eを形成し、これは、C R I S P R R N A転写物を、C a s c a d eが保持するスペーサー反復単位に加工する。Brouns et al. (2008) Science 321: 960-964。他の原核生物において、C a s 6は、C R I S P R転写物を加工する。大腸菌におけるC R I S P Rベースのファージ不活性化はC a s c a d eおよびC a s 3を必要とするが、C a s 1またはC a s 2を必要としない。パイロコッカス・フリオサスおよび他の原核生物におけるC m r (C a s R A M Pモジュール)タンパク質は、小C R I S P R R N Aと機能的複合体を形成し、これは相補的標的R N Aを認識し、開裂する。より単純なC R I S P R系は、二重らせんの各鎖のための2活性切断部位を有するヌクレアーゼであるタンパク質C a s 9を頼る。C a s 9と修飾C R I S P R座位R N Aの組み合わせを、遺伝子エディティングのための系に使用できる。Pennisi (2013) Science 341: 833-836。 20 30

【0688】

C R I S P R／C a s系を使用して、T C Rおよび／またはH L A遺伝子を編集でき(塩基対の付加または欠失)または未成熟終止を導入でき、これは、そうしてT C Rおよび／またはH L Aの発現を減少させる。あるいはC R I S P R／C a s系を、R N A干渉のように使用し、T C Rおよび／またはH L A遺伝子を可逆性形式でオフにできる。哺乳動物細胞において、例えば、R N Aは、C a sタンパク質をT C Rおよび／またはH L Aプロモーターに導くことができ、R N Aポリメラーゼを立体的に遮断する。

【0689】

当分野で知られるテクノロジー、例えば、米国公開20140068797号およびCong (2013) Science 339: 819-823に記載のものを使用して、T C Rおよび／またはH L Aを阻害する人工C R I S P R／C a s系を産生できる。例えば、Tsai (2014) Nature Biotechnol., 32:6 569-576、米国特許8,871,445号; 8,865,406号; 8,795,965号; 8,771,945号; および8,697,359号に記載されるもののよう 40

【0690】

T C Rおよび／またはH L Aを阻害するためのT A L E N

“T A L E N”または“H L Aおよび／またはT C Rに対するT A L E N”または“H L Aおよび／またはT C Rを阻害するためのT A L E N”は、H L Aおよび／またはT C R遺伝子および／またはここに記載する阻害分子(例えば、P D 1、P D - L 1、P D - 50

L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータ)の編集に使用できる人工ヌクレアーゼである、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼをいう。

【0691】

TALLENは、TALエフェクターDNA結合ドメインとDNA開裂ドメインを融合することにより人工的に産生される。転写アクティベーター様効果(TALE)は、HLAまたはTCR遺伝子の部分を含む、任意の所望のDNA配列に結合するように操作できる。操作されたTALEとDNA開裂ドメインを合わせることで、HLAまたはTCR配列を含む、任意の所望のDNA配列に特異的な、制限酵素を産生できる。次いで、これらを細胞に導入でき、そこで、それらはゲノムエディティングのために使用され得る。Boch (2011) Nature Biotech. 29: 135-6; およびBoch et al. (2009) Science 326: 1509-12; Moscou et al. (2009) Science 326: 3501。

10

【0692】

TALEは、ザントモナス細菌により分泌されるタンパク質である。DNA結合ドメインは、12番目および13番目のアミノ酸以外、反復した、高度に保存的33~34アミノ酸配列を含む。これらの2箇所は高度に可変であり、特定のヌクレオチド認識と強い相関を示す。それらは、それゆえに、所望のDNA配列と結合するように操作され得る。

20

【0693】

TALLENを産生するために、TALEタンパク質を、野生型または変異FokIエンドヌクレアーゼであるヌクレアーゼ(N)と融合する。TALLENにおいて使用するために、FokIについていくつかの変異が行われており、これらは、例えば、開裂特異性または活性の改善を含む。Cermak et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39: e82; Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011) Nature Biotech. 29: 731-734; Wood et al. (2011) Science 333: 307; Doyon et al. (2010) Nature Methods 8: 74-79; Szczepek et al. (2007) Nature Biotech. 25: 786-793; およびGuo et al. (2010) J. Mol. Biol. 200: 96。

30

【0694】

FokIドメインは、二量体として機能し、適切な配向および間隔を有する標的ゲノムにおける部位のための独特なDNA結合ドメインを有する2つの構築物を必要とする。TALE DNA結合ドメインとFokI開裂ドメインの間のアミノ酸残基数および2の個々のTALLEN結合部位の間の塩基数の両者が、高レベルの活性を達成するために重要なパラメータであると考えられる。Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8。

【0695】

HLAまたはTCR TALLENを細胞内で使用して、二重鎖切断(DSB)を産生できる。変異は、修復機構が切断を非相同末端結合により不適切に修復するならば、切断部位に導入できる。例えば、不適切な修復は、フレームシフト変異を導入し得る。あるいは、外来DNAを、TALLENと共に細胞に導入でき、外来DNAの配列および染色体配列により、この方法はHLAまたはTCR遺伝子における欠損の補正またはwt HLAまたはTCR遺伝子におけるこのような欠損の導入に使用でき、そうして、HLAまたはTCRの発現を減少させる。

40

【0696】

HLAまたはTCRにおける配列に特異的なTALLENは、モジュラー要素を使用する多様なスキームを含む、当分野で知られる任意の方法を使用して構築できる。Zhang et al. (2011) Nature Biotech. 29: 149-53; Geibler et al. (2011) PLoS ONE 6: e19509。

【0697】

HLAおよび／またはTCRを阻害するための亜鉛フィンガーヌクレアーゼ

50

“ZFN”または“亜鉛フィンガーヌクレアーゼ”または“HLAおよび／またはTCRに対するZFN”または“HLAおよび／またはTCRを阻害するためのZFN”は、HLAおよび／またはTCR遺伝子および／またはここに記載する阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFβベータ)の編集に使用できる人工ヌクレアーゼである、亜鉛フィンガーヌクレアーゼをいう。

10

【0698】

TALLENと同様、ZFNは、DNA結合ドメインに融合したFokIヌクレアーゼドメイン(またはその誘導体)を含む。ZFNの場合、DNA結合ドメインは、1以上の亜鉛フィンガーを含む。Carroll et al. (2011) Genetics Society of America 188: 773-782; およびKim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1156-1160。

【0699】

亜鉛フィンガーは、1以上の亜鉛イオンにより安定化される小タンパク質構造モチーフである。亜鉛フィンガーは、例えば、Cys2His2を含むことができ、約3bp配列を認識できる。既知特異性の多様な亜鉛フィンガーを合わせて、約6bp、9bp、12bp、15bpまたは18bp配列を認識する多フィンガーポリペプチドを産生できる。ファージディスプレイ、酵母ワンハイブリッド系、細菌ワンハイブリッドおよびツーハイブリッド系および哺乳動物細胞を含む、特異的配列を認識する亜鉛フィンガー(およびそれらの組み合わせ)を産生するための多様な選択およびモジュラーアセンブリー技術が利用可能である。

20

【0700】

TALLENと同様、ZFNは、DNAを開裂するために二量体化しなければならない。それゆえに、ZFNの対が、非パリンドロームDNA部位を標的とすることが必要である。2の々のZFNは、そのヌクレアーゼが適切に離れて、DNAの逆の鎖に結合しなければならない。Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10570-5。

【0701】

またTALLENと同様、ZFNは、DNAに二重鎖切断を創製でき、これは、不適切に修復されたならばフレームシフト変異を創製でき、細胞におけるHLAおよび／またはTCRの発現および量の減少に至る。ZFNはまた、HLAまたはTCR遺伝子における変異のために相同組換えと使用もできる。

30

【0702】

HLAおよび／またはTCRにおける配列に特異的なZFNは、当分野で知られる任意の方法を使用して構築できる。例えば、Provani (2011) Nature Med. 18: 807-815; Torikai (2013) Blood 122: 1341-1349; Cathomen et al. (2008) Mol. Ther. 16: 1200-7; Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400: 96; 米国特許公開2011/0158957号; および米国特許公開2012/0060230号参照。

40

【0703】

テロメラーゼ発現

何らかの特定の理論に縛られることを望まないが、ある態様において、治療的T細胞は、T細胞における短縮されたテロメアのために、患者における残留性が短く、したがって、テロメラーゼ遺伝子を用いるトランスフェクションは、T細胞のテロメアを延長し、患者におけるT細胞の残留性を改善し得る。Carl June, “Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic”, Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007)参照。それゆえに、ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞、異所性にテロメラーゼサブユニットを、例えば、テロメラーゼの触媒的サブユニット、例えば、TERT、例えば、hTERT発現する。ある面において、本開示は、細胞とテロメラーゼ

50

サブユニット、例えば、テロメラーゼの触媒的サブユニット、例えば、T E R T、例えば、h T E R Tをコードする核酸を接触させることを含む、C A R発現細胞を産生する方法を提供する。細胞を、C A Rをコードする構築物と接触させる前に、同時にまたは後に核酸と接触させ得る。

【0704】

ある面において、本開示は、免疫エフェクター細胞の集団(例えば、T細胞またはNK細胞)を製造する方法に関する。ある態様において、本方法は、免疫エフェクター細胞の集団(例えば、T細胞またはNK細胞)を提供し、免疫エフェクター細胞の集団とC A Rをコードする核酸を接触させ、そして、免疫エフェクター細胞の集団とテロメラーゼサブユニット、例えば、h T E R Tをコードする核酸を、C A Rおよびテロメラーゼ発現を可能とする条件下に接触させることを含む。

10

【0705】

ある態様において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸はD N Aである。ある態様において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、テロメラーゼサブユニットの発現を駆動できるプロモーターを含む。

【0706】

ある態様において、h T E R Tは、GenBank Protein ID AAC51724.1のアミノ酸配列を有し(Meyerson et al., “hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization” Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795)、次のとおりである。

20

MPRAPRCRAVRSLRSHYREVLPLATFVRRRLGPGQWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLEL
VARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFV
LVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGGSASRSLPLPKRPRR
GAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAHPSTSRPPRPWDTP
CPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNH
AQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRLRVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGS
RHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRGCALRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSF
FYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALTSRLRFIPKPDGLRPVNMDDYVV
GARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTI
PQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNE
ASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHA
KTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKRTVNVFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTF
NRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISTDA
SLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAAN
PALPSDFKTILD(配列番号88)

30

【0707】

ある態様において、h T E R Tは、配列番号88の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一の配列を有する。ある態様において、h T E R Tは、配列番号88の配列を有する。ある態様において、h T E R Tは、N末端、C末端または両方に欠失(例えば、5、10、15、20または30アミノ酸を超えない)を含む。ある態様において、h T E R Tは、N末端、C末端または両方にトランスジェニックアミノ酸配列(例えば、5、10、15、20または30アミノ酸を超えない)を含む。

40

【0708】

ある態様において、h T E R Tは、GenBank Accession No. AF018167の核酸配列によりコードされる(Meyerson et al., “hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization” Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795)。

1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc
61 cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct cctgtctgcg cagccactac cgcgaggtgc

50

121	tgccgctggc	cacgttcgtg	cggcgccctgg	ggccccaggg	ctggcggtg	gtgcagcgcg	
181	gggacccggc	ggctttccgc	gcgctgggtg	cccagtgcc	ggtgtgcgtg	ccctgggacg	
241	cacggccgcc	ccccgccgc	ccctccttcc	gccaggtgtc	ctgcctgaag	gagctggtgg	
301	cccagatgct	gcagaggctg	tgcgagcgcg	gcgcgaagaa	cgtgctggcc	ttcggcttcg	
361	cgctgctgga	cggggcccgc	gggggcccc	ccgaggcctt	caccaccagc	gtgcgcagct	
421	acctgcccc	cacggtgacc	gacgcactgc	gggggagcgg	ggcgtggggg	ctgctgttgc	
481	gccgcgtggg	cgacgacgtg	ctggttcacc	tgttggcacg	ctgcgcgtc	tttgtgtggtg	
541	tggctcccag	ctgcgcctac	caggtgtgcg	ggccgccgct	gtaccagctc	ggcgtgccca	
601	ctcaggcccc	gccccgccca	cacgctagt	gaccccgaag	gcgtctggga	tgcgaacggg	
661	cctggaacca	tagcgtcagg	gaggccgggg	tccccctggg	cctgccagcc	ccgggtgcga	10
721	ggaggcgcg	gggcagtgcc	agccgaagtc	tgccgttgcc	caagaggccc	aggcgtggcg	
781	ctgcccctga	gccggagcgg	acgcccgttg	ggcaggggtc	ctgggcccac	ccgggcagga	
841	cgctgggacc	gagtgaccgt	ggtttctgtg	tgggtgcacc	tgccagaccc	gccgaagaag	
901	ccacctcttt	ggagggtg	ctctctggca	cgcgccactc	ccacccatcc	gtgggcccgc	
961	agcaccacgc	gggcccccca	tccacatcgc	ggccaccacg	tccctgggac	acgccttgtc	
1021	ccccggtgta	cgccgagacc	aagcacttcc	tctactcctc	aggcgacaag	gagcagctgc	
1081	ggccctcctt	cctactcagc	tctctgagge	ccagcctgac	tggcgctcgg	aggctcgtgg	
1141	agaccatctt	tctgggttcc	aggccctgga	tgccaggggac	tccccgcagg	ttgccccgcc	
1201	tgccccagcg	ctactggcaa	atgcggcccc	tgtttctgga	gctgcttggg	aaccacgcgc	
1261	agtgccctta	cggggtgctc	ctcaagacgc	actgcccgtc	gcgagctg	gtcaccaccag	20
1321	cagccggtgt	ctgtgcccgg	gagaagcccc	agggtctgt	ggcggcccc	gaggaggagg	
1381	acacagaccc	ccgtcgccctg	gtgcagctgc	tccgccagca	cagcagcccc	tggcaggtgt	
1441	acggcttcgt	gcgggcctgc	ctgcgccggc	tgggtccccc	aggcctctgg	ggctccaggc	
1501	acaacgaacg	ccgttccctc	aggaacacca	agaagtcat	ctccctgggg	aagcatgccca	
1561	agctctcgct	gcaggagctg	acgtggaaga	tgagcgtg	gggctgcgct	tggctgcgca	
1621	ggagcccagg	ggttggctgt	gttccggccg	cagagcaccg	tctgcgtgag	gagatcctgg	
1681	ccaagtccct	gcactggctg	atgagtgtgt	acgtcgtcga	gctgctcagg	tctttctttt	
1741	atgtcacgga	gaccacgttt	caaaagaaca	ggctcttttt	ctaccggaag	agtgtctgga	
1801	gcaagtgtga	aagcattgga	atcagacagc	acttgaagag	ggtgcagctg	cgggagctgt	
1861	cggaagcaga	ggtcaggcag	catcggaag	ccaggccccg	cctgctgacg	tccagactcc	30
1921	gcttcatccc	caagcctgac	gggctgcggc	cgattgtgaa	catggactac	gtcgtgggag	
1981	ccagaacggt	ccgcagagaa	aagagggccg	agcgtctcac	ctcgagggtg	aaggcactgt	
2041	tcagcgtgct	caactacgag	cgggcgcggc	gccccggcct	cctgggcgcc	tctgtgctgg	
2101	gcctggacga	tatccacagg	gcctggcgca	ccttcgtgct	gcgtgtgcgg	gcccaggacc	
2161	cgccgcctga	gctgtacttt	gtcaagggtg	atgtgacggg	cgcgtagcac	accatcccc	
2221	aggacaggct	cacggaggtc	atcgccagca	tcatcaaacc	ccagaacacg	tactgcgtgc	
2281	gtcggatg	cgtggtccag	aaggccggcc	atgggcacgt	ccgcaaggcc	ttcaagagcc	
2341	acgtctctac	cttgacagac	ctccagccgt	acatgcgaca	gttcgtggct	cacctgcagg	
2401	agaccagccc	gctgagggat	gccgtcgtca	tcgagcagag	ctcctccctg	aatgaggcca	
2461	gcagtggcct	cttcgacgtc	ttcctacgct	tcatgtgccca	ccacgccgtg	cgcatcaggg	40
2521	gcaagtcccta	cgtccagtgc	caggggatcc	cgcagggtc	catcctctcc	acgtgtctct	
2581	gcagcctgtg	ctacggcgac	atggagaaca	agctgtttgc	ggggattcgg	cgggacgggc	
2641	tgtctctg	tttgggtgat	gatttcttgt	tggtagacac	tcacctcacc	cacgcgaaaa	
2701	ccttccctcag	gaccttggtc	cgagggtgtc	ctgagtatgg	ctgcgtgggtg	aacttgcgga	
2761	agacagtgg	gaacttccct	gtagaagacg	aggccctggg	tggcacggct	tttgttcaga	
2821	tgccggcccc	cggcctattc	ccctggtg	gcctgctgct	ggatacccgg	accctggagg	
2881	tgcagagcga	ctactccagc	tatgcccggga	cctccatcag	agccagtctc	accttcaacc	
2941	gcggcttcaa	ggctgggagg	aacatgcgtc	gcaaactctt	tggggtcttg	cggctgaagt	
3001	gtcacagcct	gtttctggat	ttgcagggtga	acagcctcca	gacgggtgtgc	accaacatct	
3061	acaagatcct	cctgctgcag	gcgtacagg	ttcacgcatg	tgtgctgcag	ctccatttc	50

3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatittt tcctgcgct catctctgac acggcctccc
 3181 tctgtactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc aagggcgccg
 3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgtcaagc
 3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctgggggtc actcaggaca gcccagacgc
 3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg
 3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgccac agccaggccg
 3481 agagcagaca ccagcagccc tgcacgccc ggctctacgt cccagggagg gagggcgccg
 3541 ccacacccag gcccgcacccg ctgggagctt gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct
 3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc
 3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc
 3721 agggccagct ttctctcacc aggagcccgg ctccactcc ccacatagga atagtccatc
 3781 cccagattcg ccattgttca cccctcggc tgcctcctt tgccttcac cccaccatc
 3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctggga tttggagtga ccaaagggtg
 3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg
 3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagttt tcagttttga aaaaaaaaaa
 4021 aaaaaaa(配列番号 8 9)

10

【0709】

ある態様において、h T E R Tは、配列番号 8 9 の配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または 9 9 %同一である配列を有する核酸によりコードされる。ある態様において、h T E R Tは、配列番号 8 9 の核酸によりコードされる。

20

【0710】

免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞)の活性化および増殖

T細胞のような免疫エフェクター細胞は、例えば、米国特許 6,352,694号; 6,534,055号; 6,905,680号; 6,692,964号; 5,858,358号; 6,887,466号; 6,905,681号; 7,144,575号; 7,067,318号; 7,172,869号; 7,232,566号; 7,175,843号; 5,883,223号; 6,905,874号; 6,797,514号; 6,867,041号; および米国特許出願公開 20060121005号に記載する方法を使用して、一般的に活性化および増殖できる。

30

【0711】

引用により本明細書に包含させる米国特許 5,199,942号に記載する造血幹細胞および前駆細胞のエクスピボ増殖のための方法を、本発明の細胞に適用できる。他の適当な方法は当分野で知られ、それゆえに本発明は、細胞のエクスピボ増殖の特定の方法に制限されない。簡潔には、T細胞のエクスピボ培養および増殖は、(1)哺乳動物からの採取した末梢血または骨髓外植体からの C D 3 4 + 造血幹細胞および前駆細胞回収; および(2)エクスピボでのこのような細胞の増殖を含み得る。米国特許 5,199,942号に記載される細胞増殖因子に加えて、f l t 3 L、I L-1、I L-3および c - k i t リガンドのような他の因子を細胞の培養および増殖に使用できる。

【0712】

一般に、本発明の免疫エフェクター細胞の集団、例えば、T制御性細胞枯渇細胞を、C D 3 / T C R 複合体関連シグナルを刺激する薬剤およびT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドが結合した表面と接触させることにより増殖させ得る。特に、T細胞集団は、表面上に固定された抗 C D 3 抗体または抗原結合そのフラグメントまたは抗 C D 2 抗体との接触またはカルシウムイオノフォアと組み合わせたタンパク質キナーゼ C アクティベーター(例えば、ブリオスタチン)との接触により、ここに記載するように刺激し得る。T細胞表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子と結合するリガンドを使用する。例えば、T細胞の集団を、T細胞の増殖刺激に適する条件下、抗 C D 3 抗体および抗 C D 2 8 抗体と接触させ得る。C D 4 + T細胞または C D 8 + T細胞の増殖を刺激するために、抗 C D 3 抗体および抗 C D 2 8 抗体を使用できる。抗 C D 2 8 抗体

40

50

の例は 9.3、B-T 3、XR-CD 28 を含み(Diacclone, Besancon, France)、当分野で一般に知られる他の方法のように使用できる(Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。

【0713】

ある面において、T細胞のための一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、異なるプロトコールにより提供し得る。例えば、例えば、各シグナルを提供する薬剤は溶液中でも、表面と結合してよい。表面に結合しているとき、薬剤は同じ表面(すなわち、“cis”形態)または別の表面(すなわち、“trans”形態)に結合し得る。あるいは、あるいは、一方の薬剤が表面に結合し、他方が溶液にあってよい。ある面において、共刺激シグナルを提供する薬剤は細胞表面に結合し、一次活性化シグナルを提供する薬剤は溶液中であるかまたは表面と結合する。ある面において、両剤は溶液中にあり得る。ある面において、ある面において、薬剤は不溶性形態であり、Fc受容体または抗体または薬剤と結合する他の結合剤を発現する細胞のような表面に架橋され得る。この点に関して、例えば、本発明におけるT細胞の活性化および増殖のために意図される人工抗原提示細胞(aAPC)について、米国特許出願公開20040101519号および20060034810号を参照のこと。

【0714】

ある面において、2剤は、ビーズに、同じビーズ、すなわち、“cis”または別のビーズ、すなわち、“trans”で固定化される。例として、一次活性化シグナルを提供する薬剤は抗CD3抗体または抗原結合そのフラグメントであり、共刺激シグナルを提供する薬剤は抗CD28抗体または抗原結合そのフラグメントであり、両剤が、等価な分子量で同じビーズに共固定化される。ある面において、CD4⁺ T細胞増殖およびT細胞増殖のためのビーズに結合した1:1比の各抗体を使用する。本発明のある面において、1:1比を使用して観察された増殖と比較して、T細胞増殖の増殖が観察されるように、ビーズに結合した抗CD3:CD28抗体の比を使用する。ある特定の面において、1:1比を使用して観察された増殖と比較して、約1~約3倍増加が観察される。ある面において、ビーズに結合したCD3:CD28抗体比は100:1~1:100およびその間の全ての整数値の範囲である。ある面において、抗CD3抗体より多くの抗CD28抗体が粒子に結合している、すなわち、CD3:CD28比が1未満である。ある面において、ビーズに結合した抗CD28抗体対抗CD3抗体比は2:1より大きい。ある特定の面において、ビーズに結合した1:100 CD3:CD28比の抗体を使用する。ある面において、ビーズに結合した1:75 CD3:CD28比の抗体を使用する。さらなる面において、ビーズに結合した1:50 CD3:CD28比の抗体を使用する。ある面において、ビーズに結合した1:30 CD3:CD28比の抗体を使用する。ある好ましい面において、ビーズに結合した1:10 CD3:CD28比の抗体を使用する。ある面において、ビーズに結合した1:3 CD3:CD28比の抗体を使用する。さらなる面において、ビーズに結合した3:1 CD3:CD28比の抗体を使用する。

【0715】

1:500~500:1およびその間の任意の整数値の粒子対細胞比を、T細胞または他の標的細胞の刺激のために使用し得る。当業者には容易に認識され得るように、粒子対細胞比は、標的細胞に対する粒子径による。例えば、小さいサイズのビーズは少ない細胞しか結合できず、大きなビーズはたくさん結合できる。ある面において、細胞対粒子比は、1:100~100:1およびその間の任意の整数値の範囲であり、さらなる面において1:9~9:1およびその間の任意の整数値からなる比をT細胞刺激に使用し得る。T細胞刺激をもたらす抗CD3および抗CD28結合粒子対T細胞の比は、上記のように変わりうるが、しかしながらある好ましい値は1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1および15:1を含み、一つの好ましい比は少なくとも1:1粒子対T細胞である

。ある面において、1 : 1 以下の粒子対細胞比を使用する。ある特定の面において、好ましい粒子 : 細胞比は1 : 5である。さらなる面において、粒子対細胞比は、刺激の日により変わり得る。例えば、ある面において、粒子対細胞比は、1 日目は1 : 1 ~ 1 0 : 1 であり、さらなる粒子をその後1 0 日目まで連日または隔日で細胞に添加し、最終比1 : 1 ~ 1 : 1 0 である(添加の比の細胞数に基づく)。ある特定の面において、粒子対細胞比は刺激1 日目に1 : 1 であり、刺激3 日目および5 日目に1 : 5 に調節する。ある面において、粒子を、1 日目の1 : 1 および刺激3 日目および5 日目の1 : 5 の最終比に基づき、連日または隔日で添加する。ある面において、粒子対細胞比は、刺激1 日目は2 : 1 であり、刺激3 日目および5 日目に1 : 1 0 に調節する。ある面において、粒子を、1 日目の1 : 1 および3 日目および5 日目の1 : 1 0 の最終比に基づき、連日または隔日で添加する。当業者は、多様な他の比が本発明における使用に適し得ることを認識する。特に、比は、粒子径ならびに細胞サイズおよびタイプによる。ある面において、使用するための最も典型的な比は、1 日目の1 : 1、2 : 1 および3 : 1 付近である。

【0716】

さらなる面において、T細胞のような細胞を、薬剤被覆ビーズと組み合わせ、ビーズおよび細胞をその後分離し、次いで細胞を培養する。異なる面において、培養前に、薬剤被覆ビーズおよび細胞を分離するが、一緒に培養する。さらなる面において、ビーズおよび細胞を、磁気力のような力の適用によりまず濃縮し、細胞表面マーカーのライゲーションを増加させ、それにより細胞刺激を誘導する。

【0717】

例として、細胞表面タンパク質を、抗CD3 および抗CD28 が結合した常磁性ビーズ(3 x 28 ビーズ)とT細胞を接触させることにより、ライゲートし得る。ある面において、細胞(例えば、 $10^4 \sim 10^9$ T細胞)およびビーズ(例えば、DYNAビーズS(登録商標)M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズを1 : 1 比)を、緩衝液、例えばPBS(カルシウムおよびマグネシウムのような二価カチオン不含)中で合わせる。再び、任意の細胞濃度を使用し得ることは当業者には容易に認識され得る。例えば、標的細胞は、サンプル中に極めて稀であり、サンプルの0.01%しか含まれないかまたはサンプル全体(すなわち、100%)が目的の標的細胞で構成され得る。したがって、あらゆる細胞数が本発明の状況と一体となる。ある面において、細胞と粒子の最大接触を確実にするために、粒子および細胞を混合する体積を顕著に減少させる(すなわち、細胞の濃度を高める)ことが望ましいことがある。例えば、ある面において、約100億細胞/ml、90億/ml、80億/ml、70億/ml、60億/ml、50億/mlまたは20億細胞/mlの濃度を使用する。ある面において、1億細胞/ml超を使用する。さらなる面において、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万または5000万細胞/mlの細胞濃度を使用する。さらなる面において、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万または1億細胞/mlの細胞濃度を使用する。さらなる面において、1億2500万または1億5000万細胞/mlをの濃度使用できる。高濃度を使用して、細胞収率、細胞活性化および細胞増殖を増加できる。さらに、高細胞濃度の使用はCD28陰性T細胞のような目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞のより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞の集団は、治療的価値を有し得て、得ることが望まれる。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常CD28発現が弱いCD8⁺T細胞のより効率的な選択を可能にする。

【0718】

ある態様において、CAR、例えば、ここに記載するCARをコードする核酸が形質導入された細胞を、例えば、ここに記載する方法により増殖する。ある態様において、細胞を、数時間(例えば、約2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、15時間、18時間、21時間)~約14日(例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日または14日)の期間の培養により増殖する。ある態様において、細胞は、4~9日の期間増殖される。ある態様において、細胞は、8日以下、例えば、7日、6日または5日の期間増殖され

る。ある態様において、細胞、例えば、ここに記載するCD19 CAR細胞は、5日の培養により増殖され、得られた細胞は、同じ培養条件で、9日間培養で増殖された同じ細胞よりも強力である。効力は、例えば、多様なT細胞機能、例えば増殖、標的細胞死、サイトカイン産生、活性化、遊走またはそれらの組み合わせにより規定され得る。ある態様において、5日増殖された細胞、例えば、ここに記載するCD19 CAR細胞は、同じ培養条件下に9日間培養で増殖された同じ細胞と比較して、抗原刺激による細胞倍加の少なくとも1倍、2倍、3倍または4倍増加を示す。ある態様において、細胞、例えば、ここに記載するCD19 CARを発現する細胞は、5日の培養により増殖され、得られた細胞は、同じ培養条件下に9日間培養で増殖された同じ細胞と比較して、高い炎症誘発性サイトカイン産生、例えば、IFN- γ および／またはGM-CSFレベルを示す。ある態様において、5日増殖された細胞、例えば、ここに記載するCD19 CAR細胞は、同じ培養条件下に9日間培養で増殖された同じ細胞と比較して、炎症誘発性サイトカイン産生、例えば、IFN- γ および／またはGM-CSFレベルのpg/mlで、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍またはそれ以上増加する。

【0719】

T細胞の培養期間が60日以上となるような、数サイクルの刺激も望まれ得る。T細胞培養に適する条件は、血清(例えば、胎児ウシまたはヒト血清)、インターロイキン-2(IL-2)、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β およびTNF- α または当業者に知られる細胞増殖のための任意の他の添加剤を含む、増殖および生存能に必要な因子を含み得る、適切な培地(例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640またはX-vivo 15(Lonza))を含む。細胞の増殖のための他の添加剤は、界面活性剤、プラスマネートおよびN-アセチル-L-システインおよび2-メルカプトエタノールのような還元剤を含むが、これらに限定されない。培地は、無血清または適切な量の血清(または血漿)が添加されたまたは規定されたセットのホルモンおよび／またはT細胞の増殖および拡大に十分な量のサイトカインが添加されたRPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15およびX-Vivo 20、Optimizerを含み得る。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは実験的培養においてのみ包含され、対象に注入すべき細胞の培養には含まれない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件、例えば、適切な温度(例えば、37℃)および雰囲気(例えば、空気+5%CO₂)で維持される。

【0720】

ある態様において、細胞は、例えば、フローサイトメトリーのようなここに記載する方法により測定して、14日の増殖期間にわたり、細胞の少なくとも200倍(例えば、200倍、250倍、300倍、350倍)増加をもたらす1以上のインターロイキンを含む、適切な培地(例えば、ここに記載する培地)で増殖させる。ある態様において、細胞は、IL-15および／またはIL-7(例えば、IL-15およびIL-7)の存在下増殖させる。

【0721】

ある態様において、ここに記載する方法、例えば、CAR発現細胞製造法は、T制御性細胞、例えば、CD25⁺ T細胞を、例えば、抗CD25抗体またはそのフラグメントまたはCD25結合リガンド、IL-2を使用して、細胞集団から除去することを含む。細胞集団からT制御性細胞、例えば、CD25⁺ T細胞を除去する方法は、ここに記載される。ある態様において、方法、例えば、製造法は、さらに細胞集団(例えば、CD25⁺ T細胞のようなT制御性細胞が枯渇されている細胞集団；または抗CD25抗体、そのフラグメントまたはCD25結合リガンドと前に接触された細胞集団)とIL-15および／またはIL-7の接触を含む。例えば、細胞集団(例えば、抗CD25抗体、そのフラグメントまたはCD25結合リガンドと先に接触されている)を、IL-15および／またはIL-7の存在下で増殖させる。

【0722】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、インターロイキン-15(IL-15)ポリペプチド、インターロイキン-15受容体アルファ(IL-15Ra)ポリペプチドまたはIL-15ポリペプチドとIL-15Raポリペプチドの組み合わせ、例えば、hetIL-15を含む組成物を、CAR発現細胞の製造中、例えば、エクスピボで接触させることを含む。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造中、例えば、エクスピボで、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造中、例えば、エクスピボで、IL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチドの両者の組合せを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造中、例えば、エクスピボで、hetIL-15を含む組成物と接触させる。

10

【0723】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、エクスピボ増殖中、hetIL-15を含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、エクスピボ増殖中、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、エクスピボ増殖中、IL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチドの両者を含む組成物と接触させる。ある態様において、接触は、リンパ球垂集団、例えば、CD8⁺ T細胞の生存および増殖をもたらす。

【0724】

種々の刺激時間に曝されているT細胞は、異なる特徴を示し得る。例えば、典型的な血液またはアフエーシスした末梢血単核細胞産物は、細胞毒性またはサプレッサーT細胞集団(TC、CD8⁺)より大きいヘルパーT細胞集団(TH、CD4⁺)を有する。CD3およびCD28受容体での刺激によるT細胞のエクスピボ増殖は、約8~9日目まで主にTH細胞からなるT細胞の集団を産生するが、約8~9日目後、T細胞の集団は、徐々に大きくなるTC細胞の集団を含む。したがって、処置の目的によって、対象に、主にTH細胞を含むT細胞集団を注入することは有利であり得る。同様に、TC細胞の抗原特異的サブセットが単離されているならば、このサブセットを大きな程度まで増殖させることが有利であり得る。

20

【0725】

さらに、CD4およびCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーは、細胞増殖過程の経過中に、顕著に、しかし大部分、再現性よく変化する。そうして、このような再現性は、特異的な目的のために活性化T細胞産物をあつらえる能力を可能とする。

30

【0726】

他の態様において、ここに開示する製造法は、さらに、免疫エフェクター細胞の集団とテロメラーゼサブユニットをコードする核酸、例えば、hTERTを接触させることを含む。テロメラーゼサブユニットをコードする核酸はDNAであり得る。

【0727】

本発明のCARが構築されたら、適切なインビトロおよび動物モデルにおける抗原刺激後にT細胞を増殖させる能力、再刺激の非存在下でのT細胞増殖の持続および抗癌活性のような、しかしこれらに限定されない分子の活性を評価するために、種々のアッセイが使用され得る。本発明のCARの効果を評価するためのアッセイは、下にさらに詳細に記載する。

40

【0728】

初代T細胞におけるCAR発現のウェスタンブロット分析を、単量体および二量体の存在を検出するために使用できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。極めて簡潔には、CARを発現するT細胞(CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の1:1混合物)をインビトロで10日超増殖させ、続いて溶解および還元条件下のSDS-PAGEを行う。完全長TCR-ζ細胞質ドメインおよび内因性TCR-ζ鎖を含むCARを、TCR-ζ鎖に対する抗体を使用するウェスタンブロッティングにより検出する。同じT細胞サブセットを、共有結合性二量体形成の評価を可能とするため

50

に非還元条件下のSDS-PAGE分析に使用する。

【0729】

抗原刺激後のCAR⁺ T細胞のインビトロ増殖を、フローサイトメトリーにより測定できる。例えば、CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の混合物をαCD3/αCD28ビーズで刺激し、続いて分析すべきプロモーターの制御下に、GFPを発現するレンチウイルスベクターで形質導入する。代表的プロモーターは、CMV IE遺伝子、EF-1α、ユビキチンCまたはホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターを含む。GFP蛍光を、CD4⁺および/またはCD8⁺ T細胞サブセットの培養6日目に、フローサイトメトリーにより評価する。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。あるいは、CD4⁺とCD8⁺ T細胞の混合物を、0日目にαCD3/αCD28被覆磁気ビーズで刺激し、2Aリボソームスキッピング配列を使用するCARとeGFPを発現するバイシストロニックレンチウイルスベクターを使用して、1日目にCARを形質導入する。培養物を、洗浄後、ここに記載する癌関連抗原⁺ K562細胞(K562-ここに記載するような癌関連抗原)、野生型K562細胞(K562野生型)または抗CD3および抗CD28抗体の存在下HCD32および4-1BBLを発現するK562細胞(K562-BBL-3/28)で、再刺激する。外来性IL-2を、100 IU/mlを隔日で培養物に添加する。GFP⁺ T細胞を、ビーズベースの計数を使用するフローサイトメトリーにより数える。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。

【0730】

再刺激非存在下の持続するCAR⁺ T細胞増殖も測定できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。簡潔には、平均T細胞体積(fl)を、0日目のαCD3/αCD28被覆磁気ビーズでの刺激および1日目の記載するCARの形質導入後、培養8日目にCoulter Multisizer粒子カウンター、Nexcelom Cellometer VisionまたはMillipore Scepterを使用して測定する。

【0731】

動物モデルも、CAR T活性の測定に使用できる。例えば、免疫欠損マウスにおける原発ヒトブレB ALLを処置するための、ここに記載するヒト癌関連抗原特異的CAR⁺ T細胞を使用する異種移植モデルを使用できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。極めて簡潔には、ALL確立後、マウスを処置群に無作為化する。ここに記載するような癌関連抗原特異的CARで操作したT細胞の異なる数を、1:1の等量比でB-ALLを担持するNOD-SCID-γ^{-/-}マウスに共注射する。マウスからの脾臓DNAにおけるここに記載するようなα癌関連抗原-ζおよびここに記載するようなα癌関連抗原-BB-ζベクターのコピー数を、T細胞注射後、種々の時点で評価する。動物を、1週間間隔で白血病について評価する。末梢血における癌関連抗原⁺ B-ALL芽細胞数を癌関連抗原特異的CAR⁺ T細胞または偽形質導入T細胞を注射されたマウスで計数する。ログランク検定を使用して、群の生存曲線を比較する。さらに、NOD-SCID-γ^{-/-}マウスへのT細胞注射4週間後の絶対的末梢血CD4⁺およびCD8⁺ T細胞数も分析する。マウスに、白血病性細胞を注射し、3週間後、eGFPに連結したCARをコードするバイシストロニックレンチウイルスベクターによりCARを発現するように操作されたT細胞を注射する。T細胞を、注入GFP⁺ T細胞の45~50%に、注射前に偽形質導入細胞と混合することにより標準化し、フローサイトメトリーにより確認する。動物を、1週間間隔で白血病について評価する。CAR⁺ T細胞群の生存曲線を、ログランク検定を使用して比較する。

【0732】

用量依存的CAR処置応答を評価できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。例えば、21日目にCAR T細胞、等しい数の偽形質導入T細胞で処置したまたはT細胞処置なしの、マウスにおいて白血病が確立した後35~70日後に後、末梢血を得る。各群からのマウスを、ここに記載する末梢血癌関連抗原⁺ ALL芽細胞数の決定のために無作為に採血し、35日目および49日目に殺す。残

りの動物を57日目および70日目に評価する。

【0733】

細胞増殖およびサイトカイン産生の評価は、先に、例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)に記載されている。簡潔には、CAR介在増殖の評価を、洗浄したT細胞と、ここに記載する癌関連抗原(K19)またはCD32およびCD137(KT32-BBL)を発現するK562細胞と、最終T細胞：K562比2：1で混合することによりマイクロタイタープレートにおいて実施する。K562細胞を、使用前にガンマ線で照射する。抗CD3(クローンOKT3)および抗CD28(クローン9.3)モノクローナル抗体を、これらのシグナルがエキスピボでの長期CD8⁺ T細胞増殖を支持するため、刺激T細胞増殖について陽性対照として役立つKT32-BBL細胞の培養物に添加する。T細胞を、製造者により記載のとおり、CountBright™蛍光ビーズ(Invitrogen, Carlsbad, CA)およびフローサイトメトリーを使用して、培養において数える。CAR⁺ T細胞を、eGFP-2A連結CAR発現レンチウイルスベクターで操作されたT細胞を使用するGFP発現により同定する。GFPを発現しないCAR⁺ T細胞について、CAR⁺ T細胞を、ここに記載するビオチニル化組み換え癌関連抗原タンパク質および二次アビジン-PEコンジュゲートにより検出する。T細胞のCD4⁺およびCD8⁺発現も、特異的モノクローナル抗体(BD Biosciences)を使用して同時に検出する。サイトカイン測定を、製造業者の指示に従いヒトTH1/TH2サイトカイン細胞数測定ビーズアレイキット(BD Biosciences, San Diego, CA)を使用して再刺激24時間後に回収した上清で実施する。蛍光を、FACSscaliburフローサイトメーターを使用して評価し、データを製造業者の指示に従い分析する。

