

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/110374

発行日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(43) 国際公開日 平成30年6月21日(2018.6.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/62 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/62 Z N A Z	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63 Z	4 H O 4 5
<b>C O 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00	
<b>C O 7 K 14/705 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/705	
<b>C 1 2 N 5/0783 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0783	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2018-556602 (P2018-556602)	(71) 出願人 504180239 国立大学法人信州大学 長野県松本市旭三丁目1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/043729	
(22) 国際出願日 平成29年12月6日(2017.12.6)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-242054 (P2016-242054)	(71) 出願人 509349141 京都府公立大学法人 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る梶井町465
(32) 優先日 平成28年12月14日(2016.12.14)	(74) 代理人 100114362 弁理士 萩野 幹治
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(72) 発明者 細井 創 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る梶井町465 京都府公立大学法人 京都府立医科大学内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 殺細胞効果を有するキメラ抗原受容体遺伝子改変リンパ球

## (57) 【要約】

本発明は、CAR療法の臨床応用を更に進めるべく、固形腫瘍領域での治療戦略及びそのために有用な手段の提供を課題とする。EphrinB2細胞外ドメインを抗原認識部位にもつキメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変リンパ球を作製する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

EphrinB2細胞外ドメインを含む細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、免疫細胞のエフェクター機能のための細胞内シグナルドメインを含む、EPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 2】

EphrinB2細胞外ドメインが配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 3】

前記細胞内シグナルドメインが共刺激分子の細胞内ドメインとCD3 とを含む、請求項 1 又は 2 に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

10

## 【請求項 4】

前記共刺激分子がCD28である、請求項 3 に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 5】

前記細胞外ドメインと前記膜貫通ドメインの間にスペーサドメインを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体をコードする遺伝子。

20

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の遺伝子を標的細胞に導入するステップ、を含む、キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変リンパ球の調製方法。

## 【請求項 8】

前記遺伝子の導入が、トランスポゾン法によって行われる、請求項 7 に記載の調製方法。

## 【請求項 9】

トランスポゾン法がpiggyBacトランスポゾン法である、請求項 8 に記載の調製方法。

## 【請求項 10】

標的細胞がT細胞である、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の調製方法。

30

## 【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体を発現した遺伝子改変リンパ球。

## 【請求項 12】

リンパ球がT細胞である、請求項 11 に記載の遺伝子改変リンパ球。

## 【請求項 13】

請求項 11 又は 12 に記載の遺伝子改変リンパ球を治療上有効量含む、細胞製剤。

## 【請求項 14】

横紋筋肉腫、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫及び頭頸部がんからなる群より選択される腫瘍ないしがんの治療用である、請求項 13 に記載の細胞製剤。

40

## 【請求項 15】

横紋筋肉腫、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫及び頭頸部がんからなる群より選択される腫瘍ないしがんの患者に対して、請求項 11 又は 12 に記載の遺伝子改変リンパ球を治療上有効量、投与するステップを含む、治療法。

## 【請求項 16】

プロモーターと、該プロモーターの制御下にある、請求項 6 に記載の遺伝子と、を含む発現カセット。

## 【請求項 17】

50

請求項 16 に記載の発現カセットを保持するベクター。

【請求項 18】

前記発現カセットが一对のトランスポゾン逆向き反復配列に挟まれた構造を備える、請求項 17 に記載のベクター。

【請求項 19】

請求項 18 に記載のベクターと、トランスポザーゼ発現ベクターを含む、EPHB4 受容体特異的キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変リンパ球の調製キット。

【請求項 20】

トランスポザーゼが piggyBac トランスポザーゼである、請求項 19 に記載の調製キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor; CAR) を発現する遺伝子改変リンパ球 (CAR 遺伝子導入リンパ球) に関する。詳細には、EPHB4 受容体 (Ephrin type-B receptor 4) 高発現腫瘍に殺細胞効果を発揮し得るキメラ抗原受容体遺伝子改変リンパ球及びその用途等に関する。本出願は、2016 年 12 月 14 日に出願された日本国特許出願第 2016-242054 号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

【背景技術】

20

【0002】

がん患者の腫瘍免疫機構を回復させるために、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がもつ T 細胞受容体 (TCR) に対して遺伝子改変を加え、直接的かつ選択的に腫瘍細胞を CTL に認識させ、抗腫瘍効果を発揮するという遺伝子改変キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞による治療 (CAR-T 療法) が近年開発されてきた (例えば非特許文献 1 を参照)。CAR は腫瘍抗原を特異的に認識する蛋白 (通常は抗体可変領域を一本鎖のアミノ酸配列に改変した一本鎖抗体 (scFv) が用いられる) を N 末端側に、T 細胞受容体 鎖を C 末端側に持つ蛋白の総称である。CAR を発現する T 細胞 (CAR-T 細胞) は、細胞外ドメインで腫瘍抗原を認識した後、そのシグナルを引き続き 鎖を通じて T 細胞内に伝達し、T 細胞を活性化させ、パーフォリン、グランザイムなどの殺細胞性因子を放出させることで抗腫瘍効果を発揮する (例えば非特許文献 1 を参照)。

30

【0003】

CAR-T 細胞を用いたがん治療はすでに臨床試験として応用されている。血液腫瘍領域では CD19 陽性 B リンパ球系腫瘍を対象とした第 3 相臨床試験が行われた。具体的には、再発急性リンパ性白血病患者が対象とされ、患者から採取した T 細胞に CD19 特異的 CAR を遺伝子導入し、培養、増殖させた上で患者体内に輸注した結果、処置を受けた 5 例全例で骨髄での分子生物学的寛解が得られた (例えば非特許文献 2 を参照)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

40

【非特許文献 1】 Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:720-724.

【非特許文献 2】 Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblat T, Maslak P, Frattini M, Sadelain M. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2013;5:177ra38.

50

【非特許文献 3】Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E, Liu H, Wu MF, Gee AP, Mei Z, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*. 2011;118:6050-6056.

【非特許文献 4】Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C, Liu E, Dakhova O, Ashoori A, Corder A, Gray T, Wu MF, Liu H, Hicks J, Rainusso N, Dotti G, Mei Z, Grilley B, Gee A, Rooney CM, Brenner MK, Heslop HE, Wels WS, Wang LL, Anderson P, Gottschalk S. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol*. 2015;33:1688-1696.

10

【非特許文献 5】Abate-Daga D, Davila ML CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. *Mol Ther - Oncolytics* 2016; 3; 16014

【非特許文献 6】Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol. Cell*. 1999;4; 403-14.

【非特許文献 7】Lv J, Xia Q, Wang J, Shen Q, Zhang J, Zhou X. EphB4 promotes the proliferation, invasion, and angiogenesis of human colorectal cancer. *Exp Mol Pathol*. 2016;100;402-8.

【非特許文献 8】Pradeep S, Huang J, Mora EM, Nick AM, Cho MS, Wu SY, Noh K, Pect CV, Rupaimoole R, Stein MA, Brock S, Wen Y, Xiong C, Gharpure K, Hansen JM, Nagaraja AS, Previs RA, Vivas-Mejia P, Han HD, Hu W, Mangala LS, Zand B, Stagg LJ, Ladbury JE, Ozpolat B, Alpay SN, Nishimura M, Stone RL, Matsuo K, Armaiz-Pena G N, Dalton HJ, Danes C, Goodman B, Rodriguez-Aguayo C, Kruger C, Schneider A, Haghpeykar S, Jaladurgam P, Hung MC, Coleman RL, Liu J, Li C, Urbauer D, Lopez-Berstein G, Jackson DB, Sood AK. Erythropoietin Stimulates Tumor Growth via EphB4. *Cancer Cell*. 2015;28;610-22.

20

【非特許文献 9】Ferguson BD, Tan YH, Kanteti RS, Liu R, Gayed MJ, Vokes EE, Ferguson MK, Iafrate AJ, Gill PS, Salgia R. Novel EPHB4 Receptor Tyrosine Kinase Mutations and Kinomic Pathway Analysis in Lung Cancer. *Sci Rep*. 2015;5;10641.

【非特許文献 10】Becerikli M, Merwart B, Lam MC, Suppeln P, Rittig A, Mirmohamedsadeh A, Stricker I, Theiss C, Singer BB, Jacobsen F, Steinstraesser L. EPHB4 tyrosine-kinase receptor expression and biological significance in soft tissue sarcoma. *Int J Cancer*. 2015;136;1781-91.

30

【非特許文献 11】Mertens-Walker I, Lisle JE, Nyberg WA, Stephens CR, Burke L, Rutkowski R, Herington AC, Stephenson SA. EphB4 localises to the nucleus of prostate cancer cells. *Exp Cell Res*. 2015;333;105-15.

【非特許文献 12】Ferguson BD, Tretiakova MS, Lingen MW, Gill PS, Salgia R. Expression of the EPHB4 receptor tyrosine kinase in head and neck and renal malignancies--implications for solid tumors and potential for therapeutic inhibition. *Growth Factors*. 2014;32;202-6.

40

【非特許文献 13】Aslam MI, Abraham J, Mansoor A, Druker BJ, Tyner JW, Keller C. PDGFR reverses EphB4 signaling in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111;6383-8.

【非特許文献 14】Schmitt F, Nguyen PH, Gupta N, Mayer D. Eph receptor B4 is a regulator of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 2013;33;244-8.

【非特許文献 15】Ferguson BD, Liu R, Rolle CE, Tan YH, Krasnoperov V, Kanteti R, Tretiakova MS, Cervantes GM, Hasina R, Hseu RD, Iafrate AJ, Karrison T, Ferguson MK, Husain AN, Faoro L, Vokes EE, Gill PS, Salgia R. The EphB4 receptor tyrosine kinase promotes lung cancer growth: a potential novel therapeutic target. *PL*

50

oS One. 2013;8:e67668.

【非特許文献 1 6】Liu R, Ferguson BD, Zhou Y, Naga K, Salgia R, Gill PS, Krasnopetrov V. EphB4 as a therapeutic target in mesothelioma. BMC Cancer. 2013;13:269.

【非特許文献 1 7】Li M, Zhao Z. Clinical implications of EphB4 receptor expression in pancreatic cancer. Mol Biol Rep. 2013;40:1735-41.

