(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7426361号
(P7426361)

(45)発行日　令和6年2月1日(2024.2.1)

(24)登録日　令和6年1月24日(2024.1.24)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12N 5/0783(2010.01)		C12N	5/0783	
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z ZNA
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13	
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	

請求項の数　13　外国語出願　（全91頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-146980(P2021-146980)
(22)出願日　令和3年9月9日(2021.9.9)
(62)分割の表示　特願2019-165362(P2019-165362)の分割
原出願日　平成23年12月9日(2011.12.9)
(65)公開番号　特開2022-2516(P2022-2516A)
(43)公開日　令和4年1月11日(2022.1.11)
審査請求日　令和3年10月4日(2021.10.4)
(31)優先権主張番号　61/502,649
(32)優先日　平成23年6月29日(2011.6.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/421,470
(32)優先日　平成22年12月9日(2010.12.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
最終頁に続く

(73)特許権者　500429103
ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ ペンシルバニア
アメリカ合衆国 １９１０４ ペンシルベニア州 フィラデルフィア シビック センター ブールバード ３６００ ナインス フロア
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100141195
弁理士　西澤 恵美子
(72)発明者　ジューン カール エイチ.
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 メリ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　癌を治療するためのキメラ抗原受容体改変Ｔ細胞の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含むヒトT細胞を含む、ヒト患者における血液悪性腫瘍を治療するための医薬組成物であって、

前記CARが、SEQ ID NO：20のアミノ酸配列を含むCD19抗原結合ドメインと、CD8α膜貫通ドメインと、CD8αヒンジドメインと、4-1BB共刺激シグナル伝達領域と、CD3ζシグナル伝達ドメインとを含み、

前記CD19抗原結合ドメインが、SEQ ID NO：14の核酸配列を含む核酸にコードされるものである、医薬組成物。

【請求項２】

前記CD8α膜貫通ドメインが、SEQ ID NO：22のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項３】

前記CD8α膜貫通ドメインが、SEQ ID NO：16の核酸配列を含む核酸にコードされるものである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項４】

前記CD8αヒンジドメインが、SEQ ID NO：21のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項５】

前記CD8αヒンジドメインが、SEQ ID NO：15の核酸配列を含む核酸にコードされる

ものである、請求項1に記載の医薬組成物。
【請求項６】
前記4-1BB共刺激シグナル伝達領域が、SEQ ID NO：23のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の医薬組成物。
【請求項７】
前記4-1BB共刺激シグナル伝達領域が、SEQ ID NO：17の核酸配列を含む核酸にコードされるものである、請求項1に記載の医薬組成物。
【請求項８】
キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含むヒトT細胞を含む、ヒト患者における血液悪性腫瘍を治療するための医薬組成物であって、
前記CARが、SEQ ID NO：14の核酸配列を含む核酸にコードされるCD19抗原結合ドメインと、SEQ ID NO：16の核酸配列を含む核酸にコードされるCD8α膜貫通ドメインと、SEQ ID NO：15の核酸配列を含む核酸にコードされるCD8αヒンジドメインと、SEQ ID NO：17の核酸配列を含む核酸にコードされる4-1BB共刺激シグナル伝達領域と、CD3ζシグナル伝達ドメインとを含む、医薬組成物。
【請求項９】
前記ヒトT細胞が、さらに、前記CARをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含むベクターを含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
前記プロモーターがEF-1αプロモーターである、請求項9に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
前記EF-1αプロモーターが、SEQ ID NO：7の核酸配列を含む、請求項10に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
前記ヒトT細胞が、血液悪性腫瘍を患うヒトに由来する、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病または急性リンパ性白血病である、請求項1～12のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、2010年12月9日に提出された米国仮出願第61／421,470号、および2011年6月2
9日に提出された米国仮出願第61／502,649号の優先権を主張し、これらはすべて、その全
体が参照により本明細書に組み入れられる。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
慢性リンパ性白血病（CLL）を含むB細胞悪性腫瘍を有する患者の大多数は、その疾患のために死亡すると考えられる。これらの患者を治療するための1つのアプローチは、キメラ抗原受容体（CAR）の発現を通じて、腫瘍細胞上に発現される抗原を標的とするようにT細胞を遺伝子改変することである。CARは、細胞表面抗原をヒト白血球抗原に依存しない様式で認識するように設計された抗原受容体である。CARを発現する遺伝子改変細胞を、これらの型の患者を治療するために用いる取り組みは、極めて限定的な成果しか上げていない。例えば、Brentjens et al., 2010, Molecular Therapy, 18:4, 666-668；Morgan e
t al., 2010, Molecular Therapy, published online February 23, 2010, pages 1-9；

および、Till et al., 2008, Blood, 112:2261-2271（非特許文献1～3）を参照。
【０００３】
ほとんどの癌では、腫瘍特異的抗原はまだあまり明確になっていないが、B細胞悪性腫瘍では、CD19が注目される腫瘍標的である。CD19の発現は正常B細胞および悪性B細胞に限
られ（Uckun, et al. Blood, 1988, 71:13-29（非特許文献4））、そのため、CD19はCAR
を安全に試験するための標的として広く受け入れられている。CARは内因性T細胞受容体と類似した様式でT細胞活性化を誘発しうるものの、CAR+ T細胞のインビボでの増大（expan
sion）が限定的なこと、輸注後の細胞の急速な消失、および臨床活性が期待にそぐわないことが、この技術の臨床適用に対する主な障害となっている（Jena, et al., Blood, 2010, 116:1035-1044（非特許文献5）；非特許文献4）。
【０００４】
このため、インビボで増大（expand）しうるCARを用いる癌の治療のための組成物および方法が、当技術分野では至急求められている。本発明はこの要求に応える。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００５】
【文献】Brentjens et al., 2010, Molecular Therapy, 18:4, 666-668
【文献】Morgan et al., 2010, Molecular Therapy, published online February 23, 2010, pages 1-9
【文献】Till et al., 2008, Blood, 112:2261-2271
【文献】Uckun, et al. Blood, 1988, 71:13-29
【文献】Jena, et al., Blood, 2010, 116:1035-1044
【発明の概要】
【０００６】
本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする単離された核酸配列であって、CARが
抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、該CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含む
、単離された核酸配列を提供する。
【０００７】
1つの態様において、核酸配列は、SEQ ID NO：12のアミノ酸配列を含むCARをコードす
る。
【０００８】
1つの態様において、CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO：8の核酸配列を含む。
【０００９】
1つの態様において、CARにおける抗原結合ドメインは、抗体またはその抗原結合フラグメントである。好ましくは、抗原結合フラグメントはFabまたはscFvである。
【００１０】
1つの態様において、CARにおける抗原結合ドメインは腫瘍抗原と結合する。1つの態様において、腫瘍抗原は血液悪性腫瘍と関連する。もう1つの態様において、腫瘍抗原は固形腫瘍と関連する。さらにもう1つの態様において、腫瘍抗原は、CD19、CD20、CD22、ROR
1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR
、MAGE A3 TCR、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【００１１】
1つの態様において、CARにおける共刺激シグナル伝達領域は、CD27、CD28、4-1BB、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、CD83と特異的に結合するリガンド、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む。
【００１２】
1つの態様において、CARにおけるCD3ζシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO：18の核酸配列によってコードされる。
【００１３】
本発明はまた、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3ζシグナル伝達ドメインを含む単離されたCARであって、該CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含む、CARも提供する。
【００１４】
本発明はまた、CARをコードする核酸配列を含む細胞であって、CARが抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含む、細胞も提供する。
【００１５】
1つの態様において、CARを含む細胞は、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、および調節性T細胞からなる群より選択される。
【００１６】
1つの態様において、CARを含む細胞は、CARの抗原結合ドメインがその対応する抗原と結合した場合に抗腫瘍免疫を呈する。
【００１７】
本発明はまた、CARをコードする核酸配列を含むベクターであって、CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域およびCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、該CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含む、ベクターも提供する。
【００１８】
本発明はまた、哺乳動物において標的細胞集団または組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法も提供する。1つの態様において、本方法は、CARを発現するように遺伝子改変された細胞の有効量を哺乳動物に投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、該抗原結合ドメインが該標的細胞集団または組織を特異的に認識するように選択される。
【００１９】
本発明はまた、哺乳動物において抗腫瘍免疫を与える方法も提供する。1つの態様において、本方法は、CARを発現するように遺伝子改変された細胞の有効量を哺乳動物に投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、それにより、該哺乳動物において抗腫瘍免疫を与える。
【００２０】
本発明はまた、腫瘍抗原の発現亢進と関連する疾患、障害または病状を有する哺乳動物

を治療する方法も提供する。1つの態様において、本方法は、CARを発現するように遺伝子改変された細胞の有効量を哺乳動物に投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝
達ドメインを含み、それにより、該哺乳動物を治療する。

【００２１】

1つの態様において、細胞は自己T細胞である。

【００２２】

1つの態様において、腫瘍抗原は、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra
、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR、およびこれ
らの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【００２３】

本発明はまた、慢性リンパ性白血病を有するヒトを治療する方法も提供する。1つの態様において、本方法は、CARを発現するように遺伝子操作されたT細胞をヒトに投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24
のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含む。

【００２４】

1つの態様において、ヒトは少なくとも1つの化学療法薬に対して抵抗性である。

【００２５】

1つの態様において、慢性リンパ性白血病は治療抵抗性のCD19+白血病およびリンパ腫で
ある。

【００２６】

本発明はまた、癌と診断されたヒトにおいて、遺伝子操作されたT細胞の存続集団（persisting population）を生じさせる方法も含む。1つの態様において、本方法は、CARを発現するように遺伝子操作されたT細胞をヒトに投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグ
ナル伝達ドメインを含み、遺伝子操作されたT細胞の存続集団は、投与後少なくとも1カ月間にわたってヒトの内部で存続する。

【００２７】

1つの態様において、遺伝子操作されたT細胞の存続集団は、ヒトに投与されたT細胞、該ヒトに投与されたT細胞の子孫、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの細胞を含む。

【００２８】

1つの態様において、遺伝子操作されたT細胞の存続集団は、メモリーT細胞を含む。

【００２９】

1つの態様において、遺伝子操作されたT細胞の存続集団は、投与後少なくとも3カ月間にわたってヒトの内部で存続する。もう1つの態様において、遺伝子操作されたT細胞の存続集団は、投与後少なくとも4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間
、
10カ月間、11カ月間、12カ月間、2年間または3年間にわたってヒトの内部で存続する。

【００３０】

1つの態様においては、慢性リンパ性白血病が治療される。

【００３１】

本発明はまた、癌と診断されたヒトにおいて、遺伝子操作されたT細胞の集団を増大させる方法も提供する。1つの態様において、本方法は、CARを発現するように遺伝子操作さ

れたT細胞をヒトに投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、
投与された該遺伝子操作されたT細胞は、ヒトにおいて子孫T細胞の集団を生成する。
【００３２】
1つの態様において、ヒトにおける子孫T細胞はメモリーT細胞を含む。
【００３３】
1つの態様において、T細胞は自己T細胞である。
【００３４】
もう1つの態様において、ヒトは少なくとも1つの化学療法薬に対して抵抗性である。
【００３５】
1つの態様において、癌は慢性リンパ性白血病である。もう1つの態様において、慢性リンパ性白血病は治療抵抗性のCD19+白血病およびリンパ腫である。
【００３６】
1つの態様において、子孫T細胞の集団は、投与後少なくとも3カ月間にわたってヒトの内部で存続する。もう1つの態様において、子孫T細胞の集団は、投与後少なくとも4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、2
年間または3年間にわたってヒトの内部で存続する。
【００３７】
1つの態様においては、癌が治療される。
【図面の簡単な説明】
【００３８】
本発明の好ましい態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことにより、より良く理解されるであろう。本発明を実例で説明するために、現時点で好ましい態様を図面として示している。しかし、本発明は、図面中に示された態様の厳密な配置および手段には限定されないことが理解されるべきである。
【図１Ａ】遺伝子移入ベクターおよび導入遺伝子の画像である。主要な機能的エレメントを示している、レンチウイルスベクターおよび導入遺伝子を描写している。FMC63マウスモノクローナル抗体由来の抗CD19 scFv、ヒトCD8αのヒンジおよび膜貫通ドメイン、ならびにヒト4-1BBおよびCD3ζのシグナル伝達ドメインの発現を導く、水疱性口内炎ウイルスプロテインGの偽型臨床グレードレンチウイルスベクター（pELPs 19BBzと命名）を作製した。導入遺伝子の構成性発現は、EF-1α（伸長因子-1αプロモーター）；LTR、長末端反復配列；RRE、rev応答エレメント（cPPT）およびセントラルターミネーション配列（CTS）を含めることによって導いた。図は正確な縮尺通りではない。
【図１Ｂ】遺伝子改変T細胞の製造の一連の画像である。T細胞の製造を描写している。自己細胞をアフェレーシスを介して入手し、T細胞を単核細胞の水簸によって濃縮し、洗浄した上で、残留性の白血病細胞を、陽性選択およびT細胞の活性化のための抗CD3／CD28でコーティングした常磁性ビーズの添加によって枯渇させた。細胞活性化の時点でレンチウイルスベクターを添加し、培養開始後の第3日に洗浄除去した。細胞を揺動式プラットフォーム装置（WAVE Bioreactor System）にて8～12日間増大させた。培養の最終日に、磁場に通過させることによってビーズを除去し、CART19 T細胞を採取して、輸注可能な媒体中で凍結保存した。
【図１Ｃ】臨床試験プロトコールのデザインの略図の一連の画像である。臨床試験プロトコールのデザインを描写している。患者に対して記載の通りのリンパ除去化学療法を行い、その後に1回目のCART19輸注を、静脈内への自然流下（gravity flow drip）によって15～20分の期間にわたって行った。輸注は、化学療法の完了後1～5日の時点で開始する、3日間にわたる分割投与アプローチ（10%、30%、60%）を用いて行った。エンドポイントアッセイを試験第4週に実施した。能動的モニタリングの完了時に、対象を、FDAの指導に準拠した長期経過観察のための恒久的プロトコールに移行させた。

【図２Ａ】血液におけるCART19細胞の持続的なインビボ増大および存続性を明示している一連の画像である。UPN 01から入手した試料である、全血から単離されたDNAを、CART19配列を検出および定量するための認定アッセイを用いるQ-PCR分析に一括して供した。各データポイントは100～200ngのゲノムDNAに対する3件ずつの測定値の平均を表しており、最大% CVは1.56%未満であった。アッセイの合格／不合格パラメーターには、増幅の勾配および効率、ならびに参照基準試料の増幅に関してあらかじめ定めた範囲を含めた。標準曲線の範囲によって確定されたアッセイの定量下限は、導入遺伝子2コピー／μgゲノムDNAであった；その数を下回る試料の値は推定値とみなし、反復試験値（replicate）3件のうち少なくとも2件で、15%の値を% CVに用いてCt値が生成される場合に提示した。CART19細胞は、第0日、第1日および第2日に輸注した。

【図２Ｂ】血液におけるCART19細胞の持続的なインビボ増大および存続性を明示している一連の画像である。UPN 02から入手した試料である、全血から単離されたDNAを、CART19配列を検出および定量するための認定アッセイを用いるQ-PCR分析に一括して供した。各データポイントは100～200ngのゲノムDNAに対する3件ずつの測定値の平均を表しており、最大% CVは1.56%未満であった。アッセイの合格／不合格パラメーターには、増幅の勾配および効率、ならびに参照基準試料の増幅に関してあらかじめ定めた範囲を含めた。標準曲線の範囲によって確定されたアッセイの定量下限は、導入遺伝子2コピー／μgゲノムDNAであった；その数を下回る試料の値は推定値とみなし、反復試験値（replicate）3件のうち少なくとも2件で、15%の値を% CVに用いてCt値が生成される場合に提示した。CART19細胞は、第0日、第1日、第2日および第11日に輸注した。

【図２Ｃ】血液におけるCART19細胞の持続的なインビボ増大および存続性を明示している一連の画像である。UPN 03から入手した試料である、全血から単離されたDNAを、CART19配列を検出および定量するための認定アッセイを用いるQ-PCR分析に一括して供した。各データポイントは100～200ngのゲノムDNAに対する3件ずつの測定値の平均を表しており、最大% CVは1.56%未満であった。アッセイの合格／不合格パラメーターには、増幅の勾配および効率、ならびに参照基準試料の増幅に関してあらかじめ定めた範囲を含めた。標準曲線の範囲によって確定されたアッセイの定量下限は、導入遺伝子2コピー／μgゲノムDNAであった；その数を下回る試料の値は推定値とみなし、反復試験値（replicate）3件のうち少なくとも2件で、15%の値を% CVに用いてCt値が生成される場合に提示した。CART19細胞は、第0日、第1日および第2日に輸注した。

【図２Ｄ】骨髄におけるCART19細胞の持続的なインビボ増大および存続性を明示している一連の画像である。UPN 01から入手した試料である、骨髄から単離されたDNAを、CART19配列を検出および定量するための認定アッセイを用いるQ-PCR分析に一括して供した。各データポイントは100～200ngのゲノムDNAに対する3件ずつの測定値の平均を表しており、最大% CVは1.56%未満であった。アッセイの合格／不合格パラメーターには、増幅の勾配および効率、ならびに参照基準試料の増幅に関してあらかじめ定めた範囲を含めた。標準曲線の範囲によって確定されたアッセイの定量下限は、導入遺伝子2コピー／μgゲノムDNAであった；その数を下回る試料の値は推定値とみなし、反復試験値（replicate）3件のうち少なくとも2件で、15%の値を% CVに用いてCt値が生成される場合に提示した。CART19細胞は、第0日、第1日および第2日に輸注した。

【図２Ｅ】骨髄におけるCART19細胞の持続的なインビボ増大および存続性を明示している一連の画像である。UPN 02から入手した試料である、骨髄から単離されたDNAを、CART19配列を検出および定量するための認定アッセイを用いるQ-PCR分析に一括して供した。各データポイントは100～200ngのゲノムDNAに対する3件ずつの測定値の平均を表しており、最大% CVは1.56%未満であった。アッセイの合格／不合格パラメーターには、増幅の勾配および効率、ならびに参照基準試料の増幅に関してあらかじめ定めた範囲を含めた。標準曲線の範囲によって確定されたアッセイの定量下限は、導入遺伝子2コピー／μgゲノムDNAであった；その数を下回る試料の値は推定値とみなし、反復試験値（replicate）3件のうち少なくとも2件で、15%の値を% CVに用いてCt値が生成される場合に提示した。CART19細胞は、第0日、第1日、第2日および第11日に輸注した。

【図２Ｆ】骨髄におけるCART19細胞の持続的なインビボ増大および存続性を明示している一連の画像である。UPN 03から入手した試料である、骨髄から単離されたDNAを、CART19配列を検出および定量するための認定アッセイを用いるQ-PCR分析に一括して供した。各データポイントは100～200ngのゲノムDNAに対する3件ずつの測定値の平均を表しており、最大% CVは1.56%未満であった。アッセイの合格／不合格パラメーターには、増幅の勾配および効率、ならびに参照基準試料の増幅に関してあらかじめ定めた範囲を含めた。標準曲線の範囲によって確定されたアッセイの定量下限は、導入遺伝子2コピー／μgゲノムDNAであった；その数を下回る試料の値は推定値とみなし、反復試験値（replicate）3件のうち少なくとも2件で、15%の値を% CVに用いてCt値が生成される場合に提示した。CART19細胞は、第0日、第1日および第2日に輸注した。

【図３Ａ】CAR T細胞の輸注の前後の血清のサイトカインを明示している画像である；CART19細胞の輸注後の表記の日における、UPN 01における、血清サイトカイン、ケモカインおよびサイトカイン受容体の変化の長期間にわたる測定値の連続的評価。試料を、Luminexビーズアレイ技術、ならびに組み立て済みの検証された多重キットを用いる多重分析に供した。変化倍数が3以上であった分析物を表示し、ベースラインからの相対的変化としてプロットした。各時点での各分析物に関する絶対値を、組換えタンパク質を利用した8点の3倍希釈系列にわたる標準曲線から導き出し、標準曲線に関して観測／期待されるカットオフ値の80～120%によって定量上限および定量下限（ULOQ、LLOQ）を決定した。試料を2件ずつ評価して平均値を算出しており、% CVは大半のケースで10%未満であった。絶対値に関する広範囲の状況での連結データ提示に対応するように、データは各分析物に関するベースライン値に対する変化倍数として提示している。ベースライン値が検出不能であった場合には、最小標準曲線値の2分の1をベースライン値として用いた。分析物に関する標準曲線の範囲およびベースライン（第0日の）値（UPN01について括弧内に記載）、いずれもpg／ml単位：IL1-Rα：35.5～29,318（689）；IL-6：2.7～4,572（7）；IFN-γ：11.2～23,972（2.8）；CXCL10：2.1～5,319（481）；MIP-1β：3.3～7,233（99.7）；MCP-1：4.8～3,600（403）；CXCL9：48.2～3,700（1,412）；IL2-Rα：13.4～34,210（4,319）；IL-8：2.4～5,278（15.3）；lL-10：6.7～13,874（8.5）；MIP-1α：7.1～13,778（57.6）。

【図３Ｂ】CAR T細胞の輸注の前後の血清のサイトカインを明示している画像である；CART19細胞の輸注後の表記の日における、UPN 02における、血清サイトカイン、ケモカインおよびサイトカイン受容体の変化の長期間にわたる測定値の連続的評価。試料を、Luminexビーズアレイ技術、ならびに組み立て済みの検証された多重キットを用いる多重分析に供した。変化倍数が3以上であった分析物を表示し、ベースラインからの相対的変化としてプロットした。各時点での各分析物に関する絶対値を、組換えタンパク質を利用した8点の3倍希釈系列にわたる標準曲線から導き出し、標準曲線に関して観測／期待されるカットオフ値の80～120%によって定量上限および定量下限（ULOQ、LLOQ）を決定した。試料を2件ずつ評価して平均値を算出しており、% CVは大半のケースで10%未満であった。絶対値に関する広範囲の状況での連結データ提示に対応するように、データは各分析物に関するベースライン値に対する変化倍数として提示している。ベースライン値が検出不能であった場合には、最小標準曲線値の2分の1をベースライン値として用いた。分析物に関する標準曲線の範囲およびベースライン（第0日の）値（UPN02について括弧内に記載）、いずれもpg／ml単位：IL1-Rα：35.5～29,318（301）；IL-6：2.7～4,572（10.1）；IFN-γ：11.2～23,972（ND）；CXCL10：2.1～5,319（115）；MIP-1β：3.3～7,233（371）；MCP-1：4.8～3,600（560）；CXCL9：48.2～3,700（126）；IL2-Rα：13.4～34,210（9,477）；IL-8：2.4～5,278（14.5）；lL-10：6.7～13,874（5.4）；MIP-1α：7.1～13,778（57.3）。

【図３Ｃ】CAR T細胞の輸注の前後の血清のサイトカインを明示している画像である；CART19細胞の輸注後の表記の日における、UPN 03における、血清サイトカイン、ケモカインおよびサイトカイン受容体の変化の長期間にわたる測定値の連続的評価。試料を、Luminexビーズアレイ技術、ならびに組み立て済みの検証された多重キットを用いる多重分析

に供した。変化倍数が3以上であった分析物を表示し、ベースラインからの相対的変化としてプロットした。各時点での各分析物に関する絶対値を、組換えタンパク質を利用した8点の3倍希釈系列にわたる標準曲線から導き出し、標準曲線に関して観測／期待されるカットオフ値の80～120%によって定量上限および定量下限（ULOQ、LLOQ）を決定した。試料を2件ずつ評価して平均値を算出しており、% CVは大半のケースで10%未満であった。絶対値に関する広範囲の状況での連結データ提示に対応するように、データは各分析物に関するベースライン値に対する変化倍数として提示している。ベースライン値が検出不能であった場合には、最小標準曲線値の2分の1をベースライン値として用いた。分析物に関する標準曲線の範囲およびベースライン（第0日の）値（UPN03について括弧内に記載）、いずれもpg／ml単位：IL1-Rα：35.5～29,318（287）；IL-6：2.7～4,572（8.7）；IFN-γ：11.2～23,972（4.2）；CXCL10：2.1～5,319（287）；MIP-1β：3.3～7,233（174）；MCP-1：4.8～3,600（828）；CXCL9：48.2～3,700（177）；IL2-Rα：13.4～34,210（610）；IL-8：2.4～5,278（14.6）；lL-10：6.7～13,874（0.7）；MIP-1α：7.1～13,778（48.1）。

【図３Ｄ】CAR T細胞の輸注の前後の骨髄のサイトカインを明示している画像である；CART19細胞の輸注後の表記の日における、UPN 03由来の骨髄における血清サイトカイン、ケモカインおよびサイトカイン受容体の連続的評価。試料を、Luminexビーズアレイ技術、ならびに組み立て済みの検証された多重キットを用いる多重分析に供した。変化倍数が3以上であった分析物を表示し、絶対値としてプロットした。各時点での各分析物に関する絶対値を、組換えタンパク質を利用した8点の3倍希釈系列にわたる標準曲線から導き出し、標準曲線に関して観測／期待されるカットオフ値の80～120%によって定量上限および定量下限（ULOQ、LLOQ）を決定した。試料を2件ずつ評価して平均値を算出しており、% CVは大半のケースで10%未満であった。絶対値に関する広範囲の状況での連結データ提示に対応するように、データは各分析物に関するベースライン値に対する変化倍数として提示している。ベースライン値が検出不能であった場合には、最小標準曲線値の2分の1をベースライン値として用いた。分析物に関する標準曲線の範囲およびベースライン（第0日の）値（UPN03について括弧内に記載）、いずれもpg／ml単位：IL1-Rα：35.5～29,318（287）；IL-6：2.7～4,572（8.7）；IFN-γ：11.2～23,972（4.2）；CXCL10：2.1～5,319（287）；MIP-1β：3.3～7,233（174）；MCP-1：4.8～3,600（828）；CXCL9：48.2～3,700（177）；IL2-Rα：13.4～34,210（610）；IL-8：2.4～5,278（14.6）；lL-10：6.7～13,874（0.7）；MIP-1α：7.1～13,778（48.1）。

【図４】図4A～4Dで構成される図4は、インビボでの長期にわたる表面CART19発現および機能的なメモリーCARの樹立を描写している一連の画像である。図4Aは、CARを発現するCD3+リンパ球の検出、ならびに末梢および骨髄におけるB細胞の欠如を描写している。CART19細胞輸注後の第169日にUPN 03から入手した、新たに処理した末梢血または骨髄の単核細胞を、CAR19の表面発現（上）またはB細胞の存在（下）に関して、フローサイトメトリーによって評価した；対照として、健常ドナーND365から入手したPBMCを染色した。CD3+細胞集団およびB細胞集団に対するゲーティング戦略を図9に提示している。CD3+リンパ球におけるCAR19発現を評価するために、試料をCD14-PE-Cy7およびCD16-PE-Cy7（ダンプチャンネル）ならびにCD3-FITCに対する抗体で共染色し、CD3+に対する陽性ゲーティングを行い、CD8+およびCD8-リンパ球区画におけるCAR19発現に関して、CD8a-PEおよびAlexa-647結合抗CAR19イディオタイプ抗体による共染色によって評価した。プロット内のデータはダンプチャンネル陰性／CD3陽性細胞集団に対してゲーティングされている。B細胞の存在を評価するために、試料をCD14-APCおよびCD3-FITCに対する抗体で共染色し（ダンプチャンネル）、CD20-PEおよびCD19-PE-Cy-7に対する抗体による共染色によって、ダンプチャンネル陰性画分におけるB細胞の存在に関して評価した。いずれの場合にも、図4Bおよび4Cに描写されているように、非染色対照に対する陰性ゲート象限が確定された。CD4+（図4B）およびCD8+（図4C）T細胞サブセットのT細胞免疫表現型判定を示している。T細胞輸注後の第56日および第169日にアフ

ェレーシスによって入手したUPN 03由来の凍結末梢血試料を、因子を添加せずに培地中に一晩静置し、洗浄して、T細胞の記憶、活性化および枯渇のマーカーの発現に関する多パラメーター免疫表現型判定に供した。図8に描写したようなゲーティング戦略は、ダンプチャンネル（CD14、CD16、Live／Dead Aqua）陰性およびCD3陽性の細胞に対する初期ゲーティング、ならびにその後のCD4+およびCD8+細胞に対する陽性ゲートを伴う。ゲートおよび象限は、FMO対照（CAR、CD45RA、PD-1、CD25、CD127、CCR7）を用いて、または陽性細胞集団（CD3、CD4、CD8）および明確に描出されるサブセット（CD27、CD28、CD57）に対するゲーティングによって確定された；データは、事象の客観的可視化のための二指数（bi-exponential）変換後に提示した。図4Dは、存続CAR細胞の機能的応答能（competence）を描写している。T細胞輸注後の第56日および第169日にアフェレーシスによって入手したUPN 03由来の凍結末梢血試料を、因子を加えずに培地中で一晩静置し、洗浄した上で、CD19を発現する標的細胞を認識する能力を、CD107脱顆粒アッセイを用いてエクスビボで直接的に評価した。抗CD28、抗CD49dおよびCD107-FITCの存在下における2時間のインキュベーション後に、細胞混合物を採取し、洗浄して、CART19細胞がCD19を発現する標的に対して反応して脱顆粒を行う能力を評価するための多パラメーターフローサイトメトリー分析に供した。ゲーティング戦略には、ダンプチャンネル（CD14-PE-Cy7、CD16-PE-Cy7、Live／Dead Aqua）陰性およびCD3-PE-陽性の細胞に対する初期ゲート、ならびにその後のCD8-PE-テキサスレッド陽性細胞に対するゲーティングを含めた；提示されているデータは、CD8+ゲート集団に関するものである。いずれの場合にも、陰性ゲート象限が非染色対照に対して確定された。

【図５Ａ】CART19細胞の輸注後の臨床的奏効を評価する実験の結果を描写している画像である。UPN 02を、2サイクルのリツキシマブおよびベンダムスチンで治療したところ、奏効がわずかであったことを描写している（R／B、矢印）。ベンダムスチンのみの投与の4日後から、CART19 T細胞を輸注した（B、矢印）。リツキシマブおよびベンダムスチンに対して抵抗性の白血病は、輸注から18日以内にリンパ球絶対数（ALC）が60,600／μlから200／μlに減少したことによって指し示されるように、血液から急速に除去された。疲労感および非感染性発熱症候群を理由として、輸注後の第18日にコルチコステロイド治療を開始した。基準線（点線）は、ALCに関する正常上限を指し示している。

【図５Ｂ】CART19細胞の輸注後の臨床的奏効を評価する実験の結果を描写している画像である。患者UPN 01および03由来の連続的な骨髄生検試料または血塊標本をCD20に関して染色した実験例の結果を描写している。両方の患者に存在した白血病の治療前浸潤は治療後標本には存在せず、これは細胞密度（cellularity）および三血球系造血の正常化を伴った。UPN 01は骨髄中にも血液中にも、フローサイトメトリー、細胞遺伝学検査および蛍光インサイチューハイブリダイゼーションによる評価で検出されるCLL細胞も、フローサイトメトリーによって検出される正常B細胞も有しなかった。UPN 03は、第+23日のフローサイトメトリーによって、残留性の正常CD5陰性B細胞を5％有することが確かめられ、それらがポリクローナル性であることも示された；第+176日に正常B細胞は検出されなかった。

【図５Ｃ】CART19細胞の輸注後の臨床的奏効を評価する実験の結果を描写している画像である。化学療法抵抗性の全身性リンパ節症の急速な消散を評価するために連続CTイメージングを用いた実験の結果を描写している。両側性の腋窩腫瘤が、矢印および丸印によって指し示されるように、輸注後の第83日（UPN 01）および第31日（UPN 03）までに消散した。

【図６】図6A～6Cで構成される図6は、UPN 01、02、03について流血中のリンパ球絶対数および総CART19+細胞を描写している一連の画像である。対象3人全員について、CBC値によるリンパ球絶対数を用い、かつ血液容量5.0Lと仮定した上で、流血中のリンパ球の総数（正常細胞とCLL細胞の合計）を総CART19+細胞に対してプロットしている。流血中のCART19細胞の総数は、図2に描写したように、タンデムCBC値をリンパ球絶対数およびQ-PCR表示値とともに用いることによって算出し、本明細書中の別所に記載したようにして、コピー数／ng DNAを平均％表示値に換算した。Q-PCR ％表示値は、輸注製剤

のフローサイトメトリー特性、およびCART19細胞を染色によって直接的に計数するための同時フローサイトメトリーデータが入手可能であった試料からのデータとよく相関すること（偏差の2倍未満）が見いだされた。

【図７】図7A～7Dで構成される図7は、T細胞輸注後71日のUPN-01 PBMCにおけるCART19陽性細胞の直接的なエクスビボ検出を伴う実験を描写している一連の画像である。輸注後の第71日にアフェレーシス直後に収集したか、またはアフェレーシス時点でT細胞製剤の製造のために凍結して（ベースライン）、染色前に生存性を保って解凍したかのいずれかであるUPN-01 PBMCを、CAR19モイエティーを表面で発現するCART19細胞の存在を検出するためのフローサイトメトリー分析に供した。リンパ球におけるCAR19の発現を評価するために、試料をCD3-PEおよびAlexa-647結合抗CAR19イディオタイプ抗体で共染色するか、またはCD3-PEのみ（CAR19に対してはFMO）で共染色した。図7Aは、初期リンパ球ゲートを前方散乱および側方散乱（FSC 対 SSC）に基づいて確定し、その後にCD3+細胞に対するゲーティングを行ったことを描写している。図7BはCD3+リンパ球ゲートを描写している；図7CはCARイディオタイプ染色を描写している；図7Dは、CARイディオタイプFMOを描写している。CAR19陽性ゲートが、CAR19 FMO試料に対して確定された。

【図８】図8A～8Cで構成される図8は、UPN 03血液標本において多染性フローサイトメトリーを用いることによってCART19発現を同定するためのゲーティング戦略を描写している一連の画像である。図8Cに関するゲーティング戦略はUPN 03の第56日試料について示されており、これはUPN 03の第169日試料に対して用いた戦略の代表である。図8Aは一次ゲートを描写している：ダンプ（CD14、CD16、LIVE／dead Aqua）陰性、CD3陽性。図8Bは二次ゲートを描写している：CD4陽性、CD8陽性。図8Cは三次ゲートを描写している：CAR19陽性およびCAR19陰性、これはCAR FMO試料（最も右側のパネル）に対して確定された。