【0734】

細胞毒性を、標準的⁵¹Cr放出アッセイにより評価できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。簡潔には、標的細胞(K562株および初代プロB-ALL細胞)に、⁵¹Cr(NaCrO₄として、New England Nuclear, Boston, MA)を、37℃で2時間、頻繁に攪拌しながら充填し、完全RPMIで2回洗浄し、マイクロタイタープレートに播種する。エフェクターT細胞を、ウェル中で完全RPMI中、標的細胞と種々のエフェクター細胞：標的細胞(E：T)比で混合する。さらなる培地のみ(自発的放出、SR)またはtritox-100洗剤1%溶液(全放出、TR)を含むウェルも調製する。37℃で4時間のインキュベーション後、各ウェルから上清を回収する。放出された⁵¹Crを、次いでガンマ粒子カウンター(Packard Instrument Co., Waltham, MA)を使用して測定する。各条件を少なくとも3回行い、溶解のパーセントを式：溶解%=(ER-SR)/(TR-SR)(式中、ERは各実験条件で放出された平均⁵¹Crを示す)を使用して計算する。

【0735】

造影テクノロジーを使用して、腫瘍担持動物モデルにおけるCARの特異的輸送および増殖を評価できる。このようなアッセイは、例えば、Barrett et al., Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011)に記載されている。簡潔には、NOD/SCID/γc^{-/-}(NSG)マウスに、Nalm-6細胞をIV注射し、7日後CAR構築物でエレクトロポレーション4時間後T細胞を注射する。T細胞は、ホタルルシフェラーゼを発現するようにレンチウイルス構築物で安定にトランスフェクトされ、マウスをバイオルミネセンスについて造影する。あるいは、Nalm-6異種移植モデルにおけるCAR⁺ T細胞の単回注射の治療有効性および特異性を、次のように測定できる。NSGマウスに、ホタルルシフェラーゼを安定に発現するように形質導入したNalm-6を注射し、続いて7日後に本発明のCARで電気穿孔したT細胞を1回尾静脈注射する。動物を、注射後種々の時点で造影する。例えば、5日目(処置2日前)および8日目(CAR⁺ PBL後24時間)に、代表的マウスにおけるホタルルシフェラーゼ陽性白血病の光子密度ヒートマップを作成できる。

【0736】

ここでの実施例部分に記載のものならびに当分野で知られるものを含む、他のアッセイ

も、本発明のCAR構築物の評価に使用できる。

【0737】

ここに開示する方法の代わりにまたはこれと組み合わせて、CARリガンドの使用を含む、CAR発現細胞(例えば、インビトロまたはインビボ(例えば、臨床モニタリング))、免疫細胞増殖および／または活性化および／またはCAR特異的選択の1以上の検出および／または定量的ための方法および組成物が開示される。一つの例示的態様において、CARリガンドは、CAR分子に結合する、例えば、CARの細胞外抗原結合ドメインに結合する抗体である(例えば、抗原結合ドメインに結合する抗体、例えば、抗イディオタイプ抗体；または細胞外結合ドメインの定常領域に結合する抗体)。他の態様において、CARリガンドは、CAR抗原分子である(例えば、ここに記載のような)。

10

【0738】

ある面において、CAR発現細胞を検出および／または定量する方法が開示される。例えば、CARリガンドは、インビトロまたはインビボでCAR発現細胞の検出および／または定量に使用できる(例えば、患者におけるCAR発現細胞の臨床モニタリングまたは患者への投薬)。方法は、

CARリガンド(場合により、標識CARリガンド、例えば、タグ、ビーズ、放射活性または蛍光標識を含むCARリガンド)を提供し；

CAR発現細胞を獲得し(例えば、製造サンプルまたは臨床サンプルのようなCAR発現細胞含有サンプルの獲得)；

CAR発現細胞とCARリガンドを、結合が生じる条件下で接触させ、それにより、存在するCAR発現細胞のレベル(例えば、量)を検出することを含む。CAR発現細胞とCARリガンドの結合は、FACS、ELISAなどのような標準技術を使用して検出できる。

20

【0739】

他の面において、増殖および／または活性化細胞(例えば、免疫エフェクター細胞)の方法が開示される。方法は、

CAR発現細胞(例えば、第一CAR発現細胞または一過性に発現されるCAR細胞)を提供し；

該CAR発現細胞とCARリガンド、例えば、ここに記載するようなCARリガンドを、免疫細胞拡張および／または増殖が生じる条件下で接触させ、それにより、活性化および／または増殖集団を産生することを含む。

30

【0740】

ある態様において、CARリガンドは存在する(例えば、基質、例えば、天然に存在しない基質に固定化または結合される)。ある態様において、基質は、非細胞基質である。非細胞基質は、例えば、プレート(例えば、マイクロタイタープレート)、膜(例えば、ニトロセルロース膜)、マトリックス、チップまたはビーズから選択される固体支持体であり得る。ある態様において、CARリガンドは、基質に存在する(例えば、基質表面上)。CARリガンドを、基質に共有非共有(例えば、架橋)により固定、結合または会合させ得る。ある態様において、CARリガンドは、ビーズに結合(例えば、共有結合)する。前記態様において、免疫細胞集団をインビトロまたはエクスピボで増殖できる。本方法は、さらに、例えば、ここに記載する方法のいずれかを使用する、CAR分子のリガンドの存在下、免疫細胞の集団の培養を含み得る。

40

【0741】

他の態様において、細胞を増殖および／または活性化する方法は、さらに第二刺激性分子、例えば、CD28の添加を含む。例えば、CARリガンドおよび第二刺激性分子を基質、例えば、1以上のビーズに固定し、それにより細胞増殖および／または活性化を増加させ得る。

【0742】

他の態様において、CAR発現細胞を選択または富化する方法を提供する。方法は、CAR発現細胞とここに記載のようなCARリガンドを接触させ、CARリガンドの結合に

50

基づき細胞を選択することを含む。

【0743】

さらに他の態様において、CAR発現細胞を枯渇する(例えば、減らすおよび／または殺す)方法が提供される。方法は、CAR発現細胞とここに記載するようなCARリガンドを接触させ、細胞をCARリガンドの結合に基づき細胞に標的化させ、それによりCAR発現細胞の数を減らすおよび／または殺すことを含む。ある態様において、CARリガンドは、毒性剤と結合する(例えば、トキシンまたは細胞除去剤)。他の態様において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えば、ADCCまたはADC活性を生じ得る。

【0744】

ここに開示する方法において使用できる抗CAR抗体の例は、例えば、WO2014/190273号およびJena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS March 2013 8:3 e57838に記載され、その内容を引用により本明細書に包含させる。ある態様において、抗イディオタイプ抗体分子は、抗CD19抗体分子、例えば、抗CD19 sc Fvを認識する。例えば、抗イディオタイプ抗体分子は、Jena et al., PLOS March 2013 8:3 e57838に記載のCD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1と結合について競合でき；CD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1と同じCDR(例えば、Kabata定義、Chothia定義またはKabataおよびChothia定義の組合せを使用して1以上の、例えば、全ての、VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3)を有し得て；CD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1のような1以上の(例えば、2)可変領域を有し得るかまたはCD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1を含み得る。ある態様において、抗イディオタイプ抗体は、Jena et al.に記載の方法により製造した。他の態様において、抗イディオタイプ抗体分子は、WO2014/190273号に記載の抗イディオタイプ抗体分子である。ある態様において、抗イディオタイプ抗体分子は、136.20.1のようなWO2014/190273号に記載の抗体分子と同じCDR(例えば、1以上の、例えば、全ての、VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3)を有し；WO2014/190273号の抗体分子の1以上の(例えば、2)可変領域を有してよくまたは136.20.1のようなWO2014/190273号に記載の抗体分子を含み得る。他の態様において、抗CAR抗体は、例えば、WO2014/190273号に記載のようなCAR分子の細胞外結合ドメインの定常領域に結合する。ある態様において、抗CAR抗体は、CAR分子の細胞外結合ドメインの定常領域、例えば、重鎖定常領域(例えば、CH₂-CH3ヒンジ領域)または軽鎖定常領域に結合する。例えば、ある態様において、抗CAR抗体は、WO2014/190273号に記載の2D3モノクローナル抗体と結合について競合し、2D3と同じCDR(例えば、1以上の、例えば、全ての、VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3)を有しまたは2D3の1以上の(例えば、2)可変領域を有しまたはWO2014/190273に記載のような2D3を含む。

【0745】

ある面および態様において、ここでの組成物および方法は、例えば、その全体を引用により本明細書に包含させる、2014年7月31日出願の米国特許出願号に記載のような、T細胞の特定のサブセットのために最適化される。ある態様において、T細胞の最適化サブセットは、対照T細胞、例えば、同じ構築物を発現する異なるタイプ(例えば、CD8⁺またはCD4⁺)のT細胞と比較して、残留性の増強を示す。

【0746】

ある態様において、CD4⁺ T細胞は、ここに記載するCARを含み、当該CARは、CD4⁺ T細胞に適する(例えば、最適化、例えば、残留性の増強に至る)細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、ICOSドメインを含む。ある態様において、CD8⁺ T

10

20

30

40

50

細胞は、ここに記載するCARを含み、当該CARは、CD8⁺ T細胞に適する(例えば、最適化、例えば、残留性の増強に至る)細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、4-1BBドメイン、CD28ドメインまたはICOSドメイン以外の共刺激ドメインを含む。ある態様において、ここに記載するCARは、ここに記載する抗原結合ドメインを含む。

【0747】

治療適用

ある面において、本発明は、ここに記載するような癌関連抗原の発現と関係する疾患の処置法を提供する。方法は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤の投与およびCARを発現するまたは発現できる細胞、例えば、T細胞の投与を含む。

10

【0748】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびXCAR(を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、Xはここに記載するような腫瘍マーカー(または癌関連抗原)である)を発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、該癌細胞は、該X腫瘍マーカー(または癌関連抗原)を発現する。

【0749】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD19CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD19を発現する。ある態様において、処置する癌はALL(急性リンパ芽球性白血病)、CLL(慢性リンパ性白血病)、DLBCL(びまん性大B細胞リンパ腫)、MCL(マントル細胞リンパ腫またはMM(多発性骨髄腫)である。

20

【0750】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびEGFRvIIIICARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、EGFRvIIIを発現する。ある態様において、処置する癌は神経膠芽腫である。

30

【0751】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびメソテリンCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、メソテリンを発現する。ある態様において、処置する癌は中皮腫、膵臓癌または卵巢癌である。

【0752】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD123CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD123を発現する。ある態様において、処置する癌はAMLである。

40

【0753】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD22CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD22を発現する。ある態様において、処置する癌はB細胞悪性腫瘍である。

50

【0754】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCS-1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CS-1を発現する。ある態様において、処置する癌は多発性骨髄腫である。

【0755】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCLL-1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CLL-1を発現する。ある態様において、処置する癌はAMLである。

10

【0756】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD33CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD33を発現する。ある態様において、処置する癌はAMLである。

【0757】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびGD2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、GD2を発現する。ある態様において、処置する癌は神経芽腫である。

20

【0758】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびBCMACARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、BCMAを発現する。ある態様において、処置する癌は多発性骨髄腫である。

30

【0759】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびTnCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、Tn抗原を発現する。ある態様において、処置する癌は卵巣癌である。

【0760】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびPSMACARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、PSMAを発現する。ある態様において、処置する癌は前立腺癌である。

40

【0761】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびROR1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、ROR1を発現する。ある態様において、処置する癌はB細胞悪性腫瘍である。

【0762】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻

50

害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびFLT3 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、FLT3を発現する。ある態様において、処置する癌はAMLである。

【0763】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびTAG72 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、TAG72を発現する。ある態様において、処置する癌は消化器癌である。

10

【0764】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD38 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD38を発現する。ある態様において、処置する癌は多発性骨髄腫である。

【0765】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD44v6 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD44v6を発現する。ある態様において、処置する癌は頸部癌、AMLまたはMMである。

20

【0766】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCEACARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CEAを発現する。ある態様において、処置する癌は消化器癌または膵臓癌である。

【0767】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびEPCAMCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、EPCAMを発現する。ある態様において、処置する癌は消化器癌である。

30

【0768】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびB7H3 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、B7H3である。

40

【0769】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびKITCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、KITを発現する。ある態様において、処置する癌は消化器癌である。

【0770】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびIL-13Ra2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞

50

胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、IL-13Ra2を発現する。ある態様において、処置する癌は神経膠芽腫である。

【0771】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD30CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD30を発現する。ある態様において、処置する癌はリンパ腫または白血病である。

【0772】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびGD3CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、GD3を発現する。ある態様において、処置する癌は黒色腫である。

【0773】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD171CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD171を発現する。ある態様において、処置する癌は神経芽腫、卵巣癌、黒色腫、乳癌、膵臓癌、結腸癌またはNSCLC(非小細胞性肺癌)である。

【0774】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびIL-11RaCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、IL-11Raを発現する。ある態様において、処置する癌は骨肉腫である。

【0775】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびPSCACARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、PSCAを発現する。ある態様において、処置する癌は前立腺癌である。

【0776】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびVEGFR2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、VEGFR2を発現する。ある態様において、処置する癌は固形腫瘍である。

【0777】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびルイスYCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、ルイスYを発現する。ある態様において、処置する癌は卵巣癌またはAMLである。

【0778】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD24CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD24を

10

20

30

40

50

発現する。ある態様において、処置する癌は膵臓癌である。

【0779】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびPDGFR-ベータCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、PDGFR-ベータを発現する。ある態様において、処置する癌は乳癌、前立腺癌、GIST(消化器間質腫瘍)、CML、DFSP(隆起性皮膚線維肉腫)または神経膠腫である。

【0780】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびSSEA-4CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、SSEA-4を発現する。ある態様において、処置する癌は神経膠芽腫、乳癌、肺癌または幹細胞癌である。

【0781】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCD20CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD20を発現する。ある態様において、処置する癌はB細胞悪性腫瘍である。

【0782】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤および葉酸受容体アルファCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、葉酸受容体アルファを発現する。ある態様において、処置する癌は卵巣癌、NSCLC、子宮内膜癌、腎癌または他の固形腫瘍である。

【0783】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびERBB2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、ERBB2(Her2/neu)を発現する。ある態様において、処置する癌は乳癌、胃癌、結腸直腸癌、肺癌または他の固形腫瘍である。

【0784】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびMUC1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、MUC1を発現する。ある態様において、処置する癌は乳癌、肺癌または他の固形腫瘍である。

【0785】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびEGFRCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、EGFRを発現する。ある態様において、処置する癌は神経膠芽腫、SCLC(小細胞肺癌)、SCCHN(頭頸部扁平上皮細胞癌)、NSCLCまたは他の固形腫瘍である。

【0786】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻

10

20

30

40

50

害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびNCAMCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、NCAMを発現する。ある態様において、処置する癌は神経芽腫または他の固形腫瘍である。

【0787】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCAIXCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CAIXを発現する。ある態様において、処置する癌は腎癌、CRC、子宮頸癌または他の固形腫瘍である。

10

【0788】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびEphA2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、EphA2を発現する。ある態様において、処置する癌はGBMである。

【0789】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびGD3CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、GD3を発現する。ある態様において、処置する癌は黒色腫である。

20

【0790】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびFcoSilGM1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、FcoSilGMを発現する。

【0791】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびsLeCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、sLeを発現する。ある態様において、処置する癌はNSCLCまたはAMLを発現する。

30

【0792】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびGM3CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、GM3を発現する。

40

【0793】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびTGS5CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、TGS5を発現する。

【0794】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤および

50

H M W M A A C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、H M W M A Aを発現する。ある態様において、処置する癌は黒色腫、神経膠芽腫または乳癌である。

【0795】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびoーアセチルーG D 2 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、oーアセチルーG D 2を発現する。ある態様において、処置する癌は神経芽腫または黒色腫である。

10

【0796】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤および葉酸受容体ベータC A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、C D 1 9を発現する。ある態様において、処置する癌はA M Lまたは骨髓腫である。

【0797】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびT E M 1 / C D 2 4 8 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、T E M 1 / C D 2 4 8を発現する。ある態様において、処置する癌は固形腫瘍である。

20

【0798】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびT E M 7 R C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、T E M 7 Rを発現する。ある態様において、処置する癌は固形腫瘍である。

【0799】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびC L D N 6 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、C L D N 6を発現する。ある態様において、処置する癌は卵巣癌、肺癌または乳癌である。

30

【0800】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびT S H R C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、T S H Rを発現する。ある態様において、処置する癌は甲状腺癌または多発性骨髓腫である。

40

【0801】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびG P R C 5 D C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、G P R C 5 Dを発現する。ある態様において、処置する癌は多発性骨髓腫である。

【0802】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤および

50

C X O R F 6 1 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、C X O R F 6 1である。

【0803】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびC D 9 7 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、C D 9 7を発現する。ある態様において、処置する癌はB細胞悪性腫瘍、胃癌、膵臓癌、食道癌、神経膠芽腫、乳癌または結腸直腸癌である。

10

【0804】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびC D 1 7 9 a C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、C D 1 7 9 aを発現する。ある態様において、処置する癌はB細胞悪性腫瘍である。

【0805】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびA L K C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、A L Kを発現する。ある態様において、処置する癌はN S C L C、A L C L(未分化大細胞リンパ腫)、I M T(炎症性筋線維芽細胞腫)または神経芽腫である。

20

【0806】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびポリシアル酸C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、ポリシアル酸を発現する。ある態様において、処置する癌は小細胞肺癌である。

【0807】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびP L A C 1 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、P L A C 1を発現する。ある態様において、処置する癌はH C C(肝細胞癌)である。

30

【0808】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびG l o b o H C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、G l o b o Hを発現する。ある態様において、処置する癌は卵巣癌、胃癌、前立腺癌、肺癌、乳癌または膵臓癌である。

40

【0809】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびN Y - B R - 1 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、N Y - B R - 1を発現する。ある態様において、処置する癌は乳癌である。

【0810】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻

50

害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびUPK2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、UPK2を発現する。ある態様において、処置する癌は膀胱癌である。

【0811】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびHAVCR1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、HAVCR1を発現する。ある態様において、処置する癌は腎癌である。

10

【0812】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびADRB3CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、ADRB3を発現する。ある態様において、処置する癌はユーイング肉腫である。

【0813】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびPANX3CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、PANX3を発現する。ある態様において、処置する癌は骨肉腫である。

20

【0814】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびGPR20CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、GPR20を発現する。ある態様において、処置する癌はGISTである。

【0815】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびLY6KCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、LY6Kを発現する。ある態様において、処置する癌は乳癌、肺癌、卵巣癌または子宮頸癌である。

30

【0816】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびOR51E2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、OR51E2を発現する。ある態様において、処置する癌は前立腺癌である。

40

【0817】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびTARPCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、TARPを発現する。ある態様において、処置する癌は前立腺癌である。

【0818】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびWT1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)

50

胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、W T 1を発現する。

【0819】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびN Y - E S O - 1 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、N K細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、N Y - E S O - 1を発現する。

【0820】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびL A G E - 1 a C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、N K細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、L A G E - 1 aを発現する。

10

【0821】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびM A G E - A 1 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、N K細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、M A G E - A 1を発現する。ある態様において、処置する癌は黒色腫である。

20

【0822】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびM A G E A 1 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、N K細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、M A G E A 1を発現する。

【0823】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびE T V 6 - A M L C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、N K細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、E T V 6 - A M Lを発現する。

30

【0824】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤および精子タンパク質17 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、N K細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、精子タンパク質17を発現する。ある態様において、処置する癌は卵巣癌、H C CまたはN S C L Cを発現する。

【0825】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびX A G E 1 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、N K細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、X A G E 1を発現する。ある態様において、処置する癌はユーイングまたはラブド肉腫である。

40

【0826】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のm T O R阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D O O 1または触媒的阻害剤およびT i e 2 C A Rを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、N K細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、T i e

50

2を発現する。ある態様において、処置する癌は固形腫瘍である。

【0827】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびMAD-C T-1 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、MAD-C T-1を発現する。ある態様において、処置する癌は前立腺癌または黒色腫である。

【0828】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびMAD-C T-2 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、MAD-C T-2を発現する。ある態様において、処置する癌は前立腺癌、黒色腫である。

10

【0829】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびFos関連抗原1 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、Fos関連抗原1を発現する。ある態様において、処置する癌は神経膠腫、扁平上皮細胞癌または膵臓癌である。

20

【0830】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびp53 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、p53を発現する。

【0831】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびプロステイン CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、プロステインを発現する。

30

【0832】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびサバイピンおよびテロメラーゼCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、サバイピンおよびテロメラーゼを発現する。

【0833】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびPCTA-1/ガレクチン8 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、PCTA-1/ガレクチン8を発現する。

40

【0834】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびMelanA/MART1 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞

50

胞は、M e l a n A / M A R T 1 を発現する。

【0835】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびRas変異体CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、Ras変異体を発現する。

【0836】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびp53変異体CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、p53変異体を発現する。

【0837】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびhTERT CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、hTERTを発現する。

【0838】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤および肉腫転座切断点CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、肉腫転座切断点を発現する。ある態様において、処置する癌は肉腫である。

【0839】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびML-IAP CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、ML-IAPを発現する。ある態様において、処置する癌は黒色腫である。

【0840】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびERG CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、ERG(TMPRSS2 ETS融合遺伝子)を発現する。

【0841】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびNA17 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、NA17を発現する。ある態様において、処置する癌は黒色腫である。

【0842】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびPAX3 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、PAX3を発現する。ある態様において、処置する癌は肺胞横紋筋肉腫である。

【0843】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびnアンドロゲン受容体CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、アンドロゲン受容体を発現する。ある態様において、処置する癌は転移前立腺癌である。

【0844】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびサイクリンB1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、サイクリンB1を発現する。

10

【0845】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびMYCNCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、MYCNを発現する。

【0846】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびRhocCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、Rhocを発現する。

20

【0847】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびTRP-2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、TRP-2を発現する。ある態様において、処置する癌は黒色腫である。

30

【0848】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびCYP1B1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CYP1B1を発現する。ある態様において、処置する癌は乳癌、結腸癌、肺癌、食道癌、皮膚癌、リンパ節癌、脳腫瘍または精巣癌である。

【0849】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびBORISCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、BORISを発現する。ある態様において、処置する癌は肺癌である。

40

【0850】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびSART3CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、SART3を発現する。

【0851】

50

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびPAX5CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、PAX5を発現する。

【0852】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびOY-TES1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、OY-TES1を発現する。

10

【0853】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびLCK CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、LCKを発現する。

【0854】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびAKAP-4CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、AKAP-4を発現する。

20

【0855】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびSSX2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、SSX2。

【0856】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびRAGE-1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、RAGE-1を発現する。ある態様において、処置する癌はRCC(腎臓細胞癌)または他の固形腫瘍である。

30

【0857】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を発現する。ある態様において、処置する癌は固形腫瘍である。

40

【0858】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびRU1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、RU1を発現する。

【0859】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻

50

害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびRU2CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、RU2を発現する。

【0860】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤および腸カルボキシシルエステラーゼCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、腸カルボキシシルエステラーゼを発現する。ある態様において、処置する癌は甲状腺癌、RCC、CRC(結腸直腸癌)、乳癌または他の固形腫瘍である。

10

【0861】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびプロスターゼCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、プロスターゼを発現する。

【0862】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびPAPCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、PAPを発現する。

20

【0863】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびIGF-I受容体CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、IGF-I受容体を発現する。

【0864】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびgp100CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、gp100を発現する。

30

【0865】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびbcr-ablCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、bcr-ablを発現する。

40

【0866】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびチロシナーゼCARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、チロシナーゼを発現する。

【0867】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、フコシルGM1CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することによ

50

り癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、フコシルGM1を発現する。

【0868】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびmut hsp70-2 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、mut hsp70-2を発現する。ある態様において、処置する癌は黒色腫である。

【0869】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、CD79a CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD79aを発現する。

10

【0870】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、CD79b CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD79bを発現する。

【0871】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、CD72 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD72を発現する。

20

【0872】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、LAIR1 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、LAIR1。

【0873】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、FCAR CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、FCARを発現する。

【0874】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、LILRA2 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、LILRA2を発現する。

30

【0875】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、CD300LF CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CD300LFを発現する。

【0876】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、CLEC12A CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、CLEC12Aを発現する。

40

【0877】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、BST2 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、BST2を発現する。

【0878】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、EMR2 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、EMR2を発現する。

【0879】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、LY75 CARを発現するよ

50

うに操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、LY75を発現する。

【0880】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、GPC3 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、GPC3を発現する。

【0881】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、FCRL5 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、FCRL5を発現する。

10

【0882】

ある面において、本発明は、処置を必要とする対象に、IGLL1 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を提供することにより癌を処置する方法を提供し、ここで、癌細胞は、IGLL1を発現する。

【0883】

ある面において、本発明は、癌性腫瘍の増殖が阻害されるように、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびPD1 CARを使用する、インビボで対象を処置する方法に関する。PD1 CARを、癌性腫瘍の増殖を阻害するために単独で使用し得る。あるいは、PD1 CARを他のCAR、免疫原性薬剤、標準的癌処置または他の抗体と組み合わせて使用し得る。ある態様において、対象を、PD1 CARおよびここに記載するXCARで処置する。ある態様において、PD1 CARを、他のCAR、例えば、ここに記載するCARおよびキナーゼ阻害剤、例えば、ここに記載するキナーゼ阻害剤と組み合わせて使用する。

20

【0884】

他の面において、対象を処置する、例えば、対象における過増殖性状態または障害(例えば、癌)、例えば、固形腫瘍、軟組織腫瘍または転移病変を減少するまたは軽減する方法が提供される。ある態様において、方法は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤の投与およびCARの投与を含む。

30

【0885】

ここに開示する方法で処置できる癌の例は、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域癌、胃癌、精巣癌、ファロピウス管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、腔癌、外陰癌、ホジキン疾患、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、急性骨髄球性白血病、慢性骨髄球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病を含む慢性または急性白血病、小児固形腫瘍、リンパ性リンパ腫、膀胱癌、腎臓または輸尿管癌、腎盂癌、中枢神経系(CNS)新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮細胞癌、T細胞リンパ腫、アスベストにより誘発されるものを含む環境誘発癌および該癌の組み合わせを含む。転移癌、例えば、PD-L1を発現する転移癌(Iwai et al. (2005) Int. Immunol. 17:133-144)の処置を、ここに記載する抗体分子を使用して実施できる。

40

【0886】

ここに開示する方法で処置できる固形腫瘍の例は、肝臓、肺、乳房、リンパ系、消化器(例えば、結腸)、尿生殖器(例えば、腎臓、尿路上皮性細胞)、前立腺および咽頭を冒すもの、多様な臓器系の悪性腫瘍、例えば、肉腫、腺癌および癌を含む。腺癌は、大部分の結腸癌、直腸癌、腎臓細胞癌、肝癌、肺非小細胞癌、小腸癌および食道癌のような悪性腫瘍を含む。ある態様において、癌は黒色腫、例えば、進行期黒色腫である。前記癌の転移病変も、本発明の方法および組成物を使用して処置または予防できる。

【0887】

50

ここに記載する方法を、次の癌のいずれかの処置に使用できる。

肛門癌；胆管癌；肝外胆管癌；虫垂癌；カルチノイド腫瘍、消化器癌；結腸癌；小児結腸直腸癌を含む結腸直腸癌；小児食道癌を含む食道癌；胆嚢癌；小児胃(胃体)癌を含む胃(胃体)癌；成人(原発)肝細胞(肝臓)癌および小児(原発)肝細胞(肝臓)癌を含む肝細胞(肝臓)癌；小児膵臓癌を含む膵臓癌；肉腫、横紋筋肉腫；島細胞膵臓癌；直腸癌；および小腸癌のような消化器／胃腸癌；

島細胞癌(内分泌膵臓)；小児副腎皮質癌を含む副腎皮質癌；消化器カルチノイド腫瘍；副甲状腺癌；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；小児甲状腺癌を含む甲状腺癌；小児多発性内分泌腫瘍症候群；および小児カルチノイド腫瘍のような内分泌癌；

眼内黒色腫；および網膜芽細胞腫のような眼癌；

腫瘍のユーイングファミリー；骨の骨肉腫／悪性線維性組織球腫；小児横紋筋肉腫；成人および小児軟組織肉腫を含む軟組織肉腫；腱鞘の明細胞肉腫；および子宮肉腫のような筋骨格癌；

小児および男性乳癌を含む乳癌および妊娠のような乳癌；

小児脳幹神経膠腫；脳腫瘍；小児小脳星状細胞腫；小児脳星状細胞腫／悪性神経膠腫；小児上衣腫；小児髓芽腫；小児松果体およびテント上原始神経外胚葉性腫瘍；小児視覚経路および視床下部神経膠腫；他の小児脳腫瘍；副腎皮質癌；中枢神経系リンパ腫、原発；小児小脳星状細胞腫；神経芽腫；頭蓋咽頭腫；脊髄腫瘍；中枢神経系非定型奇形様／ラブドイド腫瘍；中枢神経系胚性腫瘍；および小児テント上原始神経外胚葉性腫瘍および下垂体腫瘍のような神経性癌；

小児膀胱癌を含む膀胱癌；腎臓細胞(腎臓)癌；小児卵巣癌を含む卵巣癌；卵巣上皮性癌；卵巣低悪性能腫瘍；陰茎癌；前立腺癌；小児腎臓細胞癌を含む腎臓細胞癌；腎盂および輸尿管、移行細胞癌；精巣癌；尿道癌；陰癌；外陰癌；頸部癌；ウィルムス腫瘍および他の小児腎臓腫瘍；子宮内膜癌；および妊娠性絨毛性腫瘍のような尿生殖器癌；

小児頭蓋外胚細胞腫瘍；性腺外胚細胞腫瘍；卵巣胚細胞腫瘍；および精巣癌のような胚細胞癌；

口唇癌および口腔癌；小児口腔癌を含む口腔癌；下咽頭癌；小児喉頭癌を含む喉頭癌；潜在性原発巣を伴う転移性扁平上皮癌；口腔癌；鼻腔および副鼻腔癌；小児鼻咽頭癌を含む鼻咽頭癌；口腔咽頭癌；副甲状腺癌；咽頭癌；小児唾液腺癌を含む唾液腺癌；咽喉癌；および甲状腺癌のような頭頸部癌；

非小細胞肺癌；および小細胞肺癌；などの肺癌

悪性中皮腫、成人；悪性中皮腫、小児期；悪性胸腺腫；小児胸腺腫；胸腺癌；小児気管支腺腫／カルチノイドを含む気管支腺腫／カルチノイド；胸膜肺芽腫；非小細胞肺癌；および小細胞肺癌などの呼吸器がん；

カポジ肉腫；メルケル細胞癌；メラノーマ；および小児皮膚癌のような皮膚癌；

エイズ関連悪性腫瘍；

他の小児癌、小児期の異常な癌および未知の原発部位の癌；

および上記癌の転移もここに記載する方法により処置または予防できる。増殖が阻止され得る代表的癌は、一般に免疫療法に応答性の癌を含む。処置のための癌の非限定的例は、黒色腫(例えば、転移悪性黒色腫)、腎癌(例えば明細胞癌)、前立腺癌(例えばホルモン難治性前立腺腺癌)、乳癌、結腸癌および肺癌(例えば非小細胞性肺癌)を含む。さらに、難治性または再発性悪性腫瘍を、ここに記載する分子を使用して処置できる。

【0888】

ここに記載する方法を使用して、血液癌または悪性腫瘍または前癌状態、例えば、白血病またはリンパ腫を処置できる。癌は、ここに記載するような癌関連抗原の発現と関連するものであり得る。血液癌および悪性腫瘍は、例えば、B細胞急性リンパ性白血病(“B ALL”)、T細胞急性リンパ性白血病(“T ALL”)、成人および小児急性リンパ性白血病を含む急性リンパ性白血病(または急性リンパ芽球性白血病)(ALL)を含む1以上の急性白血病；成人および小児急性骨髄性白血病を含む急性骨髄性白血病；1以上の慢性白血病、例えば、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(または慢性リンパ性白

10

20

30

40

50

血病)(CLL)である。ここに開示する方法で処置できるさらなる癌または血液状態は、例えば、AIDS関連リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、芽細胞性形質細胞様樹状細胞新生物、バーキットリンパ腫、慢性骨髄増殖性障害；皮膚T細胞リンパ腫、びまん性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、ホジキンリンパ腫(成人および小児ホジキンリンパ腫および妊娠中のホジキンリンパ腫を含む)、小細胞ーまたは大細胞ー濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖状態、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、周辺帯リンパ腫、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫／血漿細胞新生物、骨髄異形成および骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性障害、菌状息肉症、非ホジキンリンパ腫(成人および小児非ホジキンリンパ腫および妊娠中の非ホジキンリンパ腫を含む)、血漿芽細胞性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、セザリー症候群、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、一次中枢系リンパ腫および骨髄血液細胞の無効な産生(または異形成)により一体化される血液状態の雑多なコレクションである“前白血病”などを含む。さらにここに記載するような癌関連抗原発現と関係する疾患は、例えば、ここに記載するような癌関連抗原の発現と関係する非定型および／または非古典的癌、悪性腫瘍、前癌状態または増殖性疾患を含むが、これらに限定されない。

【0889】

ある態様において、本発明のCAR細胞、例えば、CAR Tで処置できる癌は、慢性リンパ性白血病(CLL)である。ある態様において、処置できる癌はCLLであり、CARはCD19に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0890】

ある態様において、本発明のCAR細胞、例えば、CAR Tで処置できる癌は多発性骨髄腫である。多発性骨髄腫は、骨髄における血漿細胞クローンの蓄積により特徴付けられる、血液の癌である。多発性骨髄腫の現在の治療は、サリドマイドのアナログであるレナリドマイドでの処置を含むが、これらに限定されない。レナリドマイドは、抗腫瘍活性、血管形成阻害および免疫調節を含む活性を有する。一般に、骨髄腫細胞は、フローサイトメトリーにより、ここに記載する癌関連抗原発現は陰性であると考えられる。本発明は、ここに記載するような癌関連抗原を発現する骨髄腫腫瘍細胞の少ないパーセントの認識を包含する。それゆえに、ある態様において、例えば、ここに記載するようなCD19 CARを骨髄腫細胞の標的のために使用し得る。ある態様において、本発明のCARを、1以上のさらなる治療、例えば、レナリドマイド処置と組み合わせて使用できる。

【0891】

ある態様において、リンパ球点滴、例えば同種リンパ球点滴を癌の処置において使用し、ここで、リンパ球点滴は、少なくとも一つの本発明のCAR発現細胞を含む。ある態様において、癌の処置において自己リンパ球点滴を使用し、ここで、自己リンパ球点滴は、少なくとも一つのここに記載するような癌関連抗原発現細胞を含む。

【0892】

ある態様において、対象は先に幹細胞移植、例えば、自己幹細胞移植を受けている。

【0893】

ある態様において、対象対象は先にメルファラン投与を受けている。

【0894】

ある態様において、癌は、対象におけるPD1⁺ T細胞パーセンテージ増加と関係する。ある態様において、癌は、黒色腫のようなPD-1標的化剤に一般に応答する癌である。ある態様において、癌は、腎臓細胞癌のようなT細胞指向免疫療法に一般に応答する癌である。ある態様において、癌は、PD-1陰性対PD-1陽性T細胞比の増加により処置できるものである。

【0895】

本発明は、ここに記載するような癌関連抗原発現細胞集団の増殖阻害または減少のための方法を提供し、方法は、ここに記載するような癌関連抗原を含む細胞の集団と、ここに記載するような癌関連抗原に結合する本発明のCAR発現細胞(例えば、T細胞)を接触させることを含む。特定の面において、本発明は、ここに記載するような癌関連抗原を発現

10

20

30

40

50

する癌細胞の集団の増殖を阻害するまたは減少する方法を提供し、方法は、ここに記載するような癌関連抗原を発現する癌細胞集団と、癌関連抗原を発現する細胞に結合する本発明のCAR発現細胞を接触させることを含む。ある態様において、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞)は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤で処置した対象であり得る。ある態様において、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞)は、ここに記載するように、PD1陽性免疫エフェクター細胞数減少、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞数増加、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比増加、ナイーブT細胞数増加、記憶T細胞前駆体数増加または記憶T細胞前駆体マーカーの発現レベル増加に十分な量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤と接触されている。ある面において、本発明のCARは、細胞および/または癌細胞の含量、数、量またはパーセンテージを、陰性対照と比較して、ここに記載するような癌関連抗原と関係する癌(例えば、血液癌)を有する対象または動物モデルで少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%現象させる。ある面において、対象は、ヒトである。

【0896】

本発明はまた、ここに記載するような癌関連抗原発現と関係する疾患細胞(例えば、ここに記載するような癌関連抗原と関係する癌、例えば、血液癌)を予防、処置および/または管理する方法も提供し、方法は、それを必要とする対象に、ここに記載するような癌関連抗原を発現する細胞と結合する本発明のCAR発現細胞(例えば、T細胞)を投与することを含む。ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤で処置された対象であり得る。ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、ここに記載のように、PD1陽性免疫エフェクター細胞数減少、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞数増加、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比増加、ナイーブT細胞数増加、記憶T細胞前駆体数増加または記憶T細胞前駆体マーカーの発現レベル増加に十分量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤と接触されている。ある面において、対象は、ヒトである。

【0897】

本発明は、ここに記載するような癌関連抗原と関係する癌の再発を呼ぼうする方法を提供し、方法は、処置を必要とする対象に、ここに記載するような癌関連抗原に結合する本発明のCAR発現細胞、例えば、T細胞を投与することを含む。ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤で処置された対象であり得る。ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、ここに記載するように、PD1陽性免疫エフェクター細胞数減少、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞数増加、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比増加、ナイーブT細胞数増加、記憶T細胞前駆体数増加または記憶T細胞前駆体マーカーの発現レベル増加に十分量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤と接触されている。

【0898】

ある面において、方法は、処置を必要とする対象に、有効量のここに記載するような癌関連抗原を発現する、本発明のCAR発現細胞またはここに記載するT細胞を、有効量の他の治療と組み合わせて投与することを含む。

【0899】

ある面において、本発明は、哺乳動物免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞

胞)における発現のためにプロモーターと操作可能に連結したCARを含むベクターに関する。ある面において、本発明は、ここに記載するような癌関連抗原を発現する癌の処置に使用するための、本発明のCARを発現する組み換えT細胞を提供する。ある面において、本発明のCAR Tは、CAR Tが腫瘍細胞を標的とし、腫瘍増殖を処置するように表面に発現された少なくとも一つの癌関連抗原を有する腫瘍細胞と接触できる。

【0900】

本発明は、ある種の細胞治療を含み、ここで、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)がキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝的に修飾され、処置を必要とするレシピエントにCAR T細胞が注入され、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤が投与される。注入された細胞は、レシピエントで腫瘍細胞を殺すことができる。抗体療法と異なり、CAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)は、インビボで複製でき、持続腫瘍制御に至り得る長期残留性をもたらす。種々の面において、患者に投与された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)または子孫は、患者で、患者にT細胞投与後少なくとも4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月、13ヶ月、14ヶ月、15ヶ月、16ヶ月、17ヶ月、18ヶ月、19ヶ月、20ヶ月、21ヶ月、22ヶ月、23ヶ月、2年、3年、4年または5年持続する。

10

【0901】

本発明はまた、ある種の細胞治療を含み、ここで、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)が、例えば、キメラ抗原受容体(CAR)を一過性に発現するように、インビトロ転写RNAで修飾され、処置を必要とするレシピエントにCAR発現細胞が注入され、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤が投与される。注入された細胞は、レシピエントで腫瘍細胞を殺すことができる。それゆえに、種々の面において、患者に投与した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)は、患者にT細胞投与後、1ヶ月、例えば、3週間、2週間、1週間未満持続する。

20

【0902】

何らかの特定の理論に縛られないが、CAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)により惹起される抗腫瘍免疫応答は、能動的または受動的免疫応答であり得るかまたはあるいは直接的対間接的免疫応答によるものであり得る。ある面において、CAR形質導入免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)は、ここに記載する癌関連抗原を発現するヒト癌細胞に応答して特定の炎症誘発性サイトカイン分泌および強力な細胞溶解性活性を示し、可溶性の癌関連抗原阻害に抵抗し、バースタンダー細胞死に介在し、確立されたヒト腫瘍の退縮に介在する。例えば、癌関連抗原発現腫瘍の不均一な場における低抗原腫瘍細胞は、近辺の抗原陽性癌細胞に対して先に反応している癌関連抗原の再指向免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)による間接的破壊を受け得る。

30

【0903】

ある面において、ある面において、本発明の完全ヒトCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)は、哺乳動物におけるエクスピボ免疫化および／またはインビボ治療のための1種のワクチンである。ある面において、哺乳動物は、ヒトである。