【非特許文献 1 8】Hasina R, Mollberg N, Kawada I, Mutreja K, Kanade G, Yala S, Surati M, Liu R, Li X, Zhou Y, Ferguson BD, Nallasura V, Cohen KS, Hyjek E, Mueller J, Kanteti R, El Hashani E, Kane D, Shimada Y, Lingen MW, Husain AN, Posner MC, Waxman I, Villafior VM, Ferguson MK, Varticovski L, Vokes EE, Gill P, Salgia R. Critical role for the receptor tyrosine kinase EPHB4 in esophageal cancers. Cancer Res. 2013;73:184-94. 10

【非特許文献 1 9】Rutkowski R, Mertens-Walker I, Lisle JE, Herington AC, Stephenson SA. Evidence for a dual function of EphB4 as tumor promoter and suppressor regulated by the absence or presence of the ephrin-B2 ligand. Int J Cancer. 2012;131:E614-24.

【非特許文献 2 0】Noren NK1, Foos G, Hauser CA, Pasquale EB. The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. Nat Cell Biol. 2006;8:815-25.

【非特許文献 2 1】Aitsebaomo J1, Portbury AL, Schisler JC, Patterson C. Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity. Circ Res. 2008;103:929-39. 20

【非特許文献 2 2】Boyd AW, Bartlett PF, Lackmann M. Therapeutic targeting of EPH receptors and their ligands. Nat Rev Drug Discovery 2014;1339-62.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

固形腫瘍領域では、神経芽腫、骨肉腫に対するCAR-T細胞療法が開発されつつあるものの（非特許文献 3、4）、いまだ十分な研究がなされておらず、臨床応用もされていない。そこで本発明は、CAR療法の臨床応用を更に進めるべく、固形腫瘍領域での治療戦略及びそのために有用な手段の提供を課題とする。 30

【課題を解決するための手段】

【0006】

CAR-T細胞を特異的かつ強力に腫瘍細胞に作用させるためには、（1）腫瘍のみに高発現し、CAR-T細胞が標的とし得るがん抗原の同定、（2）がん抗原と特異的に結合する分子の同定とクローニング、が重要である（例えば非特許文献 5 を参照）。この点を考慮しつつ検討を進める中で本発明者らは、EPHB4受容体に着目した。EPHB4は、受容体チロシンキナーゼのEphファミリーのメンバーである。胚発生では、EPHB4にそのリガンドであるEphrinB2が結合することが細胞接着や細胞運動の調節、及び血管の発生に重要な役割を果たす（非特許文献 6 を参照）。さらに、組織崩壊や異常な細胞接着・運動・生存が癌の進行した段階で示される特徴であることから、Eph受容体の不適切な機能は、悪性腫瘍の原因となる可能性がある。実際に、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、横紋筋肉腫など種々のがんではEPHB4が高発現し、がんの悪性化に関わっていることが報告されている（非特許文献 7 ~ 20 を参照）。また、EPHB4の機能を選択的に遮断するephrinB2-Fc分子によって、これらの腫瘍細胞の増殖が著明に抑制されることが示されている（非特許文献 20 を参照）。さらに、EPHB4は血管内皮細胞に一部弱く発現するものの、その他の正常組織での発現は極めて低い（非特許文献 21 を参照）。また、悪性腫瘍患者に対してEphB4阻害薬であるEPHB4-HSAを用いた臨床試験では著しい有害事象を認めなかった（非特許文献 22 を参照）。興味深いことに、がんの悪性化におけるEPHB4の活性化はリガンド非依存的に生じること、また、癌細胞における、リガンド依存的なEPHB4の活性化（EphrinB2とEPHB4の結合によるEPHB4活性化）で癌細胞に細胞死が誘導されることが明らかと 40 50

なっている（非特許文献13、20を参照）。

【0007】

以上の考察によれば、EPHB4を高発現する腫瘍においては、EPHB4が有望ながん抗原、即ち、「治療標的」になると考えられる。そこで本発明者らは、EPHB4を特異的に認識する遺伝子改変T細胞を構築することで、EPHB4を高発現する腫瘍細胞を特異的に攻撃することが出来るという発想に至った。EPHB4は受容体であるため、そのリガンドであるEphrinB2はEPHB4と特異的かつ強力に結合することが出来る。EphrinB2におけるEPHB4との結合部位（細胞外ドメイン）を、キメラ抗原受容体（CAR）に組み込むことによって、EPHB4発現腫瘍細胞を特異的に認識し、殺細胞効果を有する遺伝子改変型T細胞を構築することが出来ると考えられる。さらには、EphrinB2細胞外ドメインをもつCARとEPHB4の結合のみでも、細胞死を誘導することが期待されるため、従来の抗体可変領域を用いたCARよりも治療効果が高く、より理想的なCARになると考えられる。

10

【0008】

以上の着想の下、EphrinB2（EFNB2）細胞外ドメインをコードする遺伝子をCAR発現ベクターに挿入したEPHB4特異的CARベクター（EPHB4-CARベクター）を構築し、当該ベクターを利用して遺伝子改変T細胞（EPHB4-CAR-T細胞）を作製した。EphrinB2細胞外ドメインをCARのEPHB4認識部位として用いることによって、従来の一本鎖抗体型CARでは見られない、EphrinB2-EPHB4結合による癌細胞への細胞死誘導効果と、CAR-T細胞の殺細胞効果の双方が期待できると考えられる。実際、EPHB4-CAR-T細胞の特性及び効果を検討した結果、EPHB4を高発現する腫瘍を特異的に殺傷できることが証明された。即ち、本発明者らが創出した戦略の有効性が実験によって確認された。

20

【0009】

上記成果に基づき、以下の発明が提供される。

[1] EphrinB2細胞外ドメインを含む細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、免疫細胞のエフェクター機能のための細胞内シグナルドメインを含む、EPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

[2] EphrinB2細胞外ドメインが配列番号1のアミノ酸配列を含む、[1]に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

[3] 前記細胞内シグナルドメインが共刺激分子の細胞内ドメインとCD3 とを含む、[1]又は[2]に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

30

[4] 前記共刺激分子がCD28である、[3]に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

[5] 前記細胞外ドメインと前記膜貫通ドメインの間にスペーサードメインを含む、[1]～[4]のいずれか一項に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体。

[6] [1]～[5]のいずれか一項に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体をコードする遺伝子。

[7] [6]に記載の遺伝子を標的細胞に導入するステップ、を含む、キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変リンパ球の調製方法。

[8] 前記遺伝子の導入が、トランスポゾン法によって行われる、[7]に記載の調製方法。

40

[9] トランスポゾン法がpiggyBacトランスポゾン法である、[8]に記載の調製方法。

[10] 標的細胞がT細胞である、[7]～[9]のいずれか一項に記載の調製方法。

[11] [1]～[5]のいずれか一項に記載のEPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体を発現した遺伝子改変リンパ球。

[12] リンパ球がT細胞である、[11]に記載の遺伝子改変リンパ球。

[13] [11]又は[12]に記載の遺伝子改変リンパ球を治療上有効量含む、細胞製剤。

[14] 横紋筋肉腫、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫及び頭頸部がんからなる群より選択される腫瘍ないしがんの治療用である、[

50

13]に記載の細胞製剤。

[15]横紋筋肉腫、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫及び頭頸部がん及び頭頸部がんからなる群より選択される腫瘍ないしがんの患者に対して、[11]又は[12]に記載の遺伝子改変リンパ球を治療上有効量、投与するステップを含む、治療法。

[16]プロモーターと、該プロモーターの制御下にある、[6]に記載の遺伝子と、を含む発現カセット。

[17][16]に記載の発現カセットを保持するベクター。

[18]前記発現カセットが一对のトランスポゾン逆向き反復配列に挟まれた構造を備える、[17]に記載のベクター。

[19][18]に記載のベクターと、トランスポザーゼ発現ベクターを含む、EPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変リンパ球の調製キット。

[20]トランスポザーゼがpiggyBacトランスポザーゼである、[19]に記載の調製キット。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】CAR発現piggyBacトランスポゾンベクターの構造。左：CD19-CAR発現ベクター（pIRII-CD19-CAR）、右：EPHB4-CAR発現ベクター（pIRII-EPHB4-CAR）。

【図2】T細胞上のEPHB4-CAR発現率。EPHB4-CAR発現ベクターとpCMV-piggyBacベクターを用いた遺伝子導入操作から15日目のT細胞のCAR遺伝子導入率をフローサイトメトリーで測定した。

【図3】EPHB4-CAR-T細胞による腫瘍細胞増殖抑制効果。CAR-T細胞（CD19-CAR-T細胞又はEPHB4-CAR-T細胞）と腫瘍細胞（Rh30細胞又はRaji細胞）を細胞比2:1で共培養した。共培養0日目及び3日目に、生存している腫瘍細胞数をフローサイトメトリーで測定した。同様の実験を3回繰り返し、平均値を算出した。上段：Rh30細胞に対する増殖抑制効果。下段：Raji細胞に対する増殖抑制効果。

【図4】EPHB4-CAR-T細胞のIFN 産生能。CAR-T細胞（CD19-CAR-T細胞又はEPHB4-CAR-T細胞）とRh30細胞を細胞比2:1で共培養した。共培養0日目及び3日目に、培養上清中に放出されたIFN をELISA法で定量した。同様の実験を3回繰り返し、平均値を算出した。

【図5】マウスモデルを用いた実験（ライブイメージング）の結果。担癌マウスにCAR-T細胞を注射後、ライブイメージング（左）で腫瘍サイズを7日毎に評価した（右）。

【発明を実施するための形態】

【0011】

#### 1. キメラ抗原受容体

本発明の第1の局面はEPHB4（Ephrin type-B receptor 4）受容体特異的なキメラ抗原受容体（慣例に従い、キメラ抗原受容体を「CAR」と呼称することがある）に関する。本発明のCARはEPHB4を標的としたものであり、EPHB4受容体に対して特異性の高い結合力（結合特異性）を有する。その特有の機能を発揮すべく、本発明のCARは特徴的な構造を備える。具体的には、EphrinB2細胞外ドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、免疫細胞のエフェクター機能のための細胞内シグナルドメインを備える。

【0012】

#### (a) 細胞外ドメイン

一般的なCARは、標的を特異的に認識する一本鎖抗体（scFv）を利用し、抗原に対する特異性を得る。対照的に本発明のCARでは、標的であるEPHB4受容体の自然リガンドであるEphrinB2タンパク質の細胞外ドメインを抗原認識に利用する。EphrinB2タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列を配列番号1に示す。典型的には、本発明のCARの細胞外ドメインは当該アミノ酸配列からなるポリペプチド鎖によって構成される。但し、その機能、即ち、EPHB4に対する特異性を示す限り、本発明のCARの細胞外ドメインが、EphrinB2タンパク質の細胞外ドメイン以外の部分を含んでいても、或いは、EphrinB2タンパク質の細胞外ドメインの一部から構成されていてもよい。また、EPHB4に対する特異性が損なわれな

