

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-513458

(P2016-513458A)

(43) 公表日 平成28年5月16日 (2016.5.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/117 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 J	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 5/078 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/078	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 N 5/0783 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0783	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 35/12 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/12	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-501065 (P2016-501065)	(71) 出願人	391058060
(86) (22) 出願日	平成26年3月10日 (2014.3.10)		ベイラー カレッジ オブ メディシン
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月6日 (2015.11.6)		BAYLOR COLLEGE OF M
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/022786		E D I C I N E
(87) 国際公開番号	W02014/164554		アメリカ合衆国, テキサス 77030,
(87) 国際公開日	平成26年10月9日 (2014.10.9)		ヒューストン, ワン ベイラー プラザ
(31) 優先権主張番号	61/775,668		(番地なし)
(32) 優先日	平成25年3月10日 (2013.3.10)	(74) 代理人	110000729
(33) 優先権主張国	米国 (US)		特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
		(72) 発明者	チョウ、ケヴィン、クォン-ホン
			アメリカ合衆国 テキサス州 77030
			、ヒューストン、ビーシーエム210-6
			00ディー、ワン ベイラー プラザ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学療法耐性免疫細胞

## (57) 【要約】

【課題】 化学療法耐性免疫細胞を提供する。

【課題解決手段】 開示されている態様は、テモゾロミドのような化学療法に感受性のガンを治療するのに有用な組成物と方法とを含む。この方法は、免疫細胞療法が、化学療法によって効果を奏さなくなるような場合に、効果的な細胞免疫療法を化学療法と共に使用することを可能にする。特定の態様では、ガンは、T M Z で処置され、腫瘍抗原特異的 T 細胞は T M Z に耐性である。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)をコードする配列と、キメラな抗原受容体(CAR)をコードする配列とを含むポリヌクレオチド。

## 【請求項 2】

前記MGMTおよび前記CARが、別個のポリペプチドである遺伝子産物として発現される、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

前記CARが腫瘍抗原に対して特異的である、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド。

10

## 【請求項 4】

前記CARが、ガン細胞上に存在する腫瘍抗原に対して特異的であり、ここで、前記ガンがテモゾロミド(TMZ)によって処置可能である、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

前記腫瘍抗原が、多形性神経膠芽細胞腫(GBM)細胞、メラノーマ細胞、リンパ腫細胞、乳ガン細胞、前立腺ガン細胞、神経芽細胞腫細胞、または、TMZ含有療法により処置可能であるあらゆる他のガン細胞において発現される、請求項3に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

前記腫瘍抗原が、HER2、CD19、CD20、CD22、カッパ鎖または軽鎖、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB3/4、EGFR、EGFRvIII、EphA2、FAP、ガン胎児性抗原、EGP2、EGP40、メソテリン、TAG72、PSMA、NKG2Dリガンド、B7-H6、IL-13受容体2、IL-11受容体、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、ルイスY、G250/CAIX、HLA-AIIMAGEA1、HLA-A2、NY-ESO-1、PSC1、葉酸受容体、CD44v7/8、8H9、NCAM、VEGF受容体、5T4、胎児性AchR、NKG2Dリガンド、CD44v6、TEM1、TEM8、前記腫瘍によって発現されるウイルス関連抗原、あるいは、腫瘍のゲノム分析および/または示差的発現研究を介して特定される他の腫瘍関連抗原を含めて、前記腫瘍および/または関連腫瘍間質において発現されるいずれかの抗原である、請求項3に記載のポリヌクレオチド。

20

30

## 【請求項 7】

請求項1～6のいずれか一項に記載されるポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

## 【請求項 8】

ウイルスベクターである、請求項7に記載のベクター。

## 【請求項 9】

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またはアデノ関連ウイルスベクターである、請求項8に記載のベクター。

## 【請求項 10】

請求項7～9のいずれか一項に記載される発現ベクターを含む細胞。

40

## 【請求項 11】

免疫系細胞としてさらに定義される、請求項10に記載の細胞。

## 【請求項 12】

T細胞、NK細胞またはNKT細胞、あるいは、エフェクター機能を有するあらゆる他の免疫細胞としてさらに定義される、請求項10に記載の細胞。

## 【請求項 13】

T細胞としてさらに定義される、請求項10に記載の細胞。

## 【請求項 14】

TMZにより処置可能であるガンを処置する方法であって、請求項10～13のいずれ

50

か一項に記載される細胞の治療効果的な量を、T M Zを受けている個体、T M Zを受けたことがある個体、または、T M Zを受けるであろう個体に送達する工程を含む方法。