40

【0904】

エクスピボ免疫化に関して、次の少なくとも1つが、哺乳動物に細胞を投与する前にインビトロで起こる。i)細胞の増殖、ii)細胞へのCARをコードする核酸の導入またはiii)細胞の凍結保存および場合により、iv)ここに記載するように、PD1陽性免疫エフェクター細胞数減少、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞数増加、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比増加、ナイーブT細胞数増加、記憶T細胞前駆体数増加または記憶T細胞前駆体マーカーの発現レベル増加に十分な量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤との細胞の接触。

【0905】

50

エキスビボ過程は当分野で周知であり、下によりより詳細に記載する。簡潔には、細胞を哺乳動物(例えば、ヒト)から単離し、ここに記載するCARを発現するベクターで遺伝子修飾(すなわち、インビトロで形質導入またはトランスフェクト)する。CAR修飾細胞を、哺乳動物レシピエントに投与して、治療効果を提供できる。哺乳動物レシピエントはヒトであってよく、CAR修飾細胞はレシピエントに対して自己であり得る。あるいは、細胞は、レシピエントに対して同種、同系または異種であり得る。

【0906】

造血幹細胞および前駆細胞のエキスビボ増殖は、引用により本明細書に包含させる米国特許5,199,942号に記載されており、本発明の細胞に適用できる。他の適当な方法は当分野で既知であり、それゆえに、本発明は、細胞のエキスビボ増殖の特定の方法に制限されない。簡潔には、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)のエキスビボ培養および増殖は、(1)哺乳動物からの採取した末梢血または骨髓外植体からのCD34+造血幹細胞および前駆細胞回収;および(2)エキスビボでのこのような細胞の増殖を含み得る。米国特許5,199,942号に記載される細胞増殖因子に加えて、flt3L、IL-1、IL-3およびckitリガンドのような他の因子を細胞の培養および増殖に使用できる。

10

【0907】

エキスビボ免疫化の点で細胞ベースのワクチンを使用するのに加えて、本発明はまた患者における抗原に対する免疫応答を惹起するための、インビボ免疫化のための組成物および方法も提供する。

20

【0908】

一般に、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤の投与およびここに記載するような細胞活性化および増殖は、免疫不全の個体で生じる疾患の処置および予防に利用し得る。特に、本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、ここに記載するような癌関連抗原の発現と関係する疾患、障害および状態の処置に使用する。ある面において、本発明の細胞を、ここに記載するような癌関連抗原の発現と関係する疾患、障害および状態を発症するリスクのある患者の処置に使用する。それゆえに、本発明は、治療有効量の本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする対象に、投与することを含む、ここに記載するような癌関連抗原の発現と関係する疾患、障害および状態を処置または予防する方法を提供する。

30

【0909】

ここに記載するような癌関連抗原の発現と関係する非癌関連徴候は、例えば、自己免疫性疾患(例えば、狼瘡)、炎症性障害(アレルギーおよび喘息)および移植を含むが、これらに限定されない。

【0910】

本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、単独でまたは希釈剤および/またはIL-2または他のサイトカインまたは細胞集団のような他の成分と組み合わせて医薬組成物として投与し得る。

【0911】

ある態様において、対象は、CAR発現細胞の投与に関連する副作用を低減または緩和する薬剤を投与することができる。CAR発現細胞の投与に付随する副作用は、CRSおよびマクロファージ活性化症候群(MAS)とも呼ばれる血液貪食リンパ組織球増多症(HLH)を含むが、これらに限定されない。CRSの症状は、高熱、悪心、一過性低血圧、低酸素症などを含む。CRSは、発熱、疲労、食欲不振、筋肉痛、関節痛(arthralgias)、悪心、嘔吐、頭痛などの臨床的体質的徴候および症状を含み得る。CRSは、発疹などの臨床皮膚徴候および症状を含み得る。CRSは、悪心、嘔吐および下痢のような臨床的消化器徴候および症状を含み得る。CRSは、頻呼吸および低酸素血症のような臨床的呼吸器徴候および症状を含み得る。CRSは、頻脈、脈圧の増大、低血圧、心拍出量の増加(早期)および心拍出量の低下(後期)などの臨床的心血管徴候および症状を含み得る。CR

40

50

Sは、凝固兆候およびd-二量体増加、出血の有無にかかわらず低フィブリノーゲン血などの症状を含み得る。CRSは、高窒素血症などの臨床腎徴候および症状を含み得る。CRSは、高トランスアミナーゼ血症および高ビリルビン血症などの臨床肝徴候および症状を含み得る。CRSは、頭痛、精神状態の変化、混乱、せん妄、単語発見困難またはフラック失語、幻覚、振戦、ジメトリア、異常歩行、発作などの臨床的神経徴候および症状を含み得る。よって、ここに記載する方法は、対象にここに記載するCAR発現細胞を投与し、さらに、CAR発現細胞処置に由来する可溶性因子のレベル増加を管理する1以上の薬剤の投与を含み得る。ある態様において、対象で増加し得る可溶性因子は、IFN- γ 、TNF α 、IL-2およびIL-6の1以上である。ある態様において、対象において増加する因子は、IL-1、GM-CSF、IL-10、IL-8、IL-5およびフラクタルカインの1以上である。それゆえに、これらの副作用を処置するために投与する薬剤は、これらの可溶性因子の1以上を中和する薬剤であり得る。ある態様において、これらの可溶性形態の1以上を中和する薬剤は、抗体または抗原結合そのフラグメントである、このような薬剤の例は、ステロイド(例えば、コルチコステロイド)、TNF α 阻害剤およびIL-6阻害剤を含むが、これらに限定されない。TNF α 阻害剤の例は、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブベゴールおよびゴリムマブのような抗TNF α 抗体分子である。TNF α 阻害剤の他の例は、エタネルセプトのような融合タンパク質である。小分子TNF α 阻害剤は、キササンチン誘導体(例えばペントキシフィリン)およびブプロピオンを含むが、これらに限定されない。IL-6阻害剤の例は、トシリズマブ(toc)、サリルマブ、エルシリモマブ、CNTO 328、ALD518/BMS-945429、CNTO 136、CPSI-2364、CDP6038、VX30、ARGX-109、FE301およびFM101のような抗IL-6抗体分子である。ある態様において、抗IL-6抗体分子は、トシリズマブである。IL-1Rベースの阻害剤の例は、アナキンラである。

【0912】

ある態様において、リンパ球枯渇性化学療法剤を、対象にCAR細胞、例えば、ここに記載するCAR発現細胞の投与(例えば、点滴)前に、同時にまたは後に投与する。一例において、リンパ球枯渇性化学療法剤を、対象にCAR細胞投与前に投与する。例えば、リンパ球枯渇性化学療法剤は、CAR細胞点滴終了1~4日(例えば、1日、2日、3日または4日)前に終了する。ある態様において、例えば、ここに記載するように、複数用量のCAR細胞を投与する。例えば、単一用量は、約 5×10^8 CAR細胞を含む。ある態様において、リンパ球枯渇性化学療法剤を、ここに記載するCAR発現細胞の投与(例えば、点滴)前、同時または後に対象に投与する。

【0913】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞と組み合わせた低い免疫増強用量のmTOR阻害剤を、癌抗原の発現と関係する疾患、例えば、ここに記載する癌の処置のために、CD19 CAR発現細胞、例えば、引用により本明細書に包含させるWO2012/079000号に記載のような、例えば、CTL019と組み合わせて対象に投与する。理論に縛られないが、他のCAR発現細胞と組み合わせたCD19 CAR発現細胞の投与は、初期細胞系譜癌細胞、例えば、癌幹細胞を標的とすることにより、免疫応答を調節することにより、制御性B細胞を枯渇することによりおよび/または腫瘍微小環境を改善することにより、ここに記載するCAR発現細胞の効果を改善すると考えられる。例えば、CD19 CAR発現細胞は、初期細胞系譜マーカー、例えば、癌幹細胞およびCD19発現細胞を発現する癌細胞を標的とすることに対し、他のここに記載するCAR発現細胞は、後期細胞系譜マーカー、例えば、CD33を発現する癌細胞を標的とする。この前処理アプローチは、ここに記載するCAR発現細胞の効果を改善できる。このような態様において、CD19 CAR発現細胞を、第二CAR発現細胞の投与(例えば、点滴)前、同時または後に投与する。

【0914】

ある態様において、CD19以外の癌抗原を標的とするCARを発現するCAR発現細胞

胞は、CD19を標的とするCAR、例えば、CD19 CARも発現する。ある態様において、非CD19 CARおよびCD19 CARを発現する細胞を、ここに記載する癌、例えば、AMLの処置のために対象に投与する。ある態様において、一方または両方のCAR分子の配置は、一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。他の態様において、一方または両方のCAR分子の配置は、一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび2以上、例えば、2、3、4または5またはそれ以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。このような態様において、非CD19 CAR分子およびCD19 CARは、同一または異なる一次細胞内シグナル伝達ドメイン、同一または異なる共刺激性シグナル伝達ドメインまたは同数または異なる数の共刺激性シグナル伝達ドメインを有し得る。あるいは、非CD19 CARおよびCD19 CARは、スプリットCARとして配置され、そこで、CAR分子の一方は抗原結合ドメインおよび共刺激ドメイン(例えば、4-1BB)を含み、他のCAR分子は抗原結合ドメインおよび一次細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3ゼータ)を含む。

10

【0915】

血液癌

血液癌状態は、血液、骨髄およびリンパ系に影響する白血病、リンパ腫および悪性リンパ球増殖状態のようなタイプの癌である。

【0916】

白血病は急性白血病および慢性白血病に分類できる。急性白血病はさらに急性骨髄性白血病(AML)および急性リンパ性白血病(ALL)として分類され得る。慢性白血病は慢性骨髄性白血病(CML)および慢性リンパ系白血病(CLL)を含む。他の関連する状態は、骨髄球性血液細胞の産生不良(または異形成)によりまとめられる血液学的状態の多様なコレクションであり、AMLに癌化するリスクがある、骨髄異形成症候群(MDS、以前は“前白血病状態”として知られる)である。

20

【0917】

リンパ腫は、リンパ球から生じる血液細胞腫瘍の群である。代表的リンパ腫は非ホジキンリンパ腫およびホジキンリンパ腫を含む。

【0918】

組み合わせ治療

低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびここに記載するCAR発現細胞の投与を含むここに記載する方法を、他の既知薬剤および治療と組み合わせ使用し得る。

30

【0919】

ここで使用する“組み合わせ”投与は、2(またはそれ以上)の異なる処置を、対象が障害に苦しんでいる過程の間に対象に送達することを意味し、例えば、2以上の処置を、対象が障害と診断された後にかつ障害が治癒または撲滅される前にまたは処置が他の理由で中止される前に送達される。ある態様において、投与期間の重複があるように、一方の処置の送達は、第二の処置の送達開始時にまだ行われている。これは、ここでは“同時の”または“一緒にの送達”ということがある。他の態様において、他の態様において、一方の処置の送達は、他の処置の送達が始まる前に終わる。いずれかの場合のある態様において、処置は、組み合わせ投与のためにより有効である。例えば、第二処置剤はより有効である、例えば、等しい効果が少ない第二処置剤で見られるまたは第二処置剤が、第二処置剤を第一処置剤非存在下で投与したときに見られるよりも大きな程度で症状を軽減するまたは第一処置剤で同様な状況が見られる。ある態様において、送達、障害と関係する症状または他のパラメータの減少が、他方の処置剤の非存在下で一方の処置剤の送達で観察されるより大きい。2処置の効果は一部相加的、完全相加的または相加的より大きいものであり得る。送達は、送達した第一処置の効果、第二剤の送達時になお検出可能であるようなものであり得る。

40

【0920】

ここに記載するCAR発現細胞、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤および少なくとも

50

一つのさらなる治療剤を同時に、同じまたは別の組成物でまたは逐次的に投与できる。3剤を任意の順番で投与してよい。例えば、逐次投与において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤およびここに記載するCAR発現細胞をまず投与してよく、さらなる薬剤を次に投与してよく、または投与の順番は逆でよい。

【0921】

CAR治療および／または他の治療剤、方法またはモダリティを、活動性障害の期間または寛解または低活動性疾患の期間に投与できる。CAR治療を、他の処置の処置前、処置と同時、処置後または障害の寛解中に投与できる。

【0922】

組み合わせて投与するとき、CAR治療およびさらなる薬剤(例えば、第二または第三の薬剤)または全てを、個々に、例えば、単剤療法として使用する各薬剤の量または投与より高い、低いまたは同じ量または用量で投与できる。ある態様において、CAR治療、さらなる薬剤(例えば、第二または第三薬剤)または全ての投与される量または用量は、個々に、例えば、単剤療法として使用する各薬剤の量または用量より低い(例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%)。他の態様において、所望の効果(例えば、癌の処置)を生じるCAR治療、さらなる薬剤(例えば、第二または第三薬剤)または全ての投与される量または用量は、同じ治療効果を達成するのに必要な、個々に、例えば、単剤療法として使用する各薬剤の量または用量より低い(例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%低い)。

【0923】

さらなる面において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびここに記載するCAR発現細胞の投与を、手術、化学療法、放射線、mTOR経路阻害剤、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸およびFK506のような免疫抑制剤、抗体またはキャンパス、抗CD3抗体、シトキサン、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および照射のような他の免疫除去剤のような処置レジメンと組み合わせ使用し得る。Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971に記載のようなペプチドワクチン。

【0924】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびここに記載するCAR発現細胞の投与を、mTOR経路阻害剤、例えば、mTORを含む生物学的経路内にある、mTOR以外の標的に作用することにより、mTOR経路活性化を減少する薬剤と組み合わせ使用し得る。理論に縛られることを望まないが、ある態様において、mTOR阻害剤とmTOR経路阻害剤を組み合わせることにより、より増強されたmTOR阻害が達成できる。ある態様において、mTOR経路阻害剤は、メトホルミンまたはそのアナログ、薬学的に許容される形態またはプロドラッグのようなアデノシンモノホスフェート活性化タンパク質キナーゼ(AMPK)のアクティベーターである。ここでの非限定的な理論により、AMPK(例えば、メトホルミンによる)の刺激は、mTORリボソームS6キナーゼ経路の阻害にいたり得る。ある態様において、mTOR経路阻害剤は、ビタミンE、ビタミンA、抗細菌抗生物質、抗酸化剤、L-カルニチン、リポ酸、メトホルミン、レスベラトロール、レプチン、非ステロイド抗炎症剤またはCOX阻害剤またはそのアナログ、薬学的に許容される形態またはプロドラッグからなる群から選択される。ある態様において、mTOR経路阻害剤は、国際出願WO2010/056754号またはWO2008/110491号またはLiu et al, Anticancer Res., 32: 1627-1638 (2012)に記載され、その各々を、引用によりその全体を本明細書に包含させる。

【0925】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびここに記載するCAR発現細胞の投

与を、化学療法剤と組み合わせて使用できる。化学療法剤の例は、アントラサイクリン(例えば、ドキソルビシン(例えば、リポソームドキソルビシン))、ビンカアルカロイド(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、ダカルバジン、メルファラン、イホスファミド、テモゾロミド)、免疫細胞抗体(例えば、アレムツズマブ、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、葉酸アンタゴニスト、ピリミジンアナログ、プリンアナログおよびアデノシンデアミナーゼ阻害剤(例えば、フルダラビン))、mTOR阻害剤、TNFRグルココルチコイド誘発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、レナリドマイド)のような免疫調節剤を含む。

10

【0926】

低い免疫増強用量のmTORおよびCAR細胞療法と組み合わせて使用する一般的化学療法剤は、アナストロゾール(アリミデックス(登録商標))、ビカルタミド(カソデックス(登録商標))、硫酸ブレオマイシン(Blenoxane(登録商標))、ブスルファン(マイレラン(登録商標))、ブスルファン注(ブスルフェクス(登録商標))、カペシタビン(ゼローダ(登録商標))、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシ-5-フルオロシチジン、カルボプラチン(パラプラチン(登録商標))、カルムスチン(BiCNU(登録商標))、クロラムブシル(リュウケラン(登録商標))、シスプラチン(Platinol(登録商標))、クラドリビン(ロイスタチン(登録商標))、シクロホスファミド(シトキササン(登録商標))またはNeosar(登録商標))、シタラビン、シトシンアラビノシド(Cytosar-U(登録商標))、シタラビンリポソーム注射(DepoCyt(登録商標))、ダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))、ダクチノマイシン(アクチノマイシンD、Cosmegam)、塩酸ダウノルビシン(Cerubidine(登録商標))、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射(DaunoXome(登録商標))、デキサメサゾン、ドセタキセル(タキソテル(登録商標))、塩酸ドキソルビシン(アドリアマイシン(登録商標))、Rubex(登録商標))、エトポシド(ベプシド(登録商標))、リン酸フルダラビン(フルダラ(登録商標))、5-フルオロウラシル(アドルシル(登録商標))、エフデックス(登録商標))、フルタミド(Eulexin(登録商標))、テザシチビン、ゲムシタビン(ジフルオロデオキシシチジン)、ヒドロキシ尿素(ハイドレア(登録商標))、イダルビシン(イダマイシン(登録商標))、イホスファミド(IFE(登録商標))、イリノテカン(Camptosar(登録商標))、L-アスパラギナーゼ(ELSPAR(登録商標))、ロイコボリンカルシウム、メルファラン(アルケラン(登録商標))、6-メルカプトプリン(ピュリネソール(登録商標))、メトトレキサート(Folex(登録商標))、ミトキサントロン(ノバントロン(登録商標))、マイロタッグ、パクリタキセル(タキソール(登録商標))、phoenix(イットリウム90/MX-DTPA)、ペントスタチン、ポリフェプロザン20とカルムスチンインプラント(グリアデル(登録商標))、クエン酸タモキシフェン(ノルバデックス(登録商標))、テニポシド(Vumon(登録商標))、6-チオグアニン、チオテパ、チラパザミン(Tirazone(登録商標))、注射用塩酸トポテカン(ハイカムチン(登録商標))、ビンブラスチン(Velban(登録商標))、ビンクリスチン(オンコビン(登録商標))およびビノレルビン(ナベルビン(登録商標))を含む。

20

30

40

【0927】

本発明の化合物と組み合わせるための特に興味深い抗癌剤は、アントラサイクリン；アルキル化剤；代謝拮抗剤；カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンまたはp70S6キナーゼFK506)を阻害するまたはp70S6キナーゼを阻害する薬剤；mTOR阻害剤(例えば、癌処置に適する用量)；免疫調節剤；アントラサイクリン；ビンカアルカロイド；プロテオソーム阻害剤；GITRアゴニストタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；CDK4キナーゼ阻害剤；BTK阻害剤；MKNキナーゼ阻害剤；DGKキナーゼ阻害剤；または腫瘍溶解性ウイルスを含む。

【0928】

50

代謝拮抗剤の例は、ピリミジンアナログ、プリンアナログおよびアデノシンデアミナーゼ阻害剤：メトトレキサート(リウマトレックス(登録商標)、Trexall(登録商標))、5-フルオロウラシル(Adrucil(登録商標)、エフデックス(登録商標)、フルオロプレクス(登録商標))、フロクスウリジン(FUDF(登録商標))、シタラビン(Cytosar-U(登録商標)、Tarabine PFS)、6-メルカプトプリン(プリントール(登録商標))、6-チオグアニン(チオグアニンTabloid(登録商標))、リン酸フルダラビン(フルダラ(登録商標))、ペントスタチン(Nipent(登録商標))、ペメトレキセド(アリムタ(登録商標))、ラルチトレキセド(トムデックス(登録商標))、クラドリビン(ロイスタチン(登録商標))、クロファラビン(Clofarex(登録商標)、クロラール(登録商標))、アザシチジン(ビダーザ(登録商標))、デシタビンおよびゲムシタビン(ジェムザール(登録商標))を含むが、これらに限定されない。好ましい代謝拮抗剤は、シタラビン、クロファラビンおよびフルダラビンを含む。

10

【0929】

低い免疫増強用量のmTORおよびCAR細胞療法と組み合わせて使用するアルキル化剤の例は、窒素マスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネート、ニトロソウレア類およびトリアゼン：ウラシルマスタード(アミノウラシルマスタード(登録商標)、Chlorethaminacil(登録商標)、Demethyldopan(登録商標)、Desmethyldopan(登録商標)、Haemanthamine(登録商標)、Nordopan(登録商標)、Uracil nitrogen mustard(登録商標)、Uracil lost(登録商標)、Uracil mostaza(登録商標)、ウラムスチン(登録商標)、ウラムスチン(登録商標))、クロルメチン(Mustargen(登録商標))、シクロホスファミド(シトキサン(登録商標)、Neosar(登録商標)、Clafen(登録商標)、エンドキサン(登録商標)、Procyttox(登録商標)、Revimmune™)、イホスファミド(Mitoxana(登録商標))、メルファラン(アルケラン(登録商標))、クロラムブシル(リューケラン(登録商標))、ピボプロマン(Amedel(登録商標)、Vercyte(登録商標))、トリエチレンメラミン(ヘメル(登録商標)、Hexalen(登録商標)、Hexastat(登録商標))、トリエチレンチオホスホロアミン、テモゾロミド(テモダール(登録商標))、チオテパ(Thioplex(登録商標))、ブスルファン(Busilvex(登録商標)、マイレラン(登録商標))、カルムスチン(BiCNU(登録商標))、ロムスチン(CeeNU(登録商標))、ストレプトゾシン(Zanosar(登録商標))およびダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))を含むが、これらに限定されないロムスチン(CeeNU(登録商標))、ストレプトゾシン(Zanosar(登録商標))およびダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))。アルキル化剤のさらなる例は、オキサリプラチン(エロキサチン(登録商標))；テモゾロミド(テモダール(登録商標))およびテモダール(登録商標))；ダクチノマイシン(別名アクチノマイシン-D、コスメゲン(登録商標))；メルファラン(別名L-PAM、L-サルコリシンおよびフェニアラニンマスタード、アルケラン(登録商標))；アルトレタミン(別名ヘキサメチルメラミン(HMM)、Hexalen(登録商標))；カルムスチン(BiCNU(登録商標))；ベンダムスチン(Treanda(登録商標))；ブスルファン(ブスルフェクス(登録商標))およびマイレラン(登録商標))；カルボプラチン(パラプラチン(登録商標))；ロムスチン(別名CCNU、CeeNU(登録商標))；シスプラチン(別名CDDP、Platinol(登録商標))およびPlatinol(登録商標)-AQ)；クロラムブシル(リューケラン(登録商標))；シクロホスファミド(シトキサン(登録商標))およびNeosar(登録商標))；ダカルバジン(別名DTIC、DICおよびイミダゾールカルボキサミド、DTIC-Dome(登録商標))；アルトレタミン(別名ヘキサメチルメラミン(HMM)、Hexalen(登録商標))；イホスファミド(Iflex(登録商標))；Prednumustine；プロカルバジン(Matulane(登録商標))；メクロレタミン(別名窒素マスタード、ムスチンおよび塩酸メクロロエタミン、Mustargen(登録商標))；ストレプトゾシン(Zanosar(登録商標))；チオテパ(別名チオホスホアミド、TESPAおよびTSPA、Thioplex(登録商標))；シクロホスファミド(エンドキサン(登録商

20

30

40

50

標)、シトキサン(登録商標)、Neosar(登録商標)、Procyt ox(登録商標)、Rev immune(登録商標));およびベンダムスチンHCl(Treanda(登録商標))を含むが、これらに限定されない。

【0930】

低い免疫増強用量のmTORおよびCAR細胞療法と組み合わせて使用する免疫調節剤の例は、例えば、アフツズマブ(Roch e(登録商標)から入手可能);ペグフィルグラスチム(Neulasta(登録商標));レナリドマイド(CC-5013、レブリミド(登録商標));サリドマイド(サロミド(登録商標))、ボマリドミド、act imid(CC4047);およびIRX-2(インターロイキン1、インターロイキン2およびインターフェロン γ を含むヒトサイトカイン混合物、CAS 951209-71-5、IRX Therapeuticsから入手可能)を含む。

【0931】

低い免疫増強用量のmTORおよびCAR細胞療法と組み合わせて使用するアントラサイクリンの例は、例えば、ドキシルビシン(アドリアマイシン(登録商標)およびRube x(登録商標));ブレオマイシン(lenoxane(登録商標));ダウノルビシン(塩酸ダウノルビシン、ダウノマイシンおよび塩酸ルビドマイシン、Cerubidine(登録商標));ダウノルビシンリボソーム(クエン酸ダウノルビシンリボソーム、DaunoXome(登録商標));ミトキサントロン(DHAD、ノバントロン(登録商標));エピルビシン(El lenceTM);イダルビシン(イダマイシン(登録商標)、イダマイシンPFS(登録商標));マイトマイシンC(ムタマイシン(登録商標));ゲルダナマイシン;ハービマイシン;ラビドマイシン;およびデスアセチルラビドマイシンを含む。

【0932】

低い免疫増強用量のmTORおよびCAR細胞療法と組み合わせて使用するビンカアルカロイドの例は、例えば、酒石酸ビンOREルビン(ナベルビン(登録商標))、ビンクリスチン(オンコビン(登録商標))およびビンデシン(El dis ine(登録商標));ビンブラスチン(別名硫酸ビンブラスチン、ビンカロイコブラスチンおよびVLB、Alkab an-AQ(登録商標)およびVeban(登録商標));およびビンOREルビン(ナベルビン(登録商標))を含む。

【0933】

低い免疫増強用量のmTORおよびCAR細胞療法と組み合わせて使用するプロテオソーム阻害剤の例は、ボルテゾミブ(ベルケイド(登録商標));カーフィルゾミブ(PX-171-007、(S)-4-メチル-N-(((S)-1-(((S)-4-メチル-1-((R)-2-メチルオキシラン-2-イル)-1-オキソペンタン-2-イル)アミノ)-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル)-2-((S)-2-(2-モルホリノアセトアミド)-4-フェニルブタンアミド)-ペンタンアミド);マリゾミブ(NPI-0052);イキサゾミブクエン酸エステル(MLN-9708);デランゾミブ(CEP-18770);およびO-メチル-N-[(2-メチル-5-チアゾリル)カルボニル]-L-セリル-O-メチル-N-[(1S)-2-[(2R)-2-メチル-2-オキシラニル]-2-オキソ-1-(フェニルメチル)エチル]-L-セリンアミド(ONX-0912)を含む。

【0934】

低い免疫増強用量のmTORおよびCAR細胞療法と組み合わせて使用するGITRアゴニストの例は、例えば、米国特許6,111,090号、欧州特許090505B1号、米国特許8,586,023号、PCT公開WO2010/003118号および2011/090754号に記載のGITR融合タンパク質または例えば、米国特許7,025,962号、欧州特許1947183B1号、米国特許7,812,135号、米国特許8,388,967号、米国特許8,591,886号、欧州特許EP1866339号、PCT公開WO2011/028683号、PCT公開WO2013/039954号、PCT公開WO2005/007190号、PCT公開WO2007/133822号、PCT公開WO2005/055808号、PCT公開WO99/40196号、PCT公開WO2001/03720号、PCT公開WO99/20758号、PCT公開WO200

6/083289号、PCT公開WO2005/115451号、米国特許7,618,632号およびPCT公開WO2011/051726号に記載の抗GITR抗体のような、例えば、GITR融合タンパク質および抗GITR抗体(例えば、二価抗GITR抗体)を含む。

【0935】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびここに記載するCARを発現する細胞を、T_{reg}細胞集団を減少させる分子と組み合わせて対象に投与する。T_{reg}細胞数を減らす(例えば、枯渇させる)方法は当分野で知られ、例えば、CD25枯渇、シクロホスファミド投与およびGITR機能修飾を含む。理論に縛られることを望まないが、アフエーシス前またはここに記載するCAR発現細胞投与前に対象におけるT_{reg}細胞数を減らすことは、腫瘍微小環境における望まない免疫細胞(例えば、T_{reg})の数を減らし、対象の再発のリスクを減らすと考えられる。ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびここに記載するCAR発現細胞を、対象に、制御性T細胞(T_{reg})を枯渇させるGITRアゴニストおよび/またはGITR抗体のようなGITRを標的とするおよび/またはGITR機能を調節する分子と組み合わせて投与する。ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびここに記載するCAR発現細胞を、対象にシクロホスファミドと組み合わせて投与する。ある態様において、GITR結合分子および/またはGITR機能を調節する分子(例えば、GITRアゴニストおよび/またはT_{reg}枯渇GITR抗体)を、CAR発現細胞の投与前に投与する。例えば、ある態様において、GITRアゴニストを、細胞のアフエーシス前に投与できる。ある態様において、シクロホスファミドを、対象にCAR発現細胞の投与(例えば、注入または再注入)前または細胞のアフエーシス前に投与する。ある態様において、シクロホスファミドおよび抗GITR抗体を、対象にCAR発現細胞の投与(例えば、注入または再注入)前または細胞のアフエーシス前に投与する。ある態様において、対象は癌(例えば、固形癌またはALLまたはCLLのような血液癌)を有する。ある態様において、対象はCLLを有する。ある態様において、対象は固形癌、例えば、ここに記載する固形癌を有する。

【0936】

GITRアゴニストの例は、例えば、米国特許6,111,090号、欧州特許090505B1号、米国特許8,586,023号、PCT公開WO2010/003118号および2011/090754号に記載のGITR融合タンパク質または、例えば、米国特許7,025,962号、欧州特許1947183B1号、米国特許7,812,135号、米国特許8,388,967号、米国特許8,591,886号、欧州特許EP1866339号、PCT公開WO2011/028683号、PCT公開WO2013/039954号、PCT公開WO2005/007190号、PCT公開WO2007/133822号、PCT公開WO2005/055808号、PCT公開WO99/40196号、PCT公開WO2001/03720号、PCT公開WO99/20758号、PCT公開WO2006/083289号、PCT公開WO2005/115451号、米国特許7,618,632号およびPCT公開WO2011/051726号抗GITR抗体に記載のような、例えば、GITR融合タンパク質および抗GITR抗体(例えば、二価抗GITR抗体)を含む。

【0937】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤およびここに記載するCAR発現細胞を、キナーゼ阻害剤と組み合わせて使用できる。

【0938】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、MNK阻害剤、例えば、CGP052088；4-アミノ-3-(p-フルオロフェニルアミノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(CG

10

20

30

40

50

P 5 7 3 8 0) ; セルコスポラミド ; E T C - 1 7 8 0 4 4 5 - 2 ; および 4 - アミノ - 5 - (4 - フルオロアニリノ) - ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジンから選択される MNK 阻害剤である。MNK 阻害剤は、例えば、MNK 1 a、MNK 1 b、MNK 2 a および / または MNK 2 b 阻害剤であり得る。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、4 - アミノ - 5 - (4 - フルオロアニリノ) - ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジンである。

【 0 9 3 9 】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、7 - シクロペンチル - N , N - ジメチル - 2 - ((5 - (ピペラジン - 1 - イル) ピリジン - 2 - イル) アミノ) - 7 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 6 - カルボキサミド (L E E 0 1 1 と呼ばれる) ; アロイシン A ; フラボピリドールまたは H M R - 1 2 7 5 、 2 - (2 - クロロフェニル) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 8 - [(3 S , 4 R) - 3 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 4 - ピペリジニル] - 4 - クロメノン ; クリゾチニブ (P F - 0 2 3 4 1 0 6 6) ; 2 - (2 - クロロフェニル) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 8 - [(2 R , 3 S) - 2 - (ヒドロキシメチル) - 1 - メチル - 3 - ピロリジニル] - 4 H - 1 - ベンゾピラン - 4 - オン、塩酸塩 (P 2 7 6 - 0 0) ; 1 - メチル - 5 - [[2 - [5 - (トリフルオロメチル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] - 4 - ピリジニル] オキシ] - N - [4 - (トリフルオロメチル) フェニル] - 1 H - ベンズイミダゾール - 2 - アミン (R A F 2 6 5) ; インジスラム (E 7 0 7 0) ; ロスコビチン (C Y C 2 0 2) ; パルボシクリブ (P D 0 3 3 2 9 9 1) ; ジナシクリブ (S C H 7 2 7 9 6 5) ; N - [5 - [[(5 - t e r t - ブチルオキサゾール - 2 - イル) メチル] チオ] チアゾール - 2 - イル] ピペリジン - 4 - カルボキサミド (B M S 3 8 7 0 3 2) ; 4 - [[9 - クロロ - 7 - (2 , 6 - ジフルオロフェニル) - 5 H - ピリミド [5 , 4 - d] [2] ベンズアゼピン - 2 - イル] アミノ] - 安息香酸 (M L N 8 0 5 4) ; 5 - [3 - (4 , 6 - ジフルオロ - 1 H - ベンズイミダゾール - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 5 - イル] - N - エチル - 4 - メチル - 3 - ピリジンメタンアミン (A G - 0 2 4 3 2 2) ; 4 - (2 , 6 - ジクロロベンゾイルアミノ) - 1 H - ピラゾール - 3 - カルボン酸 N - (ピペリジン - 4 - イル) アミド (A T 7 5 1 9) ; 4 - [2 - メチル - 1 - (1 - メチルエチル) - 1 H - イミダゾール - 5 - イル] - N - [4 - (メチルスルホニル) フェニル] - 2 - ピリミジンアミン (A Z D 5 4 3 8) ; および X L 2 8 1 (B M S 9 0 8 6 6 2) から選択される CDK 4 阻害剤である。

【 0 9 4 0 】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、CDK 4 阻害剤、例えば、ここに記載する CDK 4 阻害剤、例えば、7 - シクロペンチル - N , N - ジメチル - 2 - ((5 - (ピペラジン - 1 - イル) ピリジン - 2 - イル) アミノ) - 7 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 6 - カルボキサミド (L E E 0 1 1 と呼ばれる) または 6 - アセチル - 8 - シクロペンチル - 5 - メチル - 2 - (5 - ピペラジン - 1 - イル - ピリジン - 2 - イルアミノ) - 8 H - ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 - オン、塩酸塩 (パルボシクリブまたは P D 0 3 3 2 9 9 1 と呼ばれる) のような、例えば、CDK 4 / 6 阻害剤である。

【 0 9 4 1 】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は CDK 4 阻害剤、例えば、パルボシクリブ (P D 0 3 3 2 9 9 1) であり、パルボシクリブを、一定期間、1 日約 5 0 mg、6 0 mg、7 0 mg、7 5 mg、8 0 mg、9 0 mg、1 0 0 mg、1 0 5 mg、1 1 0 mg、1 1 5 mg、1 2 0 mg、1 2 5 mg、1 3 0 mg、1 3 5 mg (例えば、7 5 mg、1 0 0 mg または 1 2 5 mg) の用量で、例えば、2 8 日サイクルの 1 4 ~ 2 1 日間連日または 2 1 日サイクルの 7 ~ 1 2 日間連日投与する。ある態様において、1 サイクル、2 サイクル、3 サイクル、4 サイクル、5 サイクル、6 サイクル、7 サイクル、8 サイクル、9 サイクル、1 0 サイクル、1 1 サイクル、1 2 サイクルまたはそれ以上のパルボシクリブを投与する。

【 0 9 4 2 】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、イブルチニブ (P C I - 3 2 7 6 5) ; G D C - 0 8 3 4 ; R N - 4 8 6 ; C G I - 5 6 0 ; C G I - 1 7 6 4 ; H M - 7 1 2 2 4 ; C C - 2 9 2 ; O N O - 4 0 5 9 ; C N X - 7 7 4 ; および L F M - A 1 3 から選択される BTK 阻害剤である。好ましい態様において、BTK 阻害剤はインターロイキン - 2 - 誘導

10

20

30

40

50

性キナーゼ(I T K)のキナーゼ活性を低減または阻害せず、G D C - 0 8 3 4 ; R N - 4 8 6 ; C G I - 5 6 0 ; C G I - 1 7 6 4 ; H M - 7 1 2 2 4 ; C C - 2 9 2 ; O N O - 4 0 5 9 ; C N X - 7 7 4 ; および L F M - A 1 3 から選択される。

【 0 9 4 3 】

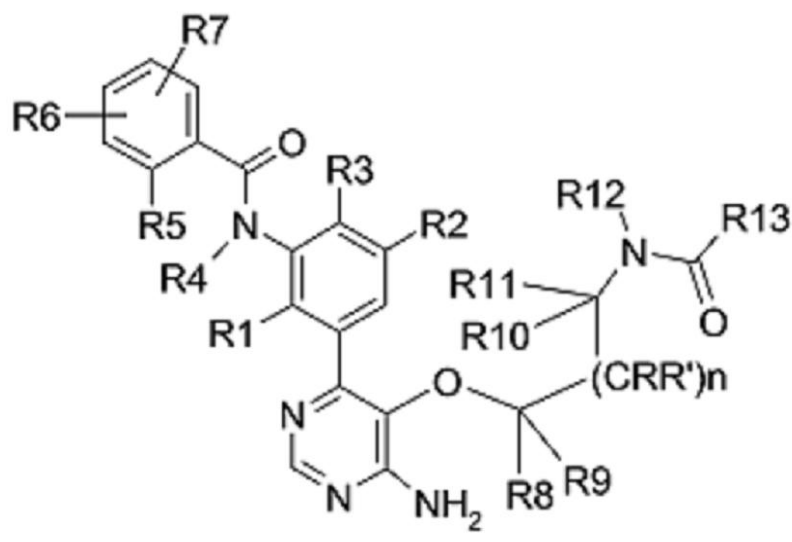
ある態様において、キナーゼ阻害剤は B T K 阻害剤、例えば、イブルチニブ(P C I - 3 2 7 6 5)であり、イブルチニブを、約 2 5 0 mg、3 0 0 mg、3 5 0 mg、4 0 0 mg、4 2 0 mg、4 4 0 mg、4 6 0 mg、4 8 0 mg、5 0 0 mg、5 2 0 mg、5 4 0 mg、5 6 0 mg、5 8 0 mg、6 0 0 mg(例えば、2 5 0 mg、4 2 0 mgまたは5 6 0 mg)の用量で、連日一定期間、例えば、2 1 日サイクルで連日または2 8 日サイクルで連日投与する。ある態様において、1 サイクル、2 サイクル、3 サイクル、4 サイクル、5 サイクル、6 サイクル、7 サイクル、8 サイクル、9 サイクル、1 0 サイクル、1 1 サイクル、1 2 サイクルまたはそれ以上のイブルチニブを投与する。

10

【 0 9 4 4 】

ここでの方法、使用および組成物のある態様において、B T K 阻害剤は、引用によりその全体を本明細書に包含させる国際出願 W O / 2 0 1 5 / 0 7 9 4 1 7 号に記載の B T K 阻害剤である。例えば、ある態様において、B T K 阻害剤は、式(I)の化合物またはその薬学的に許容される塩である。

【 化 1 2 】



20

30

(I)

〔 式 中、

R 1 は水素、場合によりヒドロキシで置換されていてよい C ₁ - C ₆ アルキルであり；

R 2 は水素またはハロゲンであり；

R 3 は水素またはハロゲンであり；

R 4 は水素であり、

R 5 は水素またはハロゲンであり；

または R 4 と R 5 は互いに結合し、結合、- C H ₂ -、- C H ₂ - C H ₂ -、- C H = C H -、- C H = C H - C H ₂ -；- C H ₂ - C H = C H -；または- C H ₂ - C H ₂ - C H ₂ -を意味し；

40

R 6 および R 7 は互いに独立してH、場合によりヒドロキシで置換されていてよい C ₁ - C ₆ アルキル、場合によりハロゲンまたはヒドロキシまたはハロゲンで置換されていてよい C 3 - C 6 シクロアルキルであり；

R 8、R 9、R、R'、R 1 0 および R 1 1 は互いに独立してHまたは場合により C ₁ - C ₆ アルコキシで置換されていてよい C ₁ - C ₆ アルキルであり；または R 8、R 9、R、R'、R 1 0 および R 1 1 の任意の 2 個は、それらが結合している炭素原子と一体となって 3 ~ 6 員飽和炭素環式環を形成してよく；

R 1 2 は水素または場合によりハロゲンもしくは C ₁ - C ₆ アルコキシで置換されていて

50

よい $C_1 - C_6$ アルキルであり；

または R_{12} と R_8 、 R_9 、 R 、 R' 、 R_{10} または R_{11} のいずれか一つは、それらが結合している原子と一体となって、4員、5員、6員または7員アザシクロ環を形成してよく、該環は場合によりハロゲン、シアノ、ヒドロキシル、 $C_1 - C_6$ アルキルまたは $C_1 - C_6$ アルコキシで置換されていてよく；

n は0または1であり；

R_{13} は場合により $C_1 - C_6$ アルキルで置換されていてよい $C_2 - C_6$ アルケニル、 $C_1 - C_6$ アルコキシまたは場合により $C_1 - C_6$ アルキルもしくは $C_1 - C_6$ アルコキシで置換されていてよい N 、 N -ジ- $C_1 - C_6$ アルキルアミノ $C_2 - C_6$ アルケニル；または場合により $C_1 - C_6$ アルキルで置換されていてよい $C_2 - C_6$ アルキレニルオキシドである。〕。