【図９】血液標本および骨髄標本におけるCART19発現およびB細胞を直接同定するためのゲーティング戦略を描写している。末梢および骨髄における、CARを発現するCD3+リンパ球の検出およびB細胞の欠如を示している、図4Aに関するゲーティング戦略：左のプロット：細胞ゲート；上のパネル：CD3+細胞に対する陽性ゲート、下のパネル：B細胞に対する陰性ゲート（CD14陰性、CD3陰性）。NC365、健常ドナー由来の末梢血対照細胞。

【図１０】患者の背景および奏効性をまとめた画像である。

【図１１】CART-19細胞の製造過程を描写している。

【図１２Ａ】患者における臨床的奏効を描写している画像である。患者由来のT細胞を感染させるために用いたレンチウイルスベクターを示している。FMC63マウスモノクローナル抗体に由来する抗CD19 scFv、ヒトCD8αのヒンジドメインおよび膜貫通ドメイン、ならびにヒト4-1BBおよびCD3ζのシグナル伝達ドメインの発現を導く、水疱性口内炎ウイルスプロテインGの臨床グレード偽型レンチウイルスベクター（pELPs 19-BB-z）を作製した。一番下にあるCAR19導入遺伝子の詳細は、主要な機能的エレメントを示している。この図は正確な縮尺通りではない。3'LTRは3'長末端反復配列を表す；5'LTR、5'長末端反復配列；Amp R、アンピシリン耐性遺伝子；Bovine GH Poly A、ポリアデニル化尾部を有するウシ成長ホルモン；cPPT／CTS、セントラルターミネーション配列を有する中心ポリプリントラクト；EF-1α、伸長因子1-α；env、エンベロープ；gag、群特異的抗原；pol、ポリメラーゼおよび逆転写酵素をコードするHIV遺伝子；R、反復配列；RRE、rev応答エレメント；scFv、単鎖可変フラグメント；TM、膜貫通性；ならびにWPRE、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント。

【図１２Ｂ】患者における臨床的奏効を描写している画像である。CART19細胞の初回輸注後の第1日～第28日の血清クレアチニン、尿酸および乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）のレベルを示している。ピークレベルは腫瘍溶解症候群による入院時と一致した。

【図１２Ｃ】患者における臨床的奏効を描写している画像である。化学療法から3日後（CART19細胞輸注の前、第-1日）ならびにCART19細胞輸注から23日後および6カ月後に入

手した骨髄生検標本を示している（ヘマトキシリンおよびエオシン）。ベースライン標本は、細胞密度全体の40％に相当する小さな成熟リンパ球の主として間質性の凝集物により浸潤された、三血球系造血を伴う過形成性骨髄（60％）を示している。第23日に入手した標本は、慢性リンパ性白血病（CLL）に関して陰性であった残留性リンパ性凝集物（10％）を示し、これはT細胞およびCD5陰性B細胞の混合物を伴った。輸注後6カ月で入手した標本は、リンパ性凝集物を伴わない三血球系造血を示し、CLLは存在しないままであった。

【図１２Ｄ】患者における臨床的奏効を描写している画像である。患者を試験に組み入れる前、ならびに初回輸注から31日後および104日後に得た造影CTスキャンを示している。輸注前のCTスキャンからは、1～3cmの両側性腫瘤が見てとれる。腋窩リンパ節症の縮退は輸注後1カ月以内に起こり、持続的であった。矢印は、治療法の前のさまざまな腫大リンパ節、および治療法の後の同等なCTスキャン上でのリンパ節の反応を強調表示している。

【図１３】図13A～13Eで構成される図13は、キメラ抗原受容体T細胞輸注の前後の血清および骨髄のサイトカインを描写している一連の画像である。サイトカインインターフェロン-γ（図13A）、インターフェロン-γで刺激したケモカインC-X-Cモチーフケモカイン10（CXCL10）（図13B）およびC-X-Cモチーフリガンド9（CXCL9）（図13C）、ならびにインターロイキン-6（図13D）の連続的測定値を、表記の時点で測定した。これらの炎症性サイトカインおよびケモカインの増加は、腫瘍溶解症候群の発現と一致した。ベースラインでは低レベルのインターロイキン-6が検出されたが、一方、ベースラインでのインターフェロン-γ、CXCL9およびCXCL10は検出限界未満であった。分析物に関する標準曲線の範囲、および括弧内に提示した患者におけるベースライン値は、以下の通りであった：インターフェロン-γ、11.2～23,972pg／ml（1.4pg／ml）；CXCL10、2.1～5319pg／ml（274pg／ml）；CXCL9、48.2～3700pg／ml（177pg／ml）；インターロイキン-6、2.7～4572pg／ml（8.3pg／ml）；腫瘍壊死因子α（TNF-α）、1.9～4005pg／ml（検出不能）；および、可溶性インターロイキン-2受容体、13.4～34,210pg／ml（644pg／ml）。図13Eは、骨髄における免疫応答の誘導を示している。骨髄吸引液から入手した上澄み液中のサイトカインTNF-α、インターロイキン-6、インターフェロン-γ、ケモカインCXCL9および可溶性インターロイキン-2受容体を、CART19細胞の輸注の前後の表記の日に測定した。インターロイキン-6、インターフェロン-γ、CXCL9および可溶性インターロイキン-2受容体のレベルの上昇は、腫瘍溶解症候群、キメラ抗原受容体T細胞浸潤のピーク、および白血病性浸潤物の根絶と一致した。

【図１４Ａ】インビボでのキメラ抗原受容体T細胞の増大および存続性を描写している一連の画像である。キメラ抗原受容体T細胞輸注の前後の連続的な時点で収集した患者の全血の試料からゲノムDNA（gDNA）を単離して、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析のために用いた。導入遺伝子DNA、およびCAR19を発現するリンパ球のパーセンテージに基づく評価では、キメラ抗原受容体T細胞は、末梢血における初期生着レベルの1000倍を上回る高さのレベルまで増大した。キメラ抗原受容体T細胞のピークレベルは、腫瘍溶解症候群と時間的に相関した。第0日に入手した血液試料は、ベースラインではPCRシグナルを有しなかった。

【図１４Ｂ】インビボでのキメラ抗原受容体T細胞の増大および存続性を描写している一連の画像である。キメラ抗原受容体T細胞輸注の前後の連続的な時点で収集した患者の骨髄吸引液の試料からゲノムDNA（gDNA）を単離して、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析のために用いた。導入遺伝子DNA、およびCAR19を発現するリンパ球のパーセンテージに基づく評価では、キメラ抗原受容体T細胞は、骨髄における初期生着レベルの1000倍を上回る高さのレベルまで増大した。キメラ抗原受容体T細胞のピークレベルは、腫瘍溶解症候群と時間的に相関した。第1日に入手した骨髄試料は、ベースラインではPCRシグナルを有しなかった。

【図１４Ｃ】インビボでのキメラ抗原受容体T細胞の増大および存続性を描写している一連の画像である。ベースラインでの骨髄吸引液のフローサイトメトリー分析からは、免疫

グロブリンκ軽鎖染色による評価でクローン性であったCD19+CD5+細胞を主体とする浸潤が示され、T細胞は乏しかった。輸注後の第31日の時点ではCD5+ T細胞が存在し、正常B細胞も悪性B細胞も検出されなかった。数字は、各象限における細胞の相対頻度を指し示している。x軸およびy軸はいずれもlog 10尺度を示している。ゲーティング戦略には、左側の枠内のCD19+およびCD5+細胞に対する初期ゲーティング、ならびにその後のCD19+CD5+サブセット（右側の枠）上での免疫グロブリンκおよびλ発現の同定を含めた。

【発明を実施するための形態】

【００３９】

詳細な説明

本発明は、血液悪性腫瘍および固形腫瘍を非限定的に含む癌を治療するための組成物および方法に関する。本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように形質導入されたT細胞の養子細胞移入の戦略に関する。CARとは、特異的な抗腫瘍細胞免疫活性を呈するキメラタンパク質を作製するために、抗体に基づく所望の抗原（例えば、腫瘍抗原）に対する特異性と、T細胞受容体を活性化する細胞内ドメインとを組み合わせた分子のことである。

【００４０】

本発明は、全体として、所望のCARを安定して発現するように遺伝子改変されたT細胞の使用に関する。CARを発現するT細胞を、本明細書では、CAR T細胞またはCAR改変T細胞と
称する。細胞を、抗体結合ドメインをその表面で安定して発現し、MHCに依存しない新規な抗原特異性を付与するように遺伝子改変することが好ましい。場合によっては、T細胞は一般に、特異的抗体の抗原認識ドメインとCD3-ζ鎖またはFcγRIタンパク質の細胞内ドメインとを組み合わせて単一のキメラタンパク質としたCARを安定して発現するように遺伝子改変される。

【００４１】

1つの態様において、本発明のCARは、抗原認識ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを有する細胞外ドメインを含む。1つの態様においては、CARの中のドメインの1つに天然に付随する膜貫通ドメインを用いる。もう1つの態様において、膜貫通ドメインを、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに対するそのようなドメインの結合を避けるように選択すること、またはそのためのアミノ酸置換によって選択もしくは改変することもできる。好ましくは、膜貫通ドメインはCD8αヒンジドメインである。

【００４２】

細胞質ドメインに関して、本発明のCARは、CD28および／または4-1BBシグナル伝達ドメ
インを単独で、または本発明のCARに関連して有用な他の任意の所望の細胞質ドメインと組み合わせて含むように設計することができる。1つの態様において、CARの細胞質ドメインは、CD3-ζのシグナル伝達ドメインをさらに含むように設計することができる。例えば、CARの細胞質ドメインは、CD3-ζ、4-1BBおよびCD28のシグナル伝達モジュール、ならび
にこれらの組み合わせを非限定的に含みうる。したがって、本発明は、CAR T細胞、および養子療法のためのそれらの使用の方法に関する。

【００４３】

1つの態様において、本発明のCAR T細胞は、所望のCAR、例えば抗CD19、CD8αのヒンジ
および膜貫通ドメイン、ならびにヒト4-1BBおよびCD3ζのシグナル伝達ドメインを含むCA
Rを含むレンチウイルスベクターを細胞に導入することによって作製することができる。本発明のCAR T細胞は、インビボで複製して、持続的腫瘍制御につながる可能性のある長期存続性をもたらすことができる。

【００４４】
1つの態様において、本発明は、CARを発現する遺伝子改変T細胞を、癌を有するかまたは癌を有するリスクのある患者の治療のために、リンパ球輸注を用いて投与することに関する。自己リンパ球輸注を治療に用いることが好ましい。治療を必要とする患者から自己PBMCを収集し、T細胞を活性化した上で、本明細書に記載された当技術分野において公知の方法を用いて増大させ、続いて患者に輸注して戻す。
【００４５】
さらにもう1つの態様において、本発明は、全体として、CLLを発症するリスクのある患者の治療に関する。本発明はまた、患者における化学療法および／または免疫療法がその患者における著しい免疫抑制をもたらし、それにより、患者がCLLを発症するリスクが高まるような悪性腫瘍または自己免疫疾患を治療することも含む。
【００４６】
本発明は、CD3-ζおよび4-1BBの共刺激ドメインの両方を含む抗CD19 CARを発現するT細
胞（CART19 T細胞とも称する）を用いることを含む。本発明のCART19 T細胞は、頑強なイ
ンビボT細胞増大を起こすことができ、血液および骨髄において、より延長した時間にわたって高レベルであり続けることのできるCD19特異的メモリー細胞を樹立することができる。場合によっては、患者に輸注された本発明のCART19 T細胞は、進行した化学療法抵抗性CLLの患者において、白血病細胞をインビボで排除することができる。しかし、本発明はCART19 T細胞には限定されない。より正確には、本発明は、CD137（4-1BB）シグナル伝
達ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3ζシグナルドメイン、およびこれらの任意の組み合わせの群から選択される1つまたは複数の細胞内ドメインと融合した、あらゆる抗原結合モイエティーを含む。
【００４７】
<u>定義</u>
別に定める場合を除き、本明細書で用いる技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書中に記載されたものと同様または同等な任意の方法および材料を本発明の試験のために実地に用いることができるが、本明細書では好ましい材料および方法について説明する。本発明の説明および特許請求を行う上では、以下の専門用語を用いる。
【００４８】
また、本明細書中で用いる専門用語は、特定の態様を説明することのみを目的とし、限定的であることは意図しないことも理解される必要がある。
【００４９】
「1つの（a）」および「1つの（an）」という冠詞は、本明細書において、その冠詞の文法的目的語の1つまたは複数（すなわち、少なくとも1つ）を指して用いられる。一例として、「1つの要素」は、1つの要素または複数の要素を意味する。
【００５０】
量、時間的長さなどの測定可能な値に言及する場合に本明細書で用いる「約」は、特定された値からの±20％または±10％、より好ましくは±5％、さらにより好ましくは±1％
、いっそうより好ましくは±0.1％のばらつきを範囲に含むものとするが、これはそのようなばらつきが、開示された方法を実施する上で妥当なためである。
【００５１】
「活性化」とは、本明細書で用いる場合、検出可能な細胞増殖を誘導するように十分に刺激されたT細胞の状態のことを指す。また、活性化が、サイトカイン産生の誘導および検出可能なエフェクター機能を伴うこともある。「活性化されたT細胞」という用語は、とりわけ、細胞分裂を行っているT細胞のことを指す。

【００５２】
「抗体」という用語は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子のことを指す。抗体は、天然供給源または組換え供給源に由来する無傷の免疫グロブリンであってもよく、無傷の免疫グロブリンの免疫応答部分であってもよい。抗体は典型的には、免疫グロブリン分子のテトラマーである。本発明における抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)$_2$、ならびに単鎖抗体およびヒト化抗体を含む、種々の形態で存在しうる（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）。
【００５３】
「抗体フラグメント」という用語は、無傷の抗体の一部分のことを指し、無傷の抗体の抗原決定可変領域のことも指す。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')2、およびFvフラグメント、直鎖状抗体、ScFv抗体、ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が非限定的に含まれる。
【００５４】
「抗体重鎖」とは、本明細書で用いる場合、天然に存在するコンフォメーションにあるすべての抗体分子中に存在する2種類のポリペプチド鎖のうち、大きい方のことを指す。
【００５５】
「抗体軽鎖」とは、本明細書で用いる場合、天然に存在するコンフォメーションにあるすべての抗体分子中に存在する2種類のポリペプチド鎖のうち、小さい方のことを指す。κ軽鎖およびλ軽鎖とは、2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプのことを指す。
【００５６】
本明細書で用いる「合成抗体」とは、組換えDNA技術を用いて作製される抗体、例えば、本明細書に記載のバクテリオファージによって発現される抗体のことを意味する。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子の合成によって作製される抗体であって、そのDNA
分子が抗体タンパク質またはその抗体を指定するアミノ酸配列を発現し、そのDNA配列またはアミノ酸配列が、利用可能であって当技術分野において周知であるDNA配列またはアミノ酸配列の合成技術を用いて得られたような抗体も意味するとみなされるべきである。
【００５７】
本明細書で用いる「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を誘発する分子と定義される。この免疫応答には、抗体産生、または特異的免疫適格細胞の活性化のいずれかまたは両方が含まれうる。当業者は、事実上すべてのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原としての役を果たしうることを理解するであろう。その上、抗原が組換えDNAまたはゲノムDNAに由来してもよい。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ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、それ故に、本明細書中でその用語が用いられる通りの「抗原」をコードすることを理解するであろう。その上、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列のみによってコードされる必要はないことも理解するであろう。本発明が複数の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を非限定的に含むこと、および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さまざまな組み合わせで並べられていることは直ちに明らかである。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要が全くないことも理解するであろう。抗原を合成して作製することもでき、または生物試料から得ることもできることは直ちに明らかである。そのような生物試料には、組織試料、腫瘍試料、細胞または生体液が非限定的に含まれうる。
【００５８】
本明細書で用いる「抗腫瘍効果」という用語は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞の数の減少、転移の数の減少、期待余命の延長、または癌性病状に付随するさまざまな生理的症状の

改善によって明らかになる生物学的効果のことを指す。「抗腫瘍効果」はまた、腫瘍のそもそもの発生を予防する、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および抗体の能力によっても明らかになる。

【００５９】

「自己抗原」という用語は、本発明によれば、免疫系によって外来性であると誤って認識されるあらゆる自己抗原のことを意味する。自己抗原には、細胞表面受容体を含む、細胞タンパク質、リンタンパク質、細胞表面タンパク質、細胞脂質、核酸、糖タンパク質が非限定的に含まれる。

【００６０】

本明細書で用いる「自己免疫疾患」は、自己免疫反応に起因する障害と定義される。自己免疫疾患は、自己抗原に対する不適切かつ過剰な反応の結果である。自己免疫疾患の例には、とりわけ、アジソン病、円形脱毛症（alopecia greata）、強直性脊椎炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、糖尿病（1型）、栄養障害型表皮水疱症、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー（Guillain-Barr）症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、血管炎、尋常性白斑、粘液水腫、悪性貧血、潰瘍性大腸炎が非限定的に含まれる。

【００６１】

本明細書で用いる場合、「自己」という用語は、後にその個体に再び導入される、同じ個体に由来する任意の材料を指すものとする。

【００６２】

「同種」とは、同じ種の異なる動物に由来する移植片のことを指す。

【００６３】

「異種」とは、異なる種の動物に由来する移植片のことを指す。

【００６４】

本明細書で用いる「癌」という用語は、異常細胞の急速かつ制御不能な増殖を特徴とする疾患と定義される。癌細胞は局所的に広がることもあれば、または血流およびリンパ系を通じて身体の他の部分に広がることもある。さまざまな癌の例には、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵癌、結腸直腸癌、腎癌、肝臓癌、脳悪性腫瘍、リンパ腫、白血病、肺癌などが非限定的に含まれる。

【００６５】

「共刺激リガンド」には、この用語が本明細書で用いられる場合、T細胞上のコグネイト共刺激分子と特異的に結合し、それにより、例えば、ペプチドが負荷されたMHC分子のT
CR／CD3複合体への結合によって与えられる一次シグナルに加えて、増殖、活性化、分化などを非限定的に含むT細胞応答を媒介するシグナルも与えることのできる、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上の分子が含まれる。共刺激リガンドには、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガン
ド（ICOS-L）、細胞内接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB
、HVEM、リンホトキシンβ受容体、3／TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結
合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3に特異的に結合するリガンドが非限定的に含まれる。共刺激リガンドはまた、とりわけ、CD27、CD28、4-1BB、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などの、
ただしこれらに限定されない、T細胞上に存在する共刺激分子に特異的に結合する抗体、

およびCD83に特異的に結合するリガンドも範囲に含む。
【００６６】
「共刺激分子」とは、共刺激リガンドに特異的に結合し、それにより、増殖などの、ただしこれに限定されない、T細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上のコグネイト結合パートナーのことを指す。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受
容体が非限定的に含まれる。
【００６７】
「共刺激シグナル」とは、本明細書で用いる場合、TCR／CD3連結などの一次シグナルと
の組み合わせで、T細胞の増殖、および／または鍵となる分子のアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションを導く分子のことを指す。
【００６８】
「疾患」とは、動物が恒常性を維持することができず、その疾患が改善しなければその動物の健康が悪化し続ける、動物の健康状態のことを指す。対照的に、動物における「障害」とは、その動物が恒常性を維持することはできるが、その動物の健康状態が、障害の非存在下にあるよりもより不都合である健康状態のことである。治療されないままであっても、障害は必ずしもその動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすとは限らない。
【００６９】
本明細書で用いる「有効量」とは、治療的または予防処置的な有益性をもたらす量のことを意味する。
【００７０】
「コードする」とは、所定のヌクレオチド配列（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）ま
たは所定のアミノ酸配列のいずれか、およびそれに起因する生物学的特性を有する、生物過程において他のポリマーおよび高分子の合成のためのテンプレートとして働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAなどのポリヌクレオチド中の特定のヌクレオチド配列の固有の特性のこ
とを指す。すなわち、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によって細胞または他の生体系においてタンパク質が産生される場合、そのタンパク質をコードする。mRNA配列と同一であって通常は配列表として提示されるヌクレオチド配列を有するコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のためのテンプレートとして用いられる非コード鎖の両方を、タンパク質、またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードすると称することができる。
【００７１】
本明細書で用いる場合、「内因性」とは、生物体、細胞、組織もしくは系に由来するか、またはその内部で産生される任意の材料のことを指す。
【００７２】
本明細書で用いる場合、「外因性」という用語は、生物体、細胞、組織もしくは系に導入されるか、またはそれらの外部で産生される任意の材料のことを指す。
【００７３】
本明細書で用いる「発現」という用語は、そのプロモーターによって作動する特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳と定義される。
【００７４】
「発現ベクター」とは、発現させようとするヌクレオチド配列と機能的に連結した発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターのことを指す。発現ベクターは、発現のために十分なシス作用エレメントを含む；発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、またはインビトロ発現系において供給されうる。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを組み入れたコスミド、プラスミド（例えば、裸のもの、またはリポソーム中に含まれるもの）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）といった、当技術分野において公知であるすべてのものが含まれる。

【００７５】

「相同な」とは、2つのポリペプチドの間または2つの核酸分子の間の配列類似性または配列同一性のことを指す。比較する2つの配列の両方において、ある位置が同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットによって占められている場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおいて、ある位置がアデニンによって占められている場合には、それらの分子はその位置で相同である。2つの配列間の相同度（percent of homology）は、2つの配列が共通して持つ一致する位置または相同な位置の数を、比較する位置の数によって除算した上で100を掛けた関数である。例えば、2つの配列中の10個の位置のうち6個が一致するかまたは相同であるならば、2つの配列は60％相同である。一例として、DNA配列ATTGCCおよびTATGGCは50％の相同性を有する。一般に、比較は、最大の相同性が得られるように2つの配列のアラインメントを行った上で行われる。

【００７６】

「免疫グロブリン」または「Ig」という用語は、本明細書で用いる場合、抗体として機能するタンパク質のクラスと定義される。B細胞によって発現される抗体は、BCR（B細胞受容体）または抗原受容体と称されることも時にある。このタンパク質のクラスに含まれる5つのメンバーは、IgA、IgG、IgM、IgDおよびIgEである。IgAは、唾液、涙液、母乳、消化管分泌物、ならびに気道および泌尿生殖路の粘液分泌物などの身体分泌物中に存在する主要な抗体である。IgGは、最も一般的な流血中抗体である。IgMは、ほとんどの哺乳動物で一次免疫応答において産生される主な免疫グロブリンである。これは凝集反応、補体固定および他の抗体応答において最も効率的な免疫グロブリンであり、細菌およびウイルスに対する防御に重要である。IgDは抗体機能が判明していない免疫グロブリンであるが、抗原受容体として働いている可能性がある。IgEは、アレルゲンに対する曝露時にマスト細胞および好塩基球からのメディエーターの放出を引き起こすことによって即時型過敏症を媒介する免疫グロブリンである。

【００７７】

本明細書で用いる場合、「説明材料（instructional material」には、本発明の組成物および方法の有用性を伝えるために用いうる、刊行物、記録、略図または他の任意の表現媒体が含まれる。本発明のキットの説明材料は、例えば、本発明の核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物を含む容器に添付してもよく、または核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物を含む容器と一緒に出荷してもよい。または、説明材料および化合物がレシピエントによって一体として用いられることを意図して、説明材料を容器と別に出荷してもよい。

【００７８】

「単離された」とは、天然の状態から変更されるかまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きた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、その天然の状態で共存する物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは、「単離されて」いる。単離された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することもでき、または例えば宿主細胞などの非ネイティブ性環境で存在することもできる。

【００７９】

本発明に関連して、一般的に存在する核酸塩基に関しては以下の略語を用いる。「A」はアデノシンのことを指し、「C」はシトシンのことを指し、「G」はグアノシンのことを指し、「T」はチミジンのことを指し、「U」はウリジンのことを指す。

【００８０】

別に指定する場合を除き、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、相互

に縮重型であって、同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチドが含まれる。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という語句には、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が一部の型においてイントロンを含みうる限り、イントロンも含まれうる。

【００８１】

本明細書で用いる「レンチウイルス」とは、レトロウイルス科（Retroviridae）ファミリーの属のことを指す。レンチウイルスは、非分裂細胞を感染させうるという点で、レトロウイルスの中でも独特である；それらはかなりの量の遺伝情報を宿主細胞のDNA中に送達することができるため、それらは遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIVおよびFIVはすべて、レンチウイルスの例である。レンチウイルスに由来するベクターは、インビボでかなり高いレベルの遺伝子移入を達成するための手段を与える。

【００８２】

「モジュレートする」という用語は、本明細書で用いる場合、治療もしくは化合物の非存在下でのその対象における反応のレベルと比較して、および／または他の点では同一であるが治療を受けていない対象における反応のレベルと比較して、対象における反応のレベルの検出可能な増加または減少を媒介することを意味する。この用語は、対象、好ましくはヒトにおいて、ネイティブ性のシグナルまたは反応を擾乱させるか、および／またはそれに影響を及ぼして、それにより、有益な治療反応を媒介することを範囲に含む。

【００８３】

別に指定する場合を除き、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、相互に縮重型であって、かつ同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチドが含まれる。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列が、イントロンを含んでもよい。

【００８４】

「機能的に連結した」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間の、後者の発現を結果的にもたらす機能的連結のことを指す。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列との機能的関係の下で配置されている場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と機能的に連結している。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼすならば、プロモーターはコード配列と機能的に連結している。一般に、機能的に連結したDNA配列は連続しており、2つのタンパク質コード領域を連結することが必要な場合には、同一のリーディングフレーム内にある。

【００８５】

「過剰発現された」腫瘍抗原または腫瘍抗原の「過剰発現」という用語は、患者の特定の組織または臓器の内部にある固形腫瘍のような疾患領域からの細胞における腫瘍抗原の発現が、その組織または臓器からの正常細胞における発現のレベルに比して異常なレベルであることを指し示すことを意図している。腫瘍抗原の過剰発現を特徴とする固形腫瘍または血液悪性腫瘍を有する患者は、当技術分野において公知の標準的なアッセイによって判定することができる。

【００８６】

免疫原性組成物の「非経口的」投与には、例えば、皮下（s.c.）、静脈内（i.v.）、筋肉内（i.m.）または胸骨内の注射法または輸注法が含まれる。

【００８７】

「患者」、「対象」、「個体」などの用語は、本明細書において互換的に用いられ、本明細書に記載の方法を適用しうる、インビトロまたはインサイチューの別を問わない、任意の動物またはその細胞のことを指す。ある非限定的な態様において、患者、対象または個体はヒトである。

【００８８】

本明細書で用いる「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの連鎖と定義される。その上、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書で用いる核酸およびポリヌクレオチドは互換的である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、そ

れらはモノマー性「ヌクレオチド」に加水分解されうるという一般知識を有する。モノマー性ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解されうる。本明細書で用いるポリヌクレオチドには、組換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCR（商標）などを用いて組換えライブラリーまたは細胞ゲノムから核酸配列をクローニングすること、および合成手段を非限定的に含む、当技術分野で利用可能な任意の手段によって得られる、すべての核酸配列が非限定的に含まれる。

【００８９】

本明細書で用いる場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は互換的に用いられ、ペプチド結合によって共有結合したアミノ酸残基で構成される化合物のことを指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成しうるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって相互に結合した2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書で用いる場合、この用語は、例えば、当技術分野において一般的にはペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短鎖、ならびに当技術分野において一般にタンパク質と称される長鎖の両方のことを指し、それらには多くの種類がある。「ポリペプチド」には、いくつか例を挙げると、例えば、生物学的活性断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドの変異体、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはこれらの組み合わせが含まれる。

【００９０】

本明細書で用いる「プロモーター」という用語は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるために必要な、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列と定義される。

【００９１】

本明細書で用いる場合、「プロモーター／調節配列」という用語は、プロモーター／調節配列と機能的に連結した遺伝子産物の発現のために必要とされる核酸配列を意味する。ある場合には、この配列はコアプロモーター配列であってよく、また別の場合には、この配列が、遺伝子産物の発現に必要とされるエンハンサー配列および他の制御エレメントをも含んでもよい。プロモーター／制御配列は、例えば、組織特異的な様式で遺伝子産物を発現させるものであってもよい。

【００９２】

「構成性」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、細胞のほとんどまたはすべての生理学的条件下で、その遺伝子産物が細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

【００９３】

「誘導性」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、実質的にはそのプロモーターに対応する誘導物質が細胞内に存在する場合にのみ、その遺伝子産物が細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

【００９４】

「組織特異的」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、実質的には細胞がそのプロモーターに対応する組織型の細胞である場合にのみ、その遺伝子産物が細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

【００９５】

「特異的に結合する」という用語は、抗体に関して本明細書で用いる場合、試料中の特異的な抗原を認識するが、他の分子は実質的に認識もせず、それらと結合もしない抗体のことを意味する。例えば、1つの種由来の抗原と特異的に結合する抗体が、1つまたは複数の種由来のその抗原と結合してもよい。しかし、そのような種間反応性はそれ自体では、

抗体の分類を特異的として変更させることはない。もう1つの例において、抗原と特異的に結合する抗体が、その抗原の異なるアレル形態と結合してもよい。しかし、そのような交差反応性はそれ自体では、抗体の分類を特異的として変更させることはない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語を、抗体、タンパク質またはペプチドの第2の化学種との相互作用に言及して、その相互作用が、化学種での特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味して用いることができる；例えば、ある抗体は、タンパク質全体ではなく特定のタンパク質構造を認識してそれと結合する。抗体がエピトープ「A」に対して特異的であるならば、エピトープAを含有する分子（または遊離した非標識A）の存在は、標識「A」およびその抗体を含む反応において、その抗体と結合した標識Aの量を減少させると考えられる。

【００９６】

「刺激」という用語は、刺激分子（例えば、TCR／CD3複合体）がそのコグネイトリガンドと結合して、それにより、TCR／CD3複合体を介するシグナル伝達などの、ただしこれには限定されないシグナル伝達イベントを媒介することによって誘導される、一次応答のことを意味する。刺激は、TGF-βのダウンレギュレーション、および／または細胞骨格構造の再構築などのような、ある種の分子の発現の改変を媒介してもよい。

【００９７】

「刺激分子」とは、この用語が本明細書で用いられる場合、抗原提示細胞上に存在するコグネイト刺激リガンドに特異的に結合する、T細胞上の分子のことを意味する。

【００９８】

「刺激リガンド」とは、本明細書で用いる場合、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上に存在する場合に、T細胞上のコグネイト結合パートナー（本明細書では「刺激分子」と称する）と特異的に結合して、それにより、活性化、免疫応答の開始、増殖などを非限定的に含む、T細胞による一次応答を媒介することのできるリガンドのことを意味する。刺激リガンドは当技術分野において周知であり、とりわけ、ペプチドが負荷されたMHCクラスI分子、抗CD3抗体、スーパーアゴニスト抗CD28抗体およびスーパーアゴニスト抗CD2抗体を範囲に含む。

【００９９】

「対象」という用語は、免疫応答を惹起させることができる、生きている生物（例えば、哺乳動物）を含むことを意図している。対象の例には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が含まれる。

【０１００】

本明細書で用いる場合、「実質的に精製された」細胞とは、他の細胞型を本質的に含まない細胞のことである。また、実質的に精製された細胞とは、その天然の状態に本来付随する他の細胞型から分離された細胞のことも指す。場合によっては、実質的に精製された細胞の集団とは、均一な細胞集団のことを指す。また別の場合には、この用語は、単に、天然の状態において本来付随する細胞から分離された細胞のことを指す。いくつかの態様において、細胞はインビトロで培養される。他の態様において、細胞はインビトロでは培養されない。

【０１０１】

本明細書で用いる「治療的」という用語は、治療および／または予防処置のことを意味する。治療効果は、疾病状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。

【０１０２】

「治療的有効量」という用語は、研究者、獣医、医師または他の臨床専門家が詳しく調べようとしている、組織、系または対象の生物学的または医学的な反応を誘発すると考えられる対象化合物の量のことを指す。「治療的有効量」という用語には、投与された場合に、治療される障害または疾患の徴候または症状のうち1つもしくは複数の発生を予防す

るか、またはそれをある程度改善するのに十分な、化合物の量が含まれる。治療的有効量は、化合物、疾患およびその重症度、ならびに治療される対象の年齢、体重などに応じて異なると考えられる。

【０１０３】

ある疾患を「治療する」とは、この用語が本明細書で用いられる場合、対象が被っている疾患または障害の少なくとも1つの徴候または症状の頻度または重症度を軽減することを意味する。

【０１０４】

本明細書で用いる「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞内に移入または導入される過程のことを指す。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞とは、外因性核酸によってトランスフェクトされた、形質転換された、または形質導入されたもののことである。この細胞には初代対象細胞およびその子孫が含まれる。

【０１０５】

本明細書で用いる「転写制御下」または「機能的に連結した」という語句は、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するために正しい位置および向きにあることを意味する。

【０１０６】

「ベクター」とは、単離された核酸を含み、かつその単離された核酸を細胞の内部に送達するために用いうる組成物のことである。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会合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを非限定的に含む数多くのベクターが、当技術分野において公知である。したがって、「ベクター」という用語は、自律複製性プラスミドまたはウイルスを含む。この用語は、例えばポリリジン化合物、リポソームなどのような、細胞内への核酸の移入を容易にする非プラスミド性および非ウイルス性の化合物も含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例には、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などが非限定的に含まれる。

【０１０７】

範囲：本開示の全体を通じて、本発明のさまざまな局面を、範囲形式で提示することができる。範囲形式による記載は、単に便宜上かつ簡潔さのためであって、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定とみなされるべきではないことが理解される必要がある。したがって、ある範囲の記載は、その範囲内におけるすべての可能な部分的範囲とともに、個々の数値も具体的に開示されていると考慮されるべきである。例えば、1～6などの範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの部分的範囲とともに、その範囲内の個
々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6も、具体的に開示されていると考慮さ
れるべきである。これは範囲の幅広さとは関係なく適用される。

