

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-504892  
(P2019-504892A)

(43) 公表日 平成31年2月21日(2019.2.21)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 35/12</b> (2015.01)	A 61 K 35/12	4 B 065
<b>A61K 35/17</b> (2015.01)	A 61 K 35/17	Z 4 C 084
<b>A61K 35/15</b> (2015.01)	A 61 K 35/15	Z 4 C 085
<b>A61K 45/00</b> (2006.01)	A 61 K 45/00	4 C 087
<b>A61K 38/20</b> (2006.01)	A 61 K 38/20	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-560705 (P2018-560705)	(71) 出願人	518279509 ナンキン レジェンド バイオテック カ ンパニー リミテッド
(86) (22) 出願日	平成29年1月26日 (2017.1.26)		中華人民共和国 チアンスー 21110 O ナンキン チャンニン ディストリク ト ロンミエン アベニュー ナンバー5 68 ビルディング オブ ナンキン ラ イフ サイエンス タウン ナンバー 6
(85) 翻訳文提出日	平成30年10月9日 (2018.10.9)	(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一
(86) 國際出願番号	PCT/CN2017/072723	(74) 代理人	100131392 弁理士 丹羽 武司
(87) 國際公開番号	W02017/133633		
(87) 國際公開日	平成29年8月10日 (2017.8.10)		
(31) 優先権主張番号	PCT/CN2016/073489		
(32) 優先日	平成28年2月4日 (2016.2.4)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		
(31) 優先権主張番号	PCT/CN2016/087855		
(32) 優先日	平成28年6月30日 (2016.6.30)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療のための改変哺乳類細胞

## (57) 【要約】

本発明は、免疫調節剤（免疫チェックポイント阻害剤等）をコードする異種核酸を含んだ改変哺乳類細胞を含む、医薬組成物を提供する。さらに、前記医薬組成物を単独で、または、キメラ抗原受容体（CAR）もしくは組換えT細胞受容体（TCR）改変T細胞免疫療法等の他の技術と組み合わせて、使用することによる癌の治療方法を提供する。本発明は、癌免疫療法に広く適用されている免疫調節剤および他の治療用タンパク質を、制御可能に、局所的に、かつ優れた費用対効果で送達するための細胞ベースのプラットフォームを提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb ) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物。

**【請求項 2】**

前記異種核酸が前記改変哺乳類細胞のゲノム中に存在する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 3】**

前記改変哺乳類細胞が初代細胞である、請求項 1 または請求項 2 に記載の医薬組成物。

10

**【請求項 4】**

前記改変哺乳類細胞が細胞株由来である、請求項 1 または請求項 2 に記載の医薬組成物。

**【請求項 5】**

前記改変哺乳類細胞が免疫細胞である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 6】**

前記免疫細胞が末梢血単核球 (P B M C ) 、 T 細胞、 B 細胞、または N K 細胞である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

**【請求項 7】**

前記改変哺乳類細胞が幹細胞である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

20

**【請求項 8】**

前記改変哺乳類細胞がさらにキメラ抗原受容体 (C A R ) または組換え T 細胞受容体 (T C R ) を発現する、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 9】**

前記改変哺乳類細胞が、前記免疫調節剤をコードする前記異種核酸と、前記 C A R または前記 T C R をコードする第 2 の異種核酸を含むベクターを含む、請求項 8 に記載の医薬組成物。

**【請求項 10】**

前記 C A R または前記 T C R をコードする前記第 2 の異種核酸が前記プロモーターに機能的に連結した、請求項 9 に記載の医薬組成物。

30

**【請求項 11】**

前記プロモーターが前記キメラ抗原受容体または前記組換え T 細胞受容体の細胞内シグナル伝達ドメインによって誘導可能である、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 12】**

前記 C A R または前記 T C R が、免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 13】**

前記医薬組成物がさらに第 2 の細胞を含み、前記第 2 の細胞はキメラ抗原受容体または組換え T 細胞受容体を発現する哺乳類免疫細胞である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

40

**【請求項 14】**

前記プロモーターが内在性プロモーターである、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 15】**

前記プロモーターが異種プロモーターである、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 16】**

50

前記プロモーターが誘導条件によって誘導可能なプロモーターである、請求項1～15のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項17】

前記誘導条件が、誘導物質、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態からなる群より選択される、請求項16に記載の医薬組成物。

【請求項18】

前記プロモーターが前記改変哺乳類細胞の内在性活性化シグナルによって誘導可能である、請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項19】

前記プロモーターがT細胞活性化依存プロモーターである、請求項18に記載の医薬組成物。

【請求項20】

前記プロモーターが誘導物質によって誘導可能である、請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項21】

前記誘導物質が小分子である、請求項20に記載の医薬組成物。

【請求項22】

前記誘導物質がポリペプチドである、請求項20に記載の医薬組成物。

【請求項23】

前記ポリペプチドが前記改変哺乳類細胞によって発現される、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項24】

前記改変哺乳類細胞がさらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する、請求項1～23のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項25】

前記免疫調節剤が免疫チェックポイント阻害剤である、請求項1～24のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項26】

前記免疫チェックポイント阻害剤がPD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、BTLA、TIM-3、またはLAG-3の阻害剤である、請求項25に記載の医薬組成物。

【請求項27】

前記免疫調節剤が免疫賦活剤である、請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

前記免疫賦活剤がIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記免疫調節剤が抗体である、請求項1～27のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項30】

前記抗体が一本鎖抗体である、請求項29に記載の医薬組成物。

【請求項31】

前記抗体が単一ドメイン抗体である、請求項29に記載の医薬組成物。

【請求項32】

前記抗体が重鎖と軽鎖とを含む、請求項29または請求項30に記載の医薬組成物。

【請求項33】

前記重鎖をコードする核酸と前記軽鎖をコードする核酸が、同一のプロモーターに機能的に連結される、請求項32に記載の医薬組成物。

【請求項34】

前記重鎖をコードする核酸と前記軽鎖をコードする核酸が、異なるプロモーターに機能

10

20

30

40

50

的に連結される、請求項 3 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 5】

前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターと前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターを同時に誘導することができる、請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 6】

前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターと前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターを順次誘導することができる、請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターと前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターが、約 10 : 1 ~ 約 1 : 10 の強度比を有する、請求項 3 4 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。 10

【請求項 3 8】

前記改変哺乳類細胞がさらに、治療用タンパク質をコードする第 2 の異種核酸を含む、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 9】

前記免疫調節剤をコードする異種核酸と、前記治療用タンパク質をコードする第 2 の異種核酸が、同一のプロモーターに機能的に連結される、請求項 3 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 0】

前記免疫調節剤をコードする異種核酸と、前記治療用タンパク質をコードする第 2 の異種核酸が、異なるプロモーターに機能的に連結される、請求項 3 8 に記載の医薬組成物。 20

【請求項 4 1】

前記治療用タンパク質が免疫調節剤ではない、請求項 3 8 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 2】

前記治療用タンパク質が免疫調節剤である、請求項 3 8 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 3】

前記改変哺乳類細胞が前記免疫調節剤と 2 種以上の治療用タンパク質を発現する、請求項 4 1 または請求項 4 2 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 4 4】

個体における癌の治療法であって、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の有効量を前記個体に投与することを含む、方法。

【請求項 4 5】

前記医薬組成物が全身投与される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記医薬組成物が輸液により投与される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記医薬組成物が腫瘍部位に局所投与される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記医薬組成物が注射により投与される、請求項 4 7 に記載の方法。 40

【請求項 4 9】

前記免疫調節剤の発現を前記改変哺乳類細胞内で誘導することをさらに含む、請求項 4 4 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記癌が固体腫瘍である、請求項 4 4 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記癌が液性腫瘍である、請求項 4 4 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記改変哺乳類細胞が前記個体から得られる、請求項 4 4 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。 50

**【請求項 5 3】**

前記改変哺乳類細胞が前記個体に対し同種異系である、請求項44～51のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 5 4】**

前記個体がヒト個体である、請求項44～53のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 5 5】**

前記免疫調節剤をコードする前記異種核酸を含んだベクターを哺乳類細胞に導入することを含む、請求項1～43のいずれか1項に記載の医薬組成物を調製する方法。

**【請求項 5 6】**

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項55に記載の方法。

**【請求項 5 7】**

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、およびそれらの誘導体からなる群より選択される、請求項56に記載の方法。

**【請求項 5 8】**

前記ベクターがエレクトロポレーションによって前記細胞に導入される、請求項55に記載の方法。

**【請求項 5 9】**

a) 請求項1～43のいずれ1項に記載の医薬組成物；およびb) 前記医薬組成物の使用のための説明書、を含むキット。

10

**【請求項 6 0】**

c) キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を発現する第2の哺乳類免疫細胞を含む組成物、をさらに含む、請求項59に記載のキット。

20

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****関連出願への相互参照**

本出願は、2016年2月4日に出願された国際特許出願第PCT/CN2016/073489号および2016年6月30日に出願された国際特許出願第PCT/CN2016/087855号の優先権の利益を主張するものであり、これらそれぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるものとする。

30

**【0002】**

本発明は、治療用タンパク質を発現する改変哺乳類細胞を含んだ医薬組成物、および癌免疫療法のためのその使用法に関する。

**【背景技術】****【0003】**

免疫監視機構の仮説によると、免疫系は腫瘍の増殖を阻害するのに重要な役割を担っている。免疫系は腫瘍関連抗原を認識することによって腫瘍細胞を正常細胞から区別することができる。T細胞は、癌免疫において重要な役割を担う主要な免疫細胞の一種である。免疫編集(immunoediting)の理論においては、腫瘍細胞の一部は免疫系による監視や排除を「回避」し、免疫原性を低下させ、最終的に臨床的に重要な腫瘍へと成長する。上記「回避」には腫瘍細胞によるいくつかの活動が含まれる可能性があり、共刺激分子発現のダウンレギュレーションや抑制分子発現のアップレギュレーション等が例として挙げられる。腫瘍細胞に対するT細胞の応答は、抑制シグナルと共に刺激シグナルとの間のバランスによって調節される。

40

**【0004】**

近年、いくつかの癌免疫療戦略が研究されている。PD-1およびCTLA-4等の抑制性免疫チェックポイントを遮断することが、癌免疫療法の魅力的な戦略と考えられるようになってきた。Blakeらは、PD-1/PD-L1を抗PD-L1抗体で遮断することにより、免疫寛容原性の環境において養子T細胞免疫療法が促進されることを報告した(

50

2015）。他の戦略としては癌ワクチンが挙げられ、この戦略においては臨床目的で人体に異種遺伝子が導入される。2015年10月には、手術不能な腫瘍を有する患者におけるメラノーマ治療に対するT-VEC (IMLYGIC (登録商標)) の注射製剤が米国FDAに認可された。単純ヘルペスウイルス1 (HSV-1) を改変して作製されたT-VECは、GM-CSFサイトカイン遺伝子をコードする腫瘍崩壊性ウイルスであり、癌細胞内で選択的に複製する。T-VEC感染癌細胞はGM-CSFを分泌する。それがDC細胞を誘引し、次いで細胞傷害性T細胞を亢進して腫瘍細胞を破壊する。免疫チェックポイント遮断を癌ワクチンと組み合わせることもできる。例えば、単純ヘルペスウイルスと併用で免疫チェックポイント阻害剤を投与することによるメラノーマの治療方法に関する最近のAmgenの特許（特許文献1）を参照のこと。

10

#### 【0005】

近年、キメラ抗原受容体 (CAR) 改変T細胞技術を用いた養子細胞免疫療法が著しい臨床成果を挙げている。2015年12月以降、80件超の臨床試験がClinicalTrials.govに登録されている。特徴的な研究の1つにおいては、CD19に対するCAR-T (CTL019) が白血病の持続的寛解をもたらすのに有効であることが示された。第57回米国血液学会 (ASH) 年会のNovartisの報告によれば、新規CTL019第2相データでは、r/r ALLを有する小児患者において93% (59名の患者中55名の患者) が完全寛解を示した。様々な疾患に対して、様々な種類の腫瘍抗原を標的としたCAR-T研究が多数進行中である。例として、BCMA、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA、EGFR、GD2、HER2、IGF1R、メソテリン (mesothelin)、PSMA、ROR1、およびWT1が標的となっている。Miaoらによれば、最も致死的な形態の癌の一種、膠芽腫の治療においてEGFRVIIIを標的とするCAR-Tを使用することが報告されている。

20

#### 【0006】

現在までに、治療用生物製剤、特にモノクローナル抗体は一般的にチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、HEK293、NS0、およびSp2/0等の細胞によって製造されている。CHO細胞株は、HUMIRA (登録商標) (アダリムマブ (adalimumab))、ENBREL (登録商標) (エタネルセプト (etanercept))、RITUXAN (登録商標) (リツキシマブ (Rituximab))、AVASTIN (登録商標) (ベバシズマブ (bevacizumab))、およびHERCEPTIN (登録商標) (トラスツズマブ (trastuzumab)) 等の組換えタンパク治療薬全体のうち、約70%の製造に使用してきた。イピリムマブ (Ipilimumab) およびラムブロリズマブ (Lambrolizumab) もまた、工業的にCHO細胞培養物中に精製される。これらの生物製剤は複雑なバイオプロセス手順によって製造された後、精製され、臨床用途の注射または輸液組成物として製剤される。

30

#### 【0007】

本明細書で参照される全ての出版物、特許、特許出願、および特許出願公開の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるものとする。

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

本出願は、免疫調節剤を発現する改変哺乳類細胞を含んだ医薬組成物、および癌治療のためのその使用方法を提供する。

40

#### 【0009】

本出願の一側面においては、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記異種核酸は前記改変哺乳類細胞のゲノム中に存在する。

#### 【0010】

上記いずれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は初代細胞である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、HEK293-6E細胞、NK-92、およびJurkat細胞からなる群より選択される細胞株等の細胞株に由

50

来する。

【0011】

上記いすれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、末梢血単核細胞（P B M C）、T細胞、B細胞、またはN K細胞等の免疫細胞である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらにキメラ抗原受容体（C A R）または組換えT細胞受容体（T C R）を発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、前記免疫調節剤をコードする前記異種核酸と、前記C A Rまたは前記T C Rをコードする第2の異種核酸を含んだベクターを含む。一部の実施形態において、前記C A Rまたは前記T C Rをコードする前記第2の異種核酸は、前記プロモーターに機能的に連結している。一部の実施形態において、前記プロモーターは、前記キメラ抗原受容体または前記組換えT細胞受容体の細胞内シグナル伝達ドメインによって誘導可能である。一部の実施形態において、前記C A RまたはT C Rは、免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記C A Rは、短縮型C A Rである。一部の実施形態において、前記C A Rは、一次細胞内シグナル伝達ドメイン（primary intracellular signaling domain）（C D 3等）を含まない。一部の実施形態において、前記C A Rは、非機能的または減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメイン（変異C D 3等）を含む。

10

【0012】

一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、造血幹細胞、間葉系幹細胞、または人工多能性幹細胞（i P S C）等の幹細胞である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらにキメラ抗原受容体（C A R）または組換えT細胞受容体（T C R）を発現する。一部の実施形態において、前記プロモーターは、前記キメラ抗原受容体または前記組換えT細胞受容体の細胞内シグナル伝達ドメインによって誘導可能である。

20

【0013】

上記いすれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記医薬組成物は、さらに第2の細胞を含み、前記第2の細胞はキメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を発現する哺乳類免疫細胞である。

【0014】

上記いすれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記プロモーターは内在性プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターは異種プロモーターである。

30

【0015】

上記いすれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導条件によって誘導可能なプロモーターである。一部の実施形態において、前記誘導条件は、誘導物質、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記プロモーターは前記改変哺乳類細胞の内在性活性化シグナルによって誘導可能である。一部の実施形態において、前記プロモーターはT細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターは、小分子、ポリペプチド（例えば前記改変哺乳類細胞によって発現されるポリペプチド）等の誘導物質によって誘導可能である。

40

【0016】

上記いすれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。

【0017】

上記いすれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤はP D - 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A - 4、B L T A、T I M - 3、またはL A G - 3の阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 2、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およ

50

び B c 1 - 2 からなる群より選択される。

【 0 0 1 8 】

上記いずれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。一部の実施形態において、前記抗体は一本鎖抗体である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は単ードメイン抗体である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は重鎖のみ抗体 (heavy chain-only antibody) である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は Fc 含有抗体 (全長抗体など) である。

【 0 0 1 9 】

上記いずれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記免疫調節剤は重鎖と軽鎖を含む抗体である。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸と前記軽鎖をコードする核酸とが、同一のプロモーターに機能的に連結される。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸と前記軽鎖をコードする核酸とが、異なるプロモーターに機能的に連結される。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターと前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターを同時に誘導することができる。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターと前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターが、約 10 : 1 ~ 約 1 : 10 の強度比を有する。

【 0 0 2 0 】

上記いずれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、さらに、免疫調節剤等の治療用タンパク質、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質、をコードする第 2 の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫調節剤をコードする異種核酸と前記治療用タンパク質をコードする前記第 2 の異種核酸が、同一のプロモーターに機能的に連結される。一部の実施形態において、前記免疫調節剤をコードする異種核酸と前記治療用タンパク質をコードする前記第 2 の異種核酸が、異なるプロモーターに機能的に連結される。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、免疫調節剤と 2 種以上の治療用タンパク質と発現する。

【 0 0 2 1 】

上記いずれかの医薬組成物による一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、該組成物が治療的に有効であるように十分に高い濃度で免疫調節剤を発現する。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、少なくとも約 1 mg / L、例えば、少なくとも約 5 mg / L、10 mg / L、20 mg / L、50 mg / L、100 mg / L、200 mg / L、300 mg / L、400 mg / L、500 mg / L、600 mg / L、700 mg / L、800 mg / L、900 mg / L、1 g / L、20 g / L、3 g / L、4 g / L、5 mg / L、または 10 g / L のいずれかの濃度で免疫調節剤を発現する。

【 0 0 2 2 】

本発明の一側面においては、個体 (ヒト個体等) における癌の治療法であって、上記医薬組成物いずれかの有効量を該個体に投与することを含む方法が提供される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液等により全身投与される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は注射等により癌の部位に局所投与される。

【 0 0 2 3 】

上記いずれかの癌の治療法による一部の実施形態において、該方法は、前記免疫調節剤の発現を前記変形哺乳類細胞内で誘導することをさらに含む。

【 0 0 2 4 】

上記いずれかの癌の治療法による一部の実施形態において、前記癌は固形腫瘍である。一部の実施形態において、前記癌は液性腫瘍である。

【 0 0 2 5 】

上記いずれかの癌の治療法による一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は前記個体に対し同種

10

20

30

40

50

異系である。

【0026】

本出願の一側面においては、上記いずれかの医薬組成物を調製する方法が提供され、該方法は、前記免疫調節剤をコードする前記異種核酸を含んだベクターを哺乳類細胞に導入することを含む。一部の実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、およびそれらの誘導体からなる群より選択されるウイルスベクター等のウイルスベクターである。一部の実施形態において、前記ベクターはエレクトロポレーションによって前記細胞に導入される。

【0027】

本出願の一側面においては、a) 上記いずれかの医薬組成物；およびb) 該医薬組成物の使用のための説明書、を含むキットが提供される。一部の実施形態において、前記キットは、c) キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を発現する第2の哺乳類免疫細胞を含む組成物をさらに含む。

【0028】

本発明のこれらおよび他の側面、ならびに長所は、以下の詳細な説明および添付の請求の範囲から明確になるであろう。本明細書に記載される各種実施形態の特性の1つ、一部、または全体を組み合わせることによって、本発明の他の実施形態を形成してもよいことを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1は、改变哺乳類細胞における免疫チェックポイント阻害剤の構成的発現と、腫瘍細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子の遮断を示す例示的な一実施形態の模式図である。

【図2】図2は、改变哺乳類細胞における免疫チェックポイント阻害剤の構成的発現と、改变哺乳類細胞上および非改变免疫細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子の遮断を示す例示的な一実施形態の模式図である。

【図3】図3は、改变哺乳類細胞における免疫チェックポイント阻害剤の誘導性発現と、腫瘍細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子の遮断を示す例示的な一実施形態の模式図である。

【図4】図4は、改变哺乳類細胞における免疫チェックポイント阻害剤の誘導性発現と、改变哺乳類細胞上および非改变免疫細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子の遮断を示す例示的な一実施形態の模式図である。

【図5】図5は、改变哺乳類細胞による免疫チェックポイント阻害剤およびキメラ抗原受容体(CAR)の共発現を示す例示的な一実施形態の模式図である。免疫チェックポイント阻害剤の分泌、および腫瘍細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子の遮断は、CAR分子による腫瘍抗原認識の下流でCAR細胞内シグナル伝達ドメインの活性化により制御される。

【図6】図6は、改变哺乳類細胞による免疫チェックポイント阻害剤およびキメラ抗原受容体(CAR)の共発現を示す例示的な一実施形態の模式図である。免疫チェックポイント阻害剤の分泌、ならびに改变哺乳類細胞上および非改变免疫細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子の遮断は、CAR分子による腫瘍抗原認識の下流でCAR細胞内シグナル伝達ドメインの活性化により制御される。

【図7A】図7Aは、改变哺乳類免疫細胞(T細胞等)による免疫チェックポイント阻害剤および短縮型抗EGFR-CARの共発現を示す例示的な一実施形態の模式図である。腫瘍細胞上の過剰発現されたEGFRに前記CARが結合する結果、前記免疫チェックポイント阻害剤の部位特異的発現と分泌が起こる。

【図7B】図7Bは、改变哺乳類免疫細胞(T細胞等)による、免疫チェックポイント阻害剤および短縮型抗EGFR-CAR；ならびにIL-7、IL-21、CCR類、およびBc12等の1つまたは複数の免疫賦活剤の共発現を示す例示的な一実施形態の模式図

10

20

30

40

50

である。腫瘍細胞上の過剰発現された E G F R に前記 C A R が結合する結果、前記免疫チェックポイント阻害剤および前記免疫賦活剤の部位特異的発現と分泌が起こる。

【図 8 A】図 8 A は、形質導入初代ヒト T 細胞における、h E F 1 プロモーターによって駆動される抗 P D - 1 および抗 C T L A - 4 抗体の発現を示す。

【図 8 B】図 8 B は、形質導入初代ヒト B 細胞における、h E F 1 プロモーターによって駆動される抗 P D - 1 および抗 C T L A - 4 抗体の発現を示す。

【図 8 C】図 8 C は、形質導入初代ヒト N K 細胞における、h E F 1 プロモーターによって駆動される抗 P D - 1 および抗 C T L A - 4 抗体の発現を示す。

【図 9 A】図 9 A は、形質導入初代ヒト T 細胞における、T E T O N (登録商標) プロモーターによって駆動される抗 P D - 1 の発現を示す。

【図 9 B】図 9 B は、形質導入初代ヒト T 細胞における、T E T O N (登録商標) プロモーターによって駆動される抗 C T L A - 4 抗体の発現を示す。

【図 10 A】図 10 A は、形質導入初代ヒト T 細胞における、N F A T プロモーターによって駆動される抗 P D - 1 の発現を示す。

【図 10 B】図 10 B は、形質導入初代ヒト T 細胞における、N F A T プロモーターによって駆動される抗 C T L A - 4 抗体の発現を示す。

【図 11】図 11 は、形質導入初代ヒト T 細胞における、温度制御プロモーターによって駆動される抗 P D - 1 の発現を示す。

【図 12 A】図 12 A は、レポーター細胞株 J u r k a t / N F A T . L u c - P D - 1 における P D - 1 の発現を示す。

【図 12 B】図 12 B は、レポーター細胞株 C H O / P D - L 1 における P D - L 1 の発現を示す。

【図 12 C】図 12 C は、レポーター細胞株 J u r k a t / I L - 2 プロモーター . L u c . C T L A - 4 における C T L A - 4 の発現を示す。

【図 13 A】図 13 A は、改変レポーター細胞株に対する抗 P D - 1 抗体の結合親和性を示す。

【図 13 B】図 13 B は、改変レポーター細胞株に対する抗 C T L A - 4 抗体の結合親和性を示す。

【図 14】図 14 は、C T L A - 4 レポーター・アッセイにおける抗 C T L A - 4 抗体の i n v i t r o 活性を示す。

【図 15 A】図 15 A は、レポーター細胞株 U 8 7 M G / v I I I . L u c . P D - L 1 上での E G F R v I I I の発現を示す。

【図 15 B】図 15 B は、レポーター細胞株 U 8 7 M G / v I I I . L u c . P D - L 1 上での P D - L 1 の発現を示す。

【図 16 A】図 16 A は、U 8 7 M G / v I I I - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞に対する、抗 E G F R v I I I - C A R および / または抗 P D - 1 抗体を発現する改変 T 細胞の細胞毒性を示す。

【図 16 B】図 16 B は、U 8 7 M G / v I I I - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞と共に培養された、抗 E G F R v I I I - C A R および / または抗 P D - 1 抗体を発現する改変 T 細胞による、I F N - ガンマの分泌を示す。

【図 16 C】図 16 C は、改変 T 細胞単独、または U 8 7 M G / v I I I - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞と共に培養された同細胞による、抗 P D - 1 抗体の発現を示す。

【図 17】図 17 は、R P M I - 8 2 2 6 / l u c - P D - L 1 腫瘍細胞に対する、抗 B C M A - C A R および / または抗 P D - 1 抗体を発現する改変 T 細胞の細胞毒性を示す。

【図 18】図 18 は、U 8 7 M G / v I I I - l u c - C D 8 0 / C D 8 6 腫瘍細胞に対する、抗 E G F R v I I I - C A R および / または抗 C T L A - 4 抗体を発現する改変 T 細胞の細胞毒性を示す。

【図 19 A】図 19 A は、U 8 7 M G / E S O 1 - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞に対する、各種抗 N Y - E S O - 1 - T C R (L I T - 0 0 1 ~ L I T - 0 0 6 ) を発現する改変 T 細胞の細胞毒性を示す。

10

20

30

40

50

【図19B】図19Bは、U87MG/ESO1-luc-PD-L1腫瘍細胞に対する、抗NY-ESO-1-TCR(LIT-006)および/または抗PD-1抗体を発現する改変T細胞の細胞毒性を示す。

【図19C】図19Cは、U87MG/ESO1-luc-PD-L1腫瘍細胞と共に培養された、抗NY-ESO-1-TCR(LIT-006)および/または抗PD-1抗体を発現する改変T細胞による、IFN-ガンマ分泌を示す。

【図20】図20は、U87MG/ESO1-luc-CD80/CD86腫瘍細胞に対する、抗NY-ESO-1-TCR(LIT-006)および/または抗CTLA-4抗体を発現する改変T細胞の細胞毒性を示す。

【図21A】図21Aは、抗HER2抗体および/または抗PD-1抗体をコードするベクターを導入した改変T細胞による抗体発現量を示す。 10

【図21B】図21Bは、抗HER2抗体および/または抗CTL A-4抗体をコードするベクターを導入した改変T細胞による抗体発現量を示す。

【図22A】図22Aは、SK-BR-3/luc細胞に対する、抗HER2抗体および/または抗PD-1抗体を発現する改変T細胞の細胞毒性を示す。

【図22B】図22Bは、SK-BR-3/luc細胞に対する、抗HER2抗体および/または抗CTL A-4抗体を発現する改変T細胞の細胞毒性を示す。

【図23】図23は、mAb425 scFvを含む抗EGFR CARをコードする、各種構築物を示す。GSI054～GSI060はさらに、抗PD-1抗体をコードする。GSI055～GSI060はさらに、IL-7またはIL-21、CCR2bまたはCCR4、および/またはBcl12等の、1つまたは複数の免疫賦活剤をコードする。 20

【図24】図24は、抗EGFR CAR-T細胞のin vitro細胞毒性アッセイを、A549-luc細胞に対する7日間の共培養で行った結果を示す。

【図25A】図25Aは、短縮型CAR-T細胞の細胞毒性アッセイを、A549-luc細胞に対する1日間の共培養で行った結果を示す。

【図25B】図25Bは、短縮型CAR-T細胞の細胞毒性アッセイを、A549-luc細胞に対する3日間の共培養で行った結果を示す。

【図25C】図25Cは、短縮型CAR-T細胞の細胞毒性アッセイを、A549-luc細胞に対する5日間の共培養で行った結果を示す。

【図25D】図25Dは、短縮型CAR-T細胞の細胞毒性アッセイを、A549-luc細胞に対する7日間の共培養で行った結果を示す。 30

【図26A】図26Aは、A549-luc細胞と共に3日間共培養を行った短縮型CAR-T細胞による抗PD-1発現を示す。

【図26B】図26Bは、A549-luc細胞と共に3日間共培養を行った短縮型CAR-T細胞によるIL-21発現を示す。

【図27A】図27Aは、GSI059導入T細胞におけるCCR4の発現を示す。

【図27B】図27Bは、GSI060導入T細胞におけるCCR4の発現を示す。

【図27C】図27Cは、GSI060導入T細胞におけるBcl12の発現を示す。

【図28】図28は、カニクイザルから得られたGSI060導入初代T細胞の細胞毒性を示す。 40

【図29A】図29Aは、CAR-Tを注入したカニクイザルの体重を示す。

【図29B】図29Bは、CAR-Tを注入したカニクイザルの体温を示す。

【図29C】図29Cは、CAR-Tを注入したカニクイザルNHP#2の全血球計算値を示す。

【図29D】図29Dは、CAR-Tを注入したカニクイザルNHP#2の血清化学値を示す。

【図30A】図30Aは、U87MG/vIII-luc-PD-L1腫瘍細胞に対する、抗PD-1 sda bを発現するEGFRvIII CAR-T細胞の細胞毒性を示す。

【図30B】図30Bは、U87MG/vIII-luc-CD80/CD86腫瘍細胞 50

に対する、抗 C T L A - 4 s d A b を発現する E G F R v I I I C A R - T 細胞の細胞毒性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明は、免疫チェックポイント阻害剤等の免疫調節剤をコードする異種核酸を含んだ改変哺乳類細胞を含む、医薬組成物を提供する。本明細書に記載される医薬組成物は、免疫調節剤を含む従来の医薬組成物とは異なり、制御可能かつ局所的な、費用対効果の高い、腫瘍細胞に対する免疫調節剤の細胞ベースの送達システムを提供することが可能である。本発明の医薬組成物は、改変哺乳類細胞（免疫細胞等）または第2の細胞のいずれかによって発現された、キメラ抗原受容体（C A R）または組換えT細胞受容体（T C R）をさらに含んでいてもよい。このような2成分医薬組成物においては、前記C A RまたはT C Rの活性化と免疫調節剤の分泌との機能の組み合わせが正のフィードバックループで互いを強化し合い、それによって腫瘍細胞に対する改変細胞の細胞毒性を増強し、また同時に、非改変宿主免疫細胞を該腫瘍細胞に対して動員することができる。本明細書に記載される医薬組成物は、それを必要とする個体に、癌（固体腫瘍等）に対する増強された強固な免疫療法を提供することにおいて有用である。

10

【0031】

本出願の一側面においては、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。

20

【0032】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞（免疫細胞または幹細胞等）であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結され、前記改変哺乳類細胞がさらにキメラ抗原受容体（C A R）または組換えT細胞受容体（T C R）を発現する、改変哺乳類細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。

【0033】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；b) キメラ抗原受容体（C A R）または組換えT細胞受容体（T C R）を発現する第2の哺乳類免疫細胞；およびc) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。

30

【0034】

本出願の他の一側面においては、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、個体における癌の治療法が提供される。

【0035】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞（免疫細胞または幹細胞等）であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結され、前記改変哺乳類細胞がさらにキメラ抗原受容体（C A R）または組換えT細胞受容体（T C R）を発現する、改変哺乳類細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、個体における癌の治療法が提供される。

40

【0036】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；b) キメラ抗原受容体（C A R）または組換えT細胞受容体（T C R）を発現する第2の哺乳類免疫細胞；およびc) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、個体における癌の治療法が提供される。

【0037】

50

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞、を含む医薬組成物の有効量を個体に投与すること；およびb) キメラ抗原受容体（CAR）または組換えT細胞受容体（TCR）を発現する第2の哺乳類免疫細胞、を含む医薬組成物の有効量を前記個体に投与すること、を含む個体における癌の治療法が提供される。

【0038】

さらには、本明細書に記載される方法に対して有用なキットおよび製品が提供される。

【0039】

I. 定義

本明細書で使用される「治療」という語は、臨床病理学の過程で、治療対象の個体または細胞の自然経過を改変するように設計された臨床的介入のことを指す。治療の望ましい効果としては、疾患の進行速度の低下、病状の改善または緩和、および寛解または予後の改善等が含まれる。例えば、癌と関連した1つまたは複数の症状が軽減または解消された場合に個体の癌に対する「治療」が成功したこととなり、その例は、癌性細胞の増殖の低下（または該細胞の破壊）、前記疾患に由来する症状の減少、前記疾患に苦しむ患者の生活の質の改善、前記疾患の治療に必要な他の薬物の投与量の減少、および／または個体の生存期間の延長等を含むが、これらに限定されない。

10

【0040】

本明細書で使用される「疾患の進行の遅延」という語は、疾患（癌等）の発症を延期させ、妨害し、減速させ、安定化し、および／または遅れて起こるようにすることを意味する。この遅延は、前記疾患の過程および／または治療を受ける個体によってその期間の長さが異なりうる。当業者にとっては明らかなことであるが、十分な、または有意な遅延は、事実上、個体において前記疾患が発症しない予防をも包含しうる。例えば、転移の発生を含む末期癌の遅延であってもよい。

20

【0041】

「有効量」は、特定の疾患の測定可能な改善をもたらすのに必要な、少なくとも最小限の量である。本明細書における有効量は、患者の病状、年齢、性別、および体重や、該個体において所望の反応を引き起こすための抗体の能力等の要素によって異なりうる。有効量は、治療的に有利な効果が、治療の任意の有毒または有害な効果を上回る量であってよい。治療用途において有益な、または所望の結果としては、疾患に由来する1つまたは複数の症状の減少、疾患に苦しむ患者の生活の質の改善、疾患の治療に必要な他の薬物の投与量の減少、ターゲティング等による他の薬物の効果の増強、疾患の進行の遅延、および／または生存期間の延長等の臨床結果が挙げられる。癌または腫瘍の場合、薬剤の有効量は、癌細胞数の減少、腫瘍サイズの減少、癌細胞の周囲器官への浸潤の阻害（すなわち、ある程度までの減速、または望ましくは停止）、腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度までの減速、または望ましくは停止）、腫瘍増殖のある程度までの阻害、および／または疾患と関連した1つまたは複数の症状のある程度までの軽減において効果を有するものであってよい。

30

【0042】

本明細書で使用される「併用」という語は、ある治療法を他の治療法に加えて適用することを指す。従って、「併用」とは、個体に対して、ある治療法を、他の治療法の適用前、適用中、または適用後に適用することを指す。

40

【0043】

治療の目的における「対象」または「個体」とは、ヒト、家畜、および、動物園、スポーツ、またはペット用途の動物などを含む、哺乳類に分類される任意の動物のことを指し、イヌ、ウマ、ネコ、およびウシ等が例として挙げられる。

【0044】

本明細書で使用される「抗体」という語は最も広い意味で用いられ、具体的には、それが所望の生物活性を示す限り、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、多重特異性抗体（二重特異性抗体等）、および抗体断片を包含する。

50

## 【0045】

本明細書で使用される「天然抗体」、「全長抗体」、「インタクト抗体」、および「全抗体 (whole antibody)」という語は互換的に使用され、実質的にインタクトな形態の抗体のことを表し、以下に定義されるような抗体断片のことは表さない。これらの語は特に、F c 領域を含む重鎖を有する抗体のことを指す。天然抗体は通常、約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、2 個の同一な軽 (L) 鎖と 2 個の同一な重 (H) 鎖とからなる。各軽鎖は 1 個の共有ジスルフィド結合によって 1 個の重鎖と連結するが、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間ではジスルフィド結合の数が異なる。各重鎖と軽鎖は、規則的に間隔を空けた鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は一方の末端に 1 個の可変領域 ( $V_H$ ) を有し、それに続いて、いくつかの定常領域を有する。各軽鎖は一方の末端に 1 個の可変領域 ( $V_L$ ) を有し、もう一方の末端に 1 個の定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の第 1 定常領域と並び、軽鎖の可変領域は重鎖の可変領域と並ぶ。特定のアミノ酸残基が軽鎖と重鎖の可変領域間の接点を形成すると信じられている。

## 【0046】

「定常領域」という語は、抗原結合部位を含む免疫グロブリンの他の部分、すなわち可変領域と比べて、より保存的なアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子の部分のことを指す。定常領域には、重鎖の  $C_H 1$ 、 $C_H 2$ 、および  $C_H 3$  ドメイン ( $C_H$  と総称) ならびに軽鎖の  $C_H L$  (または  $C_L$ ) ドメインが含まれる。

## 【0047】

抗体の「可変ドメイン」または「可変領域」とは、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端領域のことを指す。重鎖の可変領域は「 $V_H$ 」と呼ばれることがある。軽鎖の可変領域は「 $V_L$ 」と呼ばれることがある。これらの領域は一般には抗体の最も可変性の部分であり、抗原結合部位を含む。

## 【0048】

「可変性」という語は、可変領域の一部の配列が抗体間で大きく相違し、特定の抗原に対する個々の抗体の結合および特異性においてそれが用いられるという事実のことを指す。しかし、この可変性は抗体の可変領域内に均一に分布しているわけではない。それは、軽鎖と重鎖両者の可変領域内で、超可変領域 (HVR) と呼ばれる 3 個のセグメント内に集中している。可変領域のより保存的な部分はフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる。天然重鎖および軽鎖の可変領域は、それぞれ 4 個の、主として シート形状をとる FR 領域を含み、FR 領域同士は 3 個の HVR によって接続され、HVR は前記 シート構造を接続するループを形成し、または場合によって前記 シート構造の一部を形成する。各鎖の HVR は FR 領域によって互いに近接して支持され、他方の鎖の HVR と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991) を参照のこと)。定常領域は抗原に対する抗体の結合には直接的には関与しないが、抗体依存性細胞障害 (ADCC) への抗体の関与など、各種免疫エフェクター機能を示す。

## 【0049】

いずれの哺乳類の種に由来する抗体 (免疫グロブリン) の「軽鎖」も、その定常領域のアミノ酸配列に基づき、カッパ (「 $\kappa$ 」) およびラムダ (「 $\lambda$ 」) と呼ばれる明確に異なる 2 つのタイプのどちらかに分類することができる。

## 【0050】

本明細書で使用される IgG 「アイソタイプ」または「サブクラス」という語は、定常領域の化学的および抗原的特徴によって定義される免疫グロブリンのサブクラスのいずれかを意味する。

## 【0051】

重鎖の定常領域のアミノ酸配列によって、抗体 (免疫グロブリン) は異なるクラスに分けられる。免疫グロブリンには、IgA、IgD、IgE、IgG、および IgM という 5 つの主要なクラスが存在し、これらのうちいくつかは、さらに、例えば IgG1、Ig

10

20

30

40

50

G 2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2等のサブクラス（アイソタイプ）に分けることができる。前記の異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常領域は、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ 、 $\mu$ と呼ばれる。免疫グロブリンの各種クラスのサブユニット構造および三次元構造は周知であり、例えば、Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)等に一般的に記載されている。抗体は、該抗体が1つまたは複数の他のタンパク質またはペプチドと共有的または非共有的に結合することによって形成された、より大きな融合分子の一部でありうる。

#### 【0052】

本明細書で使用される「全長抗体」、「インタクト抗体」、および「全抗体」という語は互換的に使用され、実質的にインタクトな形態の抗体のことを表し、以下に定義されるような抗体断片のことは表さない。これらの語は特に、Fc領域を含む重鎖を有する抗体のことを指す。

10

#### 【0053】

「抗体断片」はインタクト抗体の一部を含み、好ましくはその抗原結合領域を含む。一部の実施形態において、本明細書で記載される抗体断片は抗原結合断片である。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv断片、ダイアボディ(diabody)、直鎖抗体、一本鎖抗体分子、および抗体断片から形成された多重特異性抗体などを含む。

20

#### 【0054】

抗体のパパイン消化により、「Fab」断片と呼ばれる、それぞれが単一の抗原結合部位を有する、2個の同一の抗原結合断片と、残りの部分である、その名前が容易に結晶化する能力を反映した、「Fc」断片とが生成する。ペプシン処理により、2個の抗原結合部位を有し、抗原を架橋することが依然可能な、F(ab')<sub>2</sub>断片が生成する。

20

#### 【0055】

「Fv」は、完全な抗原結合部位を含んだ最小の抗体断片である。一実施形態において、一本鎖Fv種は、互いに密に非共有的に結合した1個の重鎖可変領域と1個の軽鎖可変領域との二量体からなる。一本鎖Fv(scfv)種においては、1個の重鎖可変領域と1個の軽鎖可変領域とをフレキシブルなペプチドリンクによって共有結合的に連結し、一本鎖Fv種と類似した「二量体」構造をとるように軽鎖と重鎖を結合することができる。この構成では、各可変領域の3個のHVRが相互作用し、VH-VL二量体の表面上に抗原結合部位を規定する。まとめると、これら6個のHVR全体により、抗体に抗原結合特異性が付与される。しかし、該結合部位全体と比べて親和性が低いのだけれども、单一の可変領域（すなわち、抗原に対して特異的な3個のHVRしか含まない、Fvの半分）さえも抗原を認識して結合する能力を有する。

30

#### 【0056】

Fab断片は、重鎖および軽鎖可変領域に加え、軽鎖の定常領域と、重鎖の第1定常領域(CH1)とを含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを含む、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端の少数の残基がさらに加わる点で、Fab断片と異なる。Fab'-SHは、本明細書において、定常領域のシステイン残基が遊離チオール基を持つFab'のことを指す。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片はもともと、間にヒンジシステインを有するFab'断片のペアとして生成したものである。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

40

#### 【0057】

「一本鎖Fv」または「scfv」抗体断片は、抗体のVHおよびVLドメインを含み、これらのドメインは一本のポリペプチド鎖の中に存在する。一般に、scfvポリペプチドは、さらにVHおよびVLドメイン間にポリペプチドリンクを含み、該リンクはscfvが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする。scfvの総説として、例えば、Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer Berlin Heidelberg, 1994. 269-315を参照のこと。

#### 【0058】

50

「ダイアボディ」という語は、2個の抗原結合部位を有する抗体断片であって、該断片が、同一ポリペプチド鎖（VH - VL）内に、軽鎖可変領域（VL）と、それに結合した重鎖可変領域（VH）とを含むものを表す。同一鎖上の2個の該ドメイン間でペアを形成させない短さのリンカーを使用することにより、該ドメインは他の鎖の相補ドメインとペアを形成することを強いられ、2個の抗原結合部位が生成される。ダイアボディは二価または二重特異性でありうる。ダイアボディのより完全な記載としては、例えば、EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); および Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) がある。トリアボディ（trabody）およびテトラボディ（tetrabody）についても、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003) に記載されている。

10

## 【0059】

「重鎖のみ抗体」または「HCAb」という語は、重鎖を含むが、抗体に通常見られる軽鎖を欠く、機能的抗体のことを指す。ラクダ科の動物（ラクダ、ラマ、およびアルパカ等）はHCAbを産することが知られる。

## 【0060】

「単一ドメイン抗体」または「sdAb」という語は、単一の単量体可変抗体領域からなる抗体断片のことを指す。一部の例では、単一ドメイン抗体は、ラクダ科HCAbから改変されたものであり、このようなsdAbを本明細書において「ナノボディー」または「V<sub>H</sub>Hs」と呼ぶ。ラクダ科sdAbは、公知の抗原結合抗体断片の中で、最も小さなもの1つである（例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-8 (1993); Greenberg et al., Nature 374:168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013) を参照のこと）。

20

## 【0061】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体のことを指す。例えば、該集団を構成する個々の抗体は、わずかな量で存在しうる突然変異、例えば自然発生の突然変異、を除いては同一である。従って、「モノクローナル」という修飾語句は、異なった抗体の混合物ではない抗体としての特徴のことを示す。ある実施形態において、このようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的に結合するポリペプチド配列を含んだ抗体を含み、該標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスによって得られたものである。例えば、この選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、または組換えDNAクローンのプール等の複数のクローンから、ある特定のクローンを選択することである。選択された標的結合配列をさらに改変することによって、例えば、標的に対する親和性を改善し、標的結合配列をヒト化し、細胞培養におけるその産生を改善し、in vivoでのその免疫原性を減じ、または多重特異性抗体を生成できるということ、また、該改変標的結合配列を含んだ抗体も本発明のモノクローナル抗体であるということ、を理解すべきである。異なる決定基（エピトープ）を標的とする異なる抗体を典型的に含んだモノクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を標的とする。モノクローナル抗体調製物は、その特異性に加え、典型的には他の免疫グロブリンの混入がないという点において有利である。

30

## 【0062】

「モノクローナル」という修飾語句は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体としての特徴のことを示し、なんらかの特定の方法によって抗体を製造することを必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法（例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma 14 (3): 253-260 (1995); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)）、組換えDNA法（例えば米国特許第4,816,567号を参照のこと）、ファージデ