【請求項 1 5】

治療効果的な量の T M Z を前記個体に送達するとしてさらに規定される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記細胞および前記 T M Z が同時に送達される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記細胞および前記 T M Z が別個の時間で送達される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記細胞および前記 T M Z が同じ送達経路によって送達される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記細胞および前記 T M Z が異なる送達経路によって送達される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ガンが、多形性神経膠芽細胞腫、メラノーマ、リンパ腫、乳ガン、前立腺ガン、神経芽細胞腫、または、T M Z 含有療法により処置可能であるあらゆる他のガンである、請求項 1 4 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記ガンが転移性ガンである、請求項 1 4 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 C A R が、H E R 2、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、カップパ鎖または軽鎖、C D 3 0、C D 3 3、C D 1 2 3、C D 3 8、R O R 1、E r b B 3 / 4、E G F R、E G F R v I I I、E p h A 2、F A P、ガン胎児性抗原、E G P 2、E G P 4 0、メソテリン、T A G 7 2、P S M A、N K G 2 D リガンド、B 7 - H 6、I L - 1 3 受容体 2、I L - 1 1 受容体 R、M U C 1、M U C 1 6、C A 9、G D 2、G D 3、H M W - M A A、C D 1 7 1、ルイス Y、G 2 5 0 / C A I X、H L A - A I M A G E A 1、H L A - A 2 N Y - E S O - 1、P S C 1、葉酸受容体、C D 4 4 v 7 / 8、8 H 9、N C A M、V E G F 受容体、5 T 4、胎児性 A c h R、N K G 2 D リガンド、C D 4 4 v 6、T E M 1、T E M 8、前記腫瘍によって発現されるウイルス関連抗原、あるいは、腫瘍のゲノム分析および / または示差的発現研究を介して特定される他の腫瘍関連抗原を含めて、前記腫瘍および / または関連腫瘍間質において発現されるいずれかの抗原に対して特異的である、請求項 1 4 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

さらなるガン処置を前記個体に送達する工程をさらに含む、請求項 1 4 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記さらなるガン処置が、手術、化学療法、免疫療法、放射線、ホルモン療法またはそれらの組合せを含む、請求項 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記個体が、メチル化されていない M G M T プロモーターを有するとき、前記個体には、効果的な量の O<sup>6</sup> - ベンジルグアニン (O<sup>6</sup> - B G) が与えられる、請求項 1 4 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記個体の前記ガンを診断する工程をさらに含む、請求項 1 4 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載されるポリヌクレオチド、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載される発現ベクター、および / または、請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか一項に記

10

20

30

40

50

載される細胞を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は米国仮特許出願第61/775,668号(2013年3月10日出願;これはその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる)の優先権を主張する。

【0002】

本開示の実施形態は少なくとも、細胞生物学、免疫学、分子生物学および医療(ガン医療を含む)の分野に関連する。

【背景技術】

【0003】

テモゾロミド(TMZ)が未分化星状細胞腫および多形性神経膠芽細胞腫(GBM)のためにFDA承認されているが、TMZは現在、小児ガン(例えば、神経芽細胞腫など)および一般的な成人ガン(例えば、前立腺ガンおよびメラノーマ)を含めて広範囲の悪性腫瘍について評価中である。本開示は、TMZに対して耐性であり、その結果、TMZを受ける患者に与えることができる免疫細胞を作製することに集中する。本開示の様々な実施形態がGBMに関するものであるが、本開示は、TMZにより処置されるどのようなガンに対してでも適用することができる。TMZは、多形性神経膠芽細胞腫(GBM)患者の全生存を、放射線療法の単独と比較した場合、放射線治療との組合せで与えられたときには有意に改善することが大規模な多施設第III相試験において示された。そのようなものとして、TMZは今や、GBMと新たに診断される患者のための好ましい化学療法剤である。TMZの投与が腫瘍の外科的切除の後に続く。具体的には、推奨されるスケジュールが、浸潤野放射線療法(毎日30分割での60Gy)と併用でのTMZ(75mg/m<sup>2</sup>、49日までの毎日)を与え、その後は単独でのTMZ(150mg/m<sup>2</sup>~200mg/m<sup>2</sup>、5日間にわたって毎日、28日毎に)を与えることである。最初の研究では、TMZ単独療法が6ヶ月までの期間にわたって与えられたが、ほとんどの患者が現在では、寛解状態にあるか、または進行性疾患を発達させない限り、12ヶ月までとなっている。

【0004】

TMZは、DNA上のグアニン残基のO<sup>6</sup>位をメチル化することによって働く。しかしながら、これらの損傷は直ちに細胞毒性ではなく、O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)と呼ばれるDNA修復タンパク質によって修復される可能性がある。1個のMGMT分子は、MGMTタンパク質におけるシステイン残基への1個のO<sup>6</sup>-メチル基の転移を触媒することができ、これにより、DNA損傷が修復され、MGMTが不活性化される。したがって、多数の損傷を迅速に修復する能力は、細胞によって発現されるMGMTの量に依存する。MGMTは、激減すると、さらなるO<sup>6</sup>-メチルグアニン付加物を除くために新たに合成されなければならない。修復されないままにされるならば、O<sup>6</sup>-メチルグアニンはチミンとの誤った対形成をもたらし、ギャップのあるDNAおよび二重鎖切断をDNA複製期間中に引き起こし、これにより、究極的には細胞死がアポトーシス経路を介して誘発される。