【０１０８】

説明

本発明は、さまざまな疾患の中でもとりわけ、癌を治療するための組成物および方法を提供する。癌は、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、原発性または転移性の腫瘍であってよい。好ましくは、癌は血液悪性腫瘍であり、より好ましくは、癌は慢性リンパ性白血病（CLL）である。本発明の組成物および方法を用いて治療しうる他の疾患には、ウイルス感染症、細菌感染症および寄生虫感染症、ならびに自己免疫疾患が含まれる。

【０１０９】

1つの態様において、本発明は、CARを発現するように操作された細胞（例えば、T細胞）であって、抗腫瘍性を呈するCAR T細胞を提供する。本発明のCARは、T細胞抗原受容体複合体ζ鎖（例えば、CD3ζ）の細胞内シグナル伝達ドメインと融合した抗原結合ドメインを有する細胞外ドメインを含むように操作することができる。本発明のCARは、T細胞で

発現された場合に、抗原結合特異性に基づく抗原認識を再誘導することができる。例示的な抗原はCD19であるが、これはこの抗原が悪性B細胞上で発現されるためである。しかし、本発明は、CD19のターゲティングには限定されない。より正確には、本発明は、そのコグネイト抗原と結合した場合に腫瘍細胞に影響を及ぼし、その結果、腫瘍細胞が成長できなくなるか、死滅するように促されるか、または患者における腫瘍総量（tumor burden）が漸減するかもしくは消失する他の様式で影響を受けるような、あらゆる抗原結合モイエティーを含む。抗原結合モイエティーは、共刺激分子およびζ鎖のうち1つまたは複数からの細胞内ドメインと融合していることが好ましい。抗原結合モイエティーは、CD137（4-1BB）シグナル伝達ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3ζシグナルドメイン、およびこれらの任意の組み合わせの群から選択される1つまたは複数の細胞内ドメインと融合していることが好ましい。

【０１１０】

1つの態様において、本発明のCARは、CD137（4-1BB）シグナル伝達ドメインを含む。これは、本発明が一部には、CARにより媒介されるT細胞応答を、共刺激ドメインの付加によってさらに強化しうるという発見に基づくためである。例えば、CD137（4-1BB）シグナル伝達ドメインを含めることにより、CD137（4-1BB）を発現するように操作されていないことと以外は同一なCAR T細胞と比較して、CAR T細胞の抗腫瘍活性およびインビボ存続性が有意に増加した。

【０１１１】

組成物

本発明は、細胞外および細胞内のドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む。細胞外ドメインは、別の言い方では抗原結合モイエティーとも称される標的特異的結合エレメントを含む。細胞内ドメイン、または別の言い方では細胞質ドメインは、共刺激シグナル伝達領域およびζ鎖部分を含む。共刺激シグナル伝達領域とは、共刺激分子の細胞内ドメインを含む、CARの一部分のことを指す。共刺激分子とは、抗原に対するリンパ球の効率的な反応のために必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子のことである。

【０１１２】

CARの細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、またはCARの細胞質ドメインと膜貫通ドメインとの間に、スペーサードメインを組み入れてもよい。本明細書で用いる場合、「スペーサードメイン」という用語は、一般に、ポリペプチド鎖中の膜貫通ドメインを、細胞外ドメインまたは細胞質ドメインのいずれかと連結させる働きをするオリゴペプチドまたはポリペプチドのことを意味する。スペーサードメインは、最大で300アミノ酸、好ましくは10～100アミノ酸、最も好ましくは25～50アミノ酸で構成されうる。

【０１１３】

抗原結合モイエティー

1つの態様において、本発明のCARは、別の言い方では抗原結合モイエティーとも称される標的特異的結合エレメントを含む。モイエティーの選択は、標的細胞の表面を規定するリガンドの種類および数によって決まる。例えば、抗原結合ドメインを、特定の疾病状態と関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択することができる。このように、本発明のCARにおける抗原モイエティードメインとして作用しうる細胞表面マーカーの例には、ウイルス感染、細菌感染症および寄生虫感染症、自己免疫疾患ならびに癌細胞と関連するものが含まれる。

【０１１４】

1つの態様において、本発明のCARは、腫瘍細胞上の抗原と特異的に結合する所望の抗原結合モイエティーを作製することによって、関心対象の腫瘍抗原を標的とするように操作することができる。本発明に関連して、「腫瘍抗原」または「過剰増殖性（hyperproliferative）障害抗原」または「過剰増殖性障害と関連する抗原」とは、癌などの特定の過剰増殖性障害に共通する抗原のことを指す。本明細書で考察する抗原は、単に一例として含めているに過ぎない。リストは排他的であることを意図してはおらず、そのほかの例も当業者には容易に明らかとなるであろう。

【０１１５】

腫瘍抗原とは、免疫応答、特にT細胞媒介性免疫応答を誘発する腫瘍細胞によって産生されるタンパク質のことである。本発明の抗原結合モイエティーの選択は、治療される癌の具体的な種類に依存すると考えられる。腫瘍抗原は当技術分野において周知であり、これには例えば、神経膠腫関連抗原、癌胎児性抗原（CEA）、β-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、αフェトプロテイン（AFP）、レクチン反応性AFP、チログロブリン、RAGE-1、MN-CA IX
、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2（AS）、腸カルボキシルエステラーゼ、muths
p70-2、M-CSF、プロスターゼ、前立腺特異的抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53
、プロステイン、PSMA、Her2／neu、サバイビンおよびテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-
1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インスリン増殖因
子（IGF）-I、IGF-II、IGF-I受容体ならびにメソテリンが含まれる。

【０１１６】

1つの態様において、腫瘍抗原は、悪性腫瘍と関連する1つまたは複数の抗原性癌エピトープを含む。悪性腫瘍は、免疫攻撃のための標的抗原としての役を果たしうる数多くのタンパク質を発現する。これらの分子には、黒色腫におけるMART-1、チロシナーゼおよびGP
100、ならびに前立腺癌における前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）および前立腺特異的抗原（PSA）などの組織特異的抗原が非限定的に含まれる。他の標的分子には、腫瘍遺伝子HER-2／Neu／ErbB-2などの形質転換関連分子の群に属するものがある。標的抗原のさら
にもう1つの群には、腫瘍胎児性抗原などの癌胎児性抗原（CEA）がある。B細胞リンパ腫において、腫瘍特異的イディオタイプ免疫グロブリンは、個々の腫瘍に固有である、真に腫瘍特異的である免疫グロブリン抗原で構成される。CD19、CD20およびCD37などのB細胞
分化抗原は、B細胞リンパ腫における標的抗原の別の候補である。これらの抗原のいくつか（CEA、HER-2、CD19、CD20、イディオタイプ）は、モノクローナル抗体を用いる受動免
疫療法の標的として用いられ、ある程度の成果を上げている。

【０１１７】

本発明において言及される腫瘍抗原の種類は、腫瘍特異的抗原（TSA）または腫瘍関連抗原（TAA）であってもよい。TSAは腫瘍細胞に固有であり、体内の他の細胞上には存在しない。TAA関連抗原は腫瘍細胞に固有ではなく、抗原に対する免疫寛容の状態を誘導することができない条件下で、正常細胞上でも発現される。腫瘍上での抗原の発現は、免疫系が抗原に応答することを可能にする条件下で起こりうる。TAAは、免疫系が未熟であって応答することができない胎児発生中に正常細胞上で発現される抗原であってよく、またはそれらは、正常細胞上に極めて低いレベルで通常存在するが、腫瘍細胞上でははるかに高いレベルで発現される抗原であってもよい。

【０１１８】

TSA抗原またはTAA抗原の非限定的な例には、以下のものが含まれる：MART-1／MelanA（
MART-1）、gp100（Pmel 17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2などの分化抗原、およびMAGE
-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15などの腫瘍特異的多系列抗原；過剰発現される
胎児抗原、例えばCEAなど；過剰発現される腫瘍遺伝子および突然変異した腫瘍抑制遺伝子、例えばp53、Ras、HER-2／neuなど；染色体転座に起因する固有の腫瘍抗原；BCR-ABL
、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RARなど；ならびに、ウイルス抗原、例えばエプスタ
イン・バーウイルス抗原EBVAならびにヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6およびE7など。その他の大型のタンパク質ベースの抗原には、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、R
AGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-
4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、β-カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791T
gp72、α-フェトプロテイン、β-HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3＼CA 27.29＼BCAA
、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68＼P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733＼EpCAM、HTg
p-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB／70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90＼Mac
-2結合タンパク質＼シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、およびTPSが
含まれる。

【０１１９】

1つの好ましい態様において、CARの抗原結合モイエティー部分は、CD19、CD20、CD22、
ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ESO-1 T
CR、MAGE A3 TCRなどを非限定的に含む抗原を標的とする。

【０１２０】

標的にすることが望まれる抗原に応じて、本発明のCARを、所望の抗原標的に対して特異的な適切な抗原結合モイエティーを含むように操作することができる。例えば、標的にすることが望まれる抗原がCD19であるならば、CD19に対する抗体を、本発明のCARに組み
入れるための抗原結合モイエティーとして用いることができる。

【０１２１】

1つの態様において、本発明のCARの抗原結合モイエティー部分は、CD19を標的とする。
好ましくは、本発明のCARにおける抗原結合モイエティー部分は抗CD19 scFVであり、ここ
で抗CD19 scFVの核酸配列はSEQ ID：14に示された配列を含む。1つの態様において、抗CD
19 scFVは、SEQ ID NO：20のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。もう1つの態様において、本発明のCARの抗CD19 scFV部分は、SEQ ID NO：20に示されたアミノ酸配列を

含む。
【０１２２】
膜貫通ドメイン
膜貫通ドメインに関して、CARは、CARの細胞外ドメインと融合した膜貫通ドメインを含むように設計することができる。1つの態様においては、CARの中のドメインの1つに天然に付随する膜貫通ドメインを用いる。場合によっては、膜貫通ドメインを、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに対するそのようなドメインの結合を避けるように選択すること、またはそのためのアミノ酸置換によって選択もしくは改変することもできる。
【０１２３】
膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源のいずれに由来してもよい。供給源が天然である場合には、ドメインは任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来しうる。本発明において特に有用性のある膜貫通領域は、T細胞受容体のα、βまたはζ鎖、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来しうる（すなわち、それらの少なくとも膜貫通領域を含む）。または、膜貫通ドメインが合成性であってもよく、この場合には、それは主として、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含むと考えられる。好ましくは、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が合成膜貫通ドメインの各末端に認められるであろう。任意で、好ましくは長さが2～10アミノ酸である短いオリゴペプチドまたはポリペプチドのリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連鎖を形成してもよい。グリシン-セリンのダブレットは特に適したリンカーとなる。
【０１２４】
好ましくは、本発明のCARにおける膜貫通ドメインはCD8膜貫通ドメインである。1つの態様において、CD8膜貫通ドメインは、SEQ ID NO：16の核酸配列を含む。1つの態様において、CD8膜貫通ドメインは、SEQ ID NO：22のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。もう1つの態様において、CD8膜貫通ドメインは、SEQ ID NO：22のアミノ酸配列を含む。
【０１２５】
場合によっては、本発明のCARの膜貫通ドメインは、CD8αヒンジドメインを含む。1つの態様において、CD8ヒンジドメインは、SEQ ID NO：15の核酸配列を含む。1つの態様において、CD8ヒンジドメインは、SEQ ID NO：21のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。もう1つの態様において、CD8ヒンジドメインはSEQ ID NO：21のアミノ酸配列を含む。
【０１２６】
細胞質ドメイン
本発明のCARの細胞質ドメイン、または別の言い方では細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが入れられた免疫細胞の正常なエフェクター機能のうち少なくとも1つの活性化の原因となる。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特化した機能のことを指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、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ろう。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェ

クター機能シグナルを伝達して、細胞が特化した機能を遂行するように導く、タンパク質の部分を指す。通常は細胞内シグナル伝達ドメインの全体を使用しうるが、多くの場合には、その鎖全体を用いることは必要でない。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮部分（truncated portion）が用いられる範囲内において、そのような短縮部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、無傷の鎖の代わりに用いることができる。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、それ故に、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの任意の短縮部分を含むものとする。

【０１２７】

本発明のCARに用いるための細胞内シグナル伝達ドメインの好ましい例には、抗原と受容体との係合後にシグナル伝達を惹起するように協調的に作用するT細胞受容体（TCR）および補助受容体の細胞質配列、ならびに、同じ機能的能力を有する、これらの配列の任意の誘導体または変異体および任意の合成配列が含まれる。

【０１２８】

TCRのみを通じて生成されるシグナルは、T細胞の完全な活性化のためには不十分であること、および二次シグナルまたは共刺激シグナルも必要とされることが公知である。このため、T細胞活性化は、2つの別個のクラスの細胞質シグナル伝達配列によって媒介されると言うことができる：TCRを通じての抗原依存的な一次活性化を惹起するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）、および、抗原非依存的な様式で作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルをもたらすもの（二次細胞質シグナル伝達配列）。

【０１２９】

一次細胞質シグナル伝達配列は、刺激的な方式または阻害的な方式で、TCR複合体の一次活性化を調節する。刺激的な様式で作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif）すなわ
ちITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含有しうる。

【０１３０】

本発明において特に有用性のある、ITAMを含有する一次細胞質シグナル伝達配列の例には、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD6
6dに由来するものが含まれる。本発明のCARにおける細胞質シグナル伝達分子は、CD3ζに
由来する細胞質シグナル伝達配列を含むことが特に好ましい。

【０１３１】

1つの好ましい態様において、CARの細胞質ドメインは、CD3-ζシグナル伝達ドメインを
、それ自体で、または本発明のCARの文脈において有用な他の任意の所望の細胞質ドメインと組み合わせて含むように、設計することができる。例えば、CARの細胞質ドメインは、CD3ζ鎖部分および共刺激シグナル伝達領域を含むことができる。共刺激シグナル伝達領域とは、共刺激分子の細胞内ドメインを含む、CARの一部分のことを指す。共刺激分子とは、抗原に対するリンパ球の効率的な反応のために必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子のことである。そのような分子の例には、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が含まれる。
したがって、本発明は、主として4-1BBを共刺激シグナル伝達エレメントとして用いて例示されるものの、他の共刺激エレメントも本発明の範囲内にある。

【０１３２】

本発明のCARの細胞質シグナル伝達部分の内部の細胞質シグナル伝達配列は、ランダム

な順序または指定された順序で互いに連結させることができる。任意で、好ましくは長さが2～10アミノ酸である短いオリゴペプチドまたはポリペプチドのリンカーが連鎖を形成してもよい。グリシン-セリンのダブレットは特に適したリンカーとなる。

【０１３３】

1つの態様において、細胞質ドメインは、CD3-ζ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。もう1つの態様において、細胞質ドメインは、CD3-ζ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。さらにもう1つの態様において、細胞質ドメインは、CD3-ζのシグナル伝達ドメインならびにCD28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。

【０１３４】

1つの態様において、本発明のCARにおける細胞質ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびCD3-ζのシグナル伝達ドメインを含むように設計され、ここで4-1BBのシグナル伝達ドメインはSEQ ID NO：17に示された核酸配列を含み、CD3-ζのシグナル伝達ドメインはSEQ ID NO：18に示された核酸配列を含む。

【０１３５】

1つの態様において、本発明のCARにおける細胞質ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびCD3-ζのシグナル伝達ドメインを含むように設計され、ここで4-1BBのシグナル伝達ドメインはSEQ ID NO：23のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み、CD3-ζのシグナル伝達ドメインはSEQ ID NO：24のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。

【０１３６】

1つの態様において、本発明のCARにおける細胞質ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびCD3-ζのシグナル伝達ドメインを含むように設計され、ここで4-1BBのシグナル伝達ドメインはSEQ ID NO：23に示されたアミノ酸配列を含み、CD3-ζのシグナル伝達ドメインはSEQ ID NO：24に示されたアミノ酸配列を含む。

【０１３７】

ベクター

本発明は、CARの配列を含むDNA構築物を範囲に含み、ここでその配列は、細胞内ドメイ
ンの核酸配列と機能的に連結された抗原結合モイエティーの核酸配列を含む。本発明のCARにおいて用いうる例示的な細胞内ドメインには、CD3-ζ、CD28、4-1BBなどの細胞内ドメ
インが非限定的に含まれる。場合によっては、CARは、CD3-ζ、CD28、4-1BBなどの任意の
組み合わせを含みうる。

【０１３８】

1つの態様において、本発明のCARは、抗CD19 scFv、ヒトCD8のヒンジおよび膜貫通ドメ
イン、ならびにヒト4-1BBおよびCD3ζのシグナル伝達ドメインを含む。1つの態様において、本発明のCARは、SEQ ID NO：8に示された核酸配列を含む。もう1つの態様において、
本発明のCARは、SEQ ID NO：12のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。もう1つの
態様において、本発明のCARは、SEQ ID NO：12に示されたアミノ酸配列を含む。

【０１３９】

所望の分子をコードする核酸配列は、当技術分野において公知の組換え方法、例えば、標準的な手法を用いて、その遺伝子を発現する細胞からのライブラリーをスクリーニングすることによって、それを含むことが公知であるベクターから遺伝子を導き出すことによって、またはそれを含有する細胞および組織から直接的に単離することなどによって、入手することができる。または、関心対象の遺伝子を、クローニングするのではなくて、合成によって作製することもできる。

【０１４０】
本発明はまた、本発明のDNAが挿入されたベクターも提供する。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターは、長期的遺伝子移入を達成するための適したツールであるが、これはそれらが、導入遺伝子の長期的で安定的な組み込み、および娘細胞におけるその伝播を可能にするためである。レンチウイルスベクターは、マウス白血病ウイルスなどのオンコレトロウイルスに由来するベクターを上回る利点を有するが、これはそれらが、肝細胞などの非増殖性細胞の形質導入も行うことができるためである。また、それらには免疫原性が低いという利点も加わっている。
【０１４１】
概要を述べると、CARをコードする天然性または合成性の核酸の発現は、典型的には、CARポリペプチドまたはその部分をコードする核酸をプロモーターと機能的に連結させて、その構築物を発現ベクター中に組み入れることによって達成される。ベクターは、真核生物における複製および組み込みのために適している。典型的なクローニングベクターは、転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター、開始配列、ならびに所望の核酸配列の発現の調節のために有用なプロモーターを含有する。
【０１４２】
また、本発明の発現構築物を、標準的な遺伝子送達プロトコールを用いる核酸免疫処置および遺伝子治療のために用いることもできる。遺伝子送達のための方法は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,399,346号、第5,580,859号、第5,589,466号
を参照されたく、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。もう1つの態様において、本発明は、遺伝子療法ベクターを提供する。
【０１４３】
核酸は、さまざまな種類のベクター中にクローニングすることができる。例えば、核酸を、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非限定的に含むベクター中にクローニングすることができる。特に関心が持たれるベクターには、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクターおよびシークエンシングベクターが含まれる。
【０１４４】
さらに、発現ベクターを、ウイルスベクターの形態で細胞に与えることもできる。ウイルスベクター技術は当技術分野において周知であり、例えば、Sambrookら（2001, Molecu
lar Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York）、ならびにウイルス学および分子生物学の他の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には、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が非限定的に含まれる。一般に、適したベクターは、少なくとも1つの生物において機能する複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つまたは複数の選択可能なマーカーを含有する（例えば、WO 01／96584号；WO 01／29058号；および米国特許第6,326,193号を参照）。
【０１４５】
数多く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好都合なプラットフォームとなる。当技術分野において公知の手法を用いて、選択された遺伝子をベクターに挿入し、レトロウイルス粒子の中にパッケージングすることができる。続いて、組換えウイルスを単離して、対象の細胞にインビボまたはエクスビボで送達することができる。数多くのレトロウイルス系が当技術分野において公知である。いくつかの態様においては、アデノウイルスベクターを用いる。数多くのアデノウイルスベクターが当技術分野において公知である。1つの態様においては、レンチウイルスベクターを用いる。
【０１４６】
そのほかのプロモーターエレメント、例えばエンハンサーなどは、転写開始の頻度を調

節する。典型的には、これらは開始部位の30～110bp上流の領域に位置するが、数多くのプロモーターは、開始部位の下流にも機能的エレメントを含むことが最近示されている。多くの場合、プロモーターエレメント間の間隔には柔軟性があり、そのため、エレメントが互いに対して逆位になったり移動したりしてもプロモーター機能は保持される。チミジンキナーゼ（tk）プロモーターでは、反応性の低下を起こすことなく、プロモーターエレメント間の間隔を50bpまで隔てることができる。プロモーターによっては、個々のエレメントが協調的に、または独立して、転写を活性化しうるように思われる。

【０１４７】

適したプロモーターの一例は、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それと機能的に連結した任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を作動させることのできる、強力な構成性プロモーター配列である。適したプロモーターのもう1つの例は、伸長成長因子-1α（Elongation Growth Factor-1α）（EF-1α）である。しかし、シミアンウイルス40（SV40）初期プロモーター、マウス乳
腺腫瘍ウイルス（MMTV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）長末端反復配列（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、ならびに、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、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などの、ただしこれらには限定されないヒト遺伝子プロモーターを非限定的に含む、他の構成性プロモーター配列を用いることもできる。さらに、本発明は、構成性プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターも本発明の一部として想定している。誘導性プロモーターの使用により、それと機能的に連結しているポリヌクレオチド配列の発現を、そのような発現が所望である場合には有効にし、発現が所望でない場合には発現を無効にすることができる、分子スイッチがもたらされる。誘導性プロモーターの例には、メタロチオネイン（metallothionine）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が非限定的に含まれる。

【０１４８】

CARポリペプチドまたはその部分の発現を評価する目的で、ウイルスベクターによってトランスフェクトまたは感染させようとする細胞の集団からの発現細胞の同定および選択を容易にするために、細胞に導入される発現ベクターに、選択マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子またはその両方を含有させることもできる。他の局面において、選択マーカーを別個のDHA小片上に保有させて、同時トランスフェクション手順に用いることもできる。宿主細胞における発現を可能にするために、選択マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子をいずれも、適切な調節配列に隣接させることができる。有用な選択マーカーには、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子が含まれる。

【０１４９】

レポーター遺伝子は、トランスフェクトされた可能性のある細胞を同定するため、および調節配列の機能性を評価するために用いられる。一般に、レポーター遺伝子とは、レシピエント生物または組織に存在しないかまたはそれらによって発現されず、かつ、その発現が何らかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によって顕在化するポリペプチドをコードする、遺伝子のことである。レポーター遺伝子の発現は、そのDNAがレシピエント細胞に導入された後の適した時点でアッセイされる。適したレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、β-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、分泌性アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光性タンパク質の遺伝子が含まれうる（例えば、Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479:79-82）。適した発現系は周知であり、公知の手法を用いて調製すること、または販売されているものを入手することができる。一般に、レポーター遺伝子の最も高レベルでの発現を示す最小限の

5'フランキング領域を有する構築物が、プロモーターとして同定される。そのようなプロモーター領域をレポーター遺伝子と連結させて、プロモーターにより作動する転写を作用物質がモジュレートする能力を評価するために用いることができる。

【０１５０】

細胞に遺伝子を導入して発現させる方法は、当技術分野において公知である。発現ベクターに関連して、ベクターは、宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞または昆虫細胞に、当技術分野における任意の方法によって容易に導入することができる。例えば、発現ベクターを、当該技術分野のいずれの方法によっても、宿主細胞、例えば哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞または昆虫細胞にベクターを容易に導入することができる。例えば、発現ベクターを、物理的、化学的または生物学的手段によって宿主細胞に導入することができる。

【０１５１】

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には、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション、微粒子銃法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。ベクターおよび／または外因性核酸を含む細胞を作製するための方法は、当技術分野において周知である。例えば、Sambrookら（2001, Molecular Cloning: A
Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York）を参照されたい。宿
主細胞へのポリヌクレオチドの導入のために好ましい方法の1つは、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【０１５２】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNAベクターおよびRNAベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞に遺伝子を挿入するために最も広く使用される方法となっている。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型、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来しうる。例えば、米国特許第5,350,674号および第5,585,362号を参照されたい。

【０１５３】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段には、コロイド分散系、例えば高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズなど、ならびに、水中油型エマルション、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が含まれる。インビトロおよびインビボで送達媒体として用いるための例示的なコロイド系の1つは、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

【０１５４】

非ウイルス性送達系を利用する場合には、例示的な送達媒体の1つはリポソームである。脂質製剤の使用を、宿主細胞への核酸の導入のために想定している（インビトロ、エクスビボまたはインビボ）。もう1つの局面において、核酸を脂質と付随させてもよい。脂質と付随した核酸をリポソームの水性内部の中に封入し、リポソームの脂質二重層の内部に配置させ、リポソームおよびオリゴヌクレオチドの両方と付随する連結分子を介してリポソームと連結させ、リポソーム内に封じ込め、リポソームと複合体化させ、脂質を含有する溶液中に分散させ、脂質と混合し、脂質と配合し、脂質中に懸濁物として含有させ、ミセル中に含有させるかもしくは複合体化させ、または他の様式で脂質と付随させることができる。脂質、脂質／DNAまたは脂質／発現ベクターが付随する組成物は、溶液中のいかなる特定の構造にも限定されない。例えば、それらは二重層構造の中に、ミセルとして、または「崩壊した」構造として存在しうる。それらはまた、溶液中に単に点在していて、大きさも形状も均一でない凝集物を形成する可能性があってもよい。脂質とは、天然脂質または合成脂質であってよい脂肪性物質のことである。例えば、脂質には、細胞質中に天然に存在する脂肪小滴、ならびに長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体を含む化合物のクラス、例えば脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドな

どが含まれる。

【０１５５】

使用に適した脂質は、販売元から入手することができる。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から入手することができ；ジアセチルホスファート（「DCP」）はK & K Laboratories（Plainview, NY）から入手することができ；コレステロール（「Choi」）はCalbiochem-Behringから入手することができ；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）から入手することができる。クロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中にある脂質の貯蔵溶液は、約-20℃で保存することができる。クロロホルムはメタノールよりも容易に蒸発するので、それを唯一の溶媒として用いることが好ましい。「リポソーム」とは、閉じた脂質二重層または凝集物の生成によって形成される、種々の単層および多重層の脂質媒体を包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜による小胞構造および内部の水性媒質を有するものとして特徴づけることができる。多重層リポソームは、水性媒質によって隔てられた複数の脂質層を有する。それらはリン脂質を過剰量の水性溶液中に懸濁させると自発的に形成される。脂質成分は自己再配列を起こし、その後に閉鎖構造の形成が起こり、水および溶解溶質を脂質二重層の間に封じ込める（Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5:505-10）。しかし、溶液中で通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物も想定している。例えば、脂質がミセル構造をとってもよく、または単に脂質分子の不均一な凝集物として存在してもよい。また、リポフェクタミン-核酸複合体も想定している。

【０１５６】

宿主細胞における組換えDNA配列の存在を確かめる目的で、宿主細胞に外因性核酸を導入するため、または他の様式で細胞を本発明の阻害因子に曝露させるために用いられる方法にかかわらず、種々のアッセイを用いることができる。そのようなアッセイには、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば、サザンブロット法およびノーザンブロット法、RT-PCRおよびPCRなど；「生化学的」アッセイ、例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウエスタンブロット）または本発明の範囲内にある作用物質を同定するための本明細書に記載のアッセイににによって、特定のペプチドの有無を検出すること、などが含まれる。

【０１５７】

<u>T細胞の供給源</u>

本発明のT細胞の増大および遺伝子改変の前に、T細胞の供給源を対象から入手する。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、数多くの供給源から入手することができる。本発明のある態様において、当技術分野において入手可能な任意のさまざまなT細胞株を用いることができる。本発明のある態様において、T細胞は、フィコール（商標）分離などの、当業者に公知の任意のさまざまな手法を用いて対象から収集された血液ユニットから得られる。1つの好ましい態様において、個体の流血由来の細胞はアフェレーシスによって入手される。アフェレーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含む。1つの態様においては、アフェレーシスによって収集された細胞を、血漿画分を除去するために洗浄した上で、その後の処理段階のために細胞を適切な緩衝液または培地中に配置することができる。本発明の1つの態様においては、これらの細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄する。1つの代替的な態様において、洗浄溶液はカルシウムを含まず、かつ、マグネシウムを含まないか、またはすべてではないものの多くの二価カチオンを含まない。この場合にも、驚くべ

きことに、カルシウム非存在下での最初の活性化段階により、活性化の増強がもたらされる。当業者は容易に理解するであろうが、洗浄段階は、半自動化された「フロースルー」遠心分離機（例えば、Cobe 2991細胞プロセッサー、Baxter CytoMate、またはHaemonetic
s Cell Saver 5など）を製造元の指示に従って用いることなどによって、当技術分野において公知の方法によって実現することができる。洗浄の後に、細胞を、例えば、Ca^{2+}非含有、Mg^{2+}非含有PBS、PlasmaLyte A、または緩衝剤を含むかもしくは含まない他の食塩液
といった、種々の生体適合性緩衝液中に再懸濁させることができる。または、アフェレーシス試料の望ましくない成分を除去して、細胞を培養培地中に直接再懸濁させてもよい。

【０１５８】

もう1つの態様においては、赤血球を溶解させた上で、例えばPERCOLL（商標）勾配での
遠心分離によるか、または向流遠心分離溶出法によって単球を枯渇させることによって、T細胞を末梢血リンパ球から単離する。$CD3^+$、$CD28^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD45RA^+$、および$CD45RO^+$T細胞といったT細胞の特定の部分集団を、陽性選択法または陰性選択法によってさらに単離することができる。例えば、1つの好ましい態様において、T細胞は、DYNABEADS（登
録商標）M-450 CD3／CD28 Tなどの抗CD3／抗CD28（すなわち、3x28）結合ビーズとの、所
望のT細胞の陽性選択に十分な期間にわたるインキュベーションによって単離される。1つの態様において、この期間は約30分間である。1つのさらなる態様において、この期間は、30分間～36時間またはそれ以上、およびそれらの間の全ての整数値の範囲にわたる。1つのさらなる態様において、この期間は、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。さらにもう1つの好ましい態様において、この期間は10～24時間で
ある。1つの好ましい態様において、インキュベーション期間は24時間である。白血病の患者からのT細胞の単離のためには、24時間といった比較的長いインキュベーション時間を用いることにより、細胞収量を増やすことができる。腫瘍組織または免疫機能低下個体から腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）を単離する際のように、他の細胞型と比較してT細胞がわずかしか存在しないあらゆる状況で、T細胞を単離するために比較的長いインキュベーション時間を用いることができる。さらに、比較的長いインキュベーション時間の使用により、CD8+ T細胞の捕捉効率を高めることもできる。したがって、単にこの時間を短縮または延長することによって、T細胞はCD3／CD28ビーズへの結合が可能になるか、および／またはビーズのT細胞に対する比を増加もしくは減少することにより（本明細書でさらに説明するように）、T細胞の部分集団は、培養開始時もしくはこの過程の他の時点で、これについてもしくはこれに対して優先的に選択されうる。加えて、ビーズまたは他の表面上の抗CD3および／または抗CD28抗体の比を増加または減少することにより、T細胞部分集団
は、培養開始時もしくは他の望ましい時点で、これについてまたはこれに対して優先的に選択される。当業者は、本発明の状況において複数回の選択を使用することができることを認めると思われる。ある態様においては、この選択手順を実行し、活性化および増大の過程において「選択されない」細胞を使用することが望ましいことがある。「選択されない」細胞に、さらに選択を施すこともできる。

【０１５９】

陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、陰性選択された細胞への独自の表面マーカーに対する抗体の組合せにより実行することができる。1つの方法は、陰性選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体カクテルを使用する、負磁気免疫

接着またはフローサイトメトリーによる細胞ソーティングおよび／または選択である。例えば、陰性選択によって$CD4^+$細胞を濃縮するためのモノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。ある態様において、典型的には$CD4^+$、$CD25^+$、$CD62L^{hi}$、$GITR^+$、および$FoxP3^+$を発現する調節性T細胞を濃縮するかまたは陽性選択することが望ましいことがある。または、ある態様においては、抗C25結合ビーズまたは他の類似の選択方法によって、調節性T細胞を枯渇させる。

【０１６０】

陽性または陰性選択によって望ましい細胞集団を単離するために、細胞および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変化させることができる。ある態様においては、細胞とビーズの最大接触を確実にするために、ビーズおよび細胞が一緒に混合される容積の著しい減少（すなわち、細胞の濃度の増加）が望ましいことがある。例えば、1つの態様においては、細胞20億個／mlの濃度を用いる。1つの態様において、細胞10億個／mlの濃度を用いる。さらなる態様においては、細胞10000万個／mlよりも高いものを用いる。さらなる態様においては、1000万個／ml、1500万個／ml、2000万個／ml、2500万個／ml、3000万個／ml、3500万個／ml、4000万個／ml、4500万個／mlまたは5000万個／mlの細胞濃度を用いる。さらにもう1つの態様においては、7500万個／ml、8000万個／ml、8500万個／ml、9000万個／ml、9500万個／ml、または10000万個／mlからの細胞濃度を用いる。さらなる態様においては、12500万個／mlまたは15000万個／mlの濃度を用いることができる。高濃度を用いることにより、増加した細胞収量、細胞活性化および細胞増大を生じることができる。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞のような、または多くの腫瘍細胞が存在する試料（すなわち、白血病血、腫瘍組織など）からの、関心のある標的抗原を弱く発現する細胞の捕捉効率を高めることができる。そのような細胞集団は、治療的価値があり、かつ得ることが望ましい。例えば、高い濃度の細胞の使用は、通常弱くCD28を発現する$CD8^+$ T細胞をより効率的に選択することを可能にする。

【０１６１】

1つの関連した態様においては、より低い濃度の細胞を用いることが望ましいことがある。T細胞および表面（例えばビーズなどの粒子）の混合物の高度の希釈により、粒子と細胞間の相互作用は最小化される。これにより、これらの粒子と結合する所望の抗原を大量発現する細胞が選択される。例えば、$CD4^+$ T細胞は、より高いレベルのCD28を発現し、希釈した濃度で$CD8^+$ T細胞よりもより効率的に捕捉される。1つの態様において、用いられる細胞濃度は、5×10^6個／mlである。もう1つの態様において、用いられる濃度は、約1×10^5個／ml～1×10^6個／ml、およびその間の任意の整数であることができる。