40

50

イスプレイ技術（例えば、Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991) ; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992) ; Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004) ; Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004) ; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004) ; およびLee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)を参照のこと）、ならびに、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部または全体を有する動物において、ヒトまたはヒト様抗体を製造するための技術（例えば、WO 1998 / 24893 ; WO 1996 / 34096 ; WO 1996 / 33735 ; WO 1991 / 10741 ; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993) ; Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993) ; Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993) ; 10 米国特許第5,545,807号、第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、および第5,661,016号 ; Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) ; Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994) ; Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994) ; Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996) ; Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) ; ならびにLonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)を参照のこと）等を含む各種技術によって作製されたものであってよい。

## 【0063】

所望の生物活性を示す限りにおいて、本明細書のモノクローナル抗体には、具体的には、「キメラ」抗体およびその断片が含まれ、該「キメラ」抗体においては、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体中の、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同であり、一方、鎖の残りの部分は、他の種に由来する抗体中の、または他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の、対応する配列と同一または相同である（例えば米国特許第4,816,567号；およびMorrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)を参照のこと）。キメラ抗体としては、PRIMATTZED（登録商標）抗体などが挙げられ、該抗体においては抗原結合領域が、例えば、目的の抗原でマカクザルを免疫すること等によって產生された抗体に由来する。

## 【0064】

「ヒト化」型の非ヒト（例えばマウス）抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含んだキメラ抗体である。一実施形態においては、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）中の該レシピエントのHVR由来の残基が、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈長類等のヒト以外の種（ドナー抗体）の、所望の特異性、親和性、および/または能力を有するHVRに由来する残基によって置換されたものである。一部の例では、ヒト免疫グロブリンのFR残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。さらには、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中に見出されない残基を含んでいてもよい。これらの改変を、抗体性能をさらに高めるために行ってもよい。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのそれらに対応し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のそれらとなっている、少なくとも1個、典型的には2個の可変領域を実質的に全て有することとなる。該ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部も含むことになってもよく、それは典型的にはヒト免疫グロブリンのものである。より詳細には、例えば、Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986) ; Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988) ; およびPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)を参照のこと。また、例えば、Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998) ; Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995) ; Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) ; ならびに米国特許第6,982,321号および第7,087,409号を参照のこと。

## 【0065】

「ヒト抗体」はヒトによって生成された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を

有するもの、および／または本明細書に開示されるヒト抗体の作製のためのいずれかの技術を用いて作製されたものである。ヒト抗体のこの定義によれば、具体的には、非ヒト抗原結合残基を有するヒト化抗体は除外される。ヒト抗体は公知の各種技術を用いて製造することができ、それら技術の例はファージディスプレイライブラリーを含む。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991) ; Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77 (1985) ; Boerner et al., J. Immunol. 147(1):86-95 (1991)に記載の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001)も参照のこと。ヒト抗体の作製は、前記抗原を、抗原チャレンジに応答してこのような抗体を産生するが、内在性遺伝子座は機能しないように改変したトランスジェニック動物に投与することによって行うことができ、該トランスジェニック動物の例は免疫化ゼノマウス (xenomouse) (例えば、XENOMOUSE (登録商標) 技術に関して米国特許第6,075,181号および第6,150,584号を参照のこと)を含む。また、例えば、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術によって生成されたヒト抗体に関してLi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562 (2006)を参照のこと。

## 【0066】

本明細書で使用される「結合する」「～に特異的に結合する」、または「～に対して特異的な」という語は、標的と抗体の間の結合などの、測定可能かつ再現可能な相互作用のことを表し、これによって生体分子等の分子の不均質集団の存在下で標的の存在が判定される。例えば、ある標的 (例えばエピトープ) に結合または特異的に結合する抗体は、他の標的に対して結合する場合と比べ、この標的に対して、より高い親和性と結合活性で、より容易に、および／またはより長い持続時間で、結合する抗体である。一実施形態においては、抗体の無関係な標的への結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ (RIA) による測定において、該抗体の標的への結合の約10%未満である。ある実施形態においては、標的に特異的に結合する抗体は、1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、または0.1 nMの解離定数 (Kd) を有する。ある実施形態においては、抗体は、異なる種に由来するタンパク質間で保存されている該タンパク質上のエピトープに特異的に結合する。他の一実施形態において、特異的な結合は排他的な結合を含みうるが、必ずしもそれが必要というわけではない。

## 【0067】

本明細書で使用される「キメラ抗原受容体」または「CAR」とは、T細胞等の細胞上に1つまたは複数の抗原特異性を付与する、遺伝子操作された受容体のことを指す。CARは「人工T細胞受容体」、「キメラT細胞受容体」、または「キメラ免疫受容体」としても知られる。一部の実施形態において、前記CARは、腫瘍抗原に対して特異的な抗体の細胞外可変領域と、T細胞または他の受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。「CAR-T」とは、CARを発現するT細胞のことを指す。

## 【0068】

本明細書で使用される「T細胞受容体」または「TCR」とは、MHC分子に結合した特異的抗原ペプチドに対して結合する細胞外抗原結合ドメインを含んだ、内在性または組換えT細胞受容体のことを指す。一部の実施形態において、前記TCRは、TCRポリペプチド鎖とTCRポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態において、前記TCRは、腫瘍抗原に特異的に結合する。「TCR-T」とは、組換えTCRを発現するT細胞のことを指す。

## 【0069】

「組換え」という語は、(1)天然の環境から取り出された、(2)天然に遺伝子が見出されるポリヌクレオチドの全体または一部と関連したものではない、(3)天然には連結していないポリヌクレオチドと機能的に連結した、または(4)天然には産しない、遺伝子またはタンパク質等の生体分子のことを指す。「組換え」という語は、クローン化されたDNA単離物、化学合成されたポリヌクレオチド類似体、もしくは異種系によって生

10

20

30

40

50

物学的に合成されたポリヌクレオチド類似体、またはこのような核酸によってコードされたタンパク質および／またはmRNAのことを指して用いることができる。

【0070】

「発現する」という語は、核酸をタンパク質に翻訳することを指す。タンパク質は発現後細胞内に留まる場合もあり、細胞表面膜の成分になる場合もあり、細胞外マトリクスまたは培地中へ分泌される場合もある。

【0071】

「宿主細胞」という語は、発現ベクターの複製または発現を補助しうる細胞のことを指す。宿主細胞は、大腸菌(E. coli)等の原核細胞であってもよく、または酵母、昆虫細胞、両生類細胞、もしくは哺乳類細胞等の真核細胞であってもよい。

10

【0072】

本明細書で使用される「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」という語は、外来の核酸が宿主細胞中に移入または導入されるプロセスのことを指す。「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」細胞は、外来の核酸で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細胞である。

【0073】

「in vivo」という語は、細胞を入手した生物の体内のことを指す。「ex vivo」または「in vitro」という語は、細胞を入手した生物の体外のことを指す。

20

【0074】

「細胞」という語は、初代対象細胞およびその子孫を含む。

【0075】

本明細書で使用される「免疫調節剤」という語は、免疫系に対する効果(例えば阻害または刺激効果)を有する、任意のタンパク質またはペプチドに基づいた薬剤のことを指す。

【0076】

本明細書で使用される「免疫チェックポイント阻害剤」という語は、T細胞の活性化および機能を制御することができる1つまたは複数のチェックポイントタンパク質を完全にまたは部分的に減少し、阻害し、または妨げる分子のことを指す。

30

【0077】

本明細書で使用される「免疫賦活剤」という語は、免疫応答を刺激し、活性化させ、またはその強度を高める分子のことを指す。

【0078】

本明細書で使用される「治療用タンパク質」という語は、治療効果を有する、任意のタンパク質またはペプチドに基づいた薬剤のことを指す。

【0079】

本明細書で記載される発明の実施形態には、「～からなる」および／または「～から本質的になる」実施形態が含まれると理解される。

【0080】

本明細書で値またはパラメーターに関して「約」といった場合、それは、その値またはパラメーター自体に対する変動をも含む(そしてそれを記述する)ものである。例えば、「約X」と記述された場合、そこには「X」という記述が含まれる。

40

【0081】

本明細書で値またはパラメーターに関して「～ではない」といった場合、それは通常、値またはパラメーターに関して「～以外」ということを意味し、それを記述するものである。例えば、方法がX型の癌の治療に使用されないといった場合、この方法はX以外の型の癌の治療に使用されることを意味する。

【0082】

本明細書で使用される「約X～Y」という語は、「約X～約Y」と同じ意味を有する。

50

## 【0083】

本明細書および添付の請求の範囲で使用される「ある(a)」、「または(or)」、または「その(the)」という単数形は、文脈からそうではないことが明らかな場合を除き、複数の対象も包含する。

## 【0084】

## I I . 医薬組成物

本発明の一側面により、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（例えば第2の免疫調節剤、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質）をコードする第2の異種核酸を含む。

10

## 【0085】

本発明の医薬組成物は、免疫調節剤を製造するための細胞を含む組成物とは多くの面で異なる。例えば、本発明の改変哺乳類細胞が発現する免疫調節剤は、該改変哺乳類細胞を、それを必要とする個体に直接投与することによってその個体に送達することができ、その際に該免疫調節剤を該改変哺乳類細胞から単離または精製する必要がない。一部の実施形態において、前記医薬組成物はヒト個体等の個体に投与するのに適したものである。一部の実施形態において、前記医薬組成物は注射に適したものである。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液に適したものである。一部の実施形態において、前記医薬組成物は細胞培養培地を実質的に含まない。一部の実施形態において、前記医薬組成物はエンドトキシンまたはアレルゲンタンパク質を実質的に含まない。一部の実施形態において、「実質的に含まない」とは、医薬組成物の総容量または重量に対し、約10%、5%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、1 ppm、またはそれ未満、のいずれかよりも少ないことを意味する。一部の実施形態において、前記医薬組成物はマイコプラズマ、微生物因子、および/または感染症因子を含まない。

20

30

## 【0086】

## 改変哺乳類細胞

本出願人の医薬組成物は、前記改変哺乳類細胞を任意の数含んでいてよい。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、1コピーの前記改変哺乳類細胞を含む。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、前記改変哺乳類細胞を、少なくとも約1、10、100、1000、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、またはそれよりも多い、いずれかのコピー数で含む。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、1種類の改変哺乳類細胞を含む。一部の実施形態において、前記医薬組成物は少なくとも2種類の改変哺乳類細胞を含み、これらの異なる種類の改変哺乳類細胞では、細胞源、細胞型、発現する治療用タンパク質、免疫調節剤、および/またはプロモーター等が異なる。

40

## 【0087】

前記改変哺乳類細胞は各種細胞型および細胞源に由来するものでありうる。マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、サル、およびヒト等を含むが、限定されない任意の哺乳類の種に由来する細胞が本明細書中で想定される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞はヒト細胞である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞はレシピエント個体に対して同種異系(allogenic)である（すなわち、同一種であるが異なるドナーに由来する）。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は自己由来(autologous)である（すなわち、ドナーとレシピエントが同一である）。一部の実施形態において、

50

前記改变哺乳類細胞は同系 (syngeneic) である (すなわち、ドナーとレシピエントは異なる個体であるが一卵生双生児である)。

【0088】

一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は初代細胞に由来する。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は個体から単離された初代細胞である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は個体から単離された初代細胞から増えた (例えば増殖および / または分化した) ものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は上皮、筋肉、神経、または結合組織から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は造血系である。一部の実施形態において、前記初代細胞は胸腺から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞はリンパまたはリンパ節 (例えば腫瘍を排出するリンパ節) から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は脾臓から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は骨髄から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は末梢血等の血液から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は末梢血単核球 (P B M C) である。一部の実施形態において、前記初代細胞は血漿から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は腫瘍から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は粘膜免疫系から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は皮膚から得られたものである。一部の実施形態において、前記初代細胞は生検試料から得られたものである。

10

【0089】

一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は細胞株に由来する。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は市販の細胞株から得られたものである。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は個体から単離された初代細胞から樹立された細胞株である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は細胞株から増えた (例えば増殖および / または分化した) ものである。一部の実施形態において、前記細胞株は死を免れないもの (mortal) である。一部の実施形態において、前記細胞株は不死化されたものである。一部の実施形態において、前記細胞株は白血病またはリンパ腫細胞株等の腫瘍細胞株である。一部の実施形態において、前記細胞株は P B M C に由来する細胞株である。一部の実施形態において、前記細胞株は幹細胞株である。一部の実施形態において、前記細胞株は、H E K 2 9 3 - 6 E 細胞、N K - 9 2 細胞、および J u r k a t 細胞からなる群より選択される。

20

30

30

【0090】

一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は免疫細胞である。本発明の有用な免疫細胞の例は、樹状細胞 (未成熟樹状細胞および成熟樹状細胞等)、T リンパ球 (ナイーブ T 細胞、エフェクター T 細胞、メモリー T 細胞、細胞傷害性 T リンパ球、ヘルパー T 細胞、ナチュラルキラー T 細胞、制御性 T 細胞 (Treg cell)、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L)、およびリンホカイン (lyphokine) 活性化キラー (L A K) 細胞等)、B 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、単球、マクロファージ、好中球、顆粒球、およびこれらの組み合わせを含むが、それらに限定されない。免疫細胞の亜集団を、当該分野で公知の 1 つまたは複数の細胞表面マーカー (C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 9、C D 2 0、C D 1 1 c、C D 1 2 3、C D 5 6、C D 3 4、C D 1 4、C D 3 3 等) の有無によって定義することができる。前記医薬組成物が複数の改变哺乳類免疫細胞を含む場合、該改变哺乳類免疫細胞は 1 つの免疫細胞型の特定の亜集団、1 つの免疫細胞型の複数の亜集団の組み合わせ、または 2 つ以上の免疫細胞型の組み合わせでありうる。一部の実施形態において、前記免疫細胞は均質な細胞集団中に存在する。一部の実施形態において、前記免疫細胞は該免疫細胞を増強した不均質な細胞集団中に存在する。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞はリンパ球である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞はリンパ球ではない。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は養子免疫療法に適する。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は P B M C である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は P B M C に由来する免疫細胞である。一部の実施形態において、前

40

40

50

記改变哺乳類細胞はT細胞である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞はCD<sup>4+</sup>T細胞である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞はCD<sup>8+</sup>T細胞である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞はB細胞である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞はNK細胞である。

#### 【0091】

従って、一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改变哺乳類(ヒト等)免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改变哺乳類免疫細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改变哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、B細胞、またはNK細胞から選択される。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類免疫細胞は、さらに、腫瘍抗原(CARまたはTCR等)を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改变哺乳類免疫細胞は、さらに、治療用タンパク質(例えば第2の免疫調節剤、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質)をコードする第2の異種核酸を含む。

10

#### 【0092】

一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改变哺乳類(ヒト等)T細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改变哺乳類T細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改变哺乳類T細胞は細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、TIL、LAK細胞、CAR-T、またはTCR-Tから選択される。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記プロモーターはT細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類T細胞は、さらに、腫瘍抗原(CARまたはTCR等)を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改变哺乳類T細胞は、さらに、治療用タンパク質(例えば第2の免疫調節剤、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質)をコードする第2の異種核酸を含む。

20

30

#### 【0093】

一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改变哺乳類(ヒト等)PBMCであって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改变哺乳類PBMC；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類PBMCは、さらに、腫瘍抗原(CARまたはTCR等)を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改变哺乳類PBMCは、さらに、治療用タンパク質(例えば第2の免疫調節剤、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質)をコードする第2の異種核酸を含む。

40

#### 【0094】

一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記幹細胞は全能性幹細胞である。一部の実施形態において、前記幹細胞は多能性幹細胞である。一部の実施形態において、前記幹細胞は単能性幹細胞である。一部の実施形態において、前記幹細胞は前駆細胞である。一部の実施形態において、前記幹細胞は胚性

50

幹細胞である。一部の実施形態において、前記幹細胞は造血幹細胞である。一部の実施形態において、前記幹細胞は間葉系幹細胞である。一部の実施形態において、前記幹細胞は人工多能性幹細胞（iPSC）である。

#### 【0095】

従って、一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）幹細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類幹細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類幹細胞は、造血幹細胞、間葉系幹細胞、またはiPSCから選択される。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類幹細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類幹細胞は、さらに、治療用タンパク質（例えば第2の免疫調節剤、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質）をコードする第2の異種核酸を含む。

10

#### 【0096】

前記改変哺乳類細胞は前記異種核酸を任意の数（例えば1個、2個、3個、4個、5個、10個、50個、100個、もしくは1000個のいずれか、またはそれ以上）含んでよい。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は1コピーの前記異種核酸を有する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は複数コピーの前記異種核酸を有する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は少なくとも一種のさらなる異種核酸を含み、その例は、第2の免疫調節剤もしくは免疫調節剤ではない治療用タンパク質をコードする第2の異種核酸；または、細胞内のバイオマーカーの発現に対するレポーターをコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は2種類以上の異種核酸を含み、これらはそれぞれ異なる治療用タンパク質（例えば免疫調節剤または非免疫調節剤）をコードする。

20

#### 【0097】

本明細書に記載される異種核酸は異種遺伝子発現力セット中に存在することができ、該力セットは1つまたは複数のタンパク質コード配列と、任意に1つまたは複数のプロモーターを含む。一部の実施形態において、前記異種遺伝子発現力セットは、単一のタンパク質コード配列を含む。一部の実施形態において、前記異種遺伝子発現力セットは、単一のプロモーターにより駆動される2つ以上のタンパク質コード配列を含む（すなわちポリリストロニックである）。一部の実施形態において、前記異種遺伝子発現力セットは、さらに、1つまたは複数の調節配列（例えば5'UTR、3'UTR、エンハンサー配列、IREs、または転写終結配列）、組換え部位、1つまたは複数の選択マーカー（例えば抗生物質耐性遺伝子またはレポーター遺伝子）、シグナル配列、またはその組み合わせを含む。一部の実施形態において、前記免疫調節剤または治療用タンパク質をコードする異種核酸は、分泌のためのシグナル配列を含む。

30

#### 【0098】

前記異種核酸は前記改変哺乳類細胞に一過性または安定的に組み込まれてよい。一部の実施形態において、前記異種核酸は前記改変哺乳類細胞中に一過性に発現する。例えば、前記異種核酸は、前記改変哺乳類細胞の核内で、前記異種遺伝子発現力セットを含む染色体外アレイ内に存在してよい。異種核酸は、当該分野で公知の任意のトランスフェクションまたは形質導入法、例えばウイルスまたは非ウイルス法を用いて前記改変哺乳類に導入してよい。非ウイルストラ NS フェクション法の例は、リン酸カルシウム、デンドリマー、リポソーム、またはカチオン性ポリマー（DEAE-デキストランまたはポリエチレンイミン等）などの化学物質を用いたトランスフェクション；エレクトロポレーション、セルスクイージング（cell squeezing）、ソノポレーション（sonoporation）、光学トランスクエクション（optical transfection）、インペールフェクション（impalefection）

40

50

、原形質融合、ハイドロダイナミックデリバリー (hydrodynamic delivery) 、またはトランスポゾンなどの、非化学的手法；遺伝子銃、マグネットフェクション (magnectofection) 、すなわち磁石を使用したトランスフェクション、または微粒子銃などの、粒子を用いる方法；およびヌクレオフェクション (nucleofection) 等のハイブリッド法などを含むが、これらに限定されない。一部の実施形態において、前記異種核酸は DNA である。一部の実施形態において、前記異種核酸は RNA である。一部の実施形態において、前記異種核酸は直鎖状である。一部の実施形態において、前記異種核酸は環状である。

#### 【 0099 】

一部の実施形態において、前記異種核酸は前記改変哺乳類細胞のゲノム中に存在する。例えば、前記異種核酸は、当該分野で公知の任意の方法により前記改変哺乳類細胞のゲノム中に組み込まれていてもよく、そのような方法の例は、ウイルス媒介組み込み、ランダム組み込み、相同組換え法、および、部位特異的リコンビナーゼまたはインテグラーーゼ、トランスポゼース、転写活性化因子様エフェクタースクレアーゼ (T A L E N (登録商標)) 、 C R I S P R / C a s 9 、およびジンクフィンガーヌクレアーゼ等を用いた部位特異的組み込み法などを含むが、それらに限定されない。一部の実施形態において、前記異種核酸は、前記改変哺乳類細胞のゲノムの特異的に設計された座位に組み込まれる。一部の実施形態において、前記異種核酸は、前記改変哺乳類細胞のゲノムの組み込みホットスポット内に組み込まれる。一部の実施形態において、前記異種核酸は、前記改変哺乳類細胞のゲノムのランダムな座位に組み込まれる。前記異種核酸が単一の改変哺乳類細胞内に複数コピー存在する場合、該異種核酸は該改変哺乳類細胞のゲノムの複数の座位に組み込まれていてよい。

10

20

30

40

50

#### 【 0100 】

##### 免疫調節剤

前記改変哺乳類細胞は、免疫調節剤を任意の数（例えば 1 個、 2 個、 3 個、 4 個、 5 個、もしくは 6 個のいずれか、またはそれ以上）発現してよい。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、単一の免疫調節剤をコードする異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、少なくとも 2 つの免疫調節剤をコードする 1 つまたは複数の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記少なくとも 2 つの免疫調節剤をコードする異種核酸は、同一のプロモーターに機能的に連結している。一部の実施形態において、前記少なくとも 2 つの免疫調節剤をコードする異種核酸は、異なるプロモーターに機能的に連結している。

#### 【 0101 】

従って、一部の実施形態において、 a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；および b ) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（ P B M C 、 N K 細胞、または T 細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。

#### 【 0102 】

一部の実施形態において、 a ) 少なくとも 2 個の免疫調節剤をコードする 1 つまたは複数の異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）細胞であって、各免疫調節剤をコードする異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；および b ) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（ P B M C 、 N K 細胞、または T 細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記少なくとも 2 個

の免疫調節剤をコードする異種核酸は、同一のプロモーターに機能的に連結している。一部の実施形態において、前記少なくとも2つの免疫調節剤をコードする異種核酸は、異なるプロモーターに機能的に連結している。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記少なくとも2個の免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤を含む。一部の実施形態において、前記少なくとも2個の免疫調節剤は免疫賦活剤を含む。一部の実施形態において、前記少なくとも2個の免疫調節剤はそれぞれ分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記少なくとも2個の免疫調節剤はそれぞれ抗体である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。

## 【0103】

10

本明細書が企図する免疫調節剤はタンパク質またはペプチドである。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は単一のポリペプチド鎖を含む。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は複数（例えば2個、3個、もしくは4個のいずれか、またはそれ以上）のポリペプチド鎖を含む。前記免疫調節剤のポリペプチド鎖は任意の長さのものであってよく、例えば、少なくとも約10、20、50、100、200、300、もしくは500アミノ酸のいずれか、またはそれ以上の長さであってよい。多鎖免疫調節剤の場合、それらのポリペプチド鎖をコードする核酸配列は同一のプロモーターまたは異なるプロモーターに機能的に連結していてよい。

## 【0104】

20

一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。モノクローナル抗体等の天然抗体は、特定の抗原と免疫学的な反応性を有する免疫グロブリン分子である。本明細書で使用される「抗体」という語は遺伝子操作された形態のものを含み、その例はキメラ抗体（例えばヒト化マウス抗体）、ヘテロ結合抗体（heteroconjugate antibody）（例えば二重特異性抗体）、組換え一本鎖Fv断片（scFv）、單一ドメイン抗体、および重鎖のみ抗体などを含む。「抗体」という語はまた、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、およびV<sub>H</sub>H等の抗原結合型の抗体も含む。一部の実施形態において、前記抗体はアゴニスト抗体である。一部の実施形態において、前記抗体はアンタゴニスト抗体である。一部の実施形態において、前記抗体はモノクローナル抗体である。一部の実施形態において、前記抗体は全長抗体である。一部の実施形態において、前記抗体は、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、V<sub>N A R</sub>、V<sub>H</sub>H、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ミニボディ（minibody）、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、トリボディ（tribody）、テトラボディ（tetrabody）、BiTE、ミニボディ（minibody）、scFv-Fc、トリアボディ（triabody）、および全長抗体の他の抗原結合サブ配列、またはこれらの人為的な組み合わせ、からなる群より選択される抗原結合断片である。一部の実施形態において、前記抗体はヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である。一部の実施形態において、前記抗体は一価抗体である。一部の実施形態において、前記抗体は二価抗体または四価抗体等の多価抗体である。一部の実施形態において、前記抗体は二重特異性抗体である。一部の実施形態において、前記抗体は多重特異性抗体である。一部の実施形態において、前記抗体は單一ドメイン抗体である。一部の実施形態において、前記抗体は、抗体断片（Fc含有融合タンパク質等）、または全長抗体の任意の他の機能的バリアントもしくは誘導体を含む、融合タンパク質である。

30

## 【0105】

40

一部の実施形態において、前記免疫調節剤は一本鎖抗体である。一部の実施形態において、前記一本鎖抗体は單一ドメイン抗体である。一部の実施形態において、前記一本鎖抗体はscFvである。一部の実施形態において、前記一本鎖抗体はタンデムscFvまたはBiTE等の二重特異性一本鎖抗体である。一部の実施形態において、前記一本鎖抗体は多重特異性一本鎖抗体である。

## 【0106】

50

一部の実施形態において、前記一本鎖抗体は、ラクダ科抗体またはその誘導体等の、重

鎖のみ抗体である。一部の実施形態において、單一ドメイン抗体である免疫調節剤（例えば抗 P D - 1 または抗 C T L A - 4 ）と C A R （または T C R ）とを共発現する改変哺乳類細胞を含んだ医薬組成物は、 I g G 抗体である免疫調節剤（例えば抗 P D - 1 または抗 C T L A - 4 ）と C A R （または T C R ）とを共発現する改変哺乳類細胞を含んだ医薬組成物と比べ、より強力な抗腫瘍効果を有する。どのような理論または仮説にも拘束されるものではないが、サイズが小さいこと、安定性が高いこと、および / または單一ドメイン抗体と関連した埋もれたエピトープへのアクセスがより容易であることが、單一ドメイン抗体免疫調節剤と C A R （または T C R ）を共発現する改変細胞の有効性を高めることに貢献している可能性がある。

## 【 0 1 0 7 】

一部の実施形態において、前記免疫調節剤は重鎖と軽鎖を含む抗体である。一部の実施形態において、前記重鎖は V <sub>H</sub> ドメインを有する。一部の実施形態において、前記重鎖はさらに、 1 つまたは複数の C <sub>H</sub> 1 、 C <sub>H</sub> 2 、 C <sub>H</sub> 3 等の定常領域、またはその任意の組み合わせを含む。一部の実施形態において、前記軽鎖は V <sub>L</sub> ドメインを有する。一部の実施形態において、前記軽鎖はさらに、 1 つまたは複数の、 C <sub>L</sub> 1 、 C <sub>L</sub> 2 、 C <sub>L</sub> 3 等の定常領域、またはその任意の組み合わせを含む。一部の実施形態において、前記重鎖および前記軽鎖は複数のジスルフィド結合を介して互いに結合している。一部の実施形態において、前記抗体は、ヒト I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、または I g G 4 の F c 断片等の F c を含む。一部の実施形態において、前記抗体は F c 断片を含まない。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は F a b である。

10

## 【 0 1 0 8 】

多鎖免疫調節抗体の重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドは、單一の異種核酸により、または 2 個の異種核酸により、前記改変哺乳類細胞中に共発現される。一部の実施形態において、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドは等モル比で発現される。一部の実施形態において、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドは、約 1 0 : 1 、 8 : 1 、 6 : 1 、 5 : 1 、 4 : 1 、 3 : 1 、 2 : 1 、 3 : 2 、 4 : 3 、 5 : 4 、 1 : 1 、 4 : 5 、 3 : 4 、 2 : 3 、 1 : 2 、 1 : 3 、 1 : 4 、 1 : 5 、 1 : 6 、 1 : 8 、または 1 : 1 0 のいずれかの比で発現される。一部の実施形態において、前記重鎖ポリペプチドと前記軽鎖ポリペプチドは、約 1 : 1 0 ~ 約 1 : 5 、約 1 : 5 ~ 約 1 : 3 、約 1 : 4 ~ 約 1 : 2 、約 1 : 2 ~ 約 1 : 1 、約 1 : 1 ~ 約 2 : 1 、約 2 : 1 ~ 約 4 : 1 、約 3 : 1 ~ 約 5 : 1 、約 5 : 1 ~ 約 1 0 : 1 、約 1 : 2 ~ 約 2 : 1 、約 1 : 3 ~ 約 3 : 1 、約 1 : 5 ~ 約 5 : 1 、または約 1 : 1 0 ~ 約 1 0 : 1 のいずれかの比で発現される。前記重鎖ポリペプチドと前記軽鎖ポリペプチドの間の最適な発現比によって、抗体のフォールディングと構築の過程を促進できる。例えば、Schlatter S et al. , Biotechnol Prog. 21(1) : 122-33 (2005) を参照のこと。

20

30

## 【 0 1 0 9 】

多鎖免疫調節抗体の前記重鎖ポリペプチドと前記軽鎖ポリペプチドの間の各種発現比は、前記異種核酸および / もしくは該重鎖と該軽鎖をコードする核酸のコピー数；ならびに / または誘導配列；ならびに / または該重鎖および該軽鎖をコードする核酸に連結されたプロモーターの強度を操作することにより達成されてよい。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸と前記軽鎖をコードする核酸とが、同一のプロモーターに機能的に連結される。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸と前記軽鎖をコードする核酸とが、異なるプロモーターに機能的に連結される。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターと前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターとを同時に誘導することができる。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターと前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターとを順次誘導することができる。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターの誘導が、前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターの誘導よりも先に行われる。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターの誘導が、前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターの誘導よりも後に行われる。

40

50

一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターと前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターは、約10:1、8:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、3:2、4:3、5:4、1:1、4:5、3:4、2:3、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:8、または1:10のいずれかの強度比を有する。一部の実施形態において、前記重鎖をコードする核酸のためのプロモーターと前記軽鎖をコードする核酸のためのプロモーターは、約1:10～約1:5、約1:5～約1:3、約1:4～約1:2、約1:2～約1:1、約1:1～約2:1、約2:1～約4:1、約3:1～約5:1、約5:1～約10:1、約1:2～約2:1、約1:3～約3:1、約1:5～約5:1、または約1:10～約10:1のいずれかの強度比を有する。

10

#### 【0110】

従って、一部の実施形態において、a)免疫調節抗体をコードする異種核酸を含む変形哺乳類(ヒト等)細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、変形哺乳類細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は免疫細胞(PBMC、NK細胞、またはT細胞等)である。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記免疫調節抗体は免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節抗体は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節抗体は一本鎖抗体(例えば単一ドメイン抗体、scFv、または重鎖のみ抗体)である。一部の実施形態において、前記免疫調節抗体は重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質(例えば第2の免疫調節剤、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質)をコードする第2の異種核酸を含む。

20

#### 【0111】

前記異種核酸から発現される免疫調節剤としては、免疫系を調節する(例えば阻害または活性化する)、任意のタンパク質またはペプチドに基づいた薬剤が挙げられる。免疫調節剤は、前記チェックポイント分子のような特定の分子を標的にすることができるか、あるいは免疫応答を非特異的に調節することができる。賦活剤の例は、抗原提示細胞を活性化し、細胞性免疫応答を刺激する分子を含む。例えば、賦活剤は免疫刺激ペプチドである。賦活剤は、Toll様受容体TLR-2、3、4、6、7、8、もしくは9のアゴニスト、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、TNF、CD40L、CD-28、FLOT-3リガンド、またはIL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、もしくはIL-21等のサイトカインを含むが、それらに限定されない。賦活剤は、T細胞上の活性化受容体(共刺激受容体等)のアゴニスト、例えばCD-28、OX40、GITR、CD137、CD27、CD40、またはHVEMのアゴニスト(アゴニスト抗体等)を含む。また、賦活剤は、免疫抑制因子の活性を阻害するタンパク質、例えば免疫抑制因子IL-10、IL-35、TGF-、もしくはIDOの阻害剤；または、免疫チェックポイントの活性を阻害するタンパク質、例えばCTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、B7-1、B7-H3、B7-H4、BTLA、VISTA、KIR、A2aR、もしくはTIM-3のアンタゴニスト(アンタゴニスト抗体等)を含む。また、賦活剤は、CD40、CD80、またはCD86等の共刺激分子も含む。また、免疫調節剤は、免疫系を下方制御する薬剤、例えば、IL-12p70に対する抗体、Toll様受容体TLR-2、3、4、5、6、8、もしくは9のアンタゴニスト、または免疫機能の一般的なサプレッサーを含む。これらの薬剤(例えば賦活剤または下方制御剤)を組み合わせて最適な免疫応答を達成することができる。一部の実施形態において、前記免疫調節剤はサイトカインである。一部の実施形態において、前記免疫調節剤はケモカインである。

30

#### 【0112】

40

50

本発明で特に興味深い免疫調節剤は、免疫チェックポイントタンパク質の調節剤（例えば阻害剤および賦活剤）を含む。免疫チェックポイントは、シグナルを強化する（刺激分子）か、あるいは弱める（抑制分子）、免疫系の分子である。免疫チェックポイントタンパク質は、自己寛容、ならびに生理学的免疫応答の持続期間および程度を調節および維持する。刺激性チェックポイント分子は、腫瘍壊死因子（TNF）受容体スーパーファミリーに属する、CD27、CD40、OX40、GITR、およびCD137；ならびに、B7-CD-28スーパーファミリーに属する、CD-28およびICOSを含むが、これらに限定されない。抑制性チェックポイント分子は、プログラム細胞死1（program death 1）（PD-1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（Cytotoxic T-Lymphocyte e-Associated protein 4）（CTLA-4）、リンパ球活性化遺伝子3（Lymphocyte Activation Gene-3）（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3（T-cell Immunoglobulin domain and Mucin domain 3）（TIM-3）、T細胞活性化のVドメインIgサプレッサー（V-domain Ig suppressor of T cell activation）（VISTA）、B7-H3、B7-H4、BおよびTリンパ球アテニュエーター（B and T Lymphocyte Attenuator）（BTLA）、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ（Indoleamine 2,3-dioxygenase）（IDO）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor）（KIR）、アデノシンA2A受容体、およびそれらのリガンドを含むが、これらに限定されない。CTLA-4とそのリガンドCD80およびCD86、ならびにPD-1とそのリガンドPD-L1およびPD-L2など、多数のチェックポイントタンパク質が広範に研究されている（例えばPardoll, *Nature Reviews Cancer* 12: 252-264 (2012)を参照のこと）。前記免疫調節剤は、前記免疫チェックポイント分子に特異的に結合する抗体、天然リガンド、または改変タンパク質でありうる。

#### 【0113】

一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、単一の免疫賦活剤または単一の免疫チェックポイント阻害剤等の、単一の免疫調節剤を発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は少なくとも2つの免疫調節剤を発現する。一部の実施形態において、前記少なくとも2つの免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫賦活剤と免疫チェックポイント阻害剤の両者を含む。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は同一の異種核酸によって発現される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は異なる異種核酸によって発現される。例えば、それぞれの免疫調節剤が異なる異種核酸によって発現される。

#### 【0114】

一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。本明細書が企図する免疫賦活剤の例は、刺激性チェックポイント分子の賦活剤を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は、刺激性免疫チェックポイント分子の天然または改変リガンドであり、その例は、OX40のリガンド（OX40L等）、CD-28のリガンド（CD80、CD86等）、ICOSのリガンド（B7RP1等）、4-1BBのリガンド（4-1BBL、Ultra-4-1BBL等）、CD27のリガンド（CD70等）、CD40のリガンド（CD40L等）、およびTCRのリガンド（MHCクラスIまたはクラスII分子、IMCgp100等）を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は、抗CD-28（TGN-1412等）、抗OX40（MED16469、MED1-0562等）、抗ICOS（MED1-570等）、抗GITR（TRX518、INBRX-110、NOV-120301等）、抗4-1BB（BMS-663513、PF-05082566等）、抗CD27（BION-1402、バルリルマブ（Varlilumab）、hCD27.15等）、抗CD40（CP870、893、BI-655064、BMS-986090、APX005、およびAPX005M等）、抗CD3（ブリナツモマ

10

20

30

40

50

ブ (blinatumomab) 、ムロモナブ (muromonab) 等) 、および抗 H V E M からなる群より選択される抗体 (例えばアゴニスト抗体) である。

【0115】

一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である。「免疫チェックポイント阻害剤」という語は、T細胞の活性化および機能を制御することができる1つまたは複数の抑制性チェックポイントタンパク質を完全にまたは部分的に減少させ、阻害し、または妨げる分子のことを指す。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤はT細胞を標的とする。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は腫瘍細胞を標的とする。例えば、一部の例では、腫瘍細胞は、特定のT細胞受容体に付着することにより、活性化したT細胞を不活性化 (turn off) することができる。しかし、免疫チェックポイント阻害剤は、腫瘍細胞のT細胞への付着を妨げ、T細胞を活性化されたままにすることができる (例えばHoward West, JAMA Oncol. 1(1):115 (2015)を参照のこと)。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は、抑制性免疫チェックポイント分子の天然または改変リガンドであり、その例は、CTLA-4のリガンド (B7-1、B7-2等)、TIM-3のリガンド (ガレクチン-9等)、A2a受容体のリガンド (アデノシン、レガデノソソ等)、LAG-3のリガンド (MHCクラスIまたはMHCクラスII分子等)、BTLAのリガンド (HVE M、B7-H4等)、KIRのリガンド (MHCクラスIまたはMHCクラスII分子等)、PD-1のリガンド (PD-L1、PD-L2等)、IDOのリガンド (NKT R-218、インドキシモド、NLG919等)、およびCD47のリガンド (SIRP-アルファ受容体等)を含む。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は分泌性である。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4 (イピリムマブ (Ipilimumab)、トレメリムマブ (Tremelimumab)、KAHR-102等)、抗TIM-3 (F38-2E2、ENUM005等)、抗LAG-3 (BMS-986016、IMP701、IMP321、C9B7W等)、抗KIR (リリルマブ (Lirilumab) およびIPH2101等)、抗PD-1 (ニボルマブ (Nivolumab)、ピディリズマブ (Pdilizumab)、ペムブロリズマブ (Pembrolizumab)、BMS-936559、アテゾリズマブ (atezolizumab)、ラムブロリズマブ (Lambrolizumab)、MK-3475、AMP-224、AMP-514、STI-A1110、TSR-042等)、抗PD-L1 (KY-1003 (EP20120194977)、MCLA-145、RG7446、BMS-936559、MEDI-4736、MSB0010718C、AUR-012、STI-A1010、PCT/US2001/020964、MPDL3280A、AMP-224、ダピロリズマブ・ペゴル (Dapirolizumab pegol) (CDP-7657)、MEDI-4920等)、抗CD73 (AR-42 (OSU-HDAC42、HDA C-42、AR42、AR42、OSU-HDAC42、OSU-HDAC-42、NSC-D736012、HDAC-42、HDAC42、HDAC42、NSCD736012、NSC-D736012)、MEDI-9447等)、抗B7-H3 (MGA271、DS-5573a、8H9等)、抗CD47 (CC-90002、TTI-621、VLST-007等)、抗BTLA、抗VISTA、抗A2aR、抗B7-1、抗B7-H4、抗CD52 (アレムツズマブ (alemtuzumab) 等)、抗IL-10、抗IL-35、および抗TGF- (フレソルミマブ (Fresolimumab) 等) からなる群より選択される、抑制性免疫チェックポイントタンパク質を標的とする抗体 (例えばアンタゴニスト抗体) である。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、BLTA、TIM-3、およびLAG-3 からなる群より選択される抑制性チェックポイント分子の阻害剤である。

【0116】

一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤はCTLA-4の阻害剤である。一部の実施形態において、前記CTLA-4の阻害剤は抗CTLA-4抗体である。一部の実施形態において、前記抗CTLA-4抗体はイピリムマブ (Ipilimumab) である。イピリムマブは抗CTLA-4モノクローナル抗体 (商品名YERVOY (登録商標

10

20

30

40

50

)、以前はMDX-010およびMDX-101として知られる)であり、転移を伴うまたは外科的に除去できない末期メラノーマを有する患者の治療用として、2011年3月付けて米国FDAに認可された。このmAb薬は、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、膀胱癌、および転移性ホルモン抵抗性前立腺癌の治療のための臨床試験においても有望な反応を示した。

【0117】

従って、一部の実施形態において、a) CTLA-4の阻害剤(イピリムマブ等の抗CTLA-4抗体など)をコードする異種核酸を含む変形哺乳類(ヒト等)細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、変形哺乳類細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は免疫細胞(PBMC、NK細胞、またはT細胞等)である。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質(例えばCTLA-4の阻害剤ではない第2の免疫調節剤、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質)をコードする第2の異種核酸を含む。

10

【0118】

一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤はPD-1の阻害剤である。一部の実施形態において、前記PD-1の阻害剤は抗PD-1抗体である。一部の実施形態において、前記抗PD-1抗体はラムブロリズマブ(Lambrolizumab)である。ラムブロリズマブ(ペムブロリズマブ(Pembrolizumab)またはMK-3475とも呼ばれる；商品名KEYTRUDA(登録商標))は、2014年9月4日付けて米国FDAに認可されたヒト化抗PD-1 IgG4 mAbである。この薬剤は当初、転移性メラノーマの治療に使用された。ペムブロリズマブは、PD-L1を発現する腫瘍を有し、他の化学療法剤による治療に失敗した患者における転移性非小細胞肺癌の治療に対して、2015年10月2日付けて米国FDAに認可された。

20

【0119】

従って、一部の実施形態において、a)PD-1の阻害剤(ラムブロリズマブ等の抗PD-1抗体など)をコードする異種核酸を含む変形哺乳類(ヒト等)細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、変形哺乳類細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は免疫細胞(PBMC、NK細胞、またはT細胞等)である。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質(例えばPD-1の阻害剤ではない第2の免疫調節剤、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質)をコードする第2の異種核酸を含む。

30

【0120】

40

他の治療用タンパク質

一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質をコードする第2の異種核酸を含む。本明細書が企図する治療用タンパク質の例は、治療効果を有する、任意のタンパク質またはポリペプチドに基づいた薬剤を含む。従って、免疫調節剤は治療用タンパク質の1種であると考えられる。前記変形哺乳類細胞は、前記免疫調節剤に加え、治療用タンパク質を任意の数(例えば1個、2個、3個、4個、5個、もしくは6個のいずれか、またはそれ以上)発現してよい。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は免疫調節剤である。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は免疫調節剤ではない。一部の実施形態において、前記変形哺乳類細胞は、前記免疫調節剤に加え、2つ以上のさらなる免疫調節剤、2つ以上の免疫調節剤ではない治療用タンパク質、

50

またはさらなる免疫調節剤と免疫調節剤ではない治療用タンパク質との組み合わせなどを含む、2つ以上の治療用タンパク質を発現する。

【0121】

前記免疫調節剤をコードする核酸、および前記さらなる治療用タンパク質をコードする核酸（免疫調節剤および非免疫調節剤を含む）は、同一または異なるプロモーターで駆動されるものであってよい。一部の実施形態において、前記免疫調節剤をコードする異種核酸と、前記治療用タンパク質をコードする前記第2の異種核酸とが、同一のプロモーターに機能的に連結される（例えばポリシストロニックなコード配列において）。一部の実施形態において、前記異種核酸が複数のタンパク質（例えば免疫調節剤、治療用タンパク質、キメラエフェクター分子等）をコードするポリシストロニックなコード配列である場合、自己切断ペプチド、例えば口蹄疫（foot-and-mouth disease）ウイルスF2A、ウマ鼻炎AウイルスE2A、ゾセア・アシグナ（Thosea asigna）ウイルスT2A、またはブタテッショウウイルス（teschovirus）-1 P2A等の2Aペプチド、をコードする核酸配列を、2個の異なるタンパク質をコードする配列間に配置することができる。一部の実施形態において、前記免疫調節剤をコードする異種核酸と、前記治療用タンパク質をコードする前記第2の異種核酸とが、異なるプロモーターに機能的に連結される。異なるプロモーターによる制御によって、前記免疫調節剤および前記さらなる治療用タンパク質の発現の量およびタイミング、ならびに誘導条件を別々のものとすることができます。一部の実施形態において、前記免疫調節剤をコードする異種核酸と、前記治療用タンパク質をコードする第2の異種核酸とが、同一の異種遺伝子発現カセットを介して前記改変哺乳類細胞に導入される。一部の実施形態において、前記免疫調節剤をコードする異種核酸と、前記治療用タンパク質をコードする第2の異種核酸とが、別々の異種遺伝子発現カセットを介して前記改変哺乳類細胞に導入される。

10

20

30

40

【0122】

従って、一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸と、免疫調節剤ではない治療用タンパク質をコードする第2の異種核酸とを含む改変哺乳類（ヒト等）細胞であって、前記免疫調節剤をコードする異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質をコードする第2の異種核酸は、前記プロモーターに機能的に連結している。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質をコードする第2の異種核酸は、前記免疫調節剤をコードする異種核酸に機能的に連結したプロモーターとは異なるプロモーターに機能的に連結している。

【0123】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）細胞であって、前記免疫調節剤をコードする異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変哺乳類細胞がさらに2つ以上の治療用タンパク質を発現する、改変哺乳類細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲ

50

ティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記2つ以上の治療用タンパク質は免疫調節剤ではない。一部の実施形態において、前記2つ以上の治療用タンパク質は1つまたは複数の免疫調節剤を含む。一部の実施形態において、前記2つ以上の治療用タンパク質は、それぞれが、プロモーターに機能的に連結した異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記2つ以上の治療用タンパク質のためのプロモーターは同一である。一部の実施形態において、前記2つ以上の治療用タンパク質のためのプロモーターは異なったものである。一部の実施形態において、前記2つ以上の治療用タンパク質のためのプロモーターの1つまたは複数は、前記免疫調節剤のためのプロモーターと同一である。

## 【0124】

10

当該分野で公知の任意の治療用タンパク質を、前記異種核酸によって発現してよい。本明細書が企図する治療用タンパク質は、次の機能のうちいずれか1つまたは複数を有していてよい：（1）欠損した、もしくは異常なタンパク質を置換すること；（2）既存の経路を増強すること；（3）新規機能または活性を提供すること；（4）分子または生物に干渉すること；および（5）他の化合物またはタンパク質を送達すること。

## 【0125】

20

一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は酵素である。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は調節タンパク質である。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質はシグナル伝達タンパク質である。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は細胞表面分子を標的とする。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は細胞表面分子のリガンドである。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は細胞表面分子の阻害剤である。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は細胞表面分子の賦活剤である。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は細胞表面分子である。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は化学療法剤である。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は腫瘍抗原に特異的に結合する。

## 【0126】

30

一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は免疫調節剤ではない。本出願における特に興味深い、非免疫調節剤の治療用タンパク質は、化学療法抗体等の抗癌剤である。本明細書が企図する化学療法抗体の例は、アレムツズマブ(alemtuzumab)、ベバシズマブ(bevacizumab)；セツキシマブ(cetuximab)；パニツムマブ(panitumumab)、リツキシマブ(rituximab)、ペルツズマブ(pertuzumab)、トラスツズマブ(trastuzumab)、トシツモマブ(tositumomab)、アポリズマブ(apolizumab)、アセリズマブ(aselizumab)、アトリズマブ(atlizumab)、バピネオズマブ(bapineuzumab)、ビバツズマブ・メルタンシン(bivatuzumab mertansine)、カンツズマブ・メルタンシン(cantuzumab mertansine)、セデリズマブ(cedelizumab)、セルトリズマブ・ペゴル(certolizumab pegol)、シドフシツズマブ(cidfusituzumab)、シドツズマブ(cidtuzumab)、ダクリズマブ(daclizumab)、エクリズマブ(eculizumab)、エファリズマブ(efalizumab)、エプラツズマブ(epratuzumab)、エルリズマブ(erlizumab)、フェルビズマブ(felizumab)、フォントリズマブ(fontolizumab)、ゲムツズマブ・オゾガマイシン(gemtuzumab ozogamicin)、イノツズマブ・オゾガマイシン(inotuzumab ozogamicin)、イピリムマブ(ipilimumab)、ラベツズマブ(labetuzumab)、リンツズマブ(lintuzumab)、マツズマブ(matuzumab)、メポリズマブ(mepolizumab)、モタビズマブ(motavizumab)、モトビズマブ(motovizumab)、ナタリズマブ(natalizumab)、ニモツズマブ(nimotuzumab)、ノロビズマブ(nolovizumab)、ヌマビズマブ(numavizumab)、オクレリズマブ(ocrelizumab)、オマリズマブ(omalizumab)、パリビズマブ(palivizumab)、パスコリズマブ(pascolizumab)、ペクフシツズマブ(pecfusituzumab)、ペクツズマブ(pectuzumab)、ペキセリズマブ(pexelizumab)、ラリビズマブ(ralivizumab)、ラニビズマブ(ranibizumab)、レスリビズマブ(reslivizumab)、レスリズマブ(reslizumab)、レスビズマブ(resyvizumab)、ロベリズマブ(rovelizumab)、ルプリズマブ(ruplizumab)、シブロツズマブ(sibrotuzumab)、シプリズマブ(siplizumab)、ソンツズマブ(

40

50

sontuzumab)、タカツズマブ・テトラキセタン (tacatuzumab tetraxetan)、タドシズマブ (tadocizumab)、タリズマブ (talizumab)、テフィバズマブ (tefibazumab)、トシリズマブ (tocilizumab)、トラリズマブ (toralizumab)、ツコツズマブ・セルモロイキン (tucotuzumab celmoleukin)、ツクシツズマブ (tucusituzumab)、ウマビズマブ (um avizumab)、ウルトキサズマブ (urtoxazumab)、ウステキヌマブ (ustekinumab)、ビシリズマブ (visilizumab)、および抗インターロイキン-12 (A B T - 874 / J 69 5、Wyeth Research and Abbott Laboratories) を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は抗 HER 2 抗体である。一部の実施形態において、前記抗 HER 2 抗体は HER 2 に結合し、HER 2<sup>+</sup>癌細胞の細胞増殖または成長を阻害する。一部の実施形態において、前記抗 HER 2 抗体は HER 2 に結合し、HER 2 が他の HER 受容体と二量体化することを阻害する。一部の実施形態において、前記抗 HER 2 抗体はトラスツズマブ (trastuzumab) またはペルツズマブ (pertuzumab) である。一部の実施形態において、前記抗 HER 2 抗体はトラスツズマブまたはペルツズマブではない。

10

#### 【0127】

本明細書が企図する治療用タンパク質は、免疫調節剤のための上記の任意の分子特性を有していてよい。一部の実施形態において、前記治療用タンパク質は分泌性である。例えば、前記治療用タンパク質は抗体であってよく、その例は全長抗体、一本鎖抗体、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、scFv、單一ドメイン抗体 (V<sub>H</sub>H 等)、および重鎖と軽鎖とを有する抗体断片 (Fab 等) を含む。該治療用タンパク質をコードする異種核酸と、該治療用タンパク質のためのプロモーターは、本明細書に記載した免疫調節剤のそれらのための任意の特性を有していてよい。

20

#### 【0128】

##### プロモーター

前記免疫調節剤をコードする異種核酸、前記細胞表面分子 (CAR もしくは TCR)、または本明細書に記載される任意の他の治療用タンパク質は、プロモーターに機能的に連結していてよい。一部の実施形態において、前記免疫調節剤、細胞表面分子 (CAR または TCR 等)、および他の治療用タンパク質のそれぞれは、異なるプロモーターにより駆動されるものであってよい。一部の実施形態において、前記免疫調節剤、細胞表面分子 (CAR または TCR 等)、および他の治療用タンパク質は、同一のプロモーターによって駆動されるものであってよい。

30

#### 【0129】

一部の実施形態において、前記プロモーターは内在性プロモーターである。例えば、前記免疫調節剤 (または本明細書に記載される他の治療用タンパク質) をコードする核酸は、C R I S P R / C a s 9 法等の当該分野で公知の任意の方法を用いて、前記改変哺乳類細胞のゲノム中、内在性プロモーターの下流にノックインしてよい。一部の実施形態において、前記内在性プロモーターは、ベータアクチン等の豊富なタンパク質のためのプロモーターである。一部の実施形態において、前記内在性プロモーターは誘導性プロモーターであり、例えば、前記改変哺乳類細胞の内在性活性化シグナルによって誘導可能である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞が T 細胞である場合、前記プロモーターは T 細胞活性化依存プロモーター (例えば IL-2 プロモーター、NFAT プロモーター、または NFB プロモーター) である。

40

#### 【0130】

一部の実施形態において、前記プロモーターは異種プロモーターである。

#### 【0131】

哺乳類細胞における遺伝子発現のために各種プロモーターが研究されてきたが、当該分野で公知の任意のプロモーターを本発明で使用してよい。プロモーターは構成的プロモーターと、誘導性プロモーター等の調節性プロモーター (regulated promoter) とに大きく分けられる。一部の実施形態において、前記免疫調節剤をコードする異種核酸は、構成的プロモーターに機能的に連結している。一部の実施形態において、前記免疫調節剤をコ-

50

ドする異種核酸は、誘導性プロモーターに機能的に連結している。一部の実施形態において、構成的プロモーターが第1の治療用タンパク質（免疫調節剤等）をコードする核酸に機能的に連結され、誘導性プロモーターが第2の治療用タンパク質（非免疫調節剤等）をコードする核酸に機能的に連結される。一部の実施形態において、第1の誘導性プロモーターが第1の治療用タンパク質（免疫調節剤等）またはポリペプチド鎖をコードする核酸に機能的に連結され、第2の誘導性プロモーターが第2の治療用タンパク質（非免疫調節剤等）またはポリペプチド鎖をコードする核酸に機能的に連結される。一部の実施形態において、第1の誘導性プロモーターは第1の誘導条件によって誘導可能であり、第2の誘導性プロモーターは第2の誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、第1の誘導条件は第2の誘導条件と同一である。一部の実施形態において、第1の誘導性プロモーターと第2の誘導性プロモーターは同時に誘導される。一部の実施形態において、第1の誘導性プロモーターと第2の誘導性プロモーターは順次誘導される。例えば、第1の誘導性プロモーターが第2のプロモーターよりも先に誘導されるか、または第1の誘導性プロモーターが第2のプロモーターよりも後に誘導される。

10

### 【0132】

構成的プロモーターは異種遺伝子（導入遺伝子とも呼ぶ）を宿主細胞中で構成的に発現させることができる。本明細書が企図する構成的プロモーターの例は、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ヒト伸長因子-1アルファ（hEF1）、ユビキチンCプロモーター（Ubic）、ホスホグリセロキナーゼプロモーター（PGK）、シミアンウイルス40初期プロモーター（SV40）、およびニワトリ-アクチンプロモーターとCMV初期エンハンサーとの組み合わせ（CAGG）を含むが、これらに限定されない。導入遺伝子の発現の駆動に対するこのような構成的プロモーターの有効性は、極めて多数の研究によって広範に比較してきた。例えば、Michael C. Miloneらは、初代ヒトT細胞におけるキメラ抗原受容体発現の駆動に対するCMV、hEF1、Ubic、およびPGKの有効性を比較し、その結果、hEF1プロモーターが導入遺伝子の最高レベルの発現を誘導しただけではなく、CD4およびCD8ヒトT細胞において最適に維持されたと結論づけた（Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009)）。一部の実施形態において、前記異種核酸中のプロモーターはhEF1プロモーターである。構成的プロモーターに機能的に連結した免疫チェックポイント阻害剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、該免疫チェックポイント阻害剤が、腫瘍細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子を遮断するものである例を、図1に示す。構成的プロモーターに機能的に連結した免疫チェックポイント阻害剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、該免疫チェックポイント阻害剤が、該改変哺乳類細胞および非改変免疫細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子を遮断するものである例を、図2に示す。

20

### 【0133】

一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性プロモーターである。誘導性プロモーターは調節性プロモーターのカテゴリーに属する。該誘導性プロモーターは、物理的な状態、前記改変哺乳類細胞の微小環境、もしくは前記改変哺乳類細胞の生理学的状態、誘導物質（すなわち誘導剤）、またはこれらの組み合わせ、等の1つまたは複数の条件によって誘導されうる。一部の実施形態において、前記誘導条件は、前記改変哺乳類細胞中および/または前記医薬組成物を投与される対象中で内在性遺伝子の発現を誘導しない。一部の実施形態において、前記誘導条件は、誘導物質、照射（電離放射線、光等）、温度（熱等）、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態からなる群より選択される。誘導性プロモーターに機能的に連結した免疫チェックポイント阻害剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、該免疫チェックポイント阻害剤が、腫瘍細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子を遮断するものである例を、図3に示す。誘導性プロモーターに機能的に連結した免疫チェックポイント阻害剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、該免疫チェックポイント阻害剤が、該改変哺乳類細胞および非改変免疫細胞上に発現する抑制性免疫チェックポイント分子を遮断するものである例を、図4に示す。

30

40

50

## 【0134】

従って、一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類(ヒト等)細胞であって、前記異種核酸が誘導性プロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞(PBMC、NK細胞、またはT細胞等)である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質(例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等)、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤(CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等)である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体(全長抗体、scFv、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等)である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質(例えば第2の免疫調節剤、または免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等)をコードする第2の異種核酸を含む。

10

## 【0135】

一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導物質によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記誘導物質は化合物等の小分子である。一部の実施形態において、前記小分子は、ドキシサイクリン、テトラサイクリン、アルコール、金属、またはステロイド類からなる群より選択される。化学的に誘導されるプロモーターが最も広範に研究されてきた。このようなプロモーターの例は、ドキシサイクリン、テトラサイクリン、アルコール、ステロイド類、金属、および他の化合物等の小分子化学物質の有無によって転写活性が調節されるプロモーターを含む。リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子(reverse tetracycline-controlled transactivator)(rtTA)およびテトラサイクリン応答エレメントプロモーター(tetracycline-responsive element promoter)(TRE)を用いたドキシサイクリン誘導系が、現在のところ最も成熟した系である。WO 94 29442は、テトラサイクリン応答性プロモーターによる真核細胞中の遺伝子発現の厳格な制御について記載している。WO 96 01313は、テトラサイクリンによって制御される転写モジュレーターを開示している。さらに、Tet-on系などのTet技術が、例えばTet Systems. comのウェブサイト上に記載されている。公知の化学的に制御される任意のプロモーターを用いて本出願の治療用タンパク質の発現を駆動してよい。

20

30

## 【0136】

一部の実施形態において、前記誘導物質は、成長因子、ホルモン、または細胞表面受容体に対するリガンド、等のポリペプチドであり、その例は、腫瘍抗原に特異的に結合するポリペプチドを含む。一部の実施形態において、前記ポリペプチドは前記改変哺乳類細胞によって発現される。一部の実施形態において、前記ポリペプチドは前記異種核酸中の核酸によってコードされる。ポリペプチド誘導物質も多数のものが当該分野で公知であり、これらは本発明における使用に適したものである可能性がある。例えば、エクジソン受容体に基づいた遺伝子スイッチ、プロゲステロン受容体に基づいた遺伝子スイッチ、およびエストロゲン受容体に基づいた遺伝子スイッチは、ステロイド受容体に由来するトランス活性化因子を利用した遺伝子スイッチに属する(WO 96 37609およびWO 97 38117等)。

40

## 【0137】

一部の実施形態において、前記誘導物質は、小分子成分と1つまたは複数のポリペプチドとの両者を含む。例えば、ポリペプチドの二量体化に依存した誘導性プロモーターが当該分野で公知であり、本発明における使用に適したものである可能性がある。1993年

50

に開発された最初の小分子C I D系は、薬剤F K 5 0 6の誘導体であるF K 1 0 1 2を使用し、F K B Pのホモ二量体化を誘導した。同様の戦略を用いて、Wuらは、ラパログ(Rapalog) / F K P B - F R B \* およびジベレリン(Gibberelline) / G I D 1 - G A I二量体化依存遺伝子スイッチを使用し、O N - スイッチ様式で滴定可能なC A R - T細胞を作製することに成功した(C.-Y. Wu et al., *Science* 350, aab4077 (2015))。他の二量体化依存スイッチ系の例は、クーママイシン(Coumermycin) / G y r B - G y r B (*Nature* 383 (6596): 178-81) およびH a X S / S n a p - t a g - H a l o T a g (*Chemistry and Biology* 20 (4): 549-57) を含む。

### 【0138】

一部の実施形態において、前記プロモーターは光誘導性プロモーターであり、誘導条件は光である。哺乳類細胞における遺伝子発現の調節のための光誘導性プロモーターも当該分野で周知である(例えば、*Science* 332, 1565-1568 (2011); *Nat. Methods* 9, 266-269 (2012); *Nature* 500: 472-476 (2013); *Nature Neuroscience* 18:1202-1212 (2015)を参照のこと)。このような遺伝子調節系は、(1)DNA結合、または(2)転写活性化ドメインのDNA結合タンパク質へのリクルート、の制御に基づき大きく2つのカテゴリーに分けることができる。例えば、青色光(480nm)に応答して細胞内カルシウムの増加を引き起こし、その結果N F A Tのカルシニューリン媒介動員が起こる、メラノブシンに基づいた合成哺乳類青色光制御転写系が開発され、哺乳類細胞において試験された。より最近、Motta-Menaらは、ヒト細胞株およびゼブラフィッシュ胚において転写開始の高レベルの青色光感受性制御を可能にする、天然E L 2 2 2転写因子から開発された新規誘導性遺伝子発現系を記載した(*Nat. Chem. Biol.* 10(3):196-202 (2014))。さらに、*Arabidopsis thaliana*の光受容体フィトクロムB(Phy B)とフィトクロム相互作用因子6(PIF6)の赤色光誘導相互作用が、赤色光誘導型の遺伝子発現調節のために利用された。さらに、紫外線B(UVB)誘導性遺伝子発現系も開発され、哺乳類細胞における標的遺伝子転写において有効であることが示された(*Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*, Fourth Edition CRC Press, Jan. 20<sup>th</sup>, 2015の第25章)。本明細書に記載される任意の光誘導性プロモーターを用いて本発明の治療用タンパク質の発現を駆動してよい。

### 【0139】

一部の実施形態において、前記プロモーターは、光誘導性分子と光との組み合わせによって誘導される光誘導性プロモーターである。例えば、化学誘導物質上の光切断性光ケージド基(light-cleavable photocaged group)は、該光ケージド基が照射または他の手段によって除去されない限り、該誘導物質を不活性に保つ。このような光誘導性分子の例は、小分子化合物、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質を含む。例えば、ケージドエクジソン、l a cオペロンと共に使用するためのケージドI P T G、リボザイム媒介性遺伝子発現のためのケージドトヨカマイシン、T e t - o n系と共に使用するためのケージドドキシサイクリン、および光媒介性F K B P / F R B二量体化のためのケージドラパログ(Rapalog)が開発されている(例えば、*Curr Opin Chem Biol.* 16(3-4): 292-299 (2012)を参照のこと)。

### 【0140】

一部の実施形態において、前記プロモーターは放射線誘導性プロモーターであり、誘導条件は電離放射線等の放射線である。放射線誘導性プロモーターによる導入遺伝子発現の制御も当該分野で公知である。遺伝子発現の変化が細胞への照射によって起こる。例えば、「前初期遺伝子」として知られる一群の遺伝子は、電離放射の際に即座に反応することができる。前初期遺伝子の例は、E r g - 1、p 2 1 / W A F - 1、G A D D 4 5アルファ、t - P A、c - F o s、c - J u n、N F - カッパB、およびA P 1を含むが、これらに限定されない。これらの前初期遺伝子はプロモーター領域に放射線応答性配列を有する。E r g - 1プロモーターにはコンセンサス配列が見出されており、血清応答エレメントと呼ばれるか、またはC A r Gエレメントとして知られる。放射線誘導性プロモーターと導入遺伝子との組み合わせは広く研究されており、治療上の利益を有効にもたらすこと

10

20

30

40

50

が示されている。例えば、*Cancer Biol Ther.* 6(7):1005-12 (2007)、および*Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*, Fourth Edition CRC Press, Jan. 20<sup>th</sup>, 2015の第25章を参照のこと。任意の前初期遺伝子プロモーター、または血清応答エレメントもしくはC A r G エレメントを含む任意のプロモーターが、本発明の治療用タンパク質の発現を駆動する放射線誘導性プロモーターとして有用な可能性がある。

#### 【0141】

一部の実施形態において、前記プロモーターは熱誘導性プロモーターであり、誘導条件は熱である。導入遺伝子の発現を駆動する熱誘導性プロモーターも、当該分野において広く研究されてきた。H s p 9 0 、H s p 7 0 、H s p 6 0 、H s p 4 0 、およびH s p 1 0 等の熱ショックまたはストレスタンパク質 (H S P) は、熱または他の物理的および化学的ストレスのもとで細胞を保護する重要な役割を担う。熱ショックタンパク質 (H S P) プロモーター、ならびに増殖停止およびDNA損傷 (growth arrest and DNA damage) (G A D D) 1 5 3 プロモーター、等のいくつかの熱誘導性プロモーターが、前臨床試験において試みられてきた。1985年に初めて記載されたヒトh s p 7 0 B 遺伝子のプロモーターは、最も高効率な熱誘導性プロモーターの1つである。Huangらは、h s p 7 0 B - E G F P 、h s p 7 0 B - T N F アルファ、およびh s p 7 0 B - I L 1 2 のコード配列の導入後、腫瘍細胞が熱処理した際に極めて高い導入遺伝子発現を示す一方で、熱処理を行わなかった場合、導入遺伝子の発現は検出されなかったことを報告した。そして、i n v i v o において、マウスのI L 1 2 導入遺伝子 + 热処理群で腫瘍増殖が有意に遅延した (Cancer Res. 60:3435 (2000))。科学者の別のグループは、H S V - t k 自殺遺伝子をh s p 7 0 B プロモーターに連結し、マウス乳癌を有するヌードマウスでこの系を試験した。h s p 7 0 B - H S V t k コード配列を腫瘍に投与し、熱処理したマウスは、熱処理を行わなかった対照と比較して、腫瘍の退縮と有意な生存率の向上を示した (Hum. Gene Ther. 11:2453 (2000))。当該分野で公知のさらなる熱誘導性プロモーターを、例えば*Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*, Fourth Edition CRC Press, Jan. 20<sup>th</sup>, 2015の第25章に見出すことができる。本明細書に議論される任意の熱誘導性プロモーターを用いて本発明の治療用タンパク質の発現を駆動してよい。

#### 【0142】

一部の実施形態において、前記プロモーターは酸化還元状態によって誘導可能である。酸化還元状態によって誘導可能なプロモーターの例は、誘導性プロモーターおよび低酸素誘導性プロモーターを含む。例えば、Post DEらは、H I F 活性化腫瘍細胞における導入遺伝子の発現を特異的かつ強力に誘導する、低酸素誘導性因子 (H I F) 応答性プロモーターを開発した (Gene Ther. 8: 1801-1807 (2001); Cancer Res. 67: 6872-6881 (2007))。

#### 【0143】

一部の実施形態において、前記プロモーターは、前記改変哺乳類細胞の内在性活性化シグナル等の生理学的状態によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞がT細胞である場合、前記プロモーターは、該改変哺乳類細胞の内在性活性化シグナルによって誘導可能なT細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記改変T細胞は、P M A 、イオノマイシン (ionomycin) 、またはフィトヘマグルチニン等の誘導物質によって活性化される。一部の実施形態において、前記改変T細胞は、内在性T細胞受容体または改変受容体 (組換えT C R またはC A R 等) を介した腫瘍細胞上の腫瘍抗原の認識によって活性化される。一部の実施形態において、前記改変T細胞は、免疫チェックポイントの遮断により、例えば該改変T細胞または第2の改変哺乳類細胞によって発現される免疫調節剤により、活性化される。一部の実施形態において、前記T細胞活性化依存プロモーターはI L - 2 プロモーターである。一部の実施形態において、前記T細胞活性化依存プロモーターはN F A T プロモーターである。一部の実施形態において、前記T細胞活性化依存プロモーターはN F B プロモーターである。

#### 【0144】

10

20

30

40

50

どのような理論または仮説にも拘束されるものではないが、IL-2プロモーターからの遺伝子転写によって開始されるIL-2発現はT細胞活性化の主要な活動である。ホルボール12-ミリスチン酸13-アセテート(PMA)、またはイオノマイシン、またはフィトヘマグルチニンによるヒトT細胞の非特異的刺激の結果、刺激されたT細胞からのIL-2分泌が起こる。遺伝子操作されたT細胞における活性化誘導性導入遺伝子発現のため、IL-2プロモーターが研究された(Virology Journal 3:97 (2006))。本願発明者らは、ヒトT細胞株において、IL-2プロモーターが、PMA/PHA-Pによる活性化の存在下で、レポーター遺伝子の発現を開始するのに有効であることを見出した。T細胞受容体刺激は細胞内応答のカスケードを開始し、細胞質カルシウム濃度を上昇させ、その結果NFATおよびNFBの両者の核翻訳(nuclear translation)を引き起こす。活性化T細胞核内因子(Nuclear Factor of Activated T cells)(NFAT)のメンバーは、Tリンパ球の免疫応答を媒介するCa<sup>2+</sup>依存性転写因子である。NFATは、活性化T細胞内の誘導性インターロイキン-2(IL-2)発現にとって重要であることが示されている(Mol Cell Biol. 15(11):6299-310 (1995); Nature Reviews Immunology 5:472-484 (2005))。本願発明者らは、ヒトT細胞株において、NFATプロモーターが、PMA/PHA-P活性化の存在下でレポーター遺伝子の発現を開始するのに有効であることを見出した。核内因子カッパB(NFB)を含む他の経路も、T細胞活性化を介した導入遺伝子発現の制御に用いることができる。

10

20

30

#### 【0145】

CARまたはTCR

上記改変哺乳類細胞のいずれも、細胞表面分子をさらに発現してよい。該細胞表面分子は細胞外ドメインと膜貫通ドメインとを有する。一部の実施形態において、前記細胞表面分子は、さらに、一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび/または共刺激シグナル伝達ドメイン等の、細胞内エフェクタードメインを有する。一部の実施形態において、前記細胞表面分子は内在性分子である。一部の実施形態において、前記細胞表面分子は異種分子である。一部の実施形態において、前記細胞表面分子は改変分子である。一部の実施形態において、前記細胞表面分子は前記改変哺乳類細胞の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記細胞表面分子は、プロモーター(構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター等)に機能的に連結した第2の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記細胞表面分子は、細胞をCELL SQUEEZE(登録商標)等のマイクロ流体システムに通過させながらタンパク質を細胞膜に挿入することによって、前記改変哺乳類細胞に導入される(例えば、米国特許出願公開第20140287509号を参照のこと)。前記細胞表面分子は、例えば該改変哺乳類細胞をターゲティングすることにより、シグナルを変換することにより、および/または該改変哺乳類細胞の細胞毒性を増強することにより、前記改変哺乳類細胞の機能を増強するものであってよい。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、CARまたはTCR等の細胞表面分子を発現しない。

40

#### 【0146】

一部の実施形態において、前記細胞表面分子は、前記改変哺乳類細胞を腫瘍細胞に対してターゲティングする。一部の実施形態において、前記細胞表面分子は、腫瘍細胞の細胞表面受容体のリガンドである。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記ターゲティング分子は、腫瘍抗原に対する抗体断片(scFvまたは単一ドメイン抗体等)を有する。腫瘍抗原の例は、CD19、BCMA、NY-ESO-1、VEGFR2、MAGE-A3、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA、EGFR(EGFRVIII等)、GD2、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、ROR1、WT1、および臨床的に重要な他の腫瘍抗原を含む。一部の実施形態において、前記細胞表面分子は、前記改変哺乳類細胞を、腫瘍細胞にリクルートされた免疫細胞等の腫瘍細胞の微小環境に対してターゲティングする。

50

#### 【0147】

一部の実施形態において、前記細胞表面分子はキメラエフェクター分子である。一部の実施形態において、前記キメラエフェクター分子は、少なくとも1つの腫瘍抗原を標的とする1つまたは複数の特異的結合ドメインと、1つまたは複数の細胞内エフェクタードメイン、例えば1つまたは複数の一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび/または共刺激シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記細胞表面分子はCARまたはTCRではない。

【0148】

一部の実施形態において、前記細胞表面分子はキメラ抗原受容体(CAR)である。本発明のCARは、少なくとも1つの腫瘍抗原に特異的に結合する少なくとも1つのターゲティングドメインを含んだ細胞外ドメインと、膜貫通(TM)ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CAR-T細胞等のCAR含有細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成する。「免疫エフェクター機能または免疫エフェクター応答」とは、標的細胞の免疫攻撃を増強または促進する、免疫エフェクター細胞等による機能または応答のことを表す。例えば、免疫エフェクター機能または応答とは、標的細胞の死滅、または成長もしくは増殖の阻害、を促進するTまたはNK細胞の特性のことを表しうる。免疫エフェクター機能の例は、例えばCAR-T細胞においては、細胞溶解活性(抗体依存性細胞障害、すなわちADCC等)およびヘルパー活性(サイトカイン類の分泌等)を含む。一部の実施形態において、前記CARは、免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記CARは、全長の野生型CD3および任意に1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインを有するCARと比べ、約90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、またはそれ未満、のいずれかの免疫エフェクター機能(標的細胞に対する細胞溶解機能等)しか有しない細胞内シグナル伝達ドメインを有する。一部の実施形態において、前記CAR単独では標的細胞の細胞溶解を誘発しない。一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CAR含有細胞の増殖および/または生存を促進するシグナルを生成する。一部の実施形態において、前記CARは、CD-28、CD137、CD3、CD27、CD40、ICOS、GITR、およびOX40のシグナル伝達ドメインから選択される1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。天然に存在する分子のシグナル伝達ドメインは、該分子の細胞内(すなわち細胞質)部分全体もしくは天然の細胞内シグナル伝達ドメイン全体、またはその断片もしくは誘導体を含みうる。

【0149】

一部の実施形態において、前記CARのターゲティングドメインは、抗体；あるいは、scFv、Fv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、單一ドメイン抗体(sdAb)、VHもしくはVLドメイン、またはVHドメイン、等の抗体断片である。一部の実施形態において、前記CARの1つまたは複数のターゲティングドメインは、特異的に单一の腫瘍抗原に結合する。一部の実施形態において、前記CARは、2つ以上の腫瘍抗原に結合するターゲティングドメインを有する二重特異性または多重特異性CARである。一部の実施形態において、前記腫瘍抗原は、CD19、BCMA、NY-ESO-1、VEGFR2、MAGE-A3、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA、EGFR(EGFR<sub>VIII</sub>等)、GD2、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、ROR1、WT1、および臨床的に重要な他の腫瘍抗原、ならびにこれらの組み合わせ、からなる群より選択される。

【0150】

一部の実施形態において、前記CARの膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ、ベータ、またはゼータ鎖、CD-28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7

10

20

30

40

50

、 N K p 8 0 ( K L R F 1 ) 、 C D 1 6 0 、 C D 1 9 、 I L - 2 R ベータ、 I L - 2 R ガンマ、 I L - 7 R a 、 I T G A 1 、 V L A 1 、 C D 4 9 a 、 I T G A 4 、 I A 4 、 C D 4 9 D 、 I T G A 6 、 V L A - 6 、 C D 4 9 f 、 I T G A D 、 C D 1 1 d 、 I T G A E 、 C D 1 0 3 、 I T G A L 、 C D 1 1 a 、 L F A - 1 、 I T G A M 、 C D 1 1 b 、 I T G A X 、 C D 1 1 c 、 I T G B 1 、 C D 2 9 、 I T G B 2 、 C D 1 8 、 L F A - 1 、 I T G B 7 、 T N F R 2 、 D N A M 1 ( C D 2 2 6 ) 、 S L A M F 4 ( C D 2 4 4 、 2 B 4 ) 、 C D 8 4 、 C D 9 6 ( T a c t i l e ) 、 C E A C A M 1 、 C R T A M 、 L y 9 ( C D 2 2 9 ) 、 C D 1 6 0 ( B Y 5 5 ) 、 P S G L 1 、 C D I O O ( S E M A 4 D ) 、 S L A M F 6 ( N T B - A 、 L y 1 0 8 ) 、 S L A M ( S L A M F 1 、 C D 1 5 0 、 I P O - 3 ) 、 B L A M E ( S L A M F 8 ) 、 S E L P L G ( C D 1 6 2 ) 、 L T B R 、 P A G / C b p 、 N K p 4 4 、 N K p 3 0 、 N K p 4 6 、 N K G 2 D 、 および / または N K G 2 C の膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態において、前記 C A R の膜貫通ドメインは、 C D 4 、 C D 3 、 C D 8 、 または C D - 2 8 膜貫通ドメインである。一部の実施形態において、前記 C A R の膜貫通ドメインは、 C D 8 の膜貫通ドメインを含む。  
10

## 【 0 1 5 1 】

一部の実施形態において、前記ターゲティングドメインは、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続される。一実施形態において、該ヒンジ領域は C D 8 のヒンジ領域を含む。

## 【 0 1 5 2 】

一部の実施形態において、前記 C A R は C D 8 S P 等のシグナルペプチド ( S P ) を含む。  
20

## 【 0 1 5 3 】

一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。「一次細胞内シグナル伝達ドメイン」とは、刺激性の様式で作用して免疫エフェクター機能を誘導する、細胞質シグナル伝達配列のことを表す。一部の実施形態において、前記一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ ( immunoreceptor tyrosine-based activation motif ) 、すなわち I T A M として知られるシグナル伝達モチーフを含む。一部の実施形態において、前記一次細胞内シグナル伝達ドメインは、 C D 3 ゼータ、 C D 3 ガンマ、 C D 3 デルタ、 C D 3 イプシロン、コモン F c R ガンマ ( common FcR gamma ) ( F C E R 1 G ) 、 F c R ベータ ( F c イプシロン R i b ) 、 C D 7 9 a 、 C D 7 9 b 、 F c ガンマ R I I a 、 D A P 1 0 、 および D A P 1 2 からなる群より選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記一次細胞内シグナル伝達ドメインは、 C D 3 ゼータ、 C D 3 ガンマ、 C D 3 デルタ、 C D 3 イプシロン、コモン F c R ガンマ ( F C E R 1 G ) 、 F c R ベータ ( F c イプシロン R i b ) 、 C D 7 9 a 、 C D 7 9 b 、 F c ガンマ R I I a 、 D A P 1 0 、 および D A P 1 2 からなる群より選択されるタンパク質の非機能的または減弱化シグナル伝達ドメインを含む。該非機能的または減弱化シグナル伝達ドメインは、抗体依存性細胞障害 ( A D C C ) を含む細胞溶解活性またはヘルパー活性等の、 1 つまたは複数の免疫エフェクター機能を減弱化または無効化する、点突然変異、挿入、または欠失を有する変異シグナル伝達ドメインでありうる。一部の実施形態において、前記 C A R は、非機能的または減弱化 C D 3 ゼータ ( すなわち C D 3 または C D 3 z ) シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。本明細書において、一次細胞内シグナル伝達ドメインを有しない、または非機能的もしくは減弱化一次細胞内シグナル伝達ドメインを有する C A R を、「短縮型 C A R 」という。野生型一次細胞内シグナル伝達ドメインを有する以外は同一の構成を持つ C A R と比べ、減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメインは、約 9 0 % 、 8 0 % 、 7 0 % 、 6 0 % 、 5 0 % 、 4 0 % 、 3 0 % 、 2 0 % 、 1 0 % 、 またはそれ未満、のいずれかの免疫エフェクター機能 ( 標的細胞に対する細胞溶解機能等 ) しか誘導しないものであってよい。短縮型 C A R を発現する改変細胞単独で標的細胞の細胞溶解を  
30  
40  
50

誘導することができなくともよい。短縮型CARを有する改変細胞は、on-target off-cancer毒性等の毒性および副作用が減少したものであってよい。

#### 【0154】

一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは1つまたは複数（例えば1個、2個、もしくは3個のいずれか、またはそれ以上）の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。「共刺激シグナル伝達ドメイン」は共刺激分子の細胞内部分でありうる。「共刺激分子」という語は、共刺激リガンドに特異的に結合し、増殖および生存等であるが限定されない免疫細胞による共刺激応答を媒介する、該免疫細胞（T細胞等）上の同族の（cognate）結合パートナーのことを表す。共刺激分子は、効率的な免疫応答に貢献する、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子である。共刺激分子の代表的なタンパク質ファミリーは次の通りである：TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（signaling lymphocytic activation molecules）（SLAMタンパク質）、および活性化NK細胞受容体（activating NK cell receptors）。共刺激分子の例は、MHCクラスI分子、BTLA、およびTollリガンド受容体、ならびにOX40、CD27、CD-28、CD5、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、ICOS（CD278）、および4-1BB（CD137）を含むが、これらに限定されない。このような共刺激分子のさらなる例は、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHT）、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、NKP44、NKP30、NKP46、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、およびCD19a；ならびに、CD83に特異的に結合するリガンドを含む。

#### 【0155】

一部の実施形態において、前記CARは、単一の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記CARは、2つまたはそれ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、機能的一次細胞内シグナル伝達ドメインと、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。一部の実施形態において、前記CARは、短縮型CARである。一部の実施形態において、前記CARは、機能的一次細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3等）を含まない。一部の実施形態において、前記CARは、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインからなる、または本質的になる、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記CARは、非機能的または減弱化一次細胞内シグナル伝達ドメイン（変異CD3等）と、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインと、からなる、または本質的になる、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。前記CARの共刺激シグナル伝達ドメインは、前記ターゲティングドメインの腫瘍抗原への結合の際、該CARを有する改変細胞（T細胞等）の、強化された増殖、生存、および分化のためのシグナルを伝達し、活性化誘導細胞死（activation induced cell death）を阻害するものであってよい。一部の実施形態において、前記共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27、CD-28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（lymphocyte function-associated antigen-1）（LFA-1）、CD2、

10

20

30

40

50

CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、Nkp80(KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、Nkp44、Nkp30、Nkp46、またはNKG2Dの1つまたは複数から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。  
10

#### 【0156】

一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD137の細胞質ドメイン等のCD137の機能的シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータの機能的一次シグナル伝達ドメインと、CD137の機能的シグナル伝達ドメインとを含む。一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータの非機能的または減弱化一次シグナル伝達ドメインと、CD137の機能的シグナル伝達ドメインとを含む。一部の実施形態において、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD137の機能的シグナル伝達ドメインからなる、または本質的になる。  
20

#### 【0157】

一部の実施形態において、前記CARは、CD8 SP、腫瘍抗原(EGFRvIIなど)のEGFR、NY-ESO-1、またはBCMA等)に特異的に結合するターゲティングドメイン、CD8 ヒンジおよび膜貫通ドメイン、CD137細胞質ドメイン、ならびにCD3 を含む。一部の実施形態において、前記CARは、CD8 SP、腫瘍抗原(EGFRvIIなど)のEGFR、NY-ESO-1、またはBCMA等)に特異的に結合するターゲティングドメイン、CD8 ヒンジおよび膜貫通ドメイン、ならびにCD137細胞質ドメインを含む。  
30

#### 【0158】

当該分野では多数のキメラ抗原受容体が公知であり、本発明の改変哺乳類細胞にとって適したものである可能性がある。CARはまた、抗体分子等の抗原結合断片または抗体可変領域を利用することにより、任意の細胞表面マーカーに対する特異性を有するように構築されうる。本明細書においては、CARを製造するための任意の方法を使用してよい。例えば、米国特許第6,410,319号、米国特許第7,446,191号、米国特許第7,514,537号、WO2002/077029、WO2015/142675、US2010/065818、US2010/025177、US2007/059298、およびBerger C. et al., J. Clinical Investigation 118: 1294-308 (2008)を参考のこと(これらは参考により本明細書に組み込まれるものとする)。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はCAR-T細胞である。  
40

#### 【0159】

従って、一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類(ヒト等)免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変哺乳類免疫細胞がさらにCARを発現する、改変哺乳類免疫細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、またはNK細胞である。一部の実施形態におい  
50

て、前記プロモーターは、例えば C A R の細胞内シグナル伝達ドメイン等による、誘導性である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤 ( C T L A - 4 の阻害剤または P D - 1 の阻害剤等 ) である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体 ( 全長抗体、 s c F v 、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、または F a b 等 ) である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質 ( 第 2 の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤 ; または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等 ) をコードする第 2 の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 1 5 、 I L - 2 1 、 I L - 1 2 、 C C R 4 、 C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、 C D 1 3 7 L 、 L E M 、および B c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記 C A R は、第 2 のプロモーターに機能的に連結した第 3 の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは、例えば、誘導物質 ( 例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等 ) 、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改变哺乳類免疫細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤 ( 免疫チェックポイント阻害剤等 ) をコードする異種核酸と前記 C A R をコードする異種核酸とは、 h E F 1 などの構成的プロモーター等の、同一のプロモーターに機能的に連結する。一部の実施形態において、前記 C A R は、 C D 1 9 、 B C M A 、 C D 2 0 、 C D 2 2 、 C D 3 3 、 C D 3 8 、 C E A 、 E G F R ( E G F R v I I I 等 ) 、 G D 2 、 H E R 2 、 I G F 1 R 、メソテリン、 P S M A 、 R O R 1 、および W T 1 からなる群より選択される腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記 C A R は、前記改变哺乳類免疫細胞が腫瘍細胞に結合した際に、および該改变哺乳類免疫細胞による免疫調節剤の分泌の際に、免疫細胞 ( 該改变哺乳類免疫細胞を含む ) の細胞溶解機能、サイトカイン分泌、および / または増殖を引き起こす。一部の実施形態において、前記 C A R は、免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記 C A R は、短縮型 C A R である。一部の実施形態において、前記 C A R は、一次細胞内シグナル伝達ドメイン ( C D 3 等 ) を含まない。一部の実施形態において、前記 C A R は、非機能的な、または減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメイン ( 変異 C D 3 等 ) を含む。一部の実施形態において、前記 C A R 単独では標的細胞の細胞溶解を誘発しない。

#### 【 0 1 6 0 】

一部の実施形態において、 a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改变哺乳類 ( ヒト等 ) C A R - T 細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改变哺乳類 C A R - T 細胞 ; および b ) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記プロモーターは、例えば C A R の細胞内シグナル伝達ドメイン等によって、誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤 ( C T L A - 4 の阻害剤または P D - 1 の阻害剤等 ) である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体 ( 全長抗体、 s c F v 、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、または F a b 等 ) である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質 ( 第 2 の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤 ; または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等 ) をコードする第 2 の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 1 5 、 I L - 2 1 、 I L - 1 2 、 C C R 4 、 C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、 C D 1 3 7 L 、 L E M 、および B c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記 C A R は、第 2 のプロモーターに機能的に連結した第 3 の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは、例えば、誘導物質 ( 例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等 )

）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類CAR-T細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤（免疫チェックポイント阻害剤等）をコードする異種核酸と前記CARをコードする異種核酸とは、hEF1などの構成的プロモーター等の、同一のプロモーターに機能的に連結する。一部の実施形態において、前記CARは、CD19、BCMA、NY-ESO-1、VEGFR2、MAGE-A3、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA、EGFR（EGFRvIII等）、GD2、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、ROR1、およびWT1からなる群より選択される腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記CARは、前記改変哺乳類CAR-T細胞が腫瘍細胞に結合した際に、および該改変哺乳類CAR-T細胞による免疫調節剤の分泌の際に、免疫細胞（例えば該改変哺乳類CAR-T細胞）の細胞溶解機能、サイトカイン分泌、および/または増殖を引き起す。一部の実施形態において、前記CARは、免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記CARは短縮型CARである。一部の実施形態において、前記CARは一次細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3等）を含まない。一部の実施形態において、前記CARは、非機能的な、または減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメイン（変異CD3等）を含む。一部の実施形態において、前記CAR単独では標的細胞の細胞溶解を誘発しない。

10

#### 【0161】

一部の実施形態において、前記細胞表面分子はT細胞受容体である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞がT細胞である場合、該T細胞受容体は内在性T細胞受容体である。一部の実施形態において、前記TCRを有する改変哺乳類細胞は前選択される（pre-selected）。一部の実施形態において、前記T細胞受容体は組換えTCRである。一部の実施形態において、前記TCRは腫瘍抗原に対して特異的である。一部の実施形態において、前記腫瘍抗原は、CD19、BCMA、NY-ESO-1、VEGFR2、MAGE-A3、VEGFR2、MAGE-A3、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA、EGFR（EGFRvIII等）、GD2、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、ROR1、WT1、および臨床的に重要な他の腫瘍抗原からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記腫瘍抗原は腫瘍細胞の細胞内タンパク質に由来する。腫瘍抗原（腫瘍関連抗原を含む）に対して特異的なTCRは多数記載されており、それらの例は、NY-ESO-1癌精巣抗原、p53腫瘍抑制抗原、ならびに、メラノーマ（MART1、gp100等）、白血病（WT1、副組織適合抗原等）、および乳癌（HER2、NY-BR1等）の腫瘍抗原に対するTCRを含む。本出願においては、当該分野で公知の任意のTCRを用いてよい。一部の実施形態において、前記TCRは腫瘍抗原に対して増強された親和性を有する。TCRの例、および該TCRを哺乳類細胞に導入する方法は、例えば、米国特許第5830755号およびKessels et al. Immunotherapy through TCR gene transfer. Nat. Immunol. 2, 957-961 (2001)に記載されている。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞はTCR-T細胞である。

20

30

#### 【0162】

従って、一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変哺乳類免疫細胞がさらにTCRを発現する、改変哺乳類免疫細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はPBM或はT細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、例えばTCRの細胞内シグナル伝達ドメイン等によって、誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、scFv、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳

40

50

類免疫細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記TCRは、第2のプロモーターに機能的に連結した第3の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは、例えば、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類免疫細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記TCRは、CD19、BCMA、NY-ESO-1、VEGFR2、MAGE-A3、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA、EGFR（EGFRvIII等）、GD2、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、ROR1、およびWT1からなる群より選択される腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記TCRは、前記改変哺乳類免疫細胞が腫瘍細胞に結合した際に、および該改変哺乳類免疫細胞による免疫調節剤の分泌の際に、免疫細胞（例えば該改変哺乳類免疫細胞）の細胞溶解機能、サイトカイン分泌、および／または増殖を引き起こす。一部の実施形態において、前記TCRは免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記CAR単独では標的細胞の細胞溶解を誘発しない。