【0005】

実際、高度にメチル化された、したがって、沈黙化されたMGMTプロモーターを有するGBM腫瘍を有した患者は、おそらくは損なわれたDNA修復のためと思われるが、TMZ治療に対するより良好な応答を有した。TMZを受ける患者の中で、MGMTプロモーターがメチル化されていない群はメジアン全生存が12.7ヶ月であり、一方、MGMTプロモーターがメチル化されている群は生存が21.7ヶ月であった。明らかに、これらの結果は、TMZに対する感受性を決定することにおけるMGMTの重要性を示唆しており、TMZ治療に対して応答する可能性が最も高い患者を特定するための潜在的可能性を示している。MGMTプロモーターがメチル化されていない患者については、O<sup>6</sup>-ベンジルグアニン(O<sup>6</sup>-BG)、すなわち、MGMTの阻害剤をアルキル化剤に加えるこ

10

20

30

40

50

とにより、抗腫瘍活性を改善することができる；しかしながら、この戦略には、用量を制限する造血毒性が伴う。

【0006】

結果を改善するために、1つの戦略は、細胞に基づく免疫療法をGBMのための化学療法と組み合わせることであるかもしれない。ほとんどの化学療法剤と同様に、TMZの細胞毒性影響は比較的非特異的であり、それらの最大影響を迅速に分裂する細胞に対して有する。迅速に分裂する細胞に対するこの毒性により、その抗腫瘍活性、同様にまた、脱毛症、消化器不良および骨髄抑制を含むその様々な有害影響が説明される。TMZは一般に、使用された服用スケジュールにおいて十分に許容されるが、深刻なリンパ球減少を含む骨髄抑制がその主要な副作用の1つである。様々な研究により、化学療法をT細胞免疫療法の前にリンパ球激減（lymphodeplete）患者に与えると、抗腫瘍活性が、養子移入された細胞の拡大のためのより良好な環境が提供されることによって改善されたことを示している。化学療法はまた、腫瘍細胞の免疫原性を直接に高め、そして、腫瘍細胞を養子移入されたT細胞によってより殺傷されやすくしているかもしれない。

10

【0007】

これらの研究では、化学療法および免疫療法を施す時期（タイミング）が非常に重要であった。これは、効果的な免疫療法応答を刺激するのが化学療法によるその最初の処置であるからである。しかしながら、新たに診断されたGBMの場合、この場合は、標準治療が、TMZを手術後12ヶ月までにわたって反復して与えることであるので、養子T細胞移入をいつ開始するかを選ぶことが問題となるかもしれない：T細胞を最小残存疾患のときに与えることが理想的であろうと考えられるが、T細胞を、患者がTMZを受けている間に注入することは、養子移入されたT細胞のインビボでのロバストな増殖を妨げるかもしれない、したがって、効果的な免疫療法応答を台無しにするかもしれない。

20

【0008】

したがって、TMZに関連する治療法を、GBMを有する患者において改善することが当技術分野では求められており、本開示はそのような要求に応えている。本開示の実施形態はまた、他のガンのために、TMZにより処置されている人々に対して、または、TMZ以外の化学療法のために、適用可能である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0009】

本開示の実施形態は、ガンの処置を必要としている個体のための併用治療に関する。特定の実施形態において、前記併用治療は、併用治療における一方の治療によって無効にされやすい（または活性が低下しやすい）併用治療におけるもう一方の治療を含む。具体的な実施形態において、前記併用療法は免疫療法と化学療法とを含み、ただし、この場合、化学療法は、個体におけるその標的ガン細胞だけでなく、個体のための併用治療法として用いられている免疫細胞もまた阻害することができる。

【0010】

本開示の実施形態は、免疫細胞（例えば、T細胞、NK細胞またはNKT細胞）を、患者が化学療法を受けている間に、効果的な免疫療法応答を弱めるであろうインビボでの養子移入された免疫細胞のロバストな増殖を妨げることなく提供する必要があるというジレンマに対処する。免疫細胞は非特異的であることが可能であり、あるいは、例えば、腫瘍または支持する腫瘍間質において発現される抗原を認識することができる。本開示の実施形態は、化学療法の毒性影響に対して抵抗性である免疫細胞を提供し、その結果、該免疫細胞が化学療法薬物と同時に投与され得るようにすることによってこの制限を克服する。

40

【0011】

特定の実施形態において、化学療法耐性成分、例えば、TMZ耐性成分を含み、かつ、抗原認識成分を含む細胞が存在する。前記細胞は化学療法耐性成分および抗原認識成分を別個のポリペプチドとして含んでいる場合がある。前記細胞は、化学療法耐性成分および抗原認識成分をコードするポリヌクレオチドを含んでいる場合があり、この場合、そのよ

50

うなポリヌクレオチドには、両方の成分をコードする1つのポリヌクレオチド、または、それぞれの成分についての別個のポリヌクレオチドが含まれる。化学療法耐性成分は、1つまたは複数の化学療法に対して特異的である場合がある。場合により、化学療法耐性成分は、O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)、多剤耐性遺伝子(MDR)または5'-ヌクレオチダーゼII(NT5C2)である。化学療法は、ヌクレオシドアナログ化学療法薬物、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物剤(アントラサイクリン系薬剤を含む)、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤、分化剤およびホルモン療法剤などを含めて、どのようなタイプの化学療法であってもよい。