10

【0945】

ある態様において、式 I の BTK 阻害剤は、 $N-(3-(5-((1-アクリロイルアゼチジン-3-イル)オキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $(E)-N-(3-(6-アミノ-5-((1-(ブト-2-エノイル)アゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(3-(6-アミノ-5-((1-プロピオロイルアゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(3-(6-アミノ-5-((1-(ブト-2-イノイル)アゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(3-(5-((1-アクリロイルピペリジン-4-イル)オキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルアクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $(E)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブト-2-エンアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルプロピオ1アミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $(E)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(4-メトキシ-N-メチルブト-2-エンアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブト-2-インアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(2-((4-アミノ-6-(3-(4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルオキシラン-2-カルボキサミド$ ； $N-(2-((4-アミノ-6-(3-(6-シクロプロピル-8-フルオロ-1-オキソイソキノリン-2(1H)-イル)フェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルアクリルアミド$ ； $N-(3-(5-(2-アクリルアミドエトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-エチルアクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-(2-フルオロエチル)アクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $N-(3-(5-((1-アクリルアミドシクロプロピル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド$ ； $(S)-N-(3-(5-(2-アクリルアミドプロボキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4$

20

30

40

50

-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-
 -(ブト-2-インアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチ
 ルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-
 アミノ-5-(2-(N-メチルアクリルアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-
 フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (
 S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブト-2-インアミド)プロポキシ)
 ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-
 フルオロベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(3-(N-メチルアクリルアミド
)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロ
 プロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(5-((1-アクリロイルピロリ
 ジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メ
 チルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-
 アミノ-5-((1-(ブト-2-イノイル)ピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン
 -4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロ
 ベンズアミド; (S)-2-(3-(5-((1-アクリロイルピロリジン-2-イル)メトキシ
)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニ
 ル)-6-シクロプロピル-3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オンN-(2-((
 4-アミノ-6-(3-(6-シクロプロピル-1-オキソ-3,4-ジヒドロイソキノリ
 ン-2(1H)-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)ピリミジン-5
 -イル)オキシ)エチル)-N-メチルアクリルアミド; N-(3-(5-(((2S,4R)-1
 -アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジ
 ン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロ
 ベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(((2S,4R)-1-(ブト-2-イノイル)
 -4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ
 -2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; 2-(3-(
 5-(((2S,4R)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)
 -6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル
 -6-シクロプロピル-3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オンN-(3-(5-(
 ((2S,4S)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-
 アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロ
 ピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(((2S,4S)-1-(ブト
 -2-イノイル)-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)
 -5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミ
 ド; N-(3-(5-(((2S,4R)-1-アクリロイル-4-フルオロピロリジン-2-
 イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニ
 ル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; N-(3-(6-アミノ-5-(((
 2S,4R)-1-(ブト-2-イノイル)-4-フルオロピロリジン-2-イル)メトキシ)
 ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2
 -フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(5-((1-アクリロイルアゼチジン-2-イ
 ル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)
 -4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)-N-(3-(6-アミノ-5-
 ((1-プロピオイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フ
 ルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (S)
 -2-(3-(5-((1-アクリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリ
 ミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)-6-シクロプロ
 ピル-3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オン; (R)-N-(3-(5-((1-ア
 クリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-
 フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド; (R)
)-N-(3-(5-((1-アクリロイルピペリジン-3-イル)メトキシ)-6-アミノピ
 リミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-

10

20

30

40

50

フルオロベンズアミド；N-(3-(5-(((2R,3S)-1-アクリロイル-3-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(5-(((2S,4R)-1-アクリロイル-4-シアノピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；またはN-(3-(5-(((2S,4S)-1-アクリロイル-4-シアノピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミドから選択される。

【0946】

特に断らない限り、上記式 I の BTK 阻害剤で使用した化学的用語は、引用によりその全体を本明細書に包含させる国際出願 WO/2015/079417 号に示す意味に従い使用する。

【0947】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は mTOR 阻害剤である。mTOR 阻害剤は、mTOR 阻害剤なる表題の本明細書の他の箇所における選択肢から選択できる。ここでいう用量は低い免疫増強用量の mTOR 阻害剤ではなく、抗癌効果を発揮するのに十分な用量であり、例えば、ここに記載する低い免疫増強用量より高い、用量である。それゆえに、ある態様において、2種の異なる用量の mTOR 阻害剤、例えば、免疫エフェクター細胞機能を最適化するための低い免疫増強用量、および抗癌効果を得るための高用量を与える。

【0948】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は mTOR 阻害剤、例えば、ラパマイシンであり、ラパマイシンを、抗癌効果を得るのに十分であり、かつここに記載する低い免疫増強用量より高い用量、例えば、約 3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg (例えば、6 mg) の用量で連日、一定期間、例えば、21 日サイクルで連日または 28 日サイクルで連日投与する。ある態様において、1 サイクル、2 サイクル、3 サイクル、4 サイクル、5 サイクル、6 サイクル、7 サイクル、8 サイクル、9 サイクル、10 サイクル、11 サイクル、12 サイクルまたはそれ以上のラパマイシンを投与する。

【0949】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は mTOR 阻害剤、例えば、エベロリムスであり、エベロリムスを、抗癌効果を得るのに十分であり、かつここに記載する低い免疫増強用量より高い用量、例えば、一定期間、1 日約 2 mg、2.5 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg (例えば、10 mg) の用量で、例えば、28 日サイクルで連日投与する。ある態様において、1 サイクル、2 サイクル、3 サイクル、4 サイクル、5 サイクル、6 サイクル、7 サイクル、8 サイクル、9 サイクル、10 サイクル、11 サイクル、12 サイクルまたはそれ以上のエベロリムスを投与する。

【0950】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチルピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF-04691502)；N-[4-[[4-(ジメチルアミノ)-1-ピペリジニル]カルボニル]フェニル]-N'-[4-(4,6-ジ-4-モルホリニル-1,3,5-トリアジン-2-イル)フェニル]尿素(PF-05212384、PKI-587)；2-メチル-2-{4-[3-メチル-2-オキソ-8-(キノリン-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]フェニル}プロパンニトリル(BEZ-235)；アピトリシブ(GDC-0980、RG7422)；2,4-ジフルオロ-N-{2-(メチルオキシ)-5-[4-(4-ピリダジニル)-6-キノリニル]-3-ピリジニル}ベンゼンスルホンアミド(GSK2126458)；8-(6-メトキシピリジン-3-イル)-3-メチル-1-(4-(ピペラジン-1-イル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-

2(3H)-オンマレイン酸(NVP-BGT226); 3-[4-(4-モルホリニルピリド[3',2':4,5]フロ[3,2-d]ピリミジン-2-イル)フェノール(PI-103); 5-(9-イソプロピル-8-メチル-2-モルホリノ-9H-プリン-6-イル)ピリミジン-2-アミン(VS-5584、SB2343); およびN-[2-[(3,5-ジメトキシフェニル)アミノ]キノキサリン-3-イル]-4-[(4-メチル-3-メトキシフェニル)カルボニル]アミノフェニルスルホンアミド(XL765)から選択されるデュアルホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)およびmTOR阻害剤である。

【0951】

カルシウム依存的ホスファターゼカルシニューリンを阻害する(シクロスポリンおよびFK506)または増殖因子誘発シグナル伝達に重要であるp70S6キナーゼを阻害する薬物(ラパマイシン)(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)も使用できる。

10

【0952】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、対象にCD20阻害剤、例えば、抗CD20抗体(例えば、抗CD20単一または二重特異的抗体)またはそのフラグメントと組み合わせて投与する。抗CD20抗体の例は、リツキシマブ、オファツムマブ、オクレリズマブ、ベルツズマブ、オビヌツズマブ、TRU-015(Trubion Pharmaceuticals)、オカラツズマブおよびPro131921(Genentech)を含むが、これらに限定されない。例えば、Lim et al. Haematologica. 95.1(2010):135-43参照。

20

【0953】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、腫瘍溶解性ウイルスと組み合わせて投与する。ある態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞内で選択的に複製し、その死を誘発するかまたは増殖を遅延することができる。ある場合、腫瘍溶解性ウイルスは、非癌細胞に効果を有しないか効果が最小である。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍溶解性アデノウイルス、腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス、腫瘍溶解性レトロウイルス、腫瘍溶解性パルボウイルス、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、腫瘍溶解性シンドビスウイルス、腫瘍溶解性インフルエンザウイルスまたは腫瘍溶解性RNAウイルス(例えば、腫瘍溶解性レオウイルス、腫瘍溶解性ニューカッスル病ウイルス(NDV)、腫瘍溶解性麻疹ウイルスまたは腫瘍溶解性水疱性口内炎ウイルス(VSV))を含むが、これらに限定されない。

30

【0954】

ある態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、その全体を引用により本明細書に包含させるUS2010/0178684A1号に記載のウイルス、例えば、組み換え腫瘍溶解性ウイルスである。ある態様において、組み換え腫瘍溶解性ウイルスは、例えば、その全体を引用により本明細書に包含させるUS2010/0178684A1号に記載のような、免疫または炎症性応答の阻害剤をコードする核酸配列(例えば、異種核酸配列)を含む。ある態様において、組み換え腫瘍溶解性ウイルス、例えば、腫瘍溶解性NDVは、アポトーシス促進性タンパク質(例えば、アポブチン)、サイトカイン(例えば、GM-CSF、インターフェロン-ガンマ、インターロイキン-2(IL-2)、腫瘍壊死因子-アルファ)、免疫グロブリン(例えば、ED-Bフィブロネクチンに対する抗体)、腫瘍関連抗原、二特異性アダプタータンパク質(例えば、NDV HNタンパク質およびCD3またはCD28のようなT細胞共刺激性受容体に対する二特異性抗体または抗体フラグメント; またはヒトIL-2およびNDV HNタンパク質に対する一本鎖抗体の融合タンパク質)を含む。例えば、引用によりその全体を本明細書に包含させるZamarin et al. Future Microbiol. 7.3(2012):347-67参照。ある態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、各々引用によりその全体を本明細書に包含させるUS8591881B2号、US2012/0122185A1号またはUS2014/0271677A1号に記載のキメラ腫瘍溶解性NDVである。

40

【0955】

ある態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、排他的に癌細胞において複製するよう設計

50

された、条件的複製アデノウイルス(C R A d)である。例えば、Alemany et al. Nature Biotechnol. 18(2000):723-27参照。ある態様において、腫瘍溶解性アデノウイルスは、その全体を引用により本明細書に包含させるAlemany et al.の725頁の表1に記載のものを含む。

【0956】

腫瘍溶解性ウイルスの例は、次のものを含むが、これらに限定されない。

B群腫瘍溶解性アデノウイルス(ColoAd1)(PsiOxus Therapeutics Ltd.)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT02053220参照)；

顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(G M - C S F)を含むアデノウイルスであるO N C O S - 1 0 2 (以前はC G T G - 1 0 2 と呼ばれた)(Oncos Therapeutics)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01598129参照)；

ヒトP H 2 0 ヒアルロニダーゼをコードする遺伝的に修飾された腫瘍溶解性ヒトアデノウイルスであるV C N - 0 1 (VCN Biosciences, S.L.)(例えば、Clinical Trial Identifiers: NCT02045602およびNCT02045589参照)；

網膜芽細胞腫／E 2 F経路の脱制御を伴い癌細胞で選択的に複製するように修飾されている野生型ヒトアデノウイルス血清型5 (H a d 5)由来のウイルスである条件的複製アデノウイルスI C O V I R - 5 (Institut Catala d'Oncologia)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01864759参照)；

I C O V I R 5、腫瘍溶解性アデノウイルスで感染させた骨髄由来自己間葉性幹細胞(M S C)を含むCelyvir(Hospital Infantil Universitario Nino Jesus, Madrid, Spain/Ram on Alemany)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01844661参照)；

ヒトE 2 F - 1 プロモーターが必須E 1 a ウイルス遺伝子の発現を駆動し、それによりR b経路欠損腫瘍細ウイルス複製および細胞毒性を制限する、条件複製腫瘍溶解性血清型5アデノウイルス(A d 5)であるC G 0 0 7 0 胞に対する(Cold Genesys, Inc.)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT02143804参照)；または

路網膜芽細胞腫(R b)経路欠損細胞で選択的に複製し、ある種のR G D結合インテグリンをより効率的に発現する細胞に感染するように操作されているアデノウイルスであるD N X - 2 4 0 1 (以前の名前デルター-2 4 - R G D)(Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/ DNatrix, Inc.)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01956734参照)。

【0957】

ある態様において、ここに記載する腫瘍溶解性ウイルスを、注射、例えば、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内または腹腔内注射により投与する。ある態様において、ここに記載する腫瘍溶解性ウイルスを、腫瘍内、経皮、経粘膜、経口、鼻腔内または肺投与により投与する。

【0958】

さらなる面において、本発明の細胞組成物を、患者に骨髄移植、フルダラビンのような化学療法剤、体外照射療法(X R T)、シクロホスファミドおよび／またはO K T 3またはキャンパスのような抗体を使用するT細胞除去療法と組み合わせて(例えば、前に、同時にまたは後に)投与し得る。ある面において、本発明の細胞組成物を、C D 2 0と反応する薬剤、例えば、リツキサンのようなB細胞除去療法後に投与する。例えば、ある態様において、対象を、高用量化学療法剤と続く末梢血幹細胞移植の標準的処置に付す。ある態様において、移植後、対象は、本発明の増殖した免疫細胞の注入を受ける。さらなる態様において、増殖細胞を手術の前または後に投与する。

【0959】

ある態様において、対象は、C A R 発現細胞の投与に関連する副作用を低減または緩和する薬剤を投与することができる。C A R 発現細胞の投与に付随する副作用は、C R S およびマクロファージ活性化症候群(M A S)とも呼ばれる血液貪食リンパ組織球増多症(H L H)を含むが、これらに限定されない。C R Sの症状は、高熱、悪心、一過性低血圧、低酸素症などを含む。C R Sは、発熱、疲労、食欲不振、筋肉痛、関節痛(arthralgias)、

悪心、嘔吐、頭痛などの臨床的体質的徴候および症状を含み得る。CRSは、発疹などの臨床皮膚徴候および症状を含み得る。CRSは、悪心、嘔吐および下痢のような臨床的消化器徴候および症状を含み得る。CRSは、頻呼吸および低酸素血症のような臨床的呼吸器徴候および症状を含み得る。CRSは、頻脈、脈圧の増大、低血圧、心拍出量の増加(早期)および心拍出量の低下(後期)などの臨床的心血管徴候および症状を含み得る。CRSは、凝固兆候およびd-二量体増加、出血の有無にかかわらず低フィブリノーゲン血などの症状を含み得る。CRSは、高窒素血症などの臨床腎徴候および症状を含み得る。CRSは、高トランスアミナーゼ血症および高ビリルビン血症などの臨床肝徴候および症状を含み得る。CRSは、頭痛、精神状態の変化、混乱、せん妄、単語発見困難またはフラック失語、幻覚、振戦、ジメトリア、異常歩行、発作などの臨床的神経徴候および症状を含み得る。よって、ここに記載する方法は、対象にここに記載するCAR発現細胞を投与し、さらに、CAR発現細胞処置に由来する可溶性因子のレベル増加を管理する1以上の薬剤の投与を含み得る。ある態様において、対象で増加し得る可溶性因子は、IFN- γ 、TNF α 、IL-2およびIL-6の1以上である。ある態様において、対象において増加する因子は、IL-1、GM-CSF、IL-10、IL-8、IL-5およびフラクタルカインの1以上である。それゆえに、これらの副作用を処置するために投与する薬剤は、これらの可溶性因子の1以上を中和する薬剤であり得る。ある態様において、これらの可溶性形態の1以上を中和する薬剤は、抗体または抗体そのフラグメントである、このような薬剤の例は、ステロイド(例えば、コルチコステロイド)、TNF α 阻害剤およびIL-6阻害剤を含むが、これらに限定されない。TNF α 阻害剤の例は、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブベゴールおよびゴリムマブのような抗TNF α 抗体分子である。TNF α 阻害剤の他の例は、エタネルセプトのような融合タンパク質である。小分子TNF α 阻害剤は、キササンチン誘導体(例えばペントキシフィリン)およびブプロピオンを含むが、これらに限定されない。IL-6阻害剤の例は、トシリズマブ(toc)、サリルマブ、エルシリモマブ、CNTO 328、ALD518/BMS-945429、CNTO 136、CPSI-2364、CDP6038、VX30、ARGX-109、FE301およびFM101のような抗IL-6抗体分子または抗IL-6受容体抗体分子である。ある態様において、抗IL-6受容体抗体分子は、トシリズマブである。IL-1Rベースの阻害剤の例は、アナキンラである。

【0960】

ある態様において、対象を、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤と投与できる。例えば、ある態様において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であり得る、例えば、薬剤は、チェックポイント阻害剤である。阻害分子、例えば、プログラム細胞死1(PD-1)は、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータを含む。DNA、RNAまたはタンパク質レベルでの阻害による、阻害分子の阻害はCAR発現細胞性能を最適化できる。ある態様において、例えば、ここに記載のような、阻害性核酸、例えば、阻害性核酸、例えば、dsRNA、例えば、siRNAまたはshRNA、群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)、転写-アクティベータ様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)または亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を使用して、CAR発現細胞の阻害分子の発現を阻害できる。ある態様において、阻害剤はshRNAである。ある態様において、阻害分子はCAR発現細胞内で阻害される。これらの態様において、阻害分子の発現を阻害するdsRNA分子を、CARの要素、例えば、要素全部をコードする核酸と連結する。

【0961】

ある態様において、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子を、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害す

10

20

30

40

50

る分子の発現を阻害する d s R N A 分子が、発現、例えば、C A R 発現細胞内で発現されるようにプロモーター、例えば、H 1 または U 6 駆動プロモーターに操作可能に連結する。例えば、Tiscornia G., “Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA,” Chapter 3, in Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann and Rossi) 参照。Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) Science 296: 550-553; Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500。ある態様において、T 細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する d s R N A 分子をコードする核酸分子は、C A R の成分、例えば、要素の全てをコードする核酸分子を含む、同じベクター、例えば、レンチウイルスベクター上に存在する。このような態様において、T 細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する d s R N A 分子をコードする核酸分子は、C A R の成分、例えば、要素の全てをコードする核酸に 5' または 3' に位置するベクター、例えば、レンチウイルスベクターに位置する。T 細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する d s R N A 分子をコードする核酸分子は、C A R の成分、例えば、要素の全てをコードする核酸と同一または異なる方向で転写され得る。ある態様において、T 細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する d s R N A 分子をコードする核酸分子は、C A R の成分、例えば、要素の全てをコードする核酸分子を含むベクター以外のベクターに存在する。ある態様において、T 細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する d s R N A 分子をコードする核酸分子は、C A R 発現細胞内で一過性に発現される。ある態様において、T 細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する d s R N A 分子をコードする核酸分子は、C A R 発現細胞のゲノムに安定に統合される。ある態様において、T 細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子は P D - 1 である。

10

20

30

40

50

【0962】

ある態様において、阻害シグナルの阻害剤は、例えば、阻害分子と結合する抗体または抗体フラグメントであり得る。例えば、薬剤は、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2 または C T L A 4 に結合する抗体または抗体フラグメントであり得る(例えば、イピリムマブ(別名 M D X - 0 1 0 および M D X - 1 0 1 およびヤーボイ(登録商標)として市販; Bristol-Myers Squibb; トレメリムマブ(Pfizer から入手可能な I g G 2 モノクローナル抗体、以前はチシリムマブ、C P - 6 7 5, 2 0 6 として既知))。ある態様において、ある態様において、薬剤は、T I M 3 に結合する抗体または抗体フラグメントである。ある態様において、薬剤は、L A G 3 に結合する抗体または抗体フラグメントである。ある態様において、C A R 発現細胞の活性を増強する薬剤、例えば、阻害分子の阻害剤を、同種異系 C A R、例えば、同種異系ここに記載する C A R と組み合わせて投与する(例えば、ここでの同種異系 C A R において記載)。ある態様において、P D 1 阻害剤を、P D 1 陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞増加または P D 1 陰性免疫エフェクター細胞をもたらしように低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、R A D 0 0 1 または触媒的阻害剤の投与の後に、例えば、T 細胞増加 / P D 1 陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞の比の後に投与する。

【0963】

P D - 1 は、C D 2 8、C T L A - 4、I C O S および B T L A も含む受容体の C D 2 8 ファミリーの阻害性メンバーである。P D - 1 は、活性化 B 細胞、T 細胞および骨髄細胞に発現される(Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75)。P D - 1 の 2 リガンド、P D - L 1 および P D - L 2 が P D - 1 への結合により T 細胞活性化を下方制御することが示されている(Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43)。P D - L 1 は、ヒト癌において豊富である(Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制は、P D - 1 と P D - L 1 の局所相互作用の阻害により逆転できる。P D - 1、P D - L 1 および P D - L 2 の抗体、抗体フラグメントおよび他の阻害剤は知られ

、本発明のここに記載するC A Rと組み合わせて使用し得る。例えば、ニボルマブ(別名B M S - 9 3 6 5 5 8またはM D X 1 1 0 6 ; Bristol-Myers Squibb)は、特異的にP D - 1を遮断する完全ヒトI g G 4モノクローナル抗体である。ピディリズマブ(C T - 0 1 1 ; Cure Tech)は、P D - 1に結合するヒト化I g G 1 kモノクローナル抗体である。ピディリズマブおよび他のヒト化抗P D - 1モノクローナル抗体はW O 2 0 0 9 / 1 0 1 6 1 1号に開示されている。ペンブロリズマブ(以前はランブロリズマブとして知られ、K e y t r u d a、M K 0 3 4 7 5とも呼ばれる ; Merck)は、P D - 1に結合するヒト化I g G 4モノクローナル抗体である。ペンブロリズマブおよび他のヒト化抗P D - 1抗体は、U S 8, 3 5 4, 5 0 9号およびW O 2 0 0 9 / 1 1 4 3 3 5号に開示されている。M E D I 4 7 3 6 (Medimmune)は、P D L 1に結合し、リガンドとP D 1の相互作用を阻害するヒトモノクローナル抗体である。M D P L 3 2 8 0 A (Genentech/Roche)は、P D - L 1に結合するヒトF c最適化I g G 1モノクローナル抗体である。P D - L 1に対するM D P L 3 2 8 0 Aおよび他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許7, 9 4 3, 7 4 3号およびU . S 公開2 0 1 2 0 0 3 9 9 0 6号に記載されている。他の抗P D - L 1結合剤は、Y W 2 4 3 . 5 5 . S 7 0 (重鎖および軽鎖可変領域は、W O 2 0 1 0 / 0 7 7 6 3 4号の配列番号2 0および2 1に示される)およびM D X - 1 1 0 5 (別名B M S - 9 3 6 5 5 9および例えば、W O 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4号に開示される抗P D - L 1結合剤)である。A M P - 2 2 4 (B 7 - D C I g ; Amplimmune ; 例えば、W O 2 0 1 0 / 0 2 7 8 2 7号およびW O 2 0 1 1 / 0 6 6 3 4 2号に開示)は、P D - 1とB 7 - H 1の相互作用を遮断するP D - L 2 F c融合可溶性受容体である。他の抗P D - 1抗体は、とりわけ、A M P 5 1 4 (Amplimmune)、例えば、U S 8, 6 0 9, 0 8 9号、U S 2 0 1 0 0 2 8 3 3 0号および／またはU S 2 0 1 2 0 1 1 4 6 4 9号に開示の抗P D - 1抗体を含む。

【0964】

T I M 3 (T細胞免疫グロブリン-3)も、特にI F N - g 分泌C D 4 + Tヘルパー1およびC D 8 + T細胞毒性1細胞において、T細胞機能を負に制御し、T細胞枯渇に重要な役割を有する。T I M 3とそのリガンド、例えば、ガレクチン-9 (G a l 9)、ホスファチジルセリン(P S)およびH M G B 1の相互作用の阻害は免疫応答を高め得る。T I M 3およびそのリガンドの抗体、抗体フラグメントおよび他の阻害剤は当分野で利用可能であり、ここに記載するC D 1 9 C A Rと組み合わせて使用し得る。例えば、T I M 3を標的とする抗体、抗体フラグメント、小分子またはペプチド阻害剤は、そのリガンドとの相互作用を阻害するためにT I M 3のI g Vドメインに結合する。T I M 3を阻害する抗体およびペプチドは、W O 2 0 1 3 / 0 0 6 4 9 0号およびU S 2 0 1 0 0 2 4 7 5 2 1号に開示されている。他の抗T I M 3抗体は、R M T 3 - 2 3のヒト化バージョン(Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551に開示)およびクローン8 B . 2 C 1 2 (Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541に開示)を含む。T I M 3およびP D - 1を阻害する二特異性抗体はU S 2 0 1 3 0 1 5 6 7 7 4号に開示されている。

【0965】

他の態様において、C A R発現細胞の活性を増強する薬剤は、C E A C A M阻害剤(例えば、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3および／またはC E A C A M - 5阻害剤)である。ある態様において、C E A C A Mの阻害剤は、抗C E A C A M抗体分子である。抗C E A C A M - 1抗体の例は、W O 2 0 1 0 / 1 2 5 5 7 1号、W O 2 0 1 3 / 0 8 2 3 6 6号、W O 2 0 1 4 / 0 5 9 2 5 1およびW O 2 0 1 4 / 0 2 2 3 3 2号に開示され、例えば、モノクローナル抗体3 4 B 1、2 6 H 7および5 F 4 ; または例えば、U S 2 0 0 4 / 0 0 4 7 8 5 8号、U S 7, 1 3 2, 2 5 5号およびW O 9 9 / 0 5 2 5 5 2号に開示のようなその組み換え形態である。他の態様において、抗C E A C A M抗体は、例えば、Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146)に記載のようにC E A C A M - 5と結合するかまたは例えば、W O 2 0 1 3 / 0 5 4 3 3 1号およびU S 2 0 1 4 / 0 2 7 1 6 1 8号に記載のようにC E A C A M - 1およびC E A C A M - 5と交差反応する。

【0966】

理論に縛られることを望まないが、CEACAM-1およびCEACAM-5のような癌胎児性抗原細胞接着分子(CEACAM)は、少なくとも一部、抗腫瘍免疫応答の阻害を仲介すると考えられる(例えば、Markel et al. J Immunol. 2002 Mar 15;168(6):2803-10; Markel et al. J Immunol. 2006 Nov 1;177(9):6062-71; Markel et al. Immunology. 2009 Feb;126(2):186-200; Markel et al. Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb;59(2):215-30; Ortenberg et al. Mol Cancer Ther. 2012 Jun;11(6):1300-10; Stern et al. J Immunol. 2005 Jun 1;174(11):6692-701; Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9): pii: e12529参照)。例えば、CEACAM-1は、TIM-3のヘテロ親和性リガンドとして、そしてTIM-3介在T細胞耐容性および枯渇に役割を有するとしてが記載されている(例えば、WO2014/022332号;Huang, et al. (2014) Nature doi:10.1038/nature13848)。ある態様において、CEACAM-1およびTIM-3の共遮断が、異種移植結腸直腸癌モデルにおいて抗腫瘍免疫応答を増強することが示されている(例えば、WO2014/022332号;Huang, et al. (2014), supra参照)。他の態様において、CEACAM-1およびPD-1の共遮断は、例えば、WO2014/059251号に記載されるようにT細胞耐容性を減少させる。それゆえに、CEACAM阻害剤を、ここに記載する他の免疫調節剤(例えば、抗PD-1および/または抗TIM-3阻害剤)と使用して、癌、例えば、黒色腫、肺癌(例えば、NSCLC)、膀胱癌、結腸癌、卵巣癌およびここに記載の他の癌に対する免疫応答を増強させ得る。

10

【0967】

20

LAG-3(リンパ球活性化遺伝子-3またはCD223)は、CD8⁺ T細胞枯渇に役割を有することが示されている、活性化T細胞およびB細胞に発現される細胞表面分子である。LAG-3およびそのリガンドの抗体、抗体フラグメントおよび他の阻害剤は当分野で入手可能であり、ここに記載するCD19 CARと組み合わせて使用し得る。例えば、BMS-986016(Bristol-Myers Squibb)は、LAG3を標的とするモノクローナル抗体である。IMP701(Immutep)は、アンタゴニストLAG-3抗体であり、IMP731(ImmutepおよびGlaxoSmithKline)は枯渇性LAG-3抗体である。他のLAG-3阻害剤は、LAG3の可溶性部分とMHCクラスII分子のIgの組み換え融合タンパク質であり、抗原提示細胞(APC)を活性化するIMP321(Immutep)である。他の抗体は、例えば、WO2010/019570号に開示されている。

30

【0968】

ある態様において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、例えば、第一ドメインおよび第二ドメインを含む融合タンパク質であってよく、ここで、第一ドメインは阻害分子またはそのフラグメントであり、第二ドメインは陽性シグナルと関係するポリペプチド、例えば、ここに記載の細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドである。ある態様において、陽性シグナルと結合するポリペプチドは、CD28、CD27、ICOSの共刺激ドメイン、例えば、CD28、CD27および/またはICOSの細胞内シグナル伝達ドメインおよび/または例えば、ここに記載する、例えば、CD3ゼータの一次シグナル伝達ドメインを含み得る。ある態様において、融合タンパク質は、CARを発現するのと同じ細胞により発現される。他の態様において、融合タンパク質は、本発明の抗CARを発現しない細胞、例えば、T細胞により発現される。

40

【0969】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞の活性を増強する薬剤はmiR-17-92である。

【0970】

ある態様において、ここに記載するCARの活性を増強する薬剤はサイトカインである。サイトカインは、T細胞増殖、分化、生存および恒常性に関連する重要な機能を有する。ここに記載するCAR発現細胞を受ける対象に投与できるサイトカインは、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-18およびIL-21またはこれらの組み合わせを含む。好ましい態様において、投与するサイトカインはIL-7、IL-

50

15またはIL-21またはこれらの組み合わせである。サイトカインを、1日1回または1日1回以上、例えば、1日2回、1日3回または1日4回投与できる。サイトカインを、1日以上投与でき、例えば、サイトカインを2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間または4週間投与する。例えば、サイトカインを1日1回、7日間投与する。

【0971】

ある態様において、サイトカインをCAR発現細胞と組み合わせて投与する。サイトカインを、CAR発現細胞と同時にまたは一緒に投与でき、例えば、同じ日に投与する。サイトカインをCAR発現細胞と同じ医薬組成物に製剤しても、別の医薬組成物に製剤してもよい。あるいは、サイトカインを、CAR発現細胞の投与後間もなく、例えば、CAR発現細胞投与1日、2日、3日、4日、5日、6日または7日後に投与してよい。サイトカインを1日を超える投薬レジメンで投与する態様において、サイトカイン投薬レジメンの1日目はCAR発現細胞の投与と同じ日でもよく、またはサイトカイン投薬レジメンの1日目は、CAR発現細胞の投与1日、2日、3日、4日、5日、6日または7日後であってもよい。ある態様において、1日目に、CAR発現細胞を対象に投与し、2日目に、サイトカインを1日1回、翌7日間投与する。好ましい態様において、CAR発現細胞と組み合わせて投与するサイトカインはIL-7、IL-15またはIL-21またはこれらの組み合わせである。

10

【0972】

他の態様において、サイトカインを、CAR発現細胞の投与から十分な期間後、例えば、CAR発現細胞の投与から少なくとも2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月または1年またはそれ以上の後に投与する。ある態様において、サイトカインを、CAR発現細胞に対する対象の応答の評価後に投与する。例えば、対対象にここに記載する用量およびレジメンに従い、CAR発現細胞を投与する。CAR T治療応答に対する対象の応答を、腫瘍増殖阻止、循環腫瘍細胞減少または腫瘍退縮を含む、ここに記載する方法のいずれかを使用して、CAR発現細胞の投与2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月または1年またはそれ以上後に評価する。CAR T治療に対して十分な応答を示さない対象にサイトカインを投与し得る。CAR T治療に対して応答が最適以下である対象へのサイトカインの投与はCAR T有効性または抗腫瘍活性を改善する。好ましい態様において、CAR発現細胞のその後投与されるサイトカインはIL-7である。

20

30

【0973】

ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、ここに記載するmTOR阻害剤を、低い免疫増強用量で、癌、例えば、ここに記載する癌を有する対象に、CARを有する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞と投与する。対象は、mTOR阻害剤と組み合わせて、そのタイプの癌で承認されている薬物のようなさらなる治療剤での処置を受け得る。例えば、下記表2は、種々の癌およびその承認された処置の一覧を提供する。

【0974】

【表 15】

表2. 癌および承認された処置

癌	処置
急性リンパ芽球性白血病	Abitrexate (メトトレキサート); アトリアマイシン PFS (塩酸トキソルビシン); アトリアマイシン RDF (塩酸トキソルビシン); Arranon (ネララビン); アスハラキナーゼ Erwinia chrysanthemi; Cerubidine (塩酸タウノルビン); Clafen (シクロホスファミド); クロファラビン; Clofarex (クロファラビン); クロール (クロファラビン); シクロホスファミド; シタラビン; Cytosar-U (シタラビン); シトキサン (シクロホスファミド); タサチフ; 塩酸タウノルビン; 塩酸トキソルビシン; エルウィナーゼ (アスハラキナーゼ Erwinia chrysanthemi); Folex (メトトレキサート); Folex PFS (メトトレキサート); クリーベック (メシル酸イマチニブ); Iclusig (塩酸ホナチニブ); メシル酸イマチニブ; Marqibo (硫酸ビンクリスチンリボソーム); メルカプトプリン; メトトレキサート; メトトレキサート LPF (メトトレキサート); Mexate (メトトレキサート); Mexate-AQ (メトトレキサート); ネララビン; Neosar (シクロホスファミド); Oncaspar (ヘキサメルカール); ヘキサメルカール; プリン thol (メルカプトプリン); Purixan (メルカプトプリン); ルビトマイシン (塩酸タウノルビン); Sprycel (タサチフ); Tarabine PFS (シタラビン); Vincasar PFS (硫酸ビンクリスチン); 硫酸ビンクリスチン; または硫酸ビンクリスチンリボソーム。 薬物組み合わせ hyper-CVAD: シクロホスファミド; 硫酸ビンクリスチン; 塩酸トキソルビシン (アトリアマイシン); デキサメサゾン。
急性骨髄性白血病	アトリアマイシン PFS (塩酸トキソルビシン); アトリアマイシン RDF (塩酸トキソルビシン); 三酸化ヒ素; Cerubidine (塩酸タウノルビン); Clafen (シクロホスファミド); シクロホスファミド; シタラビン; Cytosar-U (シタラビン); シトキサン (シクロホスファミド); 塩酸タウノルビン; 塩酸トキソルビシン; Neosar (シクロホスファミド); ルビトマイシン (塩酸タウノルビン); Tarabine PFS (シタラビン); Trisenox (三酸化ヒ素); Vincasar PFS (硫酸ビンクリスチン); または硫酸ビンクリスチン。薬物組み合わせ ADE: シタラビン塩酸タウノルビン; およびエトホシト。
A I D S 関連カポジ肉腫	Dox-SL (塩酸トキソルビシンリボソーム); Doxil (塩酸トキソルビシンリボソーム); 塩酸トキソルビシンリボソーム; Evacet (塩酸トキソルビシンリボソーム); Intron A (組み換えインターフェロナルファ-2b); LipoDox (塩酸トキソルビシンリボソーム); ハクリタキセル; 組み換えインターフェロナルファ-2b; タキソール (ハクリタキセル); Velban (硫酸ビンブラスチン); Velsar (硫酸ビンブラスチン); または硫酸ビンブラスチン。
基底細胞癌	Adrucil (フルオロウラシル); Aldara (イミキモト); エフテックス (フルオロウラシル); Erivedge (ヒスモテキブ); フロオプレクス (フルオロウラシル); フロオウラシル; イミキモト; またはヒスモテキブ。
膀胱癌	アトリアマイシン PFS (塩酸トキソルビシン); アトリアマイシン RDF (塩酸トキソルビシン); シ

10

20

30

40

【表 16】

	スフ [®] ラチン；塩酸ト [®] キソルビ [®] シン；Platinol（シスフ [®] ラチン）；またはPlatinol-AQ（シスフ [®] ラチン）。
骨癌	Abitrexate（メトトレキサート）；アト [®] リアマイシン PFS（塩酸ト [®] キソルビ [®] シン）；アト [®] リアマイシン RDF（塩酸ト [®] キソルビ [®] シン）；塩酸ト [®] キソルビ [®] シン；Folex（メトトレキサート）；Folex PFS（メトトレキサート）；メトトレキサート；メトトレキサート LPF（メトトレキサート）；Mexate（メトトレキサート）；または Mexate-AQ（メトトレキサート）。
脳腫瘍	アフィニートル（エヘ [®] ロリムス）；Afinitor Disperz（エヘ [®] ロリムス）；アハ [®] スチン（ヘ [®] ハ [®] シズ [®] マブ [®] ）；ヘ [®] ハ [®] シズ [®] マブ [®] ；CeeNu（ロムスチン）；エヘ [®] ロリムス；ロムスチン；Methazolastone（テモゾロミド [®] ）；Temodar（テモゾ [®] ロミド [®] ）；またはテモゾ [®] ロミド [®] 。
乳癌	Abitrexate（メトトレキサート）；アブ [®] ラキサン（ハ [®] クリタキセルアルブ [®] ミン安定化ナノ粒子製剤製剤）；Ado-トラスツズ [®] マブ [®] ；エムタンシン；アト [®] リアマイシン PFS（塩酸ト [®] キソルビ [®] シン）；アト [®] リアマイシン RDF（塩酸ト [®] キソルビ [®] シン）；Adrucil（フルオロウラシル）；アフィニートル（エヘ [®] ロリムス）；アナストロゾール；Aredia（ハ [®] ミト [®] ロネートシ [®] ナトリウム）；Arimidex（アナストロゾール）；Aromasin（エキセメスタン）；カヘ [®] シタビ [®] ン；Clafen（シクロホスファミド [®] ）；シクロホスファミド [®] ；シタキセル（シクロホスファミド [®] ）；ト [®] セタキセル；塩酸ト [®] キソルビ [®] シン；エフデ [®] ックス（フルオロウラシル）；Ellence（エヒ [®] ルビ [®] シンヒト [®] ロクロライト [®] ）；エヒ [®] ルビ [®] シンヒト [®] ロクロライト [®] ；エヘ [®] ロリムス；エキセメスタン；Fareston（トレミフェン）；Faslodex（フルヘ [®] ストラント）；フェマーラ（レトロゾール）；フルオロ [®] レクス（フルオロウラシル）；フルオロウラシル；Folex（メトトレキサート）；Folex PFS（メトトレキサート）；フルヘ [®] ストラント塩酸ケ [®] ムシタビ [®] ン；シ [®] ェムサ [®] ール（塩酸ケ [®] ムシタビ [®] ン）；酢酸コ [®] セリリン；ハーセフ [®] チン（トラスツズ [®] マブ [®] ）；イクサヘ [®] ヒ [®] ロン；Ixempra（イクサヘ [®] ヒ [®] ロン）；Kadcyla（Ado-トラスツズ [®] マブ [®] エムタンシン）；ラハ [®] チニフ [®] シ [®] トシレート；レトロゾール；Megace（酢酸メケ [®] ストロール）；酢酸メケ [®] ストロールメトトレキサート；メトトレキサート LPF（メトトレキサート）；Mexate（メトトレキサート）；Mexate-AQ（メトトレキサート）；Neosar（シクロホスファミド [®] ）；Nolvadex（タモキシフェンシトレート）；Novaldex（タモキシフェンシトレート）；ハ [®] クリタキセル；ハ [®] クリタキセルアルブ [®] ミン安定化ナノ粒子製剤製剤；ハ [®] ミト [®] ロネートシ [®] ナトリウム；Perjeta（ヘ [®] ルツズ [®] マブ [®] ）；ヘ [®] ルツズ [®] マブ [®] ；タモキシフェンシトレートタキソール（ハ [®] クリタキセル）；タキソール（ト [®] セタキセル）；トラスツズ [®] マブ [®] ；トレミフェン；Tykerb（ラハ [®] チニフ [®] シ [®] トシレート）；ゼ [®] ロータ [®] （カヘ [®] シタビ [®] ン）；または Zoladex（酢酸コ [®] セリリン）。 薬物組み合わせ AC：塩酸ト [®] キソルビ [®] シン（アト [®] リアマイシン）およびシクロホスファミド [®] 。 AC-T：塩酸ト [®] キソルビ [®] シン（アト [®] リアマイシン）；シクロホスファミド [®] ；およびハ [®] クリタキセル（タキソール）。 CAF：シクロホスファミド [®] ；塩酸ト [®] キソルビ [®] シン（アト [®] リアマイシン）；およびフルオロウラシル。 CMF：シクロホスファミド [®] ；メトトレキサート；およびフルオロウラシル。 FEC：フルオロウラシル；エヒ [®] ルビ [®] シンヒト [®] ロクロライト [®] ；およびシクロホスファミド [®] 。 TAC：ト [®] セタキセル（タキソール）；塩酸ト [®] キソルビ [®] シン（アト [®] リアマイシン）；およびシクロホスファミド [®] 。