10

20

30

40

【0163】  
一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）TCR-T細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類TCR-T細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記プロモーターは、例えばTCRの細胞内シグナル伝達ドメイン等によって、誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTL4-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、scFv、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類TCR-T細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記TCRは、第2のプロモーターに機能的に連結した第3の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは、例えば、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類TCR-T細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記TCRは、CD19、BCMA、NY-ESO-1、VEGFR2、MAGE-A3、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA、EGFR（EGFRvIII等）、GD2、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、ROR1、およびWT1からなる群より選択される腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記TCRは、前記改変哺乳類TCR-T細胞が腫瘍細胞に結合した際に、および該改変哺乳類TCR-T細胞による免疫調節剤の分泌の際に、免疫細胞（例えば該改変哺乳類TCR-T細胞）の細胞溶解機能、サイトカイン分泌、および／または増殖を引き起こす。一部の実施形態において、前記TCRは免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記TCR単独では標的細胞の

50

細胞溶解を誘発しない。

【0164】

一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらにCARおよび組換えTCRの両者を発現する。

【0165】

一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらにCARまたはTCRを発現し、前記免疫調節剤のためのプロモーターは該CARまたは該TCRの細胞内シグナル伝達ドメインによって誘導可能である。一部の実施形態において、前記プロモーターはT細胞活性化依存プロモーターである。例えば、本発明の改変CAR-TまたはTCR-T細胞は、腫瘍細胞上の腫瘍抗原への結合の際、該CARまたはTCRの細胞内シグナル伝達ドメインを介した活性化シグナルの伝達を行ってよい。該活性化シグナルは、次いで免疫チェックポイント阻害剤をコードする核酸に機能的に連結したプロモーターを誘導し、腫瘍部位において該改変CAR-TまたはTCR-T細胞による該免疫チェックポイント阻害剤の分泌を増加させるものであってよい。免疫チェックポイントの遮断によって、さらに該CAR-TおよびTCR-T細胞が活性化され、腫瘍細胞に対するそれらの細胞毒性が増強され、同時に該CAR-TおよびTCR-T細胞の増殖が誘導され、ケモカインおよびサイトカインの放出が刺激され、それによってさらに内在性T細胞と他の免疫細胞が前記腫瘍部位にリクルートされる。結果として、前記改変T細胞のCARまたはTCRと、前記免疫チェックポイント阻害剤をコードする異種遺伝子が、前記腫瘍部位における局所免疫応答を増強することのできる正のフィードバックループを形成する。CAR誘導性プロモーターに機能的に連結した免疫チェックポイント阻害剤をコードする異種核酸と、構成的プロモーターに機能的に連結したCARをコードする第2の異種核酸と、を含む改変哺乳類細胞であって、該免疫チェックポイント阻害剤が、腫瘍細胞上に発現した抑制性免疫チェックポイント分子を遮断する、改変哺乳類細胞の例を、図5に示す。CAR誘導性プロモーターに機能的に連結した免疫チェックポイント阻害剤をコードする異種核酸と、構成的プロモーターに機能的に連結したCARをコードする第2の異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、該免疫チェックポイント阻害剤が、該改変哺乳類細胞および非改変免疫細胞上に発現した抑制性免疫チェックポイント分子を遮断する、改変哺乳類細胞の例を、図6に示す。

【0166】

従って、一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類(ヒト等)CAR-T細胞であって、前記異種核酸がT細胞活性化依存プロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類CAR-T細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記T細胞活性化依存プロモーターは、IL-2プロモーター、NFATプロモーター、およびNF-Bプロモーターから選択される。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤(CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等)である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体(全長抗体、scFv、単一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等)である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類CAR-T細胞は、さらに、治療用タンパク質(第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等)をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBc1-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記CARは、第2のプロモーターに機能的に連結した第3の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは、例えば、誘導物質(例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等)、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類CAR-T細胞の活性化状態、から

10

20

30

40

50

選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記CARは、CD19、BCMA、NY-ESO-1、VEGFR2、MAGE-A3、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA、EGFR(EGFRvIII等)、GD2、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、ROR1、およびWT1からなる群より選択される腫瘍抗原を標的とする。

#### 【0167】

一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類(ヒト等)TCR-T細胞であって、前記異種核酸がT細胞活性化依存プロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類TCR-T細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記T細胞活性化依存プロモーターは、IL-2プロモーター、NFATプロモーター、およびNFBプロモーターから選択される。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤(CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等)である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体(全長抗体、scFv、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等)である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類TCR-T細胞は、さらに、治療用タンパク質(第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等)をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBc1-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記TCRは、第2のプロモーターに機能的に連結した第3の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは、例えば、誘導物質(例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等)、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類TCR-T細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記TCRは、CD19、BCMA、NY-ESO-1、VEGFR2、MAGE-A3、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA、EGFR(EGFRvIII等)、GD2、HER2、IGF1R、メソテリン、PSMA、ROR1、およびWT1からなる群より選択される腫瘍抗原を標的とする。

#### 【0168】

一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞により発現される細胞表面分子(CARおよびTCR等)は、1つまたは複数の腫瘍抗原を標的とする。腫瘍抗原は免疫応答、特にT細胞媒介性免疫応答を誘発しうる、腫瘍細胞によって產生されるタンパク質である。本発明の標的抗原の選択は、治療すべき具体的な種類の癌に依存するであろう。腫瘍抗原の例は、例えば、グリオーマ関連抗原、癌胎児性抗原(CEA)、-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン( AFP)、レクチン反応性 AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MN-CAX、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、mut-hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ(prostase)、前立腺特異抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン(protein)、PSMA、HER2/neu、サバイビン(survivin)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、ephrinB2、CD22、インシュリン増殖因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受容体、ならびにメソテリンを含む。

#### 【0169】

一部の実施形態において、前記腫瘍抗原は、悪性腫瘍と関連した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なりうるタンパク質を多数発現する。これらの分子は、メラノーマにおけるMART-1、チロシナーゼ、およびgp100や、前立腺癌における前立腺酸性フォスファターゼ(PAP)および前立腺

10

20

30

40

50

特異抗原（P S A）等の、組織特異的抗原を含むが、これらに限定されない。別の標的分子は、癌遺伝子H E R 2 / N e u / E r b B - 2 等の形質転換関連分子（transformation-related molecules）のグループに属する。標的抗原のさらなる別のグループは、癌胎児性抗原（C E A）等の腫瘍胎児性抗原である。B細胞リンパ腫においては、腫瘍特異的イディオタイプ免疫グロブリンが、個々の腫瘍に固有の、真に腫瘍特異的な（truly tumor-specific）免疫グロブリン抗原を構成する。C D 1 9、C D 2 0、およびC D 3 7等のB細胞分化抗原は、B細胞リンパ腫における標的抗原のための他の候補である。

#### 【0170】

一部の実施形態において、前記腫瘍抗原は、腫瘍特異抗原（T S A）または腫瘍関連抗原（T A A）である。T S Aは腫瘍細胞に固有であり、体内的他の細胞上には存在しない。T A A関連抗原は腫瘍細胞に固有ではなく、該抗原に対する免疫寛容状態の誘導に失敗する条件下で正常細胞上にも発現する。腫瘍上での前記抗原の発現は、免疫系が該抗原に応答することを可能にする条件下で起こりうる。T A Aは、免疫系が未熟で応答が不可能な胎児発生の途中で正常細胞上に発現する抗原であってもよく、あるいは、正常細胞上に通常極めて低レベルで存在するが、腫瘍細胞上には非常に高いレベルで発現する抗原であってもよい。

10

#### 【0171】

T S AまたはT A A抗原の限定されない例は、次のものを含む：M A R T - 1 / M e l a n A（M A R T - I）、g p 1 0 0（P m e l 1 7）、チロシナーゼ、T R P - 1、T R P - 2等の分化抗原、および、M A G E - 1、M A G E - 3、B A G E、G A G E - 1、G A G E - 2、p 1 5等の腫瘍特異的多系列抗原（tumor-specific multilineage antigens）；C E A等の過剰発現胎児性抗原；p 5 3、R a s、H E R 2 / n e u等の過剰発現腫瘍遺伝子および変異腫瘍抑制遺伝子；染色体転座の結果生ずる固有の腫瘍抗原；B C R - A B L、E 2 A - P R L、H 4 - R E T、I G H - I G K、M Y L - R A Rなど；ならびに、エピスタン・バーウイルス抗原E B V Aならびにヒトパピローマウイルス（H P V）抗原E 6およびE 7等のウイルス抗原。他の大型の、タンパク質に基づいた抗原の例は、T S P - 1 8 0、M A G E - 4、M A G E - 5、M A G E - 6、R A G E、N Y - E S O、p 1 8 5 e r b B 2、p 1 8 0 e r b B - 3、c - m e t、n m - 2 3 H I、P S A、T A G - 7 2、C A 1 9 - 9、C A 7 2 - 4、C A M 1 7 . 1、N u M a、K - r a s、ベータカテニン、C D K 4、M u m - 1、p 1 5、p 1 6、4 3 - 9 F、5 T 4、7 9 1 T g p 7 2、アルファ - フェトプロテイン、ベータ - H C G、B C A 2 2 5、B T A A、C A 1 2 5、C A 1 5 - 3 \ C A 2 7 . 2 9 \ B C A A、C A 1 9 5、C A 2 4 2、C A - 5 0、C A M 4 3、C D 6 8 \ P 1、C O - 0 2 9、F G F - 5、G 2 5 0、G a 7 3 3 \ E p C A M、H T g p - 1 7 5、M 3 4 4、M A - 5 0、M G 7 - A g、M O V 1 8、N B / 7 0 K、N Y - C O - 1、R C A S 1、S D C C A G 1 6、T A - 9 0 \ M a c - 2 結合タンパク質 \ シクロフィリンC関連タンパク質、T A A L 6、T A G 7 2、T L P、およびT P Sを含む。

20

30

#### 【0172】

一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞によって発現される前記細胞表面分子（C A RまたはT C R等）の標的となる腫瘍抗原は、E G F Rである。

40

#### 【0173】

従って、一部の実施形態において、a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）C A R - T細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変C A R - T細胞がE G F Rを標的とするC A Rを発現する、改変哺乳類C A R - T細胞；およびb ) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C T L A - 4の阻害剤またはP D - 1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等）である。一部の実施形態において、前記改変C A R

50

- T 細胞は、さらに、治療用タンパク質（第 2 の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第 2 の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は I L - 2、I L - 7、I L - 15、I L - 21、I L - 12、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記C A R は、第 2 のプロモーターに機能的に連結した第 3 の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは、例えば、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類C A R - T 細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤（免疫チェックポイント阻害剤等）をコードする異種核酸と前記C A R をコードする異種核酸とは、h E F 1 などの構成的プロモーター等の、同一のプロモーターに機能的に連結する。一部の実施形態において、前記C A R は、前記改変哺乳類C A R - T 細胞が腫瘍細胞に結合した際に、および該改変C A R - T 細胞による免疫調節剤の分泌の際に、該改変C A R - T 細胞を含むT 細胞の細胞溶解機能、サイトカイン分泌、および／または増殖を引き起こす。一部の実施形態において、前記C A R は免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記C A R は短縮型C A R である。一部の実施形態において、前記C A R は一次細胞内シグナル伝達ドメイン（C D 3 等）を含まない。一部の実施形態において、前記C A R は、非機能的な、または減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメイン（変異C D 3 等）を含む。一部の実施形態において、前記C A R 単独では標的細胞の細胞溶解を誘発しない。一部の実施形態において、前記医薬組成物はN S C L C 等の肺癌を治療するのに有用である。

#### 【 0 1 7 4 】

一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞によって発現される前記細胞表面分子（C A R またはT C R 等）の標的となる腫瘍抗原は、E G F R v I I I である。E G F R v I I I は上皮成長因子受容体の変異型であり、アミノ末端近傍のエクソン2～7の801塩基対のインフレーム消失によって特徴付けられる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、E G F R v I I I を標的とするC A R を発現する。

#### 【 0 1 7 5 】

膠芽腫（G B M）は成人における原発性悪性脳腫瘍の最も一般的な種類であり、依然として最も致死的な癌の一つである。外科的切除、化学療法、および放射線療法を含む集学的療法による治療を受けても、患者の全生存率中央値は15ヶ月に過ぎない。上皮成長因子受容体バリアントI I I (E G F R v I I I )は、G B M上の最も興味深い腫瘍特異抗原の1つである。E G F R v I I I は、野生型E G F R 受容体のインフレーム消失変異体である。E G F R v I I I は、G B M細胞表面および各種の癌にのみ発現するが、正常組織および正常細胞上には発現しない。Miao H et al (2014)の報告では、E G F R v I I I に対するC A R - T がG B Mの治療において大きな潜在的 possibility を有することが示された。

#### 【 0 1 7 6 】

従って、一部の実施形態において、a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）C A R - T 細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変C A R - T 細胞がE G F R v I I I を標的とするC A R を発現する、改変哺乳類C A R - T 細胞；およびb ) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C T L A - 4 の阻害剤またはP D - 1 の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b 等）である。一部の実施形態において、前記改変C A R - T 細胞は、さらに、治療用タンパク質（第 2 の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤

10

20

30

40

50

；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記CARは、第2のプロモーターに機能的に連結した第3の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは、例えば、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類CAR-T細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤（免疫チェックポイント阻害剤等）をコードする異種核酸と前記CARをコードする異種核酸とは、hEF1などの構成的プロモーター等の、同一のプロモーターに機能的に連結する。一部の実施形態において、前記CARは、前記改変哺乳類CAR-T細胞が腫瘍細胞に結合した際に、および該改変CAR-T細胞による免疫調節剤の分泌の際に、該改変CAR-T細胞を含むT細胞の細胞溶解機能、サイトカイン分泌、および／または増殖を引き起こす。一部の実施形態において、前記CARは免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記CARは短縮型CARである。一部の実施形態において、前記CARは一次細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3等）を含まない。一部の実施形態において、前記CARは、非機能的な、または減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメイン（変異CD3等）を含む。一部の実施形態において、前記CAR単独では標的細胞の細胞溶解を誘発しない。一部の実施形態において、前記医薬組成物は膠芽腫の治療に有用である。

10

20

#### 【0177】

一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞（CAR-T等）は、さらに1つまたは複数（例えば1個、2個、もしくは3個のいずれか、またはそれ以上）の、T細胞の持続および／または組織ホーミングなどのT細胞機能を促進する免疫賦活剤を発現する。免疫賦活剤とその例示される機能のリストを表1に示す。

#### 【0178】

## 【表1】

表1. 免疫賦活剤の例とその機能

免疫賦活剤	T細胞機能における役割
IL-2	IL-2は、特定の未熟T細胞の、制御性T細胞への分化を促進することができる。IL-2は、Tregの発生と維持において重要な役割を担う。IL-2はまた、始原T細胞 (initial T cell) が抗原で刺激された際に、T細胞のエフェクターT細胞への、およびメモリーT細胞への分化を促進することもできる。
IL-7	IL-7は、ナイーブおよびメモリーCD4 <sup>+</sup> 、CD8 <sup>+</sup> T細胞の恒常性を媒介することができる。IL-7はまた、血液悪性腫瘍 (急性リンパ性白血病、T細胞リンパ腫) を促進することもできる。
IL-15	IL-15はCD8 <sup>+</sup> Tmemの維持にとって重要であり、NK細胞毒性を強化することができる。IL-7およびIL-15は免疫応答の各段階で働き、T細胞の増殖と生存を促進することができる。そのようにして、安定で保護的な、長寿命のメモリーCD8 <sup>+</sup> T細胞プールを増殖および維持することが可能である。
IL-21	IL-21はT (effs) の維持を促進することができる。
IL-12	IL-12およびIL-15と共に培養したUCB由来T細胞は、固有のセントラルメモリー/エフェクター表現型で150倍を超える増殖を引き起こすことができる。
CCR4	CCR4を共発現するCAR-Tは、抗CD30 CAR-Tの改善されたホーミングを有しうる。
CCR2b	ケモカイン受容体CCR2bの発現は、GD2キメラ抗原受容体T細胞の腫瘍への輸送 (trafficking) を強化することができる。
ヘパラナーゼ	ヘパラナーゼは、CARリダイレクトTリンパ球 (CAR-redirected T-lymphocytes) の腫瘍浸潤と抗腫瘍活性を促進する。
CD137L	腫瘍壞死因子リガンドスーパーファミリーメンバー9であり、長期CD8 <sup>+</sup> T細胞増殖を支持する。
LEM	LEMは、ミトコンドリア呼吸に対する効果を介してCD8 <sup>+</sup> T細胞免疫を促進する。
Bcl-2	Bcl-2を過剰発現するT細胞はアポトーシスに耐性でありうる。

10

20

30

40

## 【0179】

例えば、多数のサイトカイン類が、T細胞の発生、分化、および恒常性に潜在的に影響することが報告されている (Blood (2010) 115: 17)。IL-2、IL-7、IL-15、およびIL-21は、そのヘテロマー受容体が共通鎖 (c) を共有する、サイトカインファミリーのメンバーである。各サイトカインはT細胞増殖因子として記載され、それぞれT細胞の抗腫瘍免疫応答を増強させるために用いられてきた (特にIL-2)。しかし、より細かいレベルでは、各サイトカインは非冗長な機能を有し、それによって引き起こされるT細胞応答には差異がある。IL-2は制御性T細胞の発生と維持に重要な役割を担い、この機能は他のc-サイトカイン類には共有されていない。IL-7はナイーブならびにメモリーCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞の恒常性を媒介する。IL-15はCD8<sup>+</sup>メモリーT細胞サブセットの維持に必須である。T細胞媒介腫瘍免疫におけるIL-21の役割はそれほど明確には定義されていないが、単一因子としての、またはIL-15との相乗的な組み合わせにおける、抗腫瘍効果を示す報告がある。IL-15およびIL-21も、異なるメカニズムを介してT細胞の長期維持を促進しうる。また、IL-12およびIL-15と共に培養したUCB由来T細胞が、固有のセントラルメモリー/エフェクター表現型で150倍を超える増殖を引き起こしたことを示す報告もある (Leukemia (2015) 29: 415-422)。さらに、LEMはミトコンドリア呼吸に対する効果を介してCD8<sup>+</sup> T細胞免疫を促進し (Science (2015) 348(6238): 995-1001)、ヘパラナーゼはCARリダイレクトTリンパ球 (CAR-redirected T-lymphocytes) の腫瘍浸潤と抗腫瘍活性を促進する (Nat. Med. (2015) 21(5): 524-529)。

## 【0180】

腫瘍部位への組織ホーミングまたはT細胞遊走も、特に固形腫瘍のための、養子T細胞

50

療法にとって極めて重要である。少なくとも 2 種のケモカイン受容体が、C A R - T 細胞の腫瘍細胞への輸送 (trafficking) の強化を可能にすることが報告されている。John A Craddockらは、C C R 2 b 発現活性化 T 細胞 (A T C) が、C C R 2 陰性 A T C との比較において、C C L 2 分泌神経芽細胞腫への改善されたホーミング (10 倍超) を示すことを報告した (J. Immunother. (2010) 33(8):780-788)。Antonio Di Stasiらは、C C R 4 と、C D 3 0 を標的とするキメラ抗原受容体とを共発現する T リンパ球は、ホジキン腫瘍モデルにおいて改善されたホーミングおよび抗腫瘍活性を有することを報告した (Blood (2009) 113(25))。

#### 【 0 1 8 1 】

活性化誘導細胞死 (A I C D) は、F a s 受容体 (F a s、C D 9 5) と F a s リガンド (F a s L、C D 9 5 リガンド) との相互作用によって引き起こされるプログラム細胞死の過程である。A I C D は、c - M y c のダウンレギュレーションおよびC F L A R (カスパーゼおよびF A D D 様アポトーシス調節因子 (caspase and FADD-like apoptosis regulator)) の過剰発現によって遮断することができる。B c l - x L は、プロアポトーシス条件下の *in vitro* リンパ球生存を促進する (Gene Therapy (2002) 9: 527-535)。他の報告によれば、B c l - 2 の過剰発現は、腫瘍特異的な T 細胞の生存を強化することが分かった (Cancer Res (2005) 65(5):2001-2008)。

#### 【 0 1 8 2 】

本明細書に記載の免疫賦活剤のいずれか 1 つまたは複数をさらに改変し、キメラエフェクター分子 (C A R またはT C R 等) と同一のまたは異なるベクター上で上記改変哺乳類細胞により共発現されるようにすることによって、該改変哺乳類細胞の標的細胞への結合で引き起こされる免疫応答を増強するようにしてもよい。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤および / または前記 1 つまたは複数の免疫賦活剤、ならびに前記キメラエフェクター分子 (C A R またはT C R 等) は、異なるプロモーターに駆動される異なる異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤および / または前記 1 つまたは複数の免疫賦活剤、ならびに前記キメラエフェクター分子 (C A R またはT C R 等) は、同一のプロモーターに駆動されるポリシストロニックな核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターは h E F 1 プロモーターである。一部の実施形態において、免疫調節剤、C A R (またはT C R)、および任意に他の治療用タンパク質、をコードする单一のベクターを含む改変哺乳類細胞を含む、医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、免疫調節剤、C A R (またはT C R)、および任意に他の治療用タンパク質、をコードする单一の異種核酸を含んだ改変哺乳類細胞であって、前記单一の異種核酸が同一のプロモーターに機能的に連結された改変哺乳類細胞、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、免疫調節剤、C A R (またはT C R)、および任意に他の治療用タンパク質、をコードする单一のベクターまたは单一の異種核酸を医薬組成物において使用することは、例えば、改善された薬効、均質性、および低コストといったいくつかの利点を有する。

#### 【 0 1 8 3 】

従って、一部の実施形態において、a ) 免疫チェックポイント阻害剤 (單一ドメイン抗体等) および / または免疫賦活剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類 (ヒト等) C A R - T 細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変 C A R - T 細胞がC A R を発現する、改変哺乳類 C A R - T 細胞 ; および b ) 藥理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記異種核酸は免疫チェックポイント阻害剤と免疫賦活剤の両者をコードする。一部の実施形態において、前記異種核酸は少なくとも 2 個の免疫賦活剤をコードする。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A - 4、B L T A、T I M - 3、またはL A G - 3 からなる群より選択される免疫チェックポイント分子の阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は抗

10

20

30

40

50

体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等）である。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記CARは、EGFRvIII等のEGFR、BCMA、またはNY-ESO-1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変CAR-T細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記CARは、前記プロモーターに機能的に連結した異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記CARは、第2のプロモーターに機能的に連結した第2の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記プロモーターおよび／または前記第2のプロモーターは、h E F 1 プロモーター等の構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターおよび／または第2のプロモーターは、例えば、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類CAR-T細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記CARは、前記改変哺乳類CAR-T細胞が腫瘍細胞に結合した際に、および該改変CAR-T細胞による免疫調節剤の分泌の際に、該改変CAR-T細胞を含むT細胞の細胞溶解機能、サイトカイン分泌、および／または増殖を引き起こす。一部の実施形態において、前記CARは免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記CARは短縮型CARである。一部の実施形態において、前記CARは一次細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3 等）を含まない。一部の実施形態において、前記CARは、非機能的な、または減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメイン（変異CD3 等）を含む。一部の実施形態において、前記CAR単独では標的細胞の細胞溶解を誘発しない。一部の実施形態において、前記CARは、CD8 S P、腫瘍抗原（EGFRvIIIなどのEGFR、BCMA、またはNY-ESO-1等）に特異的に結合するターゲティングドメイン、CD8 ヒンジおよび膜貫通ドメイン、ならびにCD137細胞質ドメインを含む。

#### 【0184】

一部の実施形態において、a) 免疫チェックポイント阻害剤および／または免疫賦活剤ならびにCARをコードするベクターを含む改変哺乳類（ヒト等）免疫細胞；およびb) 藥理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記ベクターは、前記免疫チェックポイント阻害剤、前記免疫賦活剤、および前記CARをコードする。一部の実施形態において、前記ベクターは、少なくとも2個の免疫賦活剤をコードする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、またはNK細胞である。一部の実施形態において、前記ベクターは、前記免疫チェックポイント阻害剤をコードする第1の核酸と前記CARをコードする第2の核酸とを含み、前記第1の核酸と前記第2の核酸は同一のプロモーターに機能的に連結されている。一部の実施形態において、前記ベクターは、前記免疫チェックポイント阻害剤をコードする第1の核酸と前記CARをコードする第2の核酸とを含み、前記第1の核酸と前記第2の核酸は異なるプロモーターに機能的に連結されている。一部の実施形態において、前記プロモーターは、h E F 1 プロモーター等の構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、IL-2プロモーター、NFATプロモーター、またはNF Bプロモーター等の、T細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、BLTA、TIM-3、またはLAG-3からなる群より選択される免疫チェックポイント分子の阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等）である。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、C

10

20

30

40

50

C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記C A Rは、E G F R v I I I 等のE G F R、B C M A、またはN Y - E S O - 1 等の腫瘍抗原を標的とする。

#### 【0185】

一部の実施形態において、a) 免疫チェックポイント阻害剤および/または免疫賦活剤ならびにC A Rをコードする異種核酸を含む改変哺乳類(ヒト等)免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類免疫細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記異種核酸は、前記免疫チェックポイント阻害剤、前記免疫賦活剤、および前記C A Rをコードする。一部の実施形態において、前記異種核酸は少なくとも2個の免疫賦活剤をコードする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はP B M C、T細胞、またはN K細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、h E F 1 プロモーター等の構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、I L - 2 プロモーター、N F A T プロモーター、またはN F B プロモーター等の、T細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A - 4、B L T A、T I M - 3、またはL A G - 3 からなる群より選択される免疫チェックポイント分子の阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は抗体(全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等)である。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 2、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記C A Rは、E G F R v I I I 等のE G F R、B C M A、またはN Y - E S O - 1 等の腫瘍抗原を標的とする。

#### 【0186】

一部の実施形態において、a) 免疫チェックポイント阻害剤および/または免疫賦活剤、ならびに免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含むC A R、をコードする異種核酸を含む改変哺乳類(ヒト等)免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類免疫細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記異種核酸は、前記免疫チェックポイント阻害剤、前記免疫賦活剤、および前記C A Rをコードする。一部の実施形態において、前記異種核酸は少なくとも2個の免疫賦活剤をコードする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はP B M C、T細胞、またはN K細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、h E F 1 プロモーター等の構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、I L - 2 プロモーター、N F A T プロモーター、またはN F B プロモーター等の、T細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A - 4、B L T A、T I M - 3、またはL A G - 3 からなる群より選択される免疫チェックポイント分子の阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は抗体(全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等)である。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 2、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記C A Rは、E G F R v I I I 等のE G F R、B C M A、またはN Y - E S O - 1 等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記C A Rは短縮型C A Rである。一部の実施形態において、前記C A Rは一次細胞内シグナル伝達ドメイン(C D 3 等)を含まない。一部の実施形態において、前記C A Rは、非機能的な、または減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメイン(変異C D 3 等)を含む。一部の実施形態において、前記C A R単独では標的細胞の細胞溶解を誘発しない。一部の実施形態において、

10

20

30

40

50

前記 C A R は、 C D 8 S P 、腫瘍抗原 ( E G F R v I I I などの E G F R ; N Y - E S O - 1 ; または B C M A 等) に特異的に結合するターゲティングドメイン、 C D 8 ヒンジおよび膜貫通ドメイン、ならびに C D 1 3 7 細胞質ドメインを含む。

【 0 1 8 7 】

細胞混合物

一部の実施形態において、前記医薬組成物はさらに第 2 の細胞を含み、該第 2 の細胞は、 C A R または T C R を発現する哺乳類免疫細胞 ( T 細胞等) である。上節に記載の C A R または T C R のうち任意のものが該第 2 の細胞によって発現されてよく、その場合に前記改変哺乳類細胞は前記免疫調節剤および任意の 1 つまたは複数のさらなる治療用タンパク質 (他の免疫調節剤または非免疫調節剤等) のみを発現するものであってよい。腫瘍部位において、前記医薬組成物の改変哺乳類細胞は、免疫調節剤を分泌することによって抑制性免疫チェックポイントを遮断するか、あるいは刺激性免疫チェックポイントを活性化することが可能である一方で、 C A R または T C R を発現する前記第 2 の哺乳類免疫細胞は、腫瘍細胞へのリクルートが可能である。前記免疫調節剤および前記 C A R または T C R からのシグナルの組み合わせによって、前記第 2 の哺乳類免疫細胞の活性化が可能となり、腫瘍細胞に対する強固な免疫応答が引き起こされうる。これら二成分の医薬組成物によって、前記改変哺乳類細胞による前記免疫調節剤およびさらなる治療用タンパク質の分泌と、 C A R または T C R を発現する前記第 2 の哺乳類免疫細胞の活性化と、を独立に制御 (タイミングや量など) することが可能となる。前記 2 種の細胞の正確な制御は、前記免疫調節剤または C A R もしくは T C R によって引き起こされる望ましくない副作用を軽減することにおいて有用であろう。

【 0 1 8 8 】

従って、一部の実施形態において、 a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類 (ヒト等) 細胞であって、前記異種核酸が誘導性プロモーターに機能的に連結する、改変哺乳類細胞 ; b ) C A R を発現する第 2 の哺乳類 (ヒト等) 免疫細胞 ; および、 c ) 藥理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞 ( P B M C 、 N K 細胞、または T 細胞等) である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質 ( 例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等 ) 、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤 ( C T L A - 4 の阻害剤または P D - 1 の阻害剤等 ) である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体 ( 全長抗体、 s c F v 、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、または F a b 等 ) である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質 ( 第 2 の免疫調節剤、 例えば免疫賦活剤 ; または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、 例えば化学療法抗体等 ) をコードする第 2 の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 1 5 、 I L - 2 1 、 I L - 1 2 、 C C R 4 、 C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、 C D 1 3 7 L 、 L E M 、および B c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第 2 の哺乳類免疫細胞は P B M C 、 T 細胞、または N K 細胞である。一部の実施形態において、前記 C A R は、 E G F R v I I I 等の腫瘍抗原を標的とする。

【 0 1 8 9 】

一部の実施形態において、 a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類 (ヒト等) 細胞であって、前記異種核酸が誘導性プロモーターに機能的に連結する、改変哺乳類細胞 ; b ) T C R を発現する第 2 の哺乳類 (ヒト等) 免疫細胞 ; および、 c ) 藥理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞 ( P B M C 、 N K 細胞、または T 細胞等) である。一部の実施形

10

20

30

40

50

態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、scFv、單ードメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBc1-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はT細胞またはTCR-Tである。一部の実施形態において、前記TCRは、EGFRV11等の腫瘍抗原を標的とする。

#### 【0190】

前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記改変哺乳類細胞と同一のまたは異なる供給源に由来するものであってよい。また、前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記改変哺乳類細胞と同一の種類（サブポピュレーションを含む）または異なる種類のものであってよい。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞および前記改変哺乳類細胞の両者は、自己由来である。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞および前記改変哺乳類細胞の両者は、同種異系である。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞および前記改変哺乳類細胞の両者は、同一個体から得られたものである。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞および前記改変哺乳類細胞の両者は、異なる個体から得られたものである。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞は自己由来であり、前記改変哺乳類細胞は同種異系である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は自己由来であり、前記第2の哺乳類免疫細胞は同種異系である。

#### 【0191】

前記第2の哺乳類免疫細胞および前記改変哺乳類細胞は、任意の適した比率で前記医薬組成物中に存在していてよい。一部の実施形態において、前記医薬組成物中の前記第2の哺乳類免疫細胞および前記改変哺乳類細胞の比率は、約1:100、1:50、1:20、1:10、1:5、1:2、1:1、2:1、5:1、10:1、20:1、または100:1のいずれかである。一部の実施形態において、前記医薬組成物中の前記第2の哺乳類免疫細胞および前記改変哺乳類細胞の比率は、約1:100～約1:50、約1:5～約1:10、約1:20～約1:10、約1:10～約1:5、約1:5～約1:2、約1:2～約1:1、約1:2～約2:1、約1:1～約2:1、約2:1～約5:1、約5:1～約10:1、約10:1～約20:1、約10:1～約50:1、約50:1～約100:1、約1:10～約10:1、または約1:100～約100:1のいずれかである。

#### 【0192】

##### 賦形剤

本発明の医薬組成物は治療目的に対して有用である。従って、免疫調節剤または他の治療用タンパク質を発現する産生細胞等の改変哺乳類細胞を含む他の組成物とは異なり、本発明の医薬組成物は、個体への投与に適した薬理学的に許容される賦形剤を含む。

#### 【0193】

適した薬理学的に許容される賦形剤は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水等の緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール等の炭水化物；タンパク質；ポリペプチド、またはグリシン等のアミノ酸；抗酸化剤；EDTA等のキ

10

20

30

40

50

レート剤、またはグルタチオン；アジュバント（水酸化アルミニウム等）；および保存剤を含んでよい。一部の実施形態において、前記薬理学的に許容される賦形剤は、自己血清を含む。一部の実施形態において、前記薬理学的に許容される賦形剤は、ヒト血清を含む。一部の実施形態において、前記薬理学的に許容される賦形剤は、非毒性、生体適合性、非免疫原性、生分解性であり、宿主の防御機構による認識を回避することができる。前記賦形剤は、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤等の補助剤を含んでもよい。一部の実施形態において、前記薬理学的に許容される賦形剤は、前記改变哺乳類細胞、またはそれが分泌する前記免疫調節剤または他の治療用タンパク質の安定性を増強する。一部の実施形態において、前記薬理学的に許容される賦形剤は、前記改变哺乳類細胞によって分泌される前記免疫調節剤または他の治療用タンパク質の凝集を減少させる。最終形態は無菌であつてよく、また、中空針等の注射器具を容易に通過できるものであつてよい。賦形剤の適切な選択により、適切な粘性を達成および維持してよい。

10

## 【0194】

一部の実施形態において、前記医薬組成物は、約4.5～約9.0の範囲のpH、例えば、約5.0～約8.0、約6.5～約7.5、または約6.5～約7.0のいずれかのpH範囲を有するように調製される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、グリセロール等の適した浸透圧調節剤（tonicity modifier）の添加により、血液と等張にすることもできる。

20

## 【0195】

一部の実施形態において、前記医薬組成物はヒトへの投与に適したものである。一部の実施形態において、前記医薬組成物は非経口投与によるヒトへの投与に適したものである。非経口投与に適した製剤は、水性または非水性の等張滅菌注射液であって、該注射液が抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および、該製剤を対象レシピエントの血液に適合させる溶質を含みうるもの、ならびに、水性または非水性の滅菌懸濁液であって、懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、および保存剤を含みうるもの、を含む。前記製剤は単位用量または複数回用量の密閉容器内、例えばアンプルまたはバイアル内に提供することができ、使用的直前に、注射のための本明細書に記載の治療方法、投与方法、および投薬レジメンにおいて、前記滅菌液体賦形剤（すなわち水）を添加することのみを要求する条件で保管される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は使い捨てバイアル、例えば使い捨て密閉バイアル内に含まれる。一部の実施形態において、前記医薬組成物は複数回使用（multi-use）バイアル内に含まれる。一部の実施形態において、前記医薬組成物は容器内にまとめて含まれる。一部の実施形態において、前記医薬組成物は凍結保存される。

30

## 【0196】

一部の実施形態において、前記医薬組成物は静脈内投与のために製剤される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は皮下投与のために製剤される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は腫瘍部位への局所投与のために製剤される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は腫瘍内注射のために製剤される。

## 【0197】

一部の実施形態において、前記医薬組成物は個体への投与のための一定の基準を満たすものである。例えば、米国食品医薬品局は21 CFR 610および21 CFR 610.13を含む、細胞に基づいた免疫療法製品のための基準を定める規制ガイドラインを発令した。医薬組成物の外観、同一性、純度、安全性、および／または有効性を評価する方法が当該分野で公知である。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、細胞培養において使用される前記改变哺乳類免疫細胞以外の動物源のタンパク質など、アレルギー性の効果をもたらしうる外来タンパク質を実質的に含まない。一部の実施形態において、「実質的に含まない」とは、医薬組成物の総容量または重量に対し約10%、5%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、1 ppm、またはそれ未満、のいずれかよりも少ないことを意味する。一部の実施形態において、前記医薬組成物はGMPレベルの工場で調製される。一部の実施形態において、非経口投与用の前記医薬組成物に含まれるエンドトキシンは、約5 EU / kg 体重 / 時間 (EU/kg body weight/hr) 未満である。一部の

40

50

実施形態において、静脈内投与用の前記医薬組成物中の改変哺乳類細胞の少なくとも約70%は生存している。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、米国薬局方(USP)に記載の14日間直接接種試験法(14-day direct inoculation test method)を用いた評価において、「増殖なし(no growth)」の結果となる。一部の実施形態において、前記医薬組成物の投与に先立って、前記改変哺乳類細胞および前記薬理学的に許容される賦形剤の両者を含んだ試料を、最終採取の約48~72時間前に(または培養物の最後の再供給と同時に)無菌性試験のために採取すべきである。一部の実施形態において、前記医薬組成物にはマイコプラズマの混入がない。一部の実施形態において、前記医薬組成物は検出可能な微生物因子を含まない。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、HIV-I型、HIV-II型、HBV、HCV、ヒトTリンパ好性ウイルスI型、およびヒトTリンパ好性ウイルスII型等の感染症因子を含まない。

10

#### 【0198】

##### I II I . 調製法

本明細書に記載される医薬組成物のいずれかを調製する方法がさらに提供され、該方法は、前記異種核酸を含むベクターを哺乳類細胞に導入することを含む。

#### 【0199】

「ベクター」は、単離された核酸を含み、該単離核酸を細胞の内部に送達するために使用されうる組成物である。当該分野においては多数のベクターが公知であり、直鎖ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と関連したポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスを含むが、これらに限定されない。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と、プロモーター配列と、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位と、1つまたは複数の選択マーカーとを含む。「ベクター」という語は、例えばポリリジン化合物やリポソーム等の、核酸の細胞内への移行を促進する非プラスミドかつ非ウイルスの化合物を含むとも解釈されるべきである。

20

#### 【0200】

一部の実施形態において、前記ベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターの例は、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、およびそれらの誘導体を含むが、これらに限定されない。ウイルスベクター技術は当該分野で周知であり、例えば、Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、ならびに他のウイルス学および分子生物学のマニュアルに記載されている。

30

#### 【0201】

ウイルスに基づいた多数の系が、哺乳類細胞への遺伝子導入のために開発してきた。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を提供する。当該分野で公知の技術を使用して、前記異種核酸をベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。その後、組換えウイルスを単離し、前記改変哺乳類細胞にin vitroまたはex vivoで送達することができる。当該分野では多数のレトロウイルス系が公知である。一部の実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。当該分野では多数のアデノウイルスベクターが公知である。一部の実施形態において、レンチウイルスベクターが使用される。一部の実施形態において、自己不活性化レンチウイルスベクターが使用される。例えば、免疫調節剤(免疫チェックポイント阻害剤等)をコードする配列を有する自己不活性化レンチウイルスベクター、および/またはキメラ抗原受容体を有する自己不活性化レンチウイルスベクターを、当該分野で公知のプロトコルによりパッケージングすることができる。得られたレンチウイルスベクターを、当該分野で公知の手法を用いて哺乳類細胞(初代ヒトT細胞等)の形質導入に使用することができる。

40

#### 【0202】

宿主細胞は、当該分野で公知の各種方法を用いて調製することができる。例えば、T細胞等の初代免疫細胞を、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部

50

位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む多数の供給源から得ることができる。一部の実施形態において、個体から採取した単位量の血液から、F I C O L L (商標) 分離等の当該分野で公知の任意の数の技術を使用し、免疫細胞 (T 細胞等) を得ることができる。一部の実施形態において、個体の循環血液からアフェレーシスによって細胞が得られる。該アフェレーシス産物は典型的には、T 細胞等のリンパ球、単球、顆粒球、B 細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含む。一部の実施形態において、アフェレーシスによって採取された前記細胞を洗浄することによって、血漿画分を除去し、また次の処理工程のために該細胞を適切な緩衝液または培地中に配置してよい。一部の実施形態において、前記細胞は、リン酸緩衝食塩水 (P B S) により、またはカルシウムやマグネシウム等の二価カチオンを欠く洗浄溶液により、洗浄される。当業者は、洗浄工程が当業者に公知の手法により、例えば半自動化「フロースル」遠心分離器 (例えば Cob e 2991 cell processor、Baxter Cytomat e、または Haemonetics Cell Saver 5) を使用説明書に従い使用することにより、達成できることを容易に理解するであろう。洗浄後、細胞を、Ca<sup>2+</sup> 不含・Mg<sup>2+</sup> 不含 P B S、PlasmaLyte A、または緩衝液を含む、または含まない他の塩類溶液等の、各種生体適合性緩衝液に再懸濁してよい。あるいはアフェレーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培地に直接再懸濁してもよい。

10

#### 【0203】

一部の実施形態においては、赤血球を溶解し、単球を、例えば P E R C O L L (商標) グラジエントを用いた遠心分離によって、または対向流遠心溶出法 (counterflow centrifugal elutriation) によって除去することで、末梢血リンパ球から初代 T 細胞を単離する。CD3<sup>+</sup>、CD-28<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA、および CD45RO 細胞等の T 細胞の特定のサブポピュレーションを、正または負の選択技術によってさらに単離することができる。例えば、一実施形態においては、T 細胞を、DYABEADS (登録商標) M-450 CD3 / CD-28 T 等の抗 CD3 / 抗 CD28 (すなわち 3 × 28) 結合ビーズと共に、所望の T 細胞の正の選択に十分な時間インキュベートすることにより、単離する。

20

#### 【0204】

一部の実施形態においては、負の選択対象となる細胞固有の表面マーカーに対する抗体の組み合わせを用いて負の選択を行うことにより、T 細胞集団をさらに濃縮してもよい。例えば、1つの方法では、負の選択対象となる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のカクテルを使用した、負の磁気免疫付着 (negative magnetic immunoadherence) またはフローサイトメトリーによる、細胞選別および / または選択を行う。例えば、CD4<sup>+</sup> 細胞を負の選択により濃縮するためには、モノクローナル抗体のカクテルは典型的には CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-D R、および CD8 に対する抗体を含む。一部の実施形態においては、CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、CD62L<sup>hi</sup>、GITR<sup>+</sup>、および FoxP3<sup>+</sup> を典型的に発現する制御性 T 細胞を濃縮する、または該細胞の正の選択を行うことが望ましい場合がある。あるいは、一部の実施形態においては、抗 CD25 結合ビーズまたは他の同様な選択方法により制御性 T 細胞が除去される。

30

#### 【0205】

ベクターを哺乳類細胞に導入する方法は当該分野で公知である。ベクターは、物理的、化学的、または生物学的方法で宿主細胞に導入することができる。

40

#### 【0206】

ベクターを宿主細胞に導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、およびエレクトロポレーションなどを含む。ベクターおよび / または外来核酸を含む細胞を製造する方法は当該分野で周知である。例えば、Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York を参照のこと。一部の実施形態において、前記ベクターはエレクトロポレーションによって前記細胞に導入される。

50

## 【0207】

異種核酸を宿主細胞に導入するための生物学的方法は、D N A またはR N Aベクターの使用を含む。ウイルスベクターは、ヒト等の哺乳類細胞に遺伝子を挿入するための、最も広く用いられる方法になった。

## 【0208】

ベクターを宿主細胞に導入するための化学的手段は、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ等のコロイド分散系、ならびに、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソーム等の、脂質に基づいた系を含む。in vitroの送達ビヒクルとしての使用のためのコロイド系の例は、リポソームを含む（例えば人工膜小胞）。

10

## 【0209】

一部の実施形態において、前記形質導入またはトランスフェクトされた哺乳類細胞を、異種核酸の導入後にex vivoで増殖させる。一部の実施形態において、前記形質導入またはトランスフェクトされた哺乳類細胞を、少なくとも約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、12日、または14日のいずれかの間、培養により増殖させる。一部の実施形態において、前記形質導入またはトランスフェクトされた哺乳類細胞を、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、12日、または14日のいずれか以下の間、培養する。一部の実施形態において、前記形質導入またはトランスフェクトされた哺乳類細胞を、改変哺乳類細胞の選択のため、さらに評価またはスクリーニングする。

20

## 【0210】

レポーター遺伝子を用いて、トランスフェクトされた可能性のある細胞を識別し、また調節配列の機能性を評価してもよい。一般にレポーター遺伝子は、レシピエントの生物または組織に存在していないか、または発現しておらず、かつ、酵素活性等の容易に検出可能な何らかの特性によってその発現が明らかにされるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、レシピエントの細胞にそのD N Aが導入された後、適切なタイミングで評価される。適したレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、-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、もしくは分泌アルカリフォスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子を含んでもよい（例えばUi-Tei et al. FEBS Letters 479: 79-82 (2000)）。適した発現系は周知であり、公知の技術を用いて調製するか、または市販のものを入手してもよい。

30

## 【0211】

哺乳類細胞中の異種核酸の存在を確認する他の方法は、当業者に周知の分子生物学的アッセイ、例えば、サザンおよびノーザンプロットティング、R T - P C R、ならびにP C R；生化学的アッセイ、例えば、特定のペプチドの有無を免疫学的方法などによって検出すること等（E L I S Aおよびウェスタンプロットティング等）などを含む。