10

20

30

40

50

い限り、上記アミノ酸配列の一部が改変されていてもよい。ここでの改変は、アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基の欠失、置換、付加等によって生じ得る。改変対象となるアミノ酸の数は例えば50個以下、好ましくは25個以下、更に好ましくは15個以下、更に更に好ましくは10個以下、最も好ましくは5個以下である。

【0013】

(b) 膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインは、細胞外ドメインと細胞内シグナルドメインの間に介在する。膜貫通ドメインとしては、CD28、CD3、CD8、CD3、CD4又は4-1BBなどの膜貫通ドメインを用いることができる。人工的に構築したポリペプチドからなる膜貫通ドメインを用いることにしてもよい。

10

【0014】

(c) 細胞内シグナルドメイン

細胞内シグナルドメインは、免疫細胞のエフェクター機能の発揮に必要なシグナルを伝達する。即ち、細胞外ドメインが標的の抗原と結合した際、免疫細胞の活性化に必要なシグナルを伝達することが可能な細胞内シグナルドメインが用いられる。細胞内シグナルドメインには、TCR複合体を介したシグナルを伝達するためのドメイン（便宜上、「第1ドメイン」と呼ぶ）と、共刺激シグナルを伝達するためのドメイン（便宜上、「第2ドメイン」と呼ぶ）が含まれる。第1ドメインとして、CD3の他、FcRI等の細胞内ドメインを用いることができる。好ましくは、CD3が用いられる。また、第2ドメインとしては共刺激分子の細胞内ドメインが用いられる。共刺激分子としてCD28、4-1BB（CD137）、CD2、CD4、CD5、CD134、OX-40又はICOSを例示することができる。好ましくは、CD28又は4-1BBの細胞内ドメインを採用する。

20

【0015】

第1ドメインと第2ドメインの連結態様は特に限定されないが、好ましくは、過去の事例においてCD3を遠位につないだ場合に共刺激が強く伝わったことが知られていることから、膜貫通ドメイン側に第2ドメインを配置する。同一又は異種の複数の細胞内ドメインをタンデム状に連結して第1ドメインを構成してもよい。第2ドメインについても同様である。

【0016】

第1ドメインと第2ドメインは、これらを直接連結しても、これらの間にリンカーを介在させてもよい。リンカーとしては例えばペプチドリinkerを用いることができる。ペプチドリinkerとは、直鎖状にアミノ酸が連結したペプチドからなるリンカーである。ペプチドリinkerの構造、特徴等は前述の通りである。但し、ここでのリンカーとしては、グリシンのみから構成されるものを用いてもよい。リンカーの長さは特に限定されない。例えば、アミノ酸残基数が2~15個のリンカーを用いることができる。

30

【0017】

(d) その他の要素

CARの分泌を促すためにリーダー配列（シグナルペプチド）が用いられる。例えば、GM-CSFレセプターのリーダー配列を用いることができる。また、細胞外ドメインと膜貫通ドメインがスペーサードメインを介して連結した構造にするとよい。即ち、好ましい態様のCARは、細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間にスペーサードメインを含む。スペーサードメインは、CARと標的抗原との結合を促進させるために用いられる。例えば、ヒトIgG（例えばヒトIgG1、ヒトIgG4）のFc断片をスペーサードメインとして用いることができる。その他、CD28の細胞外ドメインの一部やCD8の細胞外ドメインの一部等をスペーサードメインとして用いることもできる。尚、スペーサードメインを、膜貫通ドメインと細胞内シグナルドメインの間にも設けることにしてもよい。

40

【0018】

尚、これまでにCARを利用した実験、臨床研究などの報告がいくつかあり（例えばRossi G C, et al. Mol Ther 10:5-18, 2004; Dotti G, et al. Hum Gene Ther 20:1229-1239, 2009; Ngo MC, et al. Hum Mol Genet 20 (R1):R93-99, 2011; Ahmed N, et al. Mol The

50



r 17:1779-1787, 2009; Pule MA, et al. Nat Med 14:1264-1270, 2008; Louis CU, et al. Blood 118:6050-6056, 2011; Kochenderfer JN, et al. Blood 116:4099-4102, 2010; Kochenderfer JN, et al. Blood 119 :2709-2720, 2012; Porter DL, et al. N Engl J Med 365:725-733, 2011; Kalos M, et al. Sci Transl Med 3:95ra73,2011; Brentjens R J, et al. Blood 118:4817-4828, 2011; Brentjens RJ, et al. Sci Transl Med 5:177 r a38, 2013)、これらの報告を参考にして本発明におけるCARを構築することができる。

#### 【 0 0 1 9 】

### 2. キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする遺伝子及びその利用

本発明の第2の局面はCARをコードする遺伝子(以下、「CAR遺伝子」と呼称することがある)及びその利用(発現カセット、ベクター、CARを発現する遺伝子改変リンパ球の調製方法、CARを発現する遺伝子改変リンパ球及びその用途など)に関する。本発明のCAR遺伝子は上記構造のCARをコードする。従って、それを標的細胞に導入し、発現させることにより、本発明のCARを細胞表面に発現する遺伝子改変リンパ球(CAR遺伝子導入リンパ球)が得られる。CAR遺伝子導入リンパ球はCAR療法に利用することができる。CAR遺伝子の配列の具体例を配列番号3に示す。当該CAR遺伝子は、5'末端側から3'末端側に向かって、EphrinB2細胞外ドメイン(配列番号1)をコードする領域(配列番号5)、リンカー配列(配列番号6)、CD28(膜貫通ドメインと細胞内ドメインを含む)をコードする領域(配列番号7)及びCD3 細胞内ドメインをコードする領域(配列番号8)が直列的に並ぶ構造を備える。

#### 【 0 0 2 0 】

CAR遺伝子を用い、CAR発現用の発現カセット(以下、「CAR発現カセット」とも呼称する)を構築することができる。CAR発現カセットはプロモーターと、当該プロモーターの制御下にあるCAR遺伝子を含む。プロモーターの制御下となるように、通常、プロモーターの下流にCAR遺伝子を配置する。CAR発現カセットに利用可能なプロモーターの例を示すと、CMV-IE(サイトメガロウイルス初期遺伝子由来プロモーター)、SV40ori、レトロウイルスLTP、SR、EF1、アクチンプロモーター等である。プロモーターはCAR遺伝子に作動可能に連結される。ここで、「プロモーターがCAR遺伝子に作動可能に連結している」とは、「プロモーターの制御下にCAR遺伝子が配置されている」とことと同義であり、通常、プロモーターの3'末端側に直接又は他の配列を介してCAR遺伝子が連結されることになる。CAR遺伝子の下流にはポリA付加シグナル配列を配置する。ポリA付加シグナル配列の使用によって転写を終了させる。ポリA付加シグナル配列としてはSV40のポリA付加配列、ウシ由来成長ホルモン遺伝子のポリA付加配列等を用いることができる。

#### 【 0 0 2 1 】

発現カセット内に検出用遺伝子(レポーター遺伝子、細胞又は組織特異的な遺伝子、選択マーカー遺伝子など)、エンハンサー配列、WRPE配列等を含めることにしてもよい。検出用遺伝子は、発現カセットの導入の成否や効率の判定、CAR遺伝子の発現の検出又は発現効率の判定、CAR遺伝子が発現した細胞の選択や分取等に利用される。一方、エンハンサー配列の使用によって発現効率の向上が図られる。検出用遺伝子としては、ネオマイシンに対する耐性を付与するneo遺伝子、カナマイシン等に対する耐性を付与するnpt遺伝子(Herrera Estrella, EMBO J. 2(1983)、987-995)やnptII遺伝子(Messing & Vierra, Gene 19:259-268(1982))、ハイグロマイシンに対する耐性を付与するhph遺伝子(Blochinger & Digglmann, Mol Cell Bio 4:2929-2931)、メタトレキセートに対する耐性を付与するdhfr遺伝子(Bourouis et al., EMBO J. 2(7))等(以上、マーカー遺伝子)、ルシフェラーゼ遺伝子(Giacomin, P1. Sci. 116(1996)、59~72; Scikantha, J. Bact. 178(1996)、121)、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子、GFP(Gerdes, FEBS Lett. 389(1996)、44-47)やその改変体(EGFPやd2EGFPなど)等の蛍光タンパク質の遺伝子(以上、レポーター遺伝子)、細胞内ドメインを欠く上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子等の遺伝子を用いることができる。検出用遺伝子は、例えば、バイシストロニック性制御配列(例えば、リボソーム内部認識配列(IRES))や自己開裂ペプチドをコードする配列を介してCAR遺伝子に連結している。自己開裂ペプチドの例はThomasea asigna virus由来の2A

10

20

30

40

50

ペプチド (T2A) であるが、これに限定されるものではない。自己開裂ペプチドとして蹄疫ウイルス (FMDV) 由来の2Aペプチド (F2A)、ウマ鼻炎Aウイルス (ERAV) 由来の2Aペプチド (E2A)、porcine teschovirus (PTV-1) 由来の2Aペプチド (P2A) 等が知られている。

#### 【 0 0 2 2 】

CAR発現カセットは標的細胞への導入のためにベクターに搭載される。本明細書において用語「ベクター」は、それに挿入された核酸分子をターゲット (標的細胞) 内へと輸送することができる核酸性分子をいい、形態、由来などは特に限定されるものではない。様々な種類のベクターが利用可能である。好適なベクターの例はウイルスベクターであるが、非ウイルスベクターを用いることもできる。ウイルスベクターを利用した方法はウイルスが細胞へと感染する現象を巧みに利用するものであり、高い遺伝子導入効率を得られる。ウイルスベクターとしてレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター等が開発されている。この中でレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターではベクターに組み込んだ目的遺伝子が宿主染色体へと組み込まれ、安定かつ長期的な発現が期待できる。各ウイルスベクターは既報の方法に従い又は市販される専用のキットを用いて作製することができる。非ウイルスベクターの例としては、プラスミドベクター、リポソームベクター、正電荷型リポソームベクター (Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84:7413-7417, 1987)、YACベクター、BACベクターを挙げることができる。