10

20

30

40

【表 17】

	ミト。
頸部癌	Blenoxane(フ ^レ オマイシン);フ ^レ オマイシンシスフ ^ラ チン;ハイカムチン(塩酸トホ ^テ カン);Platinol(シスフ ^ラ チン);Platinol-AQ(シスフ ^ラ チン);または塩酸トホ ^テ カン。 薬物組み合わせ ゲムシタビ ^ン シスフ ^ラ チン塩酸ゲムシタビ ^ン およびシスフ ^ラ チン。
慢性リンパ性白血病	アレムツス ^マ フ ^マ ;Ambochlorin(クロラムフ ^シ ル);Amboclorin(クロラムフ ^シ ル);Arzerra(オフアツムマフ ^マ);塩酸ヘ ^ン タ ^ム スチン;キャンハ ^ス (アレムツス ^マ フ ^マ);クロラムフ ^シ ル;Clafen(シクロホスファミト ^マ);シクロホスファミト ^マ ;シトキシ ^ン (シクロホスファミト ^マ);フルタ ^ラ (リン酸フルタ ^ラ ビ ^ン);リン酸フルタ ^ラ ビ ^ン ;Gazyva(オヒ ^ヌ ツス ^マ フ ^マ);イフ ^ル チニフ ^マ ;Imbruvica(イフ ^ル チニフ ^マ);Leukeran(クロラムフ ^シ ル);Linfolizin(クロラムフ ^シ ル);Neosar(シクロホスファミト ^マ);オヒ ^ヌ ツス ^マ フ ^マ ;オフアツムマフ ^マ ;またはTreanda(塩酸ヘ ^ン タ ^ム スチン)。 薬物組み合わせ クロラムフ ^シ ル-フ ^レ ト ^ニ ゾ ^ン クロラムフ ^シ ルおよびフ ^レ ト ^ニ ゾ ^ン 。 CVP:シクロホスファミト ^マ ;硫酸ヒ ^ン クリスチン;およびフ ^レ ト ^ニ ゾ ^ン 。
慢性骨髄性白血病	Bosulif(ホ ^ス チニフ ^マ);ホ ^ス チニフ ^マ ;フ ^ス ルファン;Busulfex(フ ^ス ルファン);Clafen;シクロホスファミト ^マ ;シクロホスファミト ^マ ;シタラビ ^ン ;Cytosar-U(シタラビ ^ン);シトキシ ^ン (シクロホスファミト ^マ);タ ^サ チニフ ^マ ;ク ^リ ヘ ^ッ ク(メシル酸イマチニフ ^マ);Iclusig(塩酸ホ ^ナ チニフ ^マ);メシル酸イマチニフ ^マ ;Myleran(フ ^ス ルファン);Neosar(シクロホスファミト ^マ);ニロチニフ ^マ ;オマセタキシ ^ン メ ^ヘ スクシナート;塩酸ホ ^ナ チニフ ^マ ;Sprycel(タ ^サ チニフ ^マ);Synribo(オマセタキシ ^ン メ ^ヘ スクシナート);Tarabine PFS(シタラビ ^ン);またはTasigna(ニロチニフ ^マ)。
結腸癌	Adrucil(フルオロウラシル);アハ ^ス チン(ヘ ^ハ シス ^マ フ ^マ);ヘ ^ハ シス ^マ フ ^マ ;Camptosar(塩酸イリノテカン);カヘ ^シ タビ ^ン セツキシマフ ^マ ;エフテ ^ッ クス(フルオロウラシル);Eloxatin(オキサリフ ^ラ チン);アービ ^タ ックス(セツキシマフ ^マ);フルオロ ^レ クス(フルオロウラシル);フルオロウラシル;塩酸イリノテカン;ロイコホ ^{リン} カルシウム;オキサリフ ^ラ チン;ハ ^ニ ツムマフ ^マ ;レコ ^ラ フェニフ ^マ ;Stivarga(レコ ^ラ フェニフ ^マ);Vectibix(ハ ^ニ ツムマフ ^マ);Wellcovorin(ロイコホ ^{リン} カルシウム);セ ^ロ ータ ^マ (カヘ ^シ タビ ^ン);Zaltrap(Ziv-Aflibercept);またはZiv-Aflibercept。 薬物組み合わせ CAPOX:カヘ ^シ タビ ^ン およびオキサリフ ^ラ チン。 FOLFIRI:ロイコホ ^{リン} カルシウム(フォリン酸);フルオロウラシル;および塩酸イリノテカン。 FOLFIRI-ヘ ^ハ シス ^マ フ ^マ :ロイコホ ^{リン} カルシウム(フォリン酸);フルオロウラシル;塩酸イリノテカン;およびヘ ^ハ シス ^マ フ ^マ 。 FOLFIRI-セツキシマフ ^マ :ロイコホ ^{リン} カルシウム(フォリン酸);フルオロウラシル;塩酸イリノテカン;

10

20

30

40

【表 18】

	およびセツキシマフ。 FOLFOX:ロイコホリンカルシウム(フォリン酸);フルオウラシル;およびオキサリプラチン。 XELOX:カペシタビン(セロータ)およびオキサリプラチン。
子宮内膜癌	Megace(酢酸メゲストロール)または酢酸メゲストロール。
胃(胃)癌	アトリアマイシン PFS(塩酸トキソルビシン);アトリアマイシン RDF(塩酸トキソルビシン);Adrucil(フルオウラシル);Cyramza(ラムシルマフ);トセタキセル;塩酸トキソルビシン;エフデックス(フルオウラシル);フルオロプレクス(フルオウラシル);フルオウラシル;ハーセプチン(トラスツマフ);マイトマイシン C;Mitozytrex(マイトマイシン C);Mutamycin(マイトマイシン C);ラムシルマフ;タキソテル(トセタキセル);またはトラスツマフ。
消化器間質腫瘍	グリーベック(メシル酸イマチニブ);メシル酸イマチニブレコラフェニブ;Stivarga(レコラフェニブ);リンゴ酸スニチニブ;スーテント(リンゴ酸スニチニブ)
頭頸部癌	Abitrexate(メトトレキサート);Adrucil(フルオウラシル);Blenoxane(フレオマイシン);フレオマイシンセツキシマフ;シスプラチンセタキセル;エフデックス(フルオウラシル);アービタックス(セツキシマフ);フルオロプレクス(フルオウラシル);フルオウラシル;Folex(メトトレキサート);Folex PFS(メトトレキサート);メトトレキサート;メトトレキサート LPF(メトトレキサート);Mexate(メトトレキサート);Mexate-AQ(メトトレキサート);Platinol(シスプラチン);Platinol-AQ(シスプラチン);またはタキソテル(トセタキセル)。
ホジキンリンパ腫	Adcetris(フレンツキシマフヘドチン);アトリアマイシン PFS(塩酸トキソルビシン);アトリアマイシン RDF(塩酸トキソルビシン);Ambochlorin(クロラムフェニル);Amboclorin(クロラムフェニル);Blenoxane(フレオマイシン);フレオマイシンフレンツキシマフヘドチン;クロラムフェニル;Clafen(シクロホスファミド);シクロホスファミド; Cytosan(シクロホスファミド);タカルハシン塩酸トキソルビシン;DTIC-Dome(タカルハシン);Leukeran(クロラムフェニル);Linfolizin(クロラムフェニル);ロムスチン Matulane(塩酸プロカルハシン);Neosar(シクロホスファミド);塩酸プロカルハシン;Velban(硫酸ビンブラスチン);Velsar(硫酸ビンブラスチン);硫酸ビンブラスチン;Vincasar PFS(硫酸ビンクリスチン);または硫酸ビンクリスチン。 薬物組み合わせ: ABVD:塩酸トキソルビシン(アトリアマイシン);フレオマイシン硫酸ビンブラスチン;およびタカルハシン。 ABVE:塩酸トキソルビシン(アトリアマイシン);フレオマイシン硫酸ビンブラスチン;およびエトポシド。 ABVE-PC:塩酸トキソルビシン(アトリアマイシン);フレオマイシン硫酸ビンブラスチン;エトポシド;プレトニゾン;およびシクロホスファミド。 BEACOPP:フレオマイシンエトポシド;塩酸トキソルビシン(アトリアマイシン);シクロホスファミド;硫酸ビンクリスチン(Oncovin);塩酸プロカルハシン;およびプレトニゾン。 COPP:シクロホスファミド;硫酸ビンクリスチン(Oncovin);塩酸プロカルハシン;およ

10

20

30

40

【表 19】

	びフ^{レト}ニゾ^ン。 COPP-ABV: シクロホスファミト^ス; 硫酸ヒ^ンクリスチン (Oncovin); 塩酸ブ^ロカルハ^シン; フ^{レト}ニゾ^ン塩酸ト^キソルヒ^シン (アト^リアマイシ^ン); フ^レオマイシ^ン; および硫酸ヒ^ンフ^ラスチ^ン。 ICE: イホスファミト^ス; カルホ^フラチ^ン; およびエトホ^シト^ス。 MOPP: メクロレタミシト^ロクロライト^ス; 硫酸ヒ^ンクリスチン (Oncovin); 塩酸ブ^ロカルハ^シン; およびフ^{レト}ニゾ^ン。 OEPA: 硫酸ヒ^ンクリスチン (Oncovin); エトホ^シト^ス; フ^{レト}ニゾ^ン; および塩酸ト^キソルヒ^シン (アト^リアマイシ^ン)。 OPPA: 硫酸ヒ^ンクリスチン (Oncovin); 塩酸ブ^ロカルハ^シン; フ^{レト}ニゾ^ン; および 塩酸ト^キソルヒ^シン (アト^リアマイシ^ン)。 STANFORD V: メクロレタミシト^ロクロライト^ス; 塩酸ト^キソルヒ^シン; 硫酸ヒ^ンフ^ラスチ^ン; 硫酸ヒ^ンクリスチン; フ^レオマイシ^ンエトホ^シト^ス; およびフ^{レト}ニゾ^ン。 VAMP: 硫酸ヒ^ンクリスチン; 塩酸ト^キソルヒ^シン (アト^リアマイシ^ン); およびメトトレキサ^{ート}; およびフ^{レト}ニゾ^ン。	10
腎臓(腎臓細胞)癌	アフィニール (エヘ^ロリムス); Aldesleukin; アハ^スチン (ヘ^ハシス^マフ^ス); アクシチニ^フ; ヘ^ハシス^マフ^ス; エヘ^ロリムス; Inlyta (アクシチニ^フ); Nexavar (トシル酸ソラフェニ^フ); 塩 酸ハ^ゾハ^ニフ^ス; Proleukin (Aldesleukin); トシル酸ソラフェニ^フ; リンコ^ス酸スニチニ^フ; スーテント (リンコ^ス酸スニチニ^フ); テムシロリムス; Torisel (テムシロリムス); または Votrient (塩酸ハ^ゾハ^ニフ^ス)。	20
肝臓癌	Nexavar (トシル酸ソラフェニ ^フ) または トシル酸ソラフェニ ^フ 。	
黒色腫	Aldesleukin; タ^ブラフェニ^フ; タ^カルハ^シン; DTIC-Dome (タ^カルハ^シン); Intron A (組み換えインターフェロンアルファ-2b); イ^レリムマ^フ; Mekinist (トラメ チニ^フ); ヘ^クインターフェロンアルファ-2b; PEG-Intron (ヘ^クインターフェロンアルファ -2b); Proleukin (Aldesleukin); 組 み 換 え イン ター フェ ロ ン アル ファ -2b; Sylatron (ヘ^クインターフェロンアルファ-2b); Tafinlar (タ^ブラフェニ^フ); トラメ チニ^フ; ヘ^ムラフェニ^フ; ヤーホ^イ (イ^レリムマ^フ); または Zelboraf (ヘ^ムラフェニ^フ)。	30
悪性中皮腫	アリムタ (ヘ^メトレキセト^ス二ナトリウム); シスフ^ラチンヘ^メトレキセト^ス二ナトリウム; Platinol (シス フ^ラチン); または Platinol-AQ (シスフ^ラチン)。	
多発性骨髄腫	Aredia (ハ^ミト^ロネートジ^ナトリウム); ホ^ルテツ^ミフ^ス; カルフィルツ^ミフ^ス; Clafen (シクロホス ファミト^ス); シクロホスファミト^ス; シトキサン (シクロホスファミト^ス); Doxil (塩酸ト^キソルヒ^シンリホ^ス ソーム); 塩酸ト^キソルヒ^シンリホ^スソーム; Dox-SL (塩酸ト^キソルヒ^シンリホ^スソーム); Evacet (塩酸ト^キソルヒ^シンリホ^スソーム); Kyprolis (カルフィルツ^ミフ^ス); レナリト^マ イト^ス; LipoDox (塩酸ト^キソルヒ^シンリホ^スソーム); Mozobil (フ^レリキサフォ ル); Neosar (シクロホスファミト^ス); ハ^ミト^ロネートジ^ナトリウム; フ^レリキサフォル; ホ^マリト^ミト^ス (ホ^マリスト); ホ^マリスト; Revlimid (レナリト^マイト^ス); Synovir (サリト^マイト^ス); サリト^マ	40

【表 20】

	マイト [®] ;Thalomid(サリト [®] マイト [®]);ヘ [®] ルケイト [®] (ホ [®] ルテゾ [®] ミフ [®]);ゾ [®] レト [®] ロン酸;Zometa(ゾ [®] レト [®] ロン酸)
骨髄増殖性障害	アト[®]リアマイシン PFS(塩酸ト[®]キソルビ[®]シン);アト[®]リアマイシン RDF(塩酸ト[®]キソルビ[®]シン);三酸化ヒ素;アサ[®]シチン;Cerubidine(塩酸タ[®]ウノルビ[®]シン);Clafen(シクロホスファミト[®]);シクロホスファミト[®];シタラビ[®]ン;Cytosar-U(シタラビ[®]ン);シタラビ[®]ン;Cytosan(シクロホスファミト[®]);Dacogen(テ[®]シタビ[®]ン);タ[®]サチニフ[®];塩酸タ[®]ウノルビ[®]シン;テ[®]シタビ[®]ン塩酸ト[®]キソルビ[®]シン;タ[®]リーヘ[®]ック(メシル酸イマチニフ[®]);メシル酸イマチニフ[®];ジ[®]ヤカビ[®](リン酸ルキソリチニフ[®]);レナリト[®]マイト[®];Mylosar(アサ[®]シチン);Neosar(シクロホスファミト[®]);ニロチニフ[®];Revlimid(レナリト[®]マイト[®]);ルビ[®]ト[®]マイン(塩酸タ[®]ウノルビ[®]シン);リン酸ルキソリチニフ[®];Sprycel(タ[®]サチニフ[®]);Tarabine PFS(シタラビ[®]ン);Tasigna(ニロチニフ[®]);Trisenox(三酸化ヒ素);ヒ[®]タ[®]ーサ[®](アサ[®]シチン);Vincasar PFS(硫酸ヒ[®]ンクリスチン);または硫酸ヒ[®]ンクリスチン。 薬物組み合わせ ADE:シタラビ[®]ン塩酸タ[®]ウノルビ[®]シン;およびエトホ[®]シト[®]。
神経芽腫	アト[®]リアマイシン PFS(塩酸ト[®]キソルビ[®]シン);アト[®]リアマイシン RDF(塩酸ト[®]キソルビ[®]シン);Clafen(シクロホスファミト[®]);シクロホスファミト[®];シタラビ[®]ン;シタラビ[®]ン;シタラビ[®]ン;塩酸ト[®]キソルビ[®]シン;Neosar(シクロホスファミト[®]);Vincasar PFS(硫酸ヒ[®]ンクリスチン);または硫酸ヒ[®]ンクリスチン。
非ホジキンリンパ腫	Abitrexate(メトトレキサート);Adcetris(フ[®]レンツキシマブ[®]ヘ[®]ト[®]チン);アト[®]リアマイシン PFS(塩酸ト[®]キソルビ[®]シン);アト[®]リアマイシン RDF(塩酸ト[®]キソルビ[®]シン);Ambochlorin(クロラムブ[®]シル);Amboclorin(クロラムブ[®]シル);Arranon(ネララビ[®]ン);塩酸ベン[®]タ[®]ムスチン;Bexxar(トシツモマブ[®]およびヨウ素 I131 トシツモマブ[®]);Blenoxane(フ[®]レオマイシン);フ[®]レオマイシンホ[®]ルテゾ[®]ミフ[®];フ[®]レンツキシマブ[®]ヘ[®]ト[®]チン;クロラムブ[®]シル;Clafen(シクロホスファミト[®]);シクロホスファミト[®];シタラビ[®]ン;シタラビ[®]ン;シタラビ[®]ン;塩酸ト[®]キソルビ[®]シン;DTIC-Dome(タ[®]カルハ[®]シン);Folex(メトトレキサート);Folex PFS(メトトレキサート);Folotyn(フ[®]ラトトレキサート);イ[®]ブ[®]リツモマブ[®]チウキセタンイ[®]フ[®]ルチニフ[®];Imbruvica(イ[®]ブ[®]ルチニフ[®]);Intron A(組み換えインターフェロ[®]ンアルファ-2b);Istodax(ロミテ[®]ブ[®]シン);レナリト[®]マイト[®];Leukeran(クロラムブ[®]シル);Linfolizin(クロラムブ[®]シル);リホ[®]ゾームシタラビ[®]ン;Matulane(塩酸フ[®]ロカルハ[®]シン);メトトレキサート;メトトレキサート LPF(メトトレキサート);Mexate(メトトレキサート);Mexate-AQ(メトトレキサート);Mozobil(フ[®]レリキサフォル);ネララビ[®]ン;Neosar(シクロホスファミト[®]);Ontak(テ[®]ニロイキシ[®]フチトク);フ[®]レリキサフォル;フ[®]ラトトレキサート;組み換えインターフェロ[®]ンアルファ-2b;Revlimid(レナリト[®]マイト[®]);リツキシ[®]ン(リツキシマブ[®]);リツキシマブ[®];ロミテ[®]ブ[®]シン;トシツモマブ[®]およびヨウ素 I131 トシツモマブ[®];Treanda(塩酸ベン[®]タ[®]ムスチン);Velban(硫酸ヒ[®]ンブ[®]ラスチン);ヘ[®]ルケイト[®](ホ[®]ルテゾ[®]ミフ[®]);Velsar(硫酸ヒ[®]ンブ[®]ラスチン);硫酸ヒ[®]ンブ[®]ラスチン;Vincasar

10

20

30

40

【表 2 1】

	PFS(硫酸ヒンクリスチン);硫酸ヒンクリスチン;ホリノスタット;Zevalin(イブリツモマブチウキセタン);または Zolinza(ホリノスタット)。 薬物組み合わせ CHOP:シクロホスファミド;塩酸ドキシルビシン(ヒドロキシタウノマイシン);硫酸ヒンクリスチン(Oncovin);およびブレットニゾン。 COPP:シクロホスファミド;硫酸ヒンクリスチン(Oncovin);塩酸ブロカルハシン;およびブレットニゾン。 CVP:シクロホスファミド;硫酸ヒンクリスチン;およびブレットニゾン。 EPOCH:エトボシト;ブレットニゾン硫酸ヒンクリスチン(Oncovin);シクロホスファミド;および塩酸ドキシルビシン(ヒドロキシタウノマイシン)。 Hyper-CVAD:シクロホスファミド;硫酸ヒンクリスチン;塩酸ドキシルビシン(アトリアマイシン);およびデキサメサゾン。 ICE:イホスファミド;カルボプラチン;およびエトボシト。 R-CHOP:リツキシマブ;シクロホスファミド;塩酸ドキシルビシン(ヒドロキシタウノマイシン);硫酸ヒンクリスチン(Oncovin);およびブレットニゾン。	10
非小細胞性肺癌	Abitrexate(メトトレキサート);アブラキサン(ハククリタキセルアルブミン安定化ナノ粒子製剤製剤);ニマレイン酸アファチニブ;アリムタ(ヘメトレキセト二ナトリウム);アハスチン(ヘハシズマブ);ヘハシズマブ;カルボプラチン;Ceritinib;シスプラチン;クリゾチニブ;トセタキセル;塩酸エルロチニブ;Folex(メトトレキサート);Folex PFS(メトトレキサート);ケフィチニブ;Gilotrif(ニマレイン酸アファチニブ);塩酸ゲムシタビン;ジェムサール(塩酸ゲムシタビン);イレッサ(ケフィチニブ);メトトレキサート;メトトレキサート LPF(メトトレキサート);Mexate(メトトレキサート);Mexate-AQ(メトトレキサート);ハククリタキセル;ハククリタキセルアルブミン安定化ナノ粒子製剤製剤;Paraplat(カルボプラチン);Paraplatin(カルボプラチン);ヘメトレキセト二ナトリウム;Platinol(シスプラチン);Platinol-AQ(シスプラチン);タルセバ(塩酸エルロチニブ);タキソール(ハククリタキセル);タキソール(トセタキセル);Xalkori(クリゾチニブ);または Zykadia(Ceritinib)。 薬物組み合わせ カルボプラチン-タキソール;カルボプラチンおよびハククリタキセル(タキソール)。 ゲムシタビン-シスプラチン塩酸ゲムシタビンおよびシスプラチン。	20
		30
卵巣癌	アトリアマイシン PFS(塩酸ドキシルビシン);アトリアマイシン RDF(塩酸ドキシルビシン);カルボプラチン Clafen(シクロホスファミド); シスプラチンシクロホスファミド;シトキサン(シクロホスファミド);塩酸ドキシルビシン;Dox-SL(塩酸ドキシルビシンリボソーム);DOXIL(塩酸ドキシルビシンリボソーム);塩酸ドキシルビシンリボソーム;Evacet(塩酸ドキシルビシンリボソーム);塩酸ゲムシタビン;ジェムサール(塩酸ゲムシタビン);ハイカムチン(塩酸トボテカン);LipoDox(塩酸	40

【表 2 2】

	トキソルビシン(トキシソール) ; Neosar (シクロホスファミド) ; ハートリタキセル ; Paraplat (カルボプラチン) ; Paraplatin (カルボプラチン) ; Platinol (シスプラチン) ; Platinol-AQ (シスプラチン) ; タキソール (ハートリタキセル) ; または塩酸ドセタン。 薬物組み合わせ BEP: フレオマイシンエトポシド ; およびシスプラチン (Platinol)。 カルボプラチン-タキソール: カルボプラチンおよびハートリタキセル (タキソール)。 ゲムシタビン-シスプラチン塩酸ゲムシタビンおよびシスプラチン。	
膀胱癌	Adrucil (フルオロウラシル) ; アフィニール (エペロリムス) ; エフデックス (フルオロウラシル) ; 塩酸エルロチニブ ; エペロリムス ; フロロプロレックス (フルオロウラシル) ; フロロウラシル ; 塩酸ゲムシタビン ; シェムサール (塩酸ゲムシタビン) ; マイトマイシン C ; Mitozytrex (マイトマイシン C) ; Mutamycin (マイトマイシン C) ; リンゴ酸スニチニブ ; スーテント (リンゴ酸スニチニブ) ; またはタルセバ (塩酸エルロチニブ)。 薬物組み合わせ ゲムシタビン-オキサリプラチン塩酸ゲムシタビンおよびオキサリプラチン。	10
陰茎癌	Blenoxane (フレオマイシン) ; フレオマイシン	
直腸癌	Adrucil (フルオロウラシル) ; アハスチン (ヘパシスマブ) ; ヘパシスマブ ; Camptosar (塩酸イレノテカン) ; セツキシマブ ; エフデックス (フルオロウラシル) ; アービタックス (セツキシマブ) ; フロロプロレックス (フルオロウラシル) ; フロロウラシル ; 塩酸イレノテカン ; ハニツマブ ; レコラフェニブ ; Stivarga (レコラフェニブ) ; Vectibix (ハニツマブ) ; Zaltrap (Ziv-Aflibercept) ; または Ziv-Aflibercept。 薬物組み合わせ CAPOX: カヘシタビンおよびオキサリプラチン。 FOLFIRI: ロイコホリンカルシウム (フォリン酸) ; フロロウラシル L ; 塩酸イレノテカン。 FOLFIRI-ヘパシスマブ: ロイコホリンカルシウム (フォリン酸) ; フロロウラシル ; 塩酸イレノテカン ; およびヘパシスマブ。 FOLFIRI-セツキシマブ: ロイコホリンカルシウム (フォリン酸) ; フロロウラシル ; 塩酸イレノテカン ; およびセツキシマブ。 FOLFOX: ロイコホリンカルシウム (フォリン酸) ; フロロウラシル ; およびオキサリプラチン。 XELOX: カヘシタビン (セロータ) およびオキサリプラチン。	20
腎臓細胞癌	アフィニール (エペロリムス) ; Aldesleukin ; アハスチン (ヘパシスマブ) ; アクシチニブ ; ヘパシスマブ ; エペロリムス ; Inlyta (アクシチニブ) ; Nexavar (トシル酸ソラフェニブ) ; 塩酸ハソハニブ ; Proleukin (Aldesleukin) ; トシル酸ソラフェニブ ; テムシロリムス ; Torisel (テムシロリムス) ; Votrient (塩酸ハソハニブ)	30
網膜芽細胞腫	Clafen (シクロホスファミド) ; シクロホスファミド ; シトキサン (シクロホスファミド) ; または Neosar (シクロホスファミド)。	
横紋筋肉腫	Cosmegen (ダクチノマイシン) ; ダクチノマイシン Vincasar PFS (硫酸ビンクリスチン) ; ま	40

【表 2 3】

	たは硫酸ビシクリスチン。
皮膚癌(基底細胞癌)	Adrucil(フルオロウラシル);Aldara(イミキモト);エフテックス(フルオロウラシル);Erivedge(ヒスモデキブ);フルオプロレックス(フルオロウラシル);フルオロウラシル;イミキモト;またはヒスモデキブ。
皮膚癌(黒色腫)	Aldesleukin;タカカルハシシ DTIC-Dome(タカカルハシシ);イビリムマブ;Proleukin(Aldesleukin);ヘムラフェニブ;ヤボイ(イビリムマブ);またはZelboraf(ヘムラフェニブ)。
小細胞肺癌	Abitrexate(メトトレキサート);Etopophos(リン酸エトボシト);エトボシト;リン酸エトボシト Folex(メトトレキサート);Folex PFS(メトトレキサート);ハイカムチン(塩酸トボテカン);メトトレキサート;メトトレキサート LPF(メトトレキサート);Mexate(メトトレキサート);Mexate-AQ(メトトレキサート);Toposar(エトボシト);塩酸トボテカン;またはVePesid(エトボシト)。
軟組織肉腫	アトリアマイシン PFS(塩酸トキソリビシ);アトリアマイシン RDF(塩酸トキソリビシ);Cosmegen(タクチノマイシン);タクチノマイシン;または塩酸トキソリビシ。
精子癌	Blenoxane(ブレオマイシン);ブレオマイシンシスプラチン;Cosmegen(タクチノマイシン);Cyfos(イホスファミド);タクチノマイシン;Etopophos(リン酸エトボシト);エトボシト;リン酸エトボシト;Ifex(イホスファミド);イホスファミド;Ifosfamidum(イホスファミド);Platinol(シスプラチン);Platinol-AQ(シスプラチン);Toposar(エトボシト);Velban(硫酸ビシンプラスチン);Velsar(硫酸ビシンプラスチン);またはVePesid(エトボシト);硫酸ビシンプラスチン。
甲状腺癌	アトリアマイシン PFS(塩酸トキソリビシ);アトリアマイシン RDF(塩酸トキソリビシ);カホサンチニブ-S-マレート;Caprelsa(ハントニブ);Cometriq(カホサンチニブ-S-マレート);塩酸トキソリビシ;Nexavar(トシル酸ソラフェニブ);またはトシル酸ソラフェニブ;ハントニブ。
膣癌	Gardasil(組み換え HPV 四価ワクチン);または組み換えヒト乳頭腫ウイルス(HPV)四価ワクチン。
外陰癌	Blenoxane(ブレオマイシン);ブレオマイシン Gardasil(組み換え HPV 四価ワクチン);または組み換えヒト乳頭腫ウイルス(HPV)四価ワクチン。
ウィルムス腫瘍または他の小児腎臓癌	アトリアマイシン PFS(塩酸トキソリビシ);アトリアマイシン RDF(塩酸トキソリビシ);Cosmegen(タクチノマイシン);タクチノマイシン塩酸トキソリビシ;Vincasar PFS(硫酸ビシクリスチン);または硫酸ビシクリスチン。

10

20

30

【0979】

40

ある態様において、ここに記載するmTOR阻害剤を、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、例えば、ここに記載するタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤と組み合わせて低い免疫増強用量で対象に投与する。ある態様において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、SHP-1阻害剤、例えば、スチボグルコン酸ナトリウムのような、例えば、ここに記載するSHP-1阻害剤である。ある態様において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、SHP-2阻害剤、例えば、ここに記載するSHP-2阻害剤である。

【0980】

医薬組成物：mTOR阻害剤

ある面において、本発明は、ここに記載するCAR細胞と組み合わせて使用するために

50

製剤された、m T O R 阻害剤、例えば、ここに記載する m T O R 阻害剤を含む医薬組成物である。

【0981】

ある態様において、m T O R 阻害剤を、C A R 細胞に加えて、例えば、ここに記載するような、他の薬剤と組み合わせて投与するために製剤する。

【0982】

一般に、本発明の化合物を、上記のように、通常のかつ許容される当分野で知られる任意の方法により、単独でまたは1以上の治療剤と組み合わせて投与する。

【0983】

医薬製剤は、慣用の溶解および混合法を使用して製造できる。例えば、原体物質(例えば、m T O R 阻害剤または該化合物の安定化形態(例えば、シクロデキストリン誘導体または他の既知複合化薬物との複合体))を、ここに記載する添加物の1以上の存在下、適当な溶媒に溶解させる。m T O R 阻害剤は、一般に薬物の投与量を容易に制御可能とし、患者に洗練され、取り扱いが容易な製品を与えるような、医薬投与形態に製剤される。

【0984】

本発明の化合物は、慣用の経路で、特に経腸的に、例えば、経口で、例えば、錠剤またはカプセルの形でまたは非経腸的に、例えば、注射可能溶液剤または懸濁液剤の形で、局所的に、例えば、ローション剤、ゲル剤、軟膏剤またはクリーム剤の形でまたは経鼻または坐薬により、医薬組成物として投与され得る。M T O R 阻害剤をここに記載する他の薬剤と組み合わせて(同時にまたは別々に)投与するとき、一つの面において、両成分を同じ経路で(例えば、非経腸的に)投与し得る。あるいは、他の薬剤を、m T O R 阻害剤と異なる経路で投与し得る。例えば、m T O R 阻害剤を経口で投与してよく、他の薬剤を非経腸的に投与してよい。遊離形態または薬学的に許容される塩形態のm T O R 阻害剤を、少なくとも1個の薬学的に許容される担体または希釈剤とともに含む医薬組成物は、混合法、造粒法またはコーティング法による通常の方法で製造できる。例えば、例えば、経口組成物は、活性成分とともにa)希釈剤、例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび／またはグリシン；b)滑沢剤、例えば、シリカ、滑石、ステアリン酸、そのマグネシウムまたはカルシウム塩および／またはポリエチレングリコール；錠剤についてはまたc)結合剤、例えば、ケイ酸アルミニウム・マグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロースおよびまたはポリビニルピロリドン；場合によりd)崩壊剤、例えば、デンプン、寒天、アルギン酸またはそのナトリウム塩または起沸性混合物；および／またはe)吸収剤、着色剤、香味剤および甘味剤を含む錠剤またはゼラチンカプセル剤であり得る。経口製剤はまた活性成分を20～60% Eudragit EP0、ヒドロキシプロピルセルロースEF、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはKollidon VA64および5%までのpluronic F68、Cremophor ELまたはGelucire 44/14とともに含み得る。注射可能組成物は、水性等張溶液剤または懸濁液剤であり、坐薬は脂肪エマルジョンまたは懸濁液から製造できる。組成物は滅菌してよくおよび／または防腐剤、安定化剤、湿潤剤または乳化剤、溶解促進剤、浸透圧調整用塩類および／または緩衝液のようなアジュバントを含んでよい。加えて、さらに、他の治療的に価値ある物質も含み得る。経皮適用に適切な製剤は、本発明の化合物の有効量を担体とともに含む。担体は、宿主の皮膚の通過を助けるために吸収性の薬理的に許容される溶媒を含み得る。例えば、経皮デバイスは、裏打ち部材、化合物を場合により担体と共に含む貯蔵部、場合により化合物を宿主皮膚に制御されかつ予定された速度で長期間にわたり送達するための速度制御バリアおよび該デバイスを皮膚に固定するための手段を含む、バンデージの形であり得る。マトリックス経皮製剤も使用し得る。さらなる面において、ここに記載するm T O R 阻害剤を、マイクロニードルパッチにより投与し得る。マイクロニードルベースの薬物送達は当分野で周知であり(例えば、米国特許8,162,901号参照)、当業者は、これらの技術および方法を、ここに記載するm T O R 阻害剤の投与に応用できる。例えば、皮膚および眼への局所適用のための適切な製剤は、好ましくは当分野で周知の水溶液、軟膏、クリームまたはゲ

10

20

30

40

50

ルである。このような製剤は可溶化剤、安定化剤、張性増加剤、緩衝液および防腐剤を含み得る。

【0985】

適用のための医薬組成物(または製剤)は、薬物の投与に使用される方法によって、多様な方法で包装され得る。一般に、分配用物品は、適当な形態で医薬製剤が入れられている容器を含む。適当な容器は当業者に周知であり、ビン(プラスチックおよびガラス)、サシエット、アンプル、ビニール袋、金属シリンダーなどのような物質を含む。容器は、包装容器への軽率な接近を阻止するために、不正開封防止機構も含んでよい。加えて、容器は、容器の中身を記載するラベルがそれに付される。標識は適切な警告も含み得る。本発明はまた、a)ここに記載するような遊離形態または薬学的に許容される塩形態のmTOR阻害剤である第一剤およびb)少なくとも一つのさらなる薬剤を含む医薬組み合わせ、例えばキットも提供する。キットは、その投与指示を含んでよい。

10

【0986】

用語“組み合わせ剤”は、1個を超える活性成分の混合または組み合わせに由来する産物を意味し、活性成分の固定されたおよび固定されていない組み合わせの両者を含む。用語“固定された組み合わせ”は、複数活性成分、例えばmTOR阻害剤と他の薬剤が、両者とも患者に、同時に一個の物または投与量として投与されることを意味する。用語“非固定されていない組み合わせ”は、複数活性成分、例えばmTOR阻害剤と他の薬剤を、別々の物として、同時に、一緒にまたは別々に具体的時間制限なく患者に投与し、ここで、このような投与が、患者の体内で2化合物の治療的有效レベルを提供することを意味する。後者はまたカクテル療法、例えば3種以上の活性成分の投与にも適用される。

20

【0987】

持続放出

ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤または触媒的mTOR阻害剤は、製品安定性要求を満たすおよび／または平均血漿ピーク濃度減少、薬物吸収の程度および血漿ピーク濃度の患者間および患者内ばらつき減少、 C_{max}/C_{min} 比減少および／または食効減少のような即時放出(IR)錠剤より都合よい薬物動態特性を有する、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を含む経口固体投与形態の形の医薬製剤として提供できる。提供された医薬製剤は、より厳密な用量調節を可能にするおよび／または有害事象の頻度を減少させ、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001での患者のより安全な処置を提供することができる。

30

【0988】

ある態様において、本発明は、多粒子系であり、機能的層およびコーティングを有し得る、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001の安定な持続放出製剤を提供する。

【0989】

ここで使用する用語“持続放出、多粒子製剤”は、長時間にわたり、例えば少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間または6時間にわたり、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001の放出を可能とする製剤である。持続放出製剤は、活性成分を摂取後長時間にわたり利用可能とするような方法で製剤された、例えば、ここに記載する、特別の添加物からなるマトリクスおよびコーティングを含み得る。

40

【0990】

用語“持続放出”は用語“徐放”(SR)または“持効性放出”と交換可能に使用する。用語“持続放出”は、錠剤およびカプセル剤についての欧州薬局方(第7版)モノグラフおよびUSPの医薬投与形態についての一般的な章<1151>の定義に従う、活性薬物物質を、経口投与直後ではなく、長時間にわたり放出する医薬製剤をいう。ここで使用する用語“即時放出”(IR)は、Guidance for Industry: “Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms”(FDA CDER, 1997)の定義に従い、60分以内に

50

活性薬物物質の 85 % を放出する医薬製剤である。ある態様において、用語“即時放出”は、例えば、ここに記載する溶解アッセイで測定して、エベロリムスの錠剤からの 30 分以内の放出を意味する。

【0991】

ここに開示する mTOR 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは RAD001 の安定な持続放出製剤は、ここに記載する溶解アッセイのような当分野で知られるアッセイを使用してインビトロ放出プロファイルにより特徴付けできる。37℃でドデシル硫酸ナトリウム 0.2 % を含む 900 mL リン酸緩衝液 pH 6.8 で魅した溶解容器で、それぞれ USP 試験モノグラフ 711 および欧州薬局方試験モノグラフ 2.9.3. に従い、USP に従い、パドル法で、75 rpm で溶解を行う。

10

【0992】

ある態様において、ここに開示する mTOR 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは RAD001 の安定な持続放出製剤は、インビトロ放出アッセイで、次の放出明細に従い mTOR 阻害剤を放出する。

0.5 時間：< 45 % または < 40、例えば、< 30 %

1 時間：20 ~ 80 %、例えば、30 ~ 60 %

2 時間：> 50 % または > 70 %、例えば、> 75 % 3 時間：> 60 % または > 65 %、
例えば、> 85 %、例えば、> 90 %。

【0993】

ある態様において、ここに開示する mTOR 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは RAD001 の安定な持続放出製剤は、インビトロ溶解アッセイで、45 分、60 分、75 分、90 分、105 分または 120 分より速く mTOR 阻害剤の 50 % を放出しない。

20

【0994】

ある態様において、ここに記載する mTOR 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは RAD001 の安定持続放出製剤は、速溶性または分解性担体マトリックスに mTOR 阻害剤をコーティングと組み合わせて含み、ここで、コーティングの少なくとも一つは、持続放出コーティングである。他の態様において、ここに記載する mTOR 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは RAD001 の安定持続放出製剤は、mTOR 阻害剤を持続放出特性を有する非分解性担体マトリックスに含み、これは、場合によりさらなるコーティングと組み合わせることができる。

30

【0995】

ある態様において、担体マトリックスはマトリックス形成剤、概してマトリックス形成ポリマーを含み、充填剤、例えば、ラクトース、マンニトール、マルトデキストリン、アルファ化デンプン、リン酸カルシウムまたは微結晶性セルロースおよび崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン、クロスカルメロース、デンプングリコール酸ナトリウムまたはクロスボビドン、抗酸化剤、例えば、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルオール、アスコルビルパルミテート、トコフェロール、ビタミン E ポリエチレングリコールスクシネートおよび滑沢剤および流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、モノステアリン酸グリセリル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムまたはフマル酸ステアリルナトリウムのような処理改良剤のようなさらなる添加物を含み得る。用語“マトリックス形成剤”は、一般に、例えば、機械的または結合安定性のような物理的安定性を提供する、薬学的不活性物質に関する。

40

【0996】

速く溶解または崩壊する担体マトリックスに使用するための適当なマトリックス形成ポリマーは当分野で知られ、例えばセルロースまたはデンプン、例えば微結晶性セルロース(“MCC”)、例えば Avicel PH 101 (FMC BioPolymer)、アカシア、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、デンプン、アルファ化デンプン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(“HPMC”)、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリエチレングリコールまたはポリビニルピロリドン(“PVP”)、GP 812 のようなカラゲナンまたはそれらの組み合わせを含む。