## 【0212】

例えば、形質導入哺乳類細胞（初代T細胞等）の培養物中の免疫調節剤（免疫チェックポイント阻害剤等）の分泌の検出を、酵素結合イムノソルベントアッセイ（E L I S A）またはフローサイトメトリーによって行うことができる。さらに、分泌された免疫調節剤（免疫チェックポイント阻害剤等）の生物学的機能を、レポーターアッセイまたはサイトカイン放出アッセイを用いて、in vitroでアッセイすることができる。このようなレポーターアッセイは、自家開発の安定なレポーター腫瘍細胞に対して行うことができる。改変T細胞の場合、サイトカイン放出アッセイを、該改変T細胞による免疫チェックポイント阻害剤の分泌に応じたT細胞回復レベルの検出のために行うことができる。改変C A R - T細胞の場合、腫瘍細胞へのC A R - T細胞毒性の増強に対する免疫調節剤（免疫チェックポイント阻害剤等）分泌の能力をin vitro共培養アッセイによりアッセイすることができ、該アッセイにおいては、T細胞と腫瘍細胞の共培養をいくつかの比率で一定時間行う。

40

## 【0213】

50

## I V . 癌の治療法

本出願の一側面は、上記医薬組成物のいずれかを使用した癌の治療方法に関する。

### 【 0 2 1 4 】

一部の実施形態において、a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb ) 薬理学的に許容される賦形剤、を含むを含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、個体（ヒト個体等）における癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（P B M C、N K 細胞、またはT 細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C T L A - 4 の阻害剤またはP D - 1 の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b 等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原（E G F R V I I I などのE G F R、B C M A、またはN Y - E S O - 1 等）を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、C A R またはT C R を発現しない。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2 、I L - 7 、I L - 1 5 、I L - 2 1 、I L - 1 2 、C C R 4 、C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L 、L E M 、およびB c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は前記個体に対し同種異系である。

### 【 0 2 1 5 】

一部の実施形態において、a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変哺乳類免疫細胞がさらにC A R またはT C R を発現する、改変哺乳類免疫細胞；およびb ) 薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、個体（ヒト個体等）における癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はP B M C、T 細胞、またはN K 細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、例えばC A R またはT C R の細胞内シグナル伝達ドメイン等によって、誘導可能である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、I L - 2 プロモーター、N F A T プロモーター、またはN F B プロモーター等の、T 細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C T L A - 4 の阻害剤またはP D - 1 の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b 等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば抗H E R 2 抗体などの化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2 、I L - 7 、I L - 1 5 、I L - 2 1 、I L - 1 2 、C C R 4 、C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L 、L E M 、およびB c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記C A R は、第2のプロモーターに機能的に連結した第3の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは、例え

10

20

30

40

50

ば、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類免疫細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記CARまたはTCRは、EGFRvIII等のEGFR、BCMA、またはNY-ESO-1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体に対し同種異系である。

### 【0216】

一部の実施形態において、a) 免疫チェックポイント阻害剤および/または免疫賦活剤ならびにCARをコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類免疫細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、個体（ヒト個体等）における癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記異種核酸は、前記免疫チェックポイント阻害剤、前記免疫賦活剤、および前記CARをコードする。一部の実施形態において、前記異種核酸は少なくとも2個の免疫賦活剤をコードする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、またはNK細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、hEF1プロモーター等の構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、IL-2プロモーター、NFATプロモーター、またはNF-Bプロモーター等の、T細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、BLTA、TIM-3、またはLAG-3からなる群より選択される免疫チェックポイント分子の阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は抗体（全長抗体、scFv、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等）である。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記CARは、EGFRvIII等のEGFR、BCMA、またはNY-ESO-1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記CARは免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記CARは短縮型CARである。一部の実施形態において、前記CARは一次細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3等）を含まない。一部の実施形態において、前記CARは、非機能的な、または減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメイン（変異CD3等）を含む。一部の実施形態において、前記CAR単独では標的細胞の細胞溶解を誘発しない。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体に対し同種異系である。

### 【0217】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；b) キメラ抗原受容体（CAR）または組換えT細胞受容体（TCR）を発現する第2の哺乳類免疫細胞；およびc) 薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、個体（ヒト個体等）における癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（PBMC、NK細胞、またはT細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

10

20

30

40

50

て、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体；等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、またはNK細胞である。一部の実施形態において、前記CARまたはTCRは、EGFRvII等のEGFR、BCMA、またはNY-ESO-1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体に対し同種異系である。

10

20

30

40

#### 【0218】

一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞、を含む医薬組成物の有効量を個体に投与すること；およびb)キメラ抗原受容体（CAR）または組換えT細胞受容体（TCR）を発現する第2の哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の有効量を、前記個体に投与することを含む、個体（ヒト個体等）における癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞を含む医薬組成物は、前記第2の改変哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の投与よりも先に投与される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞を含む医薬組成物は、前記第2の改変哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の投与よりも後に投与される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（PBMC、NK細胞、またはT細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、またはNK細胞である。一部の実施形態において、前記CARまたはTCRは、EGFRvII等のEGFR、BCMA、またはNY-ESO-1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体に対し同種異系である。

#### 【0219】

本明細書に記載される方法は、固形癌および液性癌の両者を含む各種癌の治療に適したものである。本方法は、初期、進行期、および転移性癌を含む、あらゆるステージの癌に適用可能である。本明細書に記載される方法は、アジュバントを使用する環境またはアジュバント不使用の環境で、第1療法、第2療法、第3療養、または化学療法、手術、放射

50

線療法、遺伝子治療、免疫療法、骨髄移植、幹細胞移植、標的療法、寒冷療法、超音波療法、光線力学的治療、もしくはラジオ波焼灼療法等の当該分野で公知の他の種類の癌治療との併用療法として使用してもよい。

#### 【0220】

一部の実施形態において、前記癌は固形癌である。一部の実施形態において、前記癌は血液癌等の液性癌である。本明細書に記載される方法によって治療しうる癌の例は、副腎皮質癌 (adenocortical carcinoma)、原発性骨髄線維症、肛門癌、虫垂癌、星細胞腫 (小脳および大脳等)、基底細胞癌、胆管癌 (肝外等)、膀胱癌、骨癌 (骨肉腫および悪性線維性組織球腫)、脳腫瘍 (神経膠腫、脳幹神経膠腫、小脳または大脳星細胞腫 (毛様細胞性星細胞腫、びまん性星細胞腫、未分化 (悪性) 星細胞腫等)、悪性神経膠腫、上衣腫、乏突起膠腫 (oligodendrolioma)、髄膜腫、頭蓋咽頭腫、血管芽細胞腫、髄芽腫、テント上未分化神経外胚葉性腫瘍、視覚路および視床下部神経膠腫、ならびに膠芽腫)、乳癌、気管支腺腫 / カルチノイド、カルチノイド腫瘍 (消化管カルチノイド腫瘍等)、原発不明の癌、中枢神経系リンパ腫、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、慢性骨髄増殖性疾患、子宮内膜癌 (子宮癌等)、上衣腫、食道癌、ユーリングファミリー腫瘍、眼癌 (眼内黒色腫および網膜芽腫等)、胆囊癌、胃 (gastric (stomach)) 癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質性腫瘍 (GIST)、胚細胞腫瘍 (頭蓋外、性腺外、卵巣等)、妊娠性絨毛性腫瘍、頭頸部癌、肝細胞 (肝臓) 癌 (肝癌およびヘパトーマ等)、下咽頭癌、島細胞癌 (内分泌腺)、喉頭癌、喉頭癌、白血病 (T細胞白血病を除く)、口唇口腔癌、口腔癌 (oral cancer)、肝臓癌、肺癌 (小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌等)、リンパ腫 (T細胞リンパ腫を除く)、髄芽腫、メラノーマ、中皮腫、転移性扁平上皮頸部癌、口腔癌 (mouth cancer)、多発性内分泌腫瘍症候群、骨髄異形成症候群、骨髄異形成性 / 骨髄増殖性疾患、鼻腔および副鼻腔癌、上咽頭癌、神経芽細胞腫、神経内分泌癌、口腔咽頭癌、卵巣癌 (卵巣上皮癌、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍等)、膵臓癌、副甲状腺癌、陰茎癌、腹膜癌、咽頭癌、褐色細胞腫、松果体芽腫およびテント上未分化神経外胚葉腫瘍、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫 (小膠細胞腫)、肺リンパ管筋腫症、直腸癌、腎臓癌、腎孟尿管癌 (移行細胞癌)、横紋筋肉腫、唾液腺癌、皮膚癌 (非メラノーマ (扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma) 等)、メラノーマ、およびメルケル細胞癌等)、小腸癌、扁平上皮癌 (squamous cell cancer)、精巣癌、咽喉癌、甲状腺癌、結節性硬化症、尿道癌、膀胱癌、外陰癌、ウィルムス腫瘍、母斑症関連異常血管増殖、浮腫 (脳腫瘍関連等)、ならびにメーグス症候群を含むが、これらに限定されない。

#### 【0221】

前記医薬組成物の投与は、注射、摂取、輸液、埋め込み (implantation)、または移植 (transplantation) を含む任意の好都合な様式で行ってよい、前記組成物は、経動脈、皮下、皮内、腫瘍内、節内、髄内、筋肉内、静脈内、または腹腔内投与により患者に投与されてよい。一部の実施形態において、前記医薬組成物は全身投与される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、静脈内注入等の輸液により、個体に投与される。免疫療法のための輸液の技術は当該分野で公知である (例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676 (1988) を参照のこと)。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、皮内または皮下注射により、個体に投与される。一実施形態において、前記組成物は静脈内注射によって投与される。一実施形態において、前記組成物は腫瘍またはリンパ節に直接注射される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は腫瘍部位に局所的に、例えば直接腫瘍細胞に、または腫瘍細胞を有する組織に投与される。

#### 【0222】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb) 薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に投与 (全身投与、または腫瘍部位への局所投与等) することを含む、個体 (ヒト個体等) における固形癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞 (PBM C、

10

20

30

40

50

N K 細胞、または T 細胞等)である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質(例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等)、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤(C T L A - 4 の阻害剤または P D - 1 の阻害剤等)である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体(全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、または F a b 等)である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原(E G F R v I I I 等)を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、C A R または T C R を発現しない。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質(第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤;または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等)をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 1 5 、 I L - 2 1 、 I L - 1 2 、 C C R 4 、 C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、 C D 1 3 7 L 、 L E M 、および B c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記固形癌は、メラノーマ、乳癌、肺癌、肝臓癌、白血病、リンパ腫、胃癌、結腸癌、骨癌、脳腫瘍、肺腫瘍、および卵巣癌からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液により投与される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は腫瘍内注射により投与される。

### 【0223】

一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類(ヒト等)免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変哺乳類免疫細胞がさらにC A R またはT C R を発現する、改変哺乳類免疫細胞;およびb)薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に投与(全身投与、または腫瘍部位に局所投与、等)することを含む、個体(ヒト個体等)における固形癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はP B M C 、T 細胞、またはN K 細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、例えばC A R またはT C R の細胞内シグナル伝達ドメイン等によって、誘導可能である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、I L - 2 プロモーター、N F A T プロモーター、またはN F B プロモーター等の、T 細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤(C T L A - 4 の阻害剤またはP D - 1 の阻害剤等)である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体(全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、または F a b 等)である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質(第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤;または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば抗H E R 2 抗体などの化学療法抗体等)をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2 、I L - 7 、I L - 1 5 、I L - 2 1 、I L - 1 2 、C C R 4 、C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L 、L E M 、およびB c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記C A R は、第2のプロモーターに機能的に連結した第3の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは、例えば、誘導物質(例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等)、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類免疫細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記C A R またはT C R は、E G F R v I I I 等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体から得

られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記固形癌は、メラノーマ、乳癌、肺癌、肝臓癌、白血病、リンパ腫、胃癌、結腸癌、骨癌、脳腫瘍、脾臓癌、および卵巣癌からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液により投与される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は腫瘍内注射により投与される。

#### 【0224】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；b) キメラ抗原受容体（CAR）または組換えT細胞受容体（TCR）を発現する第2の哺乳類免疫細胞；およびc) 薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に投与（全身投与、または腫瘍部位に局所投与、等）することを含む、個体（ヒト個体等）における固形癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（PBMC、NK細胞、またはT細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、scFv、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、またはNK細胞である。一部の実施形態において、前記CARまたはTCRは、EGFRvIII等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記固形癌は、メラノーマ、乳癌、肺癌、肝臓癌、白血病、リンパ腫、胃癌、結腸癌、骨癌、脳腫瘍、脾臓癌、および卵巣癌からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液により投与される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は腫瘍内注射により投与される。

#### 【0225】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞、を含む医薬組成物の有効量を個体に投与すること；およびb) キメラ抗原受容体（CAR）または組換えT細胞受容体（TCR）を発現する第2の哺乳類免疫細胞、を含む医薬組成物の有効量を、前記個体に投与することを含む、個体（ヒト個体等）における固形癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞を含む医薬組成物は、前記第2の改変哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の投与よりも先に投与される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞を含む医薬組成物は、前記第2の改変哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の投与よりも後に投与される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（PBMC、NK細胞、またはT細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される

10

20

30

40

50

誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、scFv、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBc1-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、またはNK細胞である。一部の実施形態において、前記CARまたはTCRは、EGFRvIII等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記固形癌は、メラノーマ、乳癌、肺癌、肝臓癌、白血病、リンパ腫、胃癌、結腸癌、骨癌、脳腫瘍、肺腫瘍、および卵巣癌からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液により投与される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は腫瘍内注射により投与される。

10

20

30

40

#### 【0226】

一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に全身投与することを含む、個体（ヒト個体等）における液性癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（PBMC、NK細胞、またはT細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、scFv、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、BCMAまたはNY-ESO-1等の腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、CARまたはTCRを発現しない。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBc1-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記液性癌は白血病またはリンパ腫である。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液により投与される。

#### 【0227】

一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変哺乳

50

類免疫細胞がさらに C A R または T C R を発現する、改変哺乳類免疫細胞；および b ) 薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に全身投与することを含む、個体（ヒト個体等）における液性癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は P B M C 、 T 細胞、または N K 細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、例えば C A R または T C R の細胞内シグナル伝達ドメイン等によって、誘導可能である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、 I L - 2 プロモーター、 N F A T プロモーター、または N F B プロモーター等の、 T 細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（ C T L A - 4 の阻害剤または P D - 1 の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、 s c F v 、単一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、または F a b 等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第 2 の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第 2 の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 15 、 I L - 21 、 I L - 12 、 C C R 4 、 C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、 C D 137 L 、 L E M 、および B c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記 C A R は、第 2 のプロモーターに機能的に連結した第 3 の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは、例えば、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類免疫細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記 C A R または T C R は、 B C M A または N Y - E S O - 1 等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記液性癌は白血病またはリンパ腫である。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液により投与される。

#### 【 0 2 2 8 】

一部の実施形態において、 a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞； b ) キメラ抗原受容体（ C A R ）または組換え T 細胞受容体（ T C R ）を発現する第 2 の哺乳類免疫細胞；および c ) 薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に全身投与することを含む、個体（ヒト個体等）における液性癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（ P B M C 、 N K 細胞、または T 細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（ C T L A - 4 の阻害剤または P D - 1 の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、 s c F v 、単一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、または F a b 等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第 2 の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第 2 の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 15 、 I L - 21 、 I L - 12 、 C C R 4 、 C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、 C D 137 L 、 L E M 、および B c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形

10

20

30

40

50

態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はP B M C、T細胞、またはN K細胞である。一部の実施形態において、前記C A RまたはT C Rは、B C M AまたはN Y - E S O - 1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記液性癌は白血病またはリンパ腫である。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液により投与される。

#### 【0229】

一部の実施形態において、a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞、を含む医薬組成物の有効量を、個体に全身投与すること；およびb)キメラ抗原受容体(C A R)または組換えT細胞受容体(T C R)を発現する第2の哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の有効量を、前記個体に全身投与することを含む、個体(ヒト個体等)における液性癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞を含む医薬組成物は、前記第2の改変哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の投与よりも先に投与される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞を含む医薬組成物は、前記第2の改変哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の投与よりも後に投与される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞(P B M C、N K細胞、またはT細胞等)である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質(例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等)、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤(C T L A - 4の阻害剤またはP D - 1の阻害剤等)である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体(全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等)である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質(第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等)をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 2、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c 1 - 2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はP B M C、T細胞、またはN K細胞である。一部の実施形態において、前記C A RまたはT C Rは、B C M AまたはN Y - E S O - 1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記液性癌は白血病またはリンパ腫である。一部の実施形態において、前記医薬組成物は輸液により投与される。

#### 【0230】

一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性であり、前記方法はさらに免疫調節剤および/または他の治療用タンパク質の発現を誘導することを含む。前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞の誘導は、個体への投与前に、または個体への投与後に行われる。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導条件によって誘導可能であり、前記方法はさらに該誘導条件を個体に適用することを含む。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導物質(例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等)によって誘導可能であり、前記方法はさらに、該誘導物質の有効量を個体に投与して免疫調節剤および/または他の治療用タンパク質の発現を誘導することを含む。一部の実施形態において、前記誘導物質は全身投与される。一部の実施形態

10

20

30

40

50

において、前記誘導物質は腫瘍部位に局所的に、例えば直接腫瘍細胞に、または腫瘍細胞を有する組織に、投与される。一部の実施形態において、前記プロモーターは照射（光または電離放射線等）によって誘導可能であり、前記方法はさらに、個体に、例えば全身に、または腫瘍部位に局所的に、照射を適用することを含む。一部の実施形態において、前記プロモーターは熱によって誘導可能であり、前記方法はさらに、個体に、例えば腫瘍部位に局所的に、熱を加えることを含む。

### 【0231】

従って、一部の実施形態において、(1)a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸が誘導性プロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することと、(2)前記免疫調節剤の発現を誘導することを含む、個体（ヒト個体等）における癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（P B M C、N K 細胞、またはT 細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C T L A - 4 の阻害剤またはP D - 1 の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b 等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原（E G F R V I I I などのE G F R、B C M A、またはN Y - E S O - 1 等）を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、C A R またはT C R を発現しない。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 2、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c l - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記癌は、白血病、リンパ腫、メラノーマ、乳癌、肺癌、肝臓癌、白血病、リンパ腫、胃癌、結腸癌、骨癌、脳腫瘍、膵臓癌、および卵巣癌からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は（輸液等により）全身投与され、前記プロモーターは腫瘍部位で（例えば誘導物質の局所投与により、または局所的な加熱もしくは照射により）局所的に誘導される。

### 【0232】

一部の実施形態において、(1)a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）免疫細胞であって、前記異種核酸が誘導性プロモーターに機能的に連結し、前記改変哺乳類免疫細胞がさらにC A R またはT C R を発現する、改変哺乳類免疫細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することと、(2)前記免疫調節剤の発現を誘導することを含む、個体（ヒト個体等）における癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はP B M C、T 細胞、またはN K 細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、例えばC A R またはT C R の細胞内シグナル伝達ドメイン等によって、誘導可能である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、I L - 2 プロモーター、N F A T プロモーター、またはN F B プロモーター等の、T 細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C T L A - 4 の阻害剤またはP D - 1 の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実

10

20

30

40

50

施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば抗H E R 2抗体などの化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 2、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c 1 - 2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記C A Rは、第2のプロモーターに機能的に連結した第3の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第2のプロモーターは、例えば、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類免疫細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記C A RまたはT C Rは、E G F R v I I I等のE G F R、B C M A、またはN Y - E S O - 1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞は前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記癌は、白血病、リンパ腫、メラノーマ、乳癌、肺癌、肝臓癌、白血病、リンパ腫、胃癌、結腸癌、骨癌、脳腫瘍、肺腫瘍、および卵巣癌からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は（輸液等により）全身投与され、前記プロモーターは腫瘍部位で（例えば誘導物質の局所投与により、または局所的な加熱もしくは照射により）局所的に誘導される。  
10

### 【0233】

一部の実施形態において、（1）a）免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸が誘導性プロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；b）キメラ抗原受容体（C A R）または組換えT細胞受容体（T C R）を発現する第2の哺乳類免疫細胞；およびc）薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することと、（2）前記免疫調節剤の発現を誘導することを含む、個体（ヒト個体等）における癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（P B M C、N K細胞、またはT細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C T L A - 4の阻害剤またはP D - 1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 2、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c 1 - 2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はP B M C、T細胞、またはN K細胞である。一部の実施形態において、前記C A RまたはT C Rは、E G F R v I I I等のE G F R、B C M A、またはN Y - E S O - 1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記癌は、白血病、リンパ腫、メラノーマ、乳癌、肺癌、  
20

肝臓癌、白血病、リンパ腫、メラノーマ、乳癌、肺癌、  
30

肝臓癌、白血病、リンパ腫、メラノーマ、乳癌、肺癌、  
40

肝臓癌、白血病、リンパ腫、メラノーマ、乳癌、肺癌、  
50

肝臓癌、白血病、リンパ腫、胃癌、結腸癌、骨癌、脳腫瘍、肺臓癌、および卵巣癌からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は（輸液等により）全身投与され、前記プロモーターは腫瘍部位で（例えば誘導物質の局所投与により、または局所的な加熱もしくは照射により）局所的に誘導される。

【0234】

一部の実施形態において、a) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸が誘導性プロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞、を含む医薬組成物の有効量を個体に投与すること；b) キメラ抗原受容体（CAR）または組換えT細胞受容体（TCR）を発現する第2の哺乳類免疫細胞、を含む医薬組成物の有効量を、前記個体に投与すること；および、c) 前記免疫調節剤の発現を誘導することを含む、個体（ヒト個体等）における癌の治療法が提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞を含む医薬組成物は、前記第2の改変哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の投与よりも先に投与される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞を含む医薬組成物は、前記第2の改変哺乳類免疫細胞を含む医薬組成物の投与よりも後に投与される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（PBMC、NK細胞、またはT細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、scFv、單ードメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBc1-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、またはNK細胞である。一部の実施形態において、前記CARまたはTCRは、EGFRV11等のEGFR、BCMA、またはNY-ESO-1等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体から得られる。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞および/または前記第2の哺乳類免疫細胞は、前記個体に対し同種異系である。一部の実施形態において、前記癌は、白血病、リンパ腫、メラノーマ、乳癌、肺癌、肝臓癌、白血病、リンパ腫、胃癌、結腸癌、骨癌、脳腫瘍、肺臓癌、および卵巣癌からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞を含む医薬組成物は（輸液等により）全身投与され、前記プロモーターは腫瘍部位で（例えば誘導物質の局所投与により、または局所的な加熱もしくは照射により）局所的に誘導される。

【0235】

一部の実施形態において、前記医薬組成物は、体重1kgあたり少なくとも約10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、または10<sup>9</sup>細胞のいずれかの投与量で投与される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、体重1kgあたり約10<sup>4</sup>～約10<sup>5</sup>、約10<sup>5</sup>～約10<sup>6</sup>、約10<sup>6</sup>～約10<sup>7</sup>、約10<sup>7</sup>～約10<sup>8</sup>、約10<sup>8</sup>～約10<sup>9</sup>、約10<sup>4</sup>～約10<sup>9</sup>、約10<sup>4</sup>～約10<sup>6</sup>、約10<sup>6</sup>～約10<sup>8</sup>、または約10<sup>5</sup>～約10<sup>7</sup>細胞のいずれかの投与量で投与される。

【0236】

一部の実施形態において、複数種類の改変哺乳類細胞が投与される場合、これら異なる

10

20

30

40

50

種類の改変哺乳類細胞は、例えば单一組成物として同時に、または任意の適した順番で順次に、個体に投与してよい。

【0237】

一部の実施形態において、前記医薬組成物は単回投与される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は複数回（例えば2、3、4、5、もしくは6回のいずれか、またはそれ以上の回数）投与される。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、週1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、4ヶ月に1回、5ヶ月に1回、6ヶ月に1回、7ヶ月に1回、8ヶ月に1回、9ヶ月に1回、または年1回、投与される。一部の実施形態において、投与間隔は、約1週間～2週間、2週間～1ヶ月、2週間～2ヶ月、1ヶ月～2ヶ月、1ヶ月～3ヶ月、3ヶ月～6ヶ月、または6ヶ月～1年のいずれかである。医学分野の当業者は、患者の疾患の兆候をモニタリングし、それに従って治療を調整することによって、その特定の患者のための最適用量および治療レジメンを、容易に決定することができる。

10

【0238】

V. キットおよび製品

本明細書に記載される医薬組成物のいずれかを含有するキット、単位用量 (unit doses)、および製品がさらに提供される。

【0239】

一部の実施形態において、(1)a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物と、(2)該医薬組成物を使用するための説明書と、を含むキットが提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（CTLA-4の阻害剤またはPD-1の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、scFv、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはFab等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原（EGFRvIIIなどのEGFR、BCMA、またはNY-ESO-1等）を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、CARまたはTCRを発現しない。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はIL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、CCR4、CCR2b、ヘパラナーゼ、CD137L、LEM、およびBcl-2からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記キットはさらに誘導物質を含む。

20

【0240】

一部の実施形態において、(1)a)免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類（ヒト等）免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結し、前記改変哺乳類免疫細胞がさらにCARまたはTCRを発現する、改変哺乳類免疫細胞；およびb)薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物と、(2)該医薬組成物を使用するための説明書と、を含むキットが提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類免疫細胞はPBMC、T細胞、またはNK細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、例えばCARまたはTCRの細胞内シグナル伝達ドメイン等によって、誘導可能である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、IL-2プロモーター、NFATプロモーター、またはNFBプロモーター等の、T細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C

30

40

50

T L A - 4 の阻害剤または P D - 1 の阻害剤等 ) である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体 ( 全長抗体、 s c F v 、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、または F a b 等 ) である。一部の実施形態において、前記改变哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質 ( 第 2 の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤 ; または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば抗 H E R 2 抗体などの化学療法抗体等 ) をコードする第 2 の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 15 、 I L - 21 、 I L - 12 、 C C R 4 、 C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、 C D 137 L 、 L E M 、および B c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記 C A R は、第 2 のプロモーターに機能的に連結した第 3 の異種核酸によってコードされる。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記第 2 のプロモーターは、例えば、誘導物質 ( 例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等 ) 、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改变哺乳類免疫細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記 C A R または T C R は、 E G F R v I I I 等の E G F R 、 B C M A 、または N Y - E S O - 1 等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記キットはさらに誘導物質を含む。

10

## 【 0 2 4 1 】

一部の実施形態において、( 1 ) a ) 免疫チェックポイント阻害剤および / または免疫賦活剤ならびに C A R をコードする異種核酸を含む改变哺乳類 ( ヒト等 ) 免疫細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改变哺乳類免疫細胞 ; および b ) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物と、( 2 ) 該医薬組成物を使用するための説明書と、を含むキットが提供される。一部の実施形態において、前記異種核酸は、前記免疫チェックポイント阻害剤、前記免疫賦活剤、および前記 C A R をコードする。一部の実施形態において、前記異種核酸は少なくとも 2 個の免疫賦活剤をコードする。一部の実施形態において、前記改变哺乳類免疫細胞は P B M C 、 T 細胞、または N K 細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、 h E F 1 プロモーター等の構成的プロモーターである。一部の実施形態において、前記プロモーターは誘導性である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、 I L - 2 プロモーター、 N F A T プロモーター、または N F B プロモーター等の、 T 細胞活性化依存プロモーターである。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は、 P D - 1 、 P D - L 1 、 P D - L 2 、 C T L A - 4 、 B L T A 、 T I M - 3 、または L A G - 3 からなる群より選択される免疫チェックポイント分子の阻害剤である。一部の実施形態において、前記免疫チェックポイント阻害剤は抗体 ( 全長抗体、 s c F v 、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、または F a b 等 ) である。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤は I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 15 、 I L - 21 、 I L - 12 、 C C R 4 、 C C R 2 b 、ヘパラナーゼ、 C D 137 L 、 L E M 、および B c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記 C A R は、 E G F R v I I I 等の E G F R 、 B C M A 、または N Y - E S O - 1 等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記 C A R は免疫エフェクター機能が無効化または減弱化した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態において、前記 C A R は短縮型 C A R である。一部の実施形態において、前記 C A R は一次細胞内シグナル伝達ドメイン ( C D 3 等 ) を含まない。一部の実施形態において、前記 C A R は、非機能的な、または減弱化した一次細胞内シグナル伝達ドメイン ( 変異 C D 3 等 ) を含む。

20

## 【 0 2 4 2 】

一部の実施形態において、( 1 ) a ) 免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改变哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改变哺乳類細胞 ; b ) キメラ抗原受容体 ( C A R ) または組換え T 細胞受容体 ( T C R ) を発現する第 2 の哺乳類免疫細胞 ; および c ) 薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物と、( 2 ) 該医薬組成物を使用するための説明書と、を含むキットが提供される。一部の実施形態にお

30

40

50

いて、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（P B M C、N K 細胞、またはT 細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C T L A - 4 の阻害剤またはP D - 1 の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b 等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 2、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はP B M C、T 細胞、またはN K 細胞である。一部の実施形態において、前記C A R またはT C R は、E G F R v I I I 等のE G F R、B C M A、またはN Y - E S O - 1 等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記キットはさらに誘導物質を含む。

10

20

30

40

#### 【0243】

一部の実施形態において、（1）a）免疫調節剤をコードする異種核酸を含む改変哺乳類細胞であって、前記異種核酸がプロモーターに機能的に連結した、改変哺乳類細胞；およびb）薬理学的に許容される賦形剤、を含む医薬組成物と、（2）C A R またはT C R を発現する第2の哺乳類免疫細胞を含む組成物と、（3）前記医薬組成物を使用するための説明書と、を含むキットが提供される。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は免疫細胞（P B M C、N K 細胞、またはT 細胞等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は幹細胞である。一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導物質（例えばテトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの小分子等）、照射、温度、酸化還元状態、腫瘍環境、および前記改変哺乳類細胞の活性化状態、から選択される誘導条件によって誘導可能である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤（C T L A - 4 の阻害剤またはP D - 1 の阻害剤等）である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は免疫賦活剤である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は分泌タンパク質である。一部の実施形態において、前記免疫調節剤は抗体（全長抗体、s c F v、單一ドメイン抗体、重鎖のみ抗体、またはF a b 等）である。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、腫瘍抗原を認識するターゲティング分子をその表面上に発現する。一部の実施形態において、前記改変哺乳類細胞は、さらに、治療用タンパク質（第2の免疫調節剤、例えば免疫賦活剤；または、免疫調節剤ではない治療用タンパク質、例えば化学療法抗体等）をコードする第2の異種核酸を含む。一部の実施形態において、前記免疫賦活剤はI L - 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 2、C C R 4、C C R 2 b、ヘパラナーゼ、C D 1 3 7 L、L E M、およびB c 1 - 2 からなる群より選択される。一部の実施形態において、前記第2の哺乳類免疫細胞はP B M C、T 細胞、またはN K 細胞である。一部の実施形態において、前記C A R またはT C R は、E G F R v I I I 等のE G F R、B C M A、またはN Y - E S O - 1 等の腫瘍抗原を標的とする。一部の実施形態において、前記医薬組成物と、前記第2の哺乳類免疫細胞を含む組成物とが、投与の前に混合される。一部の実施形態において、前記キットはさらに誘導物質を含む。

50

#### 【0244】

前記キットは、前記改変哺乳類細胞および任意に前記第2の哺乳類免疫細胞の増殖または誘導を可能にするために、容器、試薬、培地、誘導物質、サイトカイン、緩衝液、およ

50

び抗体等の1つまたは複数のさらなる構成物を含んでいてよい。前記キットは、前記医薬組成物および／または前記第2の哺乳類免疫細胞を含む組成物を腫瘍部位に局所投与（腫瘍内注射等）するための装置を含んでもよい。

#### 【0245】

前記医薬組成物、および任意に前記第2の哺乳類免疫細胞を含む組成物、の使用に関する説明書は、一般に、対象となる治療のための用量、投与計画、および投与経路に関する情報を含む。一部の実施形態において、前記説明書はさらに、前記免疫調節剤および／または他の治療用タンパク質の発現の誘導のための、誘導物質の用量、投与計画、および投与経路等の情報を含む。前記容器は単位用量（unit doses）、バルクパッケージ（例えば複数回用量パッケージ）、または単位未満の用量（sub-unit doses）であってよい。一部の実施形態において、前記組成物（医薬組成物、第2の哺乳類免疫細胞を含む組成物、および／または誘導物質等）の総量は、単回の局所投与（腫瘍内注射等）のための全量に十分な量である。一部の実施形態において、前記組成物（医薬組成物、第2の哺乳類免疫細胞を含む組成物、および／または誘導物質等）の総量は、複数の腫瘍部位のうちの1つへの単回の局所投与（腫瘍内注射等）のための分割用量に十分な量である。一部の実施形態において、前記組成物（医薬組成物、第2の哺乳類免疫細胞を含む組成物、および／または誘導物質等）の総量は、1つの腫瘍部位への単回の局所投与（腫瘍内注射等）と複数の腫瘍部位での複数回の分割用量投与との組み合わせを含む、複数回の局所投与に対して十分な量である。

#### 【0246】

例えば、本明細書に開示されるように前記医薬組成物の十分な用量を含むキットを提供してよく、それによって、例えば1週間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、7ヶ月間、8ヶ月間、もしくは9ヶ月間のいずれか、またはそれ以上、等の長期間、個体の有効な治療が提供されてよい。キットは、前記医薬組成物の複数回単位用量および使用説明書も含んでいてよく、それらは病院薬局や調剤薬局等の薬局における保管と使用にとって十分な量で包装されてよい。

#### 【0247】

本発明のキットは適切に包装される。適した包装の例は、バイアル、ボトル、ジャー、フレキシブル包装（密閉されたマイラー（Mylar）またはプラスチック袋等）等を含むが、これらに限定されない。キットは任意に緩衝液および解説情報（interpretative information）等のさらなる構成物を提供してよい。本出願は、従って、バイアル（密閉バイアル等）、ボトル、ジャー、フレキシブル包装等を含む製品も提供する。

#### 【0248】

該製品は、容器、および該容器上の、または該容器に付随する、ラベルまたは添付文書を含みうる。適した容器は、ボトル、バイアル、注射器等を含む。該容器はガラスまたはプラスチック等の各種材料から形成されてよい。一般に、該容器は、本明細書に記載の疾患または障害を治療するのに有効な組成物を保持し、無菌のアクセスポートを有していてよい（例えば、該容器は、静脈注射用溶液袋、または皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル等であってよい）。前記ラベルまたは添付文書は、前記組成物が個体における特定の状態を治療するために使用される旨を示すものである。該ラベルまたは添付文書はさらに、該個体に該組成物を投与するための説明を含みうる。本明細書に記載の併用療法を含む製品およびキットも企図される。

#### 【0249】

添付文書とは、治療用製品の使用に関する、適応症、用法、用量、投与、禁忌、および／または警告についての情報を含む、該治療用製品の市販包装に慣例的に含められる説明書のことを表す。一部の実施形態において、添付文書は、前記組成物が固形腫瘍（膠芽腫等）の治療に使用されることを示すものである。

#### 【0250】

また、前記製品は、注射用静菌水（BWFⅠ）、リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液、お

10

20

30

40

50

およびデキストロース溶液等の薬理学的に許容される緩衝剤を含む、第2の容器をさらに含んでいてよい。また、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、および注射器等、商業上および利用者の立場から望ましい他の構成要素を含んでいてよい。

【実施例】

【0251】

以下の実施例は純粹に本発明の例示を意図するものであり、従って、どのような面からも本発明を限定するものと考えるべきではない。次の実施例および詳細な説明は説明の目的で提供されるものであり、限定の目的で提供されるものではない。

【0252】

実施例1：初代T細胞および他の哺乳類細胞における機能的抗体の発現

10

構成的プロモーター-hEF1、ドキシサイクリン誘導性プロモーター(TETON(登録商標)等)、NFAT依存誘導性プロモーター、または熱誘導性プロモーター(ヒト熱ショックタンパク質70プロモーターHSP70p等)によって駆動される抗体遺伝子を有する自己不活性化レンチウイルスベクターを設計および調製した。各抗体遺伝子は、PD-1、CTLA-4、および任意の他の目的とする標的から選択される、固有の抗原に対して特異的に抗体を発現することができる。初代ヒト末梢血単核球(PBMC)を、健常ドナー由来の末梢血を密度勾配遠心することで調製した。磁気ビーズ分離を用いてPBMCからヒト初代T細胞を精製し、プレ活性化した。次いで、プレ活性化されたT細胞に前記レンチウイルスベクターを形質導入し、ex vivoで数日間増殖させた。あるいは、293-6E細胞、Jurkat細胞、間葉系幹細胞、精製ヒトB細胞、および他のPBMC細胞等の他の宿主細胞に前記レンチウイルスベクターを形質導入し、抗体の発現に使用することができる。抗体の分泌を、均一性時間分解蛍光(homogenous time-resolved fluorescence)(HTFR)法を用いて検出した。あるいは、分泌された抗体の検出を、組換え抗原タグタンパク質により、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)で行うことができる。分泌された抗体の生物活性を、in vitroレポーターアッセイを用いて評価した。

20

【0253】

これらの実験に用いた材料および方法を以下に記載する。

30

【0254】

自己不活性化レンチウイルスベクターの調製

pMDLg/pRRE(Addgene #12251)、pRSV-Rev(Addgene #12253)、およびpMD2.G(Addgene #12259)を含むレンチウイルスパッケージングプラスミド混合物を、抗体発現プラスミドpLLV-プロモーター-抗PD-1ベクター(すなわち、pLLV-hEF1-抗PD-1、pLLV-TetOn-抗PD-1、pLLV-NFAT-抗PD-1、もしくはpLLV-HSP70p-抗PD-1)、またはpLLV-プロモーター-抗CTLA-4ベクター(すなわち、pLLV-hEF1-抗CTLA-4、pLLV-TetOn-抗CTLA-4、pLLV-NFAT-抗CTLA-4、もしくはpLLV-HSP70p-抗CTLA-4)と、ポリエーテルイミド(PEI)と共に、あらかじめ最適化された比率で予備混合した後、適切に混合して室温で5分間インキュベートした。次いで、トランスフェクション混合物をHEK293細胞に滴下し、おだやかに混合した。その後、細胞を37の5%CO<sub>2</sub>細胞インキュベーター内で一晩インキュベートした。4にて500gで10分間遠心分離した後、上清を回収した。

40

【0255】

該上清を0.45μmのPESフィルターに通し、ウイルス上清を20%ショ糖密度勾配超遠心により濃縮した。遠心分離後、上清を注意深く捨て、あらかじめ冷やしたDPBSでウイルスのペレットを慎重にリソスした。その後、ウイルスの濃度を測定した。ウイルスを適切に分注し、すぐに-80で保管した。ウイルス力価を、GenScriptによって開発されたHTRFキットでp24によって測定した。

50

【0256】

### P B M C 調製

白血球を回収し、細胞濃度を R 1 0 培地内で  $5 \times 10^6$  細胞 / mL に調整した。その後、白血球を 0.9% NaCl 溶液と 1 : 1 (v/v) の比率で混合した。3 mL の lymphoprep 培地を 15 mL の遠心管に加え、lymphoprep 上に 6 mL の希釈リンパ球混合物をゆっくりと重層した。リンパ球混合物を 800 g で 30 分間、20° にてブレーキ無しで遠心分離した。その後、リンパ球のバフィーコートを 200 μL のピペットで回収した。回収した画分を、少なくとも 6 倍の 0.9% NaCl または R 1 0 で希釈し、溶液の密度を低下させた。その後、回収した画分を 250 g で 10 分間、20° にて遠心分離した。上清を完全に吸引し、10 mL の R 1 0 を細胞ペレットに加えた。該混合物をさらに 250 g で 10 分間、20° にて遠心分離した。その後、上清を吸引した。37° にあらかじめ温めた 2 mL の R 1 0 と共に 100 IU / mL の IL-2 を細胞ペレットに加え、該細胞ペレットを静かに再懸濁した。細胞数を計数し、後の実験で使用可能な P B M C 試料とした。

### 【 0 2 5 7 】

#### T 細胞精製

Miltenyi Pan T cell isolation kit (Cat # 130-096-535) を用いて、製造者が提供するプロトコルに従い、次のように P B M C からヒト T 細胞を精製した。細胞数を最初に測定した。細胞懸濁物を 300 g で 10 分間遠心分離した。上清を完全に吸引し、細胞ペレットを  $10^7$  個の全細胞あたり 40 μL の緩衝液に再懸濁した。 $10^7$  個の全細胞あたり 10 μL の Pan T Cell Biotin- Antibody Cocktail を添加し、十分に混合し、約 5 分間冷蔵庫 (2~8°) 内でインキュベートした。その後、 $10^7$  個の細胞あたり 30 μL の緩衝液を添加した。 $10^7$  個の細胞あたり 20 μL の Pan T Cell Micro Bead Cocktail を添加した。該混合物をよく混合し、冷蔵庫 (2~8°) 内でさらに 10 分間インキュベートした。最低でも 500 μL が磁気分離に必要であった。LS カラムを適した MACS 分離装置の磁場に設置した。3 mL の緩衝液でリーンスすることでカラムの準備を行った。その後、細胞懸濁物を該カラム上にアプライし、濃縮された T 細胞画分に相当する非標識細胞を含むフロースルーを回収した。次いで、3 mL の緩衝液でカラムを洗浄することにより T 細胞を回収し、その際、濃縮された T 細胞に相当する通過分の非標識細胞を回収して、先の工程のフロースルーと合わせた。その後、T 細胞を R 1 0 + 100 IU / mL IL-2 中に再懸濁した。human T Cell Activation / Expansion Kit (Miltenyi # 130-091-441) を用いて、該初代 T 細胞を形質導入に先立って 3 日間プレ活性化した。

### 【 0 2 5 8 】

#### B 細胞精製

初代ヒト B 細胞も磁気ビーズ分離法により調製した。P B M C を上記の通り密度勾配遠心分離によって調製した。Miltenyi Human B cell isolation kit (Cat # 130-091-151) を用いて、上記ヒト T 細胞の調製と類似のプロトコルに従い、P B M C からヒト B 細胞を精製した。単離されたヒト B 細胞を、ex vivo で、組換え CD40 と IL4 タンパク質を添加した RPMI 1640 培地 (Martina et al. PLoS ONE 3(1): e1464 (2008)) 中で培養した。

### 【 0 2 5 9 】

#### ナチュラルキラー (NK) 細胞精製

初代ヒト NK 細胞を磁気ビーズ分離法により調製した。P B M C を上記の通り密度勾配遠心によって調製した。Miltenyi Human NK cell isolation kit (Cat # 130-092-657) を用いて、上記ヒト T 細胞の調製と類似のプロトコルに従い、P B M C からヒト NK 細胞を精製した。単離されたヒト NK 細胞を、ex vivo で、200 IU / mL の組換え IL2 タンパク質を添加した - MEM 培地中で培養した。

### 【 0 2 6 0 】

10

20

30

40

50

## 間葉系幹細胞の調製

ヒトドナーの骨髄を局所麻酔下で腸骨稜から吸引によって採取し、次いで単核球を Ficoll 分離法により単離する。その後、細胞を洗浄し、MSC 培地（ダルベッコ改変イーグル培地 - 低グルコース / ベニシリン / ストレプトマイシン / 10 % ウシ胎児血清）中に再懸濁し、組織培養フラスコに播種して、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> でインキュベートする。MSC を、MSC 増殖のための標準化 LUMC プロトコルに従い増殖させる。週に 2 回、培養物を顕微鏡観察し、培地を入れ替える。> 70 % コンフルエンスに達したら細胞をトリプシン処理し、各種サイズの MSC の半製品（half products）（継代 1）を 10 % ジメチルスルホキシドと共に凍結保存する。

## 【0261】

10

## 宿主細胞における抗体遺伝子の発現

初代ヒト T 細胞、精製ヒト B 細胞、および精製ヒト NK 細胞を含む宿主細胞への、段階希釈したウイルスストックによる形質導入を、7 μg / mL のポリブレンの存在下で、1200 g、32 °C、1.5 時間の遠心分離によって行った。その後、トランスフェクトされた細胞を細胞培養インキュベーターに移し、適した誘導条件下で導入遺伝子の発現を行う。具体的には、pLLV-hEF1 - 抗 PD-1 または pLLV-hEF1 - 抗 CTLA-4 を形質導入した宿主細胞を、誘導物質または誘導条件無しで 48 時間インキュベートした。pLLV-TetOn - 抗 PD-1 または pLLV-TetOn - 抗 CTLA-4 を形質導入した宿主細胞を、各種濃度（0 ~ 12 μg / mL）のドキシサイクリンと共に 48 時間インキュベートした。pLLV-NFAT - 抗 PD-1 または pLLV-NFAT - 抗 CTLA-4 を形質導入した宿主細胞を、各種濃度（0 ~ 50 ng / mL PMA・1000 ng / mL PHA-P）の T 細胞活性化組成物 PMA / PHA-P と共に 48 時間インキュベートした。pLLV-HSP70p - 抗 PD-1 または pLLV-HSP70p - 抗 CTLA-4 を形質導入した宿主細胞に、形質導入直後、温度を制御したウォーターバス中で、37 °C、39 °C、41 °C、43 °C、または 44 °C の 20 分間の熱ショックを加えた。熱ショック後、細胞を 6 ウェルプレートに播種し直し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> の細胞培養インキュベーターでさらに 3 日間増殖させた。温度誘導性プロモーターを有する他の構築物については、宿主細胞を 24 ~ 72 時間インキュベートした後、最適温度（37 °C ~ 45 °C 等）において一定時間（例えば 10 分間、20 分間または 30 分間等）誘導することができる。