#### 【0012】

抗原認識成分は、腫瘍抗原を含めて、抗原を免疫学的に認識することができる限り、どのような種類のものであってもよい。抗原は腫瘍細胞表面に存在していてもよく、腫瘍細胞から分泌されてもよく、腫瘍間質において細胞表面に存在していてもよく、または、腫瘍間質に存在していてもよい。抗原認識成分は具体的な実施形態において、キメラな抗原受容体(CAR)、TCRまたはエンゲージャー(engager)分子である。

#### 【0013】

したがって、特定の実施形態において、本開示は、化学療法に加えて細胞療法を含む免疫療法に関連づけられる方法および組成物に関する。特定の実施形態において、細胞療法は、細胞療法を必要としている個体(例えば、ヒトを含めて、哺乳動物など)のためのものである。細胞療法はどのような医学的状态に対してでも好適である場合があるが、具体的な実施形態において、細胞療法は、例えば、TMZによって処置可能であるガンを含めて、ガンのためのものである。TMZによって処置可能であるガンはどのような種類であってもよいが、具体的な実施形態において、ガンは、例えば、GBM、他の脳腫瘍(未分化星状細胞腫を含む)、神経芽細胞腫、前立腺ガンまたはメラノーマである。加えて、TMZは、腫瘍がTMZに対して感受性でないときでさえ、TMZ耐性の腫瘍特異的T細胞をガン患者において選択的に拡大するために使用することができる。したがって、この取り組みは、乳房、前立腺、肺および結腸のガンまたは上皮ガン/ガン腫、例えば、乳ガン、結腸ガン、前立腺ガン、頭頸部ガン、皮膚ガン、尿生殖路のガン(例えば、卵巣ガン、子宮内膜ガン、子宮頸ガンおよび腎臓ガン)、肺ガン、胃ガン、小腸のガン、肝臓ガン、脾臓ガン、胆嚢ガン、胆管のガン、食道ガン、唾液腺のガンおよび甲状腺のガンなどを含む広範囲の悪性腫瘍、ならびに、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫および骨髄異形成症候群(これらに限定されない)を含む血液学的悪性腫瘍に対して適用することができると思われる。

#### 【0014】

本開示の具体的な実施形態は、TMZ耐性免疫細胞(例えば、キメラな抗原受容体(CAR)を発現させるために遺伝子改変されるT細胞)を利用するGBMのための化学療法との免疫療法の組合せに関する。MGMTを、造血始原体をTMZ耐性にするために造血始原体において発現させ、これにより、造血始原体が造血幹細胞移植後のTMZ処置によってインビボ選択のために使用されることが可能になっているにもかかわらず、本開示ではむしろ、MGMTを過剰発現させるための遺伝子改変された免疫細胞が、それらの免疫細胞をGBMのための標準的な化学療法と組み合わせることを容易にするために用いられる。

#### 【0015】

本開示の実施形態において、O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)をコードする配列を含むポリヌクレオチドが存在する。本開示の実施形態において、MGMTをコードする配列と、キメラな抗原受容体(CAR)をコードする配列とを含むポリヌクレオチドが存在する;この場合、それぞれの配列が、同じポリヌクレオチド分子に存在していてもよく、または存在していなくてもよい。具体的な実施形態において、MGMTおよびCARが、別個のポリペプチドである遺伝子産物として発現される。ある特定の場合において、CARが、腫瘍抗原に対して、例えば、ガン細胞表面に存在する腫瘍抗原に対して特異的であり、ただし、この場合、ガンはテモゾロミド(TMZ)

10

20

30

40

50

によって処置可能である。ある特定の場合において、腫瘍抗原が、多形性神経膠芽細胞腫（GBM）細胞、メラノーマ細胞、リンパ腫細胞、乳ガン細胞、前立腺ガン細胞、神経芽細胞腫細胞、または、T M Z 含有療法により処置されているあらゆる他のガンの細胞において発現される。特定の実施形態において、腫瘍抗原は、E p h A 2、H E R 2、G D 2、グリピカン - 3、5 T 4、8 H 9、<sub>6</sub> インテグリン、B 細胞成熟抗原（B C M A）B 7 - H 3、B 7 - H 6、C A I X、C A 9、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、カップ軽鎖、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、C D 4 4、C D 4 4 v 6、C D 4 4 v 7 / 8、C D 7 0、C D 1 2 3、C D 1 3 8、C D 1 7 1、C E A、C S P G 4、E G F R、E G F R v I I I、E G P 2、E G P 4 0、E P C A M、E R B B 3、E R B B 4、E r b b B 3 / 4、F A P、F A R、F B P、胎児性 A c h R、葉酸受容体、G D 2、G D 3、H L A - A I M A G E A 1、H L A - A 2、I L 1 1 R a、I L 1 3 R a 2、K D R、ラムダ、ルイス - Y、M C S P、メソテリン、M u c 1、M u c 1 6、N C A M、N K G 2 D リガンド、N Y - E S O - 1、P R A M E、P S C A、P S C 1、P S M A、R O R 1、S p 1 7、サバイピン、T A G 7 2、T E M 1、T E M 8、V E G R R 2、ガン胎児性抗原、H M W - M A A、V E G F 受容体、および / または、腫瘍の細胞外マトリックスの内部に存在する他の例示的な抗原（例えば、フィブロネクチンのガン胎児性変化体、テネイシン、または、腫瘍の壊死性領域）、腫瘍によって発現されるウイルス関連抗原、あるいは、腫瘍のゲノム分析および / または示差的発現研究を介して特定される他の腫瘍関連抗原を含めて、腫瘍および / または関連腫瘍間質において発現されるあらゆる抗原である。

