

(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2016-510594

(P2016-510594A)

(43) 公表日 平成28年4月11日 (2016. 4. 11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/17 (2015. 01)	A 6 1 K 35/17 Z	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願2015-561628 (P2015-561628)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月5日 (2014. 3. 5)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年10月30日 (2015. 10. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/020936
 (87) 国際公開番号 W02014/138315
 (87) 国際公開日 平成26年9月12日 (2014. 9. 12)
 (31) 優先権主張番号 61/772, 591
 (32) 優先日 平成25年3月5日 (2013. 3. 5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 391058060
 ベイラー カレッジ オブ メディシン
 BAYLOR COLLEGE OF M
 E D I C I N E
 アメリカ合衆国, テキサス 77030,
 ヒューストン, ワン ベイラー プラザ
 (番地なし)
 (74) 代理人 110000729
 特許業務法人 ユニাস国際特許事務所
 (72) 発明者 ドッティ、ジャンピエトロ
 アメリカ合衆国 テキサス州 77030
 、ヒューストン、アパートメント 143
 O、7676 フェニックス ドライブ

最終頁に続く

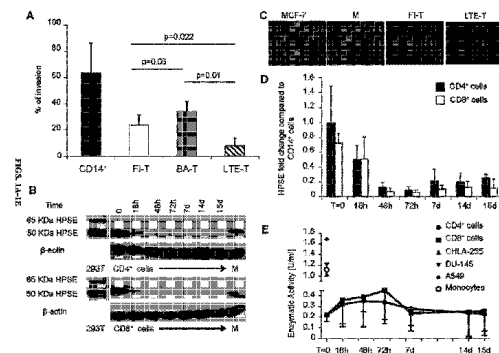
(54) 【発明の名称】 Tリンパ球におけるヘパラーゼの発現

(57) 【要約】

【課題】本開示の実施形態は、がんのための細胞療法への改善に関する。

【解決手段】ある特定の実施形態では、ex vivoで拡張されたT細胞は、内因性ヘパラーゼを発現せず、この効果の向上は、固形腫瘍のがん細胞療法を含めた、がん細胞療法のための改善を可能にする。特定の実施形態では、ex vivoで拡張されたT細胞は、組換えヘパラーゼの発現を含む。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘパラナーゼの組換え発現を含む *ex vivo* で培養された細胞であって、該細胞内で内因性ヘパラナーゼが発現されないか、またはヘパラナーゼが組換え発現されると、ヘパラナーゼの既存の発現が過剰発現される、細胞。

【請求項 2】

T 細胞、NK 細胞、または NK T 細胞である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

ex vivo で拡張された T 細胞である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 4】

腫瘍抗原特異的 T 細胞である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 5】

キメラ抗原受容体 (CAR) 特異的 T 細胞である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 6】

細胞療法の有効性を改善する方法であって、該療法のための細胞を、ヘパラナーゼが発現されるように改変するステップを含む、方法。

【請求項 7】

前記細胞が、内因性ヘパラナーゼを発現せず、前記改変するステップが、ヘパラナーゼの発現を回復させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞が、内因性ヘパラナーゼを発現し、該ヘパラナーゼが、過剰発現される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞が、腫瘍抗原特異的 T 細胞である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞が、CAR 特異的 T 細胞である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞療法が、がんのための細胞療法である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

前記細胞療法が、固形腫瘍のための細胞療法である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 13】

個体におけるがんを処置する方法であって、治療用細胞の治療有効量を該個体に送達するステップを含み、該細胞が、ヘパラナーゼを組換え発現する *ex vivo* で培養された細胞である、方法。

【請求項 14】

前記細胞が、

1) 内因性ヘパラナーゼを発現しないか、または

2) 内因性ヘパラナーゼを発現し、組換え発現されたヘパラナーゼが、過剰発現される

、
請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記がんが、固形腫瘍を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記細胞が、腫瘍抗原特異的 T 細胞である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記細胞が、CAR 特異的 T 細胞である、請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2013 年 3 月 5 日出願の米国特許仮出願第 61 / 772 , 591 号に基づ

10

20

30

40

50

く優先権を主張する。これらの出願はすべて、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記述

本発明は、NCI/NIHによって与えられたR01CA142636-01、ならびに米国国防省によって与えられたPR093892およびW81XWH-10-10425による政府資金提供を受けて行われた。政府は、本発明について一定の権利を有する。

【0003】

本開示の実施形態は、少なくとも、細胞療法、免疫療法、分子生物学、細胞生物学、およびがん医学を含めた医学の分野に関する。

【背景技術】

【0004】

がん患者のためのT細胞ベースの療法の臨床有効性は、キメラ抗原受容体(CAR)または異所性-TCR鎖および-TCR鎖の発現を介して、それらの抗原特異性をリダイレクトすることを目的とする遺伝子改変によって、実質的に増大している(Puleら、2008; Kalosら、2011; Morganら、2006)。これらの腫瘍指向的T細胞は、リンパ系腫瘍では、有意な腫瘍負荷を有する患者においてさえ、高度に有効な処置であった(Kalosら、2011; Rooneyら、1995)が、それらの効果は一般に、神経芽細胞腫(NB)などの固形腫瘍ではそれほど顕著ではなく(Puleら、2008)、特に、患者が大きな腫瘍負荷を有する場合はそれほど顕著ではない。この制限は、部分的には、活動性腫瘍の免疫回避戦略に起因する可能性もあるが(Zou、2005)、培養プロセス自体によって引き起こされる機能的な変化も、ex vivoで培養されたT細胞による腫瘍への浸透を低減する。

【0005】

CAR操作T細胞療法では、大半において、エフェクターT細胞およびエフェクター・メモリーT細胞を使用するが、これらは、それらの強力なエフェクター機能(Puleら、2008; Kalosら、2011; Savoldoら、2011)に加えて、移動し、腫瘍部位に蓄積される能力を保持する必要がある。このような特性は、T細胞の内皮細胞への接着およびケモカイン-ケモカイン受容体間相互作用を含めた、複雑な一連の相互作用を伴い、その後、T細胞の、抗原に富む組織への溢出を調整する(Muller、2003; Parish、2006; Yadaoら、2003)。このプロセスにおいて、Tリンパ球は、広範にわたる細胞の膜と会合する、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)を含めた、内皮下基底膜(BM)および細胞外マトリックス(ECM)の主要な構成要素を、生理学的に分解する(Berfieldら、1999)。ECMは、腫瘍微小環境のきわめて重要な構成要素であるので、このT細胞によるHSPGの分解プロセスも、固形腫瘍の有効な治療に必要とされる。

【0006】

ECMの分解には、T細胞による分解酵素の放出が必須であり、このうちで、ヘパラーゼ(HPSE)は、最も重要なものの1つであると考えられる。HPSEは、HSPGのヘパラン硫酸(HS)鎖を切断することができる、唯一公知の哺乳動物の-D-エンドグリコシダーゼである(Parish、2006; de Mestreaら、2007; Vlodayevskyら、2007; YurchencoおよびSchittny、1990)。HPSEは、約65 kDaの不活性の前駆体タンパク質としてまず合成され、その後、二量体化して、活性のHPSEタンパク質を形成する、約8 kDaおよび約50 kDaの2つのタンパク質サブユニットに切断される(Vlodayevskyら、2007)。HPSEは、炎症にも大きく寄与し、活性化CD4⁺Tリンパ球、好中球、単球、およびBリンパ球によって大量に産生されると考えられる(Fridmanら、1987; Naparstekら、1984; Vlodayevskyら、1992)。リンパ球による組織浸潤の促進におけるこの役割と符合して、HPSEは、実験による自己免疫性脳脊髄炎(de Mestreaら、2007)および自己免疫性関節炎(Parish、2006)

10

20

30

40

50

においても重要な役割を果たす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

H P S E は、炎症に関与しているが、腫瘍部位における T 細胞浸潤の媒介へのその寄与は、依然として不明である。養子移入の前における T 細胞の操作が、この酵素の産生にどのような効果を及ぼすのかも、知られていない。本開示は、当業界における、*e x v i v o* で拡張された細胞など、治療用細胞の、固形腫瘍などのがんの有効である能力を強化する必要を満たす。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、細胞療法に関連する方法および組成物を対象とする。特定の実施形態では、細胞療法は、ヒトを含めた哺乳動物など、細胞療法を必要とする個体のための細胞療法である。細胞療法は、任意の医学的狀態に適するが、特定の実施形態では、細胞療法は、がんのための細胞療法である。がんは、任意の種類のがんでありうるが、特定の実施形態では、がんは、個体における 1 つまたは複数の固形腫瘍を含み、固形腫瘍は、良性であってもよく、悪性であってもよい。個体は、どのような年齢であってもよく、どちらの性別であってもよい。特定の実施形態では、個体は、がんを有するか、がんを有する危険性があるか、またはがんを有することが疑われることが知られている。がんは、原発性がんであってもよく、転移性がんであってもよく、がんは、処置に対して不応性でありうる。特定の実施形態では、がんは、例えば、乳がん、肺がん、脳腫瘍、結腸がん、腎臓がん、前立腺がん、膵臓がん、甲状腺がん、骨がん、子宮頸がん、脾臓がん、肛門がん、食道がん、頭頸部がん、胃がん、胆嚢がん、黒色腫、非小細胞肺がん、リンパ腫、骨髄腫など、固形腫瘍の処置に関する。代替の実施形態では、本開示は、白血病など、非固形腫瘍の処置に関する。

【0009】

本開示の特定の実施形態は、細胞療法への改善を含めた、免疫療法への改善を提供する。特定の実施形態では、本開示は、T 細胞ベースの養子療法への改善を提供する。特定の態様では、本開示は、*e x v i v o* で拡張された T 細胞など、*e x v i v o* で拡張された細胞を利用する治療への改善を提供する。ある特定の態様では、*e x v i v o* で拡張された細胞を、がんを有する個体のための細胞療法に利用する。特定の場合には、改善された、*e x v i v o* で拡張された細胞を改変して、細胞が改変されなかった場合より有効となることを可能にする。改変細胞は、任意の様々な理由でより有効でありうるが、特定の実施形態では、改変細胞は、細胞外マトリックス (E C M) に浸透し、E C M 中の移動の改善も呈示することができる。ある特定の態様では、改変細胞は、ヘパリン硫酸プロテオグリカン (E C M および細胞表面の主構成要素) を分解することができる (またはこれをより効果的に分解することができる)。ある特定の態様では、改変細胞は、内皮下基底膜に浸透することができる (またはこれによって効果的に浸透することができる)。本開示の実施形態では、改変細胞は、それらの無改変の対応物より大きな抗腫瘍効果を及ぼしうる。代替の実施形態では、*e x v i v o* で拡張された細胞は、ヘパラーゼの発現が欠損しており、ヘパラーゼの発現の充足は、細胞の抗腫瘍活性が改善されることを可能にするが、改善は、E C M への浸透との関連が間接的であるか、またはこれと関連しない。

【0010】

一態様では、無改変形態では、検出可能なヘパラーゼを発現しないが、ヘパラーゼを検出可能なレベルまで発現するように改変された免疫細胞を含む組成物が、本明細書において提供される。特定の態様では、免疫細胞は、*e x v i v o* で操作されて内因性のヘパラーゼ発現を喪失しているが、組換え技術を介して、ヘパラーゼが発現されるように改変されており、例えば、このような遺伝子操作前の細胞のヘパラーゼ発現より高度にヘパラーゼが発現されるように改変されている。したがって、一態様では、ヘパ

10

20

30

40

50

ナーゼが発現されるように遺伝子操作された免疫細胞またはその活性断片が、本明細書において提供される。

【0011】

本開示の実施形態は、ヘパラナーゼを発現し、大量の間質を有する固形腫瘍を含めた固形腫瘍に対して有効な改変T細胞を提供する。特定の実施形態では、改変T細胞は、腫瘍間質のECMを分解する。特定の態様では、ヘパラナーゼを発現する改変T細胞は、例えば、ヘパラナーゼを発現しないT細胞、または比較的低レベルのヘパラナーゼを発現するT細胞と比較して、T細胞溢出および腫瘍浸潤の能力が改善されている。

【0012】

本開示の実施形態では、ヘパラナーゼの組換え発現を含む *ex vivo* で培養された細胞であって、細胞内で内因性ヘパラナーゼが発現されないか、またはヘパラナーゼが組換え発現されると、ヘパラナーゼの既存の発現が過剰発現される、細胞がある。特定の態様では、細胞は、なんらかの理由でヘパラナーゼをもたない可能性があるが、ある特定の態様では、細胞は、ヘパラナーゼ遺伝子プロモーターに因子が結合することによりヘパラナーゼを下方制御しており、ここで因子は、ある特定の実施形態において、p53である。特定の実施形態では、細胞は、T細胞、NK細胞、またはNK T細胞である。細胞は、*ex vivo* で拡張されたT細胞でありうる。細胞は、腫瘍抗原特異的T細胞でありうる。ある特定の実施形態では、免疫細胞、例えば、T細胞は、免疫細胞を、特定の抗原、例えば、腫瘍関連抗原 (TAA) または腫瘍特異的抗原 (TSA) を発現する標的細胞に標的化し、標的細胞を殺滅するように、免疫細胞を方向付けるポリペプチドを含む。特定の
20
の実施形態では、ポリペプチドは、キメラ抗原受容体または改変T細胞受容体である。別の特定の実施形態では、免疫細胞は、キメラ抗原受容体 (CAR)、すなわち、CAR-T細胞を含むT細胞である。

【0013】

本開示の実施形態は、組換え技術による操作を介して、ヘパラナーゼを発現する細胞であって、そうでなく、組換え技術による操作がなければ、ヘパラナーゼを発現しない、細胞を含む医薬組成物を提供する。医薬組成物は、ヘパラナーゼの発現の喪失を直接的または間接的にもたらず操作を経た免疫細胞を含んでいてもよく、ここで該細胞は、ヘパラナーゼが発現されるように改変されている。医薬組成物は、少なくとも水性担体を含めた、細胞のための担体組成物を含みうる。
30

【0014】

本開示の実施形態では、細胞療法の有効性を改善する方法であって、該療法のための細胞を、ヘパラナーゼが発現されるように組換えにより改変するステップを含む、方法がある。特定の実施形態では、細胞は、内因性ヘパラナーゼを発現せず、改変するステップが、ヘパラナーゼの発現を回復させる。ある特定の実施形態では、細胞は、内因性ヘパラナーゼを発現し、ヘパラナーゼは、過剰発現される。細胞は、腫瘍抗原特異的T細胞でありうる。細胞は、CAR特異的T細胞でありうる。細胞は、操作されたT細胞受容体またはケモカイン受容体またはサイトカインなど、T細胞の移動または生存を改善することを目的とする他の改変を含みうる。

【0015】

CARまたは操作されたT細胞受容体が細胞内で発現される場合には、細胞は、それぞれのCARまたは操作されたT細胞受容体をコードするポリヌクレオチド (発現ベクターなど) を含みうる。細胞内のベクターは、ヘパラナーゼ、CAR、操作されたT細胞受容体、またはこれらの組合せをコードする発現コンストラクトを含みうる。単一のベクターが、ヘパラナーゼ、CAR、操作されたT細胞受容体、またはこれらの組合せをコードする発現コンストラクトを含んでもよく、複数のベクターが、ヘパラナーゼ、CAR、操作されたT細胞受容体、またはこれらの組合せをコードする発現コンストラクトを含んでもよい。発現コンストラクトが、ヘパラナーゼ、CAR、および操作されたT細胞受容体の2つ以上をコードする場合には、それらの発現の調節を、同じ調節エレメントで方向づけてもよく、異なる調節エレメントで方向づけてもよい。ある特定の実施形態では、ヘパ
40
50

ナーゼ、CAR、および/または操作されたT細胞受容体の2つ以上は、個々のポリペプチドが切断可能なペプチド、例えば、2Aペプチドによって分離された、単一のポリシストロニックのポリペプチドとして発現される。発現ベクターの例示の例には、プラスミドまたはウイルスベクターが含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、細胞療法は、がんのための細胞療法であり、細胞療法は、固形腫瘍のための細胞療法でありうる。

【0016】

特定の実施形態では、個体におけるがん（固形腫瘍を含めた）を処置する方法であって、前記がんを処置する、例えば、前記がんの成長を緩徐化させるか、前記がん中の腫瘍細胞の数を低減するか、腫瘍負荷を軽減するか、または前記がんを消失させるのに治療的に有効な量の治療用細胞を、個体に送達するステップを含み、細胞が、ヘパラナーゼを組換え発現する *ex vivo* で培養された細胞である、方法が提供される。特定の実施形態では、細胞は、1) 内因性ヘパラナーゼを発現しないか、または2) 内因性ヘパラナーゼを発現し、組換え発現されたヘパラナーゼが、過剰発現される。いくつかの場合には、内因性ヘパラナーゼは、その発現を増大させるように操作されるか、または外因性ヘパラナーゼが、細胞に添加される。ある特定の実施形態では、細胞は、腫瘍抗原特異的T細胞でありうる。細胞は、CAR特異的T細胞であってもよく、操作されたT細胞受容体を含んでもよい。特定の実施形態では、細胞療法は、がんのための細胞療法であり、細胞療法は、固形腫瘍のための細胞療法でありうる。

10

【0017】

本明細書に記載の通り、養子移入された、腫瘍指向性T細胞によるヘパラナーゼの産生が研究され、固形腫瘍の処置のためのこれらの細胞の有効性の制限が、腫瘍ECM内のHSPGを分解するそれらの能力の損耗から生じ、これが、腫瘍微小環境内の腫瘍細胞に到達することに成功するそれらの能力を制限するのかが決定された。したがって、本開示のある特定の実施形態では、腫瘍特異的T細胞内で回復された、欠損したヘパラナーゼの発現は、それらの抗腫瘍効果、例えば、神経芽細胞腫モデルを含めた、適したモデルにおいて示されうる抗腫瘍効果など、固形腫瘍内の抗腫瘍効果を強化する。

20

【0018】

ある実施形態では、ヘパラナーゼを組換え発現する *ex vivo* で培養された免疫細胞を含む組成物がある。特定の実施形態では、細胞は、内因性ヘパラナーゼを発現しない。特定の実施形態では、細胞は加えて、ヘパラナーゼを内因的に発現する。ある特定の実施形態では、内因性ヘパラナーゼの発現は、1つまたは複数の基準細胞内のレベルと比較して上方制御される。特定の実施形態では、細胞は、T細胞、NK細胞、またはNK細胞である。特定の態様では、細胞は、*ex vivo* で拡張されたT細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍抗原特異的T細胞である。一実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドを含む細胞を含め、細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)を含む。一実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドは、発現ベクターを含む。いくつかの場合では、発現ベクターは、CARをコードするポリヌクレオチドを含み、ヘパラナーゼをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。特定の実施形態では、細胞は、操作されたT細胞受容体を含む。いくつかの場合では、細胞は、操作されたT細胞受容体をコードするポリヌクレオチドを含む。特定の態様では、操作されたT細胞受容体をコードするポリヌクレオチドは、発現ベクターを含む。ある特定の実施形態では、発現ベクターは、操作されたT細胞受容体をコードし、かつ/またはヘパラナーゼをコードする。

30

40

【0019】

一実施形態では、個体におけるがんを処置する方法であって、本開示の組成物の治療有効量を、個体に送達するステップを含む方法がある。特定の実施形態では、がんは、ヘラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)を含む細胞外マトリックスを含む。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍を含み、腫瘍は、悪性であってもよく、悪性でなくてもよい。固形腫瘍は、肉腫、癌、またはリンパ腫でありうる。細胞は、個体に対して同種細胞であってもよく、個体に対して自己細胞であってもよい。細胞は、T細胞でありうる。い

50

くつかの場合では、細胞は、C A Rを含み、C A Rをコードするポリヌクレオチドを含みうる。いくつかの実施形態では、細胞は、操作されたT細胞受容体を含み、細胞は、T細胞受容体をコードするポリヌクレオチドを含みうる。特定の実施形態では、がんを処置する方法は、化学療法、放射線照射、外科手術、ホルモン療法、および/または免疫療法など、1種または複数の追加のがん療法を個体に送達するステップをさらに含む。

【0020】

一実施形態では、免疫細胞療法の有効性を改善する方法であって、ヘパラナーゼを組換え発現するように、免疫細胞を改変するステップを含む方法がある。特定の実施形態では、細胞は、内因性ヘパラナーゼを発現せず、改変するステップによって、細胞内のヘパラナーゼの発現が回復される。いくつかの実施形態では、細胞は加えて、ヘパラナーゼを内因的に発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍抗原特異的T細胞である。ある特定の実施形態では、免疫細胞療法の有効性を改善する方法は、細胞を、それを必要とする個体に送達するステップをさらに含む。いくつかの場合では、個体におけるがんは、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)を含む細胞外マトリックスを含む。いくつかの実施形態では、個体は、固形腫瘍を有する。特定の実施形態では、細胞は、T細胞である。特定の実施形態では、細胞は、C A Rを含み、細胞には、C A Rをコードするポリヌクレオチドを含めることができる。いくつかの実施形態では、細胞は、操作されたT細胞受容体を含み、細胞は、T細胞受容体をコードするポリヌクレオチドを含みうる。特定の実施形態では、改変するステップは、ヘパラナーゼまたはヘパラナーゼ触媒性ドメインをコードするポリヌクレオチド、免疫細胞に送達することを含む。ある特定の実施形態では、改変するステップは、C A Rをコードするポリヌクレオチドを、免疫細胞に送達することをさらに含む。ある特定の実施形態では、ヘパラナーゼまたはヘパラナーゼ触媒性ドメインをコードするポリヌクレオチドは、C A Rもコードする。特定の実施形態には、改変するステップが、操作されたT細胞受容体をコードするポリヌクレオチドを、免疫細胞に送達することをさらに含む、方法が含まれる。いくつかの実施形態では、ヘパラナーゼまたはヘパラナーゼ触媒性ドメインをコードするポリヌクレオチドは、操作されたT細胞受容体もコードする。

【0021】

本開示の一実施形態には、細胞、ベクター、ヌクレオチドを含めた、本開示の任意の組成物を含むキットが含まれ、いくつかの態様では、キットは、化学療法、ホルモン療法、および/または免疫療法など、1種または複数の追加のがん治療剤をさらに含む。

【0022】

後述の「発明を実施するための形態」をよりよく理解するために、上記で本発明の特徴および技術的な利点についてある程度広く概説した。本発明の請求の範囲の主題を形成する本発明のさらなる特徴および利点を、以下に記載する。当業者ならば、本開示の概念および具体的な実施形態は、本発明の同じ目的を実行するように他の構造を改変または設計するための基礎として容易に利用できることを理解するであろう。当業者ならば、そのような同等な構造は、添付の請求の範囲に記載される本発明の趣旨および範囲から逸脱しないことも認識するであろう。その構成および操作の方法の両方に関する、本発明の特色と考えられる新規な特徴は、さらなる目的および利点と併せて、添付の図面を参照して考慮した場合、以下の記述から、さらによく理解されるものと予想される。しかし、図面のそれぞれは、例示と説明のみを目的として提供されたものであって、本発明の限定を規定しないことが明示的に理解されるものと予想される。

【0023】

本発明をよりいっそう理解するために、添付の図面と併せて考慮される以下の記述をここで参照する。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1A - 1E】*ex vivo*で拡張されたT細胞は、HPSEの喪失のために、ECMへの浸潤の低減を示すことを実証する図である。パネルA：単球(CD14⁺細胞、黒