20

## 【0262】

30

導入遺伝子の発現の誘導後、宿主細胞の各バッチからの分泌抗体を、例えば均一性時間分解蛍光法（homogenous time-resolved fluorescence）（HTRF、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動（Time resolved-fluorescence resonance energy transfer）すなわち TR-FRET としても知られる）または ELISA 等の各種方法を用いて検出することができる。ELISA については、簡単に記載すると、MAXI-SORP（登録商標）ELISA プレート（Nunc、cat # 44-2404-21）をヤギ抗ヒト IgG - UNLB でプレコーティングする。プロッキングと洗浄の後、形質導入細胞からの上清を順次プレートに加える。洗浄後、ヤギ抗ヒト - HRP を該プレートに加え、HRP の基質である DAB を標準的な ELISA の手順に従って加える。その後、プレートを FLEX STATION（商標）3 等のマイクロプレートリーダー上で読み取る。

40

## 【0263】

50

ここで、宿主細胞の各バッチから分泌された抗 PD-1 および抗 CTLA-4 抗体を、LANDPOWER（商標）Human Fc Detection kit（GenScript # L00656-1000）を用いて均一性時間分解蛍光法（HTRF）により検出した。該キットは試料中のヒト Fc タグ化タンパク質またはヒト IgG を検出するため使用することができる。該キットは競合イムノアッセイであり、ユーロピウム（LANDPOWER（商標）Eu）で標識したポリクローナル抗体（Fc 特異的）、および GS665 色素で標識したヒト IgG を含む。Eu 標識ポリクローナル抗体が GS665 標識ヒト IgG の Fc 領域に結合すると、FRET が発生する。ヒト IgG またはヒト F

c タグ化タンパク質を含む試料を加えると、FRETシグナルが減少することになる。検出されたFRETシグナルは、加えた試料中のヒトIgGまたはヒトFcタグ化タンパク質の濃度と逆相関する。簡単に記載すると、ヒトIgG - GS665、抗ヒトFc抗体 - Eu、および抗体試料または対照をアッセイプレート中で混合し、1.5時間インキュベートした。プレートをHTRF対応機器（PHERSTAR（商標）plus microplate reader、Ex: 320~340 nm、Em: 620 nmおよび665 nm）上で読み取った。

## 【0264】

レンチウイルスベクターpLLV-hEFF1 - 抗PD-1（またはpLLV-hEFF1 - 抗CTLA-4）によって形質導入した際、宿主細胞（初代ヒトT細胞、精製ヒトB細胞、および精製ヒトNK細胞）は抗PD-1抗体（または抗CTLA-4抗体）を構成的に分泌し、これを形質導入48時間後にHTRFによって検出することができた（図8A~8C）。抗PD-1抗体は、形質導入T細胞、B細胞、およびNK細胞から、それぞれ、9.45 ± 1.17 μg / mL、3.31 ± 0.01 μg / mL、および8.51 ± 0.83 μg / mLの濃度で分泌された。抗CTLA-4抗体の発現量は、同一種類の宿主細胞中で抗PD-1抗体よりもはるかに高かった。形質導入T細胞、B細胞、およびNK細胞の上清中に検出された抗CTLA-4抗体の濃度は、それぞれ、26.89 ± 2.74 μg / mL、29.66 ± 3.06 μg / mL、および122.12 ± 11.09 μg / mLであった。

## 【0265】

初代ヒトT細胞にレンチウイルスベクターpLLV-TetOn - 抗PD-1（またはpLLV-TetOn - 抗CTLA-4）を形質導入した際、抗PD-1抗体（または抗CTLA-4抗体）が誘導剤であるドキシサイクリンに対して用量依存的に分泌された（図9A~9B）。12 μg / mLのドキシサイクリンによる48時間の誘導期間の後、7.53 ± 0.89 μg / mLの抗PD-1抗体および53.67 ± 6.74 μg / mLの抗CTLA-4抗体が、それぞれ対応する形質導入T細胞の上清中に検出された。ドキシサイクリン無しの場合、抗PD-1抗体および抗CTLA-4抗体の両者の自然発現は、ドキシサイクリン処理した対応する形質導入細胞のものよりもずっと低かった。

## 【0266】

初代ヒトT細胞にレンチウイルスベクターpLLV-NFAT - 抗PD-1（またはpLLV-NFAT - 抗CTLA-4）を形質導入した際、抗PD-1抗体（または抗CTLA-4抗体）がPMA / PHA - P等のT細胞賦活剤に対して用量依存的に分泌された（図10A~10B）。上記結果と同様、抗CTLA-4抗体は、抗PD-1抗体よりもずっと高い濃度で形質導入初代ヒトT細胞から分泌された。50 ng / mLのPMAおよび1000 ng / mLのPHA - Pによる48時間の誘導期間の後、抗PD-1および抗CTLA-4抗体の分泌は、それぞれ9.57 ± 1.24 μg / mLおよび49.39 ± 5.53 μg / mLに達した。誘導剤PMA / PHA - P無しの場合、抗体の自然発現は、PMA / PHA - Pで処理した対応する宿主細胞と比べて低かった。

## 【0267】

図11に示す通り、初代T細胞をレンチウイルスベクターpLLV-HSP60p - 抗PD-1によって形質導入し、温度を上昇させて熱ショックを行った場合、抗PD-1抗体は、生理学的温度でインキュベートした対応する形質導入宿主細胞における場合（37で608.4 ng / mL）と比べ、有意に高い濃度で分泌された（39で709.5 ng / mL、41で844.2 ng / mL、43で866.8 ng / mL、44で957.8 ng / mL）。

## 【0268】

実施例2：改变宿主細胞によるin vitro分泌抗体の機能アッセイ  
レポーター細胞株の作製

安定的にPD-1を発現するレポーター細胞株を確立した。簡単に記載すると、レンチウイルスベクターの改变を、pLVX - Puro（Clontech #632164）

10

20

30

40

50

を用いて、*Genscript*により、本来のプロモーターをヒト伸長因子1プロモーター(*hEF1*)で置き換え、ピューロマイシン耐性遺伝子を*EcoRI*および*XbaI*を有するT2A連結G418耐性遺伝子で置き換えることによって行った。該ベクターは、*pLLV-hEF1-T2A-G418R*と命名され、分子クローニングの際にいくつかの新たな制限部位*MluI*、*HpaI*、および*BamHI*が該ベクターに加えられた。ヒトPD-1遺伝子(NCBI参照配列番号:NM\_005018.2)配列を、*EcoRI/HpaI*を介して、*pLLV-hEF1-PD-1-T2A-G418R*ベクターにクローニングし、*pLLV-hEF1-PD-1-T2A-G418R*を提供した。これをさらに、上記実施例中に記載されるようにレンチウイルスパッケージング手順で処理した。研究室内で以前に確立した宿主細胞株*Jurkat/NFAT.Luc*(ピューロマイシン耐性)への、PD-1遺伝子を有するレンチウイルスによる形質導入を、7 $\mu$ g/mLのポリブレンの存在下で、1200g、32、1.5時間の遠心分離によって行った。その後、形質導入された細胞を細胞培養インキュベーターに移し、適した誘導条件下で導入遺伝子の発現を行った。陽性細胞をネオマイシン(G418)により選択し、単一クローニングを限界希釀法によって選択した。最良のクローニングを、抗PD-1抗体を用いてFACSにより選別した。図12Aに示す通り、*Jurkat/NFAT.Luc-PD1*と命名された陽性クローニング(*Jurkat.NFAT.Luc.PD1*としても知られる)の例では95.2%がPD-1タンパク質を発現した。

10

## 【0269】

安定的にPD-L1を発現するレポーター細胞株も作製した。簡単に記載すると、ヒトPD-L1遺伝子(NCBI参照配列番号:NM\_014143.3)配列を、*EcoRI/HpaI*を介して、*pLLV-hEF1-PD-L1-T2A-G418R*にクローニングし、ベクター*pLLV-hEF1-PD-L1-T2A-G418R*を提供した。これをさらに、上記実施例中に記載されるようにレンチウイルスパッケージング手順で処理した。その後、宿主細胞株CHOへの、PD-L1遺伝子を有するレンチウイルスによる形質導入を行い、上記のようにG418による選択を行った。CHO/PD-L1安定細胞を、1.25 $\mu$ g/mLのPD-1-Fc融合タンパク質による染色、DPBSによる3回の洗浄、その後、2 $\mu$ g/mLのFITC標識抗ヒトFcによる染色によって、FACSにより選択した。図12Bに示す通り、CHO/PD-L1と命名された陽性クローニング(CHO.PDL1としても知られる)の例では95.2%がPD-L1タンパク質を発現した。

20

## 【0270】

安定的にCTLA-4を発現するレポーター細胞株も確立した。ヒトCTLA-4遺伝子(NCBI参照配列番号:NM\_005214.4)配列を、*EcoRI/HpaI*を介して、*pLLV-hEF1-T2A-G418R*にクローニングし、ベクター*pLLV-hEF1-CTLA4-T2A-G418R*を提供した。これをさらに、上記実施例中に記載されるようにレンチウイルスパッケージング手順で処理した。ヒトCTLA-4遺伝子を有するレンチウイルスを、以前に研究室内で作製した*Jurkat.IL-2*プロモーター-A.Luc安定細胞に導入した。陽性細胞をネオマイシン(G418)により選択し、単一クローニングを限界希釀法によって選択した。最良のクローニングを、抗CTLA-4抗体を用いてFACSにより選別した。図12Cに示す通り、*Jurkat.IL-2*プロモーター-Luc-CTLA-4と命名されたクローニング(*Jurkat.IL2pA.Luc.CTLA4*としても知られる)の例では30.6%がCTLA-4タンパク質を発現した。

30

## 【0271】

## 直接FACS結合アッセイ

分泌された抗PD-1抗体の結合親和性を、安定細胞株*Jurkat/NFAT.Luc-PD-1*上で発現するPD-1タンパク質への結合によって測定した。簡単に記載すると、5 $\times$ 10<sup>5</sup>個の*Jurkat/NFAT.Luc-PD-1*細胞を、実施例1の改変宿主細胞から分泌された抗PD-1抗体(0、0.1、0.3、1、3、10 $\mu$ g/mL

40

50

L<sup>-</sup>）を含む段階希釈した上清と共に、室温で2時間インキュベートした。細胞洗浄を数サイクル行った後、ヒトIgGに対するフルオロフォア標識二次抗体を加え、細胞に結合した抗PD-1抗体をFACSにより検出した。Jurkat/CTLA-4細胞を陰性対照として使用した。

【0272】

分泌された抗CTLA-4抗体の結合親和性を、研究室内で作製した安定細胞株Jurkat/IL-2プロモーター・Luc-CTLA-4上で発現するCTLA-4タンパク質への結合によって測定した。5×10<sup>5</sup>個のJurkat/IL-2プロモーター・Luc-CTLA-4細胞を、実施例1の改变宿主細胞から分泌された抗CTLA-4抗体を含む段階希釈した上清と共に、室温で2時間インキュベートした。細胞洗浄を数サイクル行った後、ヒトIgGに対するフルオロフォア標識二次抗体を加え、細胞に結合した抗CTLA-4抗体をFACSにより検出した。Jurkat/PD-1細胞を陰性対照として使用した。

10

【0273】

図13Aに示すように、改变宿主細胞から分泌された抗PD-1抗体はJurkat/NFAT・Luc-PD-1安定細胞に用量依存的に結合し、0.2μg/mLの濃度において99.5%の結合が達成された。一方、抗PD-1抗体はJurkat/IL-2プロモーター・Luc-CTLA-4細胞に結合しなかった。図13Bに示すように、改变宿主細胞から分泌された抗CTLA-4抗体はJurkat/IL-2プロモーター・Luc-CTLA-4安定細胞に用量依存的に結合（0.1μg/mLで3.77%、1μg/mLで6.49%、10μg/mLで13.20%）したが、Jurkat/NFAT・Luc-PD-1細胞には結合しなかった（<2%）。

20

【0274】

形質導入安定細胞株が発現した抗体の機能的活性

T細胞活性化の回復に対する抗PD-1抗体の効果を評価するため、1~5×10<sup>5</sup>個のJurkat/NFAT・Luc-PD-1レポーター細胞を、CHO/PD-L1細胞と共に、異なるE/T比（1:1、10:1、20:1、1:10、1:20等）で、実施例1の改变宿主細胞から分泌された抗PD-1抗体（例えば、world wide web.Druggank.ca上のアクセション番号DB09037の配列を有するペムブロリズマブ等）の存在下で、一定時間（4時間から72時間等）インキュベートする。並行して、無関係な遺伝子を有するレンチウイルスベクターを同一の細胞株に形質導入し、陰性対照とする。

30

【0275】

1×10<sup>5</sup>~5×10<sup>5</sup>個のJurkat/IL-2プロモーター・Luc-CTLA-4レポーター細胞を、CD80/CD86を発現する抗原提示細胞（RajiまたはU87MG等）と共に、異なるE/T比（1:1、10:1、20:1、1:10、1:20等）で、実施例1の改变宿主細胞から分泌された抗CTLA-4抗体の存在下で、一定時間（4時間から72時間等）インキュベートする。並行して、無関係な遺伝子を有するレンチウイルスベクターを同一の細胞株に形質導入し、陰性対照とする。

【0276】

抗CD3/CD-28ビーズまたはPMA/PHA-P等の非抗原特異的T細胞賦活剤を加え、Jurkat/NFAT・Luc-PD-1またはJurkat/IL-2プロモーター・Luc-CTLA-4レポーター細胞を活性化する。インキュベートした後、ONE-GLO（商標）ルシフェラーゼアッセイ試薬を、共培養した細胞に加える。相対発光単位（relative light unit）（RLU）で測定したアッセイウェルからのルシフェラーゼ活性を、各レポーター細胞の活性化の度合いとする。

40

【0277】

改变宿主細胞から分泌された抗PD-1抗体は、PD-1/PD-L1相互作用を遮断することによって、ヒトIgG抗体を発現する陰性対照との比較におけるRLUの増加によって示唆される、T細胞活性化の回復をもたらす可能性がある。そして、このような効果は、抗PD-1抗体の濃度に依存する可能性がある。

50

## 【0278】

改変宿主細胞から分泌された抗CTLA-4抗体は、CTLA-4/CD80-CD86相互作用を遮断することによって、ヒトIgG抗体を発現する陰性対照との比較におけるRLUの増加によって示唆される、T細胞活性化の回復をもたらす可能性がある。そして、このような効果は、抗CTLA-4抗体の濃度に依存する可能性がある。

## 【0279】

形質導入安定細胞株によるCTLA-4遮断のレポーターアッセイ

ヒトリンバ腫細胞株Raji (ATCC、#CCL86)を、使用説明書に従い、10%FBSを添加した RPMI1640培地で培養した。Raji細胞は、CTLA-4リガンドであるCD80およびCD86を高レベルで発現することが示されている (International Immunology 10(4):499-506. May 1998)。抗CTLA-4抗体を、ヒトHEK293T細胞への、イピリムマブ全長IgGコード配列 (world wide web.Drugbank.ca、アクセッション番号: Ipilimumab DB06186) を有するレンチウイルスベクターの形質導入によって得た。該形質導入細胞を抗CTLA4の分泌に適した条件下で培養し、上清を回収して、細胞に基づいたアッセイに用いた。1×10<sup>5</sup>個のJurkat / IL-2プロモーター・Luc. CTLA-4細胞を96ウェルアッセイプレート (Corning #3610) に播種し、次いで最終濃度20 μg / mLで抗ROR1または抗CTLA-4を加え、37の細胞培養インキュベーター内で1時間インキュベートした。その後、3.2×10<sup>5</sup>個のRaji細胞を各ウェルに加え、共培養アッセイをさらに24または48時間継続した。共培養完了後、各ウェル内のルシフェラーゼ活性を、ONE-GLO (商標) ルシフェラーゼ活性アッセイキット (Promega #E6110) を用いて、使用説明書に従い測定した。プレートをPHERSTAR (商標) Plusマイクロプレートリーダー上で読み取った。図14に示すように、前記共培養アッセイを48時間行った場合、抗CTLA-4 (イピリムマブ) は、関連の無い抗体 (抗ROR1)との比較において、約2.4倍高いRLUシグナルを示した (27, 914.00 ± 3431.00 RLU対 11,585.00 ± 303.00、平均値 ± 標準誤差)。このデータは、上記CTLA-4レポーターアッセイにおいて、CTLA-4遮断がIL-2プロモーター駆動ルシフェラーゼ遺伝子発現を強力に回復させることができたことを示唆する。

## 【0280】

改変初代ヒトT細胞がin vitroで発現した抗体の機能的活性

PD-L1遺伝子および1個の標的遺伝子 (EGFRvIII)、ならびにルシフェラーゼ遺伝子を、レンチウイルスベクターを用いて、ヒト膠芽腫腫瘍細胞株 (U87MG) に導入した。簡単に記載すると、ヒトPD-L1遺伝子 (NCBI参照配列番号: NM\_014143.3) 配列を、EcoRI / HpaIを介して、pLLV-hEF1-T2A-G418Rベクターにクローニングし、ベクター-pLLV-hEF1-PD-L1-T2A-G418Rを提供した。これをさらに、上記のようにレンチウイルスパッケージング手順で処理した。ヒト上皮成長因子受容体バリアントI (EGFRvIII) ヌクレオチド配列を、野生型EGFR (NM\_005228) からエクソン2~7を欠失させ、それによってコード配列の801塩基対をインフレーム欠失させ、繋ぎ目で新規グリシン残基を生成することによって得た (Endocrine-Related Cancer (2001)883-96)。EGFRvIIIヌクレオチド配列を、Xhol / XbaI制限酵素でpLVX-Puroベクターにクローニングし、pLVX-EGFRvIIIベクターを提供した。これをさらに、上記のようにレンチウイルスパッケージング処理した。陽性細胞をG418とピューロマイシンによりスクリーニングし、単一クローンを限界希釈法によって得た。

## 【0281】

細胞をセツキシマブに結合し、次いで、3×1mL DBPS洗浄、抗ヒトIgG検出抗体による染色、およびATTUNENXT (商標) フローサイトメーター (Thermo Fisher) 上でのFACS分析を行うことにより、EGFRvIII発現を確認した。図15Aに示すように、EGFRvIII導入遺伝子の発現が細胞上で検出された (

10

20

30

40

50

45.9%発現)。細胞をPE標識抗PD-L1(Biolegend #329702)で染色し、FACSCALIBUR(商標)(BD Biosciences)でFACSを行うことでPD-L1発現を確認した。図15Bに示すように、PD-L1の発現が88.3%の細胞上で検出された。ルシフェラーゼ遺伝子の発現をONE-GLO(商標)ルシフェラーゼアッセイキット(Promega)で確認し、PHERSTAR(商標)plusマイクロプレートリーダー(BMG Labtech)上で読み取った。U87MG/VIII-Luc-PD-L1と命名された最適クローン(U87MG.EGFRV3.Luc.PDL1またはU87MG.VIII-Luc.PDL1としても知られる)の例では、形質導入していない細胞と比べ、相対発光単位シグナルで示されたルシフェラーゼ活性で98.89倍の増加が見られた。

10

## 【0282】

同様に、CTLA-4リガンド遺伝子(CD80/CD86)および本願発明者らの目的の1個の標的遺伝子、ならびにルシフェラーゼ遺伝子を、レンチウイルスベクターを用いて、ヒト腫瘍細胞株(U87MG)に導入する。最適クローンの一つはU87MG/VIII-Luc-CD80/CD86と命名されている。

## 【0283】

抗PD-1遺伝子を有するレンチウイルスベクター(すなわち、pLLV-hEF1-抗PD-1、pLLV-TetOn-抗PD-1、pLLV-NFAT-抗PD-1、またはpLLV-HSP70p-抗PD-1)を形質導入した初代T細胞と、PD-L1を過剰発現するU87MG/VIII-Luc-PD-L1細胞とを、異なるE/T比(1:1、10:1、20:1、1:10、1:20等)で、適した誘導条件下、一定時間(4時間から72時間等)共培養する。抗CTLA-4遺伝子を有するレンチウイルスベクター(すなわち、pLLV-hEF1-抗CTLA-4、pLLV-TetOn-抗CTLA-4、pLLV-NFAT-CTLA-4、またはpLLV-HSP70p-CTLA-4)を形質導入した初代ヒトT細胞と、CTLA-4リガンドを過剰発現するU87MG/VIII-Luc-CD80/CD86細胞とを、各種誘導条件下で共培養する。抗体分泌初代ヒトT細胞の、腫瘍細胞に対する細胞毒性効果を、残存ルシフェラーゼ活性によってモニタリングする。

20

## 【0284】

並行して、無関係の遺伝子を形質導入した初代ヒトT細胞を前記アッセイに含め、陰性対照とする。同様なアッセイ形式により、前記共培養アッセイにおけるIL-2分泌を、HTRFキットを用いてアッセイする。同様なアッセイ形式により、前記共培養アッセイにおけるIFN-ガンマ分泌を、HTRFキットを用いてアッセイする。

30

## 【0285】

改変初代T細胞によって分泌された抗PD-1抗体は、PD-1/PD-L1相互作用を遮断することによって、ウェル内の残存ルシフェラーゼ活性によって示されるように、また、陰性対照との比較におけるIL-2またはIFN-ガンマの分泌の増加によって示されるように、T細胞活性化と細胞毒性の回復をもたらす可能性がある。このような効果はエフェクター/標的細胞比に対して用量依存的である可能性がある。

40

## 【0286】

改変初代T細胞によって分泌された抗CTLA-4抗体は、CTLA-4/CD80-CD86相互作用を遮断することによって、ウェル内の残存ルシフェラーゼ活性によって示されるように、また、陰性対照との比較におけるIL-2またはIFN-ガンマの分泌の増加によって示されるように、T細胞活性化と細胞毒性の回復をもたらす可能性がある。このような効果はエフェクター/標的細胞比に対して用量依存的である可能性がある。

## 【0287】

実施例3:改変初代ヒトT細胞が発現した抗PD-1抗体は腫瘍細胞に対するCAR-T細胞毒性をin vitroで増強する

抗EGFRVIII-CAR構築物(GS1026)を設計し、レンチウイルスベクターに導入した。該抗EGFRVIII-CAR遺伝子は、N末端からC末端に向かって、

50

CD8 シグナルペプチド、ヒト化抗EGFRvIII scFv、CD8 ヒンジおよび膜貫通(TM)領域、CD137細胞質ドメイン(CD137 cyto)、およびCD3 を含んだ全長抗EGFRvIII CARを含む。中国特許出願第CN201611039855.0号を参照のこと。次のT細胞の実験群を作製した：(1)T/GSI026：抗EGFRvIII-CAR遺伝子(GSI026)を有するレンチウイルスベクターを形質導入した変形ヒト初代T細胞；(2)T/抗PD-1：NFATプロモーターの制御下の抗PD-1抗体(ペムプロリズマブ)遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した変形ヒト初代T細胞；(3)T/GSI026・抗PD-1：抗EGFRvIII-CAR遺伝子(GSI026)とNFATプロモーターの制御下の抗PD-1抗体(ペムプロリズマブ)遺伝子との両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した変形ヒト初代T細胞；および(4)Unt：陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した変形ヒト初代T細胞。さらに、抗EGFRvIII-CAR遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した変形ヒト初代T細胞と、NFATプロモーターの制御下の抗PD-1抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した変形ヒト初代T細胞との混合物を作製し、腫瘍細胞に対する細胞毒性について評価することができる。

## 【0288】

各群の変形初代ヒトT細胞(「エフェクター細胞」)を、PD-L1を過剰発現するU87MG/VIII-Luc-PD-L1細胞(「標的細胞」)と共に、異なるE/T比(5:1、10:1、20:1等)で、5日間共培養した。腫瘍細胞に対する抗体分泌初代ヒトT細胞の細胞毒性のモニタリングを、ONE-GLO(商標)発光アッセイキットを使用説明書に従って使用し、残存ルシフェラーゼ活性を測定することによって行った。該アッセイにおける低いRLU値は、U87MG/VIII-Luc-PD-L1細胞に対する変形T細胞の強い細胞毒性効果を表す。同様なアッセイ形式により、前記共培養アッセイにおける抗PD-1抗体およびIFN-ガンマ分泌を、対応するHTTRFキットを用いて測定した。さらに、IL-2分泌を前記共培養アッセイにおいてモニタリングすることができる。

## 【0289】

図16Aに示すように、標的細胞と共に5日間共培養した場合、抗EGFRvIII-CARと抗PD-1抗体の両者を発現するCAR-T細胞(T/GSI026・抗PD-1)は、抗EGFRvIII-CARのみを発現するCAR-T細胞(T/GSI026、RLU=57, 474±1922)または抗PD-1抗体のみを発現するT細胞(T/抗PD-1、RLU=138, 549±5625)と比べて、U87MG/VIII-Luc-PD-L1腫瘍細胞に対する、より強力な細胞毒性(RLU=45, 151±7385)を示した。図16Bに示すように、共培養5日後には、抗EGFRvIII-CARと抗PD-1抗体の両者を発現するCAR-T細胞(T/GSI026・抗PD-1)は、抗EGFRvIII-CARのみを発現するCAR-T細胞(548.98±12.39pg/mL)または抗PD-1抗体のみを発現するT細胞(314.06±38.64pg/mL)と比べて、高い濃度のIFN-ガンマ(820.66±3.24pg/mL)を分泌した。

## 【0290】

抗PD-1抗体分泌を図16Cに示す。U87MG/VIII-Luc-PD-L1細胞と共に10:1のE/T比で3日間培養した場合、抗EGFRvIII-CARと抗PD-1抗体の両者を発現するCAR-T細胞は、抗PD-1のみを発現するT細胞(0.40±0.04μg/mL)または標的細胞と共に培養しなかったCAR-T細胞(0.42±0.01μg/mL)と比べて、より多くの抗PD-1抗体(0.50±0.02μg/mL)を分泌した。この結果は、前記標的細胞との共培養がCAR-T細胞におけるNFATプロモーターを誘導し、これによって該NFATプロモーターにより駆動される抗PD-1抗体遺伝子の発現が強化され、ひいては前記標的細胞に対する変形T細胞の細胞毒性が強化されることを示唆している。

## 【0291】

10

20

30

40

50

NFATプロモーターに駆動される抗PD-1抗体遺伝子を発現するCAR-Tのこのような強化された細胞毒性は、CARの標的が別の腫瘍抗原BCMAである他のin vitro CAR-T死滅モデル(killing model)においても観察された。図17に示すように、抗BCMA-CAR遺伝子および抗PD-1抗体遺伝子の両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入したヒト初代T細胞(T/BCMA-CAR・抗PD-1)は、腫瘍関連抗原BCMAと抑制性チェックポイント分子リガンドPD-L1とを高度に発現した RPMI-8226 / Luc-PD-L1腫瘍細胞の増殖を強力に阻害した。抗BCMA-CARおよび抗PD-1抗体の両者を発現するCAR-T細胞は、抗BCMA-CARのみを発現するCAR-T細胞(RLU: 7429 ± 971)または抗PD-1抗体のみを発現するT細胞(RLU: 24, 398 ± 1875)よりも高い細胞毒性(RLU: 4807 ± 698)を有していた。  
10

#### 【0292】

これらのデータは、改変初代ヒトT細胞が発現した抗PD-1抗体が、腫瘍細胞に対するCAR-T細胞毒性をin vitroで強化することを示している。

#### 【0293】

同様に、抗PD-1抗体のための他のプロモーターの、改変T細胞の抗腫瘍効果に対する効果を評価するため、hEF1プロモーター、ドキシサイクリン誘導性プロモーター(例えばTETON(登録商標))、または熱誘導性プロモーター(例えばHSP70p)等の他のプロモーターを、上記実験におけるNFATプロモーターの代わりに使用することができる。このようなプロモーターのもとで抗EGFRvII-CARおよび抗PD-1の両者を発現するCAR-T細胞も、U87MG/VIII-Luc-PD-L1腫瘍細胞を死滅させる効果が、抗EGFRvII-CARのみを発現するCAR-T細胞または抗PD-1抗体のみを発現する初代T細胞よりも高い可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子がTet-On系の制御下である場合、ドキシサイクリン等の誘導物質に対して用量依存的である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子がHSP70pの制御下である場合、熱ショックの温度または時間に依存する可能性がある。  
20

#### 【0294】

実施例4：改変初代ヒトT細胞が発現した抗CTLA-4抗体はヒト腫瘍細胞に対するCAR-T細胞毒性をin vitroで増強する  
30

次のT細胞の実験群を作製した：(1) T/GSI026：抗EGFRvII-CAR遺伝子(GSI026)を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(2) T/抗CTLA-4：NFATプロモーターの制御下の抗CTLA-4抗体(イピリムマブ)遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(3) T/GSI026 抗CTLA-4：抗EGFRvII-CAR遺伝子(GSI026)とNFATプロモーターの制御下の抗CTLA-4抗体(イピリムマブ)遺伝子との両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；および(4) unT：陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した改変ヒト初代T細胞。さらに、抗EGFRvII-CAR遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞と、NFATプロモーターの制御下の抗CTLA-4抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞との混合物を作製し、腫瘍細胞に対する細胞毒性について評価することができる。  
40

#### 【0295】

各群の改変初代ヒトT細胞(「エフェクター細胞」)を、CD80/CD86を過剰発現するU87MG/VIII-Luc-CD80/CD86細胞(「標的細胞」)と共に、異なるE/T比(5:1、10:1、20:1等)で、5日間共培養した。腫瘍細胞に対する抗体分泌初代ヒトT細胞の細胞毒性のモニタリングを、ONE-GLO(商標)発光アッセイキットを使用説明書に従って使用し、残存ルシフェラーゼ活性を測定することによって行った。該アッセイにおける低いRLU値は、U87MG/VIII-Luc-CD80/CD86細胞に対する改変T細胞の強い細胞毒性効果を表す。同様なアッセイ  
50

形式により、前記共培養アッセイにおける抗 CTLA-4 抗体、IFN-ガンマ、および IL-2 分泌を、対応する HTTRF キットを用いて測定することができる。

【0296】

図 18 に示すように、標的細胞と共に 5 日間共培養した場合、抗 EGFRvIII-CAR と抗 CTLA-4 抗体の両者を発現する CAR-T 細胞 (T/GSI 026・抗 CTLA-4) は、抗 EGFRvIII-CAR のみを発現する CAR-T 細胞 (T/GSI 026、RLU = 64, 575 ± 4706) または抗 CTLA-4 抗体のみを発現する T 細胞 (T/抗 CTLA-4、RLU: 120, 836 ± 10, 424) と比べて、U87MG/VIII-Luc-CD80/CD86 腫瘍細胞に対する、より強力な細胞毒性 (RLU = 48, 980 ± 7063) を示した。これらのデータは、改変初代ヒト T 細胞が発現した抗 CTLA-4 抗体が、腫瘍細胞に対する CAR-T 細胞毒性を *in vitro* で強化することを示している。

10

【0297】

同様に、抗 CTLA-4 抗体のための他のプロモーターの、改変 T 細胞の抗腫瘍効果に対する効果を評価するため、hEF1 プロモーター、ドキシサイクリン誘導性プロモーター (例えば TETON (登録商標))、または熱誘導性プロモーター (例えば HSP70p) 等の他のプロモーターを、上記実験における NFAT プロモーターの代わりに使用することができる。このようなプロモーターのもとで抗 EGFRvIII-CAR および抗 CTLA-4 の両者を発現する初代 T 細胞も、U87MG/VIII-Luc-CD80/CD86 腫瘍細胞を死滅させる効果が、抗 EGFRvIII-CAR のみを発現する CAR-T 細胞、または抗 CTLA-4 抗体のみを発現する T 細胞よりも、高い可能性がある。このような効果は、形質導入された抗 CTLA-4 遺伝子が Tet-On 系の制御下である場合、ドキシサイクリン等の誘導物質に対して用量依存的である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗 CTLA-4 遺伝子が HSP70p の制御下である場合、熱ショックの温度または時間に依存する可能性がある。

20

【0298】

実施例 5：改変初代ヒト T 細胞が発現した抗 PD-1 抗体はヒト固形腫瘍に対する CAR-T 細胞毒性を *in vivo* で増強する

抗 PD-1 抗体のみ、または該抗体とキメラ抗原受容体 (CAR) との組み合わせを発現する改変ヒト初代 T 細胞の *in vivo* での有効性を、ヒト腫瘍細胞を移植したマウス異種移植モデル内で評価することができる。例えば、U87MG/VIII-Luc-CD-L1 腫瘍細胞を一群の NSG マウスに移植し、ヒト膠芽腫のマウス異種移植モデルが提供される。

30

【0299】

改変ヒト初代 T 細胞を、実施例 1 に記載のように、各種形質導入プロトコルにより作製する。前記のモデル化されたマウスに、次の群の治療用細胞をそれぞれ注入する：(1) 抗 EGFRvIII-CAR 遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞；(2) 抗 PD-1 抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞；(3) 抗 EGFRvIII-CAR 遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞と、抗 PD-1 抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞との混合物；(4) 抗 EGFRvIII-CAR 遺伝子および抗 PD-1 抗体遺伝子の両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞；ならびに(5) 陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した改変ヒト初代 T 細胞。前記抗 PD-1 抗体遺伝子はドキシサイクリン誘導性プロモーター (TETON (登録商標) 等) または NFAT プロモーターの転写制御下にある。各処理条件における抗 PD-1 抗体の分泌は、マウスへの投与前に、またはマウスへの投与後に、適した条件で誘導される。

40

【0300】

各処理条件の有効性を、腫瘍細胞の減少を含むいくつかのパラメーターにより評価する。処理前後に、*in vivo* 生物発光イメージングによって腫瘍サイズをモニタリング

50

してもよい。

【0301】

抗EGFRV111-CARおよび抗PD-1抗体の両者を発現する初代T細胞は、抗EGFRV111-CARのみを発現する初代T細胞、または抗PD-1抗体のみを発現する初代T細胞よりも、U87MG/V111-Luc-PD-L1腫瘍細胞を死滅させることにおいて、より強力である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子がTet-on系の制御下である場合、ドキシサイクリンに対して用量依存的である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子の発現がNFKB1依存誘導性プロモーターの制御下である場合、EGFRV111抗原特異的CAR-Tの存在に依存する可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子がHSP70pの制御下である場合、熱ショックの温度または時間に依存する可能性がある。

10

【0302】

実施例6：改変初代ヒトT細胞が発現した抗CTLA-4抗体はヒト固形腫瘍に対するCAR-T細胞毒性をin vivoで増強する

抗CTLA-4抗体のみ、または該抗体とキメラ抗原受容体(CAR)との組み合わせを発現する改変ヒト初代T細胞のin vivoでの有効性を、ヒト腫瘍細胞を移植したマウス異種移植モデル内で評価することができる。例えば、U87MG/V111-Luc-CD80/CD86腫瘍細胞を一群のNSGマウスに移植し、ヒト膠芽腫のマウス異種移植モデルが提供される。

20

【0303】

改変ヒト初代T細胞を、実施例1に記載のように、各種形質導入プロトコルにより作製する。モデル化されたマウスに、次の群の治療用細胞をそれぞれ注入する：(1)抗EGFRV111-CAR遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(2)抗CTLA-4抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(3)抗EGFRV111-CAR遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞と、抗CTLA-4抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞との混合物；(4)抗EGFRV111-CAR遺伝子および抗CTLA-4抗体遺伝子の両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；ならびに(5)陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した改変ヒト初代T細胞。前記抗CTLA-4抗体遺伝子はドキシサイクリン誘導性プロモーター(TETON(登録商標)等)またはNFKB1プロモーターの転写制御下にある。各処理条件における抗CTLA-4抗体の分泌は、マウスへの投与前に、またはマウスへの投与後に、適した条件で誘導される。

30

【0304】

各処理条件の有効性を、腫瘍細胞の減少を含むいくつかのパラメーターにより評価する。処理前後に、in vivo生物発光イメージングによって腫瘍サイズをモニタリングしてもよい。

【0305】

抗EGFRV111-CARおよび抗CTLA-4抗体の両者を発現する初代T細胞は、抗EGFRV111-CARのみを発現する初代T細胞、または抗CTLA-4抗体のみを発現する初代T細胞よりも、U87MG/V111-Luc-CD80/CD86腫瘍細胞を死滅させることにおいて、より強力である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗CTLA-4遺伝子がTet-on系の制御下である場合、ドキシサイクリンに対して用量依存的である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗CTLA-4遺伝子の発現がNFKB1依存誘導性プロモーターの制御下である場合、EGFRV111抗原特異的CAR-Tの存在に依存する可能性がある。このような効果は、形質導入された抗CTLA-4遺伝子がHSP70pの制御下である場合、熱ショックの温度または時間に依存する可能性がある。

40

【0306】

50

実施例 7：改変初代ヒトT細胞が発現した抗PD-1抗体はヒト液性腫瘍に対するCAR-T細胞毒性をin vivoで増強する

抗PD-1抗体のみ、または該抗体とCARとの組み合わせを発現する改変ヒト初代T細胞のin vivoでの有効性を、ヒト腫瘍細胞を移植したマウス異種移植モデル内で評価することができる。例えば、ルシフェラーゼ導入遺伝子を発現するように改変されたヒト多発性骨髄腫細胞であるRPMI-8226細胞を一群のNSGマウスに移植し、ヒト多発性骨髄腫のマウス異種移植モデルが提供される。

【0307】

改変ヒト初代T細胞を、実施例1に記載のように、各種形質導入プロトコルにより作製する。前記のモデル化されたマウスに、次の群の治療用細胞をそれぞれ注入する：(1)抗BCMA-CAR遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(2)抗PD-1抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(3)抗BCMA-CAR遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞と、抗PD-1抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞との混合物；(4)抗BCMA-CAR遺伝子および抗PD-1抗体遺伝子の両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；ならびに(5)陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した改変ヒト初代T細胞。前記抗PD-1抗体遺伝子はドキシサイクリン誘導性プロモーター(TETON(登録商標)等)またはNFKBプロモーターの転写制御下にある。各処理条件における抗PD-1抗体の分泌は、マウスへの投与前に、またはマウスへの投与後に、適した条件で誘導される。

10

20

30

【0308】

各処理条件の有効性を、腫瘍細胞の減少を含むいくつかのパラメーターにより評価する。処理前後に、in vivo生物発光イメージングによって腫瘍サイズをモニタリングしてもよい。

【0309】

抗BCMA-CARおよび抗PD-1抗体の両者を発現する初代T細胞は、抗BCMA-CARのみを発現する初代T細胞、または抗PD-1抗体のみを発現する初代T細胞よりも、RPMI-8226-Luc腫瘍細胞を死滅させることにおいて、より強力である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子がTet-on系の制御下である場合、ドキシサイクリンに対して用量依存的である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子の発現がNFKB依存誘導性プロモーターの制御下である場合、BCMA抗原特異的CAR-Tの存在に依存する可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子がHSP70pの制御下である場合、熱ショックの温度または時間に依存する可能性がある。

【0310】

実施例8：改変初代ヒトT細胞が発現した抗CTLA-4抗体はヒト液性腫瘍に対するCAR-T細胞毒性をin vivoで増強する

抗CTLA-4抗体のみ、または該抗体とCARとの組み合わせを発現する改変ヒト初代T細胞のin vivoでの有効性を、ヒト腫瘍細胞を移植したマウス異種移植モデル内で評価することができる。例えば、ルシフェラーゼ導入遺伝子を発現するように改変されたヒト多発性骨髄腫細胞であるRPMI-8226細胞を一群のNSGマウスに移植し、ヒト多発性骨髄腫のマウス異種移植モデルが提供される。

40

【0311】

改変ヒト初代T細胞を、実施例1に記載のように、各種形質導入プロトコルにより作製する。前記のモデル化されたマウスに、次の群の治療用細胞をそれぞれ注入する：(1)抗BCMA-CAR遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(2)抗CTLA-4抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(3)抗BCMA-CAR遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞と、抗CTLA-4抗体遺伝子を有するレンチウイ

50

ルスペクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞との混合物；(4)抗BCMA-CAR遺伝子および抗CTLA-4抗体遺伝子の両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；ならびに(5)陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した改変ヒト初代T細胞。前記抗CTLA-4抗体遺伝子はドキシサイクリン誘導性プロモーター(TETON(登録商標)等)またはNFKBプロモーターの転写制御下にある。各処理条件における抗CTLA-4抗体の分泌は、マウスへの投与前に、またはマウスへの投与後に、適した条件で誘導される。

#### 【0312】

各処理条件の有効性を、腫瘍細胞の減少を含むいくつかのパラメーターにより評価する。処理前後に、*in vivo*生物発光イメージングによって腫瘍サイズをモニタリングしてもよい。10

#### 【0313】

抗BCMA-CARおよび抗CTLA-4抗体の両者を発現する初代T細胞は、抗BCMA-CARのみを発現する初代T細胞、または抗CTLA-4抗体のみを発現する初代T細胞よりも、RPMI-8226-Luc腫瘍細胞を死滅させることにおいて、より強力であってもよい。このような効果は、形質導入された抗CTLA-4遺伝子がTet-on系の制御下である場合、ドキシサイクリンに対して用量依存的であってもよい。このような効果は、形質導入された抗CTLA-4遺伝子の発現がNFKB依存誘導性プロモーターの制御下である場合、BCMA抗原特異的CAR-Tの存在に依存してもよい。このような効果は、形質導入された抗CTLA-4遺伝子がHSP70pの制御下である場合、熱ショックの温度または時間に依存してもよい。20

#### 【0314】

実施例9：改変初代ヒトT細胞が発現した抗PD-1抗体は腫瘍細胞に対するTCR-T細胞毒性を*in vitro*で増強する

NY-ESO-1は予後不良な多発性骨髄腫において高度に発現されている(例えば、Blood 105:3939-3944 (2005)を参照のこと)。NY-ESO-1に対するTCRを用いた細胞療法が、例えばWO/2005/113595に記載されている。HLA-A\*0201拘束性NY-ESO-1に対する高親和性TCRを形質導入した自己由来PBMNCの養子移入が、転移性滑膜細胞肉腫および転移性メラノーマの患者に対し、臨床現場で試験されている(例えば、J. Clin. Oncol. 29:917-24 (2011)およびClinical Cancer Research 21:5 (2014)を参照のこと)。また、Rapoport APら(Nat. Med. 21 (8): 914-21 (2015))は、多発性骨髄腫に対する第I/I相臨床試験において有望な臨床結果を報告しており、該臨床試験においては、癌精巣抗原NY-ESO-1およびLAG-1によって共有される天然に加工されたペプチド(naturally processed peptide)を認識する、親和性が強化されたT細胞受容体(TCR)を発現するように改変された自己T細胞を利用している。他の進行中のTCR-T免疫療法の臨床試験は、HLA-DP0401陽性の転移性癌患者に対するMAGE-A3を標的としたTCR免疫療法(NCT02111850)などを含む。30

#### 【0315】

HLA-A\*0201クラスI拘束エレメントとの関連において、NY-ESO-1の残基157~165(NY-ESO-1:157-165)に相当するペプチドSLLMWITQCを認識するTCR(下記表2記載のLIT-001~LIT-006)をコードする、6個のレンチウイルスベクターを設計した。VアルファおよびVベータ配列(野生型バリアント1G4および親和性成熟バリアント113-1G4)を、Li Y, Nature biotechnology. 2005;23:349-354およびRobbins P.F. et al, J Immunol. 2008 May 1;180 (9): 6116-6131に従って設計した。両鎖の定常領域の配列を、Uniprot: TCA: アクセッション番号P01848; TRBC1: アクセッション番号P01850; およびTRBC2: アクセッション番号A0A5B9からの配列に従って設計した。TCRアルファ鎖およびTCRベータ鎖配列を、T2Aペプチド(PLoS ONE 6(4): e18556)により連結した。1G4天然シグナルペプチドまたはCD8シグナルペプチド配列を両鎖40

10

20

30

40

50

に先行させた。さらに、設計された前記 T C R 配列のコドン最適化を行い、ヒト細胞上の最適な発現を可能にした。前記ヌクレオチド配列の合成後、それを、P L V X - P u r o ( Clontech # 6 3 2 1 6 4 ) の本来のプロモーターをヒト伸長因子 1 プロモーター ( h E F 1 ) と置き換え、ピューロマイシン耐性遺伝子を欠失させるように改変したレンチウイルスベクターにクローニングした。前記 T C R をコードするベクター ( p L L V - L I T 0 0 1 ~ p L L V - L I T 0 0 6 ) は、上述の実施例に記載のように、293T 細胞におけるレンチウイルスパッケージング系で生成した。