10

20

#### 【0016】

本開示の実施形態において、本開示のあらゆるポリヌクレオチドの少なくとも1つを含む発現ベクターが存在する。具体的な実施形態において、ベクターはウイルスベクターであり、例えば、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またはアデノ関連ウイルスベクターである。

#### 【0017】

本開示の実施形態において、本開示の少なくとも1つの発現ベクターを含む細胞が存在する。前記細胞はさらに、免疫系細胞として定義される場合がある。前記細胞はさらに、T 細胞、NK 細胞またはNK T 細胞、あるいは、エフェクター機能を有するあらゆる他の免疫細胞として定義される場合がある。前記細胞はさらに、T 細胞として定義される場合がある。

30

#### 【0018】

本開示の特定の実施形態において、ガンと診断されている個体のための併用療法であって、2つ、3つまたはそれ以上のガン治療法を含む場合がある併用療法が存在する。併用療法における治療法は、個体に対して同時に、または異なるときに施される場合がある。個体のガンは、1つ、2つまたはそれ以上の特異的な腫瘍抗原を、当該個体のための免疫療法が標的とするガン細胞の表面に有する場合がある。特定の局面において、腫瘍抗原はH E R 2であるが、場合によっては、腫瘍抗原は、ガン細胞またはその支持する間質によって発現される別の抗原である。具体的な局面において、腫瘍抗原H E R 2は、例えば、G B M 細胞、他の脳腫瘍、乳ガン、肺ガン、肉腫、卵巣において存在する。したがって、特定の細胞が、2つ以上の抗原認識成分（ただし、それぞれが、異なる抗原に対して特異的である）を有する場合がある。

40

#### 【0019】

本開示の実施形態において、化学療法により処置可能であるガンを処置する方法であって、本開示の細胞のいずれかの治療効果的な量を、当該化学療法を受けている個体、当該化学療法を受けたことがある個体、または、当該化学療法を受けるであろう個体に送達する工程を含む方法が存在する。本開示の実施形態において、特定の化学療法（例えば、T M Z）により処置可能であるガンを処置する方法であって、本開示の細胞のいずれかの治療効果的な量を、当該化学療法を受けている個体、当該化学療法を受けたことがある個体、または、当該化学療法を受けるであろう個体に送達する工程を含む方法が存在する。具

50

体的な実施形態において、本開示の方法はどれもさらに、治療効果的な量の化学療法を個体に送達することを含むとして規定される場合がある。具体的な場合において、細胞および化学療法が同時に送達され、または異なるときに送達され、または同じ送達経路によって送達され、または異なる送達経路によって送達される。TMZにより処置されている個体のための本開示の特定の局面において、個体が、メチル化されていないMGMTプロモーターを有するとき、個体には、効果的な量のO<sup>6</sup>-ベンジルグアニン(O<sup>6</sup>-BG)が本開示の他の方法工程に加えて与えられる場合がある。場合によっては、本開示の方法はどれもさらに、例えば、化学療法(例えば、TMZ)により処置可能であるガンを有することが疑われる個体において個体のガンを診断する工程を含む。

#### 【0020】

本開示のいずれかの方法の特定の局面において、ガンは、多形性神経膠芽細胞腫、メラノーマ、リンパ腫、乳ガン、前立腺ガン、神経芽細胞腫、または、TMZに基づく療法により処置されているあらゆる他のガンである。ガンは転移性ガンである場合がある。具体的な実施形態において、CARは、腫瘍および/または関連腫瘍間質において発現されるどのような抗原に対してでも特異的である。本開示の方法はどれもさらに、さらなるガン処置、例えば、手術、化学療法、免疫療法、放射線、ホルモン療法またはそれらの組合せを含む処置を個体に送達する工程を含む場合がある。

#### 【0021】

本開示の実施形態において、本開示のいずれかのポリヌクレオチドの1つまたは複数、本開示のいずれかの発現ベクターの1つまたは複数、ならびに/あるいは、本開示のいずれかの細胞の1つまたは複数を、前記ポリヌクレオチド、ベクターおよび/または細胞を作製するために好適な試薬および組成物を同様に含むことに加えて、あるいは、その代替として含むキットが存在する。化学療法が、ある特定の実施形態においてはキットに含まれる場合がある。