50

【0997】

持続放出特性を備えた非崩壊担体マトリクスのための適当なマトリクス形成添加物は当分野で知られ、例えばアカシア、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、カルボキシメチルセルロースナトリウム(または“CMCナトリウム”)、メチルセルロース、エチルセルロースおよびセルロースアセテートまたはポリアクリレート、例えば、アミノメタクリレートコポリマー(Eudragit RS/RL)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(“HPMC”)、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアセテート、ポリエチレングリコールまたはポリビニルピロリドン(“PVP”)、例えば、GP 812のようなカラゲナン、モノステアリン酸グリセリル、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル、ビタミンEポリエチレングリコールスクシネートまたはそれらの組み合わせを含む。

10

【0998】

ある態様において、徐放性コーティングは、水不溶性、非崩壊ポリマーから形成される層であり、この層により薬物の浸透による遊離を制御する。

【0999】

徐放性コーティングはまた1個以上の多孔形成剤、可塑剤ならびに滑沢剤および固化防止剤のような処理改良剤を含み得る。拡散制御放出を可能にする適当な徐放性コーティング形成ポリマーは当分野で知られ、例えばエチルセルロースおよびセルロースアセテートまたはポリアクリレート、例えば、アミノメタクリレートコポリマー(Eudragit

20

RS/RL)、ポリビニルアセテートまたはそれらの組み合わせを含む。特定の態様において、徐放性コーティング形成ポリマーはエチルセルロースまたはセルロースアセテートまたはポリアクリレート、例えば、アミノメタクリレートコポリマータイプA(Eudragit RS)またはアミノメタクリレートコポリマータイプB(Eudragit RL)またはそれらの組み合わせである。さらに、徐放性コーティングはトリアセチン、トリエチルシトレート、ジブチルセバケート、ジエチルセバケート、ポリエチレングリコール3000、4000または6000、アセチルトリエチルシトレート、アセチルトリブチルシトレートまたはジエチルフタレートのような可塑剤および/またはSyloid 244 FP、タルク、モノステアリン酸グリセリルまたは二酸化チタンのような固化防止剤を含み得る。ある態様において、可塑剤の量は、徐放性ポリマーの量に対して5~40%、好ましくは10~25%である。

30

【1000】

ある態様において、徐放性コーティングは、水不溶性コーティング形成ポリマーおよび孔形成剤を含む孔形成系である。用語“孔形成剤”は、孔の導入またはコーティングの透過性増加可能とし、活性成分の拡散制御放出を可能とする、易溶解性添加物である。適当な孔形成剤は当分野で知られ、例えばヒドロキシプロピルセルロース(HPMC(例えば、KlucelTM EF、EXF、LF)またはヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC、例えば、MethocelTM E3/E5、Pharmacoat 603TM))、ポリエチレングリコール(例えば、Macrogol 1500、3500、4000、6000)、ポロキサマー188(Pluronic F68TM)またはポビドン(PVP、例えば、Kollidon K25/K30)、糖類、例えば、デキストロース、マンノース、フルクトースのような単糖、スクロースまたはグルコジフルクトースのような二糖またはそれらの組み合わせを含む。好ましくは孔形成剤はヒドロキシプロピルセルロース(HPMC(KlucelTM EF、EXF、LF)またはヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC、MethocelTM E3/E5、Pharmacoat 603TM))、ポリエチレングリコール(Macrogol 1500、3500、4000、6000)、ポロキサマー188(Pluronic F68TM)またはポビドン(PVP、Kollidon K25/K30)またはそれらの組み合わせである。ある態様において、コーティングに含まれる孔形成剤の適当な量は、コーティング形成ポリマーの量に対して、例えば100:20~100:50または100:20~100:100のコーティングポリマー対孔形成剤の比、好ましくは比100:35~100:45、特に比100:35

40

50

～100：50に等しい。ある態様において、包含されるコーティング形成ポリマーの適当な量は、医薬製剤の総重量の例えば、4重量%～15重量%、5重量%～15重量%、好ましくは5重量%～12重量%、より好ましくは6重量%～12重量%のポリマー重量増加のパーセンテージに等しい。

【1001】

他の態様において、非崩壊徐放性担体マトリクスは、ポリマーの水和により活性成分の拡散制御放出を可能にする、マトリクス形成ポリマーを含む。持続放出担体マトリクスは、さらに結合剤およびまたは充填剤のような添加物ならびに滑沢剤および流動促進剤などのような処理改良剤を含み得る。

【1002】

以下の代表的マトリクス形成ポリマーを拡散制御放出用を使用し得る：アルギン酸ナトリウム、ポリアクリル酸(または“カルボマー”)、カルボキシメチルセルロースナトリウム、(または“CMCナトリウム”)、メチルセルロース、エチルセルロースおよびセルロースアセテートまたはポリアクリレート、例えば、アミノメタクリレートコポリマー(Eudragit RS/RL)、異なる粘性グレード(すなわち、平均ポリマー鎖長)のヒドロキシプロピルメチルセルロース(“HPMC”)およびそれらの組み合わせ、例えば、MethocelTM CRグレード、ヒドロキシプロピルセルロース、例えばKlucelTM HF/MF、ポリオキシエチレン、例えば、PolyoxTMまたはポリビニルピロリドン(“PVP”)、例えば、PVP K60、K90、ViscarinTM GP-209/GP-379のようなカラゲナンまたはそれらの組み合わせ。マトリクス形成ポリマーの組み合わせは、必要に応じた、活性成分の溶解速度の調節を可能とする。

【1003】

ある態様において、非崩壊徐放性マトリクスは、制御された浸食により活性成分の放出を可能とする添加物で形成される。浸食制御マトリクスは、親油性マトリクス形成剤およびまたさらに充填剤、崩壊剤および滑沢剤および流動促進剤のような処理改良剤のような添加物を含み得る。このマトリクスタイプに関連する代表的親油性マトリクス形成添加物は、モノステアリン酸グリセリル、例えば、Cutina GMS、ベヘン酸グリセリル、例えば、Compritol 888 ATO、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ハードファット(hard fat)、例えば、GelucireTMまたはビタミンEポリエチレングリコールスクシネート、例えば、Speziol TPGSまたはそれらの組み合わせのような親油性添加物を含む。

【1004】

代表的適当な結合剤、充填剤またはさらなる添加物は、マンニトール、アルファ化デンプン、微結晶性セルロース、ラクトース、リン酸カルシウム、タルク、二酸化チタン、トリエチルシトレート、Aerosil、例えば、BHTのような抗酸化剤、乾燥剤および例えば、クロスビドンまたはデンプングリコール酸ナトリウム、デンプンまたはクロスカルメロースのような崩壊剤を含むが、これらに限定されない。

【1005】

ある態様において、安定な徐放性製剤は、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を、速く溶解/崩壊するマトリクスに、例えば、ここに記載する固体分散の形で、機能的層またはコーティングとともに含み、機能的層またはコーティングの少なくとも1個は、活性成分の徐放性を可能とする放出制御行動を有する。他の態様において、安定な徐放性製剤は、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を徐放性マトリクス内に含み、これは、場合により、さらに保護的または徐放性層またはコーティングのような機能的層またはコーティングを含み得る。ある態様において、コーティング、例えば、徐放性コーティングは、10～100 μm、例えば、10～50 μmの範囲の厚さを有する(共焦点RAMANスペクトロスコピーで評価)。

【1006】

ある態様において、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRA

10

20

30

40

50

D 0 0 1 の製剤は、多粒子送達系の形である。ある態様において、多粒子薬物送達系は、複数の、小さく分かれた用量単位からなる経口投与形態である。このような系において、カプセル剤、錠剤、サシェ剤またはスティックバック剤のような薬物物質の投与形態は、概して直径 0.05 ~ 2.00 mm の数十から数百または最大数千の球形粒子からなる、複数のサブユニットを含み得る。1.5 ~ 3 mm サイズの製剤、例えば、ミニ錠剤は他の代替である。投与形態は、胃で急速に崩壊して、多粒子を遊離するように設計し得る。特定の理論に縛られることを望まないが、多粒が胃腸管腔で拡散し、胃から徐々に空にされて、薬物物質を制御された方式で遊離すると考えられる。

【1007】

一つの態様において、例えば、多粒子送達系の形の、ここに開示する m T O R 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは R A D 0 0 1 の製剤は、例えば、粒子のコアに溶解または分散された(例えば、ビーズ、ペレット、顆粒またはミニ錠剤)または粒子の不活性コアを囲む層に、m T O R 阻害剤を活性成分として含む。活性成分は、好ましくは親水性または親油性マトリクス形成添加物を含む徐放性マトリクスに例えば包埋できまたは速く崩壊および/または溶解するマトリクスに機能的層およびトップコーティングと組み合わせて包埋され、ここで、機能的層またはトップコーティングの少なくとも 1 個は、活性成分の拡散制御持続放出を可能とするコーティング形成ポリマーを含む。場合により、活性成分の安定性を改善するための保護層は、医薬品の安定性を確実にするために活性物質含有マトリクスを機能的層またはトップコーティングから分離する。

【1008】

他の態様において、例えば、多粒子送達系の形の、ここに開示する m T O R 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは R A D 0 0 1 の製剤は、活性成分としての m T O R 阻害剤および不溶性ポリマーおよび孔形成剤としての可溶性成分および場合によりさらに機能的層を含む外側のコーティング層を含む。本発明の目的で、用語“外側の層”は、粒子の外側に位置する層であり、さらなる層でコーティングされてよくまたはトップコーティングであってよい。用語“外側の層”、“コーティング層”または“トップコート”は、該用語を使用する文脈によって、交換可能に使用し得る。

【1009】

一つの態様において、粒子は、活性成分の持続放出を可能とする 1 個~数個のトップコートを含む。トップコートは、概して多粒子の各々を別々に含む、放出制御行動を備えた最終層である。

【1010】

ある態様において、ここに開示する m T O R 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは R A D 0 0 1 の製剤は、場合により不溶性ポリマー層への孔形成によりまたはあるいは単に不溶性ポリマーの水和により透過性であるコーティング層を介した薬物の拡散により遊離素制御するまたは孔形成剤および不溶性ポリマーの水和の組み合わせにより遊離を制御する、外側の層またはトップコーティングを含む。ポリマーは、p H と無関係に不溶性であり、場合により水可溶性孔形成剤を含む。放出速度は、孔形成剤が溶解した後の孔の形成程度に影響される。不溶性コーティングポリマーは、エチルセルロースおよびセルロースアセテートのようなセルロースエーテルまたはポリアクリレート、例えば、アミノメタクリレートコポリマー(Eudragit RS/RL)であり得る。適当な孔形成剤は、水可溶性セルロースエーテル、例えばヒドロキシプロピルセルロース(HPCC(KlucelTM EF、EXF、LF)またはヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMPC、MethocelTM E3/E5、Pharmacoat 603TM)、ポリエチレングリコール(Macrogol 1500、3500、4000、6000)、ポロキサマー 188(Pluronic F68TM)またはポビドン(PVP、Kollidon K12、K25、K30)を含む。例えば、水可溶性孔形成剤を、2 : 1 ~ 1 : 10、例えば 1 : 1 ~ 1 : 5、1 : 3 または 1 : 5 の比で不溶性ポリマーと混合してよい。ある態様において、孔形成剤対不溶性ポリマー比は、HPCC、例えば、KlucelTM EF、EXF、LF または HPMPC 3cP、例えば、MethocelTM E3 のもの、1 : 1 ~ 1 : 4、例

えば、約 1 : 1、1 : 1.2、1 : 1.5 または 1 : 2 の比である。代表的な不溶性ポリマーは、孔形成剤と組み合わせたエチルセルロース (EC、Aqualon EC N10TM) を含むが、これに限定されない。ある態様において、孔形成剤を用いずに、不溶性ポリマーアミノメタクリレートコポリマータイプ A (Eudragit RS) とアミノメタクリレートコポリマータイプ B (Eudragit RL) の組み合わせは、1 : 2 ~ 9 : 1、好ましくは 1 : 1 ~ 4 : 1 の比であり得る。

【1011】

徐放トップコートは、活性物質の大部分の小腸への遊離を達成し、胃液から活性物質を保護し、活性物質の口腔、食道および胃への暴露を最小にし得る。

【1012】

一つの態様において、ここに開示する mTOR 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは RAD001 の製剤は、薬物物質含有マトリクス、例えば、速く崩壊および／または溶解するマトリクス層を含むかまたは、例えば、1 個以上の成分を含むことができ、活性成分が分散または溶解しているビーズ、ペレットまたは顆粒のような開始コア上の、徐放性マトリクス層を含む。例えば、非晶質または結晶 mTOR 阻害剤、例えば、ラパマイシンまたは RAD001 を、マトリクス内に重量で 1 : 100 ~ 100 : 1、例えば、重量で 1 : 50 ~ 5 : 1 ; または 1 : 50 ~ 1 : 1 または 1 : 5 ~ 2 : 3 または重量で 1 : 10 ~ 1 : 5 (マトリクス形成剤に対して) で分散または溶解できる。

【1013】

ある態様において、薬物物質含有マトリクスは、出発コアの表面上に重層される。層は、均一な、規則的サイズおよび形の粒子上に流動床法で、マトリクス成分および薬物物質の分散または溶液を噴霧することにより構築し得る。あるいは、マトリクス成分の粉末混合物を、回転ディスクプロセッサを使用して重層できる。出発コアは、平均粒子径 0.1 ~ 2.5 mm を有する。単結晶、例えば、スクロースまたは流動床造粒、回転造粒、押し出し、球形化または圧密過程により製造される顆粒状凝集体である。ある態様において、ミニ錠剤を出発コアとして使用できる。特に態様、出発コアは球形であり、スクロースおよびデンプン (Sugar Spheres、SugletsTM、ノンパレイユ)、マンニトール (例えば MCellTM)、ラクトース (例えば、噴霧乾燥ラクトース) または微結晶性セルロース (例えば、CellletsTM) のような不活性物質からなる。

【1014】

他の態様において、薬物物質含有マトリクスは、粒子のコアに取り込まれる。マトリクス形成添加物、充填剤および処理を改良するための他の成分を薬物物質と混合する。得られた粉末混合物を、湿式押し出しまたは融解押し出しとその後の混合物の球形化を使用して粒子として、またはミニ錠剤への圧密化により製剤する。形成したマトリクスは、速く崩壊／溶解するマトリクスまたは親水性または親油性マトリクス形成添加物で構築された持続放出特性を備えた非崩壊マトリクスである。

【1015】

ある態様において、薬物物質またはその固体分散を含む親水性、非崩壊マトリクスからなる多粒子を、活性成分、増量剤、例えば、ラクトースを、親水性、異なる粘性のヒドロゲル形成ポリマー、流動促進剤および滑沢剤と混合することにより製造する。ある態様において、親水性、ヒドロゲル形成ポリマーは、例えば、2 重量% 水溶液で 20 mPas 未満の低粘性グレードのヒドロキシプロピルメチルセルロース、例えば、Methocel E5 と 2 重量% 水溶液で 100 mPas を超える高粘性のヒドロキシプロピルメチルセルロースグレード、例えば、Methocel K100 の組み合わせであり得る。粉末混合物を次いで打錠機で圧縮して、ミニ錠剤を得る。あるいは、粉末混合物を有機溶媒、例えば、エタノールで湿らせ、押し出し、多粒子を得るために球形化する。

【1016】

他の態様において、薬物物質またはその固体分散を含む親油性、非崩壊マトリクスからなる多粒子を、活性成分、親油性、融解可能、マトリクス形成添加物および充填剤の混合により製造できる。混合物を、押し出し機での融解および混合により製造する。得られた

10

20

30

40

50

伸張した鎖を粒子に切断し、場合により球形化する。使用する親油性添加物は、例えばビタミンEポリエチレングリコールスクシネート(Vit E TPGS、例えば、BASFからのKolliphor TPGS Pharma)単独またはモノステアリン酸グリセロール(GMS、例えば、Kollidax GMS from BASF)と9:1~1:9比の混合物である。

【1017】

ある態様において、徐放性ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001の製剤は、患者に使用可能な速放性錠剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001速放性錠剤(Final Market Imageまたは“FMI”錠剤)と比較して、24名の健常対象における一回投与後、ピーク濃度(C_{max})対投与24時間後濃度(C_{24h})比を減少させる。ある態様において、 C_{max}/C_{24h} 比は、例えば、薬物動態モデルシミュレーションで測定して減少する。 C_{max}/C_{min} 比減少の利点は、FMI製剤に対するmTOR阻害剤のバイオアベイラビリティに基づく適切な用量で、mTOR阻害剤の濃度を、薬物の治療範囲の低い側(十分な有効性)に維持し、同時に薬物の治療範囲の高い側(毒性の濃度領域)から離すことである。それゆえに、ある態様において、徐放性ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001の製剤は、その有効性に影響することなく、mTOR阻害剤の安全性プロファイルを改善できる。ある態様において、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001の徐放性製剤を投与されている患者における C_{max}/C_{24h} (ゆえに C_{max}/C_{min})比は<5または<4、例えば 3.5 ± 1 または 3 ± 0.5 である。

【1018】

ある態様において、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001は、機能的層またはトップコートから離れた層に含まれ、製剤からの持続放出特性を制御する。このような層は、mTOR阻害剤を分散または溶解するのに適するあらゆる物質から製造され得る。ある態様において、mTOR阻害剤を含む層は親水性担体マトリクスからなる。担体マトリクスは活性成分を包埋し、分解から保護し得る。適当なマトリクス形成剤は、親水性ポリマー、例えばHPMCタイプ2910またはタイプ2280、HPC、HEC、MEC、MHEC、ポビドンを含むが、これらに限定されず、これは、水に溶解できるかまたは急速に分散できる。一つの態様において、マトリクス層は、その各々を全内容を引用により本明細書に包含させる、例えばWO97/03654号またはWO03/028705号に記載の、固体分散の形である。

【1019】

ある態様において、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001のための速く溶解/崩壊する担体マトリクスは、固体分散の形である。ある態様において、固体分散は担体、例えば、水可溶性ポリマーを含み、例えば次のポリマーの1個または混合物を使用し得る。

— ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、例えば、Dow ChemicalsのMethocelTM Eまたは信越のPharmacoatTMとして入手可能なヒプロメロースタイプ2910。良好な結果が、低い見かけの粘性、例えば、20℃で2重量%水溶液で測定して100cps以下、例えば50cps以下、好ましくは20cps以下のHPMC、例えばHPMC 3cpsを使用して、得られ得る；

— ポリビニルピロリドン(ポビドン、PVP)、例えば、PVP K25、K30またはPVP K12。PVPは、例えば、BASF社からKollidon(登録商標)としてまたはISP社からPlasdone(登録商標)として商業的に入手可能である。平均分子量約8,000~約50,000ダルトンを有するPVP、例えば、PVP K30が好ましい；

— ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、例えば、Klucel EF/LF/JFまたはその誘導体。HPC誘導体の例は、水性媒体、例えば、水中で低動的粘性、例えば、5%水溶液中、25℃で測定して約400cps以下を有するものを含む。好ましいHPC誘導体は、約200,000ダルトン以下、例えば、80,000~140,000ダルトンの平均分子量を有する。商業的に入手可能なHPCは、Hercules Aqualon社からのK

10

20

30

40

50

l u c e l (登録商標) L F、K l u c e l (登録商標) E FおよびK l u c e l (登録商標) J F；および日本曹達株式会社から入手可能なN i s s o (登録商標) H P C-Lを含む；
— ポリエチレングリコール(P E G)。例は、1 0 0 0～9 0 0 0ダルトン、例えば約1 8 0 0～7 0 0 0の平均分子量を有するP E G、例えばP E G 2 0 0 0、P E G 4 0 0 0またはP E G 6 0 0 0を含む(Handbook of Pharmaceutical Excipients, p. 355-361)；

— 例えば、Gattefosse社から、G e l u c i r e (登録商標)、例えば、G e l u c i r e (登録商標) 4 4 / 1 4、5 3 / 1 0、5 0 / 1 3、4 2 / 1 2または3 5 / 1 0として入手可能な飽和ポリグリコール化グリセリド；または

— シクロデキストリン、例えばb-シクロデキストリンまたはa-シクロデキストリン。適当なb-シクロデキストリンの例は、メチル-b-シクロデキストリン；ジメチル-b-シクロデキストリン；ヒドロキシプロピル-b-シクロデキストリン；グリコシル-b-シクロデキストリン；マルトシル-b-シクロデキストリン；スルホ-b-シクロデキストリン；b-シクロデキストリンのスルホアルキルエーテル、例えばスルホ-C₁-₄-アルキルエーテルを含むが、これらに限定されない。a-シクロデキストリンの例は、グルコシル-a-シクロデキストリンおよびマルトシル-a-シクロデキストリンを含むが、これらに限定されない。

【1020】

一つの態様において、m T O R阻害剤-含有層は、抗酸化剤を、薬物物質の量に対して1：1 0 0 0～1：1比で含む。抗酸化剤はまた他の機能的層に、例えば、0.1～10%、好ましくは0.1～1%の濃度で使用し得る。適当な抗酸化剤は、ブチルヒドロキシルトルオール、ブチルヒドロキシアニソール、アスコルビルパルミテート、トコフェロール、ビタミンEポリエチレングリコールスクシネートを含むが、これらに限定されない。特定の態様において、抗酸化剤はブチルヒドロキシルトルオールである。

【1021】

一つの態様において、保護層は、活性物質を含む層を、例えば、トップコーティングのような他の機能的層から離し、医薬品の安定性を増強する。薬物物質は、トップコーティングとの直接接触の排除により安定化される。保護層はまた層を通して移動できるトップコーティングにおける何らかの成分、例えば、ポリマー副産物または可塑剤が、活性剤と直接接触することを阻止する拡散バリアとしても作用する。マトリクス形成剤(例えば、上記マトリクス形成剤)としても使用するポリマー以外に、適用したポリマーの量に対して、例えば、10～100%、例えば、20～50%の、高含量の、タルクおよび／または二酸化チタンのような無機色素または固化防止剤はバリア機能に寄与する。保護層厚さは、最適化された薬物製品安定性を得るために調節できる。

【1022】

他の態様において、m T O R阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはR A D 0 0 1は、徐放性担体マトリクスに直接包埋される。

【1023】

ある態様において、ここに開示するm T O R阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはR A D 0 0 1を含む製剤は、製剤に閉じ込められた水湿気と結合でき、内部乾燥剤として作用する、強吸湿性の添加物を含む。例えば、クロスポビドン、クロスカルメロースナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウムまたはデンプンのような吸着剤を使用できる。例えば、ある態様において、クロスポビドンを錠剤崩壊剤として、例えば、2%～25%クロスポビドンで使用する。吸着剤、例えば、クロスポビドンは、湿式および融解押し出しで使用する粉末混合物の一部、ミニ錠剤に圧縮する粉末混合物の一部、多粒子を打錠する粉末混合物の一部および／またはサシェ剤またはカプセル剤充填工程で多粒子に直接添加されることが可能である。

【1024】

一つの面において、ここに開示するm T O R阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはR A D 0 0 1は、計5%未満、例えば、計3%未満または計2.5%未満の低水湿気含量の粒

10

20

30

40

50

子(例えば、0.1～0.5 mm)、ビーズ、ペレット(例えば、0.2～2 mm)またはミニ錠剤(例えば、1.5～3 mm)で存在する。

【1025】

ある態様において、医薬組成物、例えば、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001の多粒子送達系を、例えば、カプセル剤(例えば、HPMCまたはHart Gelatineカプセル)のような医薬品としてまたは小袋またはスティックパックに包装してまたは崩壊により粒子を放出する錠剤として製剤できる。

【1026】

ある態様において、小袋、スティックパック、ブリスターまたはボトルのような一次包装は、貯蔵寿命保存中および／または使用時間中医薬品の水湿気含量を減らすかまたは安定化する水収着成分、例えば、シリカゲルを含み得る。

10

【1027】

提供される製剤は、複数ペレット、顆粒またはミニ錠剤を含みおよび／または遊離し得る。

【1028】

ある態様において、提供される製剤、例えば、多粒子製剤は、マトリクス形成添加物と薬物物質の混合物を、熱または湿潤液体の助けを借りて、押し出し、球状化しまたは薬物含有混合物のミニ錠剤を圧密化しまたは薬物含有マトリクス層を流動床または回転造粒工程でコア上に重層することにより製造できる。

【1029】

ある態様において、活性物質含有層は、親水性成分および活性物質が分散または溶解した、有機溶媒のスプレー分散をコア物質に噴霧し、同時に、溶媒を加熱、乾燥空気の助けを借りて除去することにより製造できる。この方法で、コアを囲むマトリクス層が形成され、例えば、形成された層は、例えば、HPMC、HPC、HECのようなポリマー中の活性剤の固体分散である。

20

【1030】

一つの面において、提供される医薬製剤は、次のとおり、製造し得る。親水性ポリマーがコロイド状に分散している有機フィード混合物およびここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001を分散または溶解し、これが修飾放出コートでコートされ得るような方法で、溶媒の除去により固体分散の均一な、平滑層として沈殿する。ある態様において、得られた薬物含有多粒子を、さらなる機能的層およびトップコーティングでコーティングし得る。有機溶媒およびそれらの混合物に溶解、分散および懸濁されたコーティングポリマー、滑沢剤、粘着防止剤、孔形成剤および可塑剤を含む噴霧分散を、薬物含有多粒子に噴霧する。処理中、多粒子は、制御された運動または流動化を連続して維持し、一方乾燥、加熱処理ガスを、多粒子表面上の溶媒の蒸発のために製品に適用し、ここで、フィルム層が規定温度で形成される。フィルム層厚さは、噴霧するコーティング分散の量により制御できる。最終乾燥を、重層および被覆多粒子における残存溶媒含量を最小化するために適用する。

30

【1031】

他の面において、ここに開示するmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001は、徐放性製剤の一部の高薬物充填部分として製剤し得る。ある態様において、製剤はさらに界面活性剤を含む。用語“界面活性剤”は、“湿潤剤”または“洗剤”と交換可能に使用でき、例えば、非イオン性、イオン性、アニオン性または両性界面活性剤をいう。適当な界面活性剤／湿潤剤の例は、例えば、Pluronicまたはポロクサマー(例えばポロクサマー188(Pluronic F68)の商品名の下に知られるポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーおよびブロックコポリマー、ポリオキシエチレン、Tweenの商品名の下に知られるタイプのモノおよびトリラウリル、パルミチル、ステアリルおよびオレイルエステルを含むソルビタン脂肪酸エステル、Myrjの商品名の下に知られるタイプのポリオキシエチレンステアリン酸エステルを含むポリオキシエチレン脂肪酸エステル、Brjの商品名の下に知られるポリオキシエチレンアルキルエーテル

40

50

、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)のようなナトリウムアルキルスルフェートおよびスルホネートおよびナトリウムアルキルアリアルスルホネート、水可溶性トコフェリルポリエチレングリコールコハク酸エステル(TPGS)、ポリグリセロール脂肪酸エステル、アルキレンポリオールエーテルまたはエステル、ポリエチレングリコールグリセリル脂肪酸エステル、ステロールおよびその誘導体、エステル交換、ポリオキシエチル化カプリルカープリン酸グリセリド、糖脂肪酸エステル、PEGステロールエーテル、リン脂質、脂肪酸の塩、脂肪酸スルフェートおよびスルホネート、脂肪酸の塩、脂肪酸スルフェートおよびスルホネート、中鎖または長鎖アルキル、例えば、 C_6-C_{18} 、アンモニウム塩、胆汁酸またはその塩；例えばコール酸、グリコール酸または塩、例えば、コール酸ナトリウムおよび飽和 $C_{10}-C_{22}$ 脂肪酸のポリオキシエチレンモノエステルを含むが、これらに限定されない。特定の態様において、界面活性剤はポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンコポリマーまたはブロックコポリマーまたは水可溶性トコフェリルポリエチレングリコールコハク酸エステル、例えば、水可溶性トコフェリルポリエチレングリコールコハク酸エステル、例えば、ビタミンEポリエチレングリコール1000スクシネート(TPGS)である。他の態様において、本医薬製剤中の界面活性剤はポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンコポリマー、例えば、ポロキサマー188である。さらに他の態様において、医薬製剤は界面活性剤アルキル硫酸ナトリウム、例えば、ラウリル硫酸ナトリウムを含む。

10

【1032】

界面活性剤または湿潤剤は、製剤中に、mTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001に対して、重量で10:1~1:200、例えば、重量で1:1~1:100、重量で1:2~1:8、重量で1:4~1:6の比で存在し得る。

20

【1033】

ある態様において、mTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンまたはRAD001は、高薬物負荷含有第一層であり、界面活性剤は第二層であり、ここで、該第二層は第一層の下にあり、場合によりさらなる徐放性コーティングを伴う。このような態様のいくつかにおいて、界面活性剤はポロキサマー188およびTPGSではない。ある態様において、第二層の界面活性剤または湿潤剤は、活性成分含有層を、製剤を覆うコーティングと離す、保護層を形成できる。製剤を覆うコーティングは徐放性コーティングであり得る。

【1034】

CAR有効性またはサンプル適性を評価するための方法およびバイオマーカー

30

他の面において、本発明は、対象(例えば、癌を有する対象)におけるCAR発現細胞療法の有効性またはCAR治療、例えば、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与を含む治療のためのサンプル(例えば、アフエレーシスサンプル)の適性を評価またはモニタリングする方法に関する。方法は、CAR治療またはサンプル適性に対する有効性の値を得て、ここで、該値はCAR発現細胞療法の有効性または適性の指標である。

【1035】

ある態様において、CAR治療またはサンプル適性の有効性の値は、次の1、2、3、4、5、6またはそれ以上(全て)の測定を含む。

- (i) サンプル(例えば、アフエレーシスサンプルまたは製造CAR発現細胞産物サンプル)における休止 T_{EFF} 細胞、休止 T_{REG} 細胞、若いT細胞(例えば、若いCD4またはCD8細胞またはガンマ/デルタT細胞)または早期記憶T細胞またはこれらの組み合わせの1、2、3またはそれ以上(例えば全)のレベルまたは活性；
- (ii) サンプル(例えば、アフエレーシスサンプルまたは製造CAR発現細胞産物サンプル)における活性化 T_{EFF} 細胞、活性化 T_{REG} 細胞、古いT細胞(例えば、古いCD4またはCD8細胞)または後期記憶T細胞またはこれらの組み合わせの1、2、3またはそれ以上(例えば全)のレベルまたは活性；
- (iii) サンプル(例えば、アフエレーシスサンプルまたは製造CAR発現細胞産物サンプル)における免疫細胞枯渇マーカー、例えば、免疫チェックポイント阻害剤(例えば、PD-1、PD-L1、TIM-3および/またはLAG-3)の1、2以上のレベルまたは活

40

50

性。ある態様において、免疫細胞は、枯渇表現型を有し、例えば、少なくとも2枯渇マーカーを共発現し、例えば、PD-1およびTIM-3を共発現する。他の態様において、免疫細胞は、枯渇表現型を有し、例えば、少なくとも2枯渇マーカーを共発現し、例えば、PD-1およびLAG-3を共発現する；

(iv) サンプル(例えば、アフェレーシスサンプルまたは製造CAR発現細胞産物サンプル)における、CD27および/またはCD45RO⁻(例えば、CD27⁺CD45RO⁻)免疫エフェクター細胞のレベルまたは活性；

(v) CCL20、IL-17aおよび/またはIL-6、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、CD57、CD27、CD122、CD62L、KLRG1から選択されるバイオマーカーの1、2、3、4、5、10、20またはそれ以上のレベルまたは活性；

(vi) CAR発現細胞産物サンプルにおけるサイトカインレベルまたは活性(例えば、サイトカインレパートリーの質)；または

(vii) 製造CAR発現細胞産物サンプルにおけるCAR発現細胞の形質導入効率。

【1036】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、CAR発現細胞療法は、複数(例えば、集団)のCAR発現免疫エフェクター細胞、例えば、複数(例えば、集団)のT細胞またはNK細胞またはこれらの組み合わせを含む。ある態様において、CAR発現細胞療法は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与を含む。

【1037】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、(i)~(vii)の1以上の測定は、対象から得たアフェレーシスサンプルから得る。アフェレーシスサンプルは、注入または再注入前に評価できる。

【1038】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、(i)~(vii)の1以上の測定は、製造CAR発現細胞産物サンプルから得る。製造CAR発現細胞産物は、注入または再注入前に評価できる。

【1039】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、対象を、CAR発現細胞療法を受ける前、途中または後に評価する。

【1040】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、(i)~(vii)の1以上の測定は、遺伝子発現、フローサイトメトリーまたはタンパク質発現の1以上のプロファイルを評価する。

【1041】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、方法は、さらに、(i)~(vii)の1以上の測定に基づき対象を応答者、非応答者、再発者または非再発者として特定することを含む。

【1042】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、応答者(例えば、完全応答者)は、非応答者と比較して、GZMK、PPF1BP2またはナイーブT細胞の1、2以上(全て)のレベルまたは活性が高いかまたは高いとして同定される。

【1043】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、非応答者は、応答者と比較して、IL22、IL-2RA、IL-21、IRF8、IL8、CCL17、CCL22、エフェクターT細胞または制御性T細胞の1、2、3、4、5、6、7またはそれ以上(例えば、全)のレベルまたは活性が高いかまたは高いとして同定される。

【1044】

ある態様において、再発者は、非再発者と比較して、次の遺伝子の1以上(例えば、2、3、4または全)の発現レベルが高いかまたは高いとして同定される患者である：MI

10

20

30

40

50

R199A1、MIR1203、uc021ovp、ITM2CおよびHLA-DQB1；および／または非再発者と比較して、次の遺伝子の1以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または全)の発現レベルが減少している患者である：PPIAL4D、TTY10、TXLNG2P、MIR4650-1、KDM5D、USP9Y、PRKY、RPS4Y2、RPS4Y1、NCRNA00185、SULT1E1およびEIF1AY。

【1045】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、完全応答者は、対照値、例えば、非応答者のCD8⁺ T細胞パーセンテージと比較して、大きい、例えば、統計学的に有意に大きい、CD8⁺ T細胞パーセンテージを有するかまたは有するとして同定される。

10

【1046】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、完全応答者は、対照値、例えば、非応答者のCD27⁺ CD45RO⁻免疫エフェクター細胞数と比較して、大きなパーセンテージのCD27⁺ CD45RO⁻免疫エフェクター細胞を有するかまたは有するとして同定される。

【1047】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、完全応答者または部分的応答者は、対照値、例えば、非応答者CD4⁺ T細胞パーセンテージと比較して、大きい、例えば、統計学的に有意に大きい、CD4⁺ T細胞パーセンテージを有するかまたは有するとして同定される。

20

【1048】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、完全応答者は、対照値、例えば、非応答者の休止T_{EFF}細胞、休止T_{REG}細胞、若いT細胞(例えば、若いCD4またはCD8細胞)または早期記憶T細胞数と比較して、大きなパーセンテージの休止T_{EFF}細胞、休止T_{REG}細胞、若いT細胞(例えば、若いCD4またはCD8細胞またはガンマ／デルタT細胞)または早期記憶T細胞またはこれらの組み合わせの1、2、3またはそれ以上(例えば全)を有するかまたは有するとして同定される。

【1049】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、非応答者は、対照値、例えば、応答者の活性化T_{EFF}細胞、活性化T_{REG}細胞、古いT細胞(例えば、古いCD4またはCD8細胞)または後期記憶T細胞活性化T_{EFF}細胞、活性化T_{REG}細胞、古いT細胞(例えば、古いCD4またはCD8細胞)または後期記憶T細胞数と比較して、大きなパーセンテージの活性化T_{EFF}細胞、活性化T_{REG}細胞、古いT細胞(例えば、古いCD4またはCD8細胞)または後期記憶T細胞またはこれらの組み合わせの1、2、3またはそれ以上(例えば全)を有するかまたは有するとして同定される。

30

【1050】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、非応答者は、免疫細胞枯渇マーカー、例えば、1、2以上の免疫チェックポイント阻害剤(例えば、PD-1、PD-L1、TIM-3および／またはLAG-3)の大きなパーセンテージを有するかまたは有するとして同定される。ある態様において、非応答者は、応答者からのPD-1またはLAG-3発現免疫エフェクター細胞のパーセンテージと比較して、大きなパーセンテージのPD-1、PD-L1またはLAG-3発現免疫エフェクター細胞(例えば、CD4⁺ T細胞および／またはCD8⁺ T細胞)(例えば、CAR発現CD4⁺細胞および／またはCD8⁺ T細胞)を有するかまたは有するとして同定される。

40

【1051】

ある態様において、非応答者は、大きなパーセンテージの枯渇表現型を有する免疫細胞、例えば、少なくとも2枯渇マーカーを共発現する、例えば、PD-1、PD-L1および／またはTIM-3を共発現する免疫細胞を有するかまたは有するとして同定される。他の態様において、非応答者は、大きなパーセンテージの枯渇表現型を有する免疫細胞、

50

例えば、少なくとも2枯渴マーカーを共発現する、例えば、PD-1およびLAG-3を共発現する免疫細胞を有するかまたは有するとして同定される。

【1052】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、非応答者は、CAR発現細胞療法に対する応答者(例えば、完全応答者)と比較して、CAR発現細胞集団において大きなパーセンテージのPD-1/PD-L1⁺/LAG-3⁺細胞を有するかまたは有するとして同定される。

【1053】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、部分的応答者は、CAR発現細胞集団において、応答者よりも高いパーセンテージのPD-1/PD-L1⁺/LAG-3⁺細胞を有するかまたは有するとして同定される。

10

【1054】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、非応答者は、CAR発現細胞集団においてPD1/PD-L1⁺ CAR⁺の枯渴表現型およびLAG3共発現を有するかまたは有するとして同定される。

【1055】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、非応答者は、応答者(例えば、完全応答者)と比較して、CAR発現細胞集団における大きなパーセンテージのPD-1/PD-L1⁺/TIM-3⁺細胞を有するかまたは有するとして同定される。

【1056】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、部分的応答者は、CAR発現細胞集団において、応答者よりも高いパーセンテージのPD-1/PD-L1⁺/TIM-3⁺細胞を有するかまたは有するとして同定される。

20

【1057】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、アフエレーシスサンプルにおけるCD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁻ T細胞の存在は、CAR発現細胞療法に対する対象の応答の正の予測因子である。

【1058】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、アフエレーシスサンプルにおける高いパーセンテージのPD1⁺ CAR⁺およびLAG3⁺またはTIM3⁺ T細胞は、CAR発現細胞療法に対する対象の応答が不良である負の予測因子である。

30

【1059】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、応答者(例えば、完全または部分的応答者)は、次のプロファイルの1、2、3またはそれ以上(または全)を有する。

(i)対照値、例えば、非応答者のCD27⁺免疫エフェクター細胞数と比較して、CD27⁺免疫エフェクター細胞数が多い；

(ii)(i)対照値、例えば、非応答者のCD8⁺ T細胞数と比較して、CD8⁺ T細胞数が多い；

(iii)対照値、例えば、非応答者の1以上のチェックポイント阻害剤を発現する細胞数と比較して、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3またはKLRG-1または組み合わせから選択される1以上のチェックポイント阻害剤、例えば、チェックポイント阻害剤を発現する免疫細胞数が少ない；または

40

(iv)対照値、例えば、非応答者の休止T_{EFF}細胞、休止T_{REG}細胞、ナイーブCD4細胞、非刺激記憶細胞または早期記憶T細胞数と比較して、休止T_{EFF}細胞、休止T_{REG}細胞、ナイーブCD4細胞、非刺激記憶細胞または早期記憶T細胞またはこれらの組み合わせの1、2、3、4またはそれ以上(全て)の数が多い。

【1060】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、(vi)のサイトカインレベルまたは活性は、サイトカインCCL20/MIP3a、IL17A、IL6、GM-CSF、IFNγ、IL10、IL13、IL2、IL21、IL4、IL5、IL9またはTNF

50

α またはこれらの組み合わせの 1、2、3、4、5、6、7、8 またはそれ以上(全て)から選択される。サイトカインは、IL-17a、CCL20、IL2、IL6 または TNFa の 1、2、3、4 またはそれ以上(全て)から選択できる。ある態様において、IL-17a および CCL20 から選択される一方または両方のサイトカインのレベルまたは活性の増加は、増加した応答性または減少した再発の指標である。

【1061】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、(vii)における 15% 以上の形質導入効率は、増加した応答性または減少した再発の指標である。