【表 2】

表 2. 構築したベクター

TCR	シグナルペプチド	V アルファ	アルファ定常部	2A	シグナルペプチド	V ベータ	ベータ定常部
LIT-001	CD8 <sup>α</sup> SP-6His	113-1G4	TCA (P01848)	P2A	CD8 <sup>α</sup> SP	113-1G4	TRBC1 (P01850)
LIT-002	1G4 天然 SP-6His	113-1G4	TCA (P01848)	P2A	1G4 天然 SP	113-1G4	TRBC1 (P01850)
LIT-003	1G4 天然 SP-6His	Wt 1G4	TCA (P01848)	P2A	1G4 天然 SP	Wt 1G4	TRBC1 (P01850)
LIT-004	CD8 <sup>α</sup> SP-6His	113-1G4	TCA (P01848)	P2A	CD8 <sup>α</sup> SP	113-1G4	TRBC2 (A0A5B9)
LIT-005	1G4 天然 SP-6His	113-1G4	TCA (P01848)	P2A	1G4 天然 SP	113-1G4	TRBC2 (A0A5B9)
LIT-006	1G4 天然 SP-6His	Wt 1G4	TCA (P01848)	P2A	1G4 天然 SP	Wt 1G4	TRBC2 (A0A5B9)

【0316】

ドナーのアフェレーシス血液試料由来の P B M C より、初代ヒト T 細胞を、磁気ビーズ分離によって使用説明書に従い単離した ( Human P a n T i s o l a t i o n k i t, M i l t e n y i # 1 3 0 - 0 9 6 - 5 3 5 )。初代 T 細胞を、 h u m a n T C e l l A c t i v a t i o n / E x p a n s i o n K i t ( M i l t e n y i # 1 3 0 - 0 9 1 - 4 4 1 ) を用いて 2 日間プレ活性化した。その後、プレ活性化された T 細胞に、上記 T C R をコードするレンチウイルスベクターを形質導入し、 T C R である L I T - 0 0 1 ~ L I T - 0 0 6 を発現する T C R - T 細胞を作製した。

【0317】

NY - E S O - 1、 H L A - A \* 0 2 0 1 、および P D - L 1 、ならびにレポータールシフェラーゼを発現する、ヒト悪性神経膠腫細胞株である U 8 7 M G 細胞を作製した。これを本明細書において U 8 7 M G / E S O 1 - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞と呼ぶ。 NY - E S O - 1 を発現する別の腫瘍細胞株も記載されている。例えば、 J. Immunother. 37: 135-16 (2014) を参照のこと。このような細胞株を、改変初代ヒト T 細胞の評価のために、同様な細胞毒性アッセイにおいて使用することができる。例えば、 NY - E S O - 1 および H L A - A \* 0 2 0 1 、ならびにレポータールシフェラーゼを発現する、ヒト多発性骨髄腫細胞株である R P M I 8 2 2 6 細胞を作製し、 T C R - T 細胞の細胞毒性評価のた

10

20

30

40

50

めのレポーター腫瘍細胞株 R P M I 8 2 2 6 - L u c / N Y - E S O - 1 - A 2 を提供することができる。

【 0 3 1 8 】

前記 T C R - T 細胞の細胞毒性を評価するため、該 T C R - T 細胞をそれぞれ U 8 7 M G / E S O 1 - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞と共に、20:1のE/T比で48時間共培養した。腫瘍細胞に対する T C R - T 細胞の細胞毒性を、O N E - G L O (商標) 発光アッセイキットを用いて上記のように測定した。図 1 9 A に示すように、L I T - 0 0 1 ~ L I T - 0 0 6 を発現する T C R - T 細胞は、U 8 7 M G / E S O 1 - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞に対して様々な強度の細胞毒性を示した。この6種の T C R 構築物のうち、L I T - 0 0 6 T 細胞は 2 8 . 2 5 % の細胞毒性に相当する最高の強度 (R L U = 2 5 5 , 1 7 1 ± 1 9 , 2 5 1 ) を有していた。従って、L I T - 0 0 6 T C R を発現する T C R - T 細胞を、腫瘍細胞に対する T C R - T の有効性に対する、抗 P D - 1 発現の効果を評価するための例として選択した。 10

【 0 3 1 9 】

また、h E F 1 プロモーターの転写制御下の抗 P D - 1 遺伝子を有するレンチウイルスベクター (すなわち p L L V - h E F 1 - 抗 P D - 1 ) を、実施例 1 に記載のようにレンチウイルスパッケージング系で生成した。

【 0 3 2 0 】

改変初代ヒト T 細胞が発現した抗 P D - 1 抗体が T C R - T の細胞毒性を増強できるか決定するため、次の群の改変初代ヒト T 細胞を、U 8 7 M G / E S O 1 - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞と共に、20:1のE/T比で48時間共培養した：(1) T / T C R : 抗 N Y - E S O - 1 - T C R 遺伝子を有するレンチウイルスベクター p L L V - L I T - 0 0 6 を形質導入した改変ヒト初代 T 細胞；(2) T / 抗 P D - 1 : h E F 1 プロモーターの転写制御下の抗 P D - 1 抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞；(3) T / T C R · 抗 P D - 1 : 抗 N Y - E S O - 1 - T C R 遺伝子 (p L L V - L I T - 0 0 6 ) と h E F 1 プロモーターの転写制御下の抗 P D - 1 抗体遺伝子との両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞；および(4) u n T : 陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した改変ヒト初代 T 細胞。さらに、抗 N Y - E S O - 1 - T C R 遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞と、抗 P D - 1 抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞との混合物を作製し、腫瘍細胞に対する細胞毒性について評価することができる。 20

【 0 3 2 1 】

図 1 9 B に示すように、抗 N Y - E S O - 1 - T C R および抗 P D - 1 の両者を発現する T C R - T 細胞 (T / T C R · 抗 P D - 1 ) は、抗 N Y - E S O - 1 - T C R のみを発現する T C R - T 細胞 (R L U = 2 5 5 , 1 7 1 ± 1 9 , 2 5 1 ) または抗 P D - 1 抗体のみを発現する T 細胞 (R L U = 3 5 5 , 1 0 9 ± 1 0 , 5 1 0 ) と比べて、U 8 7 M G / E S O 1 - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞を死滅させることにおいて、より強力であった (R L U = 2 3 2 , 5 6 7 ± 1 5 , 4 6 4 )。これに対応して、図 1 9 C に示すように、U 8 7 M G / E S O 1 - l u c - P D - L 1 腫瘍細胞との48時間の共培養後、抗 N Y - E S O - 1 - T C R および抗 P D - 1 の両者を発現する T C R - T 細胞 (T / T C R · 抗 P D - 1 ) は、抗 N Y - E S O - 1 - T C R のみを発現する T C R - T 細胞 (1 7 7 . 5 2 ± 7 . 6 8 p g / m L ) または抗 P D - 1 抗体のみを発現する T 細胞 (7 3 . 1 9 ± 1 . 8 8 p g / m L ) と比べて、より高濃度の I F N - ガンマを分泌した (2 0 0 . 7 7 ± 1 . 1 3 p g / m L )。 40

【 0 3 2 2 】

これらのデータは、改変初代ヒト T 細胞が発現した抗 P D - 1 抗体が、腫瘍細胞に対する T C R - T 細胞毒性を i n v i t r o で強化することを示している。

【 0 3 2 3 】

同様に、抗 P D - 1 抗体のための他のプロモーターの、改変 T 細胞の抗腫瘍効果に対す

10

20

30

40

50

る効果を評価するため、ドキシサイクリン誘導性プロモーター（例えばTETON（登録商標））、熱誘導性プロモーター（例えばHSP70p）、またはNFKBプロモーター等の他のプロモーターを、上記実験におけるhEF1プロモーターの代わりに使用することができる。このようなプロモーターのもとで抗NY-ESO-1-TCRおよび抗PD-1の両者を発現するTCR-T細胞も、腫瘍細胞を死滅させる効果が、抗NY-ESO-1-TCRのみを発現するTCR-T細胞または抗PD-1抗体のみを発現する初代T細胞よりも高い可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子がTet-On系の制御下である場合、ドキシサイクリン等の誘導物質に対して用量依存的である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗PD-1遺伝子がHSP70pの制御下である場合、熱ショックの温度または時間に依存する可能性がある。

10

#### 【0324】

実施例10：改変初代ヒトT細胞が発現した抗CTLA-4抗体は腫瘍細胞に対するTCR-T細胞毒性をin vitroで増強する

HLA-A\*0201クラスI拘束エレメントとの関連において、NY-ESO-1の残基157～165(NY-ESO-1:157-165)に相当するペプチドSLLMWITQCを認識するTCR(LIT-006)をコードするレンチウイルスベクターを、293-6E細胞におけるレンチウイルスパッケージング系で生成した。また、hEF1プロモーターの転写制御下にある抗CTLA-4遺伝子を有するレンチウイルスベクター(すなわちpLLV-hEF1-抗CTLA-4)を、実施例1に記載のようにレンチウイルスパッケージング系で生成した。

20

#### 【0325】

初代ヒト末梢血単核球(PBMC)を、健常ドナー由来の末梢血を密度勾配遠心することで調製した。磁気ビーズ分離を用いてPBMCからヒト初代T細胞を精製した。

#### 【0326】

NY-ESO-1、HLA-A\*0201、およびCD80/CD86、ならびにレポータールシフェラーゼを発現する、ヒト悪性神経膠腫細胞株であるU87MG細胞を作製した。これを本明細書においてU87MG/ESO1-luc-CD80/CD86腫瘍細胞と呼ぶ。RPMI8226-Luc/NY-ESO-1-A2などの、NY-ESO-1を発現する他の腫瘍細胞株を用いて、TCR-T細胞の細胞毒性の評価のために使用することができる。

30

#### 【0327】

次の群の改変初代ヒトT細胞を、それぞれU87MG/ESO1-luc-CD80/CD86腫瘍細胞と48時間共培養した：(1)T/TCR：抗NY-ESO-1-TCR遺伝子を有するレンチウイルスベクターpLLV-LIT-006を形質導入した改変ヒト初代T細胞；(2)T/抗CTLA-4：hEF1プロモーターの転写制御下の抗CTLA-4抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(3)T/TCR抗CTLA-4：抗NY-ESO-1-TCR遺伝子(pLLV-LIT-006)とhEF1プロモーターの転写制御下の抗CTLA-4抗体遺伝子との両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；ならびに(4)unt：陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した改変ヒト初代T細胞。さらに、抗NY-ESO-1-TCR遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞と、抗CTLA-4抗体遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞との混合物を作製し、腫瘍細胞に対する細胞毒性について評価することができる。

40

#### 【0328】

図20に示すように、抗NY-ESO-1-TCRおよび抗CTLA-4の両者を発現するTCR-T細胞(T/TCR・抗CTLA-4)は、抗NY-ESO-1-TCRのみを発現するTCR-T細胞(RLU=255, 171±19, 251)または抗CTLA-4抗体のみを発現するT細胞(RLU=355, 109±10, 510)と比べて、U87MG/ESO1-luc-CD80/CD86腫瘍細胞を死滅させることにおいて

50

、より強力であった（R L U = 232, 567 ± 15, 464）。これらのデータは、改変初代ヒトT細胞が発現した抗CTLA-4抗体が、腫瘍細胞に対するTCR-T細胞毒性を *in vitro* で強化することを示している。

### 【0329】

同様に、抗CTLA-4抗体のための他のプロモーターの、改変T細胞の抗腫瘍効果に対する効果を評価するため、ドキシサイクリン誘導性プロモーター（例えばTETON（登録商標））、熱誘導性プロモーター（例えばHSP70p）、またはNFATプロモーター等の他のプロモーターを、上記実験におけるhEF1プロモーターの代わりに使用することができる。このようなプロモーターのもとで抗NY-ESO-1-TCRおよび抗CTLA-4抗体の両者を発現するTCR-T細胞も、腫瘍細胞を死滅させる効果が、抗NY-ESO-1-TCRのみを発現するTCR-T細胞または抗CTLA-4抗体のみを発現する初代T細胞よりも高い可能性がある。このような効果は、形質導入された抗CTLA-4遺伝子がTet-On系の制御下である場合、ドキシサイクリン等の誘導物質に対して用量依存的である可能性がある。このような効果は、形質導入された抗CTLA-4遺伝子がHSP70pの制御下である場合、熱ショックの温度または時間に依存する可能性がある。

10

### 【0330】

実施例11：改変初代ヒトT細胞による抗HER2抗体および免疫チェックポイント阻害剤の共発現は、*in vitro* で腫瘍細胞に対する強力な細胞毒性を示す

初代ヒト末梢血単核球（PBMC）を、健常ドナー由来の末梢血を密度勾配遠心することで調製した。磁気ビーズ分離を用いてPBMCからヒト初代T細胞を精製した。抗HER2抗体の軽鎖および重鎖をコードする配列を設計し、2個のpcDNA3.1プラスミドベクターにそれぞれクローニングした。4 μgの各プラスミドを、43msのパルス時間用いた665Vのエレクトロポレーションにより、 $1 \times 10^7$ 個のヒト初代T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトされたT細胞をex vivoで3日間増殖させた。その後、トランスフェクトされたT細胞の一部に抗PD-1抗体（または抗CTLA-4抗体）遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入し、抗HER2および抗PD-1（または抗CTLA-4）抗体を発現させた。抗体の分泌は、LANDPOWER（商標）Human Fc Detection kit（GenScript #L00656-1000）を用いたHTRF法で検出することができる。

20

30

### 【0331】

図21A～21Bに示すように、抗HER2抗体遺伝子をコードするプラスミドをトランスフェクトした改変ヒト初代T細胞は、48時間の培養で $1.02 \pm 0.136 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗HER2抗体を発現および分泌した。抗HER2および抗PD-1（または抗CTLA-4）抗体を共発現するように改変したT細胞は、両抗体を、合計発現量において、抗HER2+抗PD-1については $3.07 \pm 0.046 \mu\text{g}/\text{mL}$ （図21A）、抗HER2+抗CTLA-4については $34.24 \pm 0.64 \mu\text{g}/\text{mL}$ （図21B）分泌した。

30

### 【0332】

分泌された抗体の生物活性を、HER2を過剰発現するヒト乳癌細胞株SK-BR-3を用いた*in vitro*腫瘍細胞増殖阻害アッセイにおいて評価した。ここで、SK-BR-3細胞はルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するように改変されており（以後、「SK-BR-3/Luc細胞」と呼ぶ）、これによってルシフェラーゼ活性のアッセイにより生腫瘍細胞の定量が可能となる。ハーセプチン（トラスツズマブ）として知られる抗HER2抗体は、SK-BR-3/Luc細胞に対する強力な細胞毒性を有する。

40

### 【0333】

抗PD-1抗体（または抗CTLA-4抗体）および抗HER2抗体をコードするベクターを形質導入することにより、4群の改変ヒト初代T細胞を作製した：（1）T/抗HER2：抗HER2抗体遺伝子をコードするプラスミドをトランスフェクトした改変ヒト初代T細胞；（2）T/抗PD-1（またはT/抗CTLA-4）：抗PD-1抗体（ま

50

たは抗 C T L A - 4 抗体) 遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞; (3) T / 抗 H E R 2 · 抗 P D - 1 (または T / 抗 H E R 2 · 抗 C T L A - 4) : 抗 H E R 2 抗体遺伝子をコードするプラスミドをトランスフェクトし、さらに抗 P D - 1 (または抗 C T L A 4) 遺伝子を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代 T 細胞; ならびに (4) u n T : 陰性対照としての形質導入していない初代ヒト T 細胞。この実験では、抗 P D - 1 および抗 C T L A - 4 抗体遺伝子は h E F 1 プロモーターのもとで駆動され、抗 H E R 2 抗体遺伝子は h C M V i e プロモーターのもとで駆動された。

### 【 0 3 3 4 】

形質導入 3 日後、各群の改変 T 細胞を、 2 0 : 1 の E : T 比で S K - B R - 3 / L u c 細胞をあらかじめ播種した 9 6 ウェルプレートに加え、 7 日間共培養を行った。ウェル内の残存ルシフェラーゼ活性を、 O N E - G L O (商標) ルシフェラーゼアッセイキットを用いて測定し、腫瘍細胞に対する前記改変 T 細胞の細胞毒性を評価した。低い値の相対発光単位 (R L U) は、 S K - B R - 3 / L u c 細胞に対して前記改変 T 細胞の細胞毒性が強いことを表す。

### 【 0 3 3 5 】

図 2 2 A に示すように、一方または両方の抗体 (抗 H E R 2 および / または抗 P D - 1) を発現する改変 T 細胞は、非形質導入 T 細胞 (U n T) と比べ、 S K - B R - 3 / L u c 細胞に対する高い細胞毒性を有していた。抗 H E R 2 および抗 P D - 1 抗体の両者を発現する改変 T 細胞 (R L U = 6 9, 7 1 9 ± 1 3, 3 8 2, U n T との比較において 9 3 . 7 8 % の阻害) は、抗 H E R 2 のみ (R L U = 4 1 4, 3 1 7 ± 2 4, 8 9 4, 6 3 . 0 1 % の阻害) または抗 P D - 1 のみ (R L U = 2 5 3, 6 1 6 ± 5 3 9 2, 7 7 . 3 6 % の阻害) を発現する T 細胞と比べ、 S K - B R - 3 / L u c 細胞に対する強化された抗腫瘍効果を示した。また、抗 H E R 2 および抗 P D - 1 抗体の両者を発現する T 細胞は、抗 P D - 1 のみを発現する T 細胞 (T / 抗 P D - 1) と 2 0 μ g / m L のハーセプチンとの組み合わせと比べても、優れた抗腫瘍効果を有していた。これらのデータは、改変初代 T 細胞による抗 H E R 2 抗体と免疫チェックポイント阻害剤 (抗 P D - 1 抗体等) の共発現が、 i n v i t r o で腫瘍細胞に対して強力な細胞毒性を有することを示している。

### 【 0 3 3 6 】

図 2 2 B に示すように、一方または両方の抗体 (抗 H E R 2 および / または抗 C T L A - 4) を発現する改変 T 細胞は、非形質導入 T 細胞 (U n T) と比べ、 S K - B R - 3 / L u c 細胞に対する高い細胞毒性を有していた。しかし、抗 H E R 2 および抗 C T L A - 4 抗体の両者を発現する改変 T 細胞は、抗 H E R 2 のみもしくは抗 C T L A - 4 のみを発現する T 細胞、または抗 C T L A - 4 を発現する T 細胞と 2 0 μ g / m L のハーセプチンとの組み合わせと比べて、 S K - B R - 3 / L u c 細胞に対する強化された抗腫瘍効果を示さなかった。

### 【 0 3 3 7 】

同様に、抗 H E R 2 および抗 P D - 1 (または抗 C T L A - 4) 抗体のための他のプロモーターの、改変 T 細胞の抗腫瘍効果に対する効果を評価するため、ドキシサイクリン誘導性プロモーター (例えば T E T O N (登録商標)) 、熱誘導性プロモーター (例えば H S P 7 0 p) 、または N F A T プロモーター等の他のプロモーターを、上記実験における h E F 1 プロモーターの代わりに使用することができる。

### 【 0 3 3 8 】

実施例 1 2 : 肺癌の治療のための免疫チェックポイント阻害剤を発現する抗 E G F R C A R - T の設計

#### 序論

肺癌は世界的に最も多い癌死の原因であり、癌関連死の 5 件あたり約 1 件、または推定 1 6 0 万人が関与している。米国および中国の両者で、肺癌は、男性と女性の両者における癌関連死の原因として、群を抜いて第 1 位となっている。米国癌協会によると、 2 2 1 , 0 0 0 人より多くの米国人が 2 0 1 5 年中に肺癌と診断され、 N S C L C が全ての肺癌

10

20

30

40

50

のうち 85% を占めている。肺癌と診断された米国内の患者のうち、全体で 17.4% が診断後に 5 年間生存するが、発展途上国においては平均的な臨床成績は低下する。

### 【0339】

肺癌患者の大部分が末期疾患（第ⅢⅢb / Ⅳ期）と診断される。これらの患者において、手術、化学療法、および放射線療法を含む従来の治療選択肢は、生存を有意に改善し、症状の軽減をもたらしうるもの、それらが治癒に結びつく可能性は低い。特定の遺伝子変異を有する患者は、上皮成長因子受容体（EGFR）遮断薬であるエルロチニブ（erlotinib）（TARCEVA（登録商標））、アファチニブ（afatinib）（GILLOTRI-F（登録商標））、およびゲフィチニブ（gefitinib）（IRESSA（登録商標））等の標的療法による恩恵を受ける可能性がある。これらの薬剤は EGFR からのプロ増殖シグナル（pro-growth signals）を遮断する。これらの薬剤は EGFR 遺伝子に特定の変異を有する患者に使用することができ、これらは、女性や、喫煙経験の無い患者により一般的である。

10

### 【0340】

免疫療法は、他の治療が有効でない患者を含む肺癌患者に、有意な利益を提供する可能性がある。ベバシズマブ（bevacizumab）（AVASTIN（登録商標））は、新生血管の増殖を補助するタンパク質である血管内皮増殖因子（VEGF）を標的とするモノクローナル抗体である。AVASTIN（登録商標）は、腫瘍における新生血管の増殖、すなわち血管新生と呼ばれるプロセスを防ぐことにより、該腫瘍細胞における栄養飢餓を引き起こす。ラムシルマブ（Ramucirumab）（CYRAMZA（登録商標））は、NSCLC を治療するために使用することができる他の血管新生阻害剤である。2015 年には、2 種の新たな免疫療法薬、ニボルマブ（nivolumab）（OPDIVO（登録商標））およびペムプロリズマブ（pembrolizumab）（KEYTRUDA（登録商標））が、肺癌の治療用として FDA に認可された。ニボルマブおよびペムプロリズマブの両者は、ヒト PD-1 分子を標的とする。より最近の 2016 年には、別の新たな免疫療法薬、アテゾリズマブ（atezolizumab）（TECENTRIQ（商標））が膀胱癌の治療用として認可された。アテゾリズマブは、PD-L1 分子と名付けられた、主要な PD-1 リガンドの一つを標的とする。アテゾリズマブは現在、数件の第Ⅲ相肺癌臨床試験において試験中である。臨床試験におけるその有効性と安全性により、アテゾリズマブは肺癌の治療に対してもなく認めると信じられている。

20

### 【0341】

養子細胞療法、より具体的にはキメラ抗原受容体改変 T 細胞療法が、近年、肺癌の治療のための多くの臨床試験において試験されてきた。NY-ESO-1（NCT01697527、NCT01967823）、VEGFR2（NCT01218867）、MAGE-A3（NCT02111850）、メソテリン（NCT01583686、NCT02414269）、およびWT1（NCT02408016）を含むいくつかの標的が研究されている。また、NY-ESO-1 を標的とするように遺伝的に改変された T 細胞と、チェックポイント阻害剤イピリムマブ（ipilimumab）（NCT02070406）との組み合わせの第Ⅰ相研究もある。これまでのところ、このような抗原を標的とする CAR-T についてはわずかな進展しかない。

30

### 【0342】

Erbb-1 または HER1 としても知られる EGFR は、4 つの密接に関連した受容体チロシンキナーゼ（RTK）：EGFR（Erbb-1）、HER2/c-neu（Erbb-2）、Her3（Erbb-3）、およびHer4（Erbb-4）からなるサブファミリーである上皮成長因子受容体における、受容体の 1 つである。EGFR の主要な天然リガンドの一つは EGF である。

40

### 【0343】

EGFR は約 40% ~ 80% の NSCLC で過剰発現されている（Cancer (2002) 94: 1593-1611; Lancet Oncol. (2003) 4:397-406）。各種組織型の肺癌の中で、EGFR 過剰発現は扁平上皮癌（84%）および大細胞癌（68%）において最も頻度が高く、小細胞

50

肺癌において最も頻度が低い (The Oncologist (2006) 11:358-373)。

【0344】

多くの治療方法がEGFRを標的としている。セツキシマブ (cetuximab) およびパニツムマブ (panitumumab) は、EGFRに対するモノクローナル抗体阻害剤の例である。臨床開発中の他の抗EGFRモノクローナル抗体としては、ザルツムマブ (zalutumumab)、ニモツズマブ (nimotuzumab)、およびマツズマブ (matuzumab) が挙げられる。これらのモノクローナル抗体はEGFRの細胞外リガンド結合ドメインを遮断する。

【0345】

しかし、EGFRは各種の正常組織においても低発現量で広範に発現している。従って、EGFRを標的とする細胞治療戦略は慎重な設計が必要である。例えば、他の例において、CAR-T開発の初期段階で、ヒト化mAbトラスツズマブ由来のscFvを使用して構築されたERBB2特異的CAR-T細胞の輸液を行ったところ、肺における致死的な炎症性サイトカイン放出を引き起こした (Morgan RA et al, Mol. Ther. (2010) 18: 843-851)。この毒性は、肺上皮細胞上の低濃度のERBB2発現に対するon-target off-tumor認識に起因するものであった。

10

【0346】

肺癌などのEGFRを過剰発現する腫瘍に対する安全で効果的な細胞療法は、未だその必要性が満たされないままである。

20

【0347】

実験設計

本実施例では、単一のベクターにコードされる、EGFRを標的とするCARと、免疫チェックポイント阻害剤を共発現するように、初代T細胞を改変した (図7A)。前記抗EGFR CARは、EGFRを過剰発現する肺癌部位にT細胞を誘導し、その肺癌部位で前記免疫チェックポイント阻害剤の部位特異的発現を引き起こす。前記抗EGFR CARが腫瘍細胞上のEGFRへ結合することにより、該CARの短縮型または変異型細胞内シグナル伝達ドメインが活性化され、それによって前記改変T細胞による減弱化された下流の免疫応答が引き起こされ、宿主内の非改変免疫細胞のリクルートによって腫瘍細胞が死滅するが、低濃度のEGFRを発現する正常細胞は死滅しない。この免疫応答はさらに、例えばT細胞メモリーや組織ホーミングを強化し、またT細胞の増殖および生存を促進する、1つまたは複数の免疫賦活剤 (図7B) を過剰発現するように前記CAR-Tを改変することで増強されうる。

30

【0348】

抗EGFR CARをコードするベクターのパネルを、in vivoにおける安全性、持続性、および組織ホーミング能が改善されたCAR-Tの作製のために設計した (図23)。EGFRを発現する肺癌細胞における免疫チェックポイント阻害剤抗体の部位特異的発現を誘導するため、抗EGFR CARのEGFR結合ドメインは、EGFRに対するヒト化モノクローナル抗体のクローン425 (mAb425) に基づいた。構築物GSI052は、N末端からC末端に向かって、CD8シグナルペプチド、mAb425scFv、CD8ヒンジおよび膜貫通(TM)領域、CD137細胞質ドメイン (CD137cyto)、およびCD3を含んだ全長抗EGFR CARをコードする。

40

【0349】

mAb425は、BALB/cマウスを、EGFRを高度に過剰発現することが知られる細胞株であるヒトA431細胞で免疫することにより作製した。mAb425をさらにヒト化し、マツズマブ (matuzumab) を提供した (米国特許第5,558,864号を参照のこと)。mAb425は高い親和性でEGFRに結合する。前臨床試験において、mAb425がEGFR依存性腫瘍の増殖を阻害し、VEGFの発現を阻害し、ADCを誘導することが示された。マツズマブは、2000年代の初頭に、結腸直腸、肺、食道、および胃癌の治療に対する第I相臨床試験が行われた。しかし、さらなる臨床試験は2007年の第I相試験以降は行われなかった。2008年2月18日、タケダとメルクはマツズマブの開発をもはや続行しないことを発表した。

50

## 【0350】

E G F R は正常組織に広範に発現しているため、C A R - T 細胞の *i n vivo* での安全性を改善するため、C D 3 ドメイン（すなわち C D 3 z ）が欠失または変異した短縮型の抗 E G F R C A R が設計された。例えば、構築物 G S I 0 5 3 は G S I 0 5 2 をもとに設計されたが、G S I 0 5 3 は C D 3 ドメインを有しない。G S I 0 5 3 は、N 末端から C 末端に向かって、C D 8 シグナルペプチド、m A b 4 2 5 s c F v 、C D 8 ヒンジ、および T M 、ならびに C D 1 3 7 細胞質ドメインを含む。

## 【0351】

次に、免疫チェックポイント阻害剤抗体をコードする配列を、前記の短縮型抗 E G F R C A R をコードする配列の隣にクローニングした。例えば、構築物 G S I 0 5 4 においては、抗 P D - 1 コード配列を C D 1 3 7 細胞質ドメインの隣にクローニングした。従って、G S I 0 5 4 は、N 末端から C 末端に向かって、C D 8 シグナルペプチド、m A b 4 2 5 s c F v 、C D 8 ヒンジおよび T M 、ならびに C D 1 3 7 細胞質ドメインと、抗 P D - 1 とを含む。

10

## 【0352】

前記短縮型抗 E G F R C A R は、免疫チェックポイント阻害剤抗体の発現を、E G F R 発現組織、特に E G F R 過剰発現腫瘍部位に対して向けることができ、その一方で標的細胞の過度の殺傷を回避することができる。前記短縮型抗 E G F R C A R 単体では E G F R 発現細胞に対して有意な細胞毒性を引き出すことはできないが、該短縮型抗 E G F R C A R は、E G F R を過剰発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する潜在的な能力を有する。

20

## 【0353】

注入された改変 C A R - T 細胞の *i n vivo* での持続性を強化するため、I L - 7 、I L - 2 1 、および B c 1 2 等の 1 つまたは複数の免疫賦活剤をベクター内に配置した。例えば、G S I 0 5 5 ~ G S I 0 6 0 は G S I 0 5 4 をもとに設計されたが、G S I 0 5 5 ~ G S I 0 5 7 には I L - 7 をコードするさらなる配列を加え、G S I 0 5 8 ~ G S I 0 6 9 には I L - 2 1 をコードするさらなる配列を加えた。I L - 7 はナイーブおよびメモリー C D 4 + 、C D 8 + T 細胞の恒常性を媒介することができ、また、I L - 7 は血液悪性腫瘍（急性リンパ性白血病または T 細胞リンパ腫等）を促進することもできる。I L - 2 1 は T ( e f f s ) の維持を促進することができる。構築物 G S I 0 5 7 および G S I 0 6 0 には、さらに B c 1 - 2 をコードする配列も加えた。B c 1 - 2 を過剰発現する T 細胞は、活性化誘導細胞死（A I C D ）に対して、より耐性を有しうる。

30

## 【0354】

組織ホーミングを強化するため、C C R 2 b をコードする配列を構築物 G S I 0 5 6 および G S I 0 5 7 に加え、C C R 4 をコードする配列を構築物 G S I 0 5 9 および G S I 0 6 0 に加えた。C C R 2 b を発現する活性化 T 細胞（A T C ）は、C C R 2 陰性 A T C と比べ、C C L 2 分泌神経芽細胞腫に対する改善されたホーミング（> 10 倍）を有する。C C R 4 と、C D 3 0 を標的とするキメラ抗原受容体とを共発現する T リンパ球は、ホジキン腫瘍モデルにおいて改善されたホーミングおよび抗腫瘍活性を有する。

## 【0355】

前記マルチシストロン性構築物において、前記 C A R 、抗 P D - 1 抗体、および任意に 1 つまたは複数の免疫賦活剤は同一のレンチウイルスベクターにコードされ、同一の構成的プロモーター h E F 1 によって駆動された。異なるタンパク質コード配列間を F 2 A および T 2 A 等の自己切断可能なリンクで置換し、高効率の複数遺伝子共発現を可能にした。

40

## 【0356】

ヒト初代 T 細胞に、構築物 G S I 0 5 2 ~ G S I 0 6 0 をそれぞれ含むレンチウイルスベクターを形質導入し、C A R - T 細胞を提供した。m A b 4 2 5 に基づいた全長 C A R - T ( G S I 0 5 2 ) または短縮型 C A R - T ( G S I 0 5 3 ) の *i n vitro* での有効性を、E G F R を過剰発現する肺癌細胞株である A 5 4 9 - L u c 細胞を用いて研究した。さらに、構築物 ( G S I 0 5 4 ~ G S I 0 6 0 ) を有する C A R - T 細胞について

50

、抗P D - 1、I L - 7 / I L - 2 1、C C R 2 b / C C R 4、およびB c 1 2のi n v i t r oでの発現を測定した。i n v i v oでの抗腫瘍効果を、A 5 4 9 - L u cを移植したN S Gマウスモデルを用いて評価する。

### 【0357】

非ヒト靈長類E G F Rは、ヒトE G F R（例えばN P \_ 0 0 5 2 1 9 . 2）に対して99%超のタンパク質配列同一性を共有する。Carolina Bergerらは、C A R改変T細胞で靈長類のR O R 1を標的とすることの安全性について研究した（Cancer Immunol. Res. (2015) 3(2): 206）。本願発明者らも、非ヒト靈長類モデルにおいて、選択された抗E G F R短縮型C A Rに誘導される抗P D - 1発現ベクターを形質導入したC A R - T細胞のi n v i v oでの安全性の研究を設計した。10

### 【0358】

E G F Rを過剰発現する肺癌細胞株A 5 4 9に対する、抗E G F R C A R - Tのi n v i t r o細胞毒性

A 5 4 9 ( A T C C # C C L - 1 8 5 )は周知のヒト肺癌細胞株であり、E G F Rを過剰発現する。i n v i t r oおよびi n v i v oアッセイを容易にするため、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を親A 5 4 9細胞に導入し、得られた細胞株をA 5 4 9 - L u cと命名した。

### 【0359】

まず、i n v i t r o細胞毒性アッセイを行い、構築されたm A b 4 2 5に基づいたC A R（全長および短縮型）の特異性および生物活性を評価した。レンチウイルスベクター（それぞれp L L V - G S I 0 5 2、p L L V - G S I 0 5 3、p L L V - G S I 0 5 7、およびp L L V - G S I 0 6 0）を上記実施例に記載のようにパッケージングした。超遠心分離を用いて上清を濃縮した後、レンチウイルスのストックを調製した。P a n T c e l l i s o l a t i o n k i t ( M i l t e n y i 、 C a t # 1 3 0 - 0 9 6 - 5 3 5 )を使用し、ヒトC D 3<sup>+</sup> T細胞をP B M Cから作製した。単離したT細胞を、T c e l l a c t i v a t i o n a n d e x p a n s i o n k i t を用いて3日間プレ活性化した。その後、プレ活性化したT細胞をG S I 0 5 2、G S I 0 5 3、G S I 0 5 7、またはG S I 0 6 0レンチウイルスストックで形質導入し、さらに3日間細胞増殖させた。A 5 4 9 - L u c細胞を、10% F B Sと2μg / m lのピューロマイシンを添加したF - 1 2 K培地で通常通り培養した。20

### 【0360】

形質導入後3日目に、形質導入済のT細胞を回収し、A 5 4 9 - L u c細胞と共に、エフェクター（C A R - T）-標的細胞（A 5 4 9 - L u c）比5：1で7日間コインキュベートした。O N E - G L O（商標）発光ルシフェラーゼアッセイ試薬を前記共培養細胞に加え、ウェル内の残存ルシフェラーゼ活性を検出した。ルシフェラーゼはA 5 4 9 - L u c細胞にのみ発現しているため、ウェル内の残存ルシフェラーゼ活性は該ウェル内の生細胞数と直接相関する。従って、前記アッセイにおける低い値の相対発光単位（R L U）は、A 5 4 9 / L u c細胞に対して前記C A R - T細胞の細胞毒性が強いことを表す。30

### 【0361】

図24に示すように、全長の抗E G F R - C A R ( G S I 0 5 2 )を発現するC A R - T細胞がA 5 4 9 - L u cに対する有意な細胞毒性を引き出すことができた一方で、このような細胞毒性は、C D 3 ドメインを欠く短縮型の抗E G F R - C A R ( G S I 0 5 3 )を発現するC A R - T細胞では大きく減弱化された。短縮型C A R ( G S I 0 5 3 )を発現するT細胞はE G F Rを過剰発現する細胞に対して有意な細胞毒性を引き出すことができなかつたため、低濃度でE G F Rを発現する正常細胞は前記C A R - T細胞によって攻撃されず、改善されたi n v i v o安全性が提供される可能性がある。G S I 0 5 7（短縮型C A R + 抗P D - 1 + I L - 7 + C C R 2 b + B c 1 2）を形質導入したC A R - T細胞は、A 5 4 9 - l u c細胞と7日間共培養した際、有意な細胞毒性を示さなかつた。これは予期していなかつたことである。I L - 7はA 5 4 9細胞の増殖を促進しうる（Int J Clin Exp Pathol. 2014 Feb 15;7(3):870）ため、G S I 0 5 5 ~ G S I 0 5 740

(IL-7を発現する)導入T細胞は次の実験に含めなかった。GSI060(短縮型CAR+抗PD-1+IL-21+CCR4+Bcl2)を形質導入したT細胞は、GSI053導入T細胞または抗PD-1抗体のみを発現するT細胞(T/抗PD-1)と比べ、強化された細胞毒性を示した。

【0362】

次に、GSI052～GSI054およびGSI058～GSI060形質導入CAR-T細胞を、同様な細胞毒性アッセイにおいて評価した。形質導入後3日目に、形質導入済のT細胞を回収し、A549-Luc細胞と共に、5:1のE-T比でコインキュベートした。ONE-GLO(商標)発光ルシフェラーゼアッセイ試薬を1日目、3日目、5日目、または7日目に前記共培養細胞に加え、残存ルシフェラーゼ活性を検出した。予期されたように、短縮型CAR(GSI053)を発現するT細胞は、5日間以上の共培養を行った際、A549-Luc肺癌細胞に対する弱い細胞毒性を引き出した(図25A～25D)。GSI058～GSI060導入CAR-T細胞は、非形質導入T細胞と比べ、恐らく抗PD-1抗体およびIL-21の発現のためと思われる強化された細胞毒性を示した。これらの結果は、短縮型抗EGFR-CARのみを発現するT細胞が、単独では標的細胞に対して有意な細胞毒性効果を有しなかったことを示した。前記免疫チェックポイント阻害剤(抗PD-1抗体)、およびIL-21等の免疫賦活剤の導入は、短縮型CAR-T機能の強化を補助するであろう。

10

【0363】

初代ヒトT細胞における抗PD-1、IL-7/IL-21、CCR2b/CCR4、Bc12のin vitro発現

20

ヒト初代T細胞を調製し、プレ活性化し、構築物GSI053、GSI054、GSI058～GSI060をそれぞれ形質導入した。A549-Luc細胞と3日間共培養した後、形質導入された各群の初代T細胞の上清を回収し、抗PD-1抗体の発現をLANDPOWER(商標)Human Fc Detection kit(GenScript)によって検出した。簡単に記載すると、5μLのヒトIgG-GS665、5μLの抗ヒトFc抗体-Eu、および10μLの抗体試料または対照をアッセイプレート中で混合し、室温で1.5時間インキュベートした。プレートをHTRF対応機器(PHERSTAR(商標)Plus microplate reader、Ex:320～340nm、Em:620nmおよび665nm)上で読み取った。

30

【0364】

図26Aに示すように、非形質導入T細胞(UNT)および短縮型CAR-T細胞(GSI053)と比べ、抗PD-1抗体遺伝子と短縮型抗EGFR-CARとを形質導入したT細胞(すなわち、GSI054、GSI058、GSI059、GSI060)は、抗PD-1抗体の分泌量が増加した。GSI054、GSI058、GSI059、GSI060CAR-T細胞における抗PD-1抗体の発現は、それぞれ、0.77±0.06μg/mL、0.48±0.14μg/mL、0.37±0.08μg/mLであった。GSI060CAR-T細胞における低い発現量は、その構築物がより長い(抗PD-1、IL-21、CCR4、およびBcl2)ことに起因する可能性がある。

40

【0365】

GSI058～GSI060改変初代T細胞のIL-21の発現を、Human IL-21 ELISA MAX(商標)Deluxe kit(Biolegend #433804)を用いて、使用説明書に従い検出した。非形質導入T細胞(UNT)を陰性対照として用いた。図26Bに示すように、GSI058CAR-T細胞は、A549-Luc細胞と3日間共培養した際に、135.05±1.68pg/mLのIL-21を分泌した。一方、GSI059およびGSI060CAR-T細胞は、それぞれ100.58±0.80pg/mLおよび18.69±4.58pg/mLのIL-21を分泌した。

【0366】

GSI059およびGSI060形質導入T細胞の細胞表面上のCCR4の発現を、P

50

E 標識抗ヒトCCR4 ( Biologend # 359411 ) を使用説明書に従って用い、フローサイトメトリーによって評価した。簡単に記載すると、洗浄後、染色した細胞を 200 μl の DPBS に再懸濁し、暗所に置いた後、FACSCALIBUR ( 商標 ) ( BD Biosciences ) または ATTUNENEXT ( 商標 ) ( Thermo Fisher ) 上でのフローサイトメトリー分析にかけた。CCR4 の発現は、39.0 % の GS1059 CAR-T 細胞および 37.3 % の GS1060 CAR-T 細胞上で検出された ( 図 27A ~ 27B ) 。

#### 【 0367 】

GS1060 導入 T 細胞における Bcl2 タンパク質の発現を、ALEXA FLUOR ( 登録商標 ) 488 標識抗 Bcl2 ( Biologend # 658703 ) による細胞内染色により、使用説明書に従って測定した。簡単に記載すると、細胞をチューブあたり 0.5 ml の固定緩衝液 ( Biologend # 422601 ) 中、暗所で 20 分間室温にて固定した。固定後、細胞を 350 g で 5 分間、室温にて遠心分離し、上清を捨てた。細胞ペレットを、細胞内染色透過緩衝液 ( Biologend # 422601 ) 中に再懸濁し、350 g で 5 分間遠心分離した。細胞を 5 回再洗浄した。固定・透過処理した細胞を、200 μL の Intracellular Staining Perm Wash Buffer 中に再懸濁し、ALEXA FLUOR ( 登録商標 ) 488 標識抗 Bcl2 抗体を該細胞に加え、暗所で室温にて 20 分間インキュベートした。染色後、細胞を 2 ml の細胞内染色透過緩衝液で 2 回洗浄し、350 g で 5 分間、室温にて遠心分離した。洗浄後、染色された細胞を 200 μL の DPBS 中に再懸濁し、暗所に置いた後、FACSCALIBUR ( 商標 ) ( BD Biosciences ) または ATTUNENEXT ( 商標 ) ( Thermo Fisher ) 上でのフローサイトメトリー分析にかけた。図 27C に示すように、Bcl2 の発現が 12.0 % の GS1060 CAR-T 細胞上で検出された。

#### 【 0368 】

形質導入 T 細胞または腫瘍細胞の細胞表面上のさらなるバイオマーカーを評価することができる。例えば、形質導入 T 細胞の細胞表面上での CCR2b の発現を、PE 標識抗ヒト CCR2 ( Biologend # 357205 ) を使用説明書に従って用い、フローサイトメトリーによって評価する。A549-Luc 細胞上で PDL1 の発現を、抗 PDL1 抗体を用いてフローサイトメトリーによって測定する。

#### 【 0369 】

ヒト肺癌モデルにおける、抗 PDL1 抗体を発現する CAR-T 細胞の in vivo 抗腫瘍効果

短縮型抗 EGFR CAR ( 例えば GS1053 ~ GS1060 ) によって誘導される、抗 PDL1 を発現する変形ヒト初代 T 細胞の in vivo での有効性を、ヒト腫瘍細胞を移植したマウス異種移植モデル内で評価することができる。例えば、NSG マウスの一群に肺癌細胞 A549-Luc を移植し、ヒト肺癌のマウス異種移植モデルを提供する。処理群において、前記モデル化されたマウスに、レンチウイルス構築物 GS1052 ~ GS1060 を形質導入したヒト初代 T 細胞の各群を注入する。対照群において、前記モデル化されたマウスに、非形質導入 T 細胞を注入する。

#### 【 0370 】

各処理条件の有効性を、腫瘍細胞の減少を含むいくつかのパラメーターにより評価する。処理前後に、in vivo 生物発光イメージングによって腫瘍サイズをモニタリングしてもよい。

#### 【 0371 】

カニクイザルにおける、短縮型抗 EGFR CAR 誘導抗 PDL1 処理の in vivo での安全性

短縮型抗 EGFR CAR と抗 PDL1 とを発現する CAR-T 細胞の in vivo での安全性を、カニクイザルのモデルにおいて評価した。

#### 【 0372 】

10

20

30

40

50

P B M C を 2 個体のサル ( N H P # 1 および N H P # 2 、 両個体ともオス、 約 4 k g ) の末梢血から得て、 上記のように密度勾配遠心によって調製した。 n o n - h u m a n p r i m a t e P a n T C e l l I s o l a t i o n K i t ( M i l t e n y i # 1 3 0 - 0 9 1 - 9 9 3 ) を使用説明書に従って用い、 カニクイザル T 細胞を P B M C から単離した。 調製したサル T 細胞を、 n o n - h u m a n p r i m a t e T C e l l A c t i v a t i o n / E x p a n s i o n K i t ( M i l t e n y i # 1 3 0 - 0 9 2 - 9 1 9 ) およびヒト I L - 2 により、 自己サル血清を用いて、 3 日間プレ活性化した。 その後、 プレ活性化された T 細胞に G S I 0 6 0 レンチウイルスを形質導入し、 さらに 1 0 日間増殖させた。

## 【 0 3 7 3 】

調製したサル G S I 0 6 0 導入 T 細胞について、 1 対の C A R 特異的プライマーを用いたリアルタイム P C R により、 C A R 導入遺伝子の組み込みコピー数を試験した。 表 3 に示すように、 G S I 0 6 0 C A R 配列は、 1 n g のゲノム D N A あたり 3 9 , 0 0 8 . 9 コピーで N H P # 2 由来の T 細胞のゲノム中に組み込まれた。 タンパク質 L 結合により、 または導入遺伝子の発現を ( 例えは抗 C C R 2 もしくは抗 C C R 4 抗体による染色後の F A C S によって ) 検出することにより、 形質導入効率を分析することもできる。 抗 P D - 1 の発現は、 上記のように H T R F によって分析することができる。