#### 【0022】

本開示の方法および組成物によって処置されているガンはどのような種類のものであってもよく、また、どのような段階のものであってもよい。個体はどのような年齢であっててもよく、または、どちらの性別であっててもよい。具体的な実施形態において、個体は、ガンを有することが知られているか、または、ガンを有することについて危険性があるか、または、ガンを有することが疑われる。ガンは原発性ガンまたは転移性ガンである場合があり、また、ガンは処置に対して不応性である場合がある。

#### 【0023】

1つの実施形態において、化学療法耐性遺伝子産物をコードする配列を含み、かつ、抗原認識成分をコードする配列を含む1つまたは複数のポリヌクレオチドが存在する。1つの具体的な実施形態において、化学療法耐性遺伝子産物は、ヌクレオシドアナログ化学療法薬物、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤、分化剤またはホルモン療法剤に対して抵抗性である。具体的な実施形態において、化学療法耐性遺伝子産物は、O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)、多剤耐性遺伝子(MDR)または5'-ヌクレオチダーゼII(NT5C2)である。特定の実施形態において、抗原認識成分は腫瘍抗原認識成分であり、例えば、キメラな抗原受容体(CAR)、操作されたTCR、または、エンゲージャー分子である。1つのある特定の実施形態において、腫瘍抗原は、腫瘍の細胞において発現される抗原または腫瘍の細胞から発現される抗原、ならびに/あるいは、関連腫瘍間質において発現される抗原である。場合により、CARが、ガン細胞表面に存在する腫瘍抗原に対して特異的であり、ただし、この場合、ガンはテモゾロミド(TMZ)によって処置可能である。特定の実施形態において、ガン細胞は、多形性神経膠芽細胞腫(GBM)細胞、未分化星状細胞腫、メラノーマ細胞、リンパ腫細胞、乳ガン細胞、前立腺ガン細胞または神経芽細胞腫細胞である。具体的な実施形態において、腫瘍抗原は、EphA2、HER2、GD2、グリピカン-3、5T4、8H9、<sub>6</sub>インテグリン、B細胞成熟抗原(BCMA)B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD19、CD20、CD22、

10

20

30

40

50



カップパ軽鎖、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、ERBB3、ERBB4、Erbb3/4、FAP、FAR、FBP、胎児性Achr、葉酸受容体、GD2、GD3、HLA-AIIMAGEA1、HLA-A2、IL11Ra、IL13Ra2、KDR、ラムダ、ルイス-Y、MCSP、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSC1、PSMA、ROR1、Sp17、サバイピン、TAG72、TEM1、TEM8、VEGFR2、ガン胎児性抗原、HMW-MAAおよびVEGF受容体からなる群から選択される。特定の実施形態において、化学療法耐性遺伝子産物および抗原認識成分が、別個のポリペプチドである遺伝子産物として発現される。ある特定の実施形態において、化学療法耐性遺伝子産物をコードする配列を含むポリヌクレオチドと、抗原認識成分をコードする配列を含むポリヌクレオチドとが、別個のポリヌクレオチドである。

10

#### 【0024】

1つの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドを含む発現ベクターが存在する。具体的な実施形態において、ベクターはウイルスベクターであり、例えば、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またはアデノ関連ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、本開示の発現ベクターを含む細胞が存在する。具体的な実施形態において、細胞は免疫系細胞であり、例えば、T細胞、NK細胞またはNK T細胞である。

20

#### 【0025】

1つの実施形態において、化学療法により処置可能であるガンを処置する方法であって、本開示の細胞の治療効果的な量を、当該化学療法を受けている個体、当該化学療法を受けたことがある個体、または、当該化学療法を受けるであろう個体に送達する工程を含む方法が存在する。1つの具体的な実施形態において、前記方法はさらに、治療効果的な量の化学療法を個体に送達する工程を含む。具体的な実施形態において、細胞および化学療法が個体に同時に送達される。特定の局面において、細胞および化学療法が個体に別個のときに送達される。特定の実施形態において、細胞が化学療法に先だって送達される。場合により、化学療法が細胞に先だって送達される。具体的な実施形態において、細胞および化学療法は同じ送達経路によって送達されるが、細胞および化学療法は異なる送達経路によって送達される場合がある。具体的な実施形態において、ガンは、多形性神経膠芽細胞腫、メラノーマ、リンパ腫、乳ガン、前立腺ガンまたは神経芽細胞腫である。場合により、ガンは転移性ガンである。化学療法は、少なくともいくつかの場合においてはTMZである場合がある。具体的な実施形態において、抗原認識成分がCARであるとき、CARは、HER2、CD19、CD20、CD22、カップパ鎖または軽鎖、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、Erbb3/4、EGFR、EGFRvIII、EphA2、FAP、ガン胎児性抗原、EGP2、EGP40、メソテリン、TAG72、PSMA、NKG2Dリガンド、B7-H6、IL-13受容体2、IL-11受容体R、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、ルイスY、G250/CAIX、HLA-AIIMAGEA1、HLA-A2NY-ESO-1、PSC1、葉酸受容体、CD44v7/8、B7-H3、NCAM、VEGF受容体、5T4、胎児性Achr、NKG2Dリガンド、グリピカン-3、CD44v6、TEM1またはTEM8に対して特異的である。いくつかの実施形態において、本開示の方法はさらに、さらなるガン処置を個体に送達する工程を含む。いくつかの実施形態において、さらなるガン処置は、手術、化学療法、免疫療法、放射線、ホルモン療法またはそれらの組合せを含む。具体的な実施形態において、個体が、メチル化されていないMGMTプロモーターを有するとき、個体には、効果的な量のO<sup>6</sup>-ベンジルグアニン(O<sup>6</sup>-BG)が与えられる。特定の実施形態において、前記方法はさらに、個体の前記ガンを診断する工程を含む。