【０１６２】

他の態様において、細胞を、回転器にて、さまざまな時間にわたって、さまざまな速度で、2～10℃または室温のいずれかで、インキュベートすることもできる。

【０１６３】

また、刺激のためのT細胞を、洗浄段階の後に凍結することもできる。理論に拘束されることは望まないが、凍結段階およびそれに続く解凍段階は、細胞集団における顆粒球およびある程度の単球を除去することによって、より均一な製剤を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄段階の後に、これらの細胞を凍結液中に懸濁させてもよい。多くの凍結液およびパラメーターが当技術分野において公知であり、かつこの状況において有用で

あるが、1つの方法は、20% DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または、
10%デキストラン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% DMS
O、または31.25% Plasmalyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45% NaCl、10%デキス
トラン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
例えばHespanおよびPlasmaLyte Aを含有する他の適した細胞凍結培地の使用を伴い、続い
てこれらの細胞は、1分間に1℃の速度で-80℃に凍結され、液体窒素貯蔵タンク内で気相中に貯蔵される。その他の制御された凍結法に加え、即時-20℃または液体窒素中の制御されない凍結を使用してもよい。

【０１６４】

ある態様においては、凍結保存細胞を本明細書に記載の通りに解凍および洗浄して、室温で1時間静置した後に、本発明の方法を用いる活性化を行う。

【０１６５】

また、本発明に関連して、本明細書に記載されたような増大された細胞が必要となる前の期間での、対象からの血液試料またはアフェレーシス産物の収集も想定している。そのために、増大させようとする細胞の供給源を、必要な任意の時点で収集し、T細胞などの所望の細胞を、本明細書に記載された説明されたもののような、T細胞療法による恩恵を受けると考えられる任意のさまざまな疾患または病状に対するT細胞療法に後に用いるために単離して凍結することができる。1つの態様においては、血液試料またはアフェレーシス物を、全般的に健常な対象から採取する。ある態様においては、血液試料またはアフェレーシス物を、疾患を発症するリスクがあるが、まだ疾患を発症していない全般的に健常な対象から採取し、関心対象の細胞を、後に用いるために単離して凍結する。ある態様においては、T細胞を増大させ、凍結して、後の時点で用いる。ある態様においては、本明細書に記載されたような特定の疾患の診断後間もなく、しかしいかなる治療も行わないうちに、患者から試料を収集する。1つのさらなる態様においては、細胞を、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス薬、化学療法、放射線療法、例えばシクロスポリン、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などの免疫抑制剤、抗体、または他の免疫除去薬、例えばCAMPATH、抗CD3抗体、サイトキサン、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
び照射などの作用因子による治療を非限定的に含む、任意のさまざまな妥当な治療様式の前の対象由来の血液試料またはアフェレーシス物から単離する。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンを阻害するか（シクロスポリンおよびFK506）、または増殖因子で誘導されるシグナル伝達にとって重要なp70S6キナーゼを阻害する（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）。1つのさらな
る態様においては、細胞を患者のために単離して、骨髄移植もしくは幹細胞移植、フルダラビンなどの化学療法薬、外部ビーム照射療法（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT
3もしくはCAMPATHなどの抗体のいずれかを用いるT細胞除去療法とともに（例えば、その
前、同時またはその後に）、後に用いるために凍結する。もう1つの態様においては、細胞を事前に単離した上で、CD20と反応する薬剤、例えばリツキサンなどによるB細胞除去療法後の治療のために後で用いるために凍結する。

【０１６６】
本発明の1つのさらなる態様においては、T細胞を、治療後に患者から直接入手する。これに関して、ある種の癌治療、特に免疫系を障害を及ぼす薬物による治療の後には、患者が通常であれば治療から回復中であると考えられる治療後間もない時点で、得られるT細胞の品質が、それらがエクスビボで増大する能力の点で最適であるか改善されていることが観察されている。同様に、本明細書に記載された方法を用いるエクスビボ操作の後にも、これらの細胞は生着およびインビボ増大の増強のために好ましい状態にある可能性がある。したがって、本発明に関連して、この回復相の間に、T細胞、樹状細胞、または造血系統の他の細胞を含む血液細胞を収集することを想定している。さらに、ある態様においては、動員（例えば、GM-CSFによる動員）レジメンおよび条件付けレジメンを用いて、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生および／または増大にとって有利に働く状態を、特に治療法の後のある規定された時間枠の間に、対象において作り出すことができる。例示的な細胞型には、T細胞、B細胞、樹状細胞および免疫系の他の細胞が含まれる。

【０１６７】
T細胞の活性化および増大
所望のCARを発現させるためのT細胞の遺伝子改変の前または後のいずれかにおいて、一般に、例えば、米国特許第6,352,694号；第6,534,055号；第6,905,680号；第6,692,964号
；第5,858,358号；第6,887,466号；第6,905,681 号；第7,144,575号；第7,067,318号；第
7,172,869号；第7,232,566号；第7,175,843号；第5,883,223号；第6,905,874号；第6,797
,514号；第6,867,041号；ならびに米国特許出願公開第20060121005号に記載された方法を
用いて、T細胞を活性化して増大させることができる。

【０１６８】
一般に、本発明のT細胞は、CD3／TCR複合体関連シグナルを刺激する作用物質、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びつけられた表面との接触によって増大させられる。特に、T細胞集団は、本明細書に記載されたように、例えば、表面上に固定化された抗CD3抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは抗CD2抗体との接触によっ
て、またはカルシウムイオノフォアを伴うプロテインキナーゼCアクチベーター（例えば、ブリオスタチン）との接触などによって、刺激することができる。T細胞の表面上のアクセサリー分子の同時刺激のためには、アクセサリー分子と結合するリガンドが用いられる。例えば、T細胞の集団を、T細胞の増殖を刺激するのに適した条件下で、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。$CD4^+$ T細胞または$CD8^+$ T細胞のいずれかの増
殖を刺激するためには、抗CD3抗体および抗CD28抗体。抗CD28抗体の例には、9.3、B-T3、
XR-CD28（Diaclone, Besancon, France）が含まれ、当技術分野において一般に公知であ
る他の方法と同様に用いることができる（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）。

【０１６９】
ある態様において、T細胞に対する一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、さまざまなプロトコールによって与えることができる。例えば、各シグナルを与える作用物質は、溶液中にあってもよく、または表面と結びつけてもよい。表面と結びつける場合、これらの作用物質を同じ表面に結びつけてもよく（すなわち、「シス」フォーメーション）、

または別々の表面に結びつけてもよい（すなわち、「トランス」フォーメーション）。または、一方の作用物質を溶液中の表面に結びつけ、もう一方の作用物質が溶液中にあってもよい。1つの態様においては、共刺激シグナルを与える作用物質を細胞表面と結合させ、一次活性化シグナルを与える作用物質は溶液中にあるか、または表面と結びつける。ある態様においては、両方の作用物質が溶液中にあってもよい。もう1つの態様において、これらの物質は可溶形態にあり、続いて、Fc受容体を発現する細胞または抗体またはこれらの物質と結合する他の結合物質などの表面と架橋結合することができる。これに関しては、例えば、本発明においてT細胞を活性化および増大させるために用いることを想定している人工抗原提示細胞（aAPC）についての、米国特許出願公開第20040101519号および
第20060034810号を参照されたい。

【０１７０】

1つの態様においては、2種の作用物質を、同じビーズ上に、すなわち「シス」か、または別々のビーズ上に、すなわち「トランス」かのいずれかとして、ビーズ上に固定化する。一例として、一次活性化シグナルを与える作用物質は抗CD3抗体またはその抗原結合フラグメントであり、共刺激シグナルを与える作用物質は抗CD28抗体またはその抗原結合フラグメントである；そして、両方の作用物質を等モル量で同じビーズに同時固定化する。1つの態様においては、$CD4^+$ T細胞の増大およびT細胞増殖のためにビーズと結合させる各抗体を1：1の比で用いる。本発明のある局面においては、ビーズと結合させる抗CD3：CD28抗体の比として、1：1の比を用いて観察される増大と比較してT細胞増大の増加が観察されるようなものを用いる。1つの特定の態様においては、1：1の比を用いて観察される増大と比較して約1～約3倍の増加が観察される。1つの態様においては、ビーズと結合させるCD3：CD28抗体の比は、100：1～1：100、およびそれらの間のすべての整数の範囲にある。本発明の1つの局面においては、抗CD3抗体よりも多くの抗CD28抗体が粒子と結合され、すなわちCD3：CD28の比は1未満である。本発明のある態様において、ビーズと結合させる抗CD28抗体と抗CD3抗体との比は、2：1よりも大きい。1つの特定の態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：100のCD3：CD28比を用いる。もう1つの態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：75のCD3：CD28比を用いる。さらなる態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：50のCD3：CD28比を用いる。もう1つの態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：30のCD3：CD28比を用いる。1つの好ましい態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：10のCD3：CD28比を用いる。もう1つの態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：3のCD3：CD28比を用いる。さらにもう1つの態様においては、ビーズと結合させる抗体に3：1のCD3：CD28比を用いる。

【０１７１】

T細胞または他の細胞標的を刺激するには、粒子と細胞との比として1：500～500：1およびその間の任意の整数値を用いることができる。当業者が容易に理解するように、粒子と細胞との比は、標的細胞に対する粒子サイズに依存しうる。例えば、小さいサイズのビーズは2、3個の細胞と結合しうるに過ぎないが、一方、より大きいビーズは多くと結合し

うると考えられる。ある態様において、細胞と粒子との比は1：100～100：1およびその間
の任意の整数値の範囲にあり、さらなる態様において、この比は1：9～9：1およびその間の任意の整数値を含み、これを同じくT細胞を刺激するために用いることができる。T細胞の刺激をもたらす、抗CD3および抗CD28が結びついた粒子とT細胞との比は、上述したよう
にさまざまでありうるが、いくつかの好ましい値には、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が含まれ、1つの好ましい比は、
T細胞1個につき粒子が少なくとも1：1である。1つの態様においては、1：1またはそれ未満である粒子と細胞との比を用いる。1つの特定の態様において、好ましい粒子：細胞比は1：5である。さらなる態様において、粒子と細胞との比は、刺激の日に応じて変化しうる。例えば、1つの態様において、粒子と細胞との比は第1日に1：1～10：1であり、その後最長10日間にわたって毎日または1日おきに追加の粒子を細胞に添加して、最終的な比が1：1～1：10となる（添加の日の細胞数に基づく）。1つの特定の態様において、粒子と
細胞との比は刺激の1日目に1：1であり、刺激の3日目および5日目に1：5に調節される。もう1つの態様において、粒子は毎日または1日おきに添加され、最終的な比は1日目に1：1であり、刺激の3日目および5日目には1：5である。もう1つの態様において、粒子と細胞
との比は刺激の1日目に2：1であり、刺激の3日目および5日目に1：10に調節される。もう
1つの態様において、粒子は毎日または1日おきに添加され、最終的な比は1日目に1：1であり、刺激の3日目および5日目には1：10である。当業者は、さまざまな他の比が、本発明における使用に適することを理解するであろう。特に、比は粒子サイズならびに細胞のサイズおよび型に応じて多様であると考えられる。

【０１７２】

本発明のさらなる態様においては、T細胞などの細胞を、作用物質でコーティングされたビーズと一緒にし、その後にビーズと細胞を分離した上で、続いて細胞を培養する。1つの代替的な態様においては、培養の前に、作用物質でコーティングされたビーズと細胞を分離せずに、一緒に培養する。1つのさらなる態様においては、ビーズおよび細胞を磁力などの力の印加によってまず濃縮して、細胞表面マーカーの連結を増加させて、それにより、細胞刺激を誘導する。

【０１７３】

例として、抗CD3および抗CD28が結びつけられた常磁性ビーズ（3x28ビーズ）をT細胞と
接触させることによって、細胞表面タンパク質を連結させることができる。1つの態様においては、細胞（例えば、10^4～10^9個のT細胞）およびビーズ（例えば、DYNABEADS（登録
商標）M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズ、1：1の比）を、緩衝液中、好ましくはPBS（カル
シウムおよびマグネシウムなどの二価カチオンを含まない）中で一緒にする。この場合も、当業者は、あらゆる細胞濃度を用いうることを容易に理解するであろう。例えば、標的細胞が試料中に非常に稀であって、試料のわずかに0.01％を構成してもよく、または試料の全体（すなわち、100％）が関心対象の標的細胞で構成されてもよい。したがって、あらゆる細胞数が本発明の状況の範囲に含まれる。ある態様においては、粒子と細胞を一緒にして混合する容積を著しく減らして（すなわち、細胞の濃度を高めて）、細胞と粒子の

最大の接触を確実にすることが望ましいと考えられる。例えば、1つの態様においては、細胞約20億個／mlの濃度を用いる。もう1つの態様においては、細胞10000万個／ml超を用
いる。1つのさらなる態様においては、1000万個、1500万個、2000万個、2500万個、3000
万個、3500万個、4000万個、4500万個、または5000万個／mlの細胞濃度を用いる。さらに
もう1つの態様においては、7500万個、8000万個、8500万個、9000万個、9500万個または1
0000万個／mlの細胞濃度を用いる。さらなる態様において、細胞12500または15000万個／
mlの濃度を用いることができる。高濃度を用いることにより、細胞収量、細胞活性化、および細胞増大の増加がもたらされうる。さらに、高い細胞濃度を用いることにより、CD28陰性T細胞のように関心対象の標的抗原を弱く発現する細胞のより効率的な捕捉が可能になる。ある態様においては、そのような細胞集団は治療的価値を有する可能性があり、入手することが望ましいと考えられる。例えば、高濃度の細胞を用いることにより、通常は比較的弱いCD28発現を有するCD8+ T細胞のより効率的な選択が可能にある。

【０１７４】

本発明の1つの態様においては、混合物を、数時間（約3時間）～約14日間、またはその間の任意の整数値単位の時間にわたって培養しうる。もう1つの態様において、混合物を21日間培養しうる。本発明の1つの態様においては、ビーズとT細胞を約8日間一緒に培養する。もう1つの態様においては、ビーズとT細胞は2～3日間一緒に培養する。数回の刺激サイクルも望ましく、その結果、T細胞の培養時間は60日間またはそれより長くなる。T細胞の培養に適した条件には、血清（例えばウシ胎仔血清またはヒト血清）、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、TGFβ
およびTNF-α、または当業者に公知である細胞増殖のための他の添加物を含む、増殖および生存のために必要な因子を含みうる適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI Medium 1640または、X-vivo 15（Lonza））が含まれる。細胞の増殖のための他の添加剤には
、界面活性剤、プラスマネート、および還元剤、例えばN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどが非限定的に含まれる。培地には、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウムおよびビタミンが添加された、血清非含有であるか、またはT細胞の増殖および増大のために十分な、適量の血清（または血漿）もしくは規定されたホルモンのセットおよび／もしくは一定量のサイトカインが加えられた、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、α-ME
M、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20が含まれうる。ペニシリンおよびストレプトマイ
シンなどの抗生物質は実験培養物のみに含められ、対象に輸注される細胞の培養物には含められない。標的細胞は、増殖を支えるために必要な条件下、例えば適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気＋5% CO_2）の下で維持される。

【０１７５】

多様な刺激時間にわたって曝露されたT細胞は、異なる特性を示しうる。例えば、典型的な血液またはアフェレーシスを受けた末梢血単核細胞産物は、ヘルパーT細胞集団（T_H、$CD4^+$）を、細胞傷害性またはサプレッサーT細胞集団（T_C、$CD8^+$）よりも多く有する。CD3受容体およびCD28受容体を刺激することによるT細胞のエクスビボ増大では、約8～9日
目より前には主としてT_H細胞からなるT細胞集団が生じるが、約8～9日目以後、T細胞の集団はT_C細胞の集団を次第に多く含むようになる。したがって、治療の目的によっては、主

としてTH細胞で構成されるT細胞集団を対象に輸注することが有利な場合がある。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場合には、このサブセットをより高度に増大させることが有益な場合がある。

【０１７６】

さらに、CD4およびCD8マーカーのほかに、他の表現型マーカーも、細胞増大の過程で顕
著に、しかし大部分は再現性を伴って変動する。このため、そのような再現性により、活性化T細胞製剤を特定の目的に合わせて作ることが可能になる。

【０１７７】

治療適用

本発明は、レンチウイルスベクター（LV）によって形質導入された細胞（例えば、T細胞）を範囲に含む。例えば、LVは、特異的抗体の抗原認識ドメインを、CD3-ζ、CD28、4-
1BBの細胞内ドメインまたはこれらの任意の組み合わせと組み合わせたCARをコードする。
このため、場合によっては、形質導入されたT細胞は、CARにより媒介されるT細胞応答を誘発することができる。

【０１７８】

本発明は、一次T細胞の特異性を腫瘍抗原に向けて再誘導するためのCARの使用を提供する。したがって、本発明はまた、哺乳動物において標的細胞集団または組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法であって、CARを発現するT細胞を哺乳動物に投与する段階を含み、該CARが、所定の標的と特異的に相互作用する結合モイエティー、例えばヒトCD3ζの細胞内ドメインを含むζ鎖部分、および共刺激シグナル伝達領域を含む、方法を提供する。

【０１７９】

1つの態様において、本発明は、CARを発現するようにT細胞を遺伝子改変し、そのCAR T
細胞をそれを必要とするレシピエントに輸注する、一種の細胞療法を含む。輸注された細胞は、レシピエントにおける腫瘍細胞を死滅させることができる。抗体療法とは異なり、CAR T細胞はインビボで複製して、持続的腫瘍制御につながりうる長期存続性をもたらすことができる。

【０１８０】

1つの態様において、本発明のCAR T細胞は、頑強なインビボT細胞増大を起こすことができ、より延長した時間にわたって存続することができる。もう1つの態様において、本発明のCAR T細胞は、あらゆる追加的な腫瘍形成または増殖を阻害するように再活性化されうる、特異的なメモリーT細胞になることができる。例えば、本発明のCART19細胞が頑強なインビボT細胞増大を起こして、血液および骨髄において延長した時間にわたって高レベルに存続して、かつ特異的なメモリーT細胞を形成しうることは予想外であった。いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、CAR T細胞は、インビボでサロゲート抗原を発現する標的細胞に遭遇するとセントラルメモリー様状態に分化することができ、その後にそれを排除することができる。

【０１８１】

いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、CAR改変T細胞によって誘発される抗腫瘍免疫応答は、能動的な免疫応答でも受動的な免疫応答でもありうる。加えて、CARにより媒介される免疫応答は、CAR改変T細胞がCARにおける抗原結合モイエティーに対して
て特異的な免疫応答を誘導する養子免疫療法アプローチの一部となりうる。例えば、CART19細胞は、CD19を発現する細胞に対して特異的な免疫応答を誘発する。

【０１８２】

本明細書に開示されたデータは、FMC63マウスモノクローナル抗体に由来する抗CD19

scFv、ヒトCD8αのヒンジおよび膜貫通ドメイン、ならびにヒト4-1BBおよびCD3ζのシグナル伝達ドメインを含むレンチウイルスベクターを具体的に開示しているが、本発明は、本明細書中の別所に記載されたような構築物の構成要素のそれぞれに関してあらゆるさまざまな変形物を含むとみなされるべきである。すなわち、本発明は、抗原結合モイエティーに対して特異的な、CARにより媒介されるT細胞応答を生じさせるための、CARにおける任意の抗原結合モイエティーの使用を含む。例えば、本発明のCARにおける抗原結合モイエティーは、癌の治療を目的として腫瘍抗原を標的とすることができる。

【０１８３】

治療しうる可能性のある癌には、血管が発達していないか、またはまだ実質的に血管が発達していない腫瘍、ならびに血管が発達した腫瘍が含まれる。癌は非固形腫瘍（血液腫瘍、例えば、白血病およびリンパ腫）を含んでもよく、または固形腫瘍を含んでもよい。本発明のCARを用いて治療される癌の種類には、癌腫、芽細胞腫および肉腫、ある種の白血病またはリンパ性悪性腫瘍、良性および悪性腫瘍、ならびに悪性腫瘍、例えば、肉腫、癌腫および黒色腫が非限定的に含まれる。成人腫瘍／癌および小児腫瘍／癌も含められる。

【０１８４】

血液悪性腫瘍は、血液または骨髄の癌である。血液（または造血器）悪性腫瘍の例には、白血病、急性白血病（急性リンパ性白血病、急性骨髄急性白血病、急性骨髄性白血病、ならびに骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性の白血病および赤白血病など）、慢性白血病（慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病、慢性骨髄性白血病および慢性リンパ性白血病など）、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（無症候型およびハイグレード型）、多発性骨髄腫、ワルデンストローム・マクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、毛様細胞白血病および骨髄異形成が含まれる。

【０１８５】

固形腫瘍とは、通常は嚢胞も液体領域も含まない組織の異常腫瘤のことである。固形腫瘍は良性のことも悪性のこともある。さまざまな種類の固形腫瘍が、それを形成する細胞の種類によって名付けられている（肉腫、癌腫およびリンパ腫など）。肉腫および癌腫などの固形腫瘍の例には、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫および他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ性悪性腫瘍、膵癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞種 皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、セミノーマ、膀胱癌、黒色腫、ならびにCNS腫瘍（神経膠腫（脳幹神経膠腫および混合神経膠腫など）、神経膠芽細胞腫（多形性神経膠芽細胞腫としても知られる）、星状細胞腫、CNSリンパ腫、胚細胞腫、髄芽細胞腫、神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫（menangioma）、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫および脳転移など）が含まれる。

【０１８６】

1つの態様において、本発明のCARのモイエティー部分と結合する抗原は、特定の癌を治療するように設計される。例えば、CD19を標的とするように設計されたCARを、プレB ALL（小児適応）、成人ALL、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、同種骨髄移植後サルベージなどを非限定的に含む癌および障害を治療するために用いることができる。

【０１８７】

もう1つの態様において、CARを、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫を治療するために、C

D22を標的とするように設計することができる。
【０１８８】
1つの態様において、CD19、CD20、CD22およびROR1を標的とするCARの組み合わせを用いて治療しうる癌および障害には、プレB ALL（小児適応）、成人ALL、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、同種骨髄移植後サルベージなどが非限定的に含まれる。
【０１８９】
1つの態様において、CARを、中皮腫、膵癌、卵巣癌などを治療するために、メソテリンを標的とするように設計することができる。
【０１９０】
1つの態様において、CARを、急性骨髄性白血病などを治療するために、標的CD33/IL3Raを標的とするように設計することができる。
【０１９１】
1つの態様において、CARを、トリプルネガティブ乳癌、非小細胞肺癌などを治療するために、c-Metを標的とするように設計することができる。
【０１９２】
1つの態様において、CARを、前立腺癌などを治療するために、PSMAを標的とするように設計することができる。
【０１９３】
1つの態様において、CARを、前立腺癌などを治療するために、糖脂質F77を標的とするように設計することができる。
【０１９４】
1つの態様において、CARを、神経膠芽細胞腫（gliobastoma）などを治療するために、EGFRvIIIを標的とするように設計することができる。
【０１９５】
1つの態様において、CARを、神経芽細胞腫、黒色腫などを治療するために、GD-2を標的とするように設計することができる。
【０１９６】
1つの態様において、CARを、骨髄腫、肉腫、黒色腫などを治療するために、NY-ESO-1 TCRを標的とするように設計することができる。
【０１９７】
1つの態様において、CARを、骨髄腫、肉腫、黒色腫などを治療するために、MAGE A3 TCRを標的とするように設計することができる。
【０１９８】
しかし、本発明は、本明細書に開示された抗原標的および疾患のみに限定されるとみなされるべきではない。より正確には、本発明は、疾患を治療するためにCARを用いうる疾患と関連するあらゆる抗原標的を含むとみなされるべきである。
【０１９９】
本発明のCAR改変T細胞はまた、哺乳動物におけるエクスビボ免疫処置および／またはインビボ治療法のためのワクチンの一種としても役立つことができる。好ましくは、哺乳動物はヒトである。
【０２００】
エクスビボ免疫処置に関しては、細胞を哺乳動物に投与する前に、以下の少なくとも1

つをインビトロで行う：i）細胞の増大、ii）CARをコードする核酸を細胞に導入すること、および／またはiii）細胞の凍結保存。

【０２０１】

エクスビボ手順は当技術分野において周知であり、以下でより詳細に考察する。手短に述べると、細胞を哺乳動物（好ましくはヒト）から単離した上で、本明細書で開示されたCARを発現するベクターによって遺伝子改変する（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を行う）。CAR改変細胞を哺乳動物レシピエントに投与することにより、治療的利益を得ることができる。哺乳動物レシピエントはヒトであってよく、CAR改変細胞はレシピエントに対して自己であることができる。または、細胞がレシピエントに対して同種、同系または異種であることもできる。

【０２０２】

造血幹細胞および始原細胞のエクスビボ増大のための手順は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,199,942号に記載されており、これを本発明の細胞に適用することができる。他の適した方法は当技術分野において公知であり、このため、本発明は、エクスビボ細胞の増大のいかなる特定の方法にも限定されない。手短に述べると、T細胞のエクスビボ培養および増大は以下を含む：（1）CD34+造血幹細胞および始原細胞を哺乳
動物から、末梢血採取物または骨髄エクスプラントから収集すること；ならびに（2）そのような細胞をエクスビボを増大させること。米国特許第5,199,942号に記載された細胞増殖因子のほかに、flt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドなどの他の因子を、細胞の培養および増大のために用いることができる。

【０２０３】

エクスビボ免疫処置に関して細胞ベースのワクチンを用いることに加えて、本発明はまた、患者における抗原に向けての免疫応答を誘発するためのインビボ免疫処置のための組成物および方法も提供する。

【０２０４】

一般に、本明細書に記載の通りに活性化および増大された細胞は、免疫機能が低下した個体において生じる疾患の治療および予防に利用することができる。特に、本発明のCAR改変T細胞は、CCLの治療に用いられる。ある態様において、本発明の細胞は、CCLを発症するリスクのある患者の治療に用いられる。したがって、本発明は、CCLの治療または予防のための方法であって、それを必要とする対象に対して、本発明のCAR改変T細胞の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。

【０２０５】

本発明のCAR改変T細胞は、単独で、または希釈剤および／またはIL-2もしくは他のサイトカインもしくは細胞集団などの他の成分と組み合わせた薬学的組成物として投与することができる。手短に述べると、本発明の薬学的組成物は、本明細書に記載の標的細胞集団を、1つまたは複数の薬学的または生理的に許容される担体、希釈剤または添加剤と組み合わせて含みうる。そのような組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液；ブドウ糖、マンノース、ショ糖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；ポリペプチドまたはグリシンのようなアミノ酸；酸化防止剤；EDTA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）；並びに保存剤を含有してもよい。本発明の組成物は、静脈内投与用に製剤されることが好ましい。

【０２０６】

本発明の薬学的組成物は、治療（または予防）される疾患に適した方法で投与することができる。投与量および投与回数は、患者の状態、並びに患者の疾患の種類および重症度などの因子により決定されるが、適量は臨床試験により決定され得る。

【０２０７】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍的有効量」、「腫瘍阻害的有効量」または「治療量」が指示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感

染症または転移の程度、および患者（対象）の状態の個体差を考慮して、医師が決定することができる。一般に、本明細書に記載のT細胞を含む薬学的組成物は、細胞10^4～10^9個／kg体重、好ましくは細胞10^5～10^6個／kg体重であって、これらの範囲内のすべての整数
値を含む投与量で投与することができる。また、T細胞組成物をこれらの用量で多回投与することもできる。細胞は、免疫療法において一般的に公知である輸注手法を用いることによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照）。特定の患者に関する最適な投与量および治療レジメンは、疾患の徴候に関して患者をモニタリングして、それに応じて治療を調節することによって、医療の当業者によって容易に決定されうる。

【０２０８】

ある態様においては、活性化されたT細胞を対象に投与し、続いてその後に血液を再び採取して（またはアフェレーシスを行って）、それ由来のT細胞を本発明に従って活性化した上で、これらの活性化および増大されたT細胞を患者に再び輸注することが望まれると考えられる。この過程を2、3週毎に複数回行うことができる。ある態様において、T細胞は10cc～400ccの採取血から活性化させることができる。ある態様において、T細胞は20
cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90ccまたは100ccの採取血から再活性化され
る。理論に拘束されるわけではないが、この複数回の採血／複数回の再輸注プロトコールを用いることは、T細胞のある特定の集団を選別するために役立つ可能性がある。

【０２０９】

本組成物の投与は、エアゾール吸引、注射、経口摂取、輸液、植え付けまたは移植を含む、任意の好都合な様式で実施することができる。本明細書に記載された組成物は、患者に対して、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内（i.v.）注射により、または腹腔内に投与することができる。1つの態様において、本発明のT細胞組成物は、患者に対して、皮内注射または皮下注射によって投与される。もう1つの態様において、本発明のT細胞組成物は、好ましくは静脈内注射によって投与される。T細胞の組成物を腫瘍内、リンパ節内または感染部位に直接注射してもよい。

【０２１０】

本発明のある態様においては、本明細書に記載の方法、またはT細胞を治療的レベルまで増大させることが当技術分野において公知である他の方法を用いて活性化および増大された細胞を、MS患者に対する抗ウイルス療法、シドホビルおよびインターロイキン-2、シタラビン（ARA-Cとしても公知）もしくはナタリズマブ治療、乾癬患者に対するエファリズマブ治療、またはPML患者に対する他の治療などの薬剤による治療を非限定的に含む、任意のさまざまな妥当な治療様式とともに（例えば、前に、同時に、または後に）患者に投与する。さらなる態様において、本発明のT細胞を、化学療法、放射線照射、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、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など、抗体、またはCAMPATHなどの他の免疫除去薬、抗CD3抗体または他の抗体療
法、サイトキシン、フルダリビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および照射と組み合わせて用いてもよい
。これらの薬物は、カルシウム依存型ホスファターゼのカルシニューリンを阻害するか（シクロスポリンおよびFK506）、または増殖因子が誘導したシグナル伝達に重要であるp70
S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）かのいずれかである（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）。1つのさらなる態様において、本発明の細胞組成物は、骨

髄移植、フルダラビンなどの化学療法薬、外部ビーム照射（ＸＲＴ）、シクロホスファミド、またはＯＫＴ３もしくはＣＡＭＰＡＴＨなどの抗体のいずれかを用いるＴ細胞除去療法と組み合わせ
て（例えば、その前、同時またはその後に）、患者に投与される。もう１つの態様において、本発明の細胞組成物は、ＣＤ２０と反応する薬剤、例えばリツキサンなどによるＢ細胞除去療法の後に投与される。例えば、１つの態様において、対象は、高用量の化学療法薬に続いて末梢血幹細胞移植を行う標準治療を受けることができる。ある態様においては、移植後に、対象は本発明の増大された免疫細胞の輸注を受ける。１つの追加的な態様において、増大された細胞は、手術の前または後に投与される。

【０２１１】

患者に投与される上記の治療の投与量は、治療される病状および治療のレシピエントの正確な性質に応じて異なると考えられる。ヒトへの投与に関する投与量の増減は、当技術分野において許容される実践に従って行うことができる。例えば、ＣＡＭＰＡＴＨの用量は、一
般に成人患者について１～約１００ｍｇの範囲であり、通常は１～３０日の期間にわたって毎日投
与される。好ましい一日量は１～１０ｍｇ/日であるが、場合によっては、最大４０ｍｇ／日までの
より多くの用量を用いることもできる（米国特許第６,１２０,７６６号に記載）。

【実施例】

【０２１２】

実験例

ここで本発明を、以下の実験例を参照しながら説明する。これらの例は例示のみを目的として提供されるものであり、本発明はこれらの例に限定されるとは全くみなされるべきではなく、本明細書で提供される教示の結果として明らかになる任意かつすべての変更も範囲に含むとみなされるべきである。

【０２１３】

それ以上の説明がなくても、当業者は、前記の説明および以下の例示的な例を用いて、本発明の化合物を作成して利用し、請求される方法を実施することができる。以下の実施例は、このため、本発明の好ましい態様を具体的に指摘しており、本開示の残りを限定するものとは全くみなされるべきでない。

【０２１４】

<u>実施例１：キメラ受容体を発現するＴ細胞は、進行した白血病の患者においてメモリー効果および強力な抗腫瘍効果を成立させる</u>

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように操作されたリンパ球について、過去の臨床試験では極めてわずかなインビボ増大および抗腫瘍効果しか実証されていない。本明細書で提示された結果は、ＣＤ１３７を含むＣＡＲ Ｔ細胞が、進行した慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）を
有する、治療された患者３人中３人において、輸注後に交差耐性のない強力な臨床活性を有することを実証している。操作されたＴ細胞はインビボで１０００倍を上回って増大し、骨髄に輸送されて、機能的ＣＡＲを少なくとも６カ月にわたって高レベルで発現し続けた。平均して、輸注された各ＣＡＲ+ Ｔ細胞は少なくとも１０００個のＣＬＬ細胞を根絶させた。血液および骨
髄におけるＣＤ１９特異的な免疫応答が実証され、これは患者３人中２人における完全寛解を伴
った。細胞の一部分はメモリーＣＡＲ+ Ｔ細胞として存続したが、このことは、Ｂ細胞悪性腫瘍の有効な治療のためのこのＭＨＣ非拘束的アプローチの潜在能力を指し示している。

【０２１５】

これらの実験に用いた材料および方法について以下に説明する。

【０２１６】

材料および方法

一般的な検査の説明

研究試料の処理、凍結および検査分析は、試料の受け取り、処理、凍結および分析のための確立されたSOPおよび／またはプロトコールを用いて優良試験所基準（Good Laboratory Practice）の規範に則って運用されている、University of PennsylvaniaのTranslational and Correlative Studies Laboratoryで行った。アッセイ成績およびデータ報告により、MIATA指針が裏づけられている（Janetzki et al., 2009, Immunity 31:527-528）。

【０２１７】

プロトコールのデザイン

図1に図示したように臨床試験（NCT01029366）を実施した。少なくとも2回の前治療レジメン後に持続性疾患を有し、かつ同種幹細胞移植には適格でなかったCD19陽性血液悪性腫瘍の患者を、この試験に対して適格とした。腫瘍病期再判定後に、CART19製造のための末梢血T細胞をアフェレーシスによって収集し、対象に対して、輸注の前の週に、図10に明記した通りの単回コースの化学療法を行った。CART19細胞を、図10に表記した用量での3日分割投与レジメン（10%、30%および60%）を用いる静脈内輸注によって投与し、可能であれば、第10日に2回目の用量を投与した；2回目の輸注のために十分な細胞を有していたのは患者UPN 02のみであった。対象を毒性および奏効性に関して、頻回な間隔で少なくとも6カ月間にわたって評価した。プロトコールは、US Food and Drug AdministrationのRecombinant DNA Advisory Committee、およびUniversity of PennsylvaniaのInstitutional Review Boardによる承認を受けた。輸注の最初の日を試験第0日に設定した。