## 【 0 3 7 4 】

また、 前記形質導入 T 細胞を A 5 4 9 - L u c 細胞と一晩共培養した。 図 2 8 に示すように、 この共培養アッセイにおいて、 調製した G S I 0 6 0 導入 T 細胞の A 5 4 9 . L u c 細胞に対する有意な細胞毒性は無かった。

## 【 表 3 】

表 3. N H P C A R - T における C A R 導入遺伝子の組み込みコピー数のリアルタイム P C R 検出 ( コピー / n g ゲノム D N A )

	N H P # 1	N H P # 2
C A R - T	2, 1 5 1, 5 4 9	3 9, 0 0 8. 9
u n T	7 3. 2	5 5. 5

## 【 0 3 7 5 】

前記自己 G S I 0 6 0 改変 T 細胞の注入の 3 日前に、 前記サルを、 体重 1 k g あたり 2 2 m g の投与量のシクロホスファミドの静脈注射によって前処理した。 G S I 0 6 0 改変 T 細胞の自己注入の日、 細胞を 3 7 のウォーターバス中でゆるやかに混ぜることによって融かし、 その後すぐに前記動物に静脈輸液によって 5 分以内に注入した。 N H P # 2 サルに、 1 k g あたり 3 . 2 × 1 0 <sup>6</sup> 個の G S I 0 6 0 改変 T 細胞を注入した。 N H P # 1 サルに、 無関係の C A R 改変 T 細胞を注入した。

## 【 0 3 7 6 】

これらのサルは、 前記 T 細胞投与後に、 発熱、 呼吸困難、 食欲、 下痢、 および体重減少についてモニタリングされた。 投与前および投与後の血液試料を得て、 C B C 、 血清化学値、 およびサイトカイン濃度について調べた。 例えは、 I F N と I L - 6 の血漿中濃度を、 投与後 1 日目、 2 日目、 3 日目、 4 週間目まで、 検出することができる。

## 【 0 3 7 7 】

図 2 9 A ~ 2 9 D に示すように、 G S I 0 6 0 改変 T 細胞の自己注入の前後で、 体重、 体温、 全血球計算値、 またはサイトカイン濃度、 血清化学値の有意な変化は無く、 カニクイザルモデルにおける G S I 0 6 0 の良好な寛容性が示された。

## 【 0 3 7 8 】

他の C A R - T 細胞、 例えは G S I 0 5 2 ~ G S I 0 5 9 を形質導入したものを、 同様なカニクイザルモデルを用いて評価することができる。

## 【 0 3 7 9 】

10

20

30

40

50

実施例 13：改変初代ヒトT細胞が発現した単一ドメイン抗PD-1または抗CTLA-4抗体は腫瘍細胞に対するCAR-T細胞毒性をin vitroで増強する

LPD-1-16と命名された抗PD-1単一ドメイン抗体(sdAb)と、前記抗EGFRvIIICAR(GSI026、実施例3に記載)との両者をコードするレンチウイルスベクター(「pLIC-1042」)を設計した。pLIC-1042は、上記実施例に記載のように、293T細胞におけるレンチウイルスパッケージング系を用いて生成した。Pan T cell isolation kit(Miltenyi、Cat#130-096-535)を使用し、ヒト初代T細胞をPBMCから作製した。単離したT細胞を、T cell activation and expansion kitを用いて3日間プレ活性化した。T細胞の次の実験群を作製した：(1) T / pLIC-1042：抗EGFRvIIICAR遺伝子(GSI026)とNFATプロモーターの制御下の抗PD-1 sdAb(LPD-1-16)遺伝子との両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(2) T / GSI026・抗PD-1：抗EGFRvIIICAR遺伝子(GSI026)とNFATプロモーターの制御下のIgG抗PD-1抗体(ペムプロリズマブ)遺伝子との両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞(実施例3に記載の通り)；(3) T / GSI026：抗EGFRvIIICAR遺伝子(GSI026)を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；および(4) Unt：陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した改変ヒト初代T細胞。

#### 【0380】

各群の改変初代ヒトT細胞(「エフェクター細胞」)を、U87MG/VIIILuc-PD-L1細胞(「標的細胞」)と共に、20:1のE/T比で3日間共培養した。腫瘍細胞に対する抗体分泌初代ヒトT細胞の細胞毒性のモニタリングを、ONE-GLO(商標)発光アッセイキットを使用説明書に従って使用し、残存ルシフェラーゼ活性を測定することによって行った。該アッセイにおける低いRLU値は、標的細胞に対する改変T細胞の強い細胞毒性効果を表す。

#### 【0381】

図30Aに示すように、標的細胞と3日間共培養した場合、抗EGFRvIIICARと抗PD-1 sdAbとの両者を共発現する細胞(T / pLIC-1042)は、抗EGFRvIIICARのみを発現する細胞(T / GSI026、RLU = 98, 874 ± 6193)またはIgG抗PD-1抗体と抗EGFRvIIICARとを発現するT細胞(T / GSI026・抗PD-1、RLU = 94, 599 ± 3507)と比べて、U87MG/VIIILuc-PD-L1腫瘍細胞に対する、より強力な細胞毒性(RLU = 79, 841 ± 3646)を示した。

#### 【0382】

同様に、LCA-16と命名された抗CTLA-4単一ドメイン抗体(sdAb)と、前記抗EGFRvIIICAR(GSI026、実施例3に記載)との両者をコードするレンチウイルスベクター(「pLIC-1043」)を設計した。pLIC-1043は、上記実施例に記載のように、293T細胞におけるレンチウイルスパッケージング系を用いて生成した。Pan T cell isolation kit(Miltenyi、Cat#130-096-535)を使用し、ヒト初代T細胞をPBMCから作製した。単離したT細胞を、T cell activation and expansion kitを用いて3日間プレ活性化した。T細胞の次の実験群を作製した：(1) T / pLIC-1043：抗EGFRvIIICAR遺伝子(GSI026)とNFATプロモーターの制御下の抗CTLA-4 sdAb(LCA-16)遺伝子との両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；(2) T / GSI026・CTLA-4：抗EGFRvIIICAR遺伝子(GSI026)とNFATプロモーターの制御下のIgG抗CTLA-4抗体(イピリムマブ)遺伝子との両者を有するレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞(実施例4に記載の通り)；(3) T / GSI026：抗EGFRvIIICAR遺伝子(GSI026)を有す

10

20

30

40

50

るレンチウイルスベクターを形質導入した改変ヒト初代T細胞；および(4)Unt：陰性対照としての無関係の遺伝子を形質導入した改変ヒト初代T細胞。

### 【0383】

各群の改変初代ヒトT細胞（「エフェクター細胞」）を、U87MG/VIII-Luc-CD80/CD86細胞（「標的細胞」）と共に、20:1のE/T比で3日間共培養した。腫瘍細胞に対する抗体分泌初代ヒトT細胞の細胞毒性のモニタリングを、ONE-GLO（商標）発光アッセイキットを使用説明書に従って使用し、残存ルシフェラーゼ活性を測定することによって行った。該アッセイにおける低いRLU値は、標的細胞に対する改変T細胞の強い細胞毒性効果を表す。

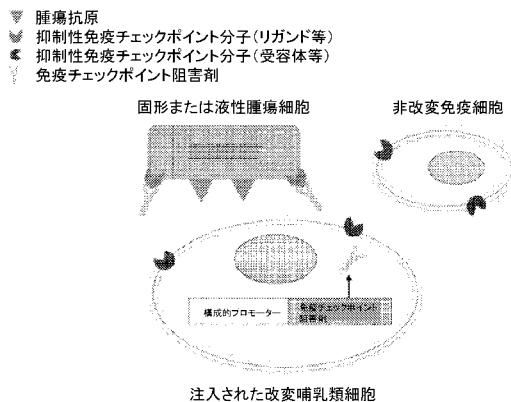
### 【0384】

図30Bに示すように、U87MG/VIII-Luc-CD80/CD86細胞と3日間共培養した場合、抗EGFRVIII-CARと抗CTLA-4 sdAbとの両者を共発現するpLIC-1043ベクターを形質導入したCAR-T細胞（T/pLIC-1043）は、抗EGFRVIII-CARのみを発現するCAR-T細胞（T/GS1026、RLU=119, 378±9670）またはIgG抗CTLA-4抗体と抗EGFRVIII-CARとを発現するT細胞（T/GS1026・抗CTLA-4、RLU=109, 135±6695）と比べて、腫瘍細胞に対する、より強力な細胞毒性（RLU=99, 816±6295）を示した。

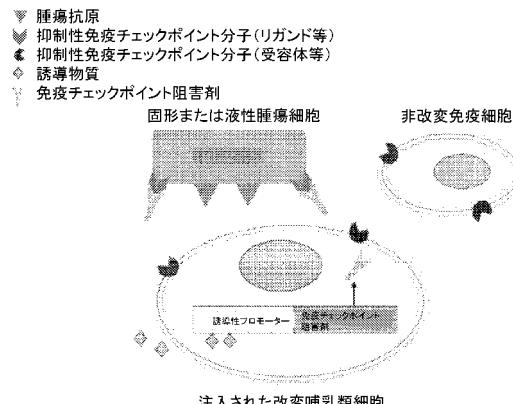
### 【0385】

これらのデータは、全長IgG抗PD-1（または抗CTLA-4）抗体と比べて、改変CAR-T細胞によって発現された単一ドメイン抗PD-1（または抗CTLA-4）抗体は、in vitroにおいて、腫瘍細胞へのCAR-T細胞の細胞毒性に対する、より顕著な増強効果を有していたことを示している。

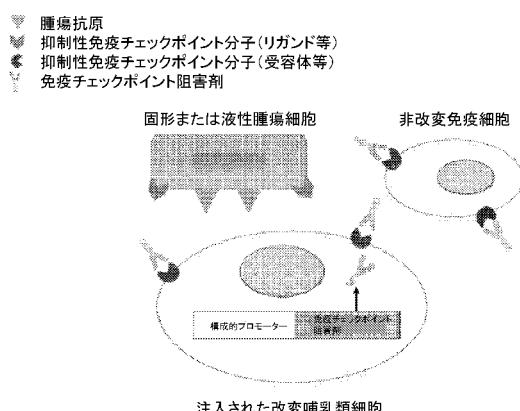
### 【図1】



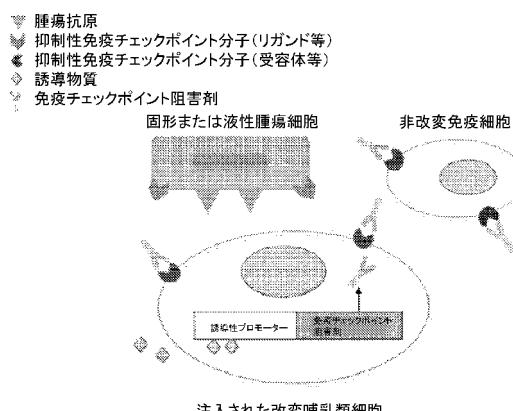
### 【図3】



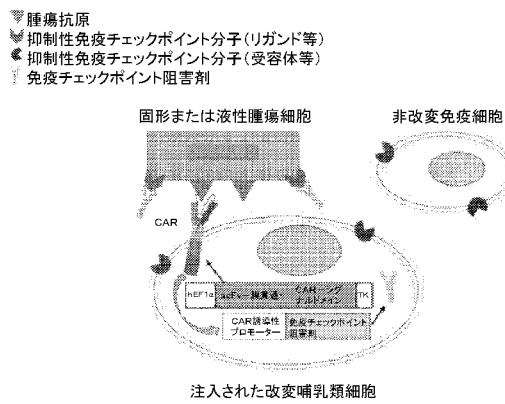
### 【図2】



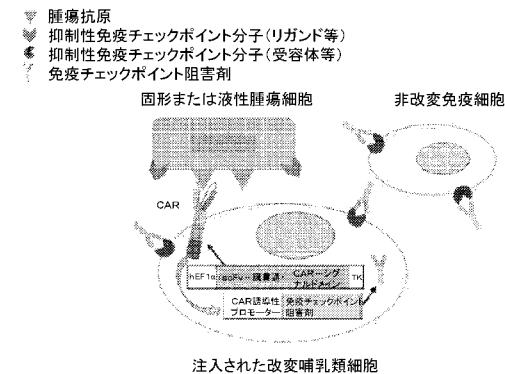
### 【図4】



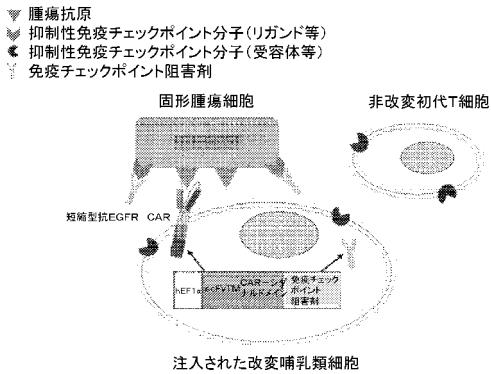
【図5】



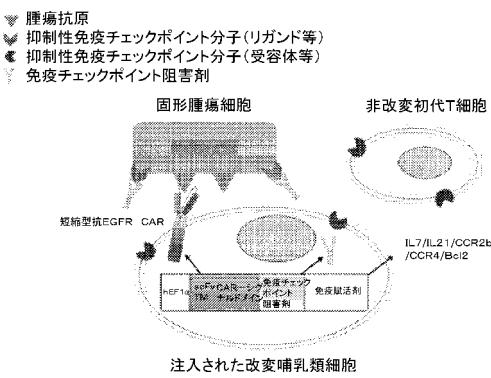
【図6】



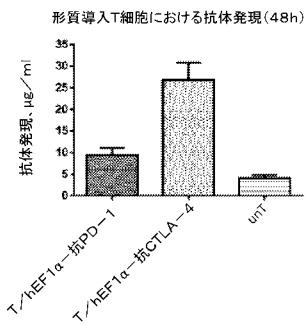
【図7 A】



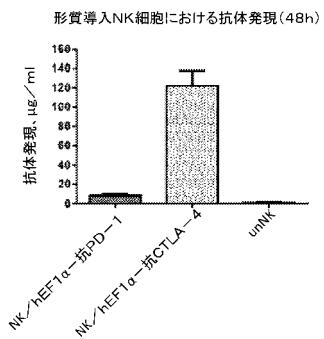
【図7 B】



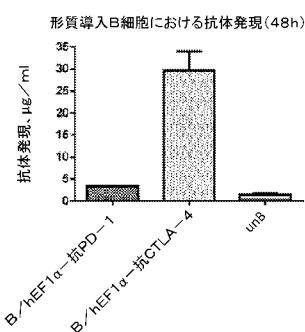
【図8 A】



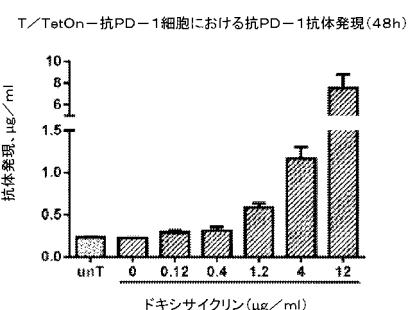
【図8 C】



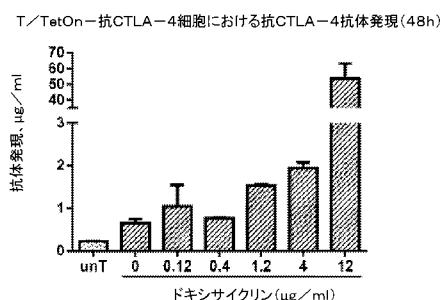
【図8 B】



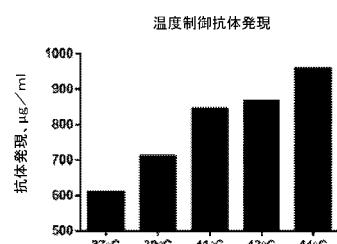
【図9 A】



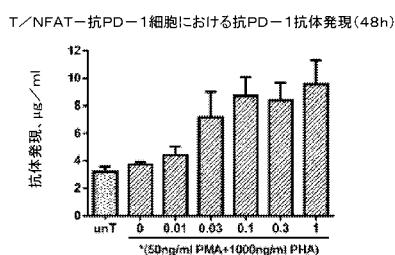
【図 9 B】



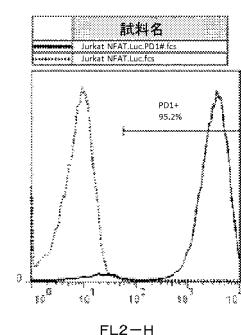
【図 1 1】



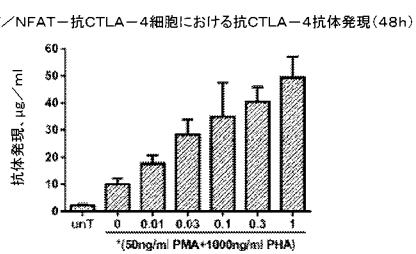
【図 1 0 A】



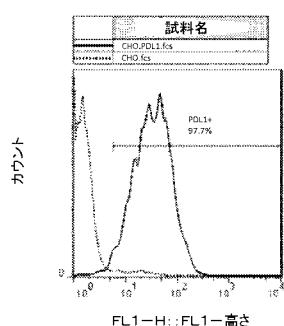
【図 1 2 A】



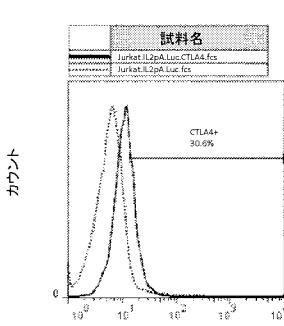
【図 1 0 B】



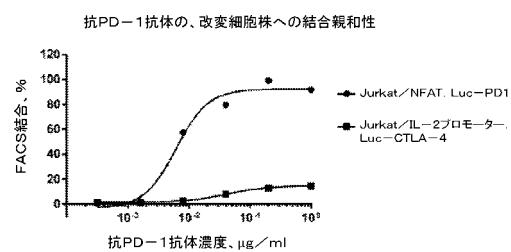
【図 1 2 B】



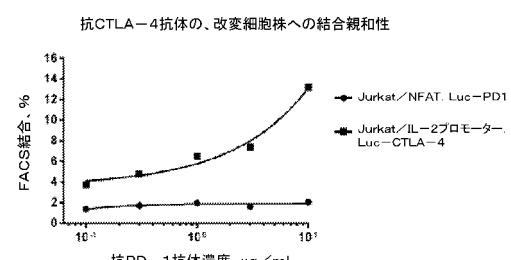
【図 1 2 C】



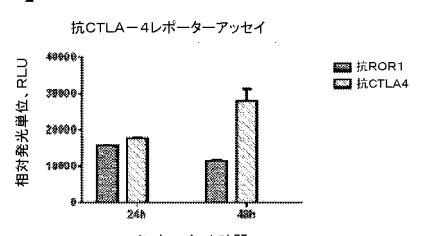
【図 1 3 A】



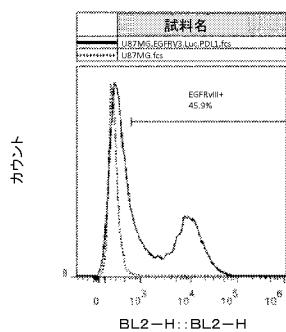
【図 1 3 B】



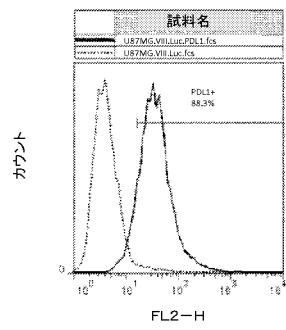
【図 1 4】



【図 15 A】

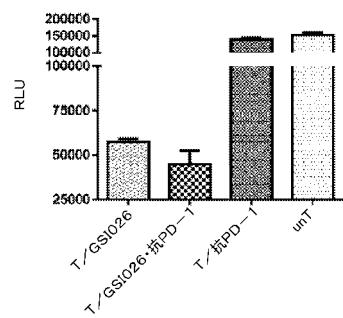


【図 15 B】



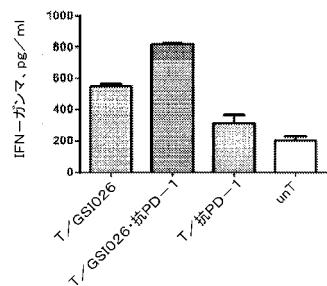
【図 16 A】

抗PD-1抗体を発現するEGFRvIII CAR-T細胞の、  
U87MG/vIII-luc-PD-L1細胞に対する細胞毒性  
(E:T=20:1, 5日目)



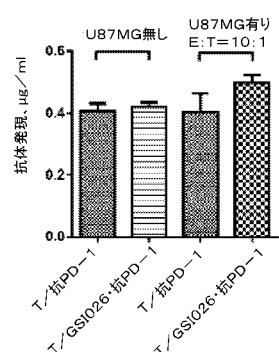
【図 16 B】

U87MG/vIII-luc-PD-L1細胞と共培養された  
EGFRvIII CAR-T細胞のIFN-ガンマ分泌  
(E:T=20:1, 5日目)



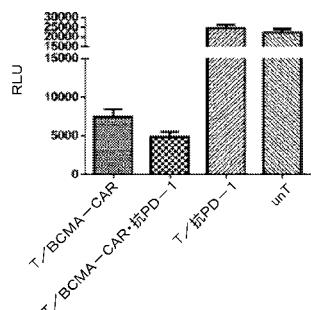
【図 16 C】

標的細胞有り/無しで培養された改変T細胞における  
抗PD-1抗体発現



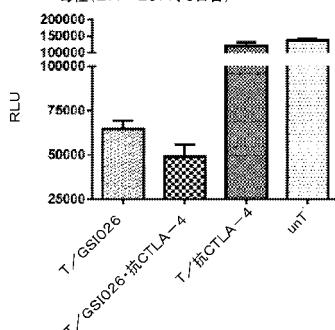
【図 17】

抗PD-1抗体を発現するBCMA CAR-T細胞の、  
RPMI-8226/luc-PD-L1細胞に対する細胞毒性  
(E:T=1:1, 72h)



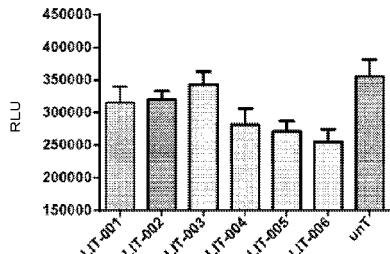
【図 18】

抗CTLA-4抗体を発現するEGFRvIII CAR-T細胞の、  
U87MG/vIII-luc-CD80/CD86細胞に対する細胞  
毒性(E:T=20:1, 5日目)

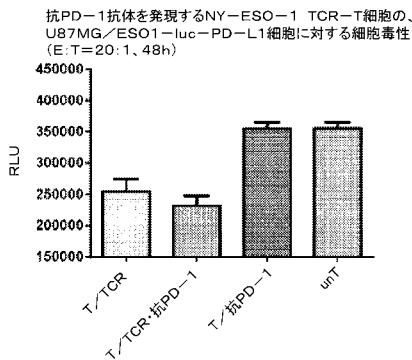


【図 19 A】

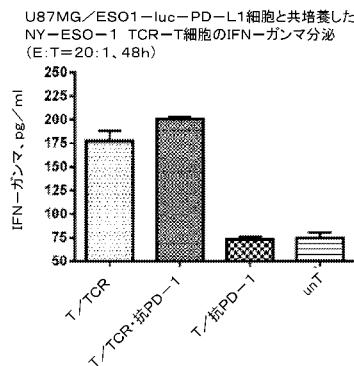
NY-ESO-1 TCR-T細胞の、  
U87MG/ESO1-luc-PD-L1細胞に対する細胞毒性  
(E:T=20:1, 48h)



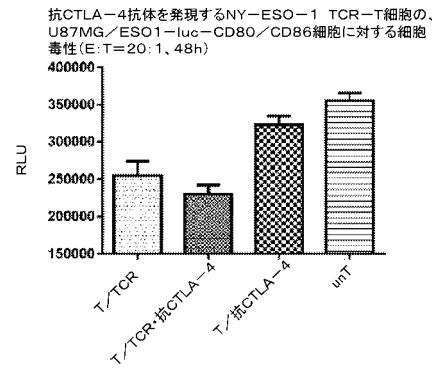
【図 19 B】



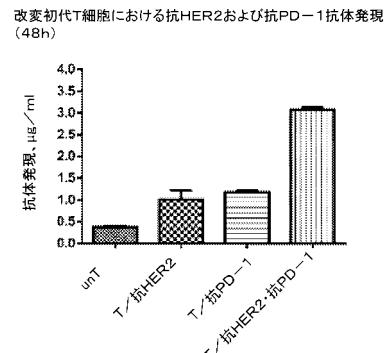
【図 19 C】



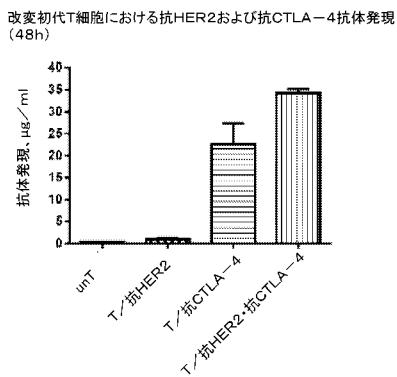
【図 20】



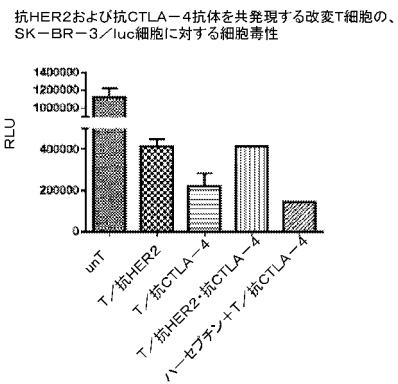
【図 21 A】



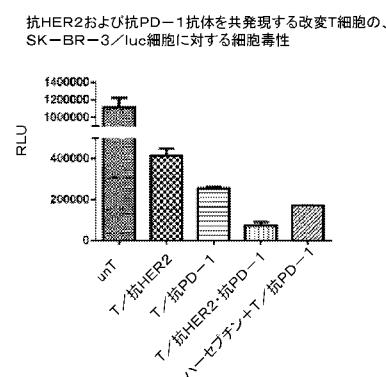
【図 21 B】



【図 22 B】



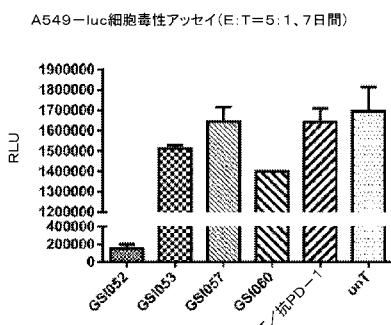
【図 22 A】



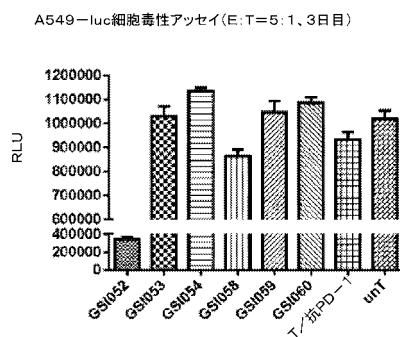
【図 23】

pLV-GS052	hEF1α	CD64/SP	VL-(G35)-V-H	CD80/CD86	CD137	CD3z
pLV-GS053	hEF1α	CD64/SP	VL-(G35)-V-H	CD80/CD86	CD137	CD3z
pLV-GS054	hEF1α	CD64/SP	VL-(G35)-V-H	CD80/CD86	CD137	CD2z
pLV-GS055	hEF1α	CD64/SP	VL-(G35)-V-H	CD80/CD86	CD137	CD2z
pLV-GS056	hEF1α	CD64/SP	VL-(G35)-V-H	CD80/CD86	CD137	CD2z
pLV-GS057	hEF1α	CD64/SP	VL-(G35)-V-H	CD80/CD86	CD137	CD2z
pLV-GS058	hEF1α	CD64/SP	VL-(G35)-V-H	CD80/CD86	CD137	CD1z
pLV-GS059	hEF1α	CD64/SP	VL-(G35)-V-H	CD80/CD86	CD137	CD1z
pLV-GS060	hEF1α	CD64/SP	VL-(G35)-V-H	CD80/CD86	CD137	CD1z

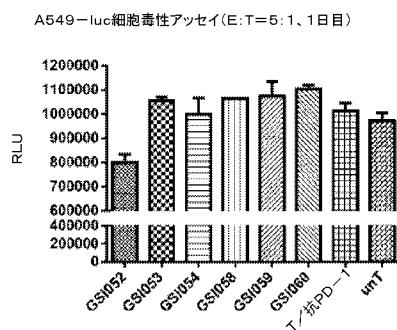
【図24】



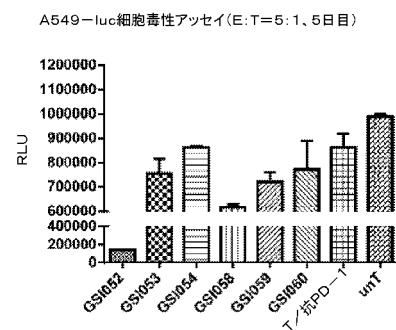
【図25B】



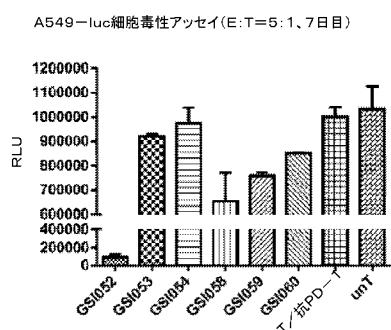
【図25A】



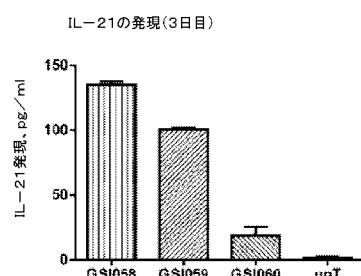
【図25C】



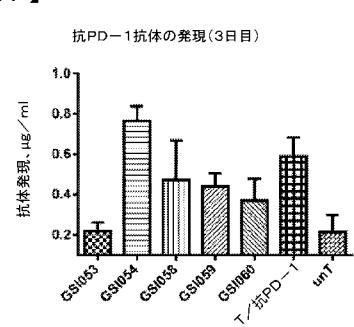
【図25D】



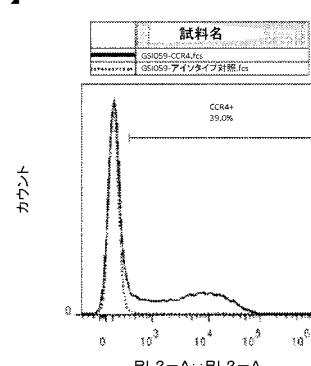
【図26B】



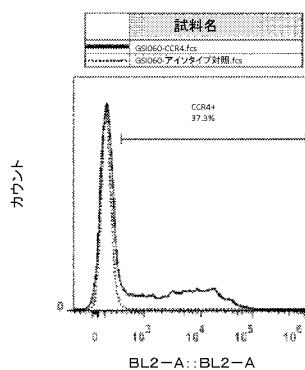
【図26A】



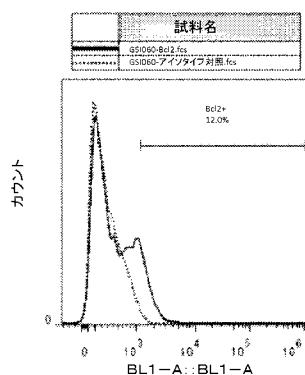
【図27A】



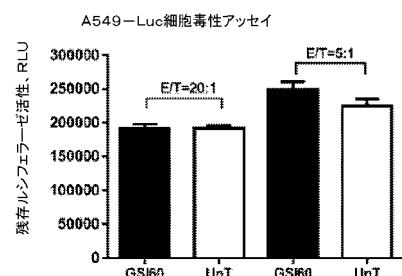
【図 27 B】



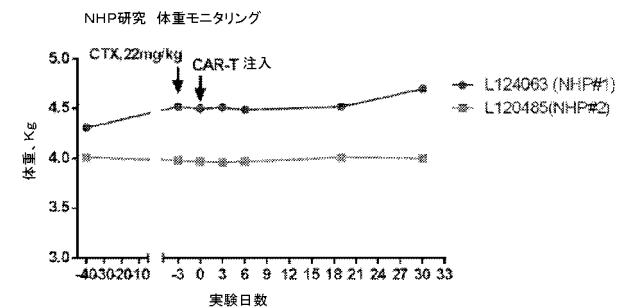
【図 27 C】



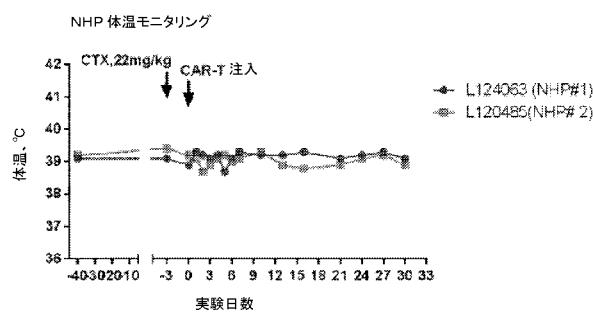
【図 28】



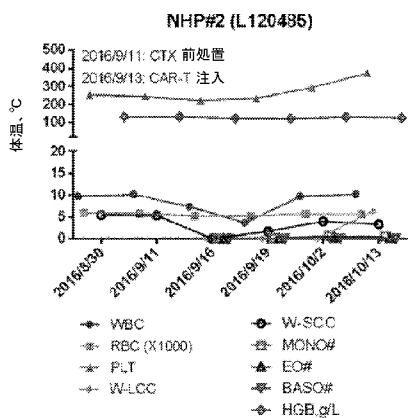
【図 29 A】



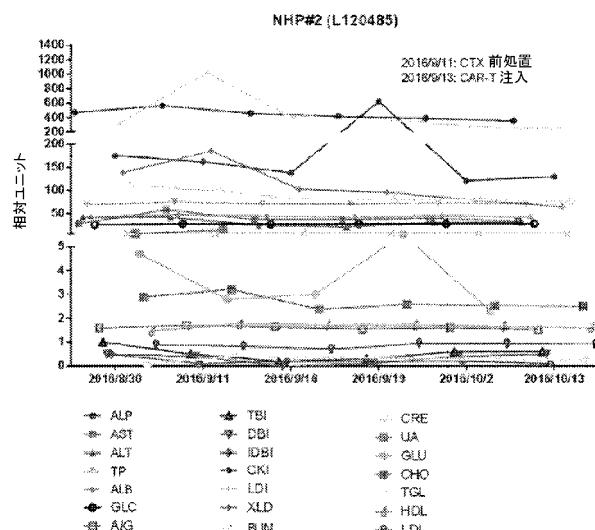
【図 29 B】



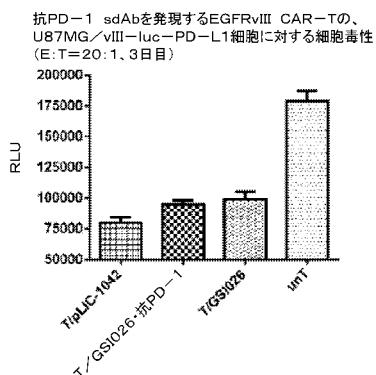
【図 29 C】



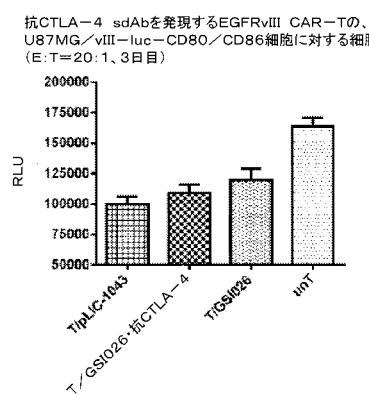
【図 29 D】



## 【図 30 A】



## 【図 30 B】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/072723															
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K 48/00(2006.01)i; C12N 5/16(2006.01)i; C12N 5/22(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i																	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K, C12N, A61P																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CPRSABS, CNMED, TWABS, TWMED, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, PUBMED :mammalian,immunomodulator,programmed death, programmed cell death,interleukin,CTLA-4,BLTA,TIM-3,LAG-3,CCR4,CCR2b,CD137L,LEM,Bcl-2,antibody, antibodies, inhibitor, inhibitors, antagonist, antagonists																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">CN 101374950 A (US DEPT HEALTH &amp; HUMAN SERVICES) 25 February 2009 (2009-02-25) see the abstract, claims 1-60</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-43, 55-60</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">CN 1753912 A (WYETH CORP ET AT.) 29 March 2006 (2006-03-29) see the abstract, claims 1-34</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-43, 55-60</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">CN 1299411 A (ARIZONA BOARD OF REGENTSUNIV ARIZONA) 13 June 2001 (2001-06-13) see the abstract, claims 1-46</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-43, 55-60</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">Zhiyu HUANG et al. "Clinical Research Progress of Anti PD-1/PD-L1 Monoclonal Antibody in the Treatment of Lung Cancer" <i>Chinese Journal of Lung Cancer</i>, Vol. 11, No. 18, 30 November 2015 (2015-11-30), ISSN: 1009-3419, pages:706-713, see page 706, the 1st paragraph to page 707, the 1st paragraph</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-43, 55-60</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	CN 101374950 A (US DEPT HEALTH & HUMAN SERVICES) 25 February 2009 (2009-02-25) see the abstract, claims 1-60	1-43, 55-60	Y	CN 1753912 A (WYETH CORP ET AT.) 29 March 2006 (2006-03-29) see the abstract, claims 1-34	1-43, 55-60	Y	CN 1299411 A (ARIZONA BOARD OF REGENTSUNIV ARIZONA) 13 June 2001 (2001-06-13) see the abstract, claims 1-46	1-43, 55-60	A	Zhiyu HUANG et al. "Clinical Research Progress of Anti PD-1/PD-L1 Monoclonal Antibody in the Treatment of Lung Cancer" <i>Chinese Journal of Lung Cancer</i> , Vol. 11, No. 18, 30 November 2015 (2015-11-30), ISSN: 1009-3419, pages:706-713, see page 706, the 1st paragraph to page 707, the 1st paragraph	1-43, 55-60
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
Y	CN 101374950 A (US DEPT HEALTH & HUMAN SERVICES) 25 February 2009 (2009-02-25) see the abstract, claims 1-60	1-43, 55-60															
Y	CN 1753912 A (WYETH CORP ET AT.) 29 March 2006 (2006-03-29) see the abstract, claims 1-34	1-43, 55-60															
Y	CN 1299411 A (ARIZONA BOARD OF REGENTSUNIV ARIZONA) 13 June 2001 (2001-06-13) see the abstract, claims 1-46	1-43, 55-60															
A	Zhiyu HUANG et al. "Clinical Research Progress of Anti PD-1/PD-L1 Monoclonal Antibody in the Treatment of Lung Cancer" <i>Chinese Journal of Lung Cancer</i> , Vol. 11, No. 18, 30 November 2015 (2015-11-30), ISSN: 1009-3419, pages:706-713, see page 706, the 1st paragraph to page 707, the 1st paragraph	1-43, 55-60															
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search  17 April 2017		Date of mailing of the international search report  26 April 2017															
Name and mailing address of the ISA/CN  STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer  XING, Yunlong															
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. (86-10)62411094															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/072723
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Rizvi, NA et al. "Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial" <i>LANCET ONCOLOGY</i> , Vol. 3, No. 16, 31 March 2015 (2015-03-31), ISSN: 1470-2045, pages:257-265, see the whole document	1-43, 55-60

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	
International application No. <b>PCT/CN2017/072723</b>	
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: <b>44-54</b> because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: [1] claims 44-54 relate to a method for treatment of the human or animal body.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2017/072723**

Patent document cited in search report		Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	101374950	A	25 February 2009	IL 221384 A AU 2007207785 A1 CN 102796743 B NZ 596494 A JP 5709356 B2 CN 102796743 A CN 105368841 A IL 221384 D0 WO 2007084342 A3 EP 2366787 A3 CA 2636111 A1 JP 2016032473 A WO 2007084342 A2 EP 2366787 A2 CN 101374950 B US 2016096875 A1 BR PI0707106 A2 EP 1984505 A2 JP 2014113151 A JP 2009523420 A AU 2007207785 B2 US 9303080 B2 US 2016102128 A1 US 2009082299 A1 IL 192730 D0 NZ 569541 A	31 July 2016 26 July 2007 18 November 2015 26 July 2013 30 April 2015 28 November 2012 02 March 2016 24 September 2012 25 October 2007 14 December 2011 26 July 2007 10 March 2016 26 July 2007 21 September 2011 27 June 2012 07 April 2016 19 April 2011 29 October 2008 26 June 2014 25 June 2009 14 November 2013 05 April 2016 14 April 2016 26 March 2009 11 February 2009 25 May 2012
CN	1753912	A	29 March 2006	MX PA05006828 A US 2008311117 A1 AT 514713 T US 2010028330 A1 US 7488802 B2 JP 2006521783 A IL 169152 D0 AU 2003288675 B2 AU 2003288675 A8 US 2004213795 A1 EP 1576014 B1 CA 2508660 C CA 2508660 A1 JP 4511943 B2 CN 101899114 A HK 1083510 A1 BR 0316880 A NO 20053389 D0 US 7521051 B2 NO 336442 B1 US 8088905 B2 NO 20053389 A IL 169152 A ES 2367430 T3	08 September 2005 18 December 2008 15 July 2011 04 February 2010 10 February 2009 28 September 2006 04 July 2007 22 July 2010 14 July 2004 28 October 2004 29 June 2011 20 August 2013 08 July 2004 28 July 2010 01 December 2010 16 December 2011 25 October 2005 12 July 2005 21 April 2009 17 August 2015 03 January 2012 12 July 2005 30 November 2010 03 November 2011

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No. PCT/CN2017/072723	
Patent document cited in search report		Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
			EP	1576014	A1
			CN	1753912	B
			WO	2004056875	A1
			US	2006210567	A1
			AU	2003288675	A1
			AU	2010235966	A1
			JP	2010189395	A
			IL	135943	D0
			WO	9923216	A3
			CA	2308575	A1
			AU	1377299	A
			WO	9923216	A2
			EP	1029041	A2
			JP	2001521740	A
			BR	9813917	A
CN		1299411	A	13 June 2001	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	
A 6 1 K 38/47 (2006.01)	A 6 1 K 38/47	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	M
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	A
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/763 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/763	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 12 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
	A 6 1 K 45/06	
	C 12 N 5/10	

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

- (72)発明者 ファン, シャオフー  
カナダ アルバータ ティー6ダブリュ 0ケー3 エドモントン アーミテージ クレセント  
サウスウェスト 1067
- (72)発明者 チャン, フアンリヤン  
中華人民共和国 チアンスー 211100 ナンキン チャンニン ディストリクト ヨンシ  
ロード ナンバー 28 ビルディング 3 ルーム 1060
- (72)発明者 ジュアン, チーチュアン  
中華人民共和国 チアンスー 210012 ナンキン ユーホアタイ ディストリクト フゥア  
シェン ストリート ナンバー9 チョーチアン インターナショナル ガーデン 36ス ビル  
ディング ルーム 104
- (72)発明者 ワン, ピンヤン  
中華人民共和国 アンホイ 233113 フォンヤン ブテン タウン
- (72)発明者 ユ, ジエ  
中華人民共和国 チアンスー 210000 ナンキン シーシャー ディストリクト ウェンゾ  
ン ストリート ナンバー8 ルーム 1005
- (72)発明者 ヘ, シアン  
中華人民共和国 チアンスー 210006 ナンキン チンホワイ ディストリクト トンシア  
ンゴンチン ナンバー15
- (72)発明者 ワン, リン  
中華人民共和国 チアンスー 210014 ナンキン シェンワー ディストリクト シャンベ  
イ アレイ ナンバー151 12ス ビルディング ルーム 207
- (72)発明者 ハオ, ジャーイン  
中華人民共和国 チアンスー 211100 ナンキン チャンニン ディストリクト ワンシャ  
ン ガーデン シューシャン ロード ナンバー378 ワンシャン ガーデン ナンバー23

ルーム 606

(72)発明者 ヤン,レイ

中華人民共和国 アンホイ 232052 ハイナン シェージャージー ディストリクト ピン  
シャン ストリート

Fターム(参考) 4B065 AA90X AB01 BA02 BA03 CA24 CA44

4C084 AA02 AA13 AA17 AA19 AA20 BA44 DA12 DA14 DA45 DC22

DC50 MA66 NA05 NA14 ZB071 ZB072 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262

ZC411 ZC412 ZC75

4C085 AA13 AA14 CC22 CC23 DD62 EE01 GG02

4C087 AA01 AA02 BB37 BB43 BB44 BB65 BC83 MA66 NA14 ZB07  
ZB09 ZB26 ZC41