【1062】

ここに開示する方法のいずれかのある態様において、(vii)における 15% 未満の形質導入効率は、低下した応答性または増加した再発の指標である。

【1063】

ある態様において、この方法で同定した応答者、非応答者、再発者または非再発者は、臨床基準によりさらに評価できる。例えば、完全応答者は、処置に対する完全応答、例えば、完全寛解を示す、疾患、例えば、癌を有する対象であるまたはそう同定される。完全応答は、例えば、NCCN Guidelines (登録商標)(これは引用により本明細書に包含させる)を使用して、ここに記載のように同定し得る。部分的応答者は、処置に対する部分的応答、例えば、部分的寛解を示す、疾患、例えば、癌を有する対象であるまたはそう同定される。部分的応答は、例えば、NCCN Guidelines (登録商標)を使用して、ここに記載のように同定し得る。非応答者は、処置に応答を示さない、例えば、疾患が安定したまたは疾患が進行した、疾患、例えば、癌を有する対象であるまたはそう同定される。非応答者は、例えば、NCCN Guidelines (登録商標)を使用して、ここに記載のように同定し得る。

【1064】

ここに開示する方法とは別にまたはそれと組み合わせて該値に対する応答は、次の 1、2、3、4 またはそれ以上を実施する。

例えば、応答者または非再発者に、CAR 発現細胞療法を投与する；

CAR 発現細胞療法の別の用量を投与する；

CAR 発現細胞療法のスケジュールまたはタイムコースを変更する；

例えば、非応答者または部分的応答者に、CAR 発現細胞療法に加えて、さらなる薬剤、例えば、チェックポイント阻害剤、例えば、ここに記載するチェックポイント阻害剤を投与する；

非応答者または部分的応答者に、CAR 発現細胞療法での処置前に対象の若い T 細胞の数を増加させる治療を投与する；

例えば、非応答者または部分的応答者として同定された対象について、CAR 発現細胞療法の製造法を修飾する、例えば、CAR をコードする核酸導入前に若い T 細胞を富化するまたは形質導入効率を増加する；

例えば、非応答者または部分的応答者または再発者に対して、別の治療を投与する；または

対象が非応答者または再発者であるまたはそうであると同定されたならば、例えば、CD25 枯渇、シクロホスファミド、抗 GITR 抗体またはこれらの組み合わせ投与の 1 以上により、T_{REG} 細胞集団および／または T_{REG} 遺伝子サインを減少させる。

【1065】

ある態様において、対象は抗 GITR 抗体で前処置される。ある態様において、対象は、注入または再注入前に抗 GITR 抗体で処置される。

【1066】

バイオポリマー送達方法

ある態様において、場合により低い免疫増強用量の mTOR 阻害剤(例えば、ここに記載する mTOR 阻害剤)と組み合わせたここに開示する 1 以上の CAR 発現細胞を、バイオポリマー足場、例えば、バイオポリマーインプラントにより対象に投与または送達し得

る。バイオポリマーを、バイオポリマー足場、例えば、バイオポリマーインプラントにより対象に投与または送達し得る。

【1067】

適当なバイオポリマーの例は、寒天、アガロース、アルギン酸、アルギン酸／リン酸カルシウムセメント(CPC)、ベーターガラクトシダーゼ(β -GAL)、(1,2,3,4,6-ペンタアセチル α -D-ガラクトース)、セルロース、キチン、キトサン、コラーゲン、エラスチン、ゼラチン、ヒアルロン酸コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ポリ(3-ヒドロキシブチレート- γ -3-ヒドロキシヘキサノエート)(PHBHHx)、ポリ(ラクチド)、ポリ(カプロラクトン)(PCL)、ポリ(ラクチド- γ -グリコリド)(PLG)、ポリエチレンオキシド(PEO)、ポリ(乳酸- γ -グリコール酸)(PLGA)、ポリプロピレンオキシド(PPO)、ポリビニルアルコール(PVA)、絹、大豆タンパク質および大豆タンパク質単離体の、単独でまたは任意の他のポリマー組成物との、あらゆる濃度およびあらゆる比での混合物を含むが、これらに限定されない。バイオポリマーは、接着または遊走促進分子、例えば、リンパ球のコラーゲン受容体に結合するコラーゲン模倣ペプチドおよび／または送達する細胞の送達、増殖または機能、例えば、抗癌活性を増強する刺激分子で増強または修飾され得る。バイオポリマー足場は、注射可能な、例えば、ゲルまたは半固体または固体組成物であり得る。

【1068】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、対象への送達前にバイオポリマー足場上に播種する。ある態様において、バイオポリマー足場は、例えば、足場のバイオポリマーに取り込まれたまたはコンジュゲートされた、さらにここに記載する1以上のさらなる治療剤(例えば、他のCAR発現細胞、抗体または小分子)またはCAR発現細胞の活性を増強する薬剤を含む。ある態様において、バイオポリマー足場を、例えば、腫瘍内に注射するかまたは腫瘍にまたは抗腫瘍効果を仲介するのに十分に腫瘍に近位に外科的にインプラントする。バイオポリマー組成物およびその送達のための方法さらなる例は、Stephan et al., Nature Biotechnology, 2015, 33:97-101; およびWO 2014/110591号に記載される。

【1069】

医薬組成物および処置：CARおよび組み合わせ

ある面において、本発明は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、ここに記載するmTOR阻害剤と組み合わせて使用するための、CARを発現するように操作された免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を含む、医薬組成物に関する。

【1070】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤の投与を、CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞投与前に開始する。ある態様において、CAR細胞を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベルまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比が、少なくとも一過性に上昇するように、mTOR阻害剤の十分な時間または十分な用量の後に投与する。

【1071】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤の投与を、CARの発現のために操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の回収前に開始する。ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、採取細胞におけるD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベルまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞比が、少なくとも一過性に、増加するように、mTOR阻害剤の十分な時間または十分な用量の後に採取する。

【1072】

本発明の医薬組成物は、ここに記載のように、CAR発現細胞、例えば、複数のCAR

発現細胞を、1以上の薬学的にまたは生理学的に許容される担体、希釈剤または添加物と組み合わせて含む。このような組成物は、中性緩衝化食塩水、リン酸緩衝化食塩水などのような緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールのような炭水化物；タンパク質；グリシンのようなポリペプチドまたはアミノ酸；抗酸化剤；E D T Aまたはグルタチオンのようなキレート剤；アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム)；および防腐剤を含み得る。本発明の組成物は、一つの面において静脈内投与用に製剤される。

【1073】

本発明の医薬組成物を、処置する(または予防する)疾患に適する方法で投与し得る。投与の量および頻度は、患者の状態および患者の疾患のタイプおよび重症度のような因子により決定されるが、適切な用量は、臨床試験により決定され得る。

【1074】

ある態様において、医薬組成物は、例えば、エンドトキシン、マイコプラズマ、複製可能レンチウイルス(R C L)、p 2 4、V S V-G核酸、H I V g a g、残留抗C D 3/抗C D 2 8被覆ビーズ、マウス抗体、貯留ヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地要素、ベクターパッケージング細胞またはプラスミド成分、細菌および真菌からなる群から選択される汚染物が実質的にない、例えば、検出可能なレベルで存在しない。ある態様において、細菌は、アルガリゲネス・フェカリス、カンジダ・アルビカンズ、エシエリキア・コリ、ヘモフィルス・インフルエンザエ、ナイセリア・メニンギティディス、シュドモナス・エルジノーサ、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ニューモニエおよびストレプトコッカス・ピオゲネスA群からなる群から選択される少なくとも1つである。

【1075】

“免疫学的に有効量”、“抗腫瘍有効量”、“腫瘍阻害有効量”または“治療量”が示されるとき、本発明の組成物の投与すべき正確な量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染の程度または転移および患者(対象)の状態の個体差を考慮して医師が決定できる。ここに記載する免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を含む医薬組成物を、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg体重、いくつかの例において $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重の範囲の用量で、これらの範囲内の全整数値を含み、投与し得ると一般に述べることができる。T細胞組成物を、また、この用量で複数回投与し得る。細胞を、免疫療法において一般に知られる注入技術を使用して投与できる(例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988参照)。

【1076】

ある面において、活性化免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を対象に投与し、続いて血液を採り(またはアフエレーシスを実施し)、本発明に従いそこからの免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を活性化し、これらの活性化し、かつ増殖させた免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を患者に再注入することが望ましいことがある。この過程を数週間毎に複数回実施できる。ある面において、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、10cc~400ccの採血した血液から活性化できる。ある面において、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90ccまたは100ccの採血した血液から活性化する。

【1077】

対象組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、留置または移植を含む、任意の簡便な方法により実施し得る。ここに記載する組成物を、患者に経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内(i.v.)注射によりまたは腹腔内に投与し得る。一つの面において、本発明のT細胞組成物を、患者に皮内または皮下注射により投与する。一つの面において、本発明のT細胞組成物を、i.v.注射により投与する。免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の組成物を、腫瘍、リンパ節または感染部位に直接注射し得る。

10

20

30

40

50

【1078】

特に代表的な面において、対象は、白血球を採取し、エキスピボで富化または枯渇させて、目的の細胞、例えば、T細胞を選択および／または単離する、白血球除去を受け得る。これらのT細胞単離体を、当分野で知られる方法により増殖させ、1以上の本発明のCAR構築物が導入され、それにより本発明のCAR T細胞が創製されるように処理し得る。処置を必要とする対象を、その後高用量の化学療法剤と続く末梢血幹細胞移植の標準的処置に付し得る。ある面において、移植後または移植と同時に、対象は、増殖させた本発明のCAR T細胞の注入を受ける。さらなる面において、増殖細胞を手術の前または後に投与する。

【1079】

ある態様において、リンパ球枯渇を、ここに記載するCAR、例えば、ここに記載するCD20-結合CARを発現する1以上の細胞の投与前に対象で実施する。ある態様において、リンパ球枯渇は、メルファラン、シトキサン、シクロホスファミドおよびフルダビンの1以上の投与を含む。

【1080】

患者に投与すべき上記処置の用量は、処置する状態の正確な性質および処置の受け手により変わる。ヒト投与のためのスケーリングは、当分野で認識されている習慣に従い実施できる。キャンパスの用量は、例えば、概して成人患者に1～約100mgの範囲であり、通常連日、1～30日の期間投与する。好ましい1日用量は1～10mg/日であるが、いくつかの例において最大40mg/日までの高用量を使用し得る(米国特許6,120,766号に記載)。

【1081】

ある態様において、CARを、例えば、インビトロ転写を使用して免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)に導入し、対象(例えば、ヒト)は、本発明のCAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の初期投与と、その後の本発明のCAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の1回以上の投与を受け、ここで、その後の1回以上の投与は、先の投与の後、15日、例えば、14日、13日、12日、11日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日または2日以内に行う。ある態様において、本発明のCAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の1回を超える投与を、対象(例えば、ヒト)に1週間当たりに行い、例えば、本発明のCAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の2、3または4投与を週あたりに投与する。ある態様において、対象(例えば、ヒト対象)は、CAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の週あたり1回を超える投与を受け(例えば、1週間当たり2回、3回または4回投与)(ここではサイクルとも呼ぶ)、続いて1週間、CAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)投与されず、その後さらにCAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の1回以上のさらなる投与(例えば、週あたりCAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の1回を超える投与)を対象に投与する。他の態様において、対象(例えば、ヒト対象)は、CAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の1回を超えるサイクルの投与を受け、各サイクル間の期間は10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日または3日より短い。ある態様において、CAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、隔日で1週間3回投与する。ある態様において、本発明のCAR免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間またはそれ以上投与する。

【1082】

ある面において、CAR発現本発明の細胞を、レンチウイルスのようなレンチウイルスウイルスベクターを使用して産生する。細胞、例えば、この方法で産生されたCAR Tは、安定なCAR発現を有する。

【1083】

ある面において、CAR発現細胞、例えば、CAR Tを、ガンマレトロウイルスベクタ

10

20

30

40

50

一、例えば、ここに記載するガンマレトロウイルスベクターのようなウイルスベクターを使用して産生する。これらのベクターを使用して産生されたCARTは、安定なCAR発現を有する。

【1084】

ある面において、CAR発現細胞は、形質導入4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日後、CARベクターを一過性に発現する。CARの一過性発現は、RNA CARベクター送達により行われ得る。ある面において、CAR RNAを、電気穿孔法によりT細胞またはNK細胞に導入する。

【1085】

一過性にCARを発現する免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)(特にマウス scFv 担持 CART)を使用して処置される患者で生じ得る可能性のある問題は、複数処置後のアナフィラキシーである。

【1086】

この理論に縛られることを望まないが、このようなアナフィラキシー応答は、液性抗CAR応答を発達させる患者、すなわち、抗IgEアイソタイプを有する抗CAR抗体が原因であると考えられる。細胞を産生する患者の抗体が、抗原への暴露の10～14日の中断があるとき、IgGアイソタイプ(これはアナフィラキシーを生じない)からIgEアイソタイプへのクラススイッチを受けると考えられる。

【1087】

患者が一過性CAR治療(例えばRNA形質導入により完成されたもののような)中に抗CAR抗体応答を産生する高リスクにあるならば、CAR発現細胞注入中断は10～14日を超えて継続してはならない。

【実施例】

【1088】

本発明を、次の実験的实施例を参照してさらに詳細に記載する。これらの実施例は、説明のみを目的として提供し、特に断らない限り限定を意図しない。そうして、本発明は、決して次の実施例に限定されると解釈してはならず、むしろ、ここに提供する教示の結果として明らかとなる任意かつ全ての異形を含むと解釈すべきである。

【1089】

さらに記載せずとも、当業者は、前の記載および次の説明的実施例を使用して、本発明の化合物を製造および利用し、本願発明方法を実施できると考える。次の作業実施例は、本発明の多様な面を特に示すものであり、本開示を限定するものと解釈されるべきでない。

【1090】

実施例1：高齢者における免疫老化に対するmTOR阻害の効果

加齢と最も明確に結びついている経路の一つは、mTOR経路である。mTOR阻害剤ラパマイシンがマウスで寿命を延長し、高齢マウスで多様な加齢関連状態を改善することが示されている(Harrison, DE et al. (2009) Nature 460:392-395; Wilkinson JE et al. (2012) Aging Cell 11:675-682; およびFlynn, JM et al. (2013) Aging Cell 12:851-862)。それゆえに、これらの知見は、mTOR阻害剤がヒトにおける加齢および加齢関連状態に有益な効果を有し得ることを示す。

【1091】

短い臨床試験時間枠で試験できる年齢関連表現型は免疫老化である。免疫老化は、感染に対する感受性の増加およびインフルエンザワクチン接種を含むワクチン接種に対する応答の減少に至る、高齢者で生じる免疫機能の減少である。年齢による免疫機能の減少は、造血幹細胞(HSC)がナイーブリンパ球を産生する能力の減少および抗原刺激に対する応答が不完全な枯渇したPD-1陽性リンパ球数の増加を含む、免疫欠損の蓄積による(Boraschi, D et al. (2013) Sci. Transl. Med.5:185ps8; Lages, CS et al. (2010) Aging Cell 9:785-798; and Shimatani, K et al., (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:15807-15812)。高齢マウスでの試験は、mTOR阻害剤ラパマイシンでの6週間の処置がHSC機能を若返らせ、ナイーブリンパ球産生増加、インフルエンザワクチン接種に対す

10

20

30

40

50

る応答改善および寿命延長に至ることを示した(Chen, C et al. (2009) Sci. Signal. 2: ra75)。

【1092】

ヒト加齢関連表現型に対するmTOR阻害の効果をおよびmTOR阻害剤RAD001が免疫老化を軽減するかを評価するために、RAD001またはプラセボを投与された高齢ボランティアにおけるインフルエンザワクチンに対する応答を評価した。ここに示す知見は、RAD001が、十分耐容性である用量で高齢ボランティアのインフルエンザワクチンに対する応答を増強したことを示唆する。RAD001はまた年齢とともに蓄積されるプログラム死(PD)-1陽性CD4およびCD8 Tリンパ球のパーセンテージも減少させた。これらの結果は、mTOR阻害が高齢ボランティアにおける免疫老化に有益な効果を有することを示す。

ここに記載するとおり、ラパマイシン類似体であるmTOR阻害剤RAD001での6週間処置は、高齢ヒトボランティアにおけるインフルエンザワクチン接種に対する応答を改善した。

【1093】

方法

研究集団

不安定な基礎疾患のない65歳以上の高齢ボランティアが、ニュージーランドおよびオーストラリアの9箇所で参加した。スクリーニング時の除外基準はヘモグロビン<9.0 g/dL、白血球数<3,500/mm³、好中球数<2,000/mm³または血小板数<125,000/mm³、未管理の糖尿病、不安定虚血性心疾患、臨床的に顕著な基礎肺疾患、免疫不全の病歴または免疫抑制性治療歴、凝固障害の病歴または長期抗凝固を必要とする医学的状態、概算糸球体濾過速度<30ml/分、重度の未管理高コレステロール血症(>350mg/dL、9.1mmol/L)または高トリグリセリド血症(>500mg/dL、5.6mmol/L)の存在を含んだ。

【1094】

処置アーム間のベースライン個体群統計学は類似した(表4)。218名の参加対象中、211名が治験を終了した。7名は治験を中止した。5名は有害事象(AE)が原因であり、1名は同意の上中止し、1名はプロトコール違反の結果、治験を去った。

【表24】

表4：治験患者の個体群統計学およびベースライン特徴

集団		RAD001連日 0.5mg N=53	RAD001毎週 5mg N=53	RAD001毎週 20mg N=53	プールしたプラセボ N=59	計 N=218
年齢(年)	平均(SD)	70.8(5.0)	72.0(5.3)	71.4(5.2)	71.1(5.1)	71.3(5.2)
性別	男性 — n(%)	34(64%)	27(51%)	32(60%)	31(53%)	124(57%)
BMI *(kg/m ²)	平均(SD)	27.4(4.2)	28.8(5.0)	28.0(4.1)	28.0(4.2)	28.0(4.4)
人種 — n(%)	白人	48(91%)	50(94%)	46(87%)	54(92%)	198(91%)
	その他	5(9%)	3(6%)	7(13%)	5(8%)	20(9%)

* 肥満度指数は、身長(m)の二乗で除した体重(kg)である。

【1095】

治験設計および遂行

2011年12月から2012年4月まで、218名の高齢ボランティアが、無作為化、観察者盲検化、プラセボ対照試験に参加した。対象を、各処置アームにおけるRADO01対プラセボ比5:2で、検証された自動化無作為化系を使用して処置アームに無作為化した。処置アームは

RADO01 0.5mg連日またはプラセボ

RADO01 5mg毎週またはプラセボ

RADO01 20mg毎週またはプラセボ

であった。

【1096】

RADO01 0.5mg連日および20mg毎週コホートにおけるプラセボがこれらのコホートにおけるRADO01錠剤とわずかに異なったため、本試験は観察者盲検であった。対象を評価する試験職員は試験薬物を見ておらず、それゆえに完全に盲検式であった。全コホートの処置期間は6週間であり、その間、対象は2週間毎に診療所での安全性評価を受けた。対象が4週間投与された後、RADO01定常レベルを投与前および投与1時間後に測定した。6週間コースの試験薬完了後、対象はRADO01が誘発した可能性のある免疫抑制から回復するために2週間休薬させ、その後株H1N1 A/California/07/2009、H3N2 A/Victoria/210/2009、B/Brisbane/60/2008を含む2012年季節性インフルエンザワクチンを接種した(Agrippal(登録商標), Novartis Vaccines and Diagnostics, Siena, Italy)。インフルエンザワクチン接種4週間後、対象から血清を採取し、インフルエンザ力価を測定した。3種のインフルエンザワクチン株ならびに2種の異種株(A/H1N1株A/New Jersey/8/76およびA/H3N2株A/Victoria/361/11)に対する抗体力価を、標準血球凝集阻害アッセイにより測定した(Kendal, AP et al. (1982) Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention B17-B35)。A/H1N1/California/07/2009特異的IgGおよびIgMレベルを、先に記載のとおりインフルエンザワクチン接種前および4週間後に測定した(Spensieri, F. et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:14330-14335)。結果を蛍光強度として表した。

【1097】

全ての対象にインフォームド・コンセント書類を渡した。試験は、医薬品の臨床試験の実施の基準の原則に従い、適切な倫理委員会および規制当局に承認された。

【1098】

安全性

有害事象評価ならびに血液学的小および生化学的安全性評価のための採血は、来院日に実施した。有害事象情報は、対象が試験薬を受けている6週間の間、家で記載した日記からも集めた。全有害事象データを、インフォームド・コンセント時から最後の来院日から30日後まで集めた。事象は試験医により軽度、中程度または重度と分類された。

【1099】

統計解析

幾何平均力価比の一次解析を、無情報事前分布を用いる正規ベイズ回帰モデルを使用して行った。このモデルを、対数尺度で各抗体力価に適合させた。各モデルの主要評価項目は84日目測定値であった。63日目測定値をアウトカムベクターに包含させた。モデルを、先のステートメントと混ぜたSAS 9.2 procを使用してフィットさせた。マトリクス共分散構造は、非構造化(選択肢タイプ=UN)として考慮した。平らである事前分布を使用した。抗体陽転率の二次解析のために、ロジスティック回帰を使用した。

治療企図集団は、少なくとも1回の完全用量の試験薬を投与され、有効性データに影響する重大なプロトコル逸脱がない全対象と定義された。試験に参加した218名の対象中199名試験が治療企図集団であった。

【1100】

免疫表現型検査

10

20

30

40

50

末梢血単核細胞を、ベースライン、6週間の治験薬処置後および対象が6週間治験薬物から離れており、インフルエンザワクチン接種した4週間後である治験の最後の3時点に採血した全血から単離した。76PBMCサブセットを、先に記載されたように、Human Immune Monitoring Center at Stanford University, CA, USAで8色免疫表現型検査パネルを使用したフローサイトメトリーにより解析した(Maecker, HT et al. (2012) Nat Rev Immunol. 12:191-200)。76PBMCサブセットを、8色凍結乾燥免疫表現型検査パネルを使用するフローサイトメトリーにより解析した(BD Lyoplate, BD Biosciences, San Diego, CA)。生存能 $>80\%$ および 2×10^6 細胞を超える収量のPBMCサンプルを解析に入れた。

【1101】

10

ベースラインから治験薬処置6週目までおよびベースラインから治験の最後(12週目)までの免疫表現型の相対的变化を、各RAD001投薬コホートで計算した。スチューデントT検定を行い、ベースラインから2回の採血時点までの免疫表現型の相対的变化が、それぞれ、プラセボ効果について調整した後、各投与群内で0とは有意に異なるかを試験した。処置効果解析における欠損値補完は行わなかった。それゆえに、患者がベースラインで表現型データ欠損があるとき、この患者は、この表現型の解析を行わなかった。患者の6週目または12週目の表現型データが欠損しているとき、この患者は、影響する時点でのこの表現型の解析に貢献しなかった。

【1102】

20

3投薬群下の76表現型の608試験を行い、プラセボ効果に対する処置効果を比較した。層別化偽発見率(FDR)管理方法論を、今なお相当に優れた検出力を提供する複数の試験と関係する偽陽性の発生を制御するために実施した。細胞型群を層別因子として取り、各層内のFDR(q値)計算をそれぞれ行った。全帰無仮説は、対応するq値 ≤ 0.1 の0.05有意水準で棄却された。0.05有意水準および対応するq < 0.1 で棄却される複数試験調節戦略は、結果の10%未満が偽であることを確実にした。

【1103】

30

第二の解析において、免疫表現型は、全3のRAD001投薬群を合わせたプールした処置群とプラセボ群で変化する。どの免疫表現型変化が処置群とプラセボ群を区別するかを決定するために、各測定した表現型の患者内細胞数比を、ベースラインと治験薬処置6週目およびベースラインと治験終了時(12週目)で計算した。比を対数変換し、プールした処置およびプラセボ群の間の差異を検出するために、各時点の共分散の解析により分析した。76表現型の152試験を実施して、プラセボ効果に対するプールした処置効果を比較した。層別化偽発見率(FDR)管理方法論を、今なお相当に優れた検出力を提供する複数の試験と関係する偽陽性の発生を制御するために実施した(Benjamini, Y. et al. (1995) J. Roy. Statist. 57:289-300; and Sun, L. et al. (2006) Genet. Epidemiol. 30:519-530)。細胞型群を層別因子として取り、FDR(q値)計算を、それぞれ各層内で実施した。0.05有意水準およびq値20%未満での全帰無仮説は棄却された。これは、0.05未満のP値および各観察された有意な結果が複数試験によるものである20%未満の確率のみを棄却すると解釈できる。

【1104】

40

結果

一般に、RAD001は、特に0.5mg連日および5mg毎週投与レジメンで良好な耐容性であった。治験中に死亡例はなかった。3名の対象は、RAD001と無関係であると評価された4つの重篤な有害事象(SAE)を経験した。4つのSAEは、先に6週間5mg毎週RAD001の6週のコースを完了していた正常血小板数の対象の左眼の網膜出血とその後の失明；プラセボ処置対象における重度の背部痛およびプラセボ処置対象における重度の胃腸炎であった。あらゆる処置群における発生率 $>2\%$ の処置関連有害事象(AE)の一覧を表5に提供する。最も一般的なRAD001関連AEは、大部分の症例で、軽度であった口腔内潰瘍であった。全体的に、RAD001を投与された対象と、プラセボ処置対照の重度のAE発生率は類似した。1つの重度のAEのみがRAD001と関連する

50

と評価され、20mg毎週RAD001処置対象の口腔内潰瘍であった。

【1105】

【表25】

表5：好ましい期間までのあらゆる処置群における処置関連AE>2%の発生率

	RAD001 0. 5mg連日 N=53 n(%)	RAD001 5 mg毎週 N=53 n(%)	RAD001 2 0mg毎週 N=53 n(%)	プラセボ, フ ォール N=59 n(%)	計 N=218 n(%)
総AE	35	46	109	21	211
AEを有する患者	22(41.5%)	20(37.7%)	27(50.9%)	12(20.3%)	81(37.2%)
口腔内潰瘍	6(11.3%)	2(3.8%)	9(17.0%)	3(5.1%)	20(9.2%)
頭痛	0	2(3.8%)	9(17.0%)	1(1.7%)	12(5.5%)
血中コレステロール 増加	2(3.8%)	2(3.8%)	2(3.8%)	0	6(2.8%)
下痢	1(1.9%)	4(7.5%)	1(1.9%)	0	6(2.8%)
消化不良	0	3(5.7%)	2(3.8%)	1(1.7%)	6(2.8%)
疲労	0	2(3.8%)	4(7.5%)	0	6(2.8%)
低密度リポタンパク 質増加	2(3.8%)	1(1.9%)	2(3.8%)	0	5(2.3%)
舌潰瘍	3(5.7%)	1(1.9%)	0	1(1.7%)	5(2.3%)
不眠症	1(1.9%)	2(3.8%)	1(1.9%)	0	4(1.8%)
口渇	0	0	2(3.8%)	1(1.7%)	3(1.4%)
好中球減少症	0	0	3(5.7%)	0	3(1.4%)
口腔内痛	0	2(3.8%)	1(1.9%)	0	3(1.4%)
掻痒	0	2(3.8%)	1(1.9%)	0	3(1.4%)
結膜炎	0	2(3.8%)	0	0	2(0.9%)
紅斑	0	2(3.8%)	0	0	2(0.9%)
肢不快感	0	2(3.8%)	0	0	2(0.9%)
粘膜炎症	0	0	2(3.8%)	0	2(0.9%)
口腔異常感	2(3.8%)	0	0	0	2(0.9%)
口内炎	0	0	2(3.8%)	0	2(0.9%)
血小板減少症	0	0	2(3.8%)	0	2(0.9%)
尿路感染	0	0	2(3.8%)	0	2(0.9%)

【1106】

RAD001が高齢ボランティアにおける免疫機能を改善する能力を、2012年の季節性インフルエンザワクチンに対する血清学的応答を測定することにより評価した。3種のインフルエンザワクチン株の各々に対するベースラインおよびインフルエンザワクチン接種4週間後の血球凝集阻害(HI)幾何平均力価(GMT)を表6に示す。一次解析変数は、HI/GMT比(ワクチン接種4週間後/ベースライン)であった。治験を、少なくとも3種のインフルエンザワクチン株中2種において、1)プラセボに対して相対的に ≥ 1.2 倍GMT;および2)80%以上が、1を超えるプラセボ補正GMT比である事後確率の存在を証明できるように強化した。このエンドポイントは、MF-59ワクチンアジュバントにより誘発されるインフルエンザGMT比の1.2倍増加がインフルエンザ疾病の減少と関連するために、選択した(Iob, A et al. (2005) Epidemiol Infect 133:687-693)。

【1107】

【表 2 6】

表 6. ベースラインおよびインフルエンザワクチン接種 4 週間後の各インフルエンザワクチン株に対する H I GMT

インフ ルエン ザワク チン株		時間	RAD001 0.5mg 連日 N=50	RAD001 5mg 毎週 N=49	RAD001 20mg 毎週 N=49	プラセボ N=55
A/H1N1	GMT (CV%)	ベースライン	102.8 (186.9)	84.2 (236.4)	90.1 (188.4)	103.2 (219.7)
		4 週目	190.2 (236.9)	198.73(195.6)	129.7 (175.9)	169.4 (259.8)
	GMT 比 (CV%)		2.6 (302.5)	2.5 (214.3)	1.8 (201.5)	2.0 (132.7)
A/H3N2	GMT (CV%)	ベースライン	106.8 (168.2)	126.04 (162.6)	137.1 (211.5)	131.7 (162.3)
		4 週目	194.4 (129.1)	223.0 (118.8)	223.0 (163.6)	184.3 (153.2)
	GMT 比 (CV%)		2.1 (152.6)	2.0 (189.2)	2.1 (277.3)	1.6 (153.6)
B	GMT (CV%)	ベースライン	44.2 (96.6)	64.8 (87.3)	58.0 (156.0)	57.0 (112.6)
		4 週目	98.4 (94.8)	117.3 (99.9)	99.2 (124.1)	114.6 (136.7)
	GMT 比 (CV%)		2.5 (111.2)	2.2 (112.8)	2.1 (126.5)	2.2 (109.2)

4 週目はインフルエンザワクチン接種 4 週間後を示す

Nはコホートあたりの対象数である

GMTは幾何平均力価である

GMT比は、ワクチン接種4週目のGMT／ベースラインのGMTである

CV%は、変動係数を示す

【1108】

治療企図(ITT)集団において、高用量(20mg毎週)コホートではなく、低い、免疫増強用量RAD001(0.5mg連日または5mg毎週)コホートが、治験の主要評価項目に合った(図1A)。これは、低用量でRAD001の異なる免疫調節機構が存在し、高用量で、mTOR阻害の既知免疫抑制性効果が発揮されるようになる可能性を示す。さらに、本結果は、低い、免疫増強用量RAD001処置後の高齢者における免疫機能の改善傾向を示唆する。

10

サブグループ解析において、低ベースラインインフルエンザ力価($\leq 1:40$)のサブセットの対象は、ITT集団より高い力価のRAD001関連増加を経験した(図1B)。これらのデータは、RAD001が、ベースラインで予防的($> 1:40$)力価を有さず、それゆえにインフルエンザ疾病の最高のリスクにある対象のインフルエンザワクチン応答の増強に特に有効であることを示す。

【1109】

RAD001濃度对各インフルエンザワクチン株に対する力価増加の散布図は、逆暴露／応答相関を示す(図2)。S6キナーゼ(S6K)のmTOR介在リン酸化に基づくモデリングおよびシミュレーションは、20mg毎週投与レジメンがmTOR介在S6K活性をほぼ完全に阻止し、5mg毎週投与レジメンはS6K活性を50%を超えて阻止し、0.5mg連日投与レジメンは、S6Kリン酸化を投与の合間に約38%まで阻止することを予測する(Tanaka, C et al. (2008) J. Clin. Oncol 26:1596-1602)。それゆえに、低い、免疫増強用量RAD001での、部分的mTOR阻害、例えば、mTOR介在S6Kリン酸化阻害は、高齢者の免疫応答の増強における高用量RAD001でのほぼ完全なmTOR阻害よりも有効ではないにしても、有効であり得る。

20

【1110】

インフルエンザワクチン接種4週間後の抗体陽転率も評価した。抗体陽転は、ワクチン接種前力価陰性(すなわち、HI力価 $< 1:10$)から、ワクチン接種後HI力価 $\geq 1:40$ への変化または非陰性($\geq 1:10$)ワクチン接種前HI力価からの少なくとも4倍増加として定義された。治療企図集団、H3N2およびB株への抗体陽転率は、プラセボコホートと比較してRAD001で増加したが、該増加は統計的有意性には合わなかった(表7)。ベースラインインフルエンザ力価 $\leq 1:40$ の対象の亜集団において、RAD001処置はまたH3N2およびB株に対する抗体陽転率を増加させ、これらの結果は、0.5mg連日投薬コホートでB株に対して統計的有意性に達した。これらのデータは、さらにRAD001が、高齢者におけるインフルエンザワクチン接種に対する血清学的応答を増強させたことを示す。

30

【1111】

【表 27】

表7：インフルエンザワクチン接種4週間後の抗体陽転した対象の割合

	プラセボ N=54	0.5mg N=48	5mg N=49	20mg N=48
治療企図集団				
H1N1	24	27	27	17
H3N2	17	27	24	25
B	17	27	22	19
ベースライン力価 ≤ 40 の対象				
H1N1	40	42	45	36
H3N2	42	64	53	71
B	16	40*	33	28

* RAD001とプラセボの間の抗体陽転のオッズ比は、有意に1より異なる(固定効果として処理したロジスティック回帰により得た両側p値<0.05)

【1112】

現在の季節性インフルエンザワクチンは、しばしば、以前に広まったウイルスのバリエーションとして存在するインフルエンザ株の継続する出現に対して適切な保護を提供しない。しかしながら、mTOR阻害剤ラパマイシンの存在下でインフルエンザに対してワクチン接種したマウスは、プラセボと比較して、インフルエンザに対する広い血清学的応答を発達させた。広い血清学的応答は、ワクチンに含まれないインフルエンザの異種株での感染に対する保護を提供する、複数のサブタイプのインフルエンザにより発現される保存的エピトープに対する抗体を含んだ(Keating, R et al. (2013) Nat Immunology 14:2166-2178)。RAD001が高齢ボランティアにおけるインフルエンザに対する血清学的応答を広幅化するかについて、インフルエンザワクチン(A/H1N1株A/New Jersey/8/76およびA/H3N2株A/Victoria/361/11)に含まれないインフルエンザの2種の異種株に対するHI力価を測定した。異種株に対するHI GMT比の増加は、プラセボコホートと比較してRAD001で高かった(図3)。さらに、異種株に対する抗体陽転率は、プラセボコホートと比較してRAD001で高かった。5mgおよび20mg毎週RAD001投薬コホートにおける抗体陽転率の増加は、H3N2異種株に対して統計的有意であった(表8)。プールしたRAD001コホートについてのH3N2抗体陽転率は39%であり、それに対しプラセボコホートは20%であった(p=0.007)。ここに示した結果は、mTOR阻害がインフルエンザワクチン接種に対する高齢ボランティアの血清学的応答を広幅化し、季節性インフルエンザワクチンに含まれないインフルエンザの異種株に対する抗体力価を高めることを示唆する。

【1113】

ラパマイシンで処置したマウスにおけるインフルエンザの異種株に対する血清学的応答の広幅化は、B細胞におけるクラススイッチングの阻止および抗インフルエンザIgMレベルの増加と関係している(Keating, R. et al. (2013) Nat Immunol 14:2166-2178)。しかしながら、クラススイッチングの阻止は、ワクチン接種後抗インフルエンザIgMおよびIgGレベルがRAD001コホートとプラセボ処置コホート間で差がなかったため、RAD001で処置したヒトにおける広幅化された血清学的応答とは関係しない可能性がある(図4)。

【1114】

10

20

30

40

【表 28】

表8:季節性インフルエンザワクチン接種4週間後インフルエンザの異種株に対して抗体陽転した対象のパーセンテージ

	プラセボ、 プール	RAD001 0.5mg連日	RAD001 5mg毎週	RAD001 20mg毎週
A/H1N1 株: A/New Jersey/8/76	7%	17%	16%	8%
A/H3N2 株: A/Victoria/361/11	20%	38%	39%*	40%*

10

* RAD001とプラセボの間の抗体陽転のオッズ比は、有意に1より異なる(固定効果として処理したロジスティック回帰により得た両側p値<0.05)

【1115】

RAD001が高齢ボランティアにおける免疫機能を増強する機構に取り組むため、免疫表現型検査を、ベースライン、治験薬処置6週間後およびインフルエンザワクチン接種4週間後(治験薬中止6週間後)に対象から得たPBMCサンプルで実施した。大部分のPBMCサブセットのパーセンテージはRAD001コホートとプラセボの間で差がなかったが、PD-1陽性CD4およびCD8細胞のパーセンテージは、プラセボコホートと比較してRAD001で低かった(図5)。PD-1陽性CD4およびCD8細胞は年齢とともに蓄積し、PD-1がT細胞受容体誘発T細胞増殖、サイトカイン産生および細胞溶解性機能を阻止するため、抗原刺激に対する不完全な応答を有する(Lages, CS et al. (2010) Aging Cell 9:785-798)。プラセボコホートにおいてPD-1陽性T細胞のパーセンテージの経時的増加があった。12週目(ワクチン接種4週間後)で、インフルエンザウイルスがPD-1陽性T細胞を増加させることが示されているため、この増加はインフルエンザワクチン接種によるものであり得る(Erikson, JJ et al. (2012) JCI 122:2967-2982)。しかしながら、全RAD001コホートでCD4 PD-1陽性T細胞のパーセンテージは6週目および12週目でベースラインから下がった(図5A)。CD8 PD-1陽性細胞のパーセンテージも、2つの低用量RAD001コホートで6週目および12週目の両方でベースラインから下がった(図5B)。PD-1陰性CD4 T細胞のパーセンテージを評価し、プラセボコホートと比較してRAD001コホートで増加した(図5C)。

20

30

【1116】

RAD001コホートからの結果をプールし、ベースラインPD-1発現の差異について調整したより厳密な統計解析下、プラセボコホート(n=25)と比較して、プールしたRADコホート(n=84)で、6週目にPD-1陽性CD4 T細胞の30.2%の統計的に有意な減少があり、p=0.03(q=0.13)であった(図6A)。プラセボコホートと比較した、プールしたRADにおける12週目のPD-1陽性CD4 T細胞の減少は32.7%であり、p=0.05(q=0.19)である。図6Bは、プラセボコホート(n=25)と比較して、プールしたRAD001コホート(n=84)における6週目のPD-1陽性CD8 T細胞の統計的に有意な37.4%の減少を示し、p=0.008(q=0.07)である。プラセボコホートと比較した、プールしたRAD001の12週目のPD-1陽性CD8 T細胞減少は41.4%であり、p=0.066(q=0.21)である。それゆえに、図5および6の結果は、合わせて、PD-1陽性CD4およびCD8 T細胞のパーセンテージのRAD001関連減少が、免疫機能の増強に貢献している可能性を示唆する。

40

50

【1117】

結論

結論として、ここに提供したデータは、mTOR阻害剤RAD001が、インフルエンザワクチン接種に対する応答で評価して、ヒト高齢者の免疫学的機能における年齢関連減少を軽減し、この改善が許容されるリスク対効果バランスで得られることを示す。高齢マウスでの試験において、mTOR阻害剤ラパマイシンでの6週間処置はインフルエンザワクチン接種に対する応答を増加しただけでなく、寿命も延長し、免疫老化の改善は、加齢関連表現型に対するより広範な効果のマーカーであり得ることを示唆する。

【1118】

RAD001投薬をワクチン接種2週間前に中断したため、RAD001の免疫増強効果は、薬物処置中止後も残留する適切な細胞集団における変化により介在され得る。ここに示した結果は、RAD001が、プラセボと比較して枯渇したPD-1陽性CD4およびCD8⁺T細胞のパーセンテージを減少させたことを示す。PD-1発現はTCRシグナル伝達により誘発され、慢性ウイルス感染を含む永続性抗原刺激の設定で高いままである。理論に縛られることを望まないが、RAD001が高齢ボランティアにおける慢性免疫活性化を減少し、それによりPD-1発現を減少させた可能性がある。RAD001はまたイムノフィリンシクロスポリンAについて報告されているように、PD-1発現を直接的にも阻害し得る(Oestreich, KJ et al. (2008) J Immunol. 181:4832-4839)。PD-1陽性T細胞のパーセンテージのRAD001誘発減少は、T細胞応答の品質を改善させる可能性がある。これは、mTOR阻害が、マウスおよび霊長類におけるワクチン接種に対する記憶CD8⁺T細胞応答の品質を改善したことを示す試験と先の一致する(Araki, K et al. (2009) Nature 460:108-112)。高齢マウスにおいて、mTOR阻害はまた造血幹細胞の数を増加させ、ナイーブリンパ球の産生増加に至ることも示されている(Chen, C et al. (2009) Sci Signal 2:ra75)。本実施例においてRAD001対プラセボコホートでナイーブリンパ球のパーセンテージに有意な差は検出されなかったが、この可能性がある機構をさらに調査し得る。