10

20

#### 【 0 0 2 3 】

好ましくは、トランスポゾン法による遺伝子導入を行う。トランスポゾン法とは、非ウイルス遺伝子導入法の一つである。トランスポゾンは、進化の過程で保存されてきた、遺伝子転位を引き起こす短い遺伝子配列の総称である。遺伝子酵素 (トランスポザーゼ) とその特異認識配列のペアで遺伝子転位を引き起こす。トランスポゾン法として、例えば、piggyBacトランスポゾン法を用いることができる。PiggyBacトランスポゾン法は、昆虫から単離されたトランスポゾンを利用するものであり (Fraser MJ et al., Insect Mol Biol. 1996 May;5(2):141-51.; Wilson MH et al., Mol Ther. 2007 Jan;15(1):139-45.)、哺乳類染色体への高効率な組込みを可能にする。PiggyBacトランスポゾン法は実際に遺伝子の導入に利用されている (例えばNakazawa Y, et al., J Immunother 32:826-836, 2009; Nakazawa Y et al., J Immunother 6:3-10, 2013等を参照)。本発明に適用可能なトランスポゾン法はpiggyBacを利用したものに限定されるものではなく、例えば、Sleeping Beauty (Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z (1997) Cell 91: 501-510.)、Frog Prince (Miskey C, Izsvak Z, Plasterk RH, Ivics Z (2003) Nucleic Acids Res 31: 6873-6881.)、Tol1 (Koga A, Inagaki H, Bessho Y, Hori H. Mol Gen Genet. 1995 Dec 10;249(4):400-5.; Koga A, Shimada A, Kuroki T, Hori H, Kusumi J, Kyono-Hamaguchi Y, Hamaguchi S. J Hum Genet. 2007;52(7):628-35. Epub 2007 Jun 7.)、Tol2 (Koga A, Hori H, Sakaizumi M (2002) Mar Biotechnol 4: 6-11.; Johnson Hamlet MR, Yergeau DA, Kuliyeve E, Takeda M, Taira M, Kawakami K, Mead PE (2006) Genesis 44: 438-445.; Choo BG, Kondrichin I, Parinov S, Emelyanov A, Go W, Toh WC, Korzh V (2006) BMC Dev Biol 6: 5.) 等のトランスポゾンを利用した方法を採用することによい。

30

40

#### 【 0 0 2 4 】

トランスポゾン法による導入操作は常法で行えばよく、過去の文献 (例えばpiggyBacトランスポゾン法についてはNakazawa Y, et al., J Immunother 32:826-836, 2009、Nakazawa Y et al., J Immunother 6:3-10, 2013、Saha S, Nakazawa Y, Huye LE, Doherty JE, Galvan DL, Rooney CM, Wilson MH. J Vis Exp. 2012 Nov 5;(69):e4235、Saito S, Nakazawa Y, Sueki A, et al. Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Cytotherapy. 2014;16:1257-69.) が参考になる。

50

## 【0025】

本発明の好ましい一態様では、piggyBacトランスポゾン法が採用される。典型的には、piggyBacトランスポゾン法ではpiggyBacトランスポザーゼをコードする遺伝子を搭載したベクター（トランスポザーゼプラスミド）と、所望の核酸コンストラクト（CAR発現カセット）がpiggyBac逆向き反復配列に挟まれた構造を備えるベクター（トランスポゾンプラスミド）を用意し、これらのベクターを標的細胞に導入（トランスフェクション）する。トランスフェクションには、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リポフェクション、リン酸カルシウム法など、各種手法を利用できる。

## 【0026】

標的細胞（CAR遺伝子を導入する細胞）として、CD4陽性CD8陰性T細胞、CD4陰性CD8陽性T細胞、iPS細胞から調製されたT細胞、 $\alpha$ -T細胞、 $\beta$ -T細胞、NK細胞、NKT細胞を挙げることができる。上記の如きリンパ球又は前駆細胞を含むものであれば、様々な細胞集団を用いることができる。末梢血から採取されるPBMC（末梢血単核細胞）は好ましい標的細胞の一つである。即ち、好ましい一態様では、PBMCに対して遺伝子導入操作を行う。PBMCは常法で調製すればよい。PBMCの調製方法については、例えば、Saha S, Nakazawa Y, Hu ye LE, Doherty JE, Galvan DL, Rooney CM, Wilson MH. J Vis Exp. 2012 Nov 5;(69):e4235を参照することができる。尚、特に言及しない限り、本明細書における各種細胞（例えばT細胞）はヒト細胞である。

## 【0027】

以上のステップで得られたCAR遺伝子導入リンパ球は、典型的には、活性化処理に供される。例えば、抗CD3抗体及び抗CD28抗体で刺激し、CAR遺伝子導入リンパ球を活性化させる。この処理によれば、通常、CAR遺伝子導入リンパ球の生存・増殖も促される。例えば、抗CD3抗体と抗CD28抗体で培養面をコートした培養容器（例えば培養皿）で1日～20日、好ましくは3日～14日、更に好ましくは5日～10日、培養することによって、抗CD3抗体及び抗CD28抗体による刺激を加えることができる。抗CD3抗体（例えばミルテニーパーイオテク社が提供する商品名CD3pure抗体を用いることができる）と抗CD28抗体（例えばミルテニーパーイオテク社が提供する商品名CD28pure抗体を用いることができる）は市販もされており、容易に入手可能である。抗CD3抗体と抗CD28抗体がコートされた磁気ビーズ（例えば、VERITAS社が提供するDynabeads T-Activator CD3/CD28）を利用して当該刺激を行うことも可能である。尚、抗CD3抗体として「OKT3」クローンを用いることが好ましい。尚、遺伝子導入操作による損傷/障害からの回復を促すために、遺伝子導入操作直後ではなく、遺伝子導入操作から8時間～48時間（好ましくは16時間～24時間）程度経過した後に活性化処理を実施するとよい。

## 【0028】

細胞の生存率/増殖率を高めるために、活性化処理の際、T細胞増殖因子が添加された培養液を使用するとよい。T細胞増殖因子としてはIL-15が好適である。好ましくは、IL-15に加えIL-7が添加された培養液を用いる。IL-15の添加量は例えば1ng/ml～20ng/ml、好ましくは5ng/ml～10ng/mlとする。同様にIL-7の添加量は例えば1ng/ml～20ng/ml、好ましくは5ng/ml～10ng/mlとする。IL-15、IL-7等のT細胞増殖因子は常法に従って調製することができる。また、市販品を利用することもできる。ヒト以外の動物種のT細胞増殖因子の使用を排除するものではないが、通常、T細胞増殖因子はヒト由来のもの（組換え体であってもよい）を用いる。ヒトIL-15、ヒトIL-7等の増殖因子は用意に入手することができる（例えばミルテニーパーイオテク社、R&Dシステムズ社等が提供する）。

## 【0029】

血清（ヒト血清、ウシ胎仔血清など）を添加した培地を用いてもよいが、無血清培地を採用することにより、臨床応用する際の安全性が高く、且つ血清ロット間の差による培養効率の違いが出にくいという利点を有する細胞を調製することが可能になる。リンパ球用の無血清培地の具体例はTexMACS<sup>TM</sup>（ミルテニーパーイオテク社）、AIM V（登録商標）（Thermo Fisher Scientific社）である。血清を用いる場合には、自己血清、即ち、本発明の調製方法で得られるCAR遺伝子導入リンパ球の投与を受ける患者から採取した血清を用い

10

20

30

40

50

るとよい。基本培地にはリンパ球の培養に適したものをを用いればよく、具体例を挙げれば、上掲のTexMACS™、AIM V（登録商標）である。その他の培養条件は、リンパ球の生存、増殖に適したものであればよく、一般的なものを採用すればよい。例えば、37 に設定したCO<sub>2</sub>インキュベーター（CO<sub>2</sub>濃度5%）内で培養すればよい。

#### 【0030】

活性化処理後、細胞を回収する。回収操作は常法で行えばよい。例えば、ピペッティング、遠心処理等によって回収する。好ましい一態様では、回収操作の前に、活性化処理後の細胞をT細胞増殖因子の存在下で培養するステップを行う。このステップによれば、効率的な拡大培養が可能になり、また、細胞の生存率を高める利点もある。ここでのT細胞増殖因子としてはIL-15、IL-7等を用いることができる。活性化処理の場合と同様に、IL-15とIL-7を添加した培地で培養することにしてもよい。培養期間は例えば1日～21日、好ましくは5日～18日、更に好ましくは10日～14日である。培養期間が短すぎると細胞数の十分な増加を望めず、培養期間が長すぎると細胞の活性（生命力）の低下、細胞の疲弊/疲労等のおそれがある。培養の途中で継代してもよい。また、培養中は必要に応じて培地交換をする。例えば3日に1回の頻度で培養液の1/3～2/3程度を新しい培地に交換する。

10

#### 【0031】

一態様では、本発明のCAR遺伝子導入リンパ球として、ウイルス特異性を獲得したキメラ抗原受容体遺伝子改変T細胞（以下、「ウイルス特異性獲得CAR-T細胞」と呼ぶ）を調製する。ウイルス特異性獲得CAR-T細胞は、自家移植に利用する場合にはウイルスT細胞受容体からの刺激による体内持続性の向上が望めること、同種移植に利用する場合には更に同種免疫反応(GVHD)の軽減により移植ドナーからのCAR-T作製が可能になり、しかも第3者ドナーからのCAR-T細胞を製剤化できる可能性があることなど、臨床応用上、重要な利点を有する。実際、ウイルス特異性獲得CAR-T細胞がより長期に体内に持続することが報告されている（Pule MA, et al. Nat Med. 2008 Nov;14(11):1264-70.）。また、第3者由来EBV特異的CTL臨床研究の報告（Annual Review血液2015、2015年1月発行、中外医学社）により、ウイルス特異性獲得細胞傷害性T細胞（CTL）の安全性が高いことが裏づけられている。

20

#### 【0032】

この態様の調製方法は以下のステップ（i）～（iv）を含む。

30

（i）T細胞を含む細胞集団を抗CD3抗体及び抗CD28抗体で刺激した後、ウイルスペプチド抗原存在下での培養及び増殖能を喪失させる処理を行うことによって得られる、ウイルスペプチド抗原を保持した非増殖性細胞を用意するステップ