【０２１８】

対象：臨床的概要

臨床的概要を図10に示し、詳細な病歴を本明細書中の他所に提示している。患者UPN 01は、55歳の時にステージIIのB細胞CLLと初めて診断された。この患者は無症候性であり、進行性リンパ球増加症、血小板減少症、リンパ節肥大および脾腫に対する治療法が必要となるまで、およそ1～1／2年間の観察を受けた。この時間の経過の間に、患者は数系統の前治療を受けた。最も直近の治療法は、CART19細胞輸注の2カ月前の2サイクルのペントスタチン、シクロホスファミドおよびリツキシマブであったが、奏効性は極めてわずかであった。この患者は続いて、CART-19細胞輸注の前にリンパ除去化学療法として1サイクルのベンダムスチンを投与された。

【０２１９】

患者UPN 02は、疲労および白血球増加症を呈した68歳の時に初めてCLLと診断された。この患者は4年間にわたって比較的安定していたが、その時点で患者は、治療を要する進行性白血球増加症（195,000／μl）、貧血および血小板減少症を発症した。核型分析により、CLL細胞に染色体17pの欠失があることが示された。疾患進行のために患者はアレムツズマブによる治療を受けて部分的奏効が得られたが、1年半以内に患者は進行性疾患となった。患者を再びアレムツズマブで18週間治療したところ、部分的奏効および1年間の無増悪期間が得られた。患者は続いて2サイクルのベンダムスチンおよびリツキシマブを投与されたが、有意な奏効性はみられなかった（図5A）。患者はCART-19細胞輸注の前に、

リンパ除去化学療法としてベンダムスチン単剤を投与された。

【０２２０】

患者UPN 03は、50歳の時に無症候性のステージI CLLを呈し、それから数年間の経過観察を受けた。患者は治療を必要とする進行性白血球増加症（白血球数92,000／μl）および進行性リンパ節肥大を起こした。患者は2サイクルのリツキシマブおよびフルダラビンを投与され、その結果、血球数の正常化および有意な改善がもたらされたが、リンパ節肥大の完全な解消には至らなかった。患者はおよそ3年間の無増悪期間を得た。核型検査により、細胞が染色体17pの欠失を含むことが示され、FISHにより、細胞200個のうち170個
でTP53欠失が実証された。それから数年を経るうちに、患者は進行性白血球増加症およびリンパ節肥大のために3系統の異なる治療法（図10）を必要とし、最後にアレムツズマブを投与され、CART19細胞輸注の6カ月前に部分的奏効が得られた。患者はCART-19細胞輸注
の前に、リンパ除去化学療法としてペントスタチンおよびシクロホスファミドを投与された。

【０２２１】

ベクターの作製

記載の通りに（Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464）、CD19-BB-z導入遺伝
子（GeMCRIS 0607-793）を設計して構築した。レンチウイルスベクターは、記載の通りに
（Zufferey et al., 1997, Nature biotechnol 15:871-875）、Lentigen Corporationに
おいて、3プラスミド作製アプローチを用いる優良製造規範に従って作製された。

【０２２２】

CART19細胞製剤の調製

抗CD3および抗CD28モノクローナル抗体でコーティングした常磁性ポリスチレンビーズを用いるT細胞調製の方法は記載されている（Laport et al., 2003, Blood 102:2004-2013）。レンチウイルス形質導入は記載の通りに行った (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103:17372-17377）。

【０２２３】

腫瘍総量の算出のための方法

ベースラインでのCLL総量を、図10に示したように推定した。骨髄、血液および二次リンパ組織におけるCLL細胞の量を、下記の通りに算出した。

【０２２４】

骨髄：健常成人において、骨髄は全体重のおよそ5%に相当する（Woodard et al., 1960, Phys Med Biol, 5:57-59；Bigler et al., 1976, Health Phys 31:213-218）。腸骨稜試料における骨髄では、不活性（脂肪）骨髄のパーセンテージが年齢とともに高くなり、5歳時の全骨髄の20%から35歳までに約50%となり、その時から65歳までは安定に保たれ
るが、その後は75歳までに不活性骨髄が約67%に増加する（Hartsock et al., 1965, Am J Clin Path 43:326-331）。活性（赤色）骨髄および不活性（脂肪）骨髄の骨内総重量に関する国際基準値は、35歳の男性では現在それぞれ1170gおよび2480gに設定されている（
Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection:The Skeleton in Annals of the ICRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection, Oxford, 1995)）。35～65歳の成人男性では骨髄は体重全体の5.0%に相当し、1.6%が活性（赤色）骨髄、3.4%が不活性（脂肪）骨髄で構成される（Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection:The Skeleton in Annals of th

e ICRP, Vol. 25 (ed, Smith, H.) 58-68 (A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection, Oxford, 1995)）。骨髄生検標本および吸引液標本に基づき、表1に示したように、ベースラインでの患者3人のCLL細胞の重量を算出した。続いて、総CLL骨髄量のこれらの推定値を、1Kg＝細胞10^{12}個を
用いて骨髄内の総CLL細胞数に換算し、その結果得られた数を図10に示した。これらの算出は、CLLが骨髄内で均一な分布を有するという仮定に基づく。患者UPN 01については、ベンダムスチン化学療法の前に入手した骨髄生検試料、ならびにベンダムスチン後およびCART19輸注の前に入手した吸引液についての算出値を示している。第-1日吸引液に関する
数字は、第-14日生検標本と比較して精度が低いが、これは第-1日吸引液の技術的限界に起因する。患者UPN 02では、CLLによる骨髄の完全な置き換えを示す単一の治療前生検標本が得られた。この患者ではCART19後の第30日に変化のない標本が得られた。患者UPN 03
に関する骨髄での総量は、化学療法後およびCART19生検前に基づいて算出した。

【０２２５】

（表１）骨髄量

	活性骨髄の重量 (kg)	不活性骨髄の重量 (kg)	骨髄の合計 (kg)
正常男性 (ICRP標準品)	1.17	2.48	3.65
UPN 01 第-14日 (95% 細胞)	3.47	0.18	3.65
UPN 02 第-47日 (95% 細胞)	3.47	0.18	3.65
UPN 03 第-1日 (60% 細胞)	2.19	1.46	3.65
	CLLの重量 (kg)		
UPN 01 第-14日 (70% CLL)	2.43		
UPN 01 第-1日 (50% CLL 凝血による)	1.73		
UPN 02 第-47日 (>95% CLL)	3.29		
UPN 03 第-1日 (40% CLL)	0.88		

【０２２６】

血液：CART19輸注前の血液中にかなりのCLL腫瘍総量を有したのは患者UPN 02のみであ
った。フローサイトメトリーにより、細胞は、薄い表面κ拘束CD5+ CD10- CD19+ CD20（
薄い）+ CD23（可変）+ IgM-B細胞集団を伴うクローン集団としての典型的な表現型を示した。CLL細胞のおよそ35％はCD38を共発現した。CLL負荷量は3サイクルのベンダムスチ
ン化学療法を行っても消失せず、CART19輸注の時点も存在していた。CART19輸注の時点で
、血中CLL数は55,000個／μLであった。血液量を5.0Lと仮定した上で、患者UPN 02は第0
日に、血中に2.75×10^{11}個のCLL細胞を有していた。患者UPN 01および03における総WBC数
が正常であったことを考慮して、これらの患者における流血中疾患負荷量は計算しなかったが、このことは全身負荷量の幾分過小な推定値をもたらしたと考えられる。

【０２２７】

二次リンパ組織：リンパ節症および脾腫の体積を、横断CTスキャンにて、FDAにより認可されたソフトウエアを用いて定量した。体積は胸部、腹部および骨盤のみについてである。T1椎体から総大腿動脈の分岐レベルまでの腫瘤を全患者で測定し、一部の患者では鼠径部における節も含めた。頭／頸部および四肢における節は分析から除外し、ベースラインのCLL標的細胞数からも除外したが、これは同じく全身負荷量の幾分過小な推定値につながったと考えられる。患者UPN 01および03は、6カ月を超えて持続的な完全寛解を有し、このため、式（ベースライン体積 - 3カ月目の体積）を、腫瘍総量のベースラインからの減少を決定するために用いた；患者UPN 02はリンパ節肥大に関して疾患安定であり、このため、ベースライン腫瘍量は、年齢を一致させた健常男性による脾臓体積基準値を差し引くことによって推定した（Harris et al., 2010, Eur J Radiol 75:e97-e101）。ベースライン腫瘍量を、細胞密度アプローチ（1Kg／L密度、および1Kg＝細胞10^{12}個）または
体積アプローチ（CLL細胞は直径10μMであり、球状と仮定すると600fLである）を用いてC
LL細胞に換算し、両方の値を図10に提示している。入手可能なCTスキャンから算出した、患者3人における二次リンパ組織中の腫瘍体積は、以下の表2に示されている。

【０２２８】

（表２）腫瘍体積

患者	試験日	LN体積 (mm3)	脾臓体積 (mm3)	総体積 (mm3)
UPN 01	-37	239655	1619180	1858835
	1カ月	105005	1258575	1363580
	3カ月	65060	1176625	1241685
UPN 02	-24	115990	1166800	1282790
	1カ月	111755	940960	1052715
UPN 03	-10	239160	435825	674985
	1カ月	111525	371200	482725
	3カ月	47245	299860	347105

【０２２９】

患者UPN 01に関するベースラインのCTスキャンを、2サイクルのペントスタチン／シクロホスファミド／リツキシマブの8日後に行ったところ、以前のCTスキャンと比較して、この化学療法レジメンに対する奏効は全く示されなかった。この患者はCART19の前に1サイクルのベンダムスチンを受けており、それ故に、UPN 01について第-37日から第+31日までの腫瘍体積の変化がベンダムスチンならびにCART19の寄与による可能性を否定できない。同様に、UPN 03に関する腫瘍体積の変化は、1サイクルのペンタスタチン／シクロホスファミドおよびCART19の併用効果を反映している。

【０２３０】

患者における有効なインビボE：T比を推定するための方法

輸注したCAR T細胞と、死滅した腫瘍細胞の数とのE：T比を、CAR T細胞注射の時点で存在した腫瘍細胞の数、および注入したCAR T細胞の数を用いて算出した（Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-3365）。本発明に関しては、図10に示し

たCART19+ T細胞の数を用いたが、これは、インビボに存在するCART19+ T細胞の絶対数を
十分な精度または正確さで決定することができないためである。血液および骨髄におけるCART19増大に関して入手可能であったデータは、図2および図6に描写されているように頑
強である。しかし、二次リンパ組織などの他の部位へのCART19の輸送について決定するこ
とは不可能であり、このため、腫瘍の最大縮小時点でインビボで達成されたCART19細胞の
総数についてはかなり不確実さがある。有効なE：T比の算出には、表3からの算出値を用いた。

【０２３１】

（表３）インビボで達成されたCART19 E：T比の算出値

患者	腫瘍総量（ベースラインおよび増分）				輸注したCART19+ 細胞	インビボでのE：T
	骨髄のベースライン	血液のベースライン	節／脾臓[1]のベースライン	CLL総量の変化の合計		
UPN 01	1.70E+12	N/A	8.1E+11	2.51E+12	1.13E+09	1:220
UPN 02	3.20E+12	2.75E+11	1.6E+12	2.74E+11[2]	5.80E+08	1:100
UPN 03	8.80E+11	N/A	4.4E+11	1.32E+12	1.42E+07	1:93,0(
					範囲	1000 - 93,000

【０２３２】

1＝密度・体積法の平均

2＝患者UPN02は骨髄で反応がみられず、脾臓およびリンパ節においてCTによって測定した
腫瘍量についてリンパ節肥大の部分的縮小がみられた（細胞3.1E+11個）。血中での反応については図5Aを参照。

【０２３３】

<u>試料の処理および凍結</u>

ラベンダートップ（K2EDTA）またはレッドトップ（添加物なし）のバキュテナーチューブ（Becton Dickinson）内に試料（末梢血、骨髄）を収集し、採取から2時間以内にTCSLに搬送した。確立された検査SOPに従って、試料は受け取って30分以内に処理した。末梢血および骨髄の単核細胞を、Ficoll-Paque（GE Health care, 17-1440-03）を用いるFicoll密度勾配遠心分離によって精製し、4%ヒト血清アルブミン（Gemini Bio-Products, 800-120）、2%ヘタスターチ（Novaplus, NDC0409-7248-49）および10% DMSO（Sigma, D2650）を加えたRPMI（Gibco 11875-135）中で、5100 Cryo 1°凍結容器を用いて凍結した；
-80℃で24～72時間おいた後、長期貯蔵のために細胞を液体窒素中に移した。アフェレーシス試料は、Hospital of the University of Pennsylvania Blood Bankを通じて入手し、Ficoll勾配精製によってCVPF中で処理した上で、上記のように凍結した。解凍直後の生存度は、評価時点で85%を上回った。血清単離のためには、試料を室温で1.5～2時間凝固させ；遠心分離によって血清を単離して、単回使用のための100μlアリコートを-80℃で

凍結した。
【０２３４】
細胞株
K562（CML、CD19陰性）はATCC（CCL-243）から入手した。Carmine Carpenito氏から寄贈いただいたK562／CD19は、CD19分子を発現するように100％の頻度でレンチウイルスにより形質導入されたK562である。CD19陽性の非T、非B ALL前駆B細胞株であり（Hurwitz et al., 1979, Int J Cancer 23:174-180）、CD19抗原を発現することが確かめられたNALM-6は、Laurence Cooper氏から寄贈いただいた。上記の細胞株は、10％ウシ胎仔血清（Hyclone）および1% Pen-Strep（Gibco, 15140-122）を加えたR10培地（RPMI 1640（Gibco, 11875）中で維持した。健常ドナー由来の末梢単核細胞（ND365）は、University of PennsylvaniaのHuman Immunology Coreからアフェレーシスによって入手し、処理して、上記のように凍結した。
【０２３５】
DNAの単離およびQ-PCR分析
ラベンダートップ（K3EDTA）のBDバキュテナーチューブ（Becton Dickinson）内に全血または骨髄試料を収集した。QIAamp DNA blood midiキット（Qiagen）および確立された検査SOPを用いて全血からゲノムDNAを直接単離し、分光光度計によって定量した上で、-80℃で貯蔵した。ゲノムDNA試料に対するQ-PCR分析は、123～200ngのゲノムDNA／時点、AB I Taqman技術、および組み込まれたCD19 CAR導入遺伝子配列を検出するための検証済みのアッセイを用いて一括して行った。標準曲線勾配およびr^2値、参照基準試料（1000コピー／プラスミドスパイク）を正確に定量する能力、ならびに健常ドナーDNA試料における増幅がみられないことを含む、合格／不合格のパラメーター範囲を、認定試験および事前に設定した許容範囲を用いて算出した。CD19 CAR導入遺伝子用のプライマー／プローブは、記載の通りとした（Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-1464）。コピー数／単位DNAを決定するために、100ngの非形質導入対照ゲノムDNAにスパイクした10^6-5コピーのレンチウイルスプラスミドからなる8点標準曲線を作成した。各データポイント（試料、標準曲線、参照基準試料）を3件ずつ評価して、平均値を報告した。患者UPN 01の場合、報告された値はすべて、3件中3件の反復試料における正のCt値から導き出され、% CVは0.46%未満であった。患者UPN 02の場合は、第+177日の試料（3件中2件の反復試料が正、% CV高値）を除き、報告された値はすべて、3件中3件の反復試料において正のCt値から導き出され、% CVは0.72%未満であった。患者UPN 03の場合は、第+1日の試料（3件中2件の反復試料が正、0.8% CV）および第+3日の試料（3件中2件の反復試料が陽性、0.67% CV）を除き、報告された値はすべて、3件中3件の反復試料において正のCt値から導き出され

、% CVは1.56%未満であった。アッセイに関する定量下限（LLOQ）を標準曲線から求めたところ、2コピー／μg DNA（10コピー／200ngの投入DNA）であった；LLOQよりも少ない
平均値（すなわち、定量不能と報告）は概算値とみなされる。調べるDNAの品質を管理するための並行した増幅反応は、12～20ngの投入ゲノムDNA、CDKN1A遺伝子（GENEBANK：Z85
996）の上流の非転写ゲノム配列に対して特異的なプライマー／プローブの組み合わせ（センスプライマー：
GAAAGCTGACTGCCCCTATTTG; SEQ ID NO. 25

、アンチセンスプライマー：
GAGAGGAAGTGCTGGGAACAAT; SEQ ID NO. 26

、プローブ：
VIC- CTC CCC AGT CTC TTT; SEQ ID NO. 27

、および対照ゲノムDNAの希釈によって作成した8点標準曲線を用いて行った；これらの増幅反応により、相関係数（CF）（検出ng／投入ng）が得られた。導入遺伝子のコピー数／μg DNAは、以下の式に従って算出した：CD19標準曲線から算出されたコピー数／投入DNA
（ng）×CF×1000ng。このアッセイの精度は、輸注した細胞製剤の表示値を、以下の式に
従ったQ-PCRによって定量する能力によって判定した：平均表示値＝検出されたコピー数／投入DNA×6.3pg DNA／male体細胞×CFと、CAR特異的検出試薬を用いるフローサイトメ
トリー導入遺伝子の陽性度の対比。これらの盲検判定により、UPN 01輸注製剤については22.68%の表示値（フローサイトメトリーによれば22.6%）、UPN 02輸注製剤については3
2.33%の表示値（フローサイトメトリーによれば23%）、およびUPN 03輸注製剤について
は4.3%の表示値（フローサイトメトリーによれば4.7%の表示）が得られた。

【０２３６】

サイトカイン分析

可溶性サイトカイン因子の定量は、Luminexビーズアレイ技術およびLife technologies
（Invitrogen）から購入したキットを用いて行った。アッセイは製造元のプロトコールに従って行い、3倍希釈系列を用いて8点標準曲線を作成した。それぞれの標準点および試料について、1：3希釈で2件ずつ評価した；2件ずつの測定に関する算出% CVは15%未満であった。データはBioplex 200で取得し、Bioplex Managerバージョン5.0ソフトウエアに
より、5パラメーターのロジスティック回帰分析を用いて分析した。標準曲線の定量範囲を80～120%（観測値／期待値）の範囲で決定した。個々の分析物の定量範囲は、図の説明文中に報告されている。

【０２３７】

CARの機能を検出するための細胞アッセイ

解凍およびTCM中での一晩の静置の後に、標的細胞に対する反応としてのCD107脱顆粒を
測定することによって細胞を機能性に関して評価した。脱顆粒アッセイは、48ウェルプレート中の最終容積500μl中で1×10^6個のPBMCおよび0.25×10^6個の標的細胞を用いて、本

質的には記載された通りに（Berts et al., 2003, J Immunol Methods 281:6578）、CD49
d（Becton Dickinson）、抗CD28、モメンシン（e-Bioscience）およびCD107a-FITC抗体（
eBiosciences）の存在下において37℃で2時間かけて行った。
【０２３８】
抗体試薬
以下の抗体を、これらの試験のために用いた：Alexa647結合マウス抗CD19 CAR抗体であ
るMDA-CARは、Bipulendu Jena博士およびLaurence Cooper博士（MD Anderson Cancer Cen
ter）から寄贈いただいた。多パラメーター免疫表現型検査用および機能的アッセイ用：抗CD3-A700、抗CD8-PE-Cy7、抗PD-1-FITC 抗CD25-AF488、抗CD28-PercP-Cy5.5、抗CD57-e
F450、抗CD27-APC-eF780、抗CD17-APC-eF780、抗CD45RA-eF605NC、CD107a-FITC（すべてe
-Bioscienceによる）、抗CD4-PE-テキサスレッドおよびLive／Dead Aqua（Life Technolo
giesによる）、ならびに抗CD14-V500、抗CD16-V500（Becton Dickinsonによる）。一般的
な免疫表現型判定のためのもの：CD3-PE、CD14-APC、CD14-PE-Cy7、CD16-FITC、CD16PE-C
y7、CD19-PE-Cy7、CD20-PE、すべてBecton Dickinsonによる。
【０２３９】
多パラメーターフローサイトメトリー
Ficoll-Paque処理後に新鮮なままで、または凍結した場合には一晩静置した後で、細胞を、5%ヒトAB血清（GemCall, 100-512）、1% Hepes（Gibco, 15630-080）、1% Pen-St
rep（Gibco, 15140-122）、1% Glutamax（Gibco, 35050-061）および0.2% N-アセチル
システイン（American Regent, NDC0517-7610-03）を加えたT細胞培地（TCM）（X-vivo 1
5（Lonza, 04-418Q）中にて2×10^6個／mlの密度で、フローサイトメトリーによって評価
した。多パラメーター免疫表現型検査を、FMO着色料を本文に記載された通りに用いて、合計4×10^6個の細胞／条件に対して行った。製造元によって推奨される抗体および試薬の濃度を用いて、細胞を1×10^6個／100μl PBSの密度で氷上にて30分間染色し、洗浄し、0.
5%パラホルムアルデヒド中に再懸濁させた上で、上記の抗体の組み合わせの検出用および分離用の青色（488nm） 紫色（405nm）、緑色（532）および赤色（633nm）レーザーな
らびに適切なフィルターセットを装着した改変LSRII（BD Immunocytometry systems）を
用いて取得した。各着色料について、最低限100,000個のCD3+細胞を取得した。機能的アッセイのためには、細胞を洗浄し、表面マーカーに関して染色して、0.5%パラホルムアルデヒド中に再懸濁させた上で、上記のように取得した；各染色条件について最低限50,000件のCD3+イベントを収集した。補正値は個々の抗体着色料およびBD補正ビーズ（Becton
Dickinson）を用いて確定し、かつ装置によって自動的に算出および適用された。データ

はFlowJoソフトウエア（バージョン8.8.4、Treestar）。一般的な免疫表現型検査のためには、青色（488）および赤色（633nm）レーザーを装着したAccuri C6細胞計算器を用いて細胞を取得した。補正値は個々の抗体着色料およびBD補正ビーズ（Becton Dickinson）を用いて確定し、手作業で算出した。データはC-Flowソフトウエア分析パッケージ（バージョン1.0.264.9、Accuri細胞計算器）を用いて分析した。

【０２４０】

患者の既往歴および治療法に対する反応

臨床治療の概要を図10に示している。患者UPN 01は最初、55歳の時にステージIIのB細胞CLLと診断された。この患者は無症候性であり、進行性リンパ球増加症、血小板減少症、リンパ節肥大および脾腫に対する治療法が必要となるまで、およそ1～1／2年の観察を受けた。4サイクルのフルダラビンの後に、この患者の血球数は完全に正常化し、CTスキャンによれば完全奏効が得られた。進行は5カ月以内に認められ、無症候性リンパ球増加症、血小板減少症、およびリンパ節肥大の増大が見られた。患者はおよそ3年間にわたって症状を伴わずに観察されたが、その後、進行性リンパ球増加症、貧血、および血小板減少症に対して、リツキシマブおよびフルダラビンによる治療が必要となった。患者は4サイクルのリツキシマブおよびフルダラビンによる治療を受け、血球数の部分的改善が得られた。この患者では1年以内に再び、白血球増加症（WBC数150,000／μl）および血小板減少症（血小板数30,000／μl）として顕在化した、治療法を必要とする進行が起こり、アレムツズマブによる治療を受けて、血球数は正常化した。進行は13カ月以内に認められた。患者はそこでリツキシマブ単剤の投与を受けたが、有意な奏効はみられず、続いてリツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン（R-CVP）の投与を2サイクル受けたものの、極めてわずかな奏効しかみられず、続いてレナリドミドの投与を受けた。レナリドミドは毒性のために中止された。患者は2サイクルのペントスタチン、シクロホスファミドおよびリツキシマブを投与されたが、奏効は極めてわずかであった。

【０２４１】

その後、この患者は、CART19細胞輸注の4日前に、リンパ除去化学療法として1サイクルのベンダムスチンを投与された。治療法の前の時点で、WBC 14,200／μl、ヘモグロビン11.4gm／dl、血小板数78,000／μlであり、ALCは8000／μlであった。CTスキャンによってびまん性リンパ節肥大が示され、骨髄にはCLLが広範に浸潤していた（細胞の67％）。患者は1.6×10^{7}個のCART-19／kgを投与された（FACSによる評価では合計1.13×10^{9}個のCART19細胞）。輸注毒性はみられなかった。ベンダムスチン投与からおよそ10日後およびCART19細胞輸注から6日後に患者は好中球減少性になり、初回CART19輸注の10日後から、患者は発熱、硬直および一過性低血圧を起こした。同時に、胸部X線およびCTスキャンによって左上葉の肺炎が判明し、抗生物質によって治療された。発熱はおよそ2週間持続し、好中球が回復した時点で解消した。患者はそれ以上は感染症状も体質症状も起こさなかった。

【０２４２】

図5に描写されているように、この患者では急速かつ完全な奏効が達成された。輸注から1カ月後～6カ月後の間に、体内の流血中CLL細胞はフローサイトメトリーによって検出されなかった。形態学的検査およびフローサイトメトリー検査により、CART-19細胞輸注から1カ月後、3カ月後および6カ月後の骨髄で、リンパ性浸潤物の持続的欠如が示されて

いる。輸注から1カ月後および3カ月後のCTスキャンにより、異常リンパ節肥大の完全消散が示されている。この患者は持続性の白血球減少症（WBC 1000～3900／μl）および血小
板減少症（血小板数ほぼ100,000／μl）、ならびに軽度の低ガンマグロブリン血症（IgG 525mg／dL、正常値650～2000mg／dL）を有しているが、感染性合併症はない。

【０２４３】

患者UPN 02は、77歳の時点でCART19細胞による治療を受けた。この患者は冠動脈疾患の
関連病歴があり、疲労および白血球増加症を呈した68歳の時、2000年に初めてCLLと診断された。患者は4年間比較的安定していたが、その時点で患者は、治療を要する進行性白血球増加症（195,000個／μl）、貧血および血小板減少症を発症した。その時の遺伝子検査により、CLL細胞に染色体17pの欠失があることが示された。疾患進行のために、患者はアレムツズマブによる12週間のコースによる治療を受け、部分的奏効および血球数の改善が得られた。1年半以内に、患者は進行性白血球増加症、貧血、血小板減少症および脾腫を生じた。核型分析により、染色体17pの欠失が確かめられたが、この時は染色体13qの欠失も認められた。患者を再びアレムツズマブで18週間治療したところ、白血球増加症の改善、ならびに貧血および脾腫の安定化が得られた。患者は1年以内に、進行性白血球増加症、貧血および血小板減少症の所見を示した。治療には2サイクルのベンダムスチンおよびリツキシマブが含められ、その結果、図5Aに示されているように、疾患の安定がもたらされたが、有意な改善はみられなかった。

【０２４４】

この患者は、CART-19細胞輸注の前に、リンパ除去化学療法としてベンダムスチン単剤の投与を受けた。患者は4.3×10^{6}個のCART19細胞／kg（合計4.1×10^{8}個）の輸注を3回に
分けて受けたが、102°という高い一過性発熱が24時間にわたって併発した。初回輸注後の第11日に、患者は4.1×10^{8}個（4.3×10^{6}個／kg）のCART19細胞の追加投与を受け、この
輸注には発熱、硬直、および低酸素症を伴わない息切れが併発し、24時間の入院が必要となった。心虚血の所見は認められず、症状は解消した。CART-19初回輸注後の第15日およびCART19細胞追加輸注後の第4日に、患者は高熱（最高104°F）、悪寒および硬直のため
に入院した。血液および尿培養およびCXRによる広範な検査を行ったものの、感染源を同定することはできなかった。患者は息切れを訴えたが、低酸素症はみられなかった。心エコー図検査により、重度の運動低下が示された。駆出率は20％であった。患者はプレドニゾン1mg／kgを1日間、0.3mg／kgをおよそ1週間投与された。これにより、発熱および心機
能不全の急速な消失がもたらされた。

【０２４５】

図5Aに描写されているように、高熱の発生に一致して、この患者では末梢血からのリンパ球の急速な減少がみられた。患者の白血球数は正常化したものの、患者は持続性の流血中CLL、安定した中程度の貧血および血小板減少症を有した。骨髄では、高度の末梢血細胞除去を行ったにもかかわらず、治療の1カ月後にCLLの持続性広範浸潤が示され、CTスキャンからはリンパ節肥大および脾腫の部分的縮小が示された。CART19細胞輸注から5カ月後に、患者は進行性リンパ球増加症を発症した。輸注から9カ月後に、この患者はリンパ球増加症（16,500／μl）を、安定した中程度の貧血および血小板減少症、および安定したリンパ節肥大とともに呈した。患者は依然として無症候性であり、それ以上の治療法は受けなかった。

【０２４６】

患者UPN 03は50歳の時に無症候性のステージI CLLと診断され、6年間にわたって経過観

察を受けた。その後、患者は、治療を必要とする進行性白血球増加症（白血球数92,000／μl）および進行性リンパ節肥大を生じた。患者は2サイクルのリツキシマブおよびフルダラビンを投与され、その結果、血球数の正常化、および、リンパ節肥大の完全消散ではないものの有意な改善がもたらされた。この患者ではおよそ3年間の無増悪期間が得られたが、その後の6カ月で、治療を必要とする急速進行性白血球増加症（WBC 165,000／μl）および進行性リンパ節肥大が起こった。患者が1サイクルのフルダラビン、ならびに3サイクルのリツキシマブおよびフルダラビンの投与を受けたところ、血球数の正常化、および触知しうるリンパ節肥大の消散が得られた。患者はおよそ20カ月間の無増悪期間を得たが、その後、患者は再び、急速進行性白血球増加症およびリンパ節肥大を発症した。この時点で骨髄はCLLによって広範に浸潤されており、核型検査によって細胞が染色体17pの欠失を含むことが示され、FISHにより、細胞200個のうち170個でTP53欠失が実証された。患者
は1サイクルのリツキシマブおよびベンダムスチン、その後に4サイクルのベンダムスチン単独（リツキシマブに対する重度のアレルギー反応のため）の投与を受けた。患者は初期には血球数が正常化したが、治療法を中止すると間もなく、進行性白血球増加症およびリンパ節肥大が起こった。

【０２４７】

患者UPN3から自己T細胞をアフェレーシスによって収集し、凍結保存した。この患者を続いて、アレムツズマブによって11週間治療したところ、優れた血液学的奏効が得られた。リンパ節肥大は改善したものの、完全消散には至らなかった。この患者ではその後6カ月にわたって活動性ではあるが安定した疾患がみられた。その後に患者は、CART19細胞輸
注の前に、リンパ除去化学療法としてペントスタチンおよびシクロホスファミドを投与された。

【０２４８】

化学療法の3日後であるが細胞輸注の前の時点で、骨髄は過形成性（60%）であり、CLLの関与がおよそ40%であった。表3および（Bonyhadi et al., 2005, J Immunol 174: 2366
-2375）に描写されているように、CLL患者からのアフェレーシス収集物に伴う製造上の限
界が理由で、患者には、1.46×10^5個のCART19+細胞／kg（合計1.42×10^7個のCART19+細胞
）を3日間にわたって輸注した。輸注毒性はみられなかった。初回輸注から14日後に、患者は悪寒、102°Fもの高い発熱、硬直、悪心および下痢を起こすようになり、対症治療を受けた。患者は呼吸器症状も心症状も起こさなかった。輸注後の第22日までに、LDHおよび尿酸の上昇によって顕在化した腫瘍溶解症候群が診断され、腎不全も併発した。患者は入院し、補液蘇生およびラスブリカーゼによる治療を受けたところ、尿酸値および腎機能は急速に正常化した。CXR、血液、尿および便培養による詳細な臨床評価を行ったが、いずれも陰性または正常であった。

【０２４９】

形態学的検査、フローサイトメトリー、細胞遺伝学検査およびFISH分析によれば、CAR
T
-19輸注から1カ月以内に患者の流血中CLLは血液および骨髄から消失しており、CTスキャンからは異常リンパ節肥大の消散が示された（図5C）。患者の寛解は、CART19細胞の初回
輸注から8カ月を過ぎても持続していた。

【０２５０】

実験の結果を以下に記す。

【０２５１】

<u>臨床プロトコール</u>

図1に描写されているように、進行した化学療法抵抗性CLLの患者3人をパイロット臨床試験に組み入れた。図10に示されているように、患者は全員、さまざまな化学療法および生物学的レジメンによる広範な前治療を受けた。患者のうち2人はp53欠損性CLLを有しており、この欠失は従来の治療法に対する奏効不良および急速な進行を予測させる（Dohner et al., 1995, Blood, 851580-1589）。患者はそれぞれ、予備化学療法の後に多くの腫瘍総量を有しており、これには広範な骨髄浸潤（40～95%）およびリンパ節症が含まれた；患者UPN 02はまた、顕著な末梢リンパ球増加症も有していた。CART19 T細胞は図1Bに描
写したように調製され、各患者についての細胞製造および製剤の特性決定の詳細は表4に示されている。患者は全員、CART19 T細胞輸注の1～4日前に、リンパ除去化学療法による
前治療を受けた。図1Aに描写したような4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインを組み入れたC
ARの予備試験という理由から、分割投与細胞輸注計画を用いた。