10

20

30

40

50

色バー)、単離されたばかりのTリンパ球(FT: freshly isolated T lymphocyte)(白色バー)、短時間活性化されたT細胞(BA-T)(グレーバー)、およびex vivoで拡張されたT細胞(LTE-T)(ストライプバー)のECM浸潤アッセイ。データは、5回の独立の実験の平均±標準偏差(SD: standard deviation)をまとめたものである。パネルB:異なる時点における、単球内、CD4⁺およびCD8⁺のFT内、BA-T内、およびLTE-T内のHPSEの発現を示すウェスタンブロット。 - アクチン染色を使用して、試料の同等なローディングを確認した。データは、4種のドナーに由来する。培養の14日目に、OKT3/CD28 Abを使用して、LTE-Tを再活性化し、その後、15日目に解析した。野生型293T細胞またはヒトHPSEをトランスフェクトされた293T細胞を、それぞれ、陰性対照および陽性対照として使用した。パネルC: MCF-7内、単球内、FT内、およびLTE-T内のHPSEについての代表的な免疫蛍光染色。核は、DAPIで染色し、青色で示すが、HPSEは、赤色蛍光色素(Alexa Fluor 555)で染色する。拡大率は、20倍である。パネルD: CD4⁺(黒色バー)およびCD8⁺(白色バー)のFT内、BA-T内、およびLTE-T内のHPSEの定量的RT-PCR。遺伝子発現の倍率変化は、単球に照らして計算した。データは、4回の独立の実験の平均±SDをまとめたものである。培養の14日目に、OKT3/CD28 Abを使用して、T細胞を再活性化し、その後、15日目に解析した。パネルE: HPSEの酵素活性は、CD4⁺(丸)およびCD8⁺(四角)のFT、BA-T、およびLTE-Tから回収された上清中で評価した。培養の4および14日目に、LTE-Tを回収し、洗浄し、新鮮な培地中で再懸濁させた。14日目に、OKT3/CD28 Abを使用して、LTE-Tを再活性化し、15日目に解析した。開始時点(T=0)の値には、培地中で48~72時間にわたり休眠させた非活性化T細胞を使用した。HPSEを放出することが知られた腫瘍細胞株CHLA-255、A549、およびDU-145を、陽性対照として使用して、アッセイ感度を推定した。4種の異なるドナーからプールされたCD14⁺細胞の単球による溶解物も、陽性対照として使用した。

【0025】

【図2A-2E】HPSEが発現されるように改変されたLTE-Tは、ECMを分解する能力を必要とすることを示す図である。LTE-Tに、HPSEおよびGFPをコードするレトロウイルスベクター[HPSE(I)GFP]を形質導入した。パネルA: 培養の12日目における、CD4⁺LTE-TおよびCD8⁺LTE-Tの両方によるGFP発現。パネルB: 対照LTE-T内、HPSE(I)GFP⁺LTE-T内、ヒトMSC内(陰性対照)、LAN-1腫瘍細胞株内、CHLA-255腫瘍細胞株内、およびA549腫瘍細胞株内(陽性対照)のHPSEについてのqRT-PCR。データは、3種のドナーの平均およびSDをまとめたものである。パネルC: 培養の12日目における、対照LTE-T内および形質導入されたLTE-T内のHPSEの発現を示すWB。 - アクチン染色を使用して、試料の同等なローディングを確認した。パネルD: GFPの発現に基づき選択を伴うかまたは伴わない、対照LTE-TおよびHPSE(I)GFP⁺LTE-TのECM浸潤アッセイ。データは、9種のドナーの平均±SDをまとめたものである。パネルE: 阻害剤ヘパリンH1の存在下または非存在下における、HPSEを形質導入されたLTE-TのECM浸潤アッセイ。データは、4回の実験の平均±標準偏差をまとめたものである。

【0026】

【図3A-3G】LTE-Tにより共発現される、HPSEおよびGD2特異的CARは、抗GD2特異性を保持し、ECMを分解する能力が強化されていることを示す図である。LTE-Tに、GD2特異的CAR単独をコードするレトロウイルスベクター(CAR)、またはGD2特異的CARおよびHPSEの両方をコードするレトロウイルスベクター[CAR(I)HPSE]を形質導入した。パネルA: 対照LTE-Tおよび形質導入されたLTE-TによるCAR発現を検出するフローサイトメトリー解析。パネルB: 対照LTE-T内および形質導入されたLTE-T内のHPSEを検出するWB。試料の同

10

20

30

40

50

等なローディングを実証する - アクチン染色。パネルC：20：1のエフェクター：標的比における⁵¹Cr放出アッセイによって評価された、対照LTE-T、CAR⁺LTE-T、およびCAR⁺HPSE⁺LTE-Tの細胞傷害活性。LAN-1およびCHLA-255(GD2⁺)、ならびにRaji(GD2⁺)を、標的細胞として使用した。パネルD：形質導入されたLTE-Tによる、GD2⁺腫瘍細胞に应答した、IL-2およびIFN γ の両方の放出。パネルE：対照LTE-T、CAR⁺LTE-T、およびCAR⁺HPSE⁺LTE-TによるECMへの浸潤。パネルC～Eにおける全体的データは、4～5種のドナーからの平均 \pm SDをまとめたものである。パネルF、G：対照LTE-Tおよび形質導入されたLTE-Tは、ECMアッセイまたはインサートアッセイの上部にプレーティングしたが、LAN-1/GFP⁺細胞は、下側チャンバーにプレーティングした。培養の3日後、下側チャンバー内の細胞を回収して、フローサイトメトリーによって、CD3⁺T細胞およびGFP⁺腫瘍細胞を定量化した。パネルFは、代表的なドットプロットを示すが、パネルGは、5種のドナーの平均 \pm SDをまとめたものである。

【0027】

【図4A-4D】HPSEおよびGD2-CARを共発現するT細胞は、ECMの存在下における抗腫瘍活性が強化されていることを提示する図である。対照LTE-TおよびCARまたはCAR(I)HPSEをコードするレトロウイルスベクターを形質導入されたLTE-Tを、ECMアッセイの上部にプレーティングし、浸潤アッセイの下側チャンバーにプレーティングされた、LAN1/GFP⁺細胞またはCHLA-225/GFP⁺細胞を消失させるそれらの能力について評価した。T細胞および腫瘍細胞を、15：1の比でプレーティングした。24時間後、インサートおよびチャンバーを取り外し、培養の3日目に、浸潤細胞を回収し、抗CD3抗体で染色して、T細胞を同定し、腫瘍細胞によるGFP発現は、これらを、処置/浸潤の後におけるフローサイトメトリーによって数え上げて、抗腫瘍活性を評価することを可能にした。インサートだけを含むアッセイ(黒色バー)を使用して、ECMの非存在下における、形質導入されたT細胞の抗腫瘍効果を評価した。パネルAおよびBは、LAN1およびCHLA-225のそれぞれの存在下における、培養物についてのフローサイトメトリー解析の代表的なドットプロットを示す。パネルCおよびDは、5回の独立の実験の平均 \pm SEをまとめたものである。

【0028】

【図5A-5D】CAR-GD2⁺HPSE⁺LTE-Tが、*in vivo*における腫瘍浸潤の強化および2つの異種神経芽細胞腫マウスモデルにおける全体的生存の改善を示すことについての図である。パネルA：腫瘍細胞株CHLA-255を移植され、対照LTE-T、CAR⁺LTE-T、およびCAR(I)HPSE⁺LTE-Tで処置されたマウスのカプラン-マイヤー解析。パネルB：腫瘍試料中で検出されたCD3⁺T細胞のフローサイトメトリー解析。ドットプロットは、群1つ当たり3匹のマウスを表す。パネルC：腫瘍細胞株LAN-1を移植され、対照LTE-T、CAR⁺LTE-T、およびCAR(I)HPSE⁺LTE-Tで処置されたマウスのカプラン-マイヤー解析。パネルD：安楽死させたマウスから回収された腫瘍の重量。

【0029】

【図6A-6C】HPSEの再発現は、*in vivo*におけるLTE-Tの生体内分布に影響を及ぼさないことを示す図である。CAR(I)HPSE⁺LTE-TおよびCAR⁺LTE-Tを、GFP.FFlucをコードするベクターで標識し、その後、尾への注射を介して、NOG-SCIDマウスに注入した。T細胞の生体内分布は、LTE-Tの注入後の表示の時点における*in vivo*イメージングによって評価した(パネルA)。組織を、LTE-Tの注入後12または19日目までに、注入されたマウスから回収し、ヘマトキシリンおよびエオシン(パネルB)および抗CD3抗体(パネルC)で染色した。20倍の拡大率。ヒト扁桃腺切片を、CD3染色についての陽性対照として使用した。

【0030】

【図 7 A - 7 B】T 細胞のサブセットを、P B M C から単離し、刺激したことを示す図である。

【0031】

【図 8 A - 8 B】ヘパラナーゼの発現のための例示のコンストラクトおよび関連の対照を示す、活性化 T リンパ球を形質導入するのに使用されるレトロウイルスベクターの概略表示である。

【0032】

【図 9 A - 9 D】p 5 3 が、L T E - T 内で上方制御され、H P S E プロモーターに結合することを示す図である。パネル A : 培養後の異なる時点における、C D 4 + T 細胞内および C D 8 + T 細胞内の H P S E および p 5 3 の q R T - P C R。遺伝子発現の倍率変化は、T = 0 に照らして計算した。データは、3 回の独立の実験の平均 ± S D をまとめたものである。パネル B : C D 3 + F I - T 内、C D 3 + B A - T 内、および C D 3 + L T E - T 内の H P S E および p 5 3 の発現を示す W B。 - アクチン染色を使用して、試料の同等なローディングを確認した。パネル C、D : 14 日目までの培養物中の、L T E - T 内 (C)、ならびに T C R 架橋の前 (T = 0) および後 (T = 72 時間後) における C D 4 5 R A + 細胞内 (D) の、p 5 3 C h I P。投入物は、DNA 超音波処理されているが、DNA 免疫沈降されてはいない。I g G および p 5 3 を、それぞれ、アイソタイプ A b および p 5 3 特異的 A b で DNA 免疫沈降する。I g G および p 5 3 の P C R バンドの強度を、投入物 P C R バンドと比較して、相対定量化を実施した。この代表的な試料では、相対定量化は、L T E - T (C) について、20 % の I g G および 90 % の p 5 3 ; C D 4 5 R A + 細胞 (D) について、T = 0 では、2 % の I g G および 4 % の p 5 3、ならびに T = 72 時間後では、53 % の I g G および 100 % の p 5 3 であった。

10

20

【0033】

【図 10 A - 10 D】腎臓内に N B 細胞を植え込まれたマウスにおける、C A R - G D 2 + H P S E + L T E - T による腫瘍浸潤の強化を示す図である。パネル A、B : C A R + L T E - T または C A R - G D 2 + H P S E + L T E - T を注入されたマウスの腎臓内に植え込まれた腫瘍内の C D 3 + T 細胞浸潤を示す免疫組織化学。10 倍の拡大率 (A) および 20 倍の拡大率 (B)。パネル C : C A R + L T E - T または C A R (I) H P S E + L T E - T で処置されたマウスから回収された腫瘍内の、高倍率視野 10 当たりの浸潤 C D 3 + T 細胞の数の散布図。パネル D : C A R + L T E - T または C A R (I) H P S E + L T E - T を注入された担がんマウスのカプラン - マイヤー解析。

30

【0034】

【図 11】O K T 3 / C D 2 8 A b による活性化後の異なる時点における、セントラル・メモリー C D 4 5 R O + / C D 6 2 L + (C M) 内およびエフェクター・メモリー C D 4 5 R O + / C D 6 2 L - (E M) 内の H P S E の発現を示すウェスタンブロットである。 - アクチン染色を使用して、試料の同等なローディングを確認した。データは、不活性 H P S E 形態および活性 H P S E 形態の両方が検出可能な代表的ドナーに由来する。

【0035】

【図 12 A - 12 B】G D 2 特異的 C A R で改変された L T E - T 内の H P S E の共発現が、E C M の存在下における抗腫瘍活性を強化することを示す図である。パネル A ~ B : 対照 L T E - T および形質導入された L T E - T は、E C M アッセイまたはインサートアッセイの上部にプレーティングしたが、C H L A 2 5 5 / G F P + 細胞は、下側チャンバーにプレーティングした。培養の 3 日後、下側チャンバー内の細胞を回収して、フローサイトメトリーによって、C D 3 + T 細胞および G F P + 腫瘍細胞を定量化した。パネル A は、C H L A 2 5 5 G F P + 腫瘍細胞によるアッセイの代表的なドットプロットを示すが、パネル B は、5 種のドナーの平均 S D をまとめたものである。

40

【0036】

【図 13】p 5 3 の、H P S E プロモーターへの結合を評価する C h I P 解析で使用されるプライマーのセットをまとめる表を提示する図である。プロモーターの起点に照らしたプライマーの位置も示す。57 ~ 277 では、センスプライマーは、配列番号 1 を含み、

50

アンチセンスプライマーは、配列番号 2 を含む。970～1167では、センスプライマーは、配列番号 3 を含む、アンチセンスプライマーは、配列番号 4 を含む。1815～2030では、センスプライマーは、配列番号 5 を含む、アンチセンスプライマーは、配列番号 6 を含む。2409～2687では、センスプライマーは、配列番号 7 を含む、アンチセンスプライマーは、配列番号 8 を含む。2975～3274では、センスプライマーは、配列番号 9 を含む、アンチセンスプライマーは、配列番号 10 を含む。

【発明を実施するための形態】

【0037】

長年にわたる特許法の慣例に沿って、請求項を含め本明細書において、語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、含む(comprising)という語と共に使用される場合、「1つまたは複数」を意味する。本開示のいくつかの実施形態は、開示の1種または複数の要素、方法ステップ、および/または方法からなるか、本質的になるものでありうる。本明細書に記載のいずれの方法または組成物も、本明細書に記載の任意の他の方法または組成物に関して実行できることが企図されている。

10

【0038】

本明細書で使用される、用語「約」または「およそ」は、基準の量、レベル、値、数、頻度、百分率、大きさ、サイズ、量、重量、または長さに照らして最大で30、25、20、25、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%変化する、数量、レベル、値、数、頻度、百分率、大きさ、サイズ、量、重量、または長さを指す。特定の実施形態では、数値に先行する場合の用語「約」または「およそ」は、±15%、10%、5%、または1%の範囲の値を指す。

20

【0039】

本明細書を通して、文脈によりそうでないことが必要とされない限り、語「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、および「含むこと(comprising)」は、言明されたステップまたは要素またはステップもしくは要素の群の包含を含意し、任意の他のステップまたは要素またはステップもしくは要素の群の除外を含意しないことが理解されるであろう。「からなる」には、語句「からなる」に後続するいかなる内容も含まれるがこれらに限定されないことが企図されている。したがって、語句「からなる」は、列挙された要素が必要または必須であり、他のいかなる要素も存在しえないことを示す。「から本質的になる」には、語句の後に列挙され、列挙された要素について開示で指定された活動または作用に干渉しないかまたはこれに寄与する他の要素に限定される、いかなる要素も含まれることが企図されている。したがって、語句「から本質的になる」は、列挙された要素が必要または必須であり、他のいかなる要素も任意選択ではなく、存在してもよいか、存在しなくてもよいかは、列挙された要素の活動または作用に影響を及ぼすのかどうかによることを示す。

30

【0040】

本明細書を通して、「一実施形態」、「ある実施形態」、「特定の実施形態」、「関連の実施形態」、「ある特定の実施形態」、「追加の実施形態」、もしくは「さらなる実施形態」、またはこれらの組合せに対する言及は、実施形態との関連で記載された、特定の特徴、構造、または特色が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書を通じた様々な箇所における以上の語句の出現は、すべてが必ずしも同じ実施形態を指すわけではない。さらに、特定の特徴、構造、または特色を、1つまたは複数の実施形態において、任意の適する形で組み合わせることができる。

40

【0041】

本開示の実施形態は、特に、腫瘍に効果的に浸潤することができない細胞についての、養子細胞移入における当面の制限に取り組むものである。例えば、養子移入された腫瘍特異的Tリンパ球は、バルク腫瘍(本開示の方法および組成物は、いかなるサイズの腫瘍に対しても有効であるが、いくつかの実施形態では、通例、最大直径が10cmを超える)を有する患者における効果が限定的である。本明細書で記載される通り、この制限を探索するために、がん患者の処置のために製造された腫瘍特異的Tリンパ球の能力を、T細胞

50

溢出を可能にする本質的なステップである、細胞外マトリックス（ECM）を分解するそれらの能力について特徴づけた。末梢血から単離されたＴリンパ球とは著しく対照的に、培養されたＴリンパ球は、ヘパラーゼ（HPSE）が欠損するため、ヘパラン硫酸プロテオグリカン分解する能力が損なわれている。培養された腫瘍特異的Ｔリンパ球内のヘパラーゼの再発現（例えば、遺伝子導入による）は、それらのエフェクター機能を損なわずに、ECMを分解するそれらの生理学的能力を回復し、腫瘍へのＴ細胞浸潤および抗腫瘍効果の強化を決定する。この戦略を利用することにより、固形腫瘍を有する患者における腫瘍指向性Ｔ細胞の活性が有意に強化される。

【0042】

I. 細胞

本開示では、ヘパラーゼを組換え発現する（例えば、外因性ヘパラーゼを発現することにより、または組換えにより内因性ヘパラーゼの発現を増大させることにより）細胞が包含される。特定の態様では、細胞は、養子移入のための細胞である。細胞は、医薬組成物中に含めることができる。細胞は、本明細書に記載されるベクターで形質転換してもよく、これをトランスフェクトしてもよい。組換えヘパラーゼを発現する細胞は、本明細書に記載のベクターのうちの少なくとも１つを導入することにより作製することができる。いくつかの実施形態では、ヘパラーゼの発現コンストラクトは、細胞のゲノムに組み込まれるが、細胞内のベクターの存在は、ヘパラーゼの発現コンストラクトの発現を媒介する。宿主に導入された核酸分子またはベクターは、宿主のゲノムに統合されてもよく、染色体外に維持されてもよい。

【0043】

本明細書で使用される用語「細胞」、「細胞株」、および「細胞培養物」は、互換的に使用することができる。これらの用語のすべてには、任意かつすべての後続の世代である、それらの子孫細胞も含まれる。すべての子孫細胞が、意図的であるかまたは予測外の突然変異のために必ずしも同一でない場合もあることが理解される。異種核酸配列の発現の文脈では、「宿主細胞」は、原核細胞または真核細胞を指し、これには、ベクターを複製し、かつ／またはベクターによりコードされる異種遺伝子が発現することができる、任意の形質転換可能な生物が含まれる。宿主細胞は、ベクターのレシピエントとして使用することができ、そのように使用されている。宿主細胞は、「トランスフェクト」してもよく、「形質転換」してもよく、これらは、外因性核酸が、宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。形質転換された細胞には、初代対象細胞およびその子孫細胞が含まれる。本明細書で使用される、用語「操作された」細胞および「組換え」細胞または宿主細胞は、例えば、ベクターなどの外因性核酸配列が導入された細胞を指すことが企図されている。したがって、組換え細胞は、組換えにより導入された核酸を含有しない、天然に存在する細胞から識別可能である。

【0044】

ある特定の実施形態では、RNAまたはタンパク質性配列を、同じ宿主細胞内の、他の選択されたRNAまたはタンパク質性配列と共に共発現しうることが企図されている。共発現は、宿主細胞に、２つ以上の異なる組換えベクターを共トランスフェクトすることによって達成することができる。代わりに、単一の組換えベクターを構築して、RNAの複数の異なるコード領域を含めることができ、その後、これを、単一のベクターをトランスフェクトされた宿主細胞内で発現することもできるであろう。いくつかの場合では、細胞は、ヘパラーゼの発現コンストラクトおよび同じ分子または異なる分子上に存在する別の発現コンストラクトも含みうる。

【0045】

細胞は、それらが原核細胞内および真核細胞内の両方で複製され、かつ／または発現されることを可能にする、制御配列を利用するベクターを含みうる。当業者ならば、その下で宿主細胞をインキュベートして、それらを維持し、ベクターの複製を許容するための条件をさらに理解するであろう。本開示の細胞の大規模生成を可能にする技法および条件も理解され、知られている。

10

20

30

40

50

【0046】

本開示の実施形態では、開示の細胞内の、内因性ヘパラーゼおよび外因性ヘパラーゼの1つまたは複数の発現の調節がある。発現の調節には、ヘパラーゼの構成的発現、ヘパラーゼの誘導的発現、ヘパラーゼの環境特異的発現、またはヘパラーゼの組織特異的発現を含めることができ、このようなプロモーターの例は、当業界で公知である。哺乳動物の構成的プロモーターには、例えば、サルウイルス40、即初期サイトメガロウイルス、ヒトユビキチンC、伸長因子1 - サブユニット、およびマウスホスホグリセリン酸キナーゼ1が含まれる。ヘパラーゼの具体的な環境特異的発現には、例えば、低酸素条件のための、ある特定の調節エレメントの使用が含まれる。

【0047】

特定の実施形態では、本明細書で企図される実施形態で使用される細胞には、例えば、哺乳動物細胞を含めた真核細胞が含まれる。ある特定の実施形態では、細胞は、ヒト細胞であるが、特定の実施形態では、細胞は、それらのそれぞれの動物における使用のための、ウマ、ウシ、マウス、ヒツジ、イヌ、ネコなどの細胞である。これらの種において、T細胞、NK細胞、NK T細胞などの様々な種類の細胞が含まれる可能性がある。

【0048】

細胞は、それらを受容する個体に関して、自己細胞でもよく、同系細胞でもよく、同種細胞でもよく、なおいくつかの場合では、異種細胞であってもよい。細胞は、主要組織適合複合体(「MHC」)プロファイルを変化させることによって改変してもよく、₂ - マイクログロブリンを不活化させて、機能的なクラスIのMHC分子の形成を防止することによって改変してもよく、クラスII分子の不活化によって改変してもよく、1つまたは複数のMHC分子の発現をもたらすことによって改変してもよく、細胞傷害活性と関連する遺伝子の発現を強化または阻害することを介して、細胞傷害能を強化または不活化させることなどによって改変してもよい。

【0049】

細胞が、特異的な抗原特異性または標的部位へのホーミング特異性を有するT細胞およびB細胞など、特定の特異性を有するいくつかの場合には、特異的クローン細胞またはオリゴクローナル細胞が対象でありうる。

【0050】

例示のT細胞は、組換え以外の形でヘパラーゼが発現されるように改変することができる。例えば、T細胞受容体の一方または両方の鎖をコードする遺伝子を導入することが要望される場合がある。例えば、ヘパラーゼなどの治療的価値を有する遺伝子や任意選択で別の治療用遺伝子の発現をもたらすことに加えて、いくつかの実施形態では、細胞を改変して、細胞を特定の部位に方向付ける。部位には、解剖学的部位を含めることができ、特に、実施形態には、固形腫瘍が含まれる。局在化された細胞濃度の増大は、標的細胞上の天然に存在するエピトープなど、標的部位に結合することを可能にする、宿主細胞上の表面膜タンパク質を発現することによって、ECM内を移動する(ヘパラーゼの発現のため)それらの能力を強化した後で達成することができる。多数の状況であって、細胞を特定の部位に方向付けることが望まれる状況、治療的産物の放出が大きな価値を有する状況、または細胞のアポトーシスを直接的または間接的にもたらす細胞内経路が誘発される状況がある。