（ii）EPHB4受容体特異的キメラ抗原受容体遺伝子を標的細胞に導入し、遺伝子改変T細胞を得るステップ

（iii）ステップ（i）で用意した非増殖性細胞とステップ（ii）で得た遺伝子改変T細胞を混合し、共培養するステップ

（iv）培養後の細胞を回収するステップ

#### 【0033】

ステップ（i）では、まず、T細胞を含む細胞集団を抗CD3抗体及び抗CD28抗体で刺激し、活性化T細胞を得る。「T細胞を含む細胞集団」として、好ましくは、末梢血から採取されるPBMC（末梢血単核細胞）を用いる。PBMCを精製し、T細胞の含有率を高めたものや、末梢血からフェレーシスによって採取した単核球等を、ここでの「T細胞を含む細胞集団」として用いることも可能である。

40

#### 【0034】

例えば、抗CD3抗体と抗CD28抗体で培養面をコートした培養容器（例えば培養皿）で3時間～3日、好ましくは6時間～2日、更に好ましくは12時間～1日、培養することによって、細胞集団内のT細胞に対して抗CD3抗体及び抗CD28抗体による刺激を加えることができる。抗CD3抗体（例えばミルテニーバイオテク社が提供する商品名CD3pure抗体を用いることができる）と抗CD28抗体（例えばミルテニーバイオテク社が提供する商品名CD28pu

50

re抗体を用いることができる)は市販もされており、容易に入手可能である。抗CD3抗体と抗CD28抗体がコートされた磁気ビーズ(例えば、VERITAS社が提供するDynabeads T-Activator CD3/CD28)を利用してステップ(i)の刺激を行うことも可能である。尚、抗CD3抗体として「OKT3」クローンを用いることが好ましい。

#### 【0035】

上記のようにして活性化T細胞を得た後、ウイルスペプチド抗原存在下での培養と増殖能を喪失させる処理を行う。これによって、非増殖性の「ウイルスペプチド抗原を細胞表面に保持した活性化T細胞」(以下、「ウイルスペプチド保持非増殖性細胞」と呼ぶ)が得られる。ウイルスペプチド抗原存在下での培養と、増殖能を喪失させる処理の順序は特に限定されない。従って、ウイルスペプチド抗原存在下で培養した後に増殖能を喪失させても、或いは増殖能を喪失させた後にウイルスペプチド抗原存在下で培養することにしてもよい。好ましくは、増殖能を喪失する前の方がウイルスペプチド抗原の取り込みがより良好であろうという期待から前者の順序を採用する。

10

#### 【0036】

「増殖能を喪失させる処理」は、典型的には放射線照射であるが、薬剤を用いることにしてもよい。放射線照射の条件の一例を示すと、ガンマ線を用い、25Gy~50Gyの強度で15~30分間の処理である。

#### 【0037】

ウイルスペプチド抗原存在下で培養するためには、例えば、ウイルスペプチド抗原が添加された培地を用いればよい。或いは、培養中にウイルスペプチド抗原を培地に添加すればよい。ウイルスペプチド抗原の添加濃度は例えば0.5 $\mu$ g/ml~1 $\mu$ g/mlとする。培養期間は例えば10分~5時間、好ましくは20分~3時間とする。本明細書における「ウイルスペプチド抗原」とは、特定のウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導するエピトープペプチドまたはエピトープを含むロングペプチドをいう。ウイルスペプチド抗原としては、これらに限定されるものではないが、例えばアデノウイルス(AdV)の抗原ペプチド(例えば、WO 2007015540 A1を参照)、サイトメガロウイルス(CMV)の抗原ペプチド(例えば、特開2002-255997号公報、特開2004-242599号公報、特開2012-87126号公報を参照)、エプスタインバールウイルス(EBV)の抗原ペプチド(例えば、WO 2007049737 A1、特願2011-177487号公報、特開2006-188513号公報を参照)、等を用いることができる。ウイルスペプチド抗原は配列情報に基づき常法(例えば液相合成法、固相合成法)で調製することができる。また、ウイルスペプチド抗原の中には市販されているものもある(例えば株式会社医学生物学研究所、タカラバイオ、ミルテニーバイオテクなどが提供する。)

20

30

#### 【0038】

1種類の抗原ペプチドを用いることも可能であるが、通常は2種類以上の抗原ペプチド(抗原ペプチド混合物)を使用する。例えば、AdV抗原ペプチド混合物、CMV抗原ペプチド混合物又はEBV抗原ペプチド混合物、或いはこれら抗原ペプチド混合物の中の二つ以上を組み合わせたもの(例えば、AdV抗原ペプチド混合物、CMV抗原ペプチド混合物及びEBV抗原ペプチド混合物を混合したもの)を用いる。2種類以上の抗原ペプチドを併用することにより、標的(抗原ペプチド)が異なる複数の活性化T細胞を得ることができ、本発明の調製方法で得られるCAR-T細胞が有効な治療対象(患者)の増大(カバー率の向上)を望める。いずれのウイルスに由来する抗原ペプチドを使用するかを決定するにあたっては、本発明の調製方法で得られるCAR-T細胞の用途、具体的には治療対象となる疾患や患者の病態を考慮するとよい。AdV抗原ペプチド混合物、CMV抗原ペプチド混合物、EBV抗原ペプチド混合物については市販もされており(例えば、ミルテニーバイオテク社が提供する、PepTivator(登録商標) AdV5 Hexon、PepTivator(登録商標) CMV pp65、PepTivator(登録商標) EBV EBNA-1、PepTivator(登録商標) EBV BZLF1、JPT Peptide Technologies社が提供するPepMix<sup>TM</sup> Collection HCMV、PepMix<sup>TM</sup> EBV(EBNA1)等)、容易に入手することができる。

40

#### 【0039】

50

ステップ ( i i ) は、上で説明した遺伝子導入操作 ( CAR遺伝子の導入 ) に対応するものであり、各種遺伝子導入法を利用することができる。好ましくはトランスポゾン法を採用する。このステップによって遺伝子改変T細胞 ( CAR-T細胞 ) が得られる。

【 0 0 4 0 】

ステップ ( i i i ) では、ステップ ( i ) で用意した非増殖性細胞 ( ウイルスペプチド保持非増殖性細胞 ) と、ステップ ( i i ) で得た遺伝子改変T細胞を混合し、共培養する。これによって、非増殖性細胞による共刺激分子及びウイルス抗原ペプチドを介した刺激が加わり、ウイルス抗原特異的な遺伝子改変T細胞が活性化するとともに、その生存・増殖が促される。

【 0 0 4 1 】

共培養に使用する非増殖性細胞の数と遺伝子改変T細胞の数の比率 ( 非増殖性細胞の数 / 遺伝子改変T細胞の数 ) は特に限定されないが、例えば、0.025 ~ 0.5とする。

【 0 0 4 2 】

このステップは、ウイルス特異性獲得CAR-T細胞を選択的に増殖させるため、強力な刺激を避けてT細胞の疲弊 / 疲労を防ぐため、等の理由から、原則として、抗CD3抗体及び抗CD28抗体による刺激を加えない。一方、細胞の生存率 / 増殖率を高めるために、共培養の際、T細胞増殖因子が添加された培養液を使用するとよい。T細胞増殖因子としてはIL-15が好適である。好ましくは、IL-15に加えIL-7が添加された培養液を用いる。IL-15の添加量は例えば5ng/ml ~ 10ng/mlとする。同様にIL-7の添加量は例えば5ng/ml ~ 10ng/mlとする。IL-15、IL-7等のT細胞増殖因子は常法に従って調製することができる。また、市販品を利用することもできる。ヒト以外の動物種のT細胞増殖因子の使用を排除するものではないが、通常、T細胞増殖因子はヒト由来のもの ( 組換え体であってもよい ) を用いる。ヒトIL-15、ヒトIL-7等の増殖因子は用意に入手することができる ( 例えばミルテニーバイオテク社、R&Dシステムズ社等が提供する ) 。

【 0 0 4 3 】

血清 ( ヒト血清、ウシ胎仔血清など ) を添加した培地を用いてもよいが、無血清培地を採用することにより、臨床応用する際の安全性が高く、且つ血清ロット間の差による培養効率の違いが出にくいという利点を有する細胞を調製することが可能になる。T細胞用の無血清培地の具体例はTexMACS™ ( ミルテニーバイオテク社 )、AIM V ( 登録商標 ) ( Thermo Fisher Scientific社 ) である。血清を用いる場合には、自己血清、即ち、ステップ ( i i ) で得られる遺伝子改変T細胞の由来である個体 ( 典型的には本発明の調製方法で得られるキメラ抗原受容体遺伝子改変T細胞の投与を受ける患者 ) から採取した血清を用いるとよい。基本培地にはT細胞の培養に適したものを用いればよく、具体例を挙げれば、上掲のTexMACS™、AIM V ( 登録商標 ) である。その他の培養条件は、T細胞の生存、増殖に適したものであればよく、一般的なものを採用すればよい。例えば、37 に設定したCO<sub>2</sub>インキュベーター ( CO<sub>2</sub>濃度5% ) 内で培養すればよい。

【 0 0 4 4 】

ウイルスペプチド保持非増殖性細胞をステップ ( i i i ) の途中で追加してもよい。或いは、共培養後の細胞を回収し、ウイルスペプチド保持非増殖性細胞と混合した後に再度、共培養を行うことにしてもよい。これらの操作を2回以上繰り返すことにしてもよい。このように、ウイルスペプチド保持非増殖性細胞を利用した刺激なし活性化を複数回行うことにすれば、ウイルス特異性獲得CAR-T細胞の誘導率の向上、ウイルス特異性獲得CAR-T細胞数の増加を望める。尚、改めて用意したもの、又はステップ ( i ) で用意した細胞の一部を保存しておいたものを、ここでのウイルスペプチド保持非増殖性細胞として使用する。

【 0 0 4 5 】

ステップ ( i i i ) における共培養の期間は、例えば1日 ~ 21日、好ましくは5日 ~ 18日、更に好ましくは10日 ~ 14日である。培養期間が短すぎると十分な効果を望めず、培養期間が長すぎると細胞の活性 ( 生命力 ) の低下、細胞の疲弊 / 疲労等のおそれがある。