【1119】

RAD001がインフルエンザの異種株に対する血清学的応答を広幅化する機構をさらに調査し得る。ラパマイシンも、インフルエンザワクチン接種後B細胞におけるクラススイッチングを阻止することが示されている。その結果、抗インフルエンザ抗体の独特のレパートリーが産生され、それがインフルエンザワクチンに含まれないインフルエンザウイルスサブタイプでの致死感染に対する株間保護を促進した(Keating, R et al. (2013) Nat Immunol. 14:2166-2178)。ここに記載した結果は、RAD001がインフルエンザワクチン接種2週間前にRAD001を中止した高齢対象におけるB細胞クラススイッチングを改変したことを示さなかった。基礎機構をさらに解明する必要があるが、ここに記載する異種インフルエンザ株に対する血清学的応答の増加は、インフルエンザの季節性ワクチンと地域社会で広まっている株があまり適合していない年のインフルエンザ疾病に対する保護の増強に寄与し得る。

【1120】

インフルエンザ抗体力価に対するRAD001の効果は、高齢者のインフルエンザワクチン接種に対する応答の増加について承認されているMF59ワクチンアジュバントの効果と同等であった(Podda, A (2001) Vaccine 19:2673-2680)。それゆえに、インフルエンザワクチン接種に対する抗体応答のRAD001駆動増強は、高齢者におけるMF59アジュバント添加インフルエンザワクチンで証明される臨床的利益に翻訳され得る(Iob, A et al. (2005) Epidemiol Infect. 133:687-693)。しかしながら、RAD001はまた臓器移植患者の免疫応答の抑制にも使用される。これらの外見上逆説的な結果は、mTOR阻害剤の免疫調節効果が用量および／または抗原依存性であり得る可能性を惹起する(Ferrer, IR et al. (2010) J Immunol. 185:2004-2008)。逆RAD001暴露／ワクチン接種応答相関の傾向がここで見られた。完全なmTOR阻害は通常シクロフィリンラパマイシン機構を介して免疫機能を抑制するが、部分的mTOR阻害は、少なくとも高齢者

において、異なる加齢関連表現型阻害により免疫機能を増強する可能性がある。興味深いことに、mTOR活性は、高齢動物モデルにおける造血幹細胞を含む多様な組織で増加する(Chen C. et al. (2009) Sci Signal 2:ra75 and Barns, M. et al. (2014) Int J Biochem Cell Biol. 53:174-185)。それゆえに、mTOR活性の、若い組織で見られるレベルへの下落が、mTOR活性のより完全な抑制とは逆に、老化減少適応症に臨床的利益があり得る。

【1121】

加齢関連適応症の処置におけるRAD001のようなmTOR阻害剤の安全性プロファイルは懸念されている。腫瘍学または臓器移植適応症で使用される用量でのRAD001の毒性は、多くの加齢関連適応症では許容されないであろう口内炎、下痢、悪心、血球減少、高脂血および高血糖を含む。しかしながら、これらのAEは、血中のRAD001のトラフレベルに関係する。それゆえに、本治験で使用したRAD001投与レジメンは、トラフレベルを最少化するように選択した。0.5mg連日、5mg毎週および20mg毎週投薬コホートの平均RAD001トラフレベルは、それぞれ0.9ng/ml、0.3ng/ml(定量下限)未満および0.7ng/mlであった。これらのトラフレベルは、臓器移植および癌患者で使用される投与レジメンと関係するトラフレベルより顕著に低い。さらに、6週間の限られた処置コースが有害事象のリスクを減らした。これらの結果は、この治験で使用された投与レジメンが、高齢者のある状態については許容されるリスク対効果を有し得ることを示唆する。それにもかかわらず、ここに記載した試験の対象の相当数が、0.5mg連日ほど低い投薬でも口腔内潰瘍を発症した。それゆえに、低い、免疫増強用量RAD001の安全性プロファイルはさらなる治験を必要とする。現在利用可能なラパログよりも問題のない安全性プロファイルを有するmTOR阻害剤は、将来加齢関連状態における良好な治療選択肢を提供し得る。

【1122】

実施例2：高齢者対象におけるワクチンに対する免疫応答の増強

免疫機能は高齢者で低下し、感染発生率増加およびワクチン接種に対する応答減少に至る。mTOR阻害がヒトにおいて抗加齢効果を有するかの決定の第一段階として、無作為化プラセボ対照治験を実施し、mTOR阻害剤RAD001が、高齢ボランティアにおけるワクチン接種に対する応答により評価された免疫機能の加齢関連低下を反転させるかを決定した応答。全例で、適切な患者同意を得て、治験は国の保健機関により承認された。

【1123】

RAD001の次の3投与レジメンを治験で使用した：

20mg毎週(トラフレベル：0.7ng/ml)

5mg毎週(トラフレベルは検出限界以下であった)

0.5mg連日(トラフレベル：0.9ng/ml)

【1124】

移植および腫瘍適応症で承認されているRAD001の用量より低いトラフレベルのために、これらの投与レジメンを選択した。トラフレベルは、体内の薬物の最低レベルである。10mg連日腫瘍学投与レジメンに付随するRAD001のトラフレベルは約20ng/mlである。0.75~1.5mg b i d移植投与レジメンに付随するトラフレベルは約3ng/mlである。対照的に、我々の免疫化治験で使用した投与レジメンに付随するトラフレベルは3~20倍低かった。

【1125】

RAD001関連AEがトラフレベルと関係するため、3投与レジメンは正常ボランティアに対する適切な安全性を有することが予測された。さらに、3用量は、一定範囲のmTOR阻害を与えることが予想された。P70 S6キナーゼ(P70 S6K)は、mTORによりリン酸化される下流標的である。P70 S6Kリン酸化のレベルは、mTOR活性の指標として働く。RAD001の前臨床試験および臨床試験で得たP70 S6Kリン酸化データのモデリングおよびシミュレーションに基づき、20mg毎週が丸一週間mTOR活性をほぼ完全に阻害すると予測され、一方5mg毎週および0.5mg連日はmT

OR活性を一部阻害すると予測された。

【1126】

65歳以上の高齢ボランティアを、3つのRAD001処置群(50対象/アーム)またはプラセボ(20対象/アーム)の一つに無作為化した。対象を治験薬物で6週間処置し、2週間休薬し、インフルエンザワクチン接種(Agrippal, Novartis)および肺炎球菌ワクチン接種(Pneumovax 23, Merck)をした。インフルエンザワクチン接種に対する応答を、ワクチン接種4週間後、インフルエンザワクチンの3インフルエンザ株(H1N1、H3N2およびBインフルエンザサブタイプ)に対する血球凝集阻害アッセイによる幾何平均力価(GMT)の測定により評価した。治験の主要評価項目は(1)安全性および耐容性および(2)ワクチン接種4週間後、プラセボと比較した、インフルエンザワクチン株の2/3のインフルエンザ力価の1.2倍増加であった。このエンドポイントは、インフルエンザ力価の1.2倍増加が、ワクチン接種後のインフルエンザ疾病の減少と関連し、それゆえに臨床的に適切であるために、選択した。5mg毎週および0.5mg 1日用量は十分耐容性であり、20mg毎週用量と異なり、GMT主要評価項目を満たした(図1A)。高齢ボランティアにおいてプラセボと比較して、RAD001がインフルエンザワクチン接種に対する応答を改善しただけでなく、肺炎球菌ワクチン接種に対する応答も改善した。肺炎球菌ワクチンは、23種の肺炎球菌血清型からの抗原を含む。血清型の7種に対する抗体力価を我々の対象で測定した。6/7血清型に対する抗体力価が、プラセボと比較して全3つのRADコホートで増加した。

10

【1127】

20

合わせたインフルエンザおよび肺炎球菌力価データは、部分的(80~100%未満)mTOR阻害が、完全なmTOR阻害よりも免疫機能における加齢関連低下の反転により有効であることを示す。

【1128】

実施例3：低用量mTOR阻害はエネルギーおよび運動を増やす

前臨床モデルにおいて、ラバログであるラバマイシンでのmTOR阻害は、老齢マウスにおける自発的身体活動性を増加させる(Wilkinson et al. Rapamycin slows aging in mice. (2012) Aging Cell; 11:675-82)。興味深いことに、実施例2に記載した0.5mg連日投薬コホートの対象も、投与1年後のアンケートで、プラセボと比較してエネルギーおよび運動能の増加を報告した(図7)。これらのデータは、ラバログでの部分的mTOR阻害が、単なる免疫機能を超えて加齢関連罹病率に対する効果を有し得ることを示唆する。

30

【1129】

実施例4：RAD001でのP70 S6キナーゼ阻害

モデリングおよびシミュレーションを実施し、mTOR活性を部分的に阻害すると予測されるRAD001の連日および毎週用量範囲を予測した。上記のとおり、P70 S6KはmTORによりリン酸化され、P70 S6Kのノックアウトが寿命を増加するため加齢とより密接に結びついたmTORの下流標的である。それゆえにモデリングを、P70 S6K活性を一部阻害するRAD001の用量で行った。 ≥ 0.1 mgおよび < 20 mgの範囲の毎週投薬がP70 S6K活性の部分的阻害を達成すると予測される(図8)。

【1130】

40

連日投薬について、30pM~4nMの濃度のRAD001が細胞株におけるP70 S6K活性を部分的に阻害する(表9)。これらの血清濃度は、 ≥ 0.005 mg~ < 1.5 mg連日のRAD001の用量で達成されると予測される。

【表 29】

表9：インビトロでのHeLa細胞におけるP70 S6K活性の阻害パーセント							
RAD001濃度	0	6 pM	32 pM	160 pM	800 pM	4 nM	20 nM
P70 S6K阻害%	0	0	18	16	62	90	95

【1131】

結論

P70 S6Kを部分的にしか阻害しない用量のmTOR阻害剤を用いる、加齢関連罹患を処置するまたは一般に免疫応答を増強する方法。加齢適応症における低用量のRAD001での部分的mTOR阻害の有効性は予想外の発見である。 $\geq 0.1 \text{ mg} \sim < 20 \text{ mg}$ 毎週および $\geq 0.005 \text{ mg} \sim < 1.5 \text{ mg}$ 連日のRAD001用量範囲が部分的mTOR阻害を達成し、それゆえに加齢関連罹患または免疫応答の増強に有効性を有することが期待される。

【1132】

実施例5：PD-1 CAR

本実施例におけるPD-1 CARは、4-1BBおよびCD3ゼータのような膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインも融合した阻害分子の細胞外ドメイン(ECD)、プログラム細胞死1(PD-1)を含む。ある態様において、PD-1 CARを単独で使用する。ある態様において、PD-1 CARを他のCAR、例えば、CD19 CARと組み合わせて使用する。ある態様において、PD-1 CARは、T細胞の残留性を改善する。ある態様において、CARは、T細胞の持続を改善する。ある態様において、CARは、配列番号26で下線により示されるPD-1の細胞外ドメインを含むPD-1 CARである(PD-1ドメインを下線を引く)

Malpvtalllplalllhaarppgwflldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdkl
aafpedrsppgqdcfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylclgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpsps
prpagqfqltlytttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyc
krgrrkllyifkqpfmrpvqtteedgcscrffpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreedyvldkr
rgrdpemmkgkprkrnpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqualppr 配列
番号26

【1133】

PD-1 CARの対応するヌクレオチド配列を下に示し、PD-1 ECDを下に配列番号27で下線を引く(PD-1ドメインを下線を引く)。

Atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctgcactcctgctccacgccgctagaccacccggatgggtttctgga
ctctccggatcgcccggtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttgggttgactgagggcgataatgcgaccttca
cgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgctgaactggtagccgatgagcccgtaaacccagaccgacaagctc
gccgctttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttccgctgactcaactgccgaatggcagagactt
ccacatgagcgtggtccgcgctaggcgaaacgactccgggacctacctgtcgaggccatctcgctggcgccctaaggccc
aatcaaaagagagcttgagggccgaactgagagtgaccgagcgagagctgagggtgccaactgcacatccatccccatcg
cctcgccctgcggggcagtttccagacctgggtcacgaccactccggcgcccgccccaccgactccggccccaactatcgc
gagccagccctgtcgtgtagggccgaagcatgccgccctgccgcggagggtgctgtgcataccgggggattggacttgc
catgcgacatctacatttgggctcctctcgccggaacttgtggcgtgctccttctgtccctggatcatcacctgtactgc
aagcggggtcggaagaaagcttctgtacattttcaagcagcccttcatgaggcccggtgcaaacccagaggaggagcg
ttgtccttgcgggttccccgaagaggaagaaggaggttgcgagctgcgcgtgaagttctcccgagcgccgacgccccg
cctataagcaggggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcggaagagtacgatgtgttggaagaagcg
cgcgccggggaccccgaaatgggcggggaagcctagaagaaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaagga
caagatggccgaggcctactccgaaattgggatgaaggagagcgcgagggggaaaggggcacgacggcctgtaccaag
gactgtccaccgccaccaaggacacatacagatgccctgcacatgcaggcccttccccctcgc 配列番号27

10

20

30

40

50

【1134】

阻害分子の他の例は、PD1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4およびTGFRベータを含む。PD1は、CD28、CTLA-4、ICOSおよびBTLAも含む受容体のCD28ファミリーの阻害性メンバーである。PD-1は、活性化B細胞、T細胞および骨髄細胞に発現される(Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75)。PD1に対する2リガンド、PD-L1およびPD-L2は、PD1への結合によりT細胞活性化を下方制御することが示されている(Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1は、ヒト癌において豊富である(Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制は、PD1とPD-L1の局所相互作用の阻害により逆転できる。

10

【1135】

NFAT-LUCレポーター(JNL)を含むJurkat細胞を、ピューロマイシンを0.5 μg/mlで含むJurkat細胞増殖培地で 0.5×10^6 /ml密度まで増殖させた。各トランスフェクションについて、 3×10^6 細胞を100 gで10分遠沈させた。構築物あたり4 μg DNAをトランスフェクションあたりに使用した。Amaxa Nucleofector solution VおよびサプリメントIを混合し、100 μlを、DNA構築物とチューブに添加した。次いで、混合物を細胞に添加し、エレクトロポレーションキュベットに移した。エレクトロポレーションを、Amaxa Nucleofector II Deviceを使用して設定X-001の下に実施した。0.5 mlの増殖培地をエレクトロポレーション直後に添加し、混合物を、6ウェルプレートの1ウェル中の2 ml増殖培地に添加した。2時間後、多様な濃度のラパログ化合物を細胞に添加した。細胞を、標的で被覆された組織培養プレートウェルに適用した。組織培養プレートを5 μg/mlのPD-L1-FcまたはIgG1-Fcまたは任意の標的で、2時間、37℃で被覆し、次いでブロッキング緩衝液(5%血清含有DPBS)で30分遮断した。トランスフェクト細胞を、100 μl/ウェルで標的プレートに添加し、さらに16時間インキュベートした。ウェルあたりLuciferase One Glo試薬100 μlを添加した。サンプルを、5分、37℃でインキュベートし、発光をEnvisionプレートリーダーを使用して測定した。

20

30

【1136】

PD1 CAR構築物は、PD1-ECD-TM-4-1BB-CD3ゼータを含む。この構築物は、構築物をトランスフェクトした細胞、例えば、PD1 CARをトランスフェクトしたCART細胞の残留性を改善し得る。

【1137】

図9に示すように、PD1 CARは、IgG1-Fcによる対照処置と比較して、NFAT誘導性プロモーター駆動ルシフェラーゼ活性の顕著なPD1誘導活性化を示した。これは、PD-L1とのPD1相互作用が、Jurket細胞表面におけるPD1のクラスタリングに十分であり、NFAT経路の強い活性化をもたらすことを示す。

40

【1138】

実施例6：低用量RAD001は、細胞培養モデルにおけるCART増殖を刺激する

インビトロでのCAR T細胞増殖に対するRAD001の低用量の効果を、CART発現細胞と標的細胞を種々の濃度のRAD001存在下で共培養することにより評価した。

【1139】

材料および方法

CAR形質導入T細胞の産生

ヒト化、抗ヒトCD19 CAR(hu CART19)レンチウイルス転移ベクターを、VSVg偽型レンチウイルス粒子に封入されたゲノム材料を産生するために使用した。ヒト化抗ヒトCD19 CAR(hu CART19)のアミノ酸およびヌクレオチド配列は、

50

2014年3月15日に出願されたPCT出願、WO2014/153270号に記載されたCAR 1、ID 104875であり、そこで配列番号85および31とされている。

【1140】

レンチウイルス転移ベクターDNAを、3パッケージング要素VSVg env、gag/polおよびrevと、リポフェクタミン試薬と組み合わせて混合し、レンチーX293T細胞をトランスフェクトする。培地をその後24時間および30時間に交換し、ウイルス含有培地を採取し、濾過し、-80℃で保存する。CARTを、健常ドナー血液またはleukopakの陰性磁気選択により得た新鮮または凍結ナイーブT細胞の形質導入により産生する。T細胞を、抗CD3/抗CD28ビーズと24時間インキュベーションすることにより活性化し、ウイルス上清または濃縮ウイルス(それぞれ、MOI=2または10)を培養に添加する。修飾T細胞を約10日増殖させる。細胞形質導入のパーセンテージ(細胞表面のCARを発現)およびCAR発現レベル(相対蛍光強度、Geo Mean)を、7~9日目にフローサイトメトリー分析で決定する。増殖速度遅延および約350fLに近づくT細胞サイズの組み合わせが、T細胞をその後の分析のために凍結保存する状態を決定する。

【1141】

CART増殖評価

CARTの機能性を評価するために、T細胞を融解し、計数し、生存能をCellometerで評価する。各培養における多数のCAR陽性細胞を、非形質導入T細胞(UTD)を使用して標準化する。CARTに対するRAD001の影響を、50nMから開始してRAD001のタイトレーションにより試験した。全共培養実験において使用する標的細胞株は、CD19を発現し、ルシフェラーゼを発現するように形質導入されたヒト前B細胞急性リンパ芽球性白血病(ALL)細胞株であるNALM6(Nalm-6)である。

【1142】

CARTの増殖を測定するために、T細胞を標的細胞と1:1比で培養する。アッセイを4日行い、細胞をCD3、CD4、CD8およびCAR発現について染色する。多数のT細胞を、対照としてカウンティングビーズを使用するフローサイトメトリーにより評価する。

【1143】

結果

CART細胞の増殖能力を、4日共培養アッセイで試験した。多数のCAR陽性CD3陽性T細胞(濃色棒)および総CD3陽性T細胞(薄色棒)を、CAR形質導入および非形質導入T細胞とNALM6(Nalm-6)の培養後評価した(図10)。huCART19細胞は、0.016nM未満のRAD001の存在下で培養したとき増殖し、化合物が高濃度ではそれより少なく増殖した。重要なことに、0.0032および0.016nM RAD001両者で、増殖はRAD001非添加で観察されるより高かった。非形質導入T細胞(UTD)は検出可能な増殖を示さなかった。

【1144】

実施例7:低用量RAD001はインビボでCART増殖を刺激する

本実施例は、huCAR19細胞が種々の濃度のRAD001存在下でインビボで増殖する能力を評価する。

【1145】

材料および方法:

NALM6-luc細胞: NALM6ヒト急性リンパ芽球性白血病(ALL)細胞株は、再発ALL患者の末梢血から展開された。その後、細胞はホタルルシフェラーゼでタグ付けされた。これらの懸濁細胞を、10%熱不活性化ウシ胎児血清添加RPMIで増殖させた。

【1146】

マウス: 6週齢NSG(NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ)マウスを、Jackson Laborator

y(stock number 005557)から得た。

【1147】

腫瘍インプラント：NALM6-luc細胞を、インビトロで10%熱不活性化ウシ胎児血清添加RPMIで増殖および拡張した。次いで、細胞を15mlコニカルチューブに移し、2回冷滅菌PBSで洗浄した。NALM6-luc細胞を、次いで、計数し、PBS1ミリリットルあたり 10×10^6 細胞濃度で再懸濁した。細胞を氷上に置き、直ぐに(1時間以内に)マウスにインプラントした。NALM6-luc細胞を、100 μ l体積で、合計マウスあたり 1×10^6 細胞で尾静脈に静脈注射した。

【1148】

CAR T細胞投薬：マウスに、腫瘍インプラント7日後 5×10^6 CAR T細胞を投与した。細胞を、37℃水浴で一部溶かし、その後、1mlの冷滅菌PBSを細胞を含むチューブに添加しながら完全に融解した。融解細胞を15mlファルコンチューブに移し、PBSで最終体積10mlに合わせた。細胞を、各1000rpmで10分、2回洗浄し、次いで、血球計数器で計数した。T細胞を、次いで、冷PBS1mlあたり 50×10^6 CAR T細胞濃度で懸濁し、マウスに投薬するまで氷上に維持した。マウスに、100 μ lのCAR T細胞を、マウスあたり 5×10^6 CAR T細胞の用量で、尾静脈から静脈注射した。群あたり8マウスが、100 μ lのPBS単独(PBS)またはヒト化CD19 CAR T細胞で処置された。

10

【1149】

RAD001投薬：1mg RAD001に相当する50mg濃縮マイクロエマルジョンを製剤し、投薬時にD5W(デキストロース5%水溶液)に再懸濁した。マウスに、200 μ lの所望の用量のRAD001を連日経口投与(強制喫食)した。

20

【1150】

PK分析：マウスに、腫瘍インプラント7日後から開始して、連日RAD001を投薬した。投薬群は次のとおりであった：0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kgおよび10mg/kg。マウスは最初のおよび最後のRAD001投与0日目および14日後、PK分析のために次の時点で採血した：15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間および24時間。

【1151】

結果：

30

RAD001の増殖および薬物動態を、NALM6-luc腫瘍担持NSGマウスで試験した。RAD001単独の連日経口投与は、NALM6-luc腫瘍増殖に影響を有しなかった(図11)。RAD001の薬物動態分析は、腫瘍担持マウスの血中でかなり安定であることを示した(図12Aおよび12B)。0日目および14日目両者のPK分析は、血中のRAD001濃度が、試験した最低用量(0.3mg/kg)の投薬の24時間後でも10nm以上であることを示す。

【1152】

これらの用量に基づき、huCAR19 CAR T細胞を、これらの細胞の増殖能を決定するために、RAD001を伴いまたは伴わずに投薬した。使用した最高用量は、投薬24時間後の血中のRAD001のレベルに基づき、3mg/kgであった。最後のRAD001の投与の24時間後RAD001濃度が10nMを超えていたため、いくつかのRAD001の低用量を、CAR T細胞でのインビボ研究に使用した。CAR T細胞を、連日経口RAD001投薬開始1日前にIV投与した。マウスを、T細胞増殖についてFACSでモニターした。

40

【1153】

最低用量のRAD001は、CAR T細胞の増殖増加を示す(図13Aおよび13B)。この増殖増加は、CD8⁺ CAR T細胞よりもCD4⁺ CAR T細胞でより明白であり、長い。しかしながら、CD8⁺ CAR T細胞で、増殖増加は、CAR T細胞投与後最初の時点でしか見ることができない。

【1154】

50

均等物

ここに引用する各および全ての特許、特許出願および刊行物の開示は、その全体を引用により本明細書に包含させる。本発明は、具体的面を参照して開示しているが、本発明の他の面および異形が、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく他の当業者により考案され得ることは明らかである。下記特許請求の範囲は、全てのこのような面および等価な異形を含むと解釈されることを意図する。

他の態様は、次の特許請求の範囲内である。

【図 1】

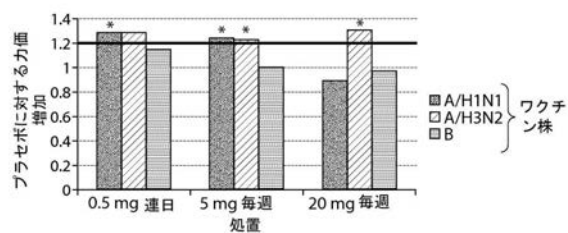


FIG. 1A

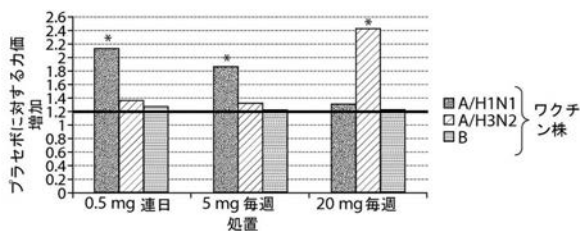


FIG. 1B

【図 2】

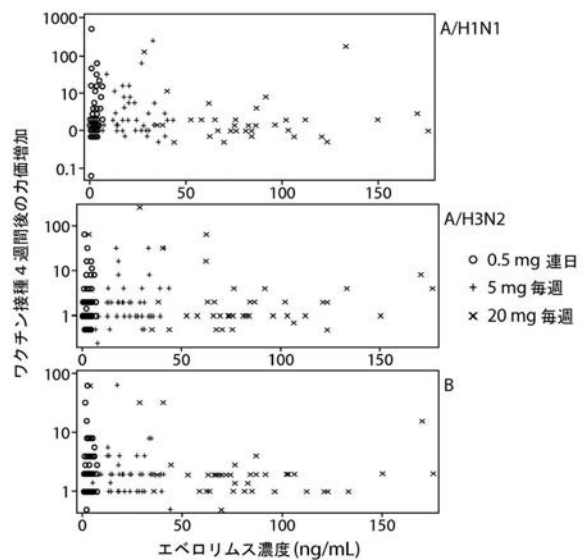


FIG. 2

【図 3】

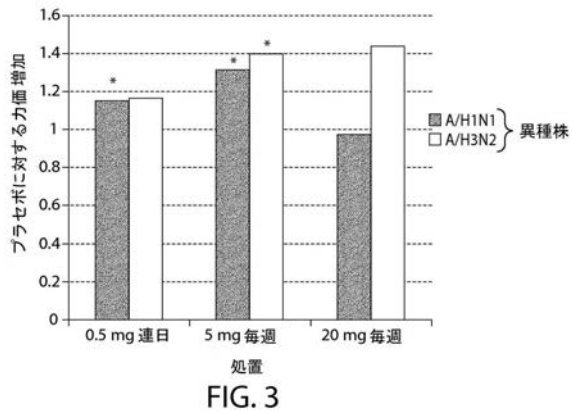


FIG. 3

【図 4】

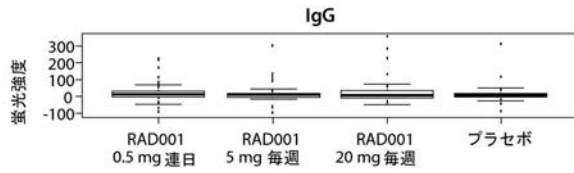


FIG. 4A

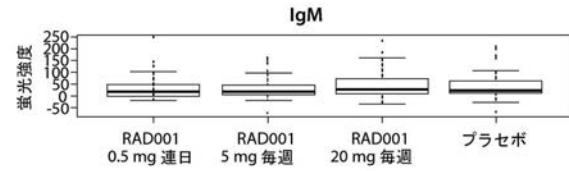


FIG. 4B

【図 5】

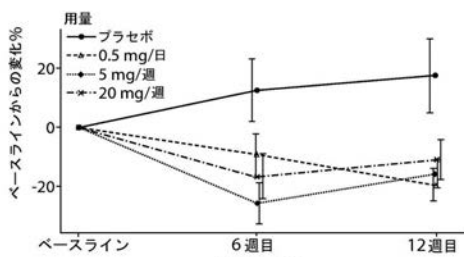


FIG. 5A

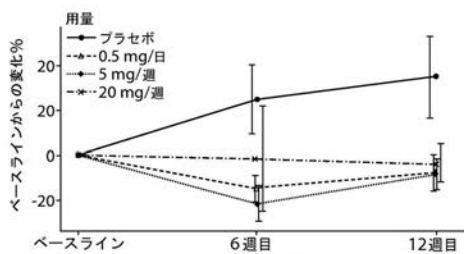


FIG. 5B

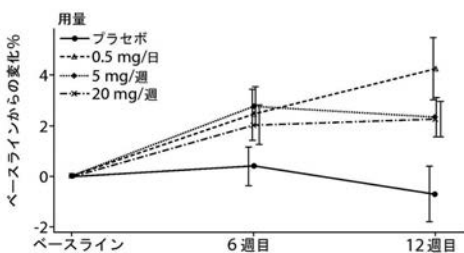


FIG. 5C

【図 6】

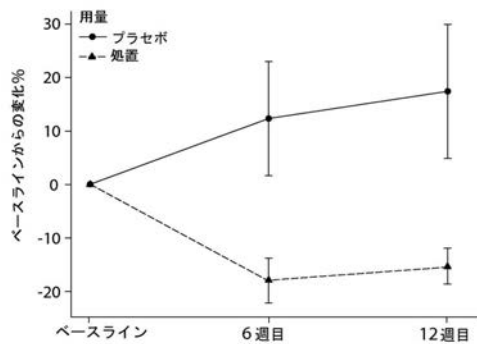


FIG. 6A

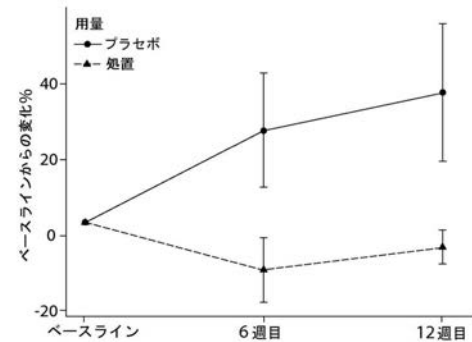


FIG. 6B

【 図 7 】

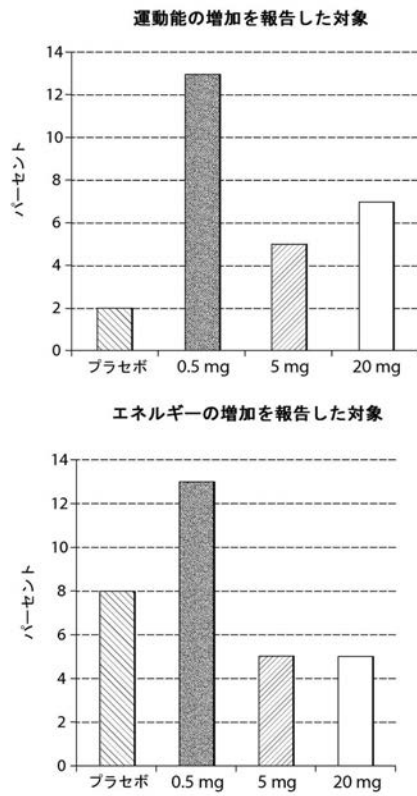
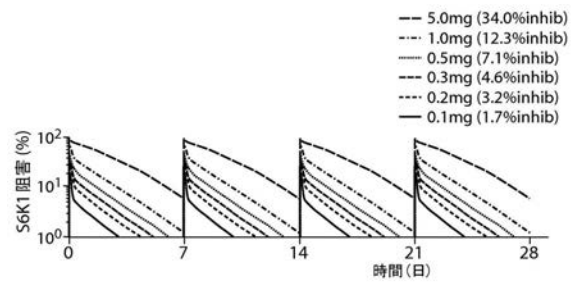
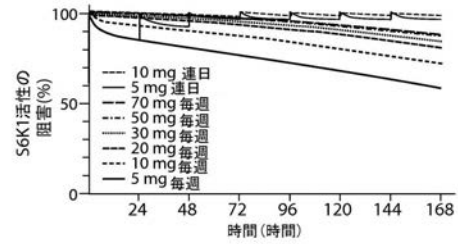


FIG. 7

【 図 8 】



【 図 9 】

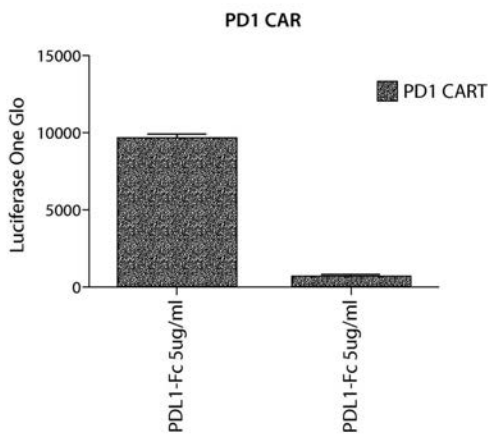


FIG. 9

【 図 10 】

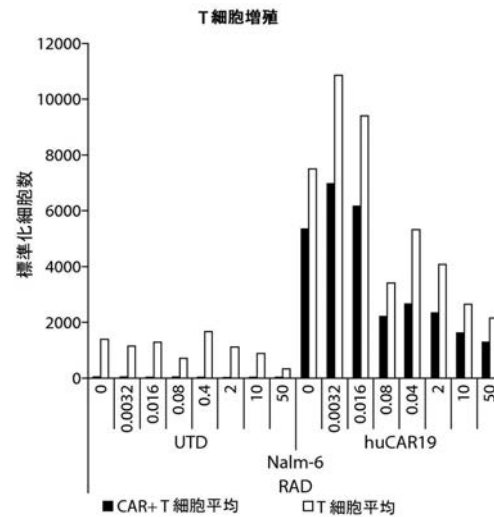


FIG. 10

【図 1 1】

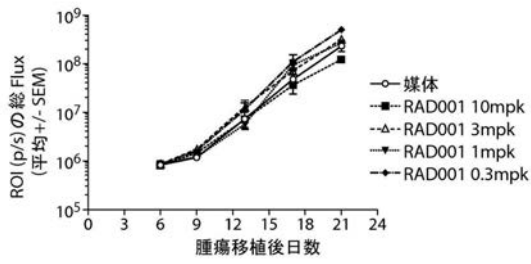


FIG. 11

【図 1 2】

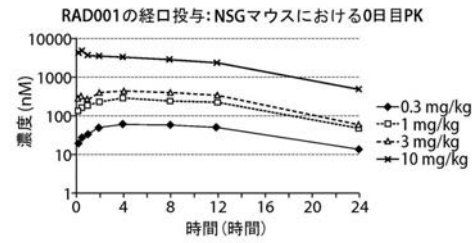


FIG. 12A

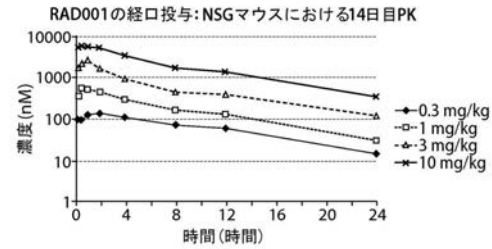


FIG. 12B

【図 1 3】

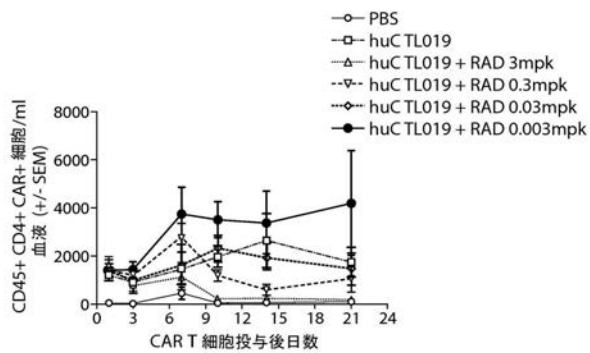


FIG. 13A

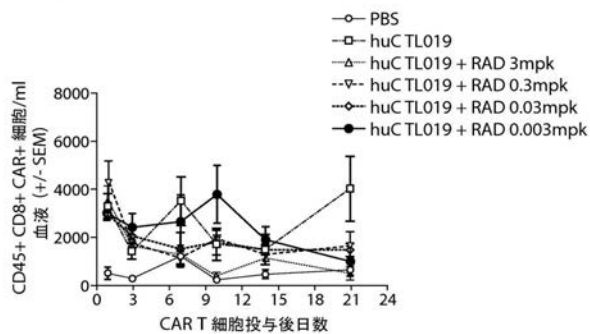


FIG. 13B

【配列表】

2017528433000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/041330

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/041330

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/041330

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/00 A61K31/4745
ADD.

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)

A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAMMILL JOANNE A ET AL: "Rapamycin Treatment Endows Car-engineered CD8+Effector T Cells With Memory-like Properties Resulting in Enhanced in vivo Engraftment", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 35, no. 9, November 2012 (2012-11), page 764, XP9186856, & 27TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE SOCIETY-FOR-IMMUNOTHERAPY-OF-CANCER (SITC); NORTH BETHESDA, MD, USA; OCTOBER 24 -28, 2012 the whole document ----- -/--	1,3-8, 11, 15-21, 23-25, 36,43,44

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

"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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 November 2015

Date of mailing of the international search report

12/11/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chavanne, Franz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/041330

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LESLIE E HUYE ET AL: "Combining mTor Inhibitors With Rapamycin-resistant T Cells: A Two-pronged Approach to Tumor Elimination", MOLECULAR THERAPY, vol. 19, no. 12, 30 August 2011 (2011-08-30), pages 2239-2248, XP055191016, GB ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2011.179 abstract -----	1,3-8, 11, 15-21, 23-25, 36,43,44
Y	WO 2010/017317 A2 (UNIV EMORY [US]; AHMED RAFI [US]; LARSEN CHRISTIAN P [US]; ARAKI KOICHI) 11 February 2010 (2010-02-11) abstract page 20, lines 23-31 page 21, lines 18-25 page 30, line 13 - page 35, line 2 examples 1-8 -----	1-46
Y	WO 2012/129514 A1 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]; RIDDELL STANLEY R [US]; HUDECEK MICHA) 27 September 2012 (2012-09-27) abstract page 2, line 18 - page 3, line 12 page 11, line 18 - page 12, line 8 page 23, line 12 - page 25, line 4 examples 1-6 -----	1-46
E	WO 2015/142675 A2 (NOVARTIS AG [CH]; UNIV PENNSYLVANIA [US]; LOEW ANDREAS [US]; MILONE MI) 24 September 2015 (2015-09-24) abstract paragraphs [0058] - [0116], [0122], [0123], [0128] - [0148], [0243], [0265], [0275], [0323] paragraphs [0339] - [0352], [0525], [0526], [0642] - [0671], [0881] table 1 -----	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/041330

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010017317 A2	11-02-2010	AU 2009279661 A1 CA 2733203 A1 EP 2318002 A2 US 2011129496 A1 US 2014370059 A1 WO 2010017317 A2	11-02-2010 11-02-2010 11-05-2011 02-06-2011 18-12-2014 11-02-2010
WO 2012129514 A1	27-09-2012	AU 2012230780 A1 CA 2830953 A1 CN 103502438 A EP 2689010 A1 JP 2014510108 A KR 20140023931 A RU 2013147157 A SG 193591 A1 US 2014314795 A1 WO 2012129514 A1	02-05-2013 27-09-2012 08-01-2014 29-01-2014 24-04-2014 27-02-2014 27-04-2015 30-10-2013 23-10-2014 27-09-2012
WO 2015142675 A2	24-09-2015	NONE	

International Application No. PCT/ US2015/ 041330

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-46

An mTOR inhibitor for use in the treatment of a subject, wherein said subject receives an immune effector cell engineered to express a CAR.

1.1. claims: 3-5, 45, 46(completely); 6-11, 13-44(partially)

Method of making an immune effector cell comprising a nucleic acid encoding a CAR comprising contacting the immune effector cell with a mTOR inhibitor.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N 9/99	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

(81)指定国 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 ジェニファー・プログドン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 デイビッド・グラス

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア 1 0 0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ジョアン・マニック

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 2 0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 マイケル・シー・ミローン

アメリカ合衆国 0 8 0 0 2 ニュージャージー州チェリー・ヒル、サリー・ロード 3 1 4 番

(72)発明者 レオン・マーフィー

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA19 QQ08 QR77 QR80 QS38 QX01

4B065 AA92X AA99Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA19 MA34 NA05 ZB092 ZB261 ZB271 ZC751

4C086 AA01 AA02 CB22 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZB27 ZC75

4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 NA05 ZB09 ZB26 ZB27 ZC75