【0051】

一実施形態では、宿主細胞は、組換えヘパラーゼを含むが、例えば、操作されたTCR受容体、エンゲージャー分子、および/またはCARも含むT細胞である。天然存在のT細胞受容体は、2つのサブユニット、_α サブユニットおよび_β サブユニットを含み、両サブユニットは、それぞれが、各T細胞ゲノムで組換えイベントによって生成される特有のタンパク質である。TCRのライブラリーを、特定の標的抗原に対するそれらの選択性についてスクリーニングすることができる。「遺伝子操作されたTCR」は、選択され、クローニングされ、かつ/またはその後養子免疫療法に用いられるT細胞集団に導入される、標的抗原に対して高いアビディティおよび反応性を有する天然のTCRを指す。遺

10

20

30

40

50

伝子操作されたTCRとは対照的に、CARは、MHCに依存せずに標的抗原に結合するように遺伝子操作されている。特定の実施形態では、CARは、限定されるものではないが、抗体またはその抗原結合断片、膜貫通ドメイン、1つまたは複数の細胞内共刺激性シグナル伝達ドメイン、および一次シグナル伝達ドメインを含めた細胞外結合ドメインを含む。

【0052】

特定の実施形態では、本開示の免疫細胞を、内因性ヘパラーゼの発現の上方制御下に置く。内因性ヘパラーゼの発現レベルを、1つまたは複数の基準細胞内のレベルと比較して上方制御することができる。基準細胞は、無改変の免疫細胞など、外因性ヘパラーゼをもたない細胞でありうる。内因性ヘパラーゼの発現レベルは、細胞の内因性ヘパラーゼのゲノムの調節エレメント内に強力なプロモーターを組み込むことを含めた、1つまたは複数の手段によって増大させることができる。いくつかの場合では、内因性ヘパラーゼの発現をオンにする、1つまたは複数の転写因子が発現されるように細胞を操作することができる。

【0053】

様々な実施形態では、T細胞は、増大させたヘパラーゼ、およびT細胞によって発現されるCARまたは操作されたTCRと同じ標的抗原を認識するエンゲージャー分子をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、CARまたは遺伝子操作されたTCRを発現するT細胞は、CARまたは遺伝子操作されたTCRによって認識される標的抗原とは異なるが、同じ標的細胞上に発現される標的抗原を認識するエンゲージャー分子をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。本開示の実施形態は、エンゲージャー分子、例えば、エンゲージャーポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を提供する。このようなエンゲージャーポリペプチドは一般に、抗原認識ドメインおよび活性化ドメインを含む。エンゲージャー分子の抗原認識ドメインは、標的細胞上に存在する1つまたは複数の分子に結合するように設計することができるが、エンゲージャー分子の活性化ドメインは、例えば、Tリンパ球など、エフェクター細胞上に存在する分子に結合する。ひとたび、エンゲージャー分子の活性化ドメインがエフェクター細胞に結合したら、活性化ドメインは、エフェクター細胞を活性化させることができる。ある特定の実施形態では、エンゲージャーの活性化ドメインが免疫細胞上の活性化分子に結合し、抗原認識ドメインが標的細胞抗原に結合すると、免疫細胞によって標的細胞が殺滅される。ある特定の実施形態では、エンゲージャーは、タンパク質、例えば、遺伝子操作されたタンパク質である。特定の実施形態では、エンゲージャーの活性化ドメインが、抗体またはその抗原結合性断片もしくは部分、例えば一本鎖可変領域断片(s c F v)であるか、またはこれを含む。他の特定の実施形態では、抗原認識ドメインは、抗体あるいは抗体断片もしくは抗原結合性断片またはこれらの一部、例えば、モノクローナル抗体、F v、またはs c F vであるかもしくはこれを含むか、または、リガンド、ペプチド、可溶性のT細胞受容体、もしくはこれらの組合せを含みうる。ある特定の実施形態では、活性化ドメインおよび抗原認識ドメインが、リンカー、例えば、ペプチドリリンカーによって連結されている。エンゲージャー分子の活性化ドメインは、免疫細胞に活性化をもたらすことができる。当業者は、免疫細胞が様々な活性化受容体を有することを認識している。例えば、CD3は、T細胞上の活性化受容体であるが、CD16、NKG2D、またはNKp30は、NK細胞上の活性化受容体であり、そして、CD3またはインバリアントTCRは、NK細胞上の活性化受容体である。したがって、T細胞を活性化するエンゲージャー分子は、NK細胞を活性化するエンゲージャー分子とは異なる活性化ドメインを有しうる。特定の実施形態、例えば、免疫細胞がT細胞である実施形態では、活性化分子が、CD3、例えば、CD3、CD3、もしくはCD3；またはCD27、CD28、CD40、CD134、CD137、およびCD278のうちの1つまたは複数である。他の特定の実施形態、例えば、免疫細胞がNK細胞である実施形態では、活性化分子がCD16、NKG2D、またはNKp30であり、免疫細胞がNK細胞である実施形態では、活性化分子がCD3またはインバリアントTCRである。ある特定の他の実施形

10

20

30

40

50

態では、エンゲージャーが、1つまたは複数の他のドメイン、例えば、1つもしくは複数のサイトカイン、共刺激性ドメイン、T細胞活性化の負の調節分子を抑制するドメイン、またはこれらの組合せをさらに含む。特定の実施形態では、サイトカインがIL-15、IL-2、および/または、IL-7である。他の特定の実施形態では、共刺激性ドメインがCD27、CD80、CD83、CD86、CD134、またはCD137である。他の特定の実施形態では、T細胞活性化の負の調節分子を抑制するドメインが、PD-1、PD-L1、CTLA4、またはB7-H4である。

【0054】

ヘパラナーゼの発現のための外因性分子を有するか、またはこれを有することを企図された本開示の細胞は、CAR（一般に、腫瘍関連抗原（TAA）結合性ドメイン（最も一般には、モノクローナル抗体の抗原結合性領域に由来するscFv）、細胞外スパー/ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む）も含みうる。CARは、例えば、第1世代のCARでもよく、第2世代のCARでもよく、第3世代のCAR（シグナル伝達が、CD28および4-1BBまたはOX40などの腫瘍壊死因子受容体（TNFr）の1つまたは複数によってもたらされる共刺激と併せて、CD3によってもたらされるCAR）でもよい。CARは、EphA2、HER2、GD2、Glypican-3、5T4、8H9、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン、B細胞成熟抗原（BCMA）B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD19、CD20、CD22、カップ軽鎖、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、ERBB3、ERBB4、ErbbB3/4、FAP、FAR、FBP、胎児AChR、葉酸受容体、GD2、GD3、HLA-AI、MAGE A1、HLA-A2、IL11Ra、IL13Ra2、KDR、ラムダ、Lewis-Y、MCSP、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSC1、PSMA、ROR1、Sp17、SURVIVIN、TAG72、TEM1、TEM8、VEGRR2、癌胎児性抗原、HMW-MAA、VEGF受容体、および/またはフィブロネクチン、テネシン、もしくは腫瘍の壊死性領域のがん胎児性バリエーションなど、腫瘍の細胞外マトリックス内に存在する他の例示の抗原に特異的でありうる。CAR（例だけを目的とする）とヘパラナーゼとは、同じベクター上にあってもよく、異なるベクター上にあってもよい。いくつかの場合では、CARは、1つまたは複数のサイトカイン（例えば、IL-2、IL-7、またはIL-15など）も含む。キメラ抗原構造および用語法は、当業界で公知であり、例えば、それらの各々の開示を参照によりそれらの全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第7,741,465号；同第5,906,936号；同第5,843,728号；同第6,319,494号；同第7,446,190号；同第5,686,281号；同第8,399,645号；および米国特許出願公開第2012/0148552号を参照されたい。

【0055】

多くの状況において、目的が処置を終了することである場合、細胞が腫瘍性となっている場合、それらの存在の後における細胞の非存在が対象である研究において、かつ/または別々の事象などでは、改変細胞を殺滅することが所望でありうる。この目的では、自殺遺伝子など、制御された条件下で、改変細胞を殺滅しうる、ある特定の遺伝子産物の発現をもたらす。自殺遺伝子、例えば、カスパーゼ9の改変形態が、低分子、例えば、AP1903と共に二量体化可能なiCaspase9系が、当業界で公知である。例えば、Straathofら、Blood、105:4247~4254（2005）を参照されたい。

【0056】

II. 細胞の治療的使用

本開示のある実施形態は、腫瘍性疾患など、がん性疾患の防止、処置、または改善のための、本明細書で記載される改変細胞の使用に関する。特に、本開示の医薬組成物は、ヘ

10

20

30

40

50

パラナーゼを有することにより、医薬組成物の細胞が、細胞がヘパラナーゼをもたなかった場合より有効となるがんを防止、改善、および／または処置するのに特に、有用でありうる。特定の実施形態では、医薬組成物で処置されるがん細胞は、医薬組成物の細胞が、がん細胞のECMを分解するヘパラナーゼを発現するため、効果的に処置される。特定の実施形態では、がんは、固形腫瘍の形態である。

【0057】

本明細書で使用される場合、「処置」または「処置すること」は、疾患または病的状態の症状または病態への有益または望ましいいかなる作用も含み、処置されている疾患または状態（例えば、がん）の1種または複数の測定可能マーカーにおける最小限の低減さえ含む。処置は、場合によって、疾患もしくは状態の症状の軽減もしくは改善または疾患もしくは状態の進行の遅延を伴うことがある。「処置」は、必ずしも、疾患もしくは状態またはそれに伴う症状の完全な根絶または治癒を示すわけではない。

10

【0058】

本明細書で使用される場合、「予防する」および「予防される」、「予防すること」などの類似の語は、疾患または状態、例えば、がんの発生または再発を予防する、阻害する、またはその可能性を低減するためのアプローチを示す。この語は、疾患もしくは状態の発症もしくは再発を遅らせること、または疾患もしくは状態の症状の発症もしくは再発を遅らせることも指す。本明細書で使用される場合、「予防」および類似の語は、疾患または状態の発症または再発の前に、疾患または状態の強度、影響、症状、および／または負荷を軽減させることも含む。

20

【0059】

固形腫瘍の危険性がある個体を、本開示の組成物下または方法で処理することができる。個体は、家族歴または個人歴などの1つまたは複数の公知の危険因子を有すること、喫煙者であること、1つまたは複数の遺伝子マーカーを有することなどの理由で、危険性がある可能性がある。

【0060】

ヘパラナーゼを発現する免疫細胞の組成物の投与に関して考えられる適応症は、乳腺、前立腺、肺、および結腸がん、または乳がん、結腸がん、前立腺がん、頭頸部がん、皮膚がんなどの上皮がん／癌、尿生殖器がん、例えば、卵巣がん、子宮体がん、子宮がん、および腎がん、肺がん、胃がん、小腸のがん、肝がん、膵がん、胆嚢がん、胆管のがん、食道がん、唾液腺のがん、ならびに甲状腺のがんを含めた、腫瘍性疾患を含めたがん疾患である。特定の実施形態では、本開示の組成物の投与は、例えば、微小残存病変、初期がん、進行がん、および／または転移がんおよび／または不応性がんを含めたすべてのステージおよびタイプのがんに有用である。

30

【0061】

本開示は、がんに対して有効な他の化合物を伴う共投与プロトコールをさらに包含する。本発明の細胞の共投与のための臨床レジメンは、他方の構成要素を投与すると同時に、その前に、またはその後に行う共投与を包含しうる。特定の組合せ療法には、化学療法、放射線照射、外科手術、ホルモン療法、または他のタイプの免疫療法が含まれる。

【0062】

例示を目的として述べると、がん患者、またはがんに対して感受性であるかもしくはがんを有することが疑われる患者は、以下の通りに処置することができる。本明細書で記載される通りに改変された細胞は、患者に投与し、長期間にわたり保持することができる。個体には、1回または複数回の細胞の投与を行うことができる。例示の細胞には、*ex vivo*で拡張されたT細胞が含まれる。細胞は、ヘパラナーゼの活性部分またはすべてを少なくとも発現するように改変され、それを必要とする個体に提供される。いくつかの場合では、細胞は、腫瘍に直接注射することができる。例示のヘパラナーゼのヌクレオチド配列は、GenBank（登録商標）受託番号NM__006665の配列であり、例示のヘパラナーゼのポリペプチド配列は、GenBank（登録商標）受託番号NP__006656の配列であり、これらのいずれも、参照によりそれらの全体として本明細書に組

40

50

み込まれる。配列全体の活性部分またはすべてを、細胞に組み込むこともできるが、特定の態様では、組み込まれるヘパラナーゼの部分には、例えば、酵素活性に必要とされる任意のドメインが含まれる。

【0063】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変細胞を封入して免疫認識を阻害し、腫瘍部位に配置する。例えば、細胞は、リボソーム内、アルギン酸中、または血小板に富む血漿中に封入することができる。

【0064】

別の実施形態には、タンパク質産物の発現を活性化させて、細胞を活性化させうる、ヘパラナーゼを伴う抗原特異的 T 細胞の改変が含まれる。T 細胞受容体ならば、腫瘍細胞、病原体、細胞介在性自己免疫などに対して方向付けることができるであろう。細胞の活性化、例えば、IL-2 などのインターロイキンをもたらすことによれば、リガンドに応答した改変 T 細胞の拡大をもたらすことができるであろう。改変 T 細胞の他の使用には、T 細胞を特異的な部位に方向付けるためのホーミング受容体の発現が含まれよう。細胞傷害作用、標的細胞、例えば、内皮細胞の表面膜タンパク質の上方制御、または他の生物学的事象が所望されるであろう。

10

【0065】

別の実施形態では、抗原特異的 T 細胞を、エクソサイトーシスされるホルモンまたは因子を移出するように改変することができる。エクソサイトーシスの強化をもたらすことによって、大量のホルモンまたは因子が移出され、加えて、細胞質中のホルモンまたは因子の量に基づくフィードバック機構が存在する場合、ホルモンまたは因子の産生の増大がもたらされるであろう。一態様では、発現および移出が共時的に誘導されうるように、ホルモンまたは因子の発現の誘導をもたらすことができる。

20

【0066】

III. コンストラクトの細胞への導入

ヘパラナーゼコンストラクトは、コンストラクトを含有する宿主細胞の選択を可能にする、少なくとも1つのマーカーがありうる、1つまたは複数の DNA 分子または DNA コンストラクトとして導入することができる。コンストラクトは、従来の方途により調製することができる。必要に応じて、遺伝子領域と調節領域とを隔離し、ライゲートし、適切なクローニング宿主内でクローニングし、制限もしくはシーケンシング、または他の好都合な手段によって解析した。特に、PCR を使用して、機能的な単位の全部または一部を含めた個別の断片を単離することができる。必要に応じて、「プライマー対」、ライゲーション、in vitro における突然変異誘発などを使用して、1つまたは複数の突然変異を導入することができる。ひとたび完成され、適切な配列を有することが実証されたコンストラクトは、その後、任意の好都合な手段によって、宿主細胞に導入することができる。コンストラクトは、細胞への感染または形質導入のために、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、もしくは単純ヘルペスウイルス (HSV) またはレトロウイルスベクターを含めた他のウイルスなど、非複製性の欠損ウイルスゲノムに組み込み、パッケージングすることができる。所望の場合、コンストラクトには、トランスフェクションのためのウイルス配列を含めることができる。代わりに、融合、エレクトロポレーション、遺伝子銃、トランスフェクション、リポフェクションなどによって、コンストラクトを導入することもできる。コンストラクトの導入前に、宿主細胞を、培養物中で成長させ、拡張するのについて、コンストラクトの導入およびコンストラクトの組み込みのための適切な処理を施すことができる。その後、細胞を拡張し、コンストラクト内に存在するマーカーによって、スクリーニングする。使用して成功しうる様々なマーカーには、hprt、ネオマイシン耐性、チミジンキナーゼ、ハイグロマイシン耐性などが含まれる。

30

40

【0067】

特定の実施形態では、ヘパラナーゼを、一過性発現のための RNA として、細胞に導入する。RNA は、例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、および

50

脂質媒介型トランスフェクションを含めた様々な手段によって、開示の免疫細胞に送達することができる。特定の態様では、コンストラクトの細胞への導入は、トランスポゾンを通じて行うことができる。使用のための合成トランスポゾンの例は、ヘパラナーゼ遺伝子またはその活性断片を含めた発現カセットを含む、スリーピングビューティートランスポゾンである。

【0068】

いくつかの場合では、コンストラクトを特定の遺伝子座に組み込むことが所望される相同組換えのための標的部位を有しうる。例えば、相同組換えについて当業界で公知である材料および方法を使用して、内因性遺伝子をノックアウトし、コンストラクトによってコードされた遺伝子で置き換える（同じ遺伝子座または他の場所において）ことができる。相同組換えには、 λ -ベクターまたはO-ベクターを使用することができる。例えば、ThomasおよびCapecechi、1987；Mansourら、1988；ならびにJoynerら、1989を参照されたい。

10

【0069】

コンストラクトは、少なくとも、ヘパラナーゼと、任意選択で、別の遺伝子とをコードする、単一のDNA分子として導入することもでき、1つまたは複数の遺伝子を有する、異なるDNA分子として導入することもできる。各々が同じまたは異なるマーカを伴うコンストラクトを、同時に導入することもでき、逐次的に導入することもできる。例示の例では、1つのコンストラクトは、特定の調節配列の制御下にあるヘパラナーゼを含有する。

20

【0070】

コンストラクトDNAの原液を調製し、トランスフェクションを実行するのに使用される有用なエレメントであって、細菌または酵母による複製起点、選択および/または増幅マーカ、原核生物または真核生物における発現のためのプロモーター/エンハンサーエレメントなどのエレメントを含有するベクターは、当業界で周知であり、多くが市販されている。

【0071】

IV. 細胞の投与

ヘパラナーゼが発現されるように改変された（DNAコンストラクトを伴う細胞など）細胞は、選択条件下にある培養物中で成長させることができ、コンストラクトを有する細胞として選択された細胞は、その後、拡張し、例えば、宿主細胞内のコンストラクトの存在を決定するためのポリメラーゼ連鎖反応を使用して、さらに解析することができる。ひとたび、改変宿主細胞を同定したら、その後、計画した通りに使用することができる、例えば、培養物中で拡張することもでき、宿主生物に導入することもできる。

30

【0072】

細胞の性質により、細胞を、多種様々な方途により、宿主生物、例えば、哺乳動物に導入することができる。特定の実施形態では、細胞を、腫瘍部位に導入するが、代替の実施形態では、細胞は、がん細胞にホーミングするか、細胞を、がん細胞にホーミングするように改変する。利用される細胞の数は、多数の状況、導入の目的、細胞の寿命、使用されるプロトコル、例えば、投与回数、細胞の増殖能力、組換えコンストラクトの安定性などに依存するであろう。細胞は、対象の部位において、またはその近傍において一般に注射される、分散液として適用することができる。細胞は、生理学的に許容できる培地中の細胞でありうる。

40

【0073】

特定の実施形態では、投与経路は、例えば、静脈内経路、動脈内経路、腹腔内経路、または皮下経路でありうる。複数回投与は、同じ経路を介してもよく、異なる経路を介してもよい。

【0074】

当業界では、適切な用量レベルの決定が慣例的に実施されている。特定の実施形態では、形質導入されたT細胞に基づく、以下のレジメン：用量レベル1：1 m² 当たり 2 × 1

50

0⁷ 個、用量レベル 2 : 1 m² 当たり 1 × 10⁸ 個、用量レベル 3 : 1 m² 当たり 2 × 10⁸ 個を利用することができる。

【0075】

DNA の導入は、必ずしも全ての場合で組み込みをもたらす必要はない。状況によって、導入された DNA の一過性の維持で十分な場合もある。そのような場合、細胞が宿主に導入されて、所定時間後に、例えば細胞が特定の部位にホーミングできた後に機能できるようになるといった、短期的な効果を達成することができる。

【0076】

細胞は、所望される通りに投与することができる。所望される応答、投与の様式、細胞の寿命、存在する細胞の数により、様々なプロトコルを利用することができる。投与回数

10

【0077】

特定の場合には、複数の開示の免疫細胞を、がんを有する個体に送達する。特定の実施形態では、単回投与が必要とされる。他の実施形態では、細胞の複数回投与が必要とされる。例えば、操作された免疫細胞の初回投与の後で、例えば、がんの存在または非存在について、個体の検査を行うこともでき、腫瘍の数および/またはサイズの低減について個体の検査を行うこともできる。万一、がんが、初回投与後における腫瘍の成長など、さらなる処置に対する必要を示す場合は、追加の 1 回または複数回の同じ操作された免疫細胞（または、任意選択で、別の種類の免疫療法および/もしくは化学療法、外科手術および/もしくは放射線照射を含めた、別の種類のがん療法）の送達が個体に施される。いくつ

20

【0078】

系は、リガンドに対する細胞応答、発現の効率、および、必要に応じて、分泌レベル、発現産物の活性、時期および状況と共に変化する患者の特定の必要、細胞または個々の細胞の発現活性の喪失の結果としての細胞活性の喪失率などの変数下に置かれることを理解されたい。したがって、各個別の患者について、集団全体に投与されうる万能細胞があったとしても、各患者を個体に適正な投与量についてモニタリングすることが予測され、このような患者のモニタリングの実施は、当業界では慣例的である。

【0079】

30

V. 核酸ベースの発現系

本開示の態様では、ヘパラナーゼを発現する細胞であって、ヘパラナーゼの発現が、細胞内の組換え DNA から産生される細胞が提供される。ヘパラナーゼをコードする配列は、例えば、発現ベクターを含めたベクターによりすることができる。他の遺伝子産物（CAR および/または操作された T 細胞受容体および/またはエンゲージャー分子など）は、同じ発現ベクターから発現してもよく、ヘパラナーゼとは別個のベクターにより細胞内に存在してもよい。

【0080】

A. ベクター

「ベクター」という用語は、細胞に導入するために核酸配列をその中に挿入でき、細胞内で複製可能である担体核酸分子を指すのに用いられる。核酸配列は、「外因性」であってもよく、これは、その配列が、ベクターがその中に導入される細胞にとって外来のものであること、またはその配列が細胞内の配列に相同であるが、宿主細胞核酸中において、その配列が通常は存在しない位置にあることを意味する。ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス）、および人工染色体（例えば、YAC）が含まれる。当業者ならば、標準的な組換え技法でベクターを構築するのに十分な装備を備えている（例えば、Maniatis ら、1988、および Ausubel ら、1994 を参照。両文献を参照により本明細書に組み込む）。

40

【0081】

「発現ベクター」という用語は、転写可能な RNA をコードする核酸を含む、任意のタ

50

イブの遺伝子コンストラクトを指す。場合によっては、その後、RNA分子がタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。その他の場合、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの生成においては、これらの配列は翻訳されない。発現ベクターは、様々な「制御配列」を含有することができる。「制御配列」は、特定の宿主細胞における、動作可能に連結されたコード配列の転写、場合によって翻訳に必要な核酸配列を指す。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能を果たす、下に記載される核酸配列を含有することもできる。