【０２５２】

（表４）アフェレーシス産物およびCART19製剤のリリース基準

	アッセイ	諸元	UPN 01	UPN 02	UPN 03
アフェレーシス産物					
	CD3+またはCD45+に対するフローサイトメトリー	N/A	4.46%	2.29%	2.67%
CART19製剤					
	輸注する総細胞数	~2-5 x 10^9	5 x 10^9	1.275 x 10^9 1.275 x 10^9 [合計2.55 x 10^9]	3 x 10^8
	細胞の生存度	>= 70%	96.2%	95.3 (90.5)[1]	90.3
	CD3+細胞の%	>= 80%	88.9%	98.8	98.9
	残留ビーズ数	ビーズ<=100個／細胞3×10^6個	3.95	1	4
	エンドトキシン	<= 3.5 EU/mL	<0.5 EU/mL	<0.5 EU/mL	<0.5 EU/mL
	マイコプラズマ	陰性	陰性	陰性	陰性
	無菌性(Bactec)	増殖なし	増殖なし	増殖なし	増殖なし
	真菌培養	増殖なし	増殖なし	増殖なし	増殖なし
	BSA ELISA	<= 1 μg/mL	<0.5 ng/mL	<0.5 ng/mL	<0.5 ng/mL
	複製可能レンチウイルス(RCL)	RCL検出不能	検出不能	不確定[2]	不確定[2]
	形質導入効率(scFv発現)	>= 20%	22.6%	23%	4.74%[4]
	ベクターDNA配列(CART19 PCR)	0.2 - 3コピー／細胞	0.15[3]	0.275	0.101

【０２５３】

1＝2回目の用量

2＝第12日時点でLOQを下回り、かつ、ベクター世代によるプラスミドDNAの持ち越しと整
合するように以前の増大時よりも減少しているアッセイ値。情報補正としてFDAに提出。

3＝FACSによる表面染色に基づく製剤リリース

4＝外部DSMCおよびIRBにより、リリース基準に対して許諾された治療上の例外

【０２５４】

CART19のインビボ増大および存続性ならびに骨髄への輸送

CD3／CD28ビーズを用いて増大された、4-1BBシグナル伝達ドメインを発現するCAR+ T細
胞は、4-1BBを持たないCARよりも改良されていると考えられる。血液および骨髄におけ
るCART19細胞の定量的追跡を可能にするQ-PCRアッセイを開発した。図2Aおよび2Cに描写さ
れているように、患者は全員、血液中のCART19細胞の増大および存続性を少なくとも6カ月にわたって有していた。注目されることとして、患者UPN 01およびUPN 03では、輸注後
の最初の1カ月の間に、血液中のCAR+ T細胞の1,000～10,000倍への増大が生じた。ピーク
増大レベルは、患者UPN 01（第15日）および患者UPN 03（第23日）における輸注後臨床症
状の発生と一致した。その上、患者3人全員で、一次速度論を用いてモデル化しうる初期減衰の後、輸注後の第90日から第180日までにCART19 T細胞レベルは安定化した。重要な
こととして、すべての患者で、CART19 T細胞は骨髄にも輸送されたが、図2D～2Fに描写さ
れているように、血液中で観察されたレベルよりも5分の1～10分の1という低いレベルであった。患者UPN 01および03では、骨髄において対数線形減衰がみられ、消失T1/2はほぼ
35日であった。

【０２５５】

<u>CART19輸注後の血液区画および骨髄区画における特異的免疫応答の誘導</u>

図3に描写されているように、すべての患者から血清試料を収集して、サイトカインレベルを定量的に決定するためにバッチ分析を行い、CART19細胞の毒性を評価するため、およびその機能に関する所見を得るために、一群のサイトカイン、ケモカインおよび他の可溶性因子を評価した。試験した30種の分析物のうち11種はベースラインから3倍またはそれ以上の変化を生じ、これには4種のサイトカイン（IL-6、1NF-γ、IL-8およびIL-10）、
5種のケモカイン（MIP-1α、MIP-1β、MCP-1、CXCL9、CXCL10）ならびにIL-1RαおよびIL
-2Rαに対する可溶性受容体が含まれた。これらのうち、インターフェロン-γはベースラインからの相対的変化が最も大きかった。興味深いことに、UPN 01およびUPN 03における
サイトカイン上昇のピーク時間は、各患者における前述した臨床症状および血液中のCART19細胞のピークレベルと時間的に相関した。患者UPN 02では中程度の変化しか認められなかったが、これはおそらくこの患者に与えられたコルチコステロイド治療の結果と考えられる。4-1BBシグナル伝達ドメインを有するCAR+ T細胞を開発することの前臨床段階での根拠の1つは、CD28シグナル伝達ドメインと比較してIL-2分泌を誘発する性向が弱いことであったとはいえ、患者の血清中での可溶性IL-2の上昇は検出されなかった（Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464）。CAR+ T細胞が、かなりの量のIL-2を分泌するCAR
によって、または輸注後の外因性IL-2の供与によって誘発されうると考えられる細胞である調節性T細胞によって抑制される可能性が以前の研究（Lee et al., 2011, Cancer Res 71:2871-2881）で示されていることからみて、これは持続的な臨床活性と関係している可
能性がある。さらに、図3Dに描写されているように、UPN 03の骨髄吸引液からの上清で

サ
イトカイン分泌の頑強な誘導が観察され、これは腫瘍溶解症候群の発症および完全寛解とも一致した。

【０２５６】

血液中でのメモリーCART19細胞の集団の長期的発現および樹立

CARにより媒介される癌免疫療法における核心的な課題は、最適化された細胞製造および共刺激ドメインが、遺伝子改変されたT細胞の存続性を増強するか否か、および患者におけるCAR+メモリーT細胞の樹立を可能にするか否かである。以前の研究では、輸注後のT細胞上のCARの頑強な増大、長期にわたる存続性および／または発現は実証されていない（Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115；Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22；Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271；Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi:10.1172/JC146110）。輸注から169日後の血液および骨髄の両方
からの試料のフローサイトメトリー分析により、UPN 03（図4Aおよび4B）におけるCAR19
を発現する細胞の存在、および図4Aに描写されているようにB細胞の欠如が明らかになった。注目されることとして、図2および図6に描写されているように、Q-PCRアッセイによれば、患者3人の全員が4カ月およびそれ以後の時点で存続CAR+細胞を有する。フローサイトメトリーによるCAR+細胞のインビボ頻度は、CART19導入遺伝子に関するPCRアッセイか
ら得られた値とよく一致した。重要なこととして、図4Aに描写されているように、患者UPN 03では、CD16陽性サブセットまたはCD14陽性サブセットでCAR19+細胞が検出不能であっ
たため、CD3+細胞のみがCAR19を発現した。図7に描写されているように、患者UPN 01の血
液中では輸注後の第71日にもCAR発現がT細胞の4.2%の表面上で検出された。

【０２５７】

次に、多染性フローサイトメトリーを用いることにより、抗CARイディオタイプ抗体（MDA-647）および図8に示されたゲーティング戦略を用いて、UPN 03におけるCART19細胞の
発現、表現型および機能をさらに特徴づけるための詳細な試験を行った。CAR19発現に基づき、CD8+細胞およびCD4+細胞の両方においてメモリーおよび活性化のマーカーの発現に
著しい差が観察された。図4Cに描写されているように、第56日の時点で、CART19 CD8+細
胞は、抗原への長期的および頑強な曝露に整合するように、主としてエフェクターメモリー表現型（CCR7-CD27-CD28-）を提示した。対照的に、CAR陰性CD8+細胞はエフェクター細
胞およびセントラルメモリー細胞の混合物からなり、細胞のあるサブセットはCCR7発現を伴い、CD27+／CD28-およびCD27+／CD28+画分にかなりの数があった。CART19細胞集団およ
びCAR陰性細胞集団は両方ともCD57をかなり発現したものの、CART19細胞ではこの分子はP
D-1とともに均一に共発現され、このことはこれらの細胞の高度な複製履歴を反映している可能性がある。CAR陰性細胞集団とは対照的に、CART19 CD8+集団はすべて、CD25および
CD127の両方の発現を欠いていた。第169日までに、CAR陰性細胞集団の表現型は第56日の
試料に類似したままであったが、CART19集団は、とりわけCCR7の発現、より高レベルのCD

27およびCD28といったセントラルメモリー細胞の特徴を有する少数集団、ならびにPD-1陰
性、CD57陰性かつCD127陽性であるCAR+細胞を含むようになった。
【０２５８】
CD4+区画では、図4Bに描写されているように、第56日の時点で、CART19細胞は、CCR7を
一様に欠くこと、ならびにCD57+区画およびCD57-区画の両方に分布するCD27+／CD28+／PD
-1+細胞が優位であること、ならびにCD25およびCD127の発現が本質的に存在しないことに
よって特徴づけられた。対照的に、CAR陰性細胞はこの時点でCCR7、CD27およびPD-1の発
現に関して異種混交的であり、CD127を発現し、CD25+／CD127-（調節性T細胞の可能性の
ある）集団もかなり含んでいた。第169日までに、CAR+CD4+細胞ではすべて、CD28発現は
一様に陽性のままであったが、CART19 CD4+細胞のある画分は、CCR7の発現を伴い、CD27-
細胞のパーセンテージがより高く、PD-1陰性サブセットが出現し、かつCD127発現を獲得
するというセントラルメモリー表現型に向かった。CAR陰性細胞はその第56日の対応物と
かなり一致したままであったが、ただし、CD27発現の低下、CD25+／CD127-細胞のパーセ
ンテージの減少は例外であった。
【０２５９】
CART19細胞は血液中で6カ月後もエフェクター機能を保ちうる
CAR+ T細胞を用いた以前の試験の限界には、短い存続性およびインビボ増殖が不十分であることのほかに、輸注したT細胞のインビボでの機能的活性の急速な損失もあった。患者UPN 01および03における高レベルのCART19細胞存続性およびCAR19分子の表面発現によ
り、凍結保存した末梢血試料から回収した細胞における抗CD19特異的エフェクター機能を直接検査するという機会がもたらされた。患者UPN 03からのPBMCを、CD19発現に関して陽
性または陰性のいずれかである標的細胞とともに培養した（図4d）。表面CD107a発現によ
る評価で、CART19 T細胞の頑強なCD19特異的エフェクター機能が、CD19陰性標的細胞とは
異なる、CD19陽性標的細胞に対する特異的脱顆粒によって実証された。注目されることとして、標準的なフローサイトメトリー染色での同じエフェクター細胞におけるCAR19の表面発現に関して図8に描写されているように、CD19陽性標的に対するCART19集団の曝露に
より、表面CAR-19の急速な内部移行が誘導された。NALM-6株はCD80もCD86も発現しないこ
とからみて、標的細胞上の共刺激分子の存在は、CART19細胞の脱顆粒を誘発するために必
要ではなかった（Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 1:5426-5435）。エフェクター機能は輸注後の第56日の時点で明らかであり、第169日の時点でも保たれた。CAR+およびCAR-T細胞の頑強なエフェクター機能を、薬理刺激によって実証することも可能と考えられる。
【０２６０】
CART19細胞の臨床的活性

いずれの患者においても、輸注後の4日間には、一過性の発熱反応以外に目立った毒性は観察されなかった。しかし、すべての患者で、その後、初回輸注後の第7日～第21日の間に、目立った臨床的毒性および検査値上の毒性が生じた。これらの毒性は短期的かつ可逆的であった。標準的な基準によれば（Hallek et al., 2008, Blood 111:5446）、これまでに治療した3人の患者のうち、CART19輸注後6カ月を上回った時点でのCRは2人であり
、PRは1人である。各患者についての既往歴および治療法に対する反応の詳細は、図10に描写されている。

【０２６１】

手短に述べると、患者UPN 01は、輸注の10日後から、硬直および一過性低血圧を伴う発
熱症候群を発症した。発熱はおよそ2週間持続してから解消した；この患者ではこれ以上に体質症状を起こさなかった。この患者では、図5に描写されているように、急速かつ完全な奏効が達成された。輸注後1カ月～6カ月の間に、フローサイトメトリーにより、血液中の流血中CLL細胞は全く検出されなかった。図5Bに描写されているように、形態学的検査およびフローサイトメトリー検査により、CART-19細胞輸注後1カ月、3カ月および6カ月
の骨髄では、リンパ性浸潤物の持続的欠如が示されている。図5Cに描写されているように、輸注後1カ月および3カ月のCTスキャンにより、リンパ節肥大の消散が示されている。完全寛解は、この報告の時点から10カ月超にわたって持続した。

【０２６２】

患者UPN 02は2サイクルのベンダムスチンおよびリツキシマブによって治療され、その結果、図5Aに描写されているように、疾患の安定がもたらされた。この患者は、CART19T
細胞輸注の前に、リンパ除去化学療法としてベンダムスチンの3回目の投与を受けた。患者は40℃に至る発熱、硬直および呼吸困難を発症し、初回輸注後の第11日であってCART19
細胞の2回目の追加投与の当日に、24時間の入院が必要となった。発熱および体質症状は持続し、患者は第15日に一過性心機能不全を起こした；コルチコステロイド療法を第18日に開始した後に、症状はすべて消失した。CART19輸注の後に、高熱の発生と同時に、この
患者では、図5Aに描写されているように末梢血からのp53欠損性CLL細胞の急速な消失、およびリンパ節肥大の部分的縮小が起こり、骨髄では、高度の末梢血細胞除去を行ったにもかかわらず、治療の1カ月後にはCLLの持続性広範浸潤が示された。患者は無症候性のままであった。

【０２６３】

患者UPN 03は、CART19細胞輸注の前に、ペントスタチンおよびシクロホスファミドをリ
ンパ除去化学療法として投与された。化学療法の3日後であるが細胞輸注の前の時点で、骨髄は過形成性（60%）であり、CLLの関与がおよそ50%であった。この患者は低用量のC
ART19細胞（1.5×10^5個のCAR+T細胞／kgを3日間に分けて）の投与を受けた。この場合も
急性輸注毒性はみられなかった。しかし、初回輸注から14日後に、患者は硬直、発熱、悪心および下痢を起こし始めた。輸注後の第22日までに、入院を必要とする腫瘍溶解症候群と診断された。患者の体質症状は消散し、CART19輸注から1カ月以内に、形態学的検査、フローサイトメトリー、細胞遺伝学検査およびFISH分析によれば、患者の流血中CLLは血液および骨髄から消失した。図5Bおよび5Cに描写されているように、CTスキャンによって、異常リンパ節肥大の消散が示された。完全寛解はCART19細胞の初回輸注から8カ月を上

回って持続した。

【０２６４】

インビボでのCART19エフェクターとCLL標的細胞との比の検討

前臨床試験により、ヒト化マウスで大きな腫瘍を除去することができたこと、および、2.2×10^{7}個のCARの輸注によって、インビボでのE：T比が1：42となる1×10^{9}個の細胞で構成される腫瘍を根絶させることができたことが示されているが（Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-3365）、これらの計算は注射後のT細胞の増大を考慮に入れていない。 CLL腫瘍総量の経時的な推定により、輸注されたCAR+ T細胞の数に基づく、3人の対象においてインビボで達成された腫瘍縮小および推定CART19 E：T比の算出が可能になった。骨髄、血液および二次リンパ組織におけるCLL量（CLL load）を測定することによって、腫瘍総量を算出した。図10に示されたベースライン腫瘍総量は、各患者がCART19輸注の前に10^{12}個という桁数のCLL細胞（すなわち、腫瘍量1kg）を有していたことを指し示している。患者UPN 03は、第-1日（すなわち、化学療法の後およびCART19輸注の前）の時点で、骨髄内での推定ベースライン腫瘍総量がCLL細胞8.8×10^{11}個であり、二次リンパ組織における腫瘍量の計測値は、体積分析用CTスキャン分析の方法に応じてCLL細胞$3.3\sim5.5\times10^{11}$個であった。UPN 03にはCART19細胞が1.4×10^{7}個しか輸注されなかったことと、初期腫瘍総量の推定値（CLL細胞1.3×10^{12}個）を用いた上で、さらに治療後にはCLL細胞が全く検出不能であったことを考慮すると、1：93,000という際立ったE：T比が達成された。同様の計算により、UPN 01およびUPN 02については、表3に示されたように、1：2200および1：1000というインビボでの有効E：T比が算出された。最終的には、CART19 T細胞による連続死滅の寄与と、1,000倍を上回るインビボでのCART19増大とが相まって、CART19細胞によって媒介される強力な抗白血病効果の原因になっている可能性が高い。

【０２６５】

キメラ受容体を発現するT細胞は、進行した白血病の患者においてメモリー効果および強力な抗腫瘍効果を成立させる

CARのインビボ発現およびエフェクター機能が限定されていることは、第一世代CARを試験する治験において中心的な限界となってきた（Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115；Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22；Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271；Park et al., 2007, Mol Ther 15:825833；Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270）。4-1BBシグナル伝達モジュールを含むCARの存続性の強化を実証した前臨床モデリングに基づき（Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464；Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-3365）、レンチウイルスベクター技術によって操作された第二世代のCARを開発するための実験をデザインした。こ

の第二世代のCARは、慢性HIV感染の状況で安全であることが見いだされた（Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103:17372-17377）。今回の結果は、この第二世代CARをT細胞において発現させ、セントラルメモリーT細胞の生着を促すように設計された条件下で培養した場合に（Rapoport et al., 2005, Nat Med 11:1230-1237；Bondanza et al., 2006, Blood 107:1828-1836）、以前の報告と比較して輸注後のCAR T細胞の増大の向
上が観察されたことを示している。CART19細胞はCD19特異的なメモリー細胞を樹立させ、
これまでに達成されていないインビボでのE：T比で腫瘍細胞を死滅させる。

【０２６６】

CART19は4-1BBシグナル伝達ドメインを組み入れた初のCAR治験であり、レンチウイルス
ベクター技術を用いた初めてのものである。今回の結果は腫瘍部位へのCARの効率的な輸送を実証しており、CD19特異性を呈する「腫瘍浸潤リンパ球」の事実上の樹立を伴う。顕著なインビボ増大により、患者から直接回収したCARがインビボでエフェクター機能を数カ月にわたって保ちうることの初めての実証が可能となった。以前の研究では、ウイルス特異的T細胞への第一世代CARの導入が一次T細胞にとって好ましいことが示唆された（Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270）が、最適な共刺激を受けた一次T細胞に導入された第二世代CARを用いた結果はこの考え方に疑問を投げかける。いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、臨床的効果が著明かつ空前無比であり、患者3人のすべてでキログラム規模の腫瘍総量の溶解が起こり、患者のうち2人では危険な恐れのある高レベルのサイトカインの遅延放出が伴うという、警告を促す事項が提起された。古典的なサイトカインストーム効果は観察されなかった。しかし、本研究は、3日という期間をかけたCART19の慎重な輸注によって、この可能性を軽減するように設計した。

【０２６７】

極めて低用量のCARが強力な臨床的奏効を誘発しうることが見いだされた。これはCART19ベクターのデザインの安全性を実証したパイロット試験であった。以前の試験で検討されたものよりも数桁少ないCART19細胞の用量が臨床的有益性を有しうるという観察所見は
、CAR療法のより大きな規模での将来の実施のため、およびCD19以外の標的に向けられたCARを試験する試験のデザインのために重要な意味を有するであろう。

【０２６８】

本研究はさらに、CART19がセントラルメモリーT細胞およびエフェクターT細胞の両方で
発現されることを指し示しており、このことは、以前の報告と比較したそれらの長期生存に寄与している可能性が高い。いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、CAR T細胞は、インビボでサロゲート抗原を発現する標的細胞（例えば、CLL腫瘍細胞または正常B細胞）に遭遇するとセントラルメモリー様の状態に分化して、その後にそれを排除することができる。事実、4-1BBのシグナル伝達は、TCRシグナル伝達に関連してメモリー
の発達を促進することが報告されている（Sabbagh et al., 2007, Trends Immunol 28:333-339）。

【０２６９】

CART19の増殖性および生存性の拡大により、これまで報告されていなかったCAR T細胞の薬物動態の諸局面が明らかになった。血清および骨髄におけるサイトカイン放出の動態

はピークCART19レベルと相関しており、そのため、CD19を発現する細胞標的が限定的になった時点で遅延を開始させることが可能である。CART19の生存性の拡大の機序は、4-1BBドメインの前記の組み入れ、または天然のTCRおよび／もしくはCARを通じてのシグナル伝達と関係している可能性もある。興味深い可能性は、生存性の拡大が、骨髄標本で同定されたCART19の集団と関係していることであり、これはCD19 CARを骨髄内でB細胞始原細胞と遭遇させることによって維持しうるという仮説を生み出す。この問いかけと関係するのは、インビボでCART19細胞の初期増大を作動させるものは何かということである。稀な例外はあるが（Savoldo et al., 201 1, J Clin Invest doi:10.1172/JCI46110；Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270）、本研究はIL-2輸注を省いた唯一の試験であり、そのため、CART19細胞は、おそらくは恒常性サイトカインに反応するか、またはさらに可能性が高いものとしては白血病標的および／または正常B細胞上に発現されるCD19に反応して増大した可能性が高い。後者の場合には、CART19の自己再生が正常細胞上で起こって、「自己ワクチン接種／追加接種」を介したCARメモリーの機序をもたらし、それ故に、長期的な腫瘍免疫監視機構をもたらした可能性があるため、これは、正常APC上の標的、例えばCD19およびCD20などに対して向けられたCARの注目される特徴と考えうる可能性がある。CART19恒常性の機序については、細胞の内因性および外因性の存続機構を解明するためにさらに研究が必要であろう。これらの成果の以前には、ほとんどの研究者はCAR療法を免疫療法の一過性形態と捉えていたが、最適化されたシグナル伝達ドメインを備えたCARは、寛解の誘導および強化、ならびに長期的な免疫監視機構のいずれにおいても役割を果たす可能性がある。

【０２７０】

強力な抗白血病効果が、p53欠損性白血病の患者2人を含む、患者3人のすべてで観察された。CARを用いた以前の研究では、リンパ除去化学療法による抗腫瘍効果を区別することが困難であった。しかし、本研究においてインビボCAR増大と同時に、おそらくはそれに依存して起こった、フルダラビン抵抗性患者における腫瘍溶解の動態を兼ね備えた遅延サイトカイン放出は、CART19が強力な抗腫瘍効果を媒介することを指し示している。今回の結果は、CARの効果を増強する上での化学療法の役割を否定するものではない。

【０２７１】

インビボでCAR T細胞の持続的機能を得るために必要な鍵となる特徴について十分な理解を得るためには、ベクター、導入遺伝子および細胞製造手順と、他の施設で進行中の試験による結果との徹底的な比較が必要であろう。抗体療法とは異なり、CAR改変T細胞はインビボで複製する潜在能力を有しており、長期存続性は持続的な腫瘍制御につながりうるであろう。非交差耐性キラーT細胞で構成される汎用的（off the shelf）療法が利用可能であれば、B細胞悪性腫瘍の患者の転帰を改善しうる可能性がある。例えばリツキシマブおよびベバシズマブ（bevicizumab）などの薬剤を用いる抗体療法の限界は、治療法が、不便である上に費用もかかる反復的な抗体輸注を必要とすることにある。CART19細胞の単回輸注後にT細胞上で発現された抗CD19 scFvによる長期にわたる抗体療法の送達（この場合、現在までに治療した患者3人中3人で少なくとも6カ月にわたって）には、便利さおよ

び費用節約を含む、数多くの実用上の利点がある。

【０２７２】

実施例2：慢性リンパ性白血病におけるキメラ抗原受容体改変T細胞

CD137（T細胞における共刺激受容体［4-1BB］）およびCD3-ζ（T細胞抗原受容体のシグナル伝達成分）のシグナル伝達ドメインを結びつけた、B細胞抗原CD19に対する特異性を有するキメラ抗原受容体を発現するレンチウイルスベクターを設計した。治療抵抗性慢性リンパ性白血病（CLL）の患者に再輸注した、低用量（体重1kg当たりおよそ1.5×10^5個）の自己キメラ抗原受容体改変T細胞は、インビボで初期生着レベルの1000倍を上回る高いレベルまで増大したことが観察された。また、患者が腫瘍溶解症候群の遅延発症を呈して、完全寛解が得られたことも観察された。

【０２７３】

腫瘍溶解症候群を除いて、キメラ抗原受容体T細胞と関係のある他の唯一のグレード3／4毒性作用は、リンパ球減少症のみであった。組換え細胞は血液および骨髄において少なくとも6カ月にわたって高レベルで存続し、キメラ抗原受容体を発現し続けた。特異的免疫応答が骨髄で検出され、これはCD19を発現する正常B細胞および白血病細胞の喪失を伴った。寛解は治療10カ月後も継続中である。低γグロブリン血症は、予想された慢性毒性作用であった。

【０２７４】

これらの実験で使用した材料および方法について、以下で説明する。

【０２７５】

材料および方法

試験手順

以前に報告したように（Milone et al., 2009, Mol Ther, 17:1453-64）、自己不活性化レンチウイルスベクター（GeMCRIS 0607-793）を設計して、前臨床安全性試験に供した。T細胞の調製方法も以前に記載されている（Porter et al, 2006, Blood, 107:1325-31）。血液および骨髄におけるキメラ抗原受容体T細胞を検出するために、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析を行った。定量下限は標準曲線から求めた；定量下限を下回る平均値（すなわち、報告可能ではあるが定量不能である）は概算値とみなす。アッセイの定量下限は、ゲノムDNA 1μg当たり25コピーであった。

可溶性因子の分析は、単回使用用にアリコートに分けて-80℃で貯蔵した、全血および骨髄由来の血清を用いて行った。可溶性サイトカイン因子の定量は、Luminex bead-arrayの技術および試薬（Life Technologies）を用いて行った。

【０２７６】

1回目のアフェレーシス

12～15リットルのアフェレーシス手順をアフェレーシスセンターで実施する。この手順の間に、CART-19 T細胞作製のために末梢血単核細胞（PBMC）を入手する。単回の白血球アフェレーシスにより、CART-19 T細胞を製造するために少なくとも50×10^9個の白血球を採取する。ベースライン血液の白血球も入手して凍結保存する。

【０２７７】

細胞減少（cytroreductive）化学療法

化学療法の完了から1～2日後にCART-19細胞を投与しうるように、化学療法を輸注のおよそ5～10日前に開始する。化学療法の開始のタイミングは、このため、レジメンの長さに依存する。この化学療法の目的は、CART-19細胞の生着および恒常的増大を促進するためにリンパ球減少症を誘導することである。疾患腫瘍総量も減らすように化学療法を選択

してもよい。細胞減少化学療法の選択および投与は地域の腫瘍専門医が行う。化学療法の選択は、患者の基礎疾患および過去の治療法に基づく。フルダラビン（30mg／m^2／日×3日）およびシクロホスファミド（300mg／m^2／日×3日）が選択すべき薬剤であるが、これ
は養子免疫療法を進める上でこれらの薬剤の使用の経験が最も豊富なためである。CHOP、HyperCVAD、EPOCH、DHAP、ICEまたは他のレジメンを含む、FDA認可薬を用いる他のいくつ
かの許容されるレジメンも適切である。

【０２７８】

病期再判定評価

化学療法の完了時に、ベースライン腫瘍総量測定値を得る目的で、限定的な病期再判定を行う。これには、イメージング、身体的診察および微小残存病変（MRD）評価が含まれる。対象は以下の輸注前検査を行う：身体的診察、有害事象の文書記録、ならびに血液学検査、生化学検査および妊娠検査のための採血（該当する場合）。

【０２７９】

CART-19 T細胞の調製

CD19に対する特異性を有する細胞外単鎖抗体（scFv）を発現するように自己T細胞を操作する。細胞外scFvは、悪性細胞および正常B細胞の表面に発現が限られる分子であるCD19を発現する細胞に対して、形質導入T細胞の特異性を再誘導することができる。CD19 scFvに加えて、TCRζ鎖、または4-1BBおよびTCRζのシグナル伝達モジュールで構成される縦
列シグナル伝達ドメインのいずれかで構成される細胞内シグナル伝達分子も発現するように細胞に形質導入する。scFvはマウスモノクローナル抗体に由来し、それ故にマウス配列を含有しており、シグナル伝達ドメインはすべてがネイティブ性ヒト配列のものである。CART-19 T細胞は、アフェレーシスによってT細胞を単離して、レンチウイルスベクター技術（Dropulic et al., 2006, Human Gene Therapy, 17:577-88；Naldini et al., 1996, Science, 272:263-7；Dull et al., 1998, J Virol, 72:8463-71）を用いてscFv:TCRζ:4-1BBをCD4およびCD8 T細胞に導入することによって製造される。何人かの患者には、競合
的再増殖実験のために対照scFv:TCRζ:を細胞の一部分に導入する。これらの受容体は、MHC非依存的な様式で抗原と結合する点で「万能的（universal）」であり、このため、単一の受容体構築物を、CD19抗原陽性腫瘍を有する患者の集団を治療するために用いることができる。

【０２８０】

CAR構築物はUniversity of Pennsylvaniaで開発され、臨床グレードのベクターはLenti
gen Corporationで製造された。CART-19細胞は、University of PennsylvaniaのClinical
Cell and Vaccine Production Facilityで、図11に示された過程に従って製造される。細胞培養が終わったところで、細胞を輸注可能な凍結媒体中で凍結保存する。合計2.5×10^9～5×10^9個の細胞の輸注物を含むCART-19形質導入T細胞の単回用量を、1つまたは2つの
バッグに入れる。各バッグは、以下の輸注可能グレード試薬（% v／v）を含有する凍結媒体のアリコート（容積は用量に依存）を含む：31.25 plasmalyte-A、31.25 デキストロ
ース（5%）、0.45 NaCl、最大7.50のDMSO、1.00 デキストラン40、5.00 ヒト血清アルブ
ミンと、バッグ当たりおよそ2.5～5×10^9個の自己T細胞。安全性を高めるために、初回用量は細胞のほぼ10%を第0日に、30%を第1日に、60%を第2日とする分割用量として第0日

、第1日および第2日に投与する。

【０２８１】

貯蔵

CART-19形質導入T細胞を含有するバッグ（容量10～100ml）は監視下にある-135℃冷凍庫内で血液銀行の条件下で貯蔵する。輸注バッグは必要時まで冷凍庫で貯蔵する。

【０２８２】

細胞の解凍

治験薬剤部（investigational pharmacy）で細胞の記録をとった後に、凍結細胞をドライアイス中にて対象のベッドサイドまで搬送する。36℃～38℃に維持した水浴を用いて、細胞をベッドサイドで一度に1バッグずつ解凍する。細胞がちょうど解凍するまで、バッグを丁寧にもみほぐす。凍結塊を容器内に残さないようにすべきである。CART-19細胞製剤のバッグが損傷もしくは漏出しているように見えるか、または別の形で損なわれているように見える場合には、それを輸注すべきではない。

【０２８３】

前投薬

T細胞輸注後の副作用には、一過性の発熱、悪寒および／または悪心が含まれうる。対象には、CART-19細胞の輸注の前に、アセトアミノフェン650mgの内服、および塩酸ジフェンヒドラミン25～50mgの内服または静脈内注射による前投薬を行うことが推奨される。これらの投薬を、必要に応じて6時間毎に繰り返してもよい。患者がアセトアミノフェンによって緩和しない発熱を続けるようであれば、1コースの非ステロイド性抗炎症薬の投薬を処方してもよい。患者には、命に危険のある緊急時を除き、いかなる時もヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン（ソルメドロール（Solu-Medrol））またはデキサメタゾン（デカドロン（Decadron））などの全身性コルチコステロイドを投与しないことが推奨されるが、これはT細胞に有害作用を及ぼす可能性があるためである。急性輸注反応に対してコルチコステロイドが必要な場合には、初回用量にヒドロコルチゾン100mgが推奨される。

【０２８４】

投与／輸注

輸注は化学療法の完了から1～2日後に開始する。初回輸注の日に、患者には分画を含むCBC、ならびにCD3、CD4およびCD8数の評価を行うが、これは化学療法を一つにはリンパ球減少症を誘導するために行うためである。いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、2.5～5×10^9個のCART-19細胞という初回静脈内用量がこのプロトコールには最適であると考えられている。健常成人には約1×10^{12}個のT細胞が存在するため、提唱される総用量はT細胞の体内総量の約0.5％に相当する（Roederer, 1995, Nat Med, 1:621-7；Macallan et al., 2003, Eur J Immunol, 33: 2316-26）。1回目の用量は分割投与を用いて第0日（10％）、第1日（30％）および第2日（60％）に投与する。対象は隔離された部屋で輸注を受ける。本明細書中の別所に記載したように、細胞は患者のベッドサイドで解凍する。解凍した細胞は忍容しうる限りできるだけ速い輸注速度で投与し、その結果、輸注の持続時間はおよそ10～15分となる。形質導入されたT細胞は、三方活栓付きの18ゲージのラテックス非含有Y型輸血セットによって、毎分およそ10mL～20mLの流速で急速静脈内輸注によって投与する。輸注の持続時間はおよそ15分とする。CART-19改変細胞のバッグを1つまたは2つ、氷上にて搬送し、細胞を低温のまま対象に投与する。CART-19細胞の混

合物を投与される対象では、混合を促す目的で、Y-アダプターを用いて細胞を同時に投与する。対象には本明細書中の別所に記載したように輸注および前投薬を行う。対象のバイタルサインの評価およびパルスオキシメトリー検査を、投与の前、輸注の終了時、およびその後は15分毎に1時間、そしてこれらが安定して良好になるまで行う。ベースラインCAR
T-19レベルの決定のための血液試料は、輸注前および輸注20分後に入手する。先行して彼らに行った細胞減少化学療法による毒性を来した患者では、これらの毒性が消失するまで輸注スケジュールを遅らせる。T細胞輸注を遅らせる根拠となる具体的な毒性には以下が含まれる：1）肺：飽和度を95％超に保つために酸素補給が必要、または胸部X線上の進行性である放射線学的異常の存在；2）心臓：医学的管理によってコントロールされていない新たな心不整脈。3）昇圧サポートを必要とする低血圧。4）活動性感染症：T細胞輸注から48時間以内の細菌、真菌またはウイルスに関する血液培養が陽性。カリウムおよび尿酸に関する血清試料を収集し、初回輸注の前ならびに以後の各輸注の2時間後。

【０２８５】

生着および存続性を評価するための輸注後臨床検査

対象は初回CART-19細胞輸注後の第4日および第10日に再受診して、血清サイトカインレ
ベルに関する採血、およびCART-19細胞の存在を評価するためのCART-19 PCRを受ける。対
象は3週間にわたって週1回ずつ再受診して、以下を受ける：身体的診察、有害事象の文書記録、ならびに血液学検査、生化学検査、CART-19細胞の生着および存続性、および臨床検査のための採血。

【０２８６】

2回目の輸注

いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、患者に対するCART-19細胞の2回
目の用量は、彼らが1回目の用量に対して十分な忍容性を示し、かつ十分なCART-19細胞が
製造されたならば、第11日に投与しうると考えられている。用量は合計2～5×10^9個の細胞とする。カリウムおよび尿酸に関する血清試料を輸注2時間後に収集する。