30

40

#### 【0026】

50

1つの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド、本開示の発現ベクターおよび／または本開示の細胞を含むキットが存在する。

【0027】

1つの実施形態において、ガンを個体において処置する方法であって、前記個体に治療効果的な量の本開示の細胞を投与する工程を含み、前記ガンが、前記細胞が抵抗性である治療法に対して感受性である方法が存在する。1つの具体的な実施形態において、ガンは、乳房、前立腺、肺および結腸のガンまたは上皮ガン／ガン腫、例えば、乳ガン、結腸ガン、前立腺ガン、頭頸部ガン、皮膚ガン、尿生殖路のガン（例えば、卵巣ガン、子宮内膜ガン、子宮頸ガンおよび腎臓ガン）、肺ガン、胃ガン、小腸のガン、肝臓ガン、脾臓ガン、胆嚢ガン、胆管のガン、食道ガン、唾液腺のガンおよび甲状腺のガン、ならびに、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫および骨髄異形成症候群（これらに限定されない）を含む血液学的悪性腫瘍からなる群から選択される。

10

【0028】

前記は、下記の発明の詳細な説明がよりよく理解され得るために、本発明の特徴および技術的利点をかなり大まかに概説している。本発明の請求項の主題を形成する本発明のさらなる特徴および利点が本明細書中下記において記載されるであろう。開示される概念および具体的な実施形態は、本発明の同じ目的を行うために他の構造を改変するための、または設計するための基礎として容易に利用され得ることが、当業者によって理解されなければならない。そのような同等な組み立ては、添付された請求項において示されるような発明の精神および範囲から逸脱しないこともまた、当業者によって認識されなければならない。さらなる目的および利点と一緒に、本発明に特徴的であると考えられる新規な特徴がその構成および操作方法の両方に関して、添付された図面に関連して考慮されるときには下記の記載からよりよく理解されるであろう。しかしながら、図のそれぞれが、例示および記載の目的のためだけに提供されており、本発明の境界を規定するものとして意図されないことが明確に理解されなければならない。

20

【図面の簡単な説明】

【0029】

本発明のより完全な理解のために、添付された図面と併せて解釈される下記の記載が次に参照される。

【0030】

【図1】TMZをHER2・CAR T細胞と組み合わせることにより、腫瘍殺傷が強化されることを示す。U373・eGFP・FFLuc細胞を、TMZ（62・5 μMおよび125 μM）を伴って、または、TMZを伴うことなく（DMSO）、非形質導入（NT）T細胞またはHER2・CAR T細胞のどちらかと共培養した。腫瘍殺傷を蛍光顕微鏡法によって評価した。TMZおよびHER2・CAR T細胞の両方を受ける群のみが、完全な腫瘍殺傷を示した。

30

【0031】

【図2】TMZがT細胞拡大を阻害することを明らかにする。1 × 10<sup>6</sup>個のHER2・CAR T細胞を100 U/mlのIL-2とともに1日目に播き、100 μMのTMZにより処置した。3日毎に、T細胞を計数し、新鮮なIL-2を与え、TMZにより再び処置した。HER2・CAR T細胞がTMZの非存在下で拡大したが、100 μMのTMZによる処置はインビトロでのT細胞拡大を効果的に妨げた（平均 ± s.d. ; n = 4 ドナー ; \* p < 0.05）。

40

【0032】

【図3A-C】TMZ耐性HER2・CAR T細胞の作製を示す。MGMTを、第二世代のHER2・CAR（3A）を有するSFGLTROウイルスベクターにクローン化した。このHER2・MGMT構築物を使用して、HER2・CARと機能的MGMTタンパク質との両方を発現したT細胞（HER2・MGMT T細胞）を作製した。システイン（C）からアラニン（A）へのアミノ酸置換をMGMT配列に含有する第2の構築物を使用して、HER2・CARと非機能的MGMTタンパク質とを発現するコントロールT細胞

50

胞 (HER2-MGMTCA T細胞) を作製した。HER2-CARの発現を、T細胞をFAB抗体により染色することによって検出し(3B)、MGMTの発現を定量的RT-PCRによって求めた(3C)。HER2-MGMT T細胞およびHER2-MGMTCA T細胞はともに、同程度のレベルのHER2-CAR(データは4つのドナーを表す)およびMGMT mRNA(平均±s.d.; n=4ドナー; データはGAPDHに対して正規化される)を発現する。