【0082】

B. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、転写の開始および速度がそこで制御される核酸配列領域である制御配列である。「プロモーター」は、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子など、調節タンパク質および調節分子が、核酸配列の特異的な転写を開始するために結合しうる遺伝的要素を含有しうる。「動作可能に配置された」、「動作可能に連結された」、「制御下」、および「転写制御下」という句は、プロモーターが、核酸配列との関係において、その配列の転写開始および/または発現を制御するのに正しい機能的な位置および/または方向で存在することを意味する。

【0083】

プロモーターは、一般に、RNA合成の開始部位の位置を決めるのに機能する配列を含む。この最もよく知られている例がTATAボックスであるが、例えば、哺乳動物の末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターおよびSV40後期遺伝子のプロモーターなど、プロモーターの中にはTATAボックスをもたないものもあり、開始部位自体を覆う異なるエレメントが、開始箇所を定めるのを助ける。さらに別のプロモーターエレメントが、転写開始の頻度を調節する。典型的な場合、これらは開始部位の30~110bp上流の領域に位置している。ただし、開始部位の下流に機能エレメントを含有していることが示されているプロモーターもいくつもある。コード配列をプロモーターの「制御下」に置くには、転写リーディングフレームの転写開始部位の5'末端を、選択されたプロモーターの「下流」（すなわち、3'側）に配置する。「上流」のプロモーターが、DNAの転写を刺激し、コードされたRNAの発現を促進する。

【0084】

プロモーターエレメント間の間隔は、しばしば柔軟であり、そのため、エレメントが反転するか、お互いと比べて動いた場合でも、プロモーター機能が保存される。tkプロモーターでは、活性を低下させずに、プロモーターエレメント間の間隔を50bpまで広げることができる。プロモーターに応じて、個々のエレメントは、転写を活性化するために協力して機能することも、独立して機能することもできるようである。プロモーターは、「エンハンサー」と共に用いても、そうでなくともよい。「エンハンサー」は、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用の調節配列を指す。

【0085】

プロモーターは、コーディングセグメントおよび/またはエキソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得ることができる、核酸配列に天然に随伴しているものでもよい。そのようなプロモーターを「内因性」と呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、核酸配列に天然に随伴し、その配列の下流または上流のいずれかに位置するものでもよい。代わりに、コーディング核酸セグメントを、組換え体または異種のプロモーターの制御下に置くことによって、ある種の利点を得られるであろう。組換え体または異種のプロモーターとは、その天然の環境にある核酸配列には通常は随伴していないプロモーターを指す。組換え体または異種のエンハンサーも、その天然の環境にある核酸配列には通常は随伴していないエンハンサーを指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および任意の他のウイルスまたは原核もしくは真核細胞から単離されるプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在」しない、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメントおよび/または発現を改変する変異を含有するプロモーターまたはエンハンサーが含まれる。例えば、

組換えDNAの構築で最も一般的に用いられるプロモーターには、ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトース、およびトリプトファン（trp）プロモーター系が含まれる。プロモーターおよびエンハンサー核酸配列の合成による生成に加えて、本明細書に開示されている組成物に関して、PCR（商標）を含めた組換えクローニングおよび／または核酸増幅技術を用いて、配列を生成することができる（それぞれが参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,683,202号および第5,928,906号を参照）。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などの非核オルガネラ内の配列の転写および／または発現を指示する制御配列も利用できることが企図されている。

【0086】

当然ながら、発現用に選択されたオルガネラ、細胞型、組織、器官、または生物内でDNAセグメントの発現を効率的に指示するプロモーターおよび／またはエンハンサーを利用することが重要となる。分子生物学の当業者ならば、タンパク質発現用のプロモーター、エンハンサー、および細胞型の組合せの使用について一般的に知っている（例えば、参照により本明細書に組み込まれるSambrookら、1989参照）。利用するプロモーターは、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指示するのに適切な条件下で構成的なもの、組織特異的なもの、誘導可能なもの、ならびに／または、組換えタンパク質および／もしくはペプチドの大規模生成に有利なものなど、有用なものでありうる。プロモーターは、異種のもので、内因性のものでよい。特定の実施形態では、ヘパラナーゼの発現は、誘導的プロモーターまたは組織特異的プロモーターの制御下にある。組織特異的プロモーターは、当業界で公知であるが、特定の実施形態では、組織特異性を、がんが位置する組織に照らして調整する。組織特異的プロモーターまたは組織特異的エレメント、およびそれらの活性を特徴付けるアッセイは、低酸素状態誘導性プロモーターなど、当業者に周知である。

【0087】

さらに、発現を駆動させるために、あらゆるプロモーター／エンハンサーの組合せを使用することもできる。T3、T7、またはSP6の細胞質発現系の使用も、別の可能な実施形態である。真核細胞は、送達複合体の一部として、または追加の遺伝子発現コンストラクトとして適切な細菌ポリメラーゼが与えられれば、ある種の細菌プロモーターからの細胞質転写をサポートすることができる。

【0088】

コード配列の効率的な翻訳には、特異的な開始シグナルも必要でありうる。これらのシグナルには、ATG開始コドンまたは隣接の配列が含まれる。ATG開始コドンを含めた、外因性の翻訳制御シグナルの提供が必要でありうる。当業者ならば、この決定および必要なシグナルの提供を容易に行うことができるだろう。

【0089】

本開示のある特定の実施形態では、内部リボソーム進入部位（IRES）エレメントを用いて、多重遺伝子または多シストロン性メッセージが生成され、これらを、本開示で用いることができる。

【0090】

ベクターは、多重クローニング部位（MCS）を含むことができる。MCSは、複数の制限酵素部位を含有する核酸領域である。これらの制限酵素部位はいずれも、ベクターを消化する標準的な組換え技術と共に用いることができる。「制限酵素消化」は、核酸分子内の特定の位置のみで機能する酵素を用いて核酸分子を触媒により切断することを指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。そのような酵素の使用は、当業者によって広く理解されている。しばしば、ベクターは、外因性の配列をベクターにライゲートすることが可能となるように、MCS内で切断する制限酵素を用いて線形化または断片化される。「ライゲーション」は、相互に連続していても、いなくてもよい2つの核酸断片間でリン酸ジエステル結合を形成するプロセスを指す。制限酵素およびライゲーション反応を用いる技法は、組換え技術の当業者に周知である。

【0091】

スライシング部位、終結シグナル、複製起点、および選択マーカーも利用することができる。

【0092】

C．プラスミドベクター

ある特定の実施形態では、プラスミドベクターが、宿主細胞を形質転換するための使用に企図されている。一般に、宿主細胞と適合性の種に由来するレプリコンおよび制御配列を含有するプラスミドベクターがこれらの宿主と共に使用される。通常、ベクターは、複製部位と、形質転換細胞における表現型選択を提供できるマーキング配列とを有する。非限定的な例では、E.coliは、しばしば、E.coli種由来のプラスミドであるpBR322の誘導体を用いて形質転換される。pBR322は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含有しており、したがって、形質転換細胞を同定するための簡単な手段を提供する。pBRプラスミドまたは他の微生物プラスミドもしくはファージは、例えば、微生物がそれ自体のタンパク質の発現に用いることができるプロモーターも含有しているか、含有するように改変されていなければならない。

10

【0093】

加えて、宿主微生物と適合性であるレプリコンおよび制御配列を含有するファージベクターを、これらの宿主と共に形質転換ベクターとして用いることができる。例えば、組換えファージベクターを作製する際に、例えば、E.coli LE392などの宿主細胞を形質転換するのに使用できるラムダファージGEM(商標)11を利用することができる。

20

【0094】

さらなる有用なプラスミドベクターには、pINベクター(Inouyeら、1985)およびpGEXベクターが含まれる。pGEXベクターは、後の精製および分離または切断のために、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)可溶性融合タンパク質を生成するのに使用される。他の適した融合タンパク質は、ガラクトシダーゼやユビキチンなどとの融合タンパク質である。

【0095】

発現ベクターを含む細菌宿主細胞、例えば、E.coliは、いくつかの適した培地のいずれか、例えば、LB中で培養される。当業者には理解されるように、ある種のベクターにおける組換えタンパク質の発現は、宿主細胞を、ある種のプロモーターに特異的な薬剤と接触させることによって、例えば、IPTGを培地に添加するか、インキュベーション温度をより高温に切り換えることによって、誘導することができる。細菌をさらなる期間、通常は2~24時間培養した後、遠心分離によって細胞を収集し、洗浄して、残りの培地を除去する。

30

【0096】

D．ウイルスベクター

ある種のウイルスは、細胞を感染させるか、受容体媒介のエンドサイトーシスを介して細胞に進入し、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定的かつ効率的に発現する能力を有するので、そのようなウイルスは、外来の核酸を細胞(例えば、哺乳動物細胞)内に導入する魅力的な候補となっている。本開示の構成要素は、ヘパラナーゼをコードするウイルスベクターでありうる。本開示の核酸を送達するのに使用できるウイルスベクターの非限定な例を以下に記載する。

40

【0097】

1．アデノウイルスベクター

核酸の送達のための特定の方法は、アデノウイルス発現ベクターを使用するものである。アデノウイルスベクターは、ゲノムDNAに組み込まれる能力が低いことが知られているが、この特徴は、これらのベクターによってもたらされる遺伝子移入の効率が高いことで相殺される。「アデノウイルス発現ベクター」には、(a)コンストラクトのパッケージングをサポートし、(b)最終的に、その中にクローニングされた組織または細胞特異的なコンストラクトを発現するのに十分なアデノウイルス配列を含有するコンストラクト

50

が含まれると企図されている。アデノウイルス(36 kbの直鎖状二本鎖DNAウイルス)の遺伝学的構成に関する知識により、アデノウイルスDNAの大きな領域を7 kbまでの外来配列で置換することが可能である(GrunhausおよびHorwitz、1992)。

【0098】

2. AAVベクター

核酸は、アデノウイルス支援のトランスフェクションを用いて細胞内に導入できる。アデノウイルスを組み合わせた系を用いた細胞系でトランスフェクション効率の増大が報告されている(KelleherおよびVos、1994; Cottentr、1992; Curriel、1994)。アデノ随伴ウイルス(AAV)は、組み込まれる頻度が高く、かつ非分裂性の細胞を感染させることができ、それにより遺伝子を哺乳動物細胞に、例えば組織培養中(Muzyczka、1992)または*in vivo*で、送達するのに有用となっているので、本開示の細胞で使用するのに魅力的なベクター系である。AAVは、感染の宿主域が広い(Tratschinger、1984; Laughlinら、1986; Lebkowskiら、1988; McLaughlinら、1988)。rAAVベクターの生成および使用に関する詳細は、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,139,941号および第4,797,368号に記載されている。

10

【0099】

3. レトロウイルスベクター

レトロウイルスは、それらの遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、多量の外来遺伝物質を輸送し、広い範囲の種および細胞型を感染させ、特別な細胞株でパッケージングされる能力を有するため、送達ベクターとして有用である(Miller、1992。)

20

【0100】

ヘパラナーゼレトロウイルスベクターを構築するために、複製欠損であるウイルスを生成する特定のウイルス配列の箇所に核酸(例えば、ヘパラナーゼの部分またはすべてをコードするもの)をウイルスゲノムに挿入する。ビリオンを生成するために、gag、pol、およびenv遺伝子を含むがLTRおよびパッケージング構成要素が無いパッケージング細胞株を構築する(Mannら、1983)。レトロウイルスLTRおよびパッケージング配列と共に、cDNAを含む組換えプラスミドが、特別な細胞株に導入される(例えば、リン酸カルシウム沈殿によって)と、パッケージング配列によって、組換えプラスミドのRNA転写産物をウイルス粒子にパッケージングすることが可能になり、その後、ウイルス粒子が培養培地中に分泌される(NicolasおよびRubenstein、1988; Temin、1986; Mannら、1983)。次いで、組換え体レトロウイルスを含む培地を収集し、場合によっては濃縮し、遺伝子移入に用いる。レトロウイルスベクターは、多様な細胞型を感染させることができる。しかし、組み込みおよび安定した発現には、宿主細胞の分裂が必要である(Paskindら、1975)。

30

【0101】

レンチウイルスは、複雑なレトロウイルスであり、共通のレトロウイルス遺伝子であるgag、pol、およびenvに加えて、調節または構造的な機能を有する他の遺伝子も含有している。レンチウイルスベクターは、当業界で周知である(例えば、Naldiniら、1996; Zuffereyら、1997; Blomerら、1997年; 米国特許第6,013,516号および第5,994,136号を参照)。レンチウイルスのいくつかの例としては、ヒト免疫不全ウイルス: HIV-1、HIV-2、およびサル免疫不全ウイルス: SIVが挙げられる。レンチウイルスベクターは、HIV病原性遺伝子を多重弱毒化することによって生成された。例えば、遺伝子env、vif、vpr、vpu、およびnefが欠失しており、それにより、ベクターが生物学的に安全になっている。

40

【0102】

組換え体レンチウイルスベクターは、非分裂性細胞を感染させることができ、*in v*

50

*in vivo*および*ex vivo*の遺伝子移入ならびに核酸配列の発現の両方に用いることができる。例えば、適した宿主細胞が、パッケージング機能、すなわち、*gag*、*pol*、*env*、*rev*、および*tat*を有する2つ以上のベクターでトランスフェクトされる、非分裂性細胞を感染させることができる組換え体レンチウイルスが、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,994,136号に記載されている。エンベロープタンパク質を、特定の細胞型の受容体へとターゲティングする抗体または特定のリガンドと連結することによって、組換え体ウイルスをターゲティングすることができる。対象とする配列(調節領域を含む)を、特定の標的細胞上にある受容体のリガンドをコードする別の遺伝子と共にウイルスベクターに挿入することによって、例えば、ベクターが標的的特異的となる。

10

【0103】

4. 他のウイルスベクター

他のウイルスベクターも、本開示におけるワクチンコンストラクトとして利用できる。ワクチニアウイルス(*Ridgeway*, 1988; *Baichwal*および*Sugden*, 1986; *Coupar*ら, 1988)、シンドビスウイルス、サイトメガロウイルス、および単純ヘルペスウイルスなどのウイルス由来のベクターを利用することができる。これらは、様々な哺乳動物細胞用に魅力的な特徴をいくつかもっている(*Friedmann*, 1989; *Ridgeway*, 1988; *Baichwal*および*Sugden*, 1986; *Coupar*ら, 1988; *Horwich*ら, 1990)。

20

【0104】

E. 改変ウイルスを用いる送達

送達する核酸を、特異的な結合リガンドを発現するように遺伝子操作された感染性のウイルス中に収容することができる。したがって、ウイルス粒子は、標的細胞の同族受容体に特異的に結合し、内容物を細胞に送達することになる。ウイルスエンベロープにラクトース残基を化学的に付加することによるレトロウイルスの化学修飾に基づいて、レトロウイルスベクターの特異的なターゲティングを可能にするように設計された新規なアプローチが開発された。この修飾は、シアロ糖タンパク質受容体を介した肝細胞の特異的な感染を可能にすることができる。

【0105】

レトロウイルスエンベロープタンパク質および特定の細胞受容体に対するビオチン化抗体が用いられる、組換え体レトロウイルスをターゲティングする別のアプローチが設計された。抗体は、ストレプトアビジンを用いることにより、ビオチン構成要素を介して結合させた(*Roux*ら, 1989)。Rouxらは、主要組織適合複合体クラスIおよびクラスII抗原に対する抗体を用いて、それらの表面抗原を有する様々なヒト細胞の、エコトロピックウイルスによる感染を*in vitro*で実証した(*Roux*ら, 1989)。

30

【0106】

F. ベクター送達と細胞形質転換

細胞をトランスフェクトまたは形質転換するための核酸送達のための適した方法は、当業者に公知である。そのような方法には、DNAの*ex vivo*でのトランスフェクションや注入などによる直接的送達が含まれるが、これらに限定されない。当業界で公知の技法の適用によって、細胞を安定的にまたは一過性に形質転換することができる。

40

【0107】

G. *Ex vivo*形質転換

*ex vivo*セッティングにおいて、生物から摘出された真核細胞および組織にトランスフェクトするための方法は、当業者に公知である。したがって、細胞または組織を摘出し、ヘパラナーゼまたは本開示の他の核酸を使用して、*ex vivo*においてトランスフェクトしうることが企図されている。特定の態様では、移植細胞または組織が生物内に入れられる。好ましい様相では、核酸が移植細胞内で発現される。

【0108】

50

V I . キット

本明細書に記載の組成物は、いずれもキットに含めることができる。非限定的な例では、組換え発現されたヘパラーゼを有する、細胞療法における使用のための、1つもしくは複数の細胞、および/または組換え発現されたヘパラーゼを有する、細胞療法における使用のための、1つもしくは複数の細胞を生成する試薬を、キットに含めることができる。キットの構成要素は、適した容器手段で提供される。特定の実施形態では、キットは、ベクター、プライマー、酵素（制限酵素、リガーゼ、ポリメラーゼなど）、緩衝液、ヌクレオチドなどの組換え操作試薬を含む。

【0109】

キットのいくつかの構成要素は、水性媒体に入れるか、凍結乾燥形態でパッケージングすることができる。キットの容器手段には、通常、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または他の容器手段が含まれることになり、その中に、構成要素を入れる、好ましくは、適切にアlicoートに分けることができる。キット内に複数の構成要素がある場合、キットは、通常、第2、第3、または他の追加の容器を含有することになり、その中に追加の構成要素を個別に入れることができる。しかし、構成要素の様々な組合せを1つのバイアルに含めることもできる。本開示のキットは、典型的には、販売用に構成要素をしっかりと封じ込めるための手段も含むことになる。そのような容器には、その中に所望のバイアルが保持される射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器が含まれることになる。

【0110】

キットの構成要素を1種および/または2種以上の液体溶液中で提供する場合、液体溶液は水溶液であり、無菌水溶液が特に有用である。場合によっては、容器手段が、それ自体、シリンジ、ピペット、および/または装置などの他のものであってもよく、そこから、製剤を身体の感染領域に適用すること、動物に注射すること、ならびに/またはキットの他の構成要素にさえ適用し、かつ/もしくはこれと混合することができる。

【0111】

しかし、キットの構成要素は、乾燥粉末として提供することができる。試薬および/または構成要素を乾燥粉末として提供する場合、この粉末を、適した溶媒の添加によって再構成することができる。溶媒を別の容器手段に入れて提供できることが企図されている。キットは、無菌の薬学的に許容できるバッファーおよび/または他の希釈剤を含有するための第2の容器手段を含むことができる。

【0112】

本開示の特定の実施形態では、細胞療法に用いられる細胞をキットに入れて提供し、場合によっては、細胞がキットの本質的に唯一の構成要素となる。キットは、代わりにまたは加えて、ヘパラーゼのために細胞を組換えとする試薬および材料を含みうる。特定の実施形態では、試薬および材料には、ヘパラーゼを増幅するためのプライマー、ヌクレオチド、適したバッファー、バッファー試薬、塩などが含まれ、場合によっては、試薬には、ヘパラーゼをコードするベクターおよび/もしくはDNAならびに/またはそのための調節エレメントが含まれる。

【0113】

特定の実施形態では、キット内に、個体から1つまたは複数の試料を抽出するのに適した1つまたは複数の装置がある。この装置は、シリンジ、メスなどであってもよい。

【0114】

本開示のいくつかの場合に、キットには、細胞療法の実施形態に加えて、例えば、化学療法、ホルモン療法、および/または免疫療法など、二次がん療法も含まれる。キットは、個体の特定のがんに照らして調整することができ、個体のためのそれぞれの二次がん療法を含みうる。

【0115】

本開示のいくつかの場合に、キット内の細胞は、ヘパラーゼ以外の治療用分子が発現されるように改変することができる。他の治療用分子は、任意の種類でありうるが、特定

10

20

30

40

50

の実施形態では、治療用分子は、例えば、キメラ抗原受容体である。

【0116】

場合によっては、キットが、細胞療法実施形態に加えて、例えば、化学療法、ホルモン療法、および/または免疫療法など、第2のがん療法も含む。キットは、個体用に特定のがんに適合させ、個体用のそれぞれの第2のがん療法を含むようにできる。

【0117】

VII. 併用療法

本開示のある特定の実施形態では、臨床態様のための本開示の方法が、(がん療法とも称しうる)抗がん剤など、過増殖疾患の処置に有効な他の薬剤と併用される。例えば、「抗がん」剤は、がん細胞を殺滅する、がん細胞のアポトーシスを誘導する、がん細胞の成長速度を低減させる、転移の発生率または数を低減させる、腫瘍の大きさを低減させる、腫瘍成長を抑制する、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給を低減させる、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答を促進する、がんの進行を防止もしくは抑制する、またはがんを有する対象の寿命を延長することによって、対象体内のがんに負の影響を与えることができる。より一般的には、これらの他の組成物は、細胞を殺滅するか、その増殖を抑制するのに有効な総量で提供することになる。このプロセスは、がん細胞を、発現コンストラクトおよび薬剤または複数の因子と同時に接触させることを含みうる。これは、細胞を、両方の薬剤を含む1つの組成物または薬理的製剤と接触させることによって、または細胞を、一方の組成物が発現コンストラクトを含み、他方が第2の薬剤を含む2つの異なる組成物もしくは製剤と同時に接触させることによって達成できる。

【0118】

化学療法および放射線療法薬剤に対する腫瘍細胞の耐性は、臨床腫瘍学における重大な問題となっている。現在のがん研究の1つの目標は、化学療法および放射線療法の有効性を、それを遺伝子療法と併用することによって改善する方法を見出すことである。例えば、レトロウイルスベクター系によって脳腫瘍に送達される場合の、単純ヘルペス-チミジンキナーゼ(HS-tK)遺伝子は、抗ウイルス剤ガンシクロビルに対する感受性を誘導することに成功した(Culverら、1992)。本開示の文脈では、細胞療法は、他のアポトーシス促進剤または細胞周期調節剤に加えて、化学療法的介入、放射線療法的介入、または免疫療法的介入と共に、同様に使用しうることが企図されている。

【0119】

代わりに、本発明の療法は、他方の薬剤処置と数分間から何週間かの間隔を置いて、その前にまたはその後に行うことができる。他方の薬剤と本開示が個体に別々に適用される実施形態では、一般に、各送達時の間で有意な期間が期限切れにならないことを確実にして、それにより、薬剤療法および本発明の療法が細胞に対してなお有利な併用効果を及ぼすことができるようにすることになる。そのような場合、細胞を、両方の様式と、相互に約12~24時間の内、より好ましくは、相互に約6~12時間の内に接触させることができることが企図されている。しかし、状況によっては、処置の期間をかなり延長し、それぞれの投与の間で数日(2、3、4、5、6、または7)から数週間(1、2、3、4、5、6、7、または8)が経過することが望ましい可能性がある。