10

20

30

40

50

## 【0046】

ウイルスペプチド保持非増殖性細胞との共培養の前に、ステップ(i i)で得た遺伝子改変T細胞をウイルスペプチド保持非増殖性PBMC(末梢血単核球)と共培養することにしてもよい。この態様の場合、ステップ(i i)で得た遺伝子改変T細胞とウイルスペプチド保持非増殖性PBMCを共培養して得られた細胞と、ステップ(i)で用意したウイルスペプチド保持非増殖性細胞とを混合し、共培養することになる。ここでのウイルスペプチド保持非増殖性PBMCは、PBMCをウイルスペプチド抗原存在下での培養及び増殖能を喪失させる処理に供することによって調製することができる。具体的には、例えば、末梢血から分離したPBMCを放射線処理した後、ウイルスペプチド抗原存在下で培養し、ウイルスペプチド保持非増殖性PBMCを得る。尚、1回の採血で得た末梢血から分離したPBMCの一部を用いてウイルスペプチド保持非増殖性PBMCを調製するとともに、他の一部から遺伝子改変T細胞を調製することにすれば、本発明の実施に伴う採血回数を低減することができ、臨床応用上、極めて大きな利点となる。特に、残りのPBMCを用いてステップ(i)を行い、ウイルスペプチド保持非増殖性細胞(2段階目の共培養に使用する細胞)を調製することになれば、必要な3種類の細胞、即ち、遺伝子改変T細胞、当該細胞との共培養に使用するウイルスペプチド保持非増殖性PBMC、2段階目の共培養に使用するウイルスペプチド保持非増殖性細胞を1回の採血によって用意することができることから、本発明で得られるCAR-T細胞を用いた治療における、患者の負担は大幅に軽減される。

10

## 【0047】

ステップ(i i i)に続くステップ(i v)では、培養後の細胞を回収する。回収操作は常法で行えばよい。例えば、ピペッティング、遠心処理等によって回収する。ステップ(i i i)とステップ(i v)の間に、共培養後の細胞をT細胞増殖因子の存在下で培養するステップ(拡大培養)を行うことにしてもよい。この拡大培養に際してウイルスペプチド保持非増殖性細胞を追加したり、或いは拡大培養の途中でウイルスペプチド保持非増殖性細胞を追加したりすることにしてもよい。

20

## 【0048】

別の態様では、ステップ(i i)と同様の操作で得た遺伝子改変T細胞をウイルスペプチド保持非増殖性PBMC(末梢血単核球)と共培養した後、抗CD28抗体(抗CD3抗体を併用してもよい)で刺激する。続いて、必要に応じて培養(例えば拡大培養)した後、細胞を回収し、CAR-T細胞(本発明のCAR遺伝子導入リンパ球としてのウイルス特異性獲得CAR-T細胞)を得る。

30

## 【0049】

## 3. CAR遺伝子導入リンパ球及びその用途

本発明の更なる局面は、本発明の調製方法で得られた、キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変リンパ球(以下、「本発明のCAR遺伝子導入リンパ球」と呼ぶ)及びその用途に関する。本発明のCAR遺伝子導入リンパ球はEPHB4受容体を高発現する腫瘍/がん(以下、「標的疾患」と呼ぶ)の治療、予防又は改善に広く利用され得る。標的疾患の例を挙げると、横紋筋肉腫、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫及び頭頸部がんである。「治療」とは、標的疾患に特徴的な症状又は随伴症状を緩和すること(軽症化)、症状の悪化を阻止ないし遅延すること等が含まれる。「予防」とは、疾病(障害)又はその症状の発症/発現を防止又は遅延すること、或いは発症/発現の危険性を低下させることをいう。一方、「改善」とは、疾病(障害)又はその症状が緩和(軽症化)、好転、寛解、又は治癒(部分的な治癒を含む)することをいう。

40

## 【0050】

本発明のCAR遺伝子導入リンパ球を細胞製剤の形態で提供することもできる。本発明の細胞製剤には、本発明のCAR遺伝子導入リンパ球が治療上有効量含有される。例えば1回の投与用として、 $1 \times 10^4$ 個 $\sim 1 \times 10^{10}$ 個の細胞を含有させる。細胞の保護を目的としてジメチルスルフォキシド(DMSO)や血清アルブミン等、細菌の混入を阻止する目的で抗生物質等、細胞の活性化、増殖又は分化誘導などを目的とした各種の成分(ビタミン類、サイトカイン、成長因子、ステロイド等)等の成分を細胞製剤に含有させてもよい。

50

## 【 0 0 5 1 】

本発明のCAR遺伝子導入リンパ球又は細胞製剤の投与経路は特に限定されない。例えば、静脈内注射、動脈内注射、門脈内注射、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、又は腹腔内注射によって投与する。全身投与によらず、局所投与することにもよい。局所投与として、目的の組織・臓器・器官への直接注入を例示することができる。投与スケジュールは、対象（患者）の性別、年齢、体重、病態などを考慮して作成すればよい。単回投与の他、連続的又は定期的に複数回投与することにもよい。

## 【 0 0 5 2 】

本発明のCAR遺伝子導入リンパ球を用いた治療法では、治療上有効量のCAR遺伝子導入リンパ球を患者に投与する。本発明のCAR遺伝子導入リンパ球はその特徴的な構成により、E PHB4蛋白を細胞膜表面に発現する腫瘍に対して抗腫瘍効果を発揮するという特性を示す。そのため、特定の腫瘍群、即ち、横紋筋肉腫、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫、頭頸部がん等の治療に用いることが可能になる。

## 【 0 0 5 3 】

## 4 . CAR遺伝子導入リンパ球調製用のベクター及びキット

本発明の更なる局面は本発明の調製方法に利用可能なベクター（CAR遺伝子導入リンパ球調製ベクター）及びキット（CAR遺伝子導入リンパ球調製キット）に関する。本発明のCAR遺伝子導入リンパ球調製ベクターは、CAR発現カセットを搭載したものであり、当該発現カセットの標的細胞への導入を可能にする。CAR発現カセットにはCAR遺伝子の他、CAR遺伝子の発現に必要なプロモーター（CMV-IE、SV40ori、レトロウイルスLTP、SR、EF1、アクチンプロモーター等）が含まれる。本発明のベクターに、検出用遺伝子（レポーター遺伝子、細胞又は組織特異的な遺伝子、選択マーカー遺伝子など）、エンハンサー配列、WRPE配列等を含めることができる。

## 【 0 0 5 4 】

好ましくは、トランスポゾン法に利用されるベクターとして本発明のベクターを構築する。この場合、典型的には、CAR発現カセットが一对のトランスポゾン逆向き反復配列に挟まれた構造（例えば5'側トランスポゾン逆向き反復配列、CAR発現カセット、3'側トランスポゾン逆向き反復配列の順に配置される）をベクターが備えることになる。

## 【 0 0 5 5 】

本発明のキットの一態様は、トランスポゾン法を利用したCAR遺伝子導入リンパ球の調製方法に適したキットである。当該キットは、一对のトランスポゾン逆向き反復配列に挟まれたCAR発現カセットを搭載したCARベクターとトランスポザーゼ発現ベクターを含む。CARベクターに組み込まれた一对のトランスポゾン逆向き反復配列と対応するようにトランスポザーゼを選択する。例えば、piggyBac逆向き反復配列とpiggyBacトランスポザーゼの組合せを採用する。

## 【 0 0 5 6 】

遺伝子導入操作に使用する試薬、器具、装置等、形質転換体の検出や選択などに使用する試薬、器具、装置等を本発明のキットに含めてもよい。尚、通常、本発明のキットには取り扱い説明書が添付される。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 5 7 】

CAR療法の臨床応用を更に進めるべく、以下の検討を行った。

## 【 0 0 5 8 】

## &lt; EPHB4-CAR-T細胞の殺細胞効果 &gt;

## 1 . 材料及び方法

## ( 1 ) pIRII-EPHB4-CARベクターの作製

(I) 既報のCD19-CAR発現piggyBacトランスポゾンベクター（pIRII-CAR.CD19）（Saito S, Nakazawa Y, Sueki A, Matsuda K, Tanaka M, Yanagisawa R, Maeda Y, Sato Y, Okabe S, Inukai T, Sugita K, Wilson MH, Rooney CM, Koike K. Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromoso

10

20

30

40

50



me-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*. 2014;16;1257-69) を制限酵素XhoIとBbvCI (New England Biolab, Ipswich, MA, USA) の両者で切断した。

(II)EFNB2遺伝子を高発現していることが知られている、ヒト神経芽腫細胞株SH-SY5YからmRNAを抽出し、cDNAを合成した。EFNB2は333個のアミノ酸配列(配列番号2)を持つ膜結合型蛋白であるが、その細胞外ドメイン(配列番号1)は、N末端から227番目のアミノ酸までであることが知られている。この部位を特異的に増幅可能なPCRプライマー(XhoI-EFNB2 forwardプライマー: ATCTCGAGATGGCTGTGAGAAGGG(配列番号9)とEFNB2 ECD-BbvCI reverseプライマー: ATCCTCAGC ATAAGGCCACTTCGGAAC(配列番号10))を作製し、先に得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行った。このPCRプライマー配列にはあらかじめForwardプライマーにXhoI制限酵素認識部位を、ReverseプライマーにBbvCI認識部位をそれぞれ挿入しておいた。

10

(III)(II)で得られた699bpのDNA断片を、ZeroBlunt PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) を用いてpCR-Bluntプラスミドにクローニングした。このプラスミドを用いて大腸菌をトランスフォームし、大量増幅、抽出した。抽出したEFNB2細胞外ドメイン塩基配列が挿入されたpCR-Bluntプラスミドを、制限酵素XhoIとBbvCIの両者で切断した。

(IV)(I)で得られた4971bpのDNA断片と、(III)で得られた689bpのDNA断片をDNA Ligation kit (Takarabio, Otsu, Shiga, Japan) を用いてライゲーションした。

(V)コンピテントセルを用いて、(IV)で得られた5660bp環状DNAプラスミド(配列番号4)を大量増幅した。

20

(VI)Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) を用いて全塩基配列を確認した(配列表を参照)。

【0059】

## (2) EPHB4-CAR-T細胞の調製

(I)末梢血約10 mlより比重遠心分離法を用いて単核球(PBMC)を分離した。

(II)4D-Nucleofector™装置とP3 Primary Cell 4D-Nucleofector™Xキット(Lonza, Basel, Switzerland)の組み合わせによるエレクトロポレーション法(Program EO-115)を用いて、pIRII-EPHB4-CARベクター(5 µg)とpCMV-piggyBacベクター(5 µg)を $1 \times 10^7$ 個のPBMCに遺伝子導入した。