【０２８７】

2回目のアフェレーシス

2リットルのアフェレーシス手順をアフェレーシスセンターで行う。研究調査のためにPBMCを入手して凍結保存する。対象は以下を受ける：身体的診察、有害事象の文書記録、ならびに血液学検査、生化学検査、CART-19細胞の生着および存続性、および臨床検査のための採血。加えて、腫瘍総量測定値を得る目的で病期再判定を行う。病期再判定検査は病型別に判定し、イメージング、MRD評価、骨髄吸引および生検、ならびに／またはリンパ節生検を含む。

【０２８８】

輸注後2～6カ月の毎月の評価

対象にCART-19細胞輸注後の2～6カ月は月1回再受診させる。これらの試験受診時に対象
は以下を受ける：併用薬、身体的診察、有害事象の文書記録、ならびに血液学検査、生化学検査、CART-19細胞の生着および存続性、および臨床検査のための採血。CART-19細胞輸
注後2～6カ月の時点で、検出可能なRCLの存在の可能性を否定するためにHIV DNAアッセイ
を行う。

【０２８９】

輸注2年後までの年4回の評価

輸注2年後まで、対象を年4回評価する。これらの試験受診時に、対象は以下を受ける：併用薬、身体的診察、有害事象の文書記録、ならびに血液学検査、生化学検査、CART-19細胞の生着および存続性、および臨床検査のための採血。CART-19細胞輸注後3カ月および
6カ月の時点で、検出可能なRCLの存在の可能性を否定するためにHIV DNAアッセイを行う。

【０２９０】

実験の結果について以下に記す。

【０２９１】

患者病歴

患者は1996年にステージI CLLの診断を受けた。この男性はまず、6年間の観察後に、進行性白血球増加症およびリンパ節肥大に対する治療を必要とした。2002年に、彼は2サイクルのリツキシマブ＋フルダラビンによって治療された；この治療の結果、血球数の正常化およびリンパ節肥大の部分的消散がもたらされた。2006年に、彼は疾患進行のために4サイクルのリツキシマブおよびフルダラビンを受け、再び血球数の正常化およびリンパ節肥大の部分的縮退が得られた。この奏効の後に、20カ月間の無増悪期間および2年間の無治療期間があった。2009年2月に、彼は急速進行性白血球増加症および再発性リンパ節肥大を有した。彼の骨髄はCLLにより広範に浸潤されていた。細胞遺伝学的分析により、細胞15個のうち3個が染色体17pの欠失を含むことが示され、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション（FISH）検査からは、細胞200個のうち170個が染色体17p上のTP53に関わる
欠失を有することが示された。彼はリツキシマブおよびベンダムスチンを1サイクル投与され、ベンダムスチンをさらに3サイクル、リツキシマブを伴わずに受けた（重度のアレルギー反応のため）。この治療の結果、リンパ球増加症の一過性に過ぎない改善が生じた。コンピュータ断層撮影（CT）により、治療法の後に進行性リンパ節肥大が実証された。

【０２９２】

自己T細胞を白血球アフェレーシスによって収集し、凍結保存した。患者は続いてアレムツズマブ（抗CD52、成熟リンパ球、細胞表面抗原）を11週間投与され、造血の改善およ
びリンパ節肥大の部分的消散を得た。次の6カ月間は、彼の疾患は安定しており、持続的で広範な骨髄病変および複数の1～3cmリンパ節がみられるびまん性リンパ節肥大を伴った。2010年7月に、この患者はキメラ抗原受容体改変T細胞の第1相臨床試験に組み入れられた。

【０２９３】

細胞輸注

この患者からの自己T細胞を解凍して、CD19特異的キメラ抗原受容体を発現するようにレンチウイルスによる形質導入を行った（図12A）；レンチウイルスベクターおよび関連配列の配列識別名は表5に描写されている。細胞輸注の4日前に、患者はリンパ球の除去のためにデザインされた、リツキシマブを伴わない化学療法を受けた（ペントスタチンを体表面積1m^2当たり4mgの用量で、およびシクロホスファミドを1m^2当たり600mgの用量で）（
Lamanna et al., 2006, J Clin Oncol, 24:1575-81）。化学療法の3日後、しかし細胞輸注の前に、骨髄は過形成性であり、CLLの関与がおよそ40％であった。白血病細胞はκ軽鎖ならびにCD5、CD19、CD20およびCD23を発現した。細胞遺伝学的分析により、2種の別個
のクローンが示され、これらはいずれも染色体17pおよびTP53座位の喪失をもたらした（4
6,XY,del(17)(p12)[5]/46,XY,der(17)t(17;21)(q10;q10)[5]/46,XY[14]）。化学療法の4
日後に、患者は、5％が形質導入されている合計3×10^8個のT細胞、すなわち合計1.42×

10
7個の形質導入細胞（1.46×10^{5}個／kg）を、3日連続の毎日の静脈内輸注にて分割投与された（第1日に10%、第2日に30%、および第3日に60%）。輸注後サイトカインは投与し
なかった。輸注の毒性作用は認められなかった。

【０２９４】

（表５）pELPS-CD19-BBz移入ベクターの配列識別名

SEQ ID NO: #	識別
SEQ ID NO: 1	pELPS-CD19-BBZ移入ベクター（核酸配列）
SEQ ID NO: 2	RSVのU4（核酸配列）
SEQ ID NO: 3	HIV R 反復配列（核酸配列）
SEQ ID NO: 4	HIV U5 反復配列（核酸配列）
SEQ ID NO: 5	部分的Gag/Pol（核酸配列）
SEQ ID NO: 6	cPPT（核酸配列）
SEQ ID NO: 7	EF1αプロモーター（核酸配列）
SEQ ID NO: 8	CD19-Bζ CAR（核酸配列）
SEQ ID NO: 9	Huウッドチャック PRE（核酸配列）
SEQ ID NO: 10	R 反復配列（核酸配列）
SEQ ID NO: 11	U5 反復配列（核酸配列）
SEQ ID NO: 12	CD19-Bζ CAR（アミノ酸配列）
SEQ ID NO: 13	CD8リーダー（核酸配列）
SEQ ID NO: 14	抗CD19scFv（核酸配列）
SEQ ID NO: 15	CD8ヒンジ（核酸配列）
SEQ ID NO: 16	CD8膜貫通（核酸配列）
SEQ ID NO: 17	4-1BB（核酸配列）
SEQ ID NO: 18	CD3ζ（核酸配列）
SEQ ID NO: 19	CD8リーダー（アミノ酸配列）
SEQ ID NO: 20	抗CD19scFv（アミノ酸配列）
SEQ ID NO: 21	CD8ヒンジ（アミノ酸配列）
SEQ ID NO: 22	CD8膜貫通（アミノ酸配列）
SEQ ID NO: 23	4-1BB（アミノ酸配列）
SEQ ID NO: 24	CD3ζ（アミノ酸配列）

【０２９５】

<u>臨床的奏効および評価</u>

初回輸注の14日後に、患者は悪寒および微熱を有するようになり、グレード2の疲労を伴った。以後の5日間で、悪寒は強まり、彼の体温は39.2℃（102.5°F）に上昇し、これに硬直、発汗、無食欲、悪心および下痢が伴った。彼には呼吸器症状も心症状もみられなかった。発熱を理由として、胸部放射線検査ならびに血液、尿および便の培養を行ったと

ころ、いずれも陰性または正常であった。輸注後の第22日に腫瘍溶解症候群が診断された（図12B）。尿酸レベルは10.6mg／dl（630.5μmol／l）であり、リンレベルは4.7mg／dl
（1.5mmol／l）（正常範囲、2.4～4.7mg／dl［0.8～1.5mmol／l］）であり、乳酸デヒド
ロゲナーゼレベルは1130U ／l（正常範囲、98～192）であった。急性腎障害の所見がみら
れ、クレアチニンレベル2.60mg／dl（229.8μmol／l）（ベースラインレベル、＜1.0mg／
dl［＜88.4μmol／l］）。患者は入院し、補液蘇生およびラスブリカーゼによる治療を受けた。尿酸レベルは24時間以内、クレアチニンレベルは3日以内に正常範囲に復帰した；彼は入院第4日に退院した。乳酸デヒドロゲナーゼレベルは徐々に低下し、以後1カ月をかけて正常になった。

【０２９６】

CART19細胞輸注後の第28日までに、リンパ節肥大は触知不能となり、第23日の時点で骨
髄内のCLLの所見は認められなかった（図12C）。核型はその時点で細胞15個中15個とも正
常であり（46,XY）、FISH検査は、検査した細胞200個中198個でTP53欠失に関して陰性で
あった；これは陰性対照における正常範囲内にあると判断される。フローサイトメトリー分析によって残留性CLLは示されず、B細胞は検出不能であった（CD5+CD10-CD19+CD23+リ
ンパ球ゲート内の細胞の1％未満）。輸注後の第31日に行ったCTスキャンにより、リンパ節肥大の消散が示された（図12D）。

【０２９７】

CART19細胞輸注の3カ月後および6カ月後に、身体的診察で目立った点は依然としてなく
、触知可能なリンパ節肥大は認めず、CART19細胞輸注の3カ月後に行ったCTスキャンによ
り、持続的寛解が示された（図12D）。3カ月および6カ月の時点での骨髄検査からも、形態学的分析、核型分析（46,XY）またはフローサイトメトリー分析のいずれによってもCLL
の所見は示されず、正常B細胞の継続的な欠如も示された。寛解は少なくとも10カ月間持続した。

【０２９８】

<u>CART19細胞の毒性</u>

細胞輸注には急性毒性作用はなかった。認められた唯一の重篤な（グレード3または4の）有害事象は、上記のグレード3の腫瘍溶解症候群のみであった。患者にはベースラインでグレード1のリンパ球減少症があり、第1日からはグレード2または3のリンパ球減少症が始まり、治療法後少なくとも10カ月間続いた。リンパ球絶対数140個／m^3のグレード4のリ
ンパ球減少症が第19日に記録されたが、第22日から少なくとも10カ月まで、リンパ球絶対
数は390～780個／m^3の範囲であり（グレード2または3のリンパ球減少症）、患者は第19日
から第26日まで一過性のグレード1血小板減少症（血小板数、98,000～131,000／m^3）を、
第17日から第33日までグレード1または2の好中球減少症（好中球絶対数、1090～1630／m^3

）を有した。試験治療とおそらく関係すると考えられた他の徴候および症状には、初回輸注17日後に生じて第33日までに消失したグレード 1および2のアミノトランスフェラーゼレベルおよびアルカリホスファターゼレベルの上昇、ならびに発熱、悪寒、発汗、筋肉痛、頭痛および疲労からなるグレード1および2の体質症状が含まれた。グレード2の低γグロブリン血症は静脈内免疫グロブリン輸注によって是正された。

【０２９９】

血清および骨髄のサイトカインの分析

患者の臨床的奏効には、炎症性サイトカインのレベルの遅延上昇が伴い（図13Aから図13Dまで）、インターフェロン-γ、インターフェロン-γ応答性ケモカインCXCL9およびCXCL10、ならびにインターロイキン-6のレベルは、ベースラインレベルの160倍もの高さとなった。サイトカインレベルの一時的上昇は臨床症状と平行関係にあり、CART19細胞の初回輸注の17～23日後がピークであった。

【０３００】

連続的骨髄吸引液からの上清をサイトカインに関して測定したところ、免疫活性化の所見が示された（図13E）。インターフェロン-γ、CXCL9、インターロイキン-6および可溶性インターロイキン-2受容体の有意な増加が、T細胞輸注前日のベースラインレベルとの比較で認められた；値はCART19細胞の初回輸注後の第23日にピークとなった。骨髄サイトカインの増加は、骨髄からの白血病細胞の排除と一致した。血清および骨髄の腫瘍壊死因子αは変化のないままであった。

【０３０１】

キメラ抗原受容体T細胞の増大および存続

リアルタイムPCRでは、抗CD19キメラ抗原受容体（CAR19）をコードするDNAが、初回輸注後の第1日から検出された（図14A）。輸注後の第21日までにインビボでの細胞の3-logを上回る増大が認められた。ピークレベルで、血液中のCART19細胞は流血中リンパ球の20%超に相当した；これらのピークレベルは体質症状、腫瘍溶解症候群（図12B）および血清サイトカインレベルの上昇（図13Aから図13Dまで）の発生と一致した。CART19細胞は輸注6カ月後に高レベルで検出可能なままであったものの、その値はピークレベルから10分の1に減少した。血液中でのキメラ抗原受容体T細胞の倍加時間はおよそ1.2日であり、消失半減期は31日であった。

【０３０２】

骨髄におけるキメラ抗原受容体T細胞

CART19細胞は骨髄標本において初回輸注23日後から同定され（図14B）、少なくとも6カ月間持続し、減衰半減期は34日であった。骨髄におけるCART19細胞の最も高いレベルは初回輸注の23日後の初回評価時に同定され、サイトカイン分泌プロファイルによって指し示されるように、免疫応答の誘導と一致した（図13E）。骨髄吸引液のフローサイトメトリー分析により、ベースラインでCD5+CD19+細胞のクローン増大が指し示され、これは輸注後1カ月、および輸注後3カ月に入手した試料にはみられなかった（データ非提示）。正常B細胞は治療後に検出されなかった（図14C）。

【０３０３】

遺伝子改変された自己CART19細胞による治療

本明細書に記載されたのは、CD3-ζおよびCD137（4-1BB）シグナル伝達ドメインを

連結
させた抗CD19を発現するレンチウイルスベクターによる形質導入を通じてCD19を標的とす
るように遺伝子改変された自己T細胞による治療から3週間後の、腫瘍溶解症候群の遅延発症および完全奏効である。遺伝子改変された細胞は、輸注後少なくとも6カ月間にわたって骨髄に高レベルで存在した。骨髄におけるCD19特異的免疫応答の生成は、サイトカインの一時的放出および白血病細胞の除去によって明示され、それはキメラ抗原受容体T細胞の浸潤のピークと一致した。細胞免疫療法後の腫瘍溶解症候群の発症は、これまで報告されていない（Baeksgaard et al., 2003, Cancer Chemother Pharacol, 51: 187-92）。

【０３０４】

特異的腫瘍抗原を標的とするように自己T細胞を遺伝子操作することは、癌療法のための注目される戦略の1つである（Sadelain et al., 2009, Curr Opin Immunol, 21: 215-23；Jena et al., 2010, Blood, 116: 1035-44）。本明細書に記載されたアプローチの重要な特徴は、キメラ抗原受容体T細胞がHLAに拘束されない様式で腫瘍標的を認識することができ、その結果、非常にさまざまな組織学的特徴を有する腫瘍に対して「汎用的」なキメラ抗原受容体を構築することができることである。HIV由来レンチウイルスベクターを癌療法のために用いたが、これはレトロウイルスベクターの使用を上回るいくつかの利点があるアプローチである（June et al., 2009, Nat Rev Immunol, 9:704-16）。

【０３０５】

キメラ抗原受容体T細胞の以前の試験では、客観的腫瘍反応は中程度であり、改変された細胞のインビボ増殖は持続的でなかった（Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res, 12:6106-15；Till et al., 2008, Blood, 112:2261-71；Pule et al., 2008, Nat Med, 14:1264-70）。Brentjensらは、CD28シグナル伝達ドメインを連結させたCD19を標的とする
キメラ抗原受容体の臨床試験の予備的結果を報告し、進行したCLLの患者3人中2人で一過性腫瘍反応を見いだした（Brentjens et al., 2010, Mol Ther, 18:666-8)；しかし、キメラ抗原受容体は流血中から急速に消失した。

【０３０６】

輸注された極めて低用量のキメラ抗原受容体T細胞が、臨床に明白な抗腫瘍効果をもたらすと考えられることは予想外であった。事実、輸注された用量の1.5×10^5個／kgのキメラ抗原受容体T細胞は、キメラ抗原受容体またはトランスジェニックT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞の以前の試験で用いられたよりも数桁少なかった（Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res, 12:6106-15；Brentjens et al., 2010, Mol Ther, 18:666-8；Morgan et al., 2010, Mol Ther, 18:843-51；Johnson et al., 2009, Blood, 114:535-46）。いかなる特定の理論にも束縛されることは望まないが、化学療法はキメラ抗原受容体の効果を増強しうると推測される。

【０３０７】

患者の血液および骨髄におけるCART19細胞の長期にわたる存続性は、4-1BBシグナル伝
達ドメインを含めたことに起因する。マウス配列を含む単鎖Fv抗体フラグメントを発現するCART19細胞が拒絶されなかったことからみて、CART19細胞により媒介される正常B細胞
の排除が、キメラ抗原受容体に対する免疫寛容の誘導を促した可能性が高い。この患者において検出可能なCD19陽性白血病細胞が存在しなかったことを考慮すれば、いかなる特定の理論にも束縛されることは望まないが、キメラ抗原受容体T細胞の恒常性は、少なくとも一部には初期B細胞始原細胞により、それらが骨髄内に出現した時点で送達された刺激によって達成された可能性がある。本発明は、「メモリー」キメラ抗原受容体T細胞を維持させる新たな機序が存在する可能性があるという発見に関する。

【０３０８】

CD19は注目される腫瘍標的であるものの、その発現が正常細胞および悪性B細胞に限ら

れるため、キメラ抗原受容体T細胞の存続が長期的なB細胞欠乏を媒介する可能性については懸念がある。実際に、この患者において、B細胞は輸注後少なくとも6カ月間にわたって血液および骨髄から失われた。この患者は再発性感染症を有しなかった。リツキシマブを用いるCD20を通じてのB細胞のターゲティングは、B細胞悪性腫瘍の患者に対する有効で比
較的安全な戦略であり、長期的なB細胞リンパ球減少症は管理可能である（Molina, 2008, Ann Rev Med, 59:237-50）。リツキシマブによって治療された患者は、治療法の中止から数カ月以内にB細胞が回復することが報告されている。そのような回復が、抗B細胞性のT細胞がインビボに存続する患者で起こるか否かはまだ明らかではない。

【０３０９】

TP53欠失を伴うCLLを有する患者では、標準療法の後に短期的な寛解が得られる（Dohne
r et al,, 1995, Blood, 85:1580-9）。同種骨髄移植は、進行CLLの患者における長期寛解を誘導している唯一のアプローチである（Gribben et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant, 17:Suppl:S63-S70）。しかし、その結果生じる強力な移植片対腫瘍効果には
、慢性移植片対宿主病の頻度が高いことによる高度の病態が伴い、これは高齢患者‐CLLに罹患していることが典型的である‐では多くの場合、特に重症である（Gribben et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant, 17:Suppl:S63-S70；Sorror et al., 2008, Blood, 111:446-52）。本明細書に提示されたデータは、遺伝子改変された自己T細胞がこの限界を克服しうる可能性を示唆する。

【０３１０】

腫瘍溶解症候群およびサイトカイン分泌の遅延発現と、それに相まった活発なインビボでのキメラ抗原受容体T細胞の増大および顕著な抗白血病活性は、CART19細胞の実質的および持続的なエフェクター機能を指し示す証拠となるものである。本明細書に記載された実験は、この療法の効力を強く示しており、強力なシグナル伝達ドメインと連結されたキメラ抗原受容体の形質導入を通じてCD19（および他の標的）を標的とするように遺伝子改変された自己T細胞の詳細な研究の支えともなる。抗体媒介療法とは異なり、キメラ抗原受容体改変T細胞はインビボで複製する潜在能力を有し、長期存続性は持続的な腫瘍制御につながりうると考えられる。進行CLLの他の2人の患者もこのプロトコールに従ってCART
19輸注を受け、3人全員で腫瘍の奏効が得られた。これらの知見は、B細胞新生物に対するCD19再誘導T細胞の継続的研究に正当な根拠を与えるものである。

【０３１１】

本明細書に引用された特許、特許出願および刊行物のそれぞれおよびすべての開示内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。具体的な態様を参照しながら本発明を開示してきたが、本発明の真の趣旨および範囲を逸脱することなく、本発明の他の態様および変形物も当業者によって考案されうることは明らかである。添付された特許請求の範囲は、そのようなすべての態様および等価な変形物を含むことを意図している。

本発明は以下を提供する。

［１］

キメラ抗原受容体（CAR）をコードする単離された核酸配列であって、該CARが抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域およびCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、該CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含む、単離された核酸配列。

［２］

前記CARがSEQ ID NO：12のアミノ酸配列を含む、請求項1記載の単離された核酸配列。

［３］

SEQ ID NO：8の核酸配列を含む、請求項1記載の単離された核酸配列。

［４］

前記抗原結合ドメインが抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項1記載の単離された核酸配列。
［５］
前記抗原結合フラグメントがFabまたはscFvである、請求項4記載の単離された核酸配列。
［６］
前記抗原結合ドメインが腫瘍抗原と結合する、請求項1記載の単離された核酸配列。
［７］
前記腫瘍抗原が血液悪性腫瘍と関連する、請求項6記載の単離された核酸配列。
［８］
前記腫瘍抗原が固形腫瘍と関連する、請求項6記載の単離された核酸配列。
［９］
前記腫瘍抗原が、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項6記載の単離された核酸配列。
［１０］
前記共刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB、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、CD83と特異的に結合するリガンド、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む、請求項1記載の単離された核酸配列。
［１１］
前記CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO：18の核酸配列によってコードされる、請求項1記載の単離された核酸配列。
［１２］
抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域およびCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、該CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含む、単離されたキメラ抗原受容体（CAR）。
［１３］
SEQ ID NO：12のアミノ酸配列を含む、請求項12記載の単離されたCAR。
［１４］
前記抗原結合ドメインが抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項12記載の単離されたCAR。
［１５］
前記抗原結合フラグメントがFabまたはscFvである、請求項14記載の単離されたCAR。
［１６］
前記抗原結合ドメインが腫瘍抗原と結合する、請求項12記載の単離されたCAR。
［１７］
前記腫瘍抗原が血液悪性腫瘍と関連する、請求項16記載の単離されたCAR。
［１８］
前記腫瘍抗原が固形腫瘍と関連する、請求項16記載の単離されたCAR。
［１９］
前記腫瘍抗原が、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項16記載の単離されたCAR。
［２０］
前記共刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB、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、CD83と特異的に結合するリガンド、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む、請求項12記載の単離されたCAR。
［２１］

キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含む細胞であって、該CARが抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含む、細胞。

［２２］

前記CARがSEQ ID NO：12のアミノ酸配列を含む、請求項21記載の細胞。

［２３］

前記核酸がSEQ ID NO：8の核酸配列を含む、請求項21記載の細胞。

［２４］

前記抗原結合ドメインが抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項21記載の細胞。

［２５］

前記抗原結合フラグメントがFabまたはscFvである、請求項24記載の細胞。

［２６］

前記抗原結合ドメインが腫瘍抗原と結合する、請求項21記載の細胞。

［２７］

前記腫瘍抗原が血液悪性腫瘍と関連する、請求項26記載の細胞。

［２８］

前記腫瘍抗原が固形腫瘍と関連する、請求項26記載の細胞。

［２９］

前記腫瘍抗原が、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項26記載の細胞。

［３０］

前記共刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB、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、CD83と特異的に結合するリガンド、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む、請求項21記載の細胞。

［３１］

前記CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO：18の核酸配列によってコードされる、請求項21記載の細胞。

［３２］

T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）および調節性T細胞からなる群より選択される、請求項21記載の細胞。

［３３］

前記抗原結合ドメインがその対応する抗原と結合した場合に抗腫瘍免疫を呈する、請求項21記載の細胞。

［３４］

キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含むベクターであって、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域およびCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、該CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含む、ベクター。

［３５］

前記CARがSEQ ID NO：12のアミノ酸配列を含む、請求項34記載のベクター。

［３６］

CARをコードする単離された核酸配列がSEQ ID NO：8の核酸配列を含む、請求項34記載のベクター。

［３７］

前記抗原結合ドメインが抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項34記載のベクター。

［３８］

前記抗原結合フラグメントがFabまたはscFvである、請求項37記載のベクター。

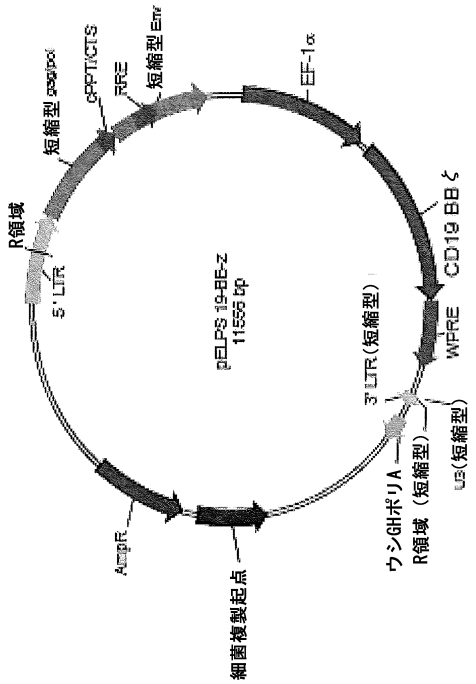
［３９］
前記抗原結合ドメインが腫瘍抗原と結合する、請求項34記載のベクター。
［４０］
前記腫瘍抗原が血液悪性腫瘍と関連する、請求項39記載のベクター。
［４１］
前記腫瘍抗原が固形腫瘍と関連する、請求項39記載のベクター。
［４２］
前記腫瘍抗原が、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項39記載のベクター。
［４３］
前記共刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む、請求項34記載のベクター。
［４４］
前記CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO：18の核酸配列によってコードされる、請求項34記載のベクター。
［４５］
哺乳動物において標的細胞集団または組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法であって、CARを発現するように遺伝子改変された細胞の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、該抗原結合ドメインが該標的細胞集団または組織を特異的に認識するように選択される、方法。
［４６］
哺乳動物において抗腫瘍免疫を与える方法であって、CARを発現するように遺伝子改変された細胞の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、それにより、該哺乳動物において抗腫瘍免疫を与える、方法。
［４７］
腫瘍抗原の発現亢進と関連する疾患、障害または病状を有する哺乳動物を治療する方法であって、CARを発現するように遺伝子改変された細胞の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、それにより、該哺乳動物を治療する、方法。
［４８］
前記細胞が自己T細胞である、請求項47記載の方法。
［４９］
前記腫瘍抗原が、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項47記載の方法。
［５０］
慢性リンパ性白血病を有するヒトを治療する方法であって、CARを発現するように遺伝子操作されたT細胞を該ヒトに投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含む、方法。
［５１］
前記ヒトが少なくとも1つの化学療法薬に対して抵抗性である、請求項50記載の方法。
［５２］
前記慢性リンパ性白血病が治療抵抗性のCD19+白血病およびリンパ腫である、請求項50

記載の方法。
［５３］
癌と診断されたヒトにおいて、遺伝子操作されたT細胞の存続集団を生じさせる方法であって、CARを発現するように遺伝子操作されたT細胞を該ヒトに投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、該遺伝子操作されたT細胞の存続集団が投与後少なくとも1カ月間にわたって該ヒトの内部で存続する、方法。
［５４］
前記遺伝子操作されたT細胞の存続集団が、前記ヒトに投与されたT細胞、該ヒトに投与されたT細胞の子孫、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの細胞を含む、請求項53記載の方法。
［５５］
前記遺伝子操作されたT細胞の存続集団がメモリーT細胞を含む、請求項53記載の方法。
［５６］
前記癌が慢性リンパ性白血病である、請求項53記載の方法。
［５７］
前記慢性リンパ性白血病が治療抵抗性のCD19+白血病およびリンパ腫である、請求項56記載の方法。
［５８］
前記遺伝子操作されたT細胞の存続集団が、投与後少なくとも3カ月間にわたって前記ヒトの内部で存続する、請求項53記載の方法。
［５９］
前記遺伝子操作されたT細胞の存続集団が、投与後少なくとも4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、2年間または3年間にわたって前記ヒトの内部で存続する、請求項53記載の方法。
［６０］
前記慢性リンパ性白血病が治療される、請求項56記載の方法。
［６１］
癌と診断されたヒトにおいて、遺伝子操作されたT細胞の集団を増大（expand）させる方法であって、CARを発現するように遺伝子操作されたT細胞を該ヒトに投与する段階を含み、該CARが抗原結合ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列を含むCD3ζシグナル伝達ドメインを含み、投与された該遺伝子操作されたT細胞が、該ヒトにおいて子孫T細胞の集団を生成する、方法。
［６２］
前記ヒトにおける前記子孫T細胞がメモリーT細胞を含む、請求項61記載の方法。
［６３］
前記T細胞が自己T細胞である、請求項61記載の方法。
［６４］
前記ヒトが少なくとも1つの化学療法薬に対して抵抗性である、請求項61記載の方法。
［６５］
前記癌が慢性リンパ性白血病である、請求項61記載の方法。
［６６］
前記慢性リンパ性白血病が治療抵抗性のCD19+白血病およびリンパ腫である、請求項65記載の方法。
［６７］
前記子孫T細胞の集団が、投与後少なくとも3カ月間にわたって前記ヒトの内部で存続する、請求項61記載の方法。
［６８］
前記子孫T細胞の集団が、投与後少なくとも4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、2年間または3年間にわたって前記

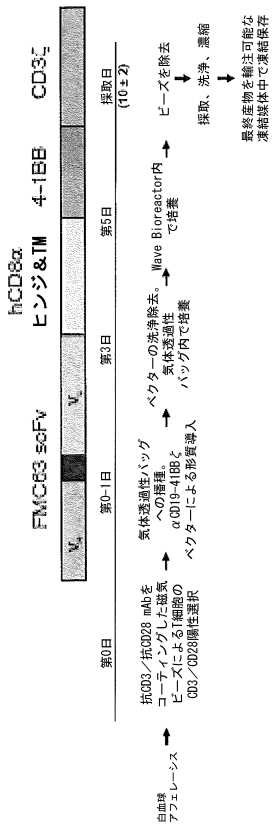
ヒトの内部で存続する、請求項61記載の方法。
［６９］
前記癌が治療される、請求項61記載の方法。
【０３１２】
規則46.4に基づく説明書
条約第19条に基づく特許請求の範囲に対する補正の結果として、新たな請求の範囲第70項～第89項が追加された。したがって、請求の範囲第1項～第89項が、本出願において出願中である。
請求の範囲第1項から第69項までは変更がない。
新たな請求の範囲第70項～第89項は、本明細書において開示された特徴を説明している。具体的には、独立請求項である特許請求の範囲第70項および第81項は、SEQ ID NO：9を
説明している。新たな請求の範囲第70項～第89項の裏づけは、とりわけ、ページ上では、出願時の本明細書の、第87ページの表5における第1行～第31行、および図12に見られる。
特許請求の範囲に対するこれらの補正によって、新規事項が追加されることはない。

【図面】

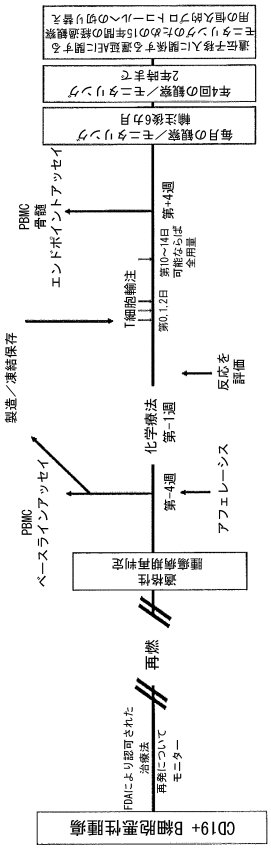
【図１Ａ】


R領域
短縮型 gagpol
cPPT/CTS
RRE
短縮型 Env
EF-1α
5' LTR
pELPS 19-BB-z
11555 bp
CD19 BBζ
WPRE
3' LTR(短縮型)
ウシGHポリA
R領域（短縮型）
U3(短縮型)
AmpR
細菌複製起点

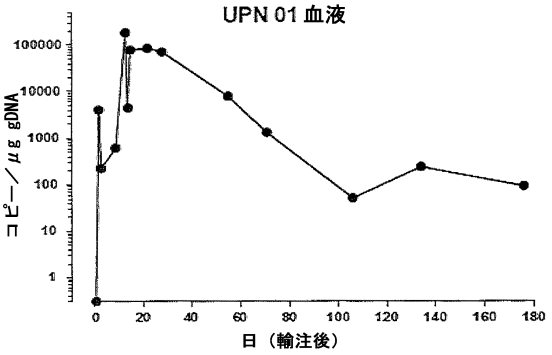
【図１Ｂ】


hCD8α
FMC63 scFv
ヒンジ&TM
4-1BB
CD3ζ
第0日
第0-1日
第3日
第5日
採取日
(10±2)
自血球アフェレーシス
抗CD3／抗CD28 mAbをコーティングした磁気ビーズによるT細胞のCD3／CD28陽性選択
気体透過性バッグへの播種。αCD19-41BBとベクターによる形質導入
ベクターの洗浄除去。気体透過性バッグ内で培養
Wave Bioreactor内で培養
ビーズを除去
採取、洗浄、濃縮
最終産物を輸注可能な凍結媒体中で凍結保存