【0120】

次のような様々な組合せを利用することができる。ここで、本開示は「A」であり、放射線療法または化学療法など、第2の薬剤は「B」である。

【0121】

A / B / A	B / A / B	B / B / A	A / A / B	A / B /
B	B / A / A	A / B / B / B	B / A / B / B	

【0122】

B / B / B / A	B / B / A / B	A / A / B / B
A / B / A / B	A / B / B / A	B / B / A / A

【0123】

B / A / B / A	B / A / A / B	A / A / A / B
---------------	---------------	---------------

B / A / A / A

A / B / A / A

A / A / B / A

【 0 1 2 4 】

必要に応じて処置サイクルを反復することが予期されている。様々な標準的療法および外科的介入を本発明の細胞療法と組み合わせて適用できることも企図されている。

【 0 1 2 5 】

A . 化学療法

がん療法には、化学的処置および放射線照射ベースの処置の両方の様々な併用療法も含まれる。組合せ抗がん剤には、例えば、アシピシン；アクラルピシン；アコダゾール塩酸塩；アクロニン；アドゼレシン；アデルスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン；アメタントロン酢酸塩；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマスタット；ベンゾデパ；ピカルタミド；ピサントレン塩酸塩；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；ブレオマイシン硫酸塩；ブレキナルナトリウム；プロピリミン；プスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルムスチン；カルピシン塩酸塩；カルゼレシン；セデフィンゴール；セレコキシブ（COX-2阻害剤）；クロランブシル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリピン；メシル酸クリスナトール；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダウノルピシン塩酸塩；デシタビン；デキソルマブラチン；デザグアニン；メシル酸デザグアニン；ジアジコン；ドセタキセル；ドキソルピシン；ドキソルピシン塩酸塩；ドロロキシフェン；ドロロキシフェンクエン酸塩；プロピオン酸ドロスタノロン；ズアゾマイシン；エダトレキサート；エフロルニチン塩酸塩；エルサミトルシン；エンロプラチン；エンプロメート；エピプロピジン；エピルピシン塩酸塩；エルブルゾール；エソルピシン塩酸塩；エストラムスチン；エストラムスチンリン酸エステルナトリウム；エタニダゾール；エトボシド；エトボシドリル酸塩；エトプリン；ファドロゾール塩酸塩；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウリジン；フルダラビンリン酸エステル；フルオロウラシル；フルオロシタビン；フォスキドン；フォストリエシンナトリウム；ゲムシタビン；ゲムシタビン塩酸塩；ヒドロキシ尿素；イダルピシン塩酸塩；イホスファミド；イルモフォシン；イプロプラチン；イリノテカン；イリノテカン塩酸塩；ランレオチド酢酸塩；レトロゾール；ロイプロリド酢酸塩；リアロゾール塩酸塩；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；ロソキサントロン塩酸塩；マソプロコール；メイタンシン；メクロレタミン塩酸塩；メゲストロール酢酸塩；メレンゲストロール酢酸エステル；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メトプリン；メツレデパ；ミチンドミド；マイトカルシン；マイトクロミン；マイトギリン；マイトマルシン；マイトマイシン；マイトスペル；ミトタン；ミトキサントロン塩酸塩；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマブラチン；オキシスラン；バクリタキセル；ペガスパルガーゼ；ペリオマイシン；ペントムスチン；ペプロマイシン硫酸塩；ペルホスファミド；ピボプロマン；ピボスルファン；ピロキサントロン塩酸塩；プリカマイシン；プロメスタン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；ブレドニムスチン；プロカルバジン塩酸塩；ピューロマイシン；ピューロマイシン塩酸塩；ピラゾフリン；リボプリン；サフィンゴール；サフィンゴール塩酸塩；セムスチン；シムトラゼン；スパルホセートナトリウム；スパルソマイシン；スピログエルマニウム塩酸塩；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；スロフェヌル；タリソマイシン；テコガラナトリウム；タキソテール；テガフル；テロキサントロン塩酸塩；テモボルフィン；テニボシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チアゾフリン；チラバザミン；トレミフェンクエン酸塩；酢酸トレストロン；リン酸トリシリピン；トリメトレキサート；グルクロン酸トリメトレキサート；トリプトレリン；ツプロゾール塩酸塩；ウラシルマスタード；ウレデパ；バブレオチド；ベルテボルフィン；ビンブラスチン硫酸塩；ビンクリスチン硫酸塩；ビンデシン；ビンデシン硫酸塩；ピネピジン硫酸塩；硫酸ビングリシネート；硫酸ビンレウロシン；ビノレルピン酒石酸塩；硫酸ビンロシジン；ビンゾリジン硫酸塩；ボロゾール；ゼニプラチン；ジノスタチ

10

20

30

40

50

ン；ゾルピシン塩酸塩；20-epi-1,25ジヒドロキシビタミンD₃；5-エチニルウラシル；アピラテロン；アクラルピシン；アシルフルベン；アデシペノール；アドゼレシン；アデルスロイキン；ALL-TKアンタゴニスト；アルトレタミン；アンバムスチン；アミドックス；アミホスチン；アミノレプリン酸；アムルピシン；アムサクリン；アナグレリド；アナストロゾール；アンドログラホリド；血管新生阻害剤；アンタゴニストD；アンタゴニストG；アントラレリックス；反dorsalizing形成タンパク質1(anti-dorsalizing morphogenetic protein 1)；前立腺癌用の抗アンドロゲン；抗エストロゲン；抗ネオプラストン；アンチセンスオリゴヌクレオチド；アフィジコリングリシネート；アポトーシス遺伝子調整剤；アポトーシス調節剤；アプリン酸；ara-CDP-DL-PTBA；アルギニンデアミナーゼ；アスラクリン；アタメスタン；アトリムスチン；アキシナスタチン1；アキシナスタチン2；アキシナスタチン3；アザセトロン；アザトキシン；アザチロシン；バックチンIII誘導体；バラノール；パチマスタット；BCR/ABLアンタゴニスト；ベンゾクロリン；ベンゾイルスタウロスポリン；ベータラクタム誘導体；ベータ-アレチン；ベータクラマイシンB；ベツリン酸；bFGF阻害剤；ビカルタミド；ビスアントレン；ビスジリジニルスペルミン；ビスナフィド；ビストラトレンA；ビゼレシン；ブレフレート；プロピリミン；ブドチタン；ブチオニンスルホキシミン；カルシボトリオール；カルホスチンC；カンプトテシン誘導体；カペシタビン；カルボキサミド-アミノ-トリアゾール；カルボキサミドトリアゾール；CaRest M3；CARN 700；軟骨由来阻害剤；カルゼレシン；カゼインキナーゼ阻害剤(ICOS)；カスタノスペルミン；セクロピンB；セトロレリックス；クロリン；クロロキノキサリンスルホンアミド；シカプロスト；cis-ポルフィリン；クラドリピン；クロミフェン類似体；クロトリマゾール；コリスマイシンA；コリスマイシンB；コンプレタスタチンA4；コンプレタスタチン類似体；コナゲニン；クランベシジン816；クリスナトール；クリプトフィシン8；クリプトフィシンA誘導体；クラシンA；シクロペントアントラキノ；シクロプラタム；シペマイシン；シタラビンオクホスフェート；細胞溶解因子；サイトスタチン；ダクリキシマブ；デシタビン；デヒドロジデミンB；デスロレリン；デキサメタゾン；デキシホスファミド；デクスラゾキサ；デクスベラパミル；ジアジコン；ジデミンB；ジドックス；ジエチルノルスペルミン；ジヒドロ-5-アザシチジン；9-ジヒドロタキソール；ジオキサマイシン；ジフェニルスピロムスチン；ドセタキセル；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン；ドキソルピシン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカルマイシンSA；エブセレン；エコムスチン；エデルフォシン；エドレコロマブ；エフロルニチン；エレメン；エミテフル；エビルピシン；エプリステリド；エストラムスチン類似体；エストロゲンアゴニスト；エストロゲンアンタゴニスト；エタニダゾール；エトボシドリン酸塩；エキセメスタン；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム；フィナステリド；フラボピリドール；フレゼラスチン；フルアステロン；フルダラビン；フルオロダウノルピシン塩酸塩；フォルフェニメックス；ホルメスタン；フォストリエシン；ホテムスチン；ガドリニウムテクサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタビン；ガニレリックス；ゼラチナーゼ阻害剤；ゲムシタビン；グルタチオン阻害剤；ヘプスルファム；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ヒペリシン；イバンドロン酸；イダルピシン；イドキシフェン；イドラマントン；イルモフォシン；イロマスタット；イマチニブ(例えば、GLEEVEC(登録商標))、イミキモド；免疫刺激ペプチド；インスリン様成長因子1受容体阻害剤；インターフェロンアゴニスト；インターフェロン；インターロイキン；イオベングアン；ヨードドキソルピシン；4-イボメアノール；イロブラクト；イルソグラジン；イソベンガゾール；イソホモハリコンドリリンB；イタセトロン；ジャスプラキノリド；カハラリドF；ラメラリンNトリアセテート；ランレオチド；レイナマイシン；レノグラスチム；レンチナン硫酸塩；レプトルスタチン；レトロゾール；白血病阻害性因子；白血球アルファインターフェロン；ロイボロリド+エストロゲン+プロゲステロン；リュープロレリン；レバミソール；リアロゾール；直鎖状ポリアミン類似体；親油性二糖ペプチド；親油性白金化合物；リソクリナミド7；ロバブラチン；ロ

ンブリシン；ロメトレキソール；ロニダミン；ロソキサントロン；ロキソリピン；ルルト
 テカン；ルテチウムテキサフィリン；リソフィリン；溶解性ペプチド；メイタンシン；マ
 ノノスタチンA；マリマスタット；マソプロコール；マスピン；マトリリシン阻害剤；マ
 トリックスメタロプロテインナーゼ阻害剤；メノガリル；メルパロン；メテレリン；メチオ
 ニナーゼ；メトクロブラミド；M I F 阻害剤；ミフェプリストン；ミルテホシン；ミリモ
 スチム；ミトグアゾン；ミトラクトール；マイトマイシン類似体；ミトナフィド；マイト
 トキシンである線維芽細胞成長因子 - サボリン；ミトキサントロン；モファロテン；モル
 グラモスチム；ヒト絨毛性ゴナドトロピンである E r b i t u x ；モノホスホリルリビド
 A + ミオパクテリウム細胞壁 s k ；モピダモール；マスタード系抗がん剤；ミカペロキシ
 ドB；マイコパクテリア細胞壁抽出物；ミリアボロン；N - アセチルジナリン；N 置換ベ
 ンザミド；ナファレリン；ナグレスチップ；ナロキソン + ペンタゾシン；ナパビン；ナフ
 テルピン；ナルトグラスチム；ネダブラチン；ネモルピシン；ネリドロロン酸；ニルタミド
 ；ニサマイシン；一酸化窒素調整剤；窒素酸化物による抗酸化剤；ニトルリン；オビメル
 セン（G E N A S E N S E（登録商標））；O⁶ - ベンジルグアニン；オクトレオチド；
 オキセノン；オリゴヌクレオチド；オナプリストン；オンダンセトロン；オンダンセトロ
 ン；オラシン；経口サイトカイン誘導剤；オルマブラチン；オサステロン；オキサリプラ
 チン；オキサウノマイシン；パクリタキセル；パクリタキセル類似体；パクリタキセル誘
 導体；パラウアミン；パルミトイルリゾキシシン；パミドロロン酸；パナキシトリオール；パ
 ノミフェン；パラバクチン；パゼリブチン；ペガスバルガーゼ；ペルデシン；ポリ硫酸ペ
 ントサンナトリウム；ペントスタチン；ペントロゾール；ペルフルブロン；ペルホスファ
 ミド；ペリリルアルコール；フェナジノマイシン；酢酸フェニル；ホスファターゼ阻害剤
 ；ピシバニール；ピロカルピン塩酸塩；ピラルピシン；ピリトレキシム；プラセチンA；
 プラセチンB；プラスミノーゲン活性化因子阻害剤；白金複合体；白金化合物；白金 - ト
 リアミン複合体；ボルフィマーナトリウム；ボルフィロマイシン；ブレドニゾン；プロピ
 ルビス - アクリドン；プロスタグランジン J 2 ；プロテアソーム阻害剤；プロテインAベ
 ースの免疫調節剤；プロテインキナーゼC 阻害剤；小型藻類のプロテインキナーゼC 阻害
 剤；プロテインチロシンホスファターゼ阻害剤；プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害
 剤；プルプリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン
 コンジュゲート；r a f アンタゴニスト；ラルチトレキシド；ラモセトロン；r a s ファ
 ルネシルプロテイントランスフェラーゼ阻害剤；r a s 阻害剤；r a s - G A P 阻害剤；
 脱メチル化レテリブチン；レニウム R e 1 8 6 エチドロネート；リゾキシシン；リボザイム
 ；R I I レチナミド；ロヒツキン；ロムルチド；ロキニメックス；ルビジノンB 1 ；ルボ
 キシル；サフィンゴール；サイントピン；S a r C N U ；サルコフィトールA；サルグラ
 モスチム；S d i 1 模倣体；セムスチン；老齢由来阻害剤 1 ；センスオリゴヌ

10

20

30

クレオチド；シグナル伝達阻害剤；シゾフラン；ソブゾキサン；ボロカブテートナトリウ
 ム；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール；ソマトメジン結合性タンパク質；ソネルミ
 ン；スパルホス酸；スピカマイシンD；スピロムスチン；スプレノペンチン；スポンギス
 タチン1；スクアラミン；スチピアミド；ストロメリシン阻害剤；スルフィノシン；過活
 動血管作動性腸管ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ；スラミン；スワインソニン；タ
 リムスチン；タモキシフェンメチオジド；タウロムスチン；タザロテン；テコガラナト
 リウム；テガフル；テルラピリリウム；テロメラゼ阻害剤；テモボルフィン；テニボ
 シド；テトラクロロデカオキシド；テトラゾミン；タリブラスチン；チロコラリン；トロ
 ンボボエチン；トロンボボエチン模倣体；チマルファシン；チモボエチン受容体アゴニス
 ト；チモトリナン；甲状腺刺激性ホルモン；エチルエチオプルプリンすず；チラパザミン
 ；チタノセンジクロリド；トプセンチン；トレミフェン；翻訳阻害剤；トレチノイン；ト
 リアセチルウリジン；トリシリピン；トリメトレキサート；トリプトレリン；トロピセト
 ロン；ツロステリド；チロシンキナーゼ阻害剤；チルホスチン；U B C 阻害剤；ウベニメ
 クス；尿生殖洞由来成長阻害因子；ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト；バブレオチド；

40

50

バリオリン B ; ベラレソール ; ベラミン ; ベルジン ; ベルテボルフィン ; ビノレルビン ; ピンキサルチン ; ピタキシン ; ポロゾール ; ザノテロン ; ゼニプラチン ; ジラスコルブ ; およびジノスタチンスチマラマー、または以上の任意の類似体バリエーションもしくは誘導体バリエーションが含まれる。特定の実施形態では、化学療法は、本開示と共に、例えば、開示の投与前、投与中、および/または投与後に利用する。例示の化学療法剤には、少なくとも、ダカルバジン (DTICとも称する)、テモゾリミド、パクリタキセル、シスプラチン、カルムスチン、ホテムスチン、ビンデシン、ビンクリスチン、またはブレオマイシンが含まれる。

【0126】

B . 放射線療法

DNA 損傷を引き起こし、かつ広く利用されている他の因子には、線、X 線および/または腫瘍細胞への放射性同位元素の指向的送達として一般に知られているものが含まれる。マイクロ波およびUV照射などの他の形態のDNA 損傷因子も企図されている。これらの因子すべてが、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の集合および維持に広範な損傷をもたらす可能性がきわめて高い。X 線の線量範囲は、長期間 (3 ~ 4 週間) にわたる場合の50 ~ 200レントゲンの1日線量から、2000 ~ 6000レントゲンの単回線量までである。放射性同位元素の投与量範囲は、広範に様々であってもよく、同位元素の半減期、照射される放射線の強度およびタイプ、ならびに新生細胞による取り込みによって左右される。

【0127】

細胞に用いられる場合、「接触」および「曝露」という用語は、本明細書では、治療用コンストラクトおよび化学療法剤または放射線療法剤を標的細胞に送達するか、標的細胞の直近に置くプロセスを述べるのに使用される。細胞の殺滅または分裂停止を行うため、細胞を殺滅するか、細胞が分裂するのを妨げるのに有効な総量で両薬剤を細胞に送達する。

【0128】

C . 免疫療法

免疫療法薬は、一般に、免疫エフェクター細胞および分子の使用に依存して、がん細胞を標的にし、破壊する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面のなんらかのマーカに特異的な抗体でありうる。抗体だけで、治療のエフェクターとして働いても、細胞殺滅を実際に行うのに他の細胞を動員してもよい。抗体は、薬物または毒素 (化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など) とコンジュゲートさせてもよく、ターゲティング剤として働く。代わりに、エフェクターは、直接的または間接的に腫瘍細胞標的と相互作用する表面分子を有するリンパ球でもよい。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が含まれる。

【0129】

したがって、免疫療法を、本開示の細胞療法との併用療法の一部として用いることもあり得る。併用療法の一般的なアプローチについて以下に論じる。一般に、腫瘍細胞には、標的にすることができる、すなわち、大部分の他の細胞には存在しないなんらかのマーカがあるはずである。多くの腫瘍マーカが存在しており、これらのいずれも、本開示の関係において、ターゲティングに適したものでありうる。一般的な腫瘍マーカには、癌胎児性抗原、前立腺特異抗原、尿中腫瘍関連抗原、胎児性抗原、チロシナーゼ (p 97)、gp 68、TAG - 72、HMGF、シリアルルイス抗原、Muc A、Muc B、PLAP、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、erb B、およびp 155などが含まれる。

【0130】

免疫療法には、例えば、インターロイキン2 (IL - 2) またはインターフェロン (IFN) が含まれうる。ある特定の実施形態では、免疫療法は、Notch経路のリガンドまたは受容体に対する抗体、例えば、DLL4、Notch 1、Notch 2 / 3、Fzd 7、またはWntに対する抗体である。ある特定の他の実施形態では、免疫療法は、r

10

20

30

40

50

- spondin (RSP O) 1、RSP O 2、RSP O 3、またはRSP O 4 に対する抗体である。

【0131】

D．遺伝子

さらに別の実施形態では、第2の処置が、治療用ポリヌクレオチドが本開示の臨床実施形態の前もしくは後、またはそれと同時に投与される遺伝子療法である。細胞増殖の誘導因子、細胞増殖の抑制因子、またはプログラム細胞死の調節因子を含めた様々な発現産物が、本開示に包含される。

【0132】

E．外科手術

がんを有するヒトの60%が、予防、診断、病期分類、根治、および緩和のための手術を含めたなんらかのタイプの手術を行うことになる。根治手術は、本開示の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、および/または代替療法など、他の療法とともに施用されうるがん治療である。

【0133】

根治手術には、がん組織の全体または一部を物理的に摘出、切除、および/または破壊する切除術が含まれる。腫瘍切除術は、少なくとも腫瘍の一部の物理的な摘出を指す。腫瘍切除術に加えて、外科手術による処置には、レーザー外科療法、低温外科手術、電気外科手術、および顕微鏡下手術（モース手術）が含まれる。本開示は、表在がん、前がん病変、または付帯的な量の正常組織の摘出とともに使用できることがさらに企図されている。

【0134】

がん細胞、組織、または腫瘍の全部または一部の切除に際し、体内に空洞が形成される。さらなる抗がん療法の灌流、直接注射、または当該領域への局所適用によって、処置を達成させてもよい。そのような処置は、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日毎に、または1週、2週、3週、4週、および5週毎に、または1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、もしくは12カ月毎に、反復することができる。これらの処置は、投薬量が可変的なものでもよい。

【0135】

F．他の薬剤

処置の治療有効性を向上させるために、本開示と組み合わせて、他の薬剤を用いてもよいことが企図されている。これらの追加薬剤には、免疫調節剤、細胞表面受容体およびギャップ結合の上方制御に作用する薬剤、細胞分裂停止および分化薬剤、細胞接着の阻害剤、またはアポトーシス誘導因子に対する過増殖細胞の感受性を増強する薬剤が含まれる。免疫調節剤には、腫瘍壊死因子；インターフェロン、および；IL-2および他のサイトカイン；F42Kおよび他のサイトカイン類似体；MIP-1、MIP-1、MCP-1、RANTES、および他のケモカインが含まれる。Fas/Fasリガンド、DR4もしくはDR5/TRAILなど、細胞表面受容体またはそのリガンドの上方制御は、過増殖細胞に対するオートクリンまたはパラクリン作用を確立することによって、本開示のアポトーシス誘導能を強化するであろうことがさらに企図されている。ギャップ結合の数の増大によって、細胞間シグナル伝達が増大すれば、近傍の過剰増殖性細胞集団に対する抗過剰増殖性効果が増大するであろう。他の実施形態では、処置の抗過剰増殖有効性を向上させるために、本開示と組み合わせて、細胞分裂停止または分化薬剤を用いることができる。細胞接着の阻害剤は、本開示の有効性を向上させることが企図されている。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ（FAK）阻害剤およびロバスタチンである。処置の有効性を向上させるために、抗体c225など、アポトーシスに対する過増殖細胞の感受性を増強する他の薬剤を、本開示と組み合わせて使用できるであろうことがさらに企図されている。

【実施例】

【0136】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証する目的で含める。当業者ならば、後続の実施例で開示される技法が、本発明者によって本発明の実施においてよく機能することが発見された技法を表し、したがって、その実施のための好ましい方式を構成すると考えられうることを理解するであろう。しかし、当業者ならば、本開示に照らして、開示される特定の実施形態において、多くの変化を施し、本発明の趣旨および範囲から逸脱せずに、やはり同じ結果または同様の結果を得うることも理解するであろう。

【0137】

実施例 1

腫瘍特異的 T 細胞内で回復されたヘパラーゼの発現は、神経芽細胞腫モデルにおけるそれらの抗腫瘍効果を強化する

養子 T 細胞ベースの療法は、リンパ腫および他の血液悪性腫瘍を有する患者において有望な結果を示してきたが、固形腫瘍ではそれほど有効でないと考えられている。具体的に、神経芽細胞腫 (NB) における近年の臨床試験が、軽度のバルク疾患を有する患者に限り、CAR 改変 T 細胞による抗腫瘍有効性を示したことから、*ex vivo* において拡張されたエフェクター T 細胞の、固形腫瘍の細胞外マトリックス (ECM) に浸透し、この中を移動する能力は、限定的であることが示唆される。

【0138】

活性化 T 細胞およびエフェクター T 細胞の ECM 内の移動を調節する機構は、それほど探索されていないが、本発明者らは、循環 T 細胞と異なり、*ex vivo* で拡張された T 細胞は、内皮下基底膜 (BM) および ECM を構成する、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の分解に関与する重要な酵素である、ヘパラーゼ (HPSE) を発現しないことを見出した。この酵素活性の欠如が、*ex vivo* で拡張された T 細胞 ($8\% \pm 6\%$) の、休眠 T 細胞 ($23\% \pm 8\%$) または活性化されて短時間の T 細胞 ($34\% \pm 8\%$) と比較して有意に ($p = 0.01$) 損なわれた浸潤能力と並行したことは重要である。したがって、本発明者らは、レトロウイルス遺伝子改変による、*ex vivo* において培養された抗原特異的 T 細胞内の HPSE の回復が、それらの浸潤特性をレスキューし、抗腫瘍活性の改善をもたらすのかどうかを評価した。HPSE および GD2 特異的 CAR (CAR) を T 細胞内で共発現して、NB を標的化したところ、CAR (I) HPSE + T 細胞は、CAR + T 細胞と同等な表現型特徴および抗腫瘍活性を保持したが、CAR + T 細胞 ($13\% \pm 9\%$; $p < 0.001$) と比較して、ECM に浸潤する優れた能力を獲得した ($66\% \pm 1\%$)。ECM の存在下において、NB 腫瘍細胞を伴う共培養実験を実施した場合に、CAR (I) HPSE + T 細胞の *in vitro* における抗腫瘍活性が、CAR + T 細胞と比較して改善された (残留腫瘍細胞: 対照 T 細胞、CAR + T 細胞、および CAR (I) HPSE + T 細胞について、それぞれ、 $68\% \pm 3\%$ 、 $52\% \pm 9\%$ および $19\% \pm 1\%$) ($p = 0.0001$: 対照対 CAR (I) HPSE および $p = 0.017$: CAR 対 CAR (I) HPSE) ことは重要である。異種移植片神経芽細胞腫マウスモデルにおいて、抗腫瘍活性を比較したところ、CAR (I) HPSE + T 細胞で処置されたマウスは、対照 T 細胞 ($p < 0.001$) または CAR + T 細胞 ($p < 0.007$) で処置されたマウスと比較して、40 日目までの生存が有意に改善された。加えて、CAR (I) HPSE + T 細胞を注入されたマウスの 47% は、CAR + T 細胞を注入されたマウスの 28% と比較して、40 日目まで腫瘍はなかった。CAR (I) HPSE + T 細胞 ($4.6\% \pm 2.4\%$) で処置されたマウスは、対照 T 細胞 ($0.6\% \pm 0.5$; $p = 0.029$) または CAR + T 細胞 ($0.1\% \pm 0.1$; $p = 0.043$) で処置されたマウスから回収された腫瘍と比較して、T 細胞による腫瘍へのより大きな浸潤を示した。結論として、抗原特異的 T リンパ球内で回復された HPSE の発現は、固形腫瘍の T 細胞による免疫療法に有意な影響を及ぼす。