(III)(II)で得られた遺伝子導入細胞と、4種類のウイルス抗原ペプチド(MACS GMP Peptivator; AdV5 Hexon, CMV pp65, EBV EBNA-1, EBV BZLF1, Miltenyi Biotec, Auburn, CA)でパルスした $1 \times 10^6$ 個の照射済みPBMCを混合し、インターロイキン(IL)-7(10 ng/ml, Miltenyi)およびIL-15(5 ng/ml, Miltenyi)添加TexMACS培地(Miltenyi)2 mlで満たされた、抗CD28抗体(Miltenyi)で固相化した24ウェル培養プレートの1ウェルに静置した。遺伝子導入3日後、非固相化24ウェル培養プレートの1ウェルに遺伝子導入細胞を移入した。その際、IL-7/IL-15添加TexMACS培地を1 ml交換した。遺伝子導入7日後、遺伝子導入細胞をIL-7/IL-15(5 ng/ml)添加TexMACS培地30 mlで満たされたG-Rex10培養器(Wilson Wolf Manufacturing Inc, New Brighton, MN)に移入した。遺伝子導入14日目に細胞を回収した。一部の細胞を用いてCAR蛋白の発現をフローサイトメトリー法で確認した。このようにして作製されたCAR-T細胞をEPHB4-CAR-T細胞とする。尚、対照群として、既報のpIRII-CAR.CD19ベクターを遺伝子導入したCD19-CAR-T細胞も同様の方法で増幅培養した。

30

40

【0060】

## (3) 共培養実験 1

EPHB4高発現腫瘍として、代表的な小児がんの一つである横紋筋肉腫の腫瘍細胞株Rh30(EPHB4高発現、CD19低発現)を用いた。対照となるEPHB4低発現腫瘍として、ヒトB細胞性リンパ腫Raji細胞(EPHB4低発現、CD19高発現)を用いた。24ウェル培養プレートの1ウェルに $2 \times 10^5$ 個のCAR-T細胞(CD19-CAR-T細胞又はEPHB4-CAR-T細胞)と $1 \times 10^5$ 個の腫瘍細胞(Rh30細胞又はRaji細胞)を入れ(CAR-T細胞と腫瘍細胞の細胞比2:1)、1 mlの10%ウシ胎仔血清含DMEM培地下で3日間共培養した。尚、各組合せについて3ウェルを用意した。

50

## 【 0 0 6 1 】

共培養開始0時間後、72時間後に、ウェル毎に細胞を回収し、抗CD3-APC抗体と抗IGF1R-PE抗体で染色した後、フローサイトメトリー法でCD3陽性細胞（T細胞）とIGF1R陽性細胞（Rh30細胞）の比率を測定した。対照のRaji細胞については、抗CD3-APC抗体と抗CD19-FITC抗体で染色した後、フローサイトメトリー法でCD3陽性細胞（T細胞）とCD19陽性細胞（Raji細胞）の比率を測定した。

## 【 0 0 6 2 】

## ( 4 ) 共培養実験 2

CD19-CAR-T細胞又はEPHB4-CAR-T細胞とRh30細胞を細胞比2:1で共培養し、共培養0日目及び3日目に、培養上清中に放出されたIFN をELISA法で定量した。

10

## 【 0 0 6 3 】

## 2 . 結果

EFNB2細胞外ドメインを抗原認識部位として挿入したEPHB4-CAR発現ベクター（pIR11-EPHB4-CAR）の構成を図1に示す。また、EPHB4-CAR発現ベクターの塩基配列（配列番号4）を配列表に示した。配列番号4の配列は、EphrinB2細胞外ドメインをコードする領域（6bp~687bp。配列番号5）、リンカー配列（配列番号6）CD28（膜貫通ドメインと細胞内ドメイン含む）をコードする領域（702bp~1022bp。配列番号7）、CD3 細胞内ドメイン鎖をコードする領域（1023bp~1361bp。配列番号8）を含む。

## 【 0 0 6 4 】

遺伝子導入から15日目のT細胞上のCAR発現率を調べた結果、EPHB4-CAR遺伝子を導入したT細胞では34.2%（図2）、CD19-CAR遺伝子を導入したT細胞では55.1%であった。

20

## 【 0 0 6 5 】

共培養実験1の結果を図3及び以下の表に示す。EPHB4-CAR-T細胞は、EPHB4を高発現する腫瘍（Rh30）特異的に高い増殖抑制効果を発揮した。

## 【表1】

	Rh30（横紋筋肉腫細胞）		Raji（B細胞性リンパ腫細胞）	
	0日目	3日目	0日目	3日目
EPHB4-CAR-T細胞	15622±1745	77±14	4440±259	46064±5862
CD19-CAR-T細胞	14796±2576	78571±6279	2633±224	41±9

30

## 【 0 0 6 6 】

共培養実験2の結果を図4に示す。共培養実験1の結果に対応するように、共培養3日目においてEPHB4-CAR-T細胞は活性化し、IFN を高産生していた。

## 【 0 0 6 7 】

## 3 . 考察

EPHB4-CAR-T細胞は、EPHB4を高発現する横紋筋肉腫細胞に対して選択的かつ強力に細胞死を誘導した。即ち、今回開発したEPHB4-CAR-T細胞によれば、EPHB4を高発現する腫瘍を特異的に殺傷できることが証明された。従って、EPHB4-CAR-T細胞を用いた治療（CAR-T療法）は横紋筋肉腫に対する新規治療法として有望である。また、EPHB4-CAR-T細胞には、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫及び頭頸部がん等、EPHB4を高発現する各種腫瘍/がんの治療への適用も多いに期待される。

40

## 【 0 0 6 8 】

## &lt; 動物実験 &gt;

EPHB4-CAR-T細胞の殺細胞効果をマウスモデルで検証した。ホタルルシフェラーゼ（Firefly luciferase）で標識した横紋筋肉腫細胞株Rh30  $2 \times 10^6$ 個を免疫不全マウス（SCID B eigeマウス）の皮下に接種し、担癌マウスを作成した。

## 【 0 0 6 9 】

50

接種1週間後に、CAR-T細胞（CD19-CAR-T細胞又はEPHB4-CAR-T細胞） $10 \times 10^6$ 個を尾静脈より静脈内注射した。その後、IVIS live imaging system（住商ファーマインターナショナル株式会社）を用いて、腫瘍サイズを7日毎に評価した。

【0070】

図5に示すように、CD19-CAR-T細胞投与群では腫瘍の著しい増大が認められたが、EPHB4-CAR-T投与群では、腫瘍増大の抑制効果が示された。

【産業上の利用可能性】

【0071】

キメラ抗原受容体（CAR）遺伝子あるいはT細胞受容体（TCR）遺伝子を導入した遺伝子改変リンパ球（T細胞、NK細胞など）を用いる細胞療法（CAR療法）が、難治性がんに対する効果的な治療法として期待されている。本発明が提供するCAR遺伝子導入リンパ球はEPHB4受容体高発現細胞に特異的であり、例えば横紋筋肉腫に対する有望な治療薬（細胞製剤）となる。即ち、本発明のCAR遺伝子導入リンパ球によれば、EPHB4を高発現する横紋筋肉腫細胞に対して選択的かつ強力に細胞死を誘導することを期待できる。横紋筋肉腫は代表的な難治性小児がんであり、進行した横紋筋肉腫の予後は極めて悪く、新規治療の開発が切望されている。本発明はこのような要望に応えるものであり、その意義は極めて大きい。

10

【0072】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

20

【配列表フリーテキスト】

【0073】

配列番号3：人工配列の説明：EFNB2-CAR遺伝子

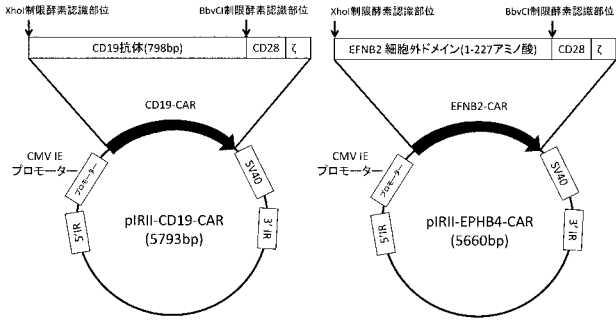
配列番号4：人工配列の説明：pIR11-EFNB2-CARベクター

配列番号6：人工配列の説明：リンカー

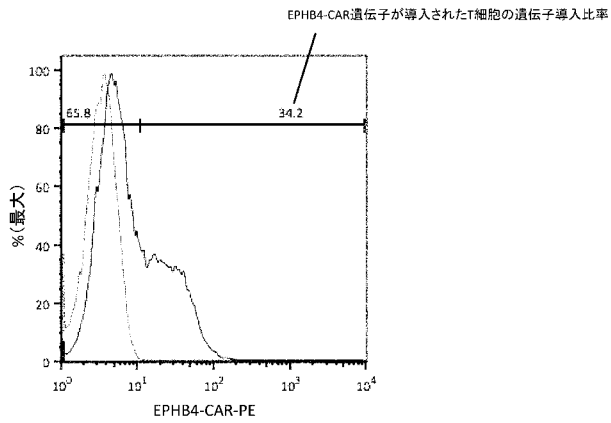
配列番号9：人工配列の説明：XhoI-EFNB2 forwardプライマー

配列番号10：人工配列の説明：EFNB2 ECD-BbvCI reverseプライマー

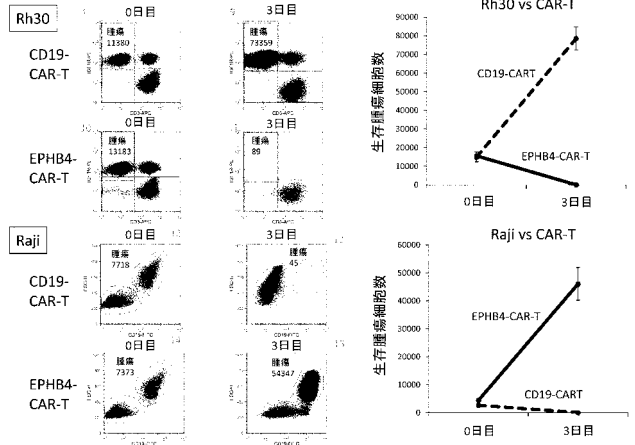
【 図 1 】



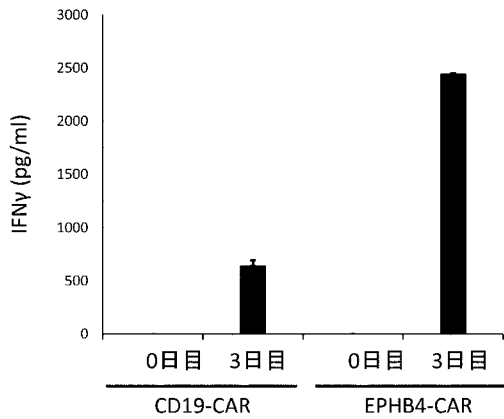
【 図 2 】



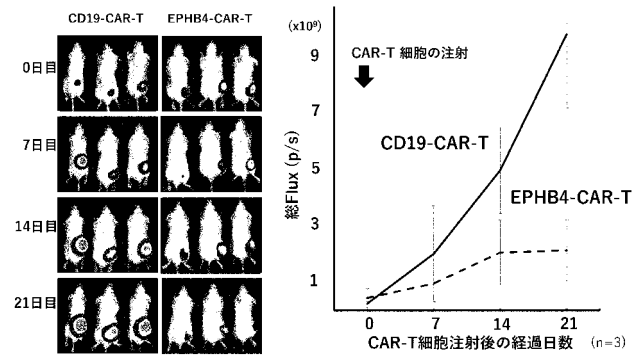
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## 【配列表】