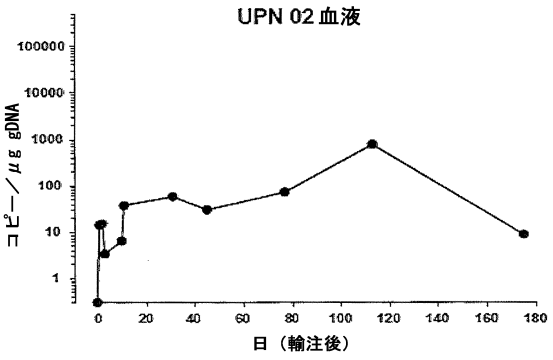
【図１Ｃ】



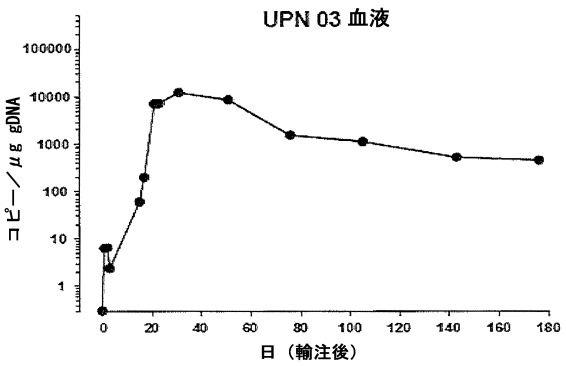
【図２Ａ】



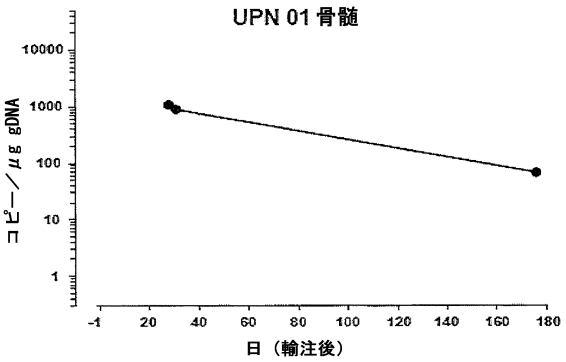
【図２Ｂ】



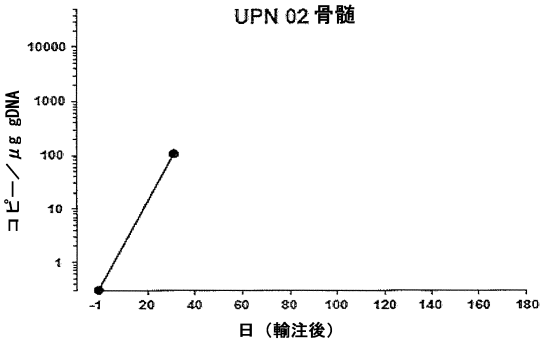
【図２Ｃ】



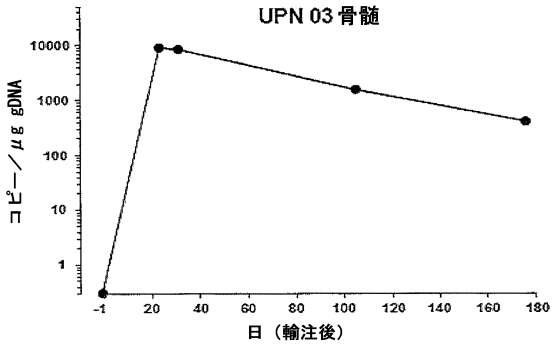
【図２Ｄ】



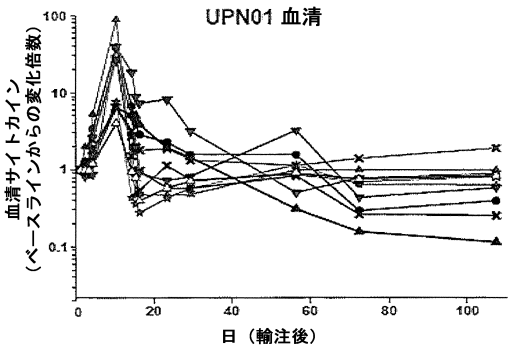
【図２Ｅ】



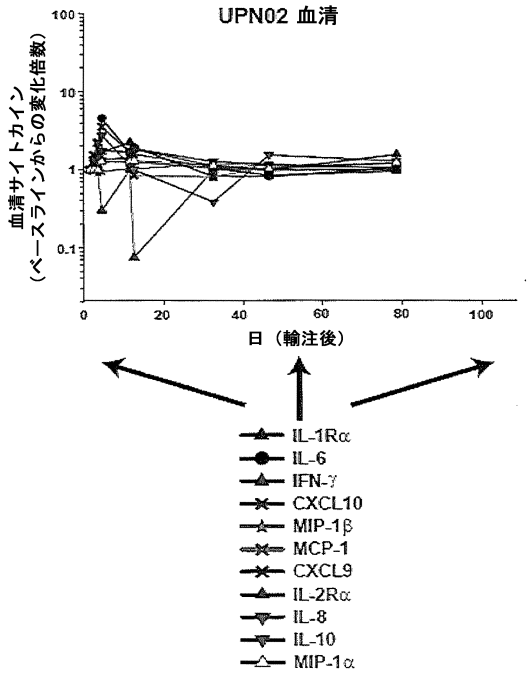
【図２Ｆ】



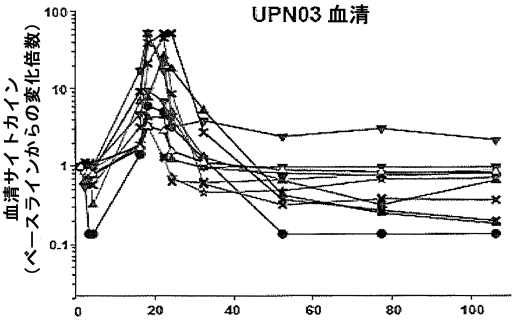
【図３Ａ】



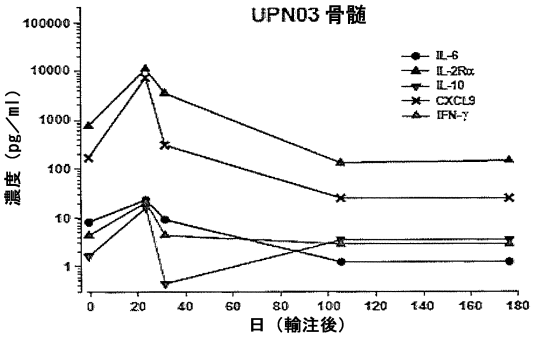
【図３Ｂ】



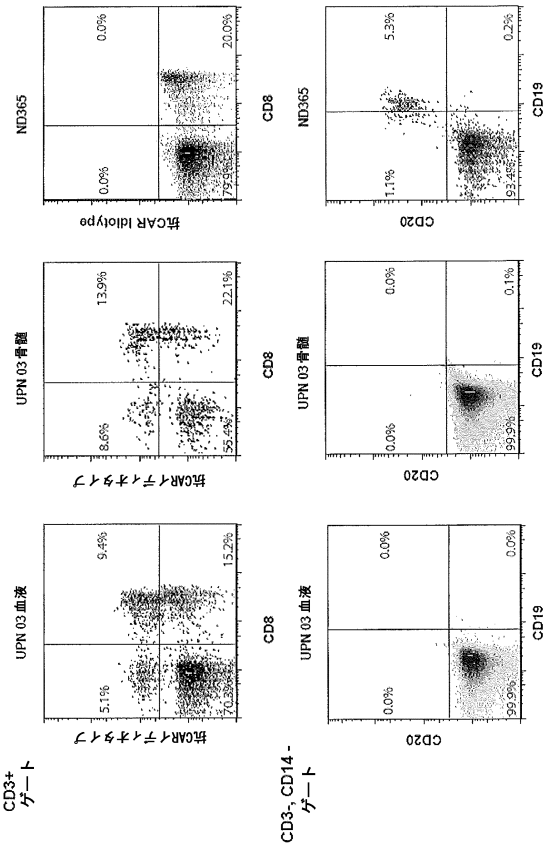
【図３Ｃ】



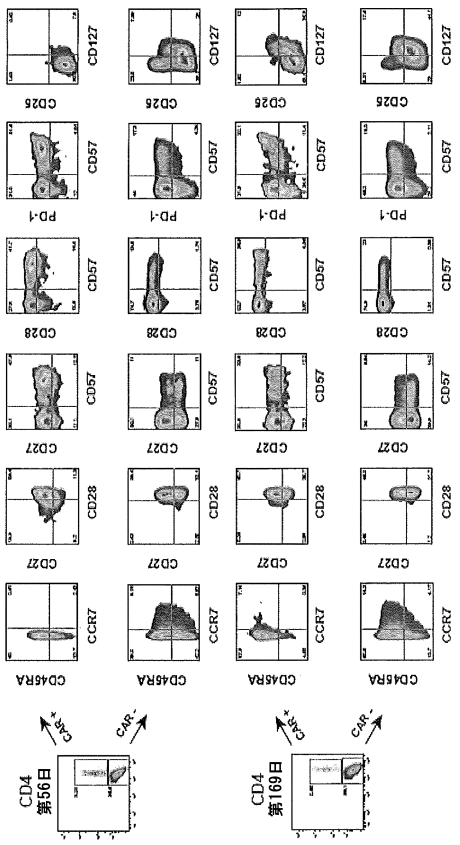
【図３Ｄ】



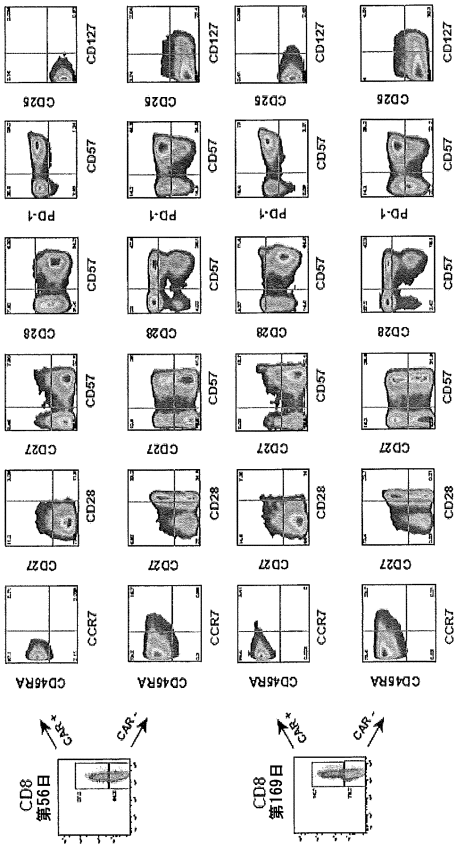
【図４Ａ】



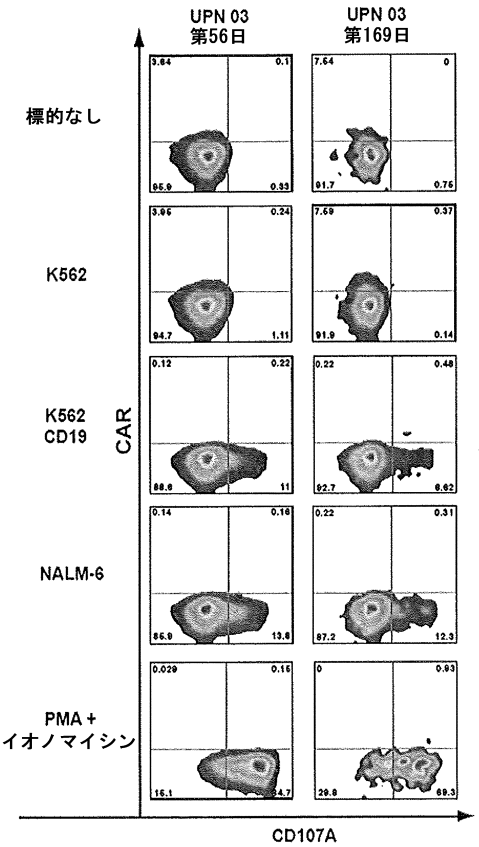
【図４Ｂ】



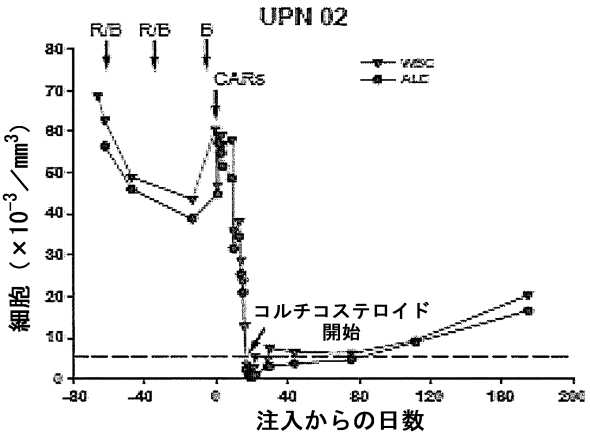
【図４Ｃ】



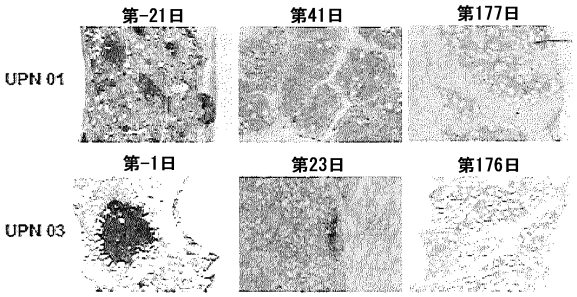
【図４Ｄ】



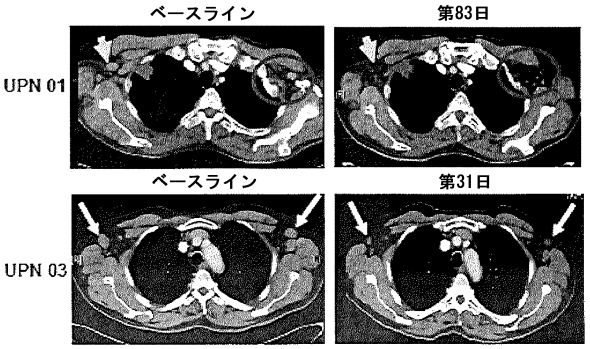
【図５Ａ】



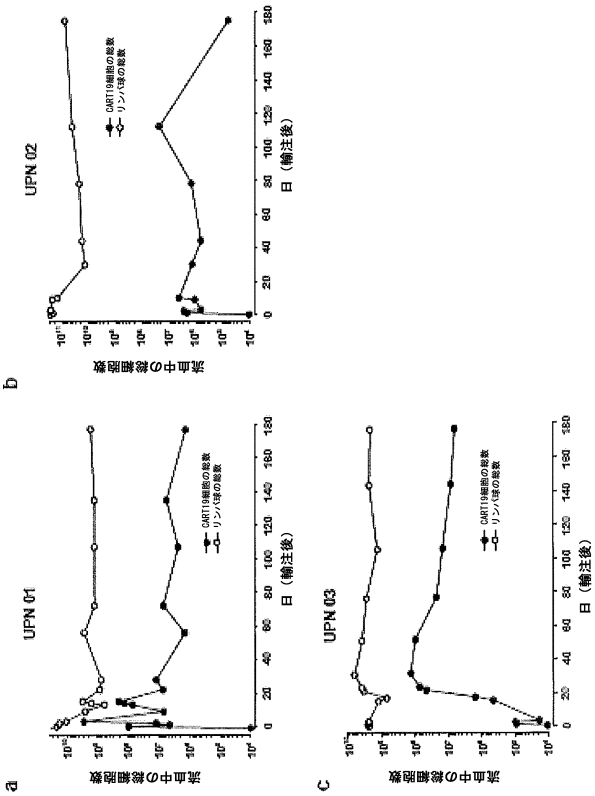
【図５Ｂ】


第-21日
第41日
第177日
UPN 01
第-1日
第23日
第176日
UPN 03

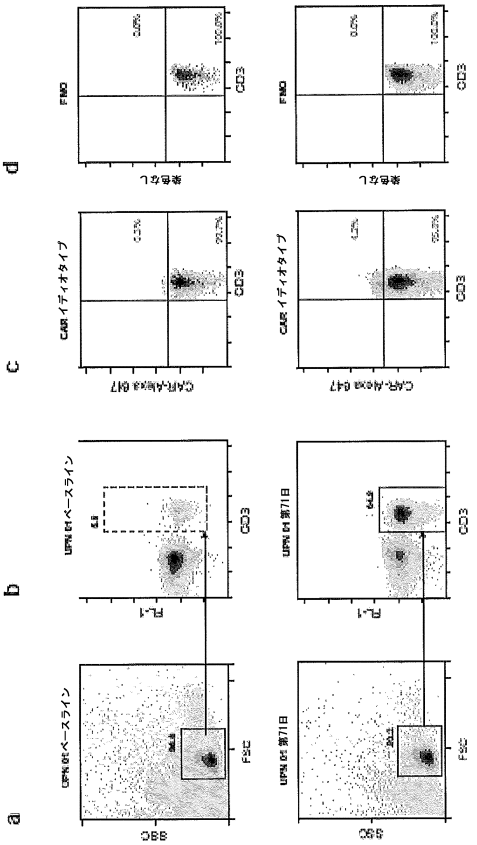
【図５Ｃ】


ベースライン
第83日
UPN 01
ベースライン
第31日
UPN 03

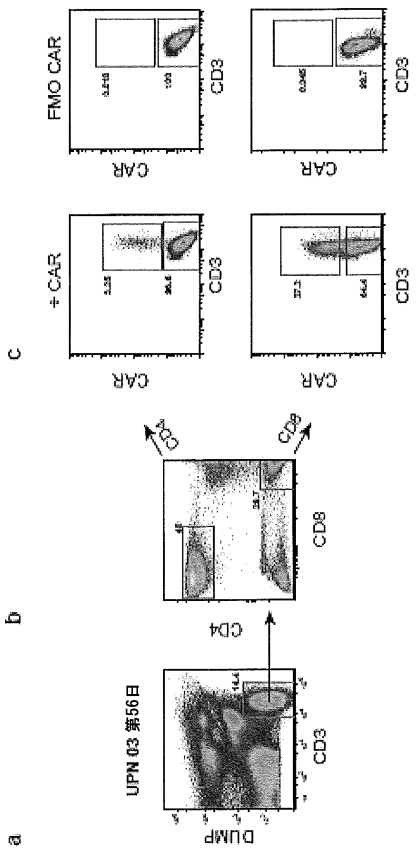
【図６】


UPN 02
UPN 01
UPN 03
CART19細胞の総数
リンパ球の総数
日（輸注後）
流血中の総細胞数

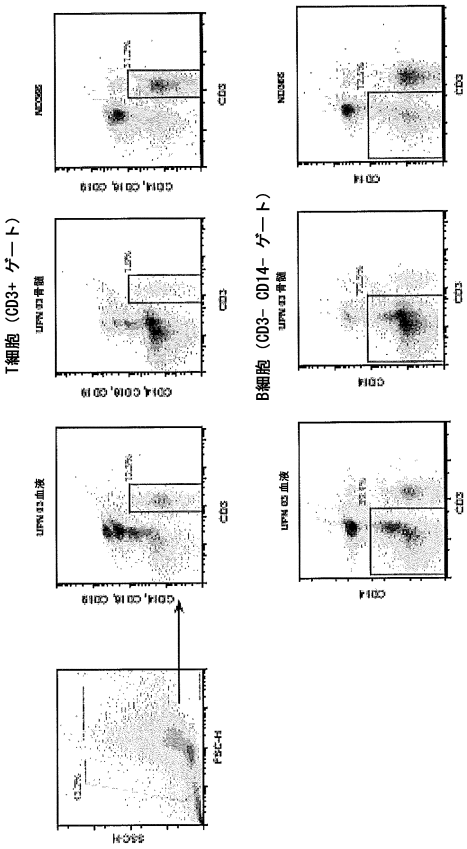
【図７】


UPN 01 ベースライン
UPN 01 第71日
CD3
FSC
SSC
FMO
CAR-Alexa 647
CAR イディオタイプ

【図８】



【図９】

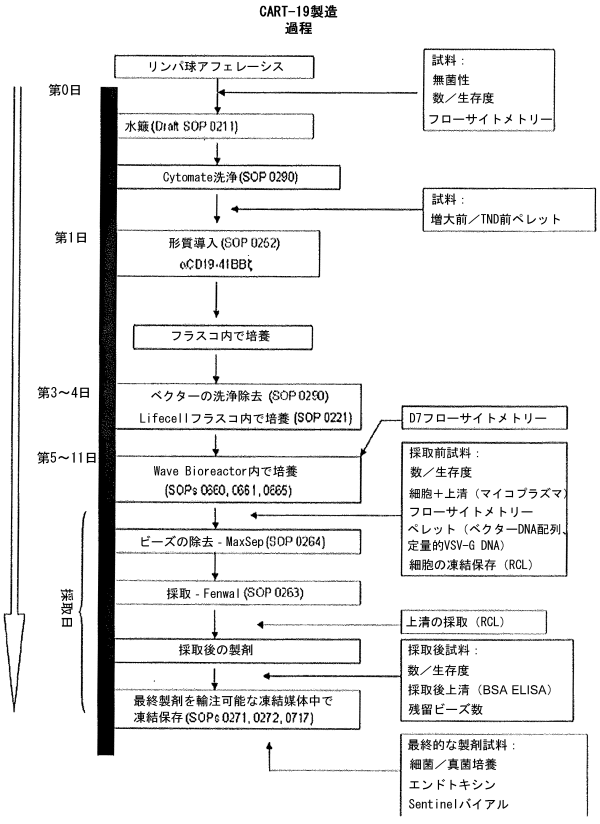


【図１０】

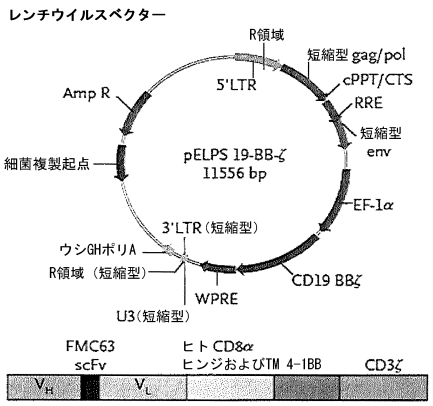
対象UPN	年齢／性別 核型	治療歴	ベースラインでのCLL腫瘍総量 骨髄[3]（試験日）	血液[3]（試験日）	リンパ節／脾臓[3]（試験日）	CART19の総用量（細胞／kg）	反応 D -30（病期）
01	65M 正常	フルダラビン×4サイクル（2002） リツキシマブ／フルダラビン×4サイクル（2005） アレムツズマブ×12週（2005） アレムツズマブ（コース2）（2006～2009） R-CHOP×2サイクル（2009） PCR×2サイクル（5/18～6/18/2010） ベンダムスチン×1サイクル（7/31～8/1/10）CART19の前	過形成の70% CLL CLL細胞2.4x10^12個（第-14日） CLL細胞1.7x10^12個（第-1日）	N/A	CLL細胞 6.2x10^11～1.0x10^12個（第-37日）	1.1x10^8（1.5x10^7/kg）	CR（8カ月超）
02	77M del(17p)(p13)[1]	アレムツズマブ×16週（6/2007） アレムツズマブ×16週（3/2009） ベンダムスチン／リツキシマブ：7/1/2010（サイクル1） 7/28/2010（サイクル2） 8/26/2010（サイクル3）CART19の前	過形成の>95% CLL CLL細胞3.2x10^12個（第-47日）	CLL細胞 2.75x10^11個（第-1日）	CLL細胞 1.2x10^12～2.0x10^12個（第-24日）	5.5x10^8（1.0x10^7/kg）	PR（5カ月）
03	84M del(17p)(p13)[2]	R-フルダラビン×2サイクル（2002） R-フルダラビン×4サイクル（10/06-1/07） R-ベンダムスチン×1サイクル（2/09） ベンダムスチン×3サイクル（3-5/09） アレムツズマブ×11週（12/09/3/10） ペンタスタチン／シクロホスファミド（9/10/10）CART19の前	過形成の40% CLL CLL細胞8.8x10^11個（第-1日）	N/A	CLL細胞 3.3x10^12～5.5x10^12個（第-10日）	1.4x10^8（1.4x10^6/kg）	CR（7カ月超）

1. UPN 02の核型（ISCN命名法）：45,XY,del(1)(q25),+del(1)(p13),t(2;20)(p13;q11.2),t(3;5)(p13;q35),add(9)(p22),?del(13)(q14q34),-14,del(17)(p13)[cp24]
2. UPN 03の核型（ISCN命名法）：46,XY,del(17)(p12)[15]/44~46,idem,del(17)t(17;21)(p11.2;q11.2)[cp4]/40~45,XY,-17[cp3]
3. 腫瘍総量の決定方法については追加の材料の項を参照のこと。

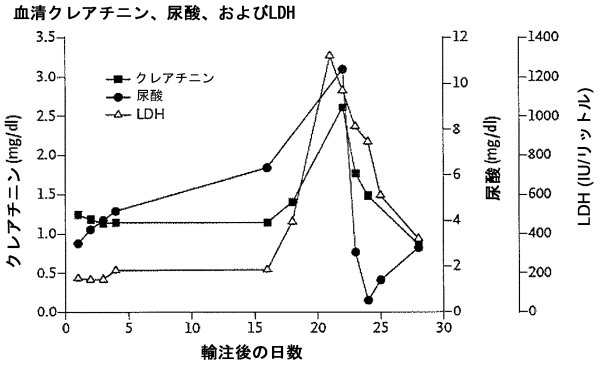
【図１１】



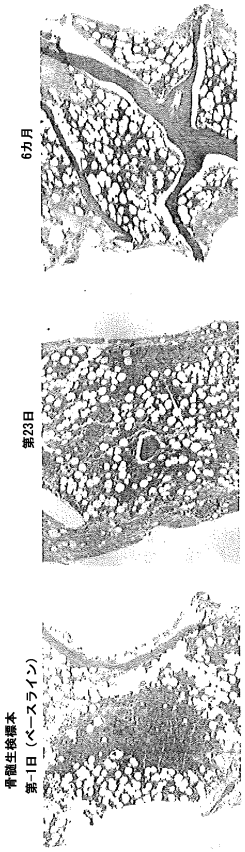
【図１２Ａ】



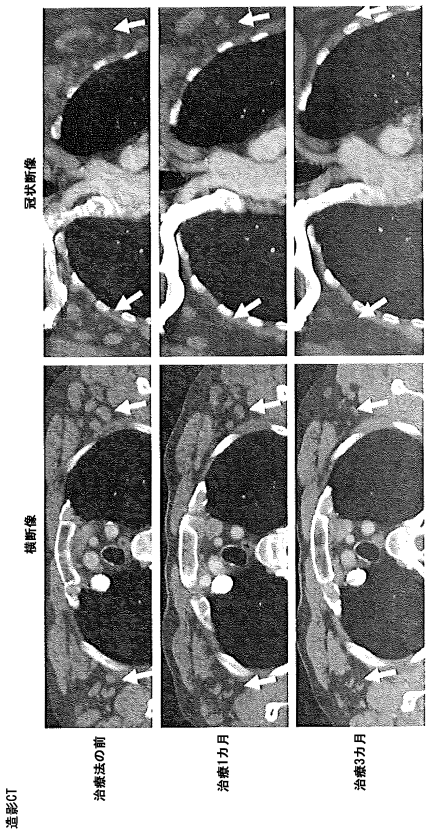
【図１２Ｂ】



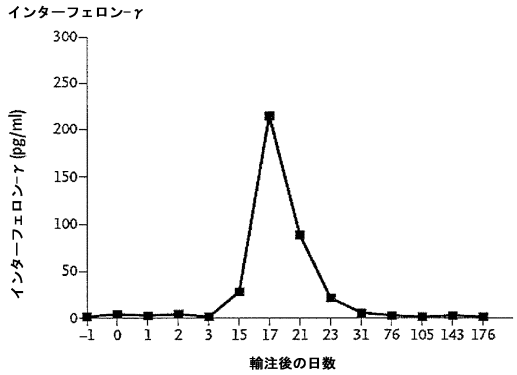
【図１２Ｃ】



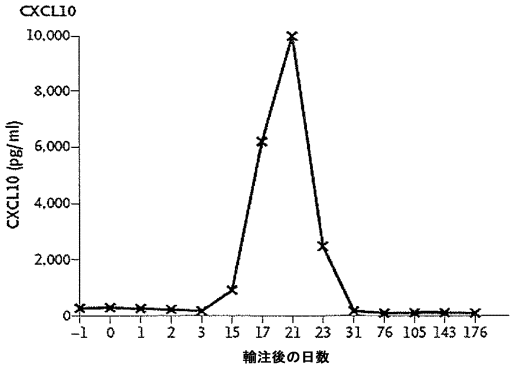
【図１２Ｄ】



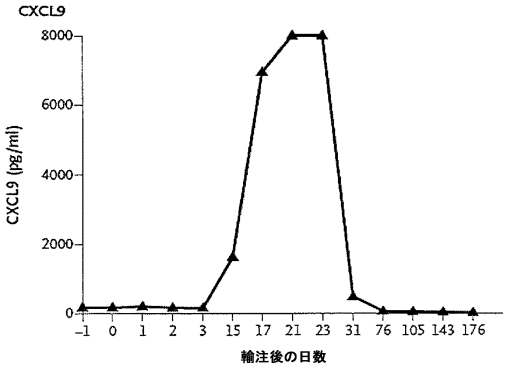
【図１３Ａ】



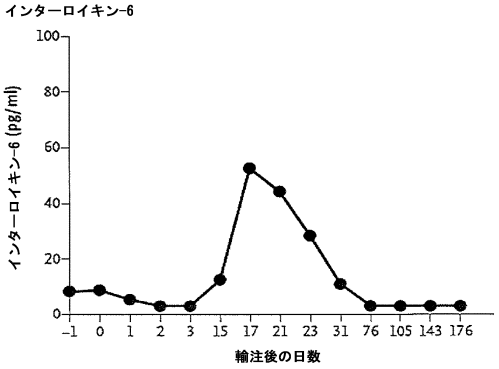
【図１３Ｂ】



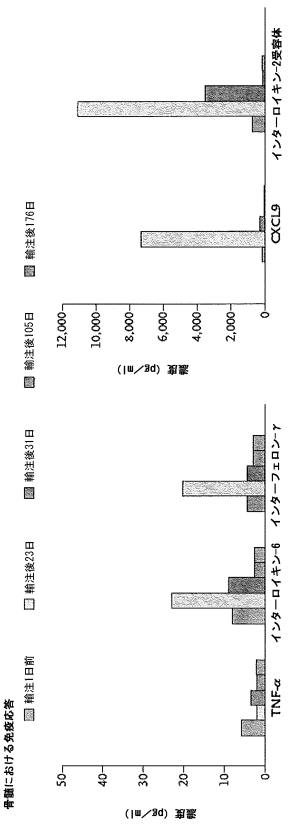
【図１３Ｃ】



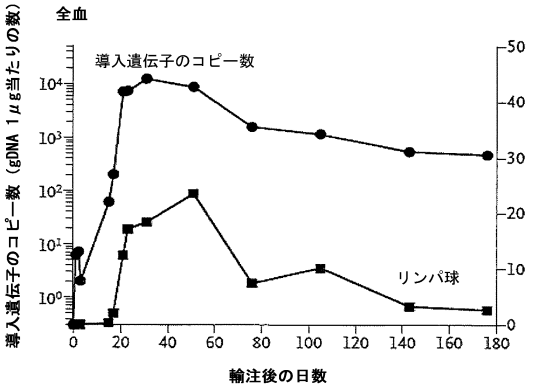
【図１３Ｄ】



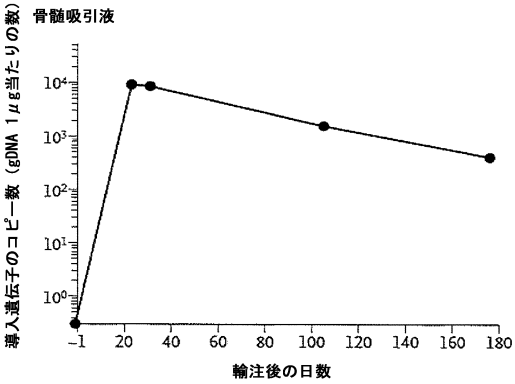
【図１３Ｅ】



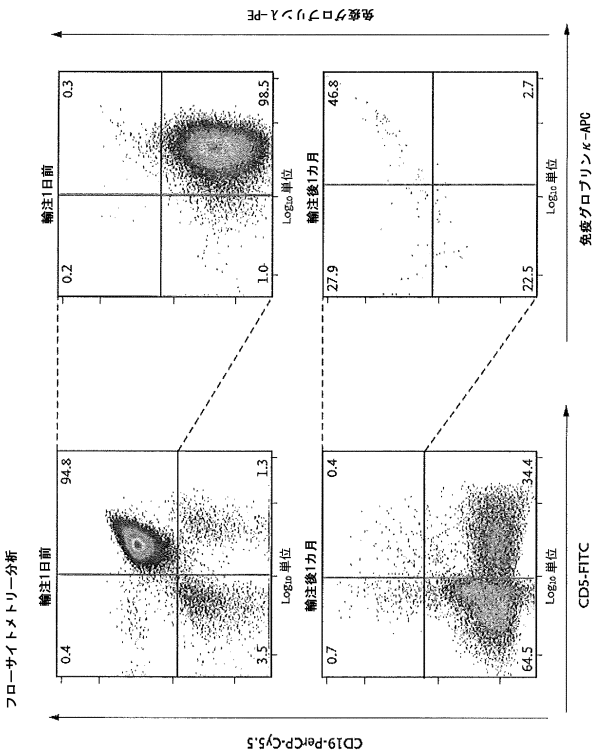
【図１４Ａ】



【図１４Ｂ】



【図１４Ｃ】



【配列表】
0007426361000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00	
C07K 16/30 (2006.01)		C07K	16/30	
C07K 14/705 (2006.01)		C07K	14/705	
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z
A61K 35/17 (2015.01)		A61K	35/17	
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	
A61P 35/02 (2006.01)		A61P	35/02	

米国(US)
オン ステーション ベアード ロード ４０９
(72)発明者 リバイン ブルース エル.
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 チェリー ヒル リバティー ベル ドライブ １２５８
(72)発明者 ポーター デビッド エル.
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 スプリングフィールド クラム クリーク ロード ８２１
(72)発明者 カロス マイケル ディー.
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 フィラデルフィア カーペンター レーン ７１６
(72)発明者 ミローヌ マイケル シー.
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 チェリー ヒル サリー ロード ３１４

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献
特許第６５８８０６０（ＪＰ，Ｂ２）
特許第６９４３９３３（ＪＰ，Ｂ２）
特開昭６２－０７０３９８（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５２１００５（ＪＰ，Ａ）
特表平０９－５０３９１１（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５０７３８３（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５２９６３６（ＪＰ，Ａ）
特表２００３－５１７３０１（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００９／０２５７９９１（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２００９／０９１８２６（WO，Ａ２）
Leukemia，2004年，Vol.18，pp.676-684
Mol. Immunol.，1997年，Vol.34, No.16-17，pp.1157-1165
Human Gene Therapy，2010年，Vol.21，pp.75-86
Mol. Therapy，2009年，Vol.17, No.8，pp.1453-1464
Blood，2010年，Vol.116, No.19，pp.3875-3886

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００
Ｃ１２Ｎ ５／００
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）