【0139】

実施例 2

腫瘍特異的 T リンパ球内の、欠損したヘパラーゼの発現の回復は、それらの抗腫瘍効果

を強化する

拡張されたT細胞は、HPSEの欠如により、ECMを分解する能力が損なわれている。ex vivoで拡張されたT細胞は、ECMを分解するそれらの能力が欠損しているのかどうかをまず評価した。Matrigelベースの浸潤アッセイを使用して、拡張されたT細胞を、単離されたばかりの休眠T細胞(FT)(ナイーブT細胞、エフェクター・メモリーT細胞、およびセントラル・メモリーT細胞)、24時間にわたりOKT3/CD28 Abに曝露された、短時間活性化されたT細胞(BA-T)、長期間にわたりex vivoで拡張されたT細胞(LTE-T)(12~14日間にわたり活性化および培養された)(セントラル・メモリーT細胞およびエフェクター・メモリーT細胞)、および単離されたばかりの単球(陽性対照)と比較した。予測される通り、5種の異なる健常ドナーから単離された単球は、ECMを分解する最大の能力($63\% \pm 23\%$)を示した(図1A)。BA-Tが、FTと比較して、ECMへの浸潤の強化を示した(それぞれ、 $34\% \pm 8\%$ の対 $23\% \pm 8\%$; $p = 0.05$)ことは、齧歯動物で前に報告されたデータ(de Messtreaら、2007)と符合する。しかし、LTE-Tは、BA-T($p = 0.01$)およびFT($p = 0.022$)のいずれと比較しても、ECMを分解する能力が有意に低減された($8\% \pm 6\%$)。

10

【0140】

上記の観察の一因となる機構を精査するため、各細胞群内のHPSEの発現および機能の評価した。単球ならびにCD4⁺FTおよびCD8⁺FTならびにCD4⁺BA-TおよびCD8⁺BA-Tのいずれも、HPSEの活性形態(50kDa)の発現を保持したが、LTE-Tは、培養の2日目までにHPSEの発現を喪失し、培養期間中において、一貫して陰性を維持した(図1B)ことは、浸潤アッセイと符合する。さらに、LTE-Tが休眠していて、その後、培養の14日目に、OKT3/CD28 Abを使用して、再活性化された場合でさえ、HPSEは、再発現されなかった。LTE-TによるHPSEの発現の欠如は、免疫蛍光によって確認された(図1C)。セントラル・メモリー(CD45RO⁺CD62L⁺)細胞およびエフェクター・メモリー(CD45RO⁺CD62L⁻)細胞を末梢血から分離することによって、OKT3/CD28 Abによる刺激の18時間後において、両方のサブセットにおけるHPSEの潜在形態(65kDa)から活性(50kDa)形態への移行、およびその後における酵素の恒常的な喪失(図7)も実証された。

20

30

【0141】

LTE-T内のHPSEタンパク質の非存在は、定量的RT-PCRにより評価される、HPSE mRNAの下方制御と関連した。図1Dで示される通り、HPSE特異的mRNAは、CD4⁺T細胞内およびCD8⁺T細胞内のいずれにおいても、活性化の直後に減少し、14日間の培養期間にわたり、CD14⁺細胞と比較して(CD4⁺T細胞について、 $p < 0.005$ 、およびCD8⁺T細胞について、 $p < 0.031$)低量を維持した。OKT3/CD28 Abによる、培養の14日目までのLTE-Tの再活性化は、HPSE mRNAの上方制御を誘導しなかった。このLTE-T内の細胞内HPSEの欠如は、培養物上清中の酵素活性の欠如によっても確認された。図1Eで示される通り、FTの活性化の最初の72時間以内に回収された上清中で、HPSEの酵素活性が検出され、これは、培養培地中の蓄積に帰することができるが、酵素活性は、72時間後にバックグラウンドレベルに戻っている(CD4⁺FTおよびCD8⁺FTについて、それぞれ、 $0.34 \text{ U/ml} \pm 0.2 \text{ U/ml}$ および $0.45 \text{ U/ml} \pm 0.27 \text{ U/ml}$ から、 $0.22 \text{ U/ml} \pm 0.06$ へ)(図1E)。

40

【0142】

腫瘍抑制因子p53は、そのプロモーターに結合することによって、HPSE遺伝子の発現を調節する。p53が、HPSEを過剰発現する腫瘍内の細胞内の機能の喪失により、下方制御されるかまたは突然変異することを示す以前の研究に基づき、活性化Tリンパ球内の機能的p53ならば、HPSE mRNAの下方制御に関与することが考えられた。p53のmRNA(図9A)およびタンパク質サブユニット(図9B)は、活性化した

50

CD4⁺T細胞内およびCD8⁺T細胞内のいずれにおいても遷延的に上方制御され、*ex vivo*の培養中においても上方制御されることが見出された。p53クロマチン免疫沈降 (ChIP: chromatin immunoprecipitation) により評価される通り、p53は、LTE-T内でHPSEプロモーターに結合した (図9C) ので、p53の上方制御とHPSEの下方制御とは、実際に連関していた。この事象が、*ex vivo*で培養されたT細胞 (LTE-T) 内で観察されるだけでなく、ナイーブ (CD45RA⁺) T細胞から抗原感作を経たT細胞 (CD45RO⁺) への移行中においても生理学的に生じることをさらに実証するため、T細胞受容体 (TCR: T cell receptor) の架橋による活性化の前および後における、単離されたばかりのCD45RA⁺T細胞内で、p53 ChIPを繰り返した。図9Dで示される通り、ナイーブCD45RA⁺T細胞は、TCR架橋の72時間後に限る、p53の、HPSEプロモーターへの結合を示し、これは、ナイーブT細胞から抗原感作を経たT細胞へのそれらの移行を指示する。したがって、活性化T細胞内のp53の上方制御は、HPSE mRNA発現の下方制御に恒常的に寄与する。

10

20

30

40

50

【0143】

HPSEの再発現は、*ex vivo*で拡張されたLTE-Tの、ECMを分解する能力を回復する。LTE-Tが、HPSEの発現を下方制御し、それによって、ECMを分解するそれらの能力を喪失することを見出したところ、レトロウイルス遺伝子導入を介して、LTE-T内のHPSEを再発現すれば、それらの浸潤能力が回復されることが考えられた。図2Aで示される通り、GFPおよびHPSEの両方をコードするレトロウイルスベクターを形質導入されたLTE-Tは、qRT-PCRおよびWBにより評価される (図2BおよびC) 通り、GFP (51% ± 18%) およびHPSEを発現した。機能アッセイにおいて実証される通り、HPSE (I) GFP⁺ LTE-Tは、ECM (48% ± 19%) を、対照LTE-T (29% ± 18%; $p = 0.025$) より良好に分解した (図2D)。この相違は、形質導入されたT細胞を、GFP陽性細胞の選択 (>90%) に基づき、Matrigel (商標) 細胞浸潤アッセイにより試験する前に、HPSEの発現について濃縮した場合にさらに強められた (69% ± 19%; $p < 0.001$)。HPSE阻害剤Heparin H1 (Nakajimaら、1984) の添加により、GFPにより分取されたLTE-Tによる浸潤は、74% ± 14% から29% ± 9% に有意に ($p < 0.01$) 低減された (図2E) ので、HPSE (I) GFP⁺ LTE-Tの回復された浸潤特性は、HPSE特異的であることが確認された。したがって、養子T細胞移入のために*ex vivo*で培養されたLTE-T内のHPSEの再発現は、メモリー細胞の、ECMを分解する生理学的特性を回復する。

【0144】

GD2特異的CARで改変されたTリンパ球内のHPSEの共発現は、エフェクター機能を損なわずに、ECMへの浸潤を強化する。LTE-T内のHPSEの発現は、ECMを分解するそれらの能力を回復することを実証したので、次に、この特性を、抗腫瘍特異性とカップリングしうるのでどうかを決定した。NBを、モデルとして使用し、GD2特異的CARの発現によって、NB関連抗原GD2を標的化する、T細胞を生成した (Puleら、2005)。5種の健常ドナーに由来するLTE-Tに、CAR単独またはHPSEおよびCARの両方 (CAR (I) HPSE) をコードするレトロウイルスベクターを形質導入した。CARベクターおよびCAR (I) HPSEベクターを使用したところ、培養の14日目におけるCAR発現は、それぞれ、71% ± 14% および56% ± 6% であった (図3A)。CAR分子は、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞のいずれによっても発現された (CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞のそれぞれについて、39% ± 19% および60% ± 18%; CAR (I) HPSE: CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞のそれぞれについて、38% ± 13% および61% ± 13%)。HPSEは、CAR (I) HPSEベクターを形質導入されたT細胞内のウェスタンブロットによって、一貫して検出された (図3B)。CAR (I) HPSE⁺ LTE-Tは、NB標的細胞に対するエフェクター機能を保持した。標準的な⁵¹Cr放出アッセイでは、CAR⁺ LTE-T

TおよびCAR (I) HPSE⁺ L TE - Tのいずれも、GD2⁺ LAN1細胞 (20 : 1のE : T比における、それぞれ、71% ± 22%および41% ± 16%の殺滅) およびGD2⁺ CHLA - 255細胞 (それぞれ、76% ± 7%および55% ± 13%) を特異的に溶解させた。CARおよびCAR (I) HPSE L TE - Tは、GD2⁻ 標的細胞系 Rajiに対して、無視できる程度の活性を示した (それぞれ、8% ± 3%および2% ± 2%) (図3C)。予測される通り、対照L TE - Tは、これらの標的のいずれも溶解させなかった。CAR改変T細胞の抗腫瘍活性は、IFN γ (CAR⁺ L TE - TおよびCAR (I) HPSE⁺ L TE - Tについて、それぞれ、細胞10⁶個当たり927 ± 328および527 ± 320 pg / ml) およびIL - 2 (CAR⁺ L TE - TおよびCAR (I) HPSE⁺ L TE - Tについて、それぞれ、細胞10⁶個当たり83 ± 6および61 ± 27 pg / ml) の放出が保持された (図3D)、Th1サイトカインプロファイルの保存と関連した。それらの同等な細胞傷害機能とは著しく対照的に、CAR (I) HPSE⁺ L TE - Tだけが、ECMを、CAR⁺ L TE - Tまたは対照L TE - T (それぞれ、13% ± 9%および16% ± 10%) と比較して、有意に (p = 0.004およびp < 0.001) 良好に (66% ± 1%) 分解した (図3E)。HPSEおよびCARを共発現するL TE - Tが、ECMの存在下で抗腫瘍活性を増大させたことを、*ex vivo*において立証するため、L TE - Tおよび腫瘍細胞を、L TE - Tは、ECMを分解して、腫瘍標的に到達し、これらを消失させなければならない、Matrigel (商標) 細胞浸潤アッセイにプレーティングした。培養の3日後、CAR⁺ L TE - TおよびCAR (I) HPSE⁺ L TE - Tのいずれも (< 3%の残留GFP⁺ 腫瘍細胞)、ECMの非存在下 (インサート) で、LAN - 1腫瘍細胞を、対照L TE - T (31% ± 6%の残留GFP⁺ LAN - 1細胞) と比較して同等に良好に消失させた (図3F、G)。これと対照的に、ECMの存在下では、CAR (I) HPSE⁺ L TE - Tは、CAR⁺ L TE - Tの存在下における37% ± 12%の残留と比較して、16% ± 8%を除くすべてのLAN - 1細胞を消失させた (p = 0.001) (図3F、G)。対照L TE - Tは、いずれの条件 (インサートまたはECM) でも、抗腫瘍活性を示さなかった (45% ± 9%の残留GFP⁺ LAN - 1)。NB細胞株CHLA - 255についても同一な結果が得られた。したがって、HPSEおよびCARを共発現するL TE - Tだけが、ECMの存在下で頑健な抗腫瘍活性を示す。

【0145】

HPSEおよびGD2特異的CARを共発現するT細胞は、ECMの存在下における抗腫瘍活性が強化されている。次に、HPSEおよびGD2特異的CARの共発現が、ECMの存在下における抗NB活性を強化するのかどうかを決定した。L TE - Tおよび腫瘍細胞を、Matrigel浸潤アッセイにプレーティングし、T細胞の、ECMを分解して、その後、GFPを発現する (定量化のために) CHLA - 255腫瘍細胞およびLAN1腫瘍細胞を標的化する能力を測定した。図4Aおよび4Bに示される通り、培養の3日後において、CAR⁺ L TE - TおよびCAR (I) HPSE⁺ L TE - Tのいずれも (< 3%の残留GFP⁺ 細胞)、ECMの非存在下において、LAN1腫瘍細胞およびCHLA - 255腫瘍細胞を、対照L TE - T (それぞれ、31% ± 6%および42% ± 10%の残留GFP⁺ 細胞) と比較して、同等に良好に消失させた。これと対照的に、ECMの存在下では、CAR (I) HPSE⁺ L TE - Tは、CAR⁺ L TE - Tの存在下における37% ± 12%および52% ± 9%の残留と比較して、16% ± 8%および19% ± 1%を除くすべての、それぞれ、LAN1細胞およびCHLA - 255細胞を消失させた (p = 0.001)。予測される通り、対照L TE - Tは、いずれの条件でも、抗腫瘍活性を示さなかった (それぞれ、45% ± 9%および68% ± 3%の残留LAN1およびCHLA - 255)。図4Cおよび4Dは、平均 ± SDをまとめたものである。

【0146】

HPSEおよびCAR - GD2を共発現するT細胞は、NBの異種移植片マウスモデルにおける全体的生存を改善する。*in vivo*における知見を検証するため、Matrigelの存在下において、NOG / SCID / β_2 マウスに、2つの異なる細胞

株 (CHLA-255 および LAN-1) を、i.p. で植え込んで、複雑で構造化された腫瘍の形成を可能にすることにより、NB の異種移植片モデルを確立した。10 日後、マウスには、対照 LTE-T または CAR⁺ LTE-T または CAR (I) HPSE⁺ LTE-T を i.p. で施した。図 5 A で示される通り、CHLA-255 を植え込まれ、CAR (I) HPSE⁺ LTE-T で処置されたマウスは、40 日目における生存が、対照 LTE-T ($p < 0.001$) または CAR⁺ LTE-T ($p < 0.007$) で処置されたマウスと比較して有意に改善された。40 日後、各処置群からの生存マウスを安楽死させ、肉眼的腫瘍の存在について評価した。生存し、CAR⁺ LTE-T を注入されたマウス 7 匹中、無腫瘍なのは 2 匹 (29%) だけであったが、生存し、CAR (I) HPSE⁺ LTE-T を注入されたマウス 17 匹中 8 匹 (47%) は、腫瘍の証拠を示さなかった。別の実験セットでは、T 細胞注入後の 12 ~ 14 日目にマウスを安楽死させて、腫瘍部位における T 細胞浸潤を測定した。CAR (I) HPSE⁺ LTE-T を注入されたマウスの腫瘍は、対照 ($0.6\% \pm 0.5$; $p = 0.029$) または CAR⁺ LTE-T ($0.1\% \pm 0.1$; $p = 0.043$) で処置されたマウスから回収された腫瘍と比較して、T 細胞浸潤が大きかった ($4.6\% \pm 2.4\%$) (図 5 B)。腫瘍細胞系 LAN-1 を移植されたマウスにおいても、同様の結果が得られた (図 5 C)。CAR (I) HPSE⁺ T 細胞を注入されたマウス LTE-T は、40 日目における生存が、対照 LTE-T ($p < 0.0001$) または CAR⁺ LTE-T ($p < 0.039$) で処置されたマウスと比較して有意に改善された。安楽死させたマウスから回収された腫瘍も、マウスに CAR (I) HPSE⁺ LTE-T を注入した場合、対照と比較して、体重の有意な低減を示し ($0.8\text{ g} \pm 0.6\text{ g}$ 対 $3.3\text{ g} \pm 2.4\text{ g}$) ($p = 0.039$)、CAR⁺ LTE-T を注入されたマウスと比較してもある傾向が示された ($0.8\text{ g} \pm 0.6\text{ g}$ 対 $2.5\text{ g} \pm 2\text{ g}$) ($p = 0.093$) (図 5 D)。

10

20

30

40

50

【0147】

T 細胞による HPSE の強制発現が、in vivo におけるそれらの生体内分布に影響を及ぼすかどうかを評価した。これらの研究では、CAR (I) HPSE⁺ LTE-T および CAR⁺ LTE-T を、eGFP、FFLuc をコードするベクターで標識し、その後、尾静脈注射を介して注入した。T 細胞の生体内分布は、T 細胞注入後の異なる時点における in vivo イメージングによって評価したが、マウスの 2 つの群間で有意差を示さなかった (図 6)。

【0148】

i.p. 注入する場合、NB 細胞株は、複雑で構造化された腫瘍を形成するのに Matrigel (商標) を必要とするため、ホタルルシフェラーゼで標識された CHLA-255 腫瘍細胞を腎臓内に植え込み、Matrigel (商標) に対する必要なしに固形腫瘍を発症させる、二次 NOG / SCID / $\beta_2\text{-microglobulin}$ / $\text{CD}3\gamma$ モデルにより、提起されたアプローチの、腫瘍への T 細胞浸潤の促進における関与性を検証した。CAR (I) HPSE⁺ LTE-T を静脈内注入されたマウスに由来する腫瘍切片は、CAR⁺ LTE-T と比較して、CD3⁺ T 細胞の浸潤の強化を示した (それぞれ、 357 ± 72 および 173 ± 32 ; $p = 0.028$) (図 10 A、B、C)。注入されたマウスの長期にわたる観察は、CAR (I) HPSE⁺ LTE-T を注入されたマウスの、50 日目までの生存の改善も示した ($p < 0.005$) (図 10 D)。

【0149】

HPSE の発現が回復された LTE-T による、肺または肝臓など、正常組織への非特異的浸潤についての懸念を排除するため、in vivo における T 細胞の生体内分布を評価した。したがって、これらの研究では、CAR (I) HPSE⁺ LTE-T および CAR⁺ LTE-T を、GFP、FFLuc をコードするベクターで標識し、その後、尾静脈注射を介して注入した。T 細胞接種後の異なる時点における、in vivo イメージングおよび免疫組織化学によって評価された T 細胞の生体内分布は、マウスの 2 つの群間で有意差を示さなかったことから、肺または肝臓における、HPSE の発現が回復された LTE-T の優先的蓄積は示されなかった (図 6)。

【0150】

実施例3

ある特定の実施形態の概要

データは、がんの処置のための腫瘍抗原特異的T細胞を生成するのに必要とされる、*ex vivo*における培養の長期化により、腫瘍ECMを構成するHSPGの分解において鍵となる役割を果たすHPSEのそれらによる産生が損なわれることを示す。HPSEの欠如は、腫瘍指向性T細胞のECM内の移動を限定し、腫瘍細胞への接近を妨げ、固形腫瘍を消失させるそれらの能力を低減する。遺伝子導入によるHPSEの強制発現は、CARによりリダイレクトしたT細胞のHSPGを分解する能力を回復し、NBモデルにおけるそれらの抗腫瘍効果を強化する。

10

【0151】

血管を介して腫瘍部位に溢出するTリンパ球の能力は、それらの抗腫瘍機能に死活的である。FTおよびBAT-Lは、検出可能な50kDaの活性形態のタンパク質の発現を示すが、養子免疫療法のためのT細胞株を製造するのに現在使用されているプロトコルに従い生成されたLTE-Tは、HPSEを欠損している。実験は、HPSE mRNAは、T細胞活性化の直後に下方制御されるが、HPSE特異的酵素活性は、培養培地中のT細胞活性化後最初の72時間以内に増大することを示す。これらの観察は、あらかじめ形成されたHPSEが細胞内区画内に保存され、活性化T細胞に応答した早期事象として放出されることを示す以前の研究と符合する(Bartlettら、1995)。HPSEの不活性形態から活性形態への急速な移行およびその放出が、TCR誘発時におけるセントラル・メモリーT細胞およびエフェクター・メモリーT細胞の生理学的特性であることは重要である。*ex vivo*で拡張されたT細胞の解析も、これらの細胞のいずれも、HPSE mRNAの発現およびHPSEの酵素活性をもたず、LTE-Tが休眠し、その後、TCRの刺激によって再活性化される場合、HPSEの転写も産生も回復されないことを示す。

20

【0152】

データは、HPSEの欠如が、LTE-Tの、HSPGを分解する能力を直接的に低減し、したがって、それらのECMの存在下における抗腫瘍活性を妨げることを示すが、HS鎖の切断により、あらかじめ形成されて保存されたケモカインが、間質に放出されることに注目することも重要である(Gallagher、2001; Iozzo、1998)。(30)

30

【0153】

遺伝子導入によるLTE-T内のHPSEの再発現は、エフェクター機能を損なわずに、ECMを分解するそれらの生理学的能力を回復する。HPSEは、単一のベクター内で、腫瘍に方向付けられたCARとたやすく組み合わせることから、ECM分解の回復に加えた、抗腫瘍特性の同時的な獲得が可能となる。これは、*in vivo*において、腫瘍環境内でCARおよびHPSEを共発現するT細胞浸潤の数的増大であって、腫瘍間質のECMを分解するそれらの能力の回復を反映する増大をもたらす。本明細書に記載のアプローチは、HPSE⁺CAR⁺LTE-Tが、CARのエンゲージメント後において、CAR内のCD28およびOX40共刺激エンドドメインの包含を介して、共刺激を受けることを可能にする(Puleら、2005)。しかし、HPSEをもたないCAR-T細胞は、腫瘍細胞にエンゲージしないので、HPSEの欠如によって決定される全体的効果が、マウスにおける腫瘍成長の増大であるように、抗原媒介型刺激も共刺激も受けない。

40

【0154】

生理学的条件下において、T細胞によるHPSEの発現は、非病理学的組織へのT細胞溢出に由来する組織の損傷を回避するように緊密に調節される。本開示の実施形態では、HPSEは、CAR-T細胞だけにおいて発現され、抗原特異性は、T細胞の、抗原含量