2018110374000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成30年8月31日(2018.8.31)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

E p h r i n B 2細胞外ドメインを含む細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、免疫細胞のエフェクター機能のための細胞内シグナルドメインを含む、E P H B 4受容体特異的キメラ抗原受容体。

【請求項2】

E p h r i n B 2細胞外ドメインが配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のE P H B 4受容体特異的キメラ抗原受容体。

【請求項3】

前記細胞内シグナルドメインが共刺激分子の細胞内ドメインとC D 3 とを含む、請求項1又は2に記載のE P H B 4受容体特異的キメラ抗原受容体。

【請求項4】

前記共刺激分子がC D 2 8である、請求項3に記載のE P H B 4受容体特異的キメラ抗原受容体。

【請求項5】

前記細胞外ドメインと前記膜貫通ドメインの間にスペーサドメインを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のE P H B 4受容体特異的キメラ抗原受容体。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか一項に記載のE P H B 4受容体特異的キメラ抗原受容体をコードする遺伝子。

【請求項7】

請求項6に記載の遺伝子を標的細胞に導入するステップ、を含む、キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変リンパ球の調製方法。

【請求項8】

前記遺伝子の導入が、トランスポゾン法によって行われる、請求項7に記載の調製方法。

【請求項9】

トランスポゾン法がp i g g y B a cトランスポゾン法である、請求項8に記載の調製方法。

【請求項10】

標的細胞がT細胞である、請求項7～9のいずれか一項に記載の調製方法。

【請求項11】

請求項1～5のいずれか一項に記載のE P H B 4受容体特異的キメラ抗原受容体を発現した遺伝子改変リンパ球。

【請求項12】

リンパ球がT細胞である、請求項11に記載の遺伝子改変リンパ球。

【請求項13】

請求項11又は12に記載の遺伝子改変リンパ球を治療上有効量含む、細胞製剤。

【請求項14】

横紋筋肉腫、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫及び頭頸部がんからなる群より選択される腫瘍ないしがんの治療用である、請求項13

に記載の細胞製剤。

【請求項 15】

横紋筋肉腫、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、食道がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫及び頭頸部がんからなる群より選択される腫瘍ないしがんの患者に対して、請求項 11 又は 12 に記載の遺伝子改変リンパ球を治療上有効量、投与するステップを含む、治療法。

【請求項 16】

プロモーターと、該プロモーターの制御下にある、請求項 6 に記載の遺伝子と、を含む発現カセット。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の発現カセットを保持するベクター。

【請求項 18】

前記発現カセットが一对のトランスポゾン逆向き反復配列に挟まれた構造を備える、請求項 17 に記載のベクター。

【請求項 19】

請求項 18 に記載のベクターと、トランスポザーゼ発現ベクターを含む、E P H B 4 受容体特異的キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変リンパ球の調製キット。

【請求項 20】

トランスポザーゼが p i g g y B a c トランスポザーゼである、請求項 19 に記載の調製キット。

【請求項 21】

E p h r i n B 2 - E P H B 4 結合による細胞死誘導効果と、キメラ抗原受容体を介した殺細胞効果によって治療効果を発揮する、請求項 13 又は 14 に記載の細胞製剤。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/043729
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/0783(2010.01)i, C12N5/10(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) Int.Cl. C12N15/09, A61K35/17, A61P35/00, C07K14/705, C07K19/00, C12N5/0783, C12N5/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN), UniProt/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	中川岳志, 外 2 名, キメラ抗原受容体 (CAR) 発現細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を用いた次世代養子免疫療法の開発, Drug Deli very System (2013) vol. 28-1, pp. 35-44, ISSN: 0913-5006, page 38, right column, lines 3-7, page 39, table 1, page 40, fig. 3, page 41, fig. 4, page 42, left column, paragraph [0002] to right column, paragraph [0002], (NAKAGAWA, Takeshi et al., "Development of next-generation adoptive immunotherapy using cytotoxic T-lymphocyte (CTL) expressing chimeric antigen-receptor (CAR) ")	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 February 2018 (13.02.2018)		Date of mailing of the international search report 20 February 2018 (20.02.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/043729

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-536806 A (ASCEPION PHARMACEUTICALS, INC.) 26 September 2013, paragraph [0006] & US 2013/0165475 A1, paragraph [0006] & EP 2611806 A1 & WO 2012/028106 A1	1-20
Y	JP 2011-256179 A (VASGENE THERAPEUTICS, INC.) 22 December 2011, claims, paragraph [0005] & US 2005/0084873 A1, claims, paragraph [0005] & EP 1605961 A1 & WO 2004/080418 A2	1-20
Y	中沢洋三, キメラ抗原受容体(CAR)を用いた遺伝子改変T細胞療法, 信州医誌(2013) vol. 61, no. 4, pp. 197-203 ISSN: 0037-3826, page 199, fig. 2, page 201, left column, paragraph [0003] to right column, paragraph [0002], (NAKAZAWA, Yozo, "Gene-modified T-cell Therapy Using Chimeric Antigen Receptor", The Shinshu medical journal (2013))	1-20
Y	SAITO, S., et al., "Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia", Cytotherapy (2014) vol. 16, pp. 1257-1269, ISSN: 1465-3249, page 1257, abstract, page 1258, left column, paragraph [0003] to page 1259, left column, paragraph [0001]	1-20
Y	JP 2008-545375 A (FUDAN UNIVERSITY) 18 December 2008, paragraphs [0004], [0059]-[0063], [0083], fig. 1 & US 2010/0154070 A1, paragraphs [0004], [0074]-[0079], [0102], fig. 1 & EP 1896578 A1 & WO 2006/122442 A1	1-20
Y	JP 2013-189443 A (NOVARTIS AG.) 26 September 2013, paragraph [0002] & US 2010/0022569 A1, paragraph [0002] & WO 2007/137981 A1	1-20
Y	LV, J., et al., "EphB4 promotes the proliferation, invasion, and angiogenesis of human colorectal cancer", Experimental and Molecular Pathology (2016) vol. 100, pp. 402-408, ISSN: 0014-4800, page 402, abstract	1-20
Y	NOREN, N. K., et al., "The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway", Nature Cell Biology (2006) vol. 8, no. 8, pp. 815-825, ISSN: 1465-7392, page 815, right column, paragraph [0001]	1-20



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 4 3 7 2 9	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/0783(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K35/17, A61P35/00, C07K14/705, C07K19/00, C12N5/0783, C12N5/10			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN), UniProt/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	中川岳志, 外2名, キメラ抗原受容体 (CAR) 発現細胞傷害性T細胞 (CTL) を用いた次世代養子免疫療法の開発, Drug Delivery System (2013) Vol.28-1, pp.35-44, ISSN:0913-5006, 第38頁右欄第3行-第7行, 第39頁表1, 第40頁図3, 第41頁図4, 第42頁左欄第2段落-右欄第2段落	1-20	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 13.02.2018		国際調査報告の発送日 20.02.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 藤澤 雅樹	4B 5802
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 4 3 7 2 9
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2013-536806 A (アスセピオン ファーマスーティカル、インコーポレイテッド) 2013.09.26, 【0006】 & US 2013/0165475 A1, [0006] & EP 2611806 A1 & WO 2012/028106 A1	1-20
Y	JP 2011-256179 A (バスジーン セラピューティクス、インコーポレイテッド) 2011.12.22, 特許請求の範囲, 【0005】 & US 2005/0084873 A1, 特許請求の範囲, [0005] & EP 1605961 A1 & WO 2004/080418 A2	1-20
Y	中沢洋三, キメラ抗原受容体 (CAR) を用いた遺伝子改変 T 細胞療法, 信州医誌 (2013) Vol. 61, No. 4, pp. 197-203 ISSN:0037-3826, 第 199 頁図 2, 第 201 頁左欄第 3 段落-右欄第 2 段落	1-20
Y	SAITO S., et al., Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, Cytotherapy (2014) Vol.16, pp.1257-1269, ISSN:1465-3249, 第 1257 頁要約, 第 1258 頁左欄第 3 段落-第 1259 頁左欄第 1 段落	1-20
Y	JP 2008-545375 A (フダン ユニバーシテイ) 2008.12.18, 【0004】, 【0059】-【0063】, 【0083】, 図 1 & US 2010/0154070 A1, [0004], [0074]-[0079], [102], 図 1 & EP 1896578 A1 & WO 2006/122442 A1	1-20
Y	JP 2013-189443 A (ノバルティス アーゲー) 2013.09.26, 【0002】 & US 2010/0022569 A1, [0002] & WO 2007/137981 A1	1-20

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2017/043729
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	LV J., et al., EphB4 promotes the proliferation, invasion, and angiogenesis of human colorectal cancer, Experimental and Molecular Pathology (2016) Vol.100, pp. 402-408, ISSN:0014-4800, 第 402 頁要約	1-20
Y	NOREN N.K., et al., The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway, Nature Cell Biology (2006) Vol.8, No.8, pp.815-825, ISSN:1465-7392, 第 815 頁右欄第 1 段落	1-20

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

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

(72) 発明者 家原 知子

京都府京都市上京区河原町通広小路 4 6 5 京都府公立大学法人 京都府立医科大学内

(72) 発明者 柳生 茂希

京都府京都市上京区河原町通広小路 4 6 5 京都府公立大学法人 京都府立医科大学内

(72) 発明者 中沢 洋三

長野県松本市旭三丁目 1 番 1 号 国立大学法人信州大学医学部内

F ターム (参考) 4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA41 DA76 EA28 FA74

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。