#### 【0033】

【図4】活性型MGMTが形質導入されるT細胞はTMZの存在下で拡大することを規定する。1×10<sup>6</sup>個のHER2-MGMT T細胞またはHER2-MGMTCA T細胞を100U/mlのIL-2とともに1日目に播き、100μMのTMZにより処置した。3日毎に、T細胞を計数し、新鮮なIL-2を与え、TMZにより再び処置した。HER2-MGMT T細胞およびHER2-MGMTCA T細胞はともに、TMZの非存在下で拡大することができたが、HER2-MGMT T細胞のみがTMZの存在下で拡大することができた(平均±s.d.; n=4ドナー; \* p<0.05、HER2-MGMT+TMZ対HER2-MGMTCA+TMZ(7日目から22日目まで)について)。

10

#### 【0034】

【図5】HER2-MGMT T細胞がTMZの存在下ではより少ないアポトーシスを受けることを示す。1×10<sup>6</sup>個の非形質導入(NT)T細胞、HER2-MGMTCA T細胞、または、HER2-MGMT T細胞を0日目に100U/mlのIL-2とともに播き、100μMまたは200μMのTMZにより処置した。細胞を3日目にIL-2およびTMZにより再び処置し、7日目にFACSによってアネキシンおよび7-ADDについて分析した。すべての群がTMZの非存在下ではアポトーシスをほとんど示さなかった。HER2-MGMT T細胞が、TMZの存在下では、NT T細胞またはHER2-MGMTCA T細胞よりも少ないアポトーシスを受けた。

20

#### 【0035】

【図6】HER2-MGMT T細胞のTMZによる前処理は腫瘍殺傷を損なわないことを明らかにする。5×10<sup>5</sup>個の非形質導入T細胞、HER2-MGMTCA T細胞、または、HER2-MGMT T細胞を0日目および3日目にIL-2±TMZにより処置した。7日目に、5×10<sup>5</sup>個のU373.eGFP.FFLucをこれらのT細胞に加えた。9日目に、T細胞を除き、腫瘍細胞を蛍光顕微鏡法によって画像化した。HER2-MGMT T細胞は、TMZにより前処理された後でさえ、腫瘍細胞を完全に殺傷することができ、これに対して、HER2-MGMTCA T細胞は腫瘍細胞を殺傷することができなかった。

30

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0036】

長年にわたる特許法慣行と調和することにおいて、「a」および「an」の単語は、請求項を含めて、comprising(含む)の単語と一緒に本明細書において使用されるとき、「one or more」(1つまたは複数)を意味する。本発明のいくつかの実施形態は、本発明の1つまたは複数の要素、方法工程および/または方法からなる場合があり、あるいは、それらから本質的になる場合がある。本明細書中に記載される方法または組成物はどれも、開示され、また、同様な結果または類似した結果を本発明の精神及び範囲から逸脱することなく依然として得る本明細書中に記載された実施形態のどのような他の方法または組成物に関してでも実行され得ることが意図される。

40

#### 【0037】

##### I. 化学療法耐性成分

本開示の実施形態において、免疫療法のための免疫細胞は1つまたは複数の化学療法耐性成分を含む。化学療法耐性成分は具体的な局面においては、化学療法耐性遺伝子によってコードされる遺伝子産物の少なくとも1つを含む。場合により、特定の細胞が2つ以上の化学療法耐性成分を含み、多数の化学療法耐性成分が同じ細胞に存在する場合、これら

50

の化学療法耐性成分は、同じタイプの成分のものである場合があり（例えば、同じタイプの化学療法に対する耐性をもたらし）、または、これらの化学療法耐性成分は異なるタイプの成分である場合がある（例えば、異なるタイプの化学療法に対する耐性をもたらし）。代替の実施形態において、複数の免疫細胞が個体に送達され、ただし、この場合、前記複数においては、第1の化学療法耐性成分と、抗原認識成分とを含む細胞、および、第2の化学療法耐性成分と、抗原認識成分とを含む前記複数における別の細胞を含む細胞の混合物が存在する。

#### 【0038】

具体的な実施形態において、化学療法耐性成分は、O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ（MGMT）、多剤耐性遺伝子（MDR）、5'-ヌクレオチダーゼII（NT5C2）である。当業者は、化学療法耐性成分が、個体に与えられている化学療法に合わせて調節されるであろうことを認識するであろう。例えば、TMZが個体に送達されているか、または送達されることになるとき、免疫細胞は、MGMTを組み込むために改変されるであろう。

10

#### 【0039】

II. 抗原認識成分

本開示の実施形態において、免疫療法のための免疫細胞は1つまたは複数の抗原認識成分を含む。

#### 【0040】

抗原認識成分は具体的な局面においては、CAR、TCRまたはエンゲージャー分子の少なくとも1つを含む。場合により、特定の細胞が2つ以上の抗原認識成分を含み、多数の抗原認識成分が同じ細胞に存在する場合、これらの抗原認識成分は、同じタイプの成分のものである場合があり（例えば、両方がCARであり）、または、