50

の大きな組織内の優先的な蓄積を駆動するため (Marelli - Bergら、2010)、非特異的組織浸潤は限定的であり、当然ながら、HSP E + CAR + L T E - Tを注入されたマウスにおける、生体内分布、組織浸潤、または毒性の変化も生じない。

【0155】

結論として、本発明者らは、腫瘍特異的 L T E - T 内の H P S E の特異的欠損であって、それらの抗腫瘍活性を限定するが、酵素の強制発現によって克服されうる欠損を同定した。この戦略を利用することにより、固形腫瘍を有する患者における腫瘍指向性 T 細胞の活性が有意に強化される。

【0156】

実施例 4

例示の材料および方法

細胞株：細胞株 293T (ヒト胎児性腎臓)、DU-145 (ヒト前立腺がん)、A549 (ヒト肺上皮癌)、および CHLA-255 (NB) を、10% のウシ胎仔血清 (FBS、Hyclone、Thermo Scientific、Pittsburgh、PA、USA)、および 2mM の GlutaMax (Invitrogen、Carlsbad、CA) を補充された IMDM (Gibco、Invitrogen (商標)、Carlsbad、CA、USA) 中で培養した。細胞株 MCF-7 (乳がん)、Raji (バーキットリンパ腫)、K562 (骨髄赤芽球性白血病)、および LAN1 (NB) を、10% の FBS および 2mM の GlutaMax を補充された RPMI 1640 (Hyclone) 中で培養した。細胞を、37 °C で 5% の CO₂ を含有する加湿雰囲気中で維持した。

【0157】

初代ヒト T リンパ球の単離および培養：Ficoll - Paque (Amersham Biosciences、Piscataway、N.J.) を使用して、末梢血単核細胞 (PBMC：peripheral blood mononuclear cell) を、健常ドナー (Gulf Coast Regional Blood Center、Houston、TX、USA) の軟膜から単離した。単球は、CD14 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec、Auburn、CA、USA) を伴う陽性磁気選択によって、PBMC から得た。CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞は、特異的なマイクロビーズ (Miltenyi) を使用する陰性磁気選択によって、PBMC から得た。CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞は、特異的なマイクロビーズ (Miltenyi) を使用する陰性磁気選択によって、PBMC から得た。選択された実験では、セントラル・メモリー細胞 (CD45RO⁺CD62L⁺) およびエフェクター・メモリー細胞 (CD45RO⁺CD62L⁻) も、陽性磁気選択 (Miltenyi) によって、PBMC から分離した。T リンパ球を、固定化された抗 CD3 (OKT3) 抗体 (Ab：antibody) (1 μg/ml) および抗 CD28 Ab (1 μg/ml) (Becton Dickinson Biosciences、Franklin Lakes、NJ、USA) で活性化し、その後、10% の FBS および 2mM の GlutaMAX を補充された、45% の RPMI 1640 および 45% のクリック培地 (Irvine Scientific、Santa Ana、CA、USA) を含有する完全培地中で拡張した。前に記載されている (Savoldo ら、2007) 通りに、細胞には、毎週 2 回、組換えインターロイキン 2 (IL-2) (50 U/ml) (Chiron Therapeutics、Emeryville、CA、USA) をフィードした。

【0158】

浸潤アッセイ：製造業者の指示に従い、in vitro において、BioCoat (商標) Matrigel (商標) 浸潤アッセイ (BD Biosciences) を使用して、各細胞サブセットの、ECM を分解する能力を検討した。簡潔には、無血清培地中で 18 時間にわたり維持された細胞を、上側チャンバー/インサート内に播種した (チャンバー 1 つ当たり 2.5 × 10⁵ 個の細胞)。10% の FBS を補充された培地を、化学誘引物質として作用するように、下側区画に添加した。24 時間後、トリパンブルー排除

10

20

30

40

50

によって、下側チャンバー内の細胞をカウントした。すべての実験は、二連で実施した。データは、Matrigelおよび膜を介した浸潤の、対照膜（8 μ mのポリエチレンテフタレート膜の小孔）内の移動と比べた百分率として表す。浸潤の百分率は、以下：（Matrigelチャンバー膜を介する細胞浸潤の平均 / 対照インサート膜を介する細胞移動の平均） $\times 100$ の通りに計算した。具体的な実験では、Tリンパ球の浸潤と、抗腫瘍活性とを、同時に評価した。簡潔には、LAN1 / GFP⁺またはCHLA 255 / GFP⁺細胞（ 1.4×10^4 個）を24ウェルプレートのボトムにプレーティングし、T細胞（ 2.5×10^5 個の細胞）を上側チャンバー / インサート内にプレーティングした、BioCoat（商標）Matrigel（商標）浸潤アッセイを使用した。24時間後にチャンバーおよびインサートを取り外し、さらに培養の3日後、細胞を、下側チャンバーから回収し、フローサイトメトリーによって定量化して、腫瘍細胞およびT細胞のそれぞれを同定した。

10

【0159】

ウェスタンブロット：OKT3 / CD28 Abによる活性化後の異なる時点において、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞を回収した。プロテアーゼ阻害剤カクテル（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）を補充したRIPA溶解緩衝液（Cell Signaling Technology（登録商標）、Danvers、MA、USA）を使用して、タンパク質を、 5×10^6 個の細胞から抽出した。50 μ gのタンパク質を、SDS-PAGEによって分解し、ポリビニリデンジフルオリド膜（Bio-Rad、Hercules、CA）に移入し、0.1%の（V/V）Tween-20を伴うトリス緩衝生理食塩液（TBS）中に5%の（W/V）脱脂粉乳でブロッキングしてから、適切なAbでプローブした。これらの実験で使用されるAbおよび希釈液は、以下：HPSE-1の65 kDaの前駆体および50 kDaの活性形態の両方を認識する、マウス抗ヒトHPA1（1:100、クローンHP130）（Insight Biopharmaceuticals Ltd、Rehovot、Israel）、ウサギ抗ヒトHPA1ポリクローナル（1:4000；Cedarlane、Burlington、NC、USA）、およびマウス抗ヒト - アクチン（1:10000、クローンC4）（Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA、USA）の通りであった。ブロットを、0.1%の（V/V）Tween-20を含有するTBSで洗浄し、その後、ブロッキング液（1:5000、ヤギ抗マウスsc-2005およびヤギ抗ウサギsc-2004）（Santa Cruz）中で希釈した、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次Abで染色した。その後、ブロットを、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate（Thermo Scientific）と共にインキュベートした。

20

30

【0160】

免疫蛍光：接着細胞（ウェル1つ当たり 1×10^5 個の細胞）は、カバー付きLab-Tek IIチャンバースライド（Nalge Nunc Intl、Roskilde、Denmark）上で成長させたが、非接着細胞（ 3.5×10^5 個の細胞）は、顕微鏡スライド上にサイトスピンした。細胞を、4%のバラホルムアルデヒド（v/v）で固定した。0.1%のTriton X-100（v/v）による透過化の後、細胞を、5%のヤギ血清（Cell Signaling Technology（登録商標））および1%のBSAと共にインキュベートして、非特異的結合をブロッキングし、その後、ヒトHPSE1に対する一次抗体（HPA1、クローンHP130）（Insight Biopharmaceuticals Ltd）で染色した（1:100の希釈液；室温で2時間にわたり）。その後、細胞を、Alexa Fluor 555ヤギ抗マウス二次抗体（Cell Signaling technology（登録商標）、Danvers、MA、USA）でプローブした（1:500の希釈液；室温で2時間にわたり）。蛍光シグナルは、蛍光顕微鏡（Olympus IX70、Leeds Instruments Inc、Irving、TX、USA）を使用して検出した。DAPIを、

40

50

核染色として使用した。

【0161】

RNAの単離および定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR) : OKT3 / CD28 Abによる活性化後の異なる時点において、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞を回収した。qRT-PCRでは、100 ngの全RNAを使用して、cDNAを調製した (TaqMan One Step PCR Master Mix Reagents Kit) (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA)。HPSEに特異的なプライマーおよびプローブ (Applied Biosystem) (HPSE: Hs00935036__m1) を使用した。HPSEのサイクル閾値 (cycle threshold) (CT) 値の相違は、GAPDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、Hs99999905__m1) のCTに照らして標準化し、発現の倍率変化はCD14⁺細胞と比べて表し、これを陽性対照とみなした。

10

【0162】

酵素免疫測定アッセイ (ELISA) : IFN 特異的ELISAおよびIL-2 特異的ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用して、GD2⁺LAN1細胞による刺激に应答したT細胞によるサイトカイン放出を解析した。ヘパラン硫酸 (HS) 分解酵素アッセイキット (滋賀、大津、タカラバイオ株式会社) を使用して、HPSE活性を測定した。簡潔には、ビオチニル化HSを、酵素に対する基質として使用した。その後、アビジン-ペルオキシダーゼにより、線維芽細胞成長因子に結合した、分解されていない基質を検出し、吸光度を450 nmで測定した。前に記載されている (Royら、2005; Zhangら、2010) 通りに、HPSE活性を、吸光度の減少の逆数として決定した。T細胞および腫瘍細胞上清は、三連で解析した。上清を、ビオチニル化HSと共に、37 で75分間にわたりインキュベートし、HPSE-1の活性を、ELISA型アッセイによって決定した：特異的な基質を使用して発色させ、マイクロプレートリーダー (Elx808iu, Bio-Tek Instruments) を使用して、プレートを450 nmで読み取った。ウェスタンブロットおよびqRT-PCRについて前に記載されている通り、OKT3 / CD28 Abによる活性化後の異なる時点において、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞からの上清を回収した。活性化の4および14日後、細胞を回収し、カウントし、洗浄し、新鮮な培地中に再プレatingした。

20

30

【0163】

レトロウイルスコンストラクト、一過性トランスフェクション、およびTリンパ球への形質導入 : HPSE cDNA (受託番号 : NM-006665) を、eGFPもコードするSFGレトロウイルス骨格 (SFG, HPSE (I) eGFP) にクローニングした (図8)。CD28、OX40、および エンドドメインを含有するGD2 特異的CARのためのコンストラクト (SFG, CAR) は、前に記載されている (Puleら、2005)。その後、本発明者らは、IRES (SFG, CAR (I) HPSE) を使用して、HPSEおよびCAR-GD2を共発現するのに、例示のバイシストロニックのベクターを生成した (図8)。T細胞のin vivoイメージングのための融合タンパク質eGFP-ホタルルシフェラーゼ (eGFP, FLuc) をコードするレトロウイルスベクターは、前に記載されている (Veraら、2006)。レトロウイルス上清を作製するために、前に記載されている (Veraら、2006) 通りに、293T細胞を、レトロウイルスベクターである、MoMLV gag-polをコードするPeq-PamプラスミドおよびRD114エンベロープをコードするRDFプラスミドと共に共トランスフェクトした。ウイルス調製時において、HPSEの特異的阻害剤SST0001 (化学修飾されたヘパリン¹⁰⁰ Na, Ro-H) (3 μg/ml) (Vlodavskyら、2007; Naggiら、2005) を、培地に添加して、その力価を増大させた。その後、レトネクチンでコーティングしたプレート (タカラバイオ株式会社) を使用して、活性化Tリンパ球に、レトロウイルス上清を形質導入した。レトネクチンプレートから取り出した後、T細胞系を、37 で5%のCO₂を含有する加湿雰囲気中、IL-2 (

40

50

50 U/mL)の存在下の完全T細胞培地中で、2週間にわたり維持した。

【0164】

フローサイトメトリー：本発明者らは、FITC蛍光色素、PE蛍光色素、PerCP蛍光色素、またはAPC蛍光色素とコンジュゲートした、以下の例示のAb：CD45、CD56、CD8、CD4、およびCD3(すべてBecton Dickinson、San Jose、CA製)を使用した。本発明者らは、各実験に、適切なアイソタイプマッチAbで標識された対照試料を含めた。Tリンパ球内のGD2特異的CARの発現は、特異的な抗イディオタイプ抗体(1A7)(Rossigら、2002)を使用して検出した。試料は、四重極蛍光シグナルのためのフィルターセットを装備したBD FAC ScaLiburシステムおよびCellQuestソフトウェア(BD Biosciences)により解析した。本発明者らは、試料ごとに最低10,000の事象を解析した。

10

【0165】

クロム放出アッセイ：前に記載されている(Savoldoら、2002)通りに、標準的な6時間の ^{51}Cr 放出アッセイを使用して、T細胞の細胞傷害活性を評価した。標的細胞を、培地中単独で、または1%のTriton X-100(Sigma-Aldrich)中でインキュベートして、それぞれ、自発的 ^{51}Cr 放出および最大 ^{51}Cr 放出を決定した。三連ウェルの特異的溶解の平均百分率は、以下： $[(\text{被験カウント} - \text{自発的カウント}) / (\text{最大カウント} - \text{自発的カウント})] \times 100$ の通りに計算した。被験標的細胞には、LAN1、CHLA 255、およびRajiが含まれた。

20

【0166】

異種SCIDマウスモデル：本発明者らは、前に記載されているSCIDマウスモデル(Savoldoら、2007; Quintarelliら、2007)を使用して、対照T細胞およびSFG-CARレトロウイルスベクターまたはSFG-CAR(1)HPSEレトロウイルスベクターを形質導入されたT細胞のin vivoにおける抗腫瘍効果を評価した。マウスによる実験は、Baylor College of Medicine's Animal Husbandryガイドラインに従い実施した。8~10週齢のNOG/SCID/ γ^c マウス(Jackson Lab、Bar Harbor、Maine)に、Matrigel(BD Biosciences)中に再懸濁させたCHLA 255細胞(2.5×10^6 個)を、腹腔内(i.p.)注射した。腫瘍接種の10~12日間後、T細胞をi.p.注射した(マウス1匹当たり 20×10^6 個の細胞)。不快感の徴候が検出されたら、マウスを安楽死させた。T細胞のin vivoにおける生体内分布については、eGFP-FFLucベクターで標識された、マウス1匹当たり 5×10^6 個のT細胞を、尾静脈注射を介して注入した。in vivoイメージングのためには、Xenogen-IVIS Imaging Systemを、前に記載されている(Veraら、2006)通りに使用した。

30

【0167】

統計学：別段に注記されない限り、データは、平均 \pm 標準偏差(SD)としてまとめる。スチューデントのt検定を使用して、有意差を示すP値 < 0.05 により、試料間の統計学的有意差を決定した。複数の比較解析が必要とされる場合、統計学的有意性は、反復測定ANOVAに続いて、複数の比較のためのニューマン-コイルス検定またはログランク(マンテル・コックス)検定によって評価した。マウスの生存データは、カプラン-マイヤー生存曲線を使用して解析した。

40

【0168】

参考文献

本明細書で引用されるすべての特許および刊行物は、参照によりそれらの全体として本明細書に組み込まれる。

Bartlett, et al., Immunol. Cell Biol. 73:113-124, 1995.

Bernfield, et al., Annu. Rev. Biochem. 68:729-777, 1999.

de Mestre, et al., J. Leukoc. Biol. 82:1289-1300, 2007.

50

Fridman, et al., J. Cell Physiol130:85-92, 1987.
Gallagher, J. Clin. Invest 108:357-361, 2001.
Iozzo, Annu. Rev. Biochem. 67:609-652, 1998.
Joyner, et al., Nature. 338:153-156, 1989.
Kalos, et al., Sci. Transl. Med.. 3:95ra73, 2011.
Mansour, et al., Nature. 336:348-352, 1988.
Marelli-Berg, et al., Immunology130:158-165, 2010.
Morgan, et al., Science 314:126-129, 2006.
Muller, Trends Immunol. 24:327-334, 2003.
Naggi, et al., J. Biol. Chem.280:12103-12113, 2005.
Naparstek, et al., Nature310:241-244, 1984.
Parish, Nat. Rev. Immunol. 6:633-643, 2006.
Pule, et al, Nat. Med. 14:1264-1270, 2008.
Pule, et al., Mol. Ther. 12:933-941, 2005.
Quintarelli, et al., Blood110:2793-2802, 2007.
Rooney, et al., Lancet 345:9-13, 1995.
Rossig, et al., Blood 99:2009-2016, 2002.
Roy, et al., Neoplasia. 7:253-262, 2005.
Savoldo, et al., Blood100:4059-4066, 2002.
Savoldo, et al., Blood110:2620-2630, 2007.
Savoldo, et al., J. Clin. Invest121:1822-1826, 2011.
Thomas & Capecchi, Cell. 51:503-512, 1987.
Vera, et al., Blood 108:3890-3897, 2006.
Vlodavsky, et al., Curr. Pharm. Des13:2057-2073, 2007.
Vlodavsky, et al., Invasion Metastasis 12:112-127, 1992.
Yadav, et al., Thromb. Haemost. 90:598-606, 2003.
Yurchenco & Schittny, FASEB J. 4:1577-1590, 1990.
Zhang, et al., Mol. Cancer Res. 8:278-290, 2010.
Zou, Nat. Rev. Cancer 5:263-274, 2005.

10

20

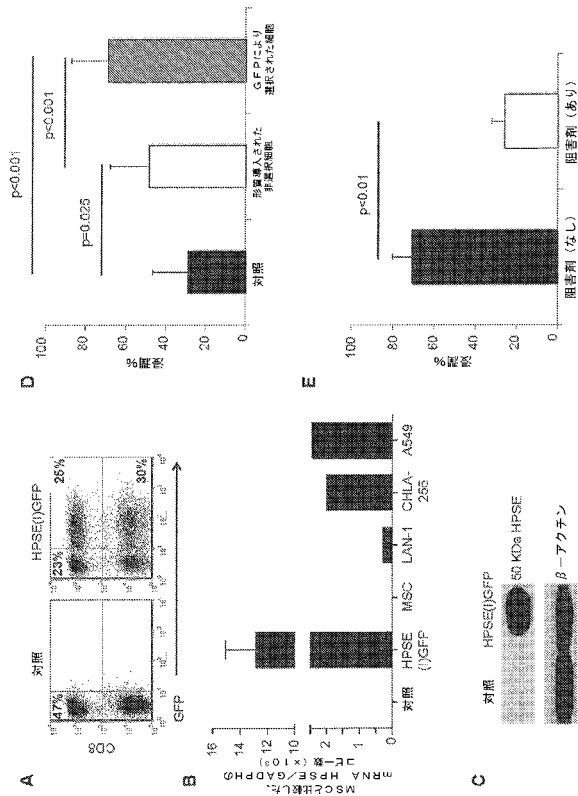
30

40

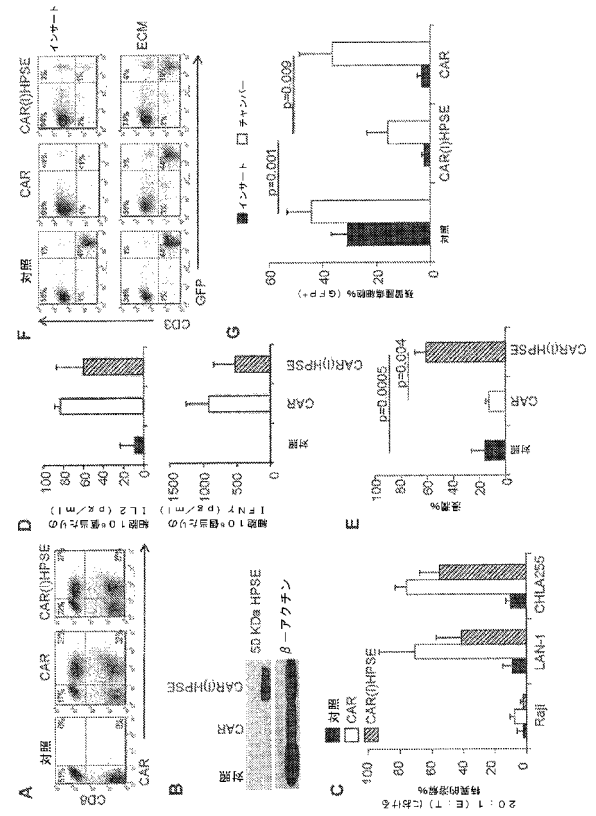
【 0 1 6 9 】

本発明およびその利点を詳細に説明したが、添付されている本発明の請求の範囲の趣旨および範囲から逸脱せずに、様々な変更、置換、および改変をここに加えることができる。さらに、本出願の範囲は、本明細中に記載されたプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法、およびステップの特定の実施形態に限定されるものではない。当業者ならば、本発明の開示内容から容易に理解するように、本明細書に記載の対応する実施形態と実質的に同じ機能を果たすか、そのような実施形態と実質的に同じ結果をもたらす、現存する、または後に開発されるプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法、またはステップも、本発明に従って使用できる。したがって、添付されている請求の範囲には、そのようなプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法、またはステップも包含されるものとする。

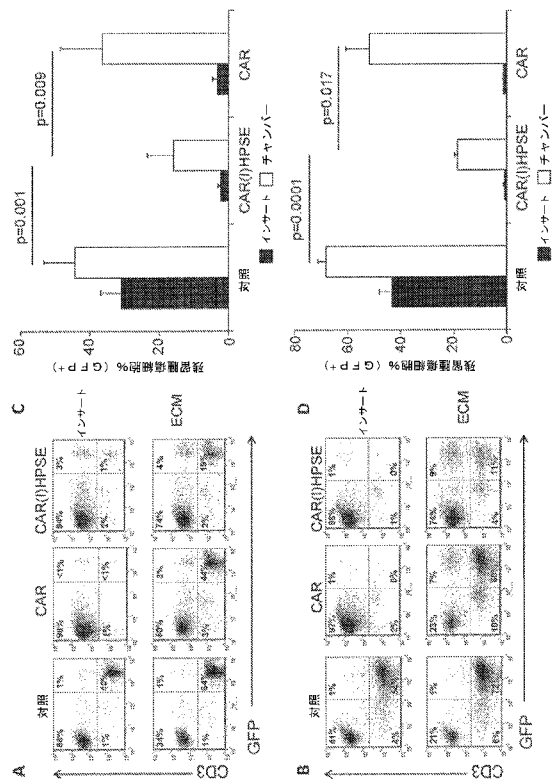
【図 2】



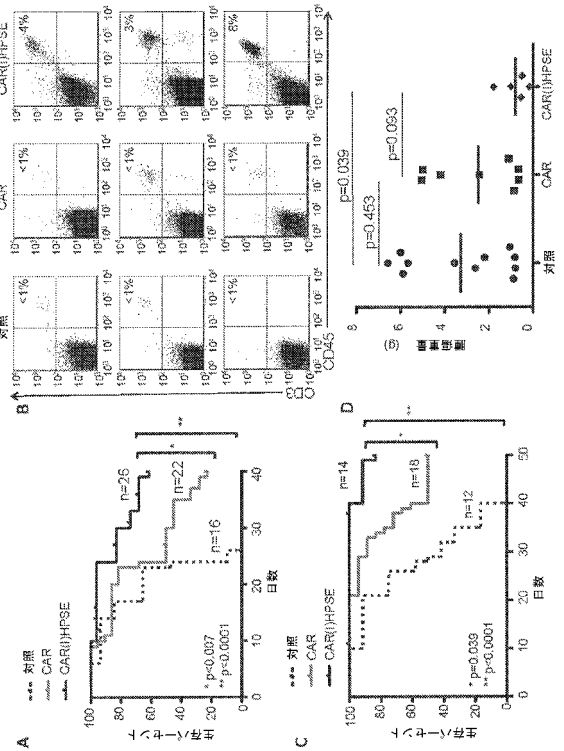
【図 3】



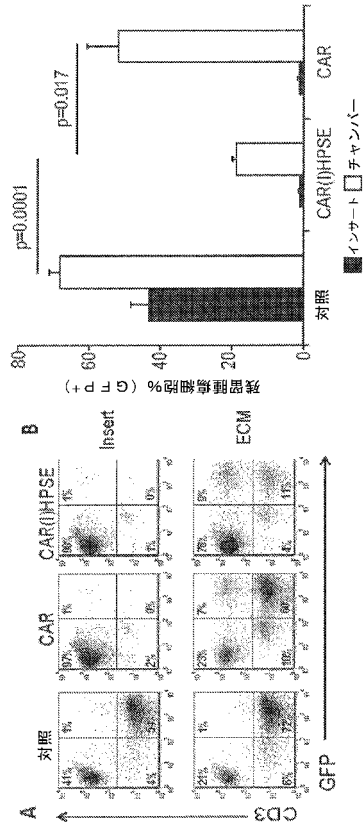
【図 4】



【図 5】



【 図 1 2 】

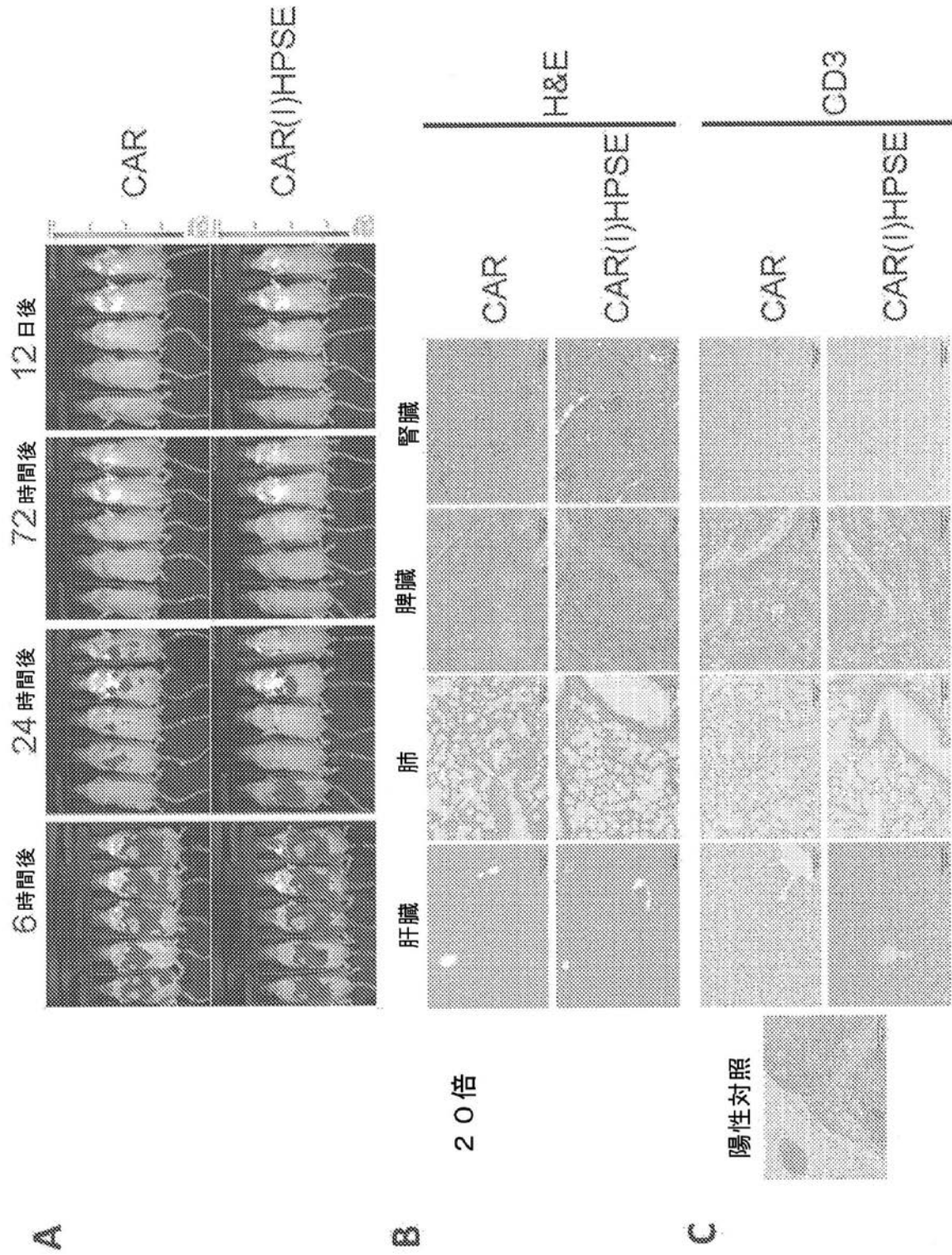


【 図 1 3 】

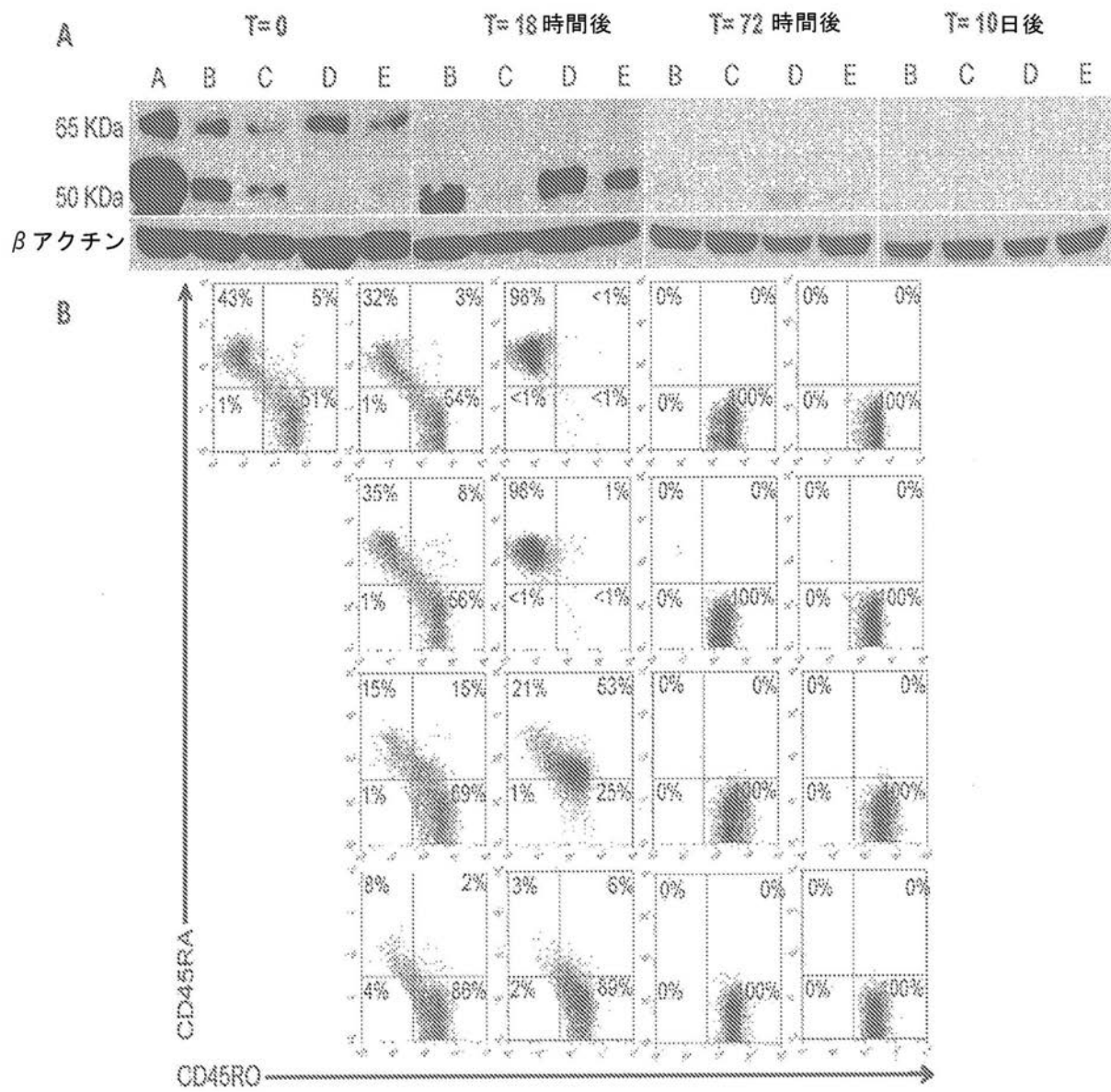
プロモーター上の位置	プライマー	配列	配列番号
57-277	HPSE p-1 センス	5'-GAAGCATAAAGTGGGTGGATCTC-3'	1
	HPSE p-1 アンチセンス	5'-GTCACCCAGGTTGGAATACAGT-3'	2
970-1167	HPSE p-2 センス	5'-CATGTAGACCACAAGGATGCAC-3'	3
	HPSE p-2 アンチセンス	5'-GATTTCCACCATGTCTGTCAGGA-3'	4
1815-2030	HPSE p-3 センス	5'-TTTTGTAGAGATGGGGCTTCA-3'	5
	HPSE p-3 アンチセンス	5'-TGTACCACCAATAAGGCAACAA-3'	6
2409-2687	HPSE p-4 センス	5'-TTCACATCCCGATTCTGACA-3'	7
	HPSE p-4 アンチセンス	5'-TTGCCAAATTCTCCTCTGC-3'	8
2975-3274	HPSE p-5 センス	5'-GAGGAAGGGATGAATACTCCA-3'	9
	HPSE p-5 アンチセンス	5'-CTACTTCCTTGCTCGCTTTCC-3'	10

[illegible]

【 図 6 】



【図7】



A SFG.hHPSE(I)eGFP



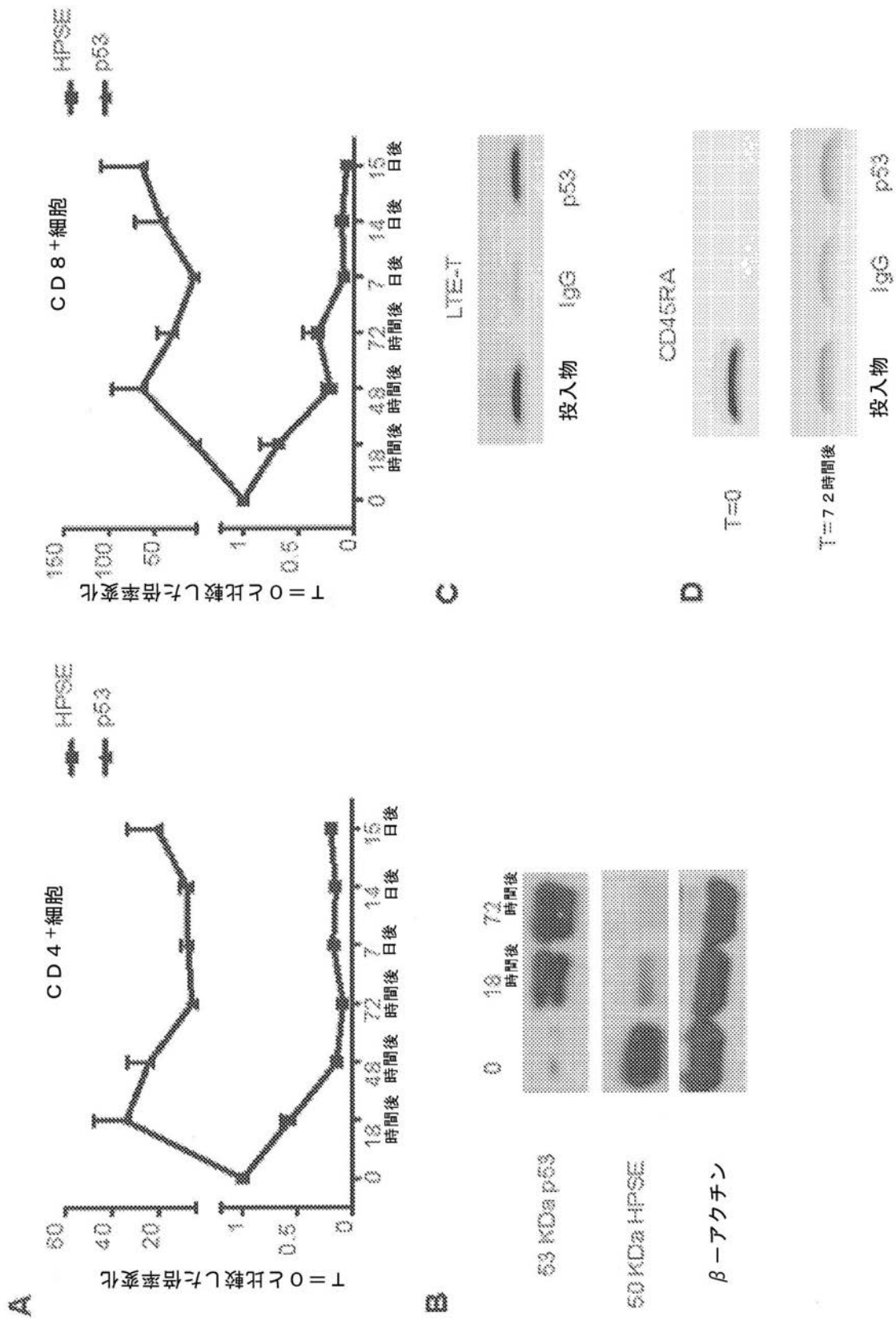
B SFG.14G2a.CD28.OX40z(I)hHPSE



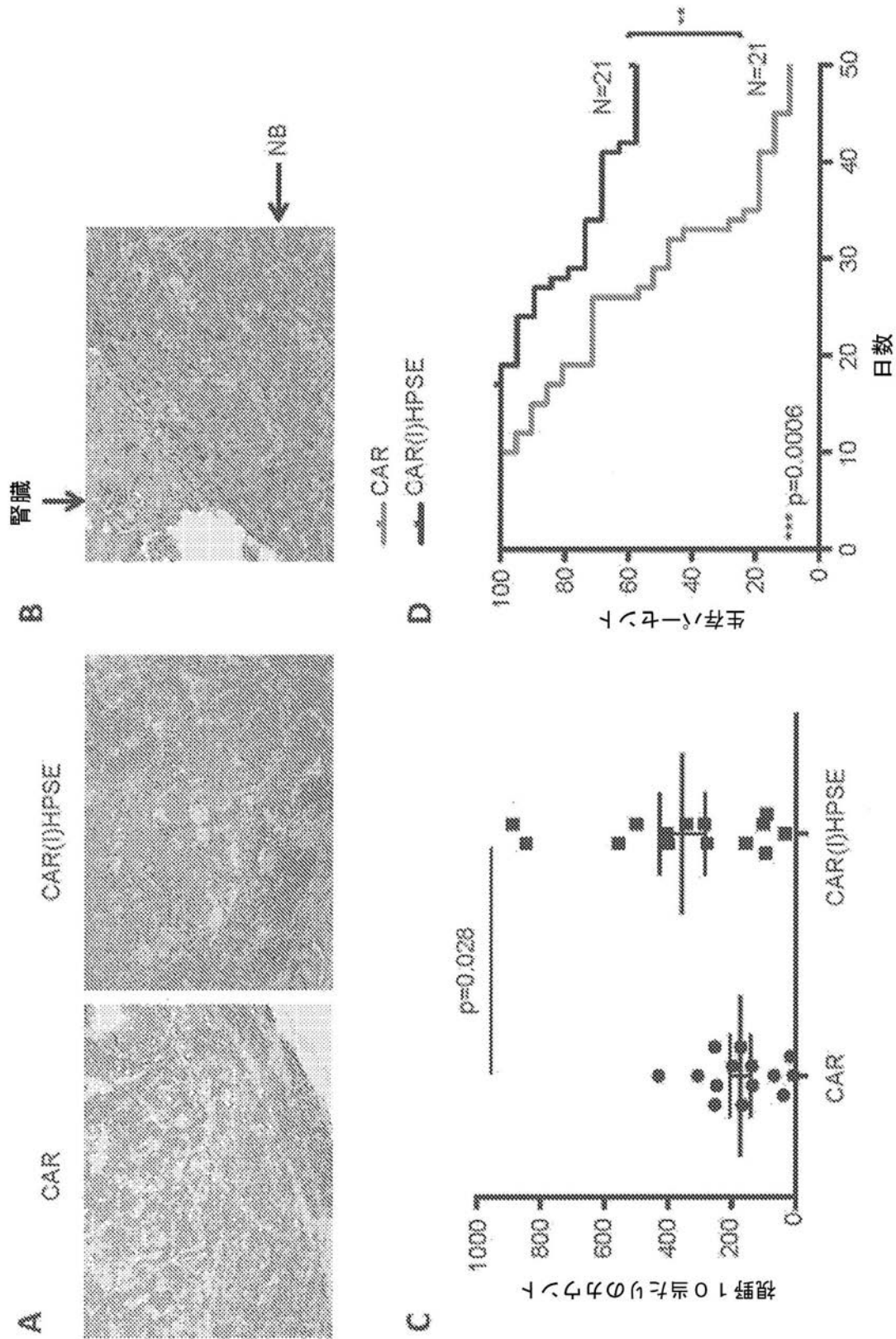
SFG.14G2a.CD28.OX40z



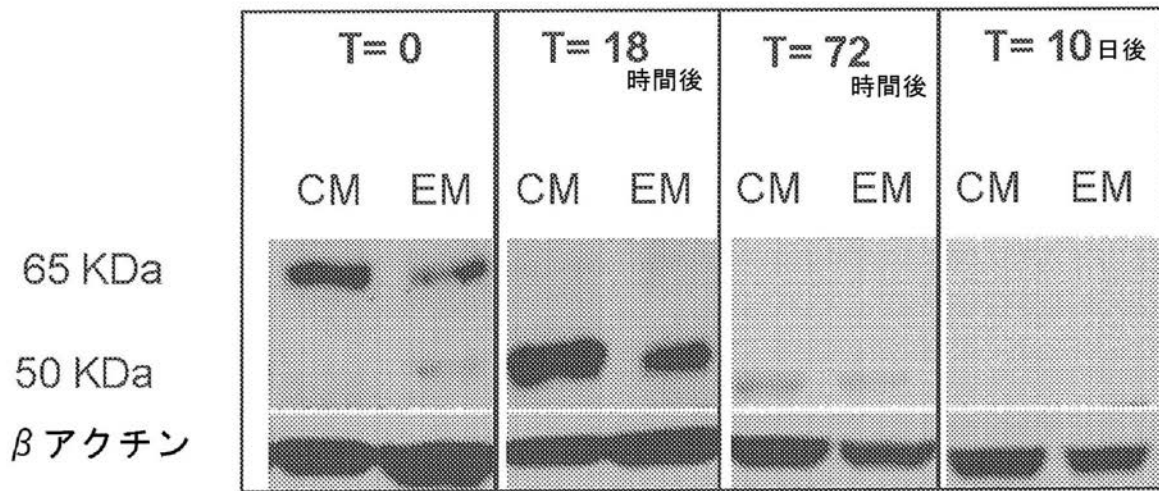
【図 9】



【図 10】



【図 1 1】



【配列表】

[2016510594000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/020936

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/00 A61K35/14 C12N5/0783
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 C12N

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2007/034480 A2 (UNIV CARMEL HAIFA ECONOMIC COR [IL]; RAPPAPORT FAMILY INST FOR RES [IL] 29 March 2007 (2007-03-29) page 5, lines 20-24 page 16, lines 22-25 page 23, line 17 - page 24, line 16 page 26, lines 16-24 page 27, line 17 - page 28, line 8 page 30, lines 12-20 example 3 page 44, lines 10-18</p> <p>----- -/--</p>	1,6,7, 11-15

☒ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 June 2014

Date of mailing of the international search report

25/06/2014

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

Noë, Veerle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/020936

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SATO MAYUMI ET AL: "Subcellular localization of human heparanase and its alternative splice variant in COS-7 cells", CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION, BUTTERWORTH, GUILDFORD, GB, vol. 26, no. 6, 1 August 2008 (2008-08-01) , pages 676-683, XP009146729, ISSN: 0263-6484, DOI: 10.1002/CBF.1492 abstract page 678, column 2, last paragraph -----	1
X	CAI YONG-GUO ET AL: "Dendritic cells reconstituted with a human heparanase gene induce potent cytotoxic T-cell responses against gastric tumor cells in vitro", TUMOR BIOLOGY, vol. 28, no. 4, 2007, pages 238-246, XP008169823, ISSN: 1010-4283 abstract page 241, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1 -----	1,6,7, 11-15
X	WO 2012/033885 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE [US]; BRENNER MALCOLM [US]; DOTTI GIANPIETRO []) 15 March 2012 (2012-03-15) abstract paragraphs [0006] - [0009], [0013], [0076]; claim 1 -----	1-17
X	MARTIN A PULE ET AL: "Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma", NATURE MEDICINE, vol. 14, no. 11, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 1264-1270, XP0055021755, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.1882 the whole document -----	1-17
X,P	CARUANA IGNAZIO ET AL: "Restored Expression of Heparanase in Tumor Specific T Cells Enhances Their Antitumor Effects in Neuroblastoma", MOLECULAR THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 21, no. Suppl. 1, 18 May 2013 (2013-05-18), page S151, XP008169825, ISSN: 1525-0016 the whole document ----- -/--	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/020936

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>V. HOYOS ET AL: "Genetic modification of human T lymphocytes for the treatment of hematologic malignancies", HAEMATOLOGICA, vol. 97, no. 11, 28 August 2012 (2012-08-28), pages 1622-1631, XP055122202, ISSN: 0390-6078, DOI: 10.3324/haematol.2012.064303 page 1628, column 2, paragraph 3 - page 1629, column 1</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>LIDER O ET AL: "Inhibition of T lymphocyte heparanase by heparin prevents T cell migration and T cell-mediated immunity", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 20, no. 3, 1 March 1990 (1990-03-01), pages 493-499, XP002094004, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/EJI.1830200306 abstract</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>VLODAVSKY I ET AL: "EXPRESSION OF HEPARANASE BY PLATELETS AND CIRCULATING CELLS OF THE IMMUNE SYSTEM: POSSIBLE INVOLVEMENT IN DIAPEDESIS AND EXTRAVASATION", INVASION METASTASIS, S. KARGER, BASEL, CH, vol. 12, no. 2, 1 March 1992 (1992-03-01), pages 112-127, XP001106180, ISSN: 0251-1789 the whole document</p> <p>-----</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/020936

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007034480 A2	29-03-2007	US 2008248020 A1 WO 2007034480 A2	09-10-2008 29-03-2007
WO 2012033885 A1	15-03-2012	EP 2614143 A1 US 2014004132 A1 WO 2012033885 A1	17-07-2013 02-01-2014 15-03-2012

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, LT, 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

(72)発明者 マルケッティ、ダリオ

アメリカ合衆国 テキサス州 77986、シーブルック、2554 デュラク トレイル

(72)発明者 カルアーナ、イニャツィオ

アメリカ合衆国 テキサス州 77030、ヒューストン、ワン ベイラー プラザ

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA12 CA04 CA20 DA03 EA04 GA11 HA17

4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA44

4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 NA05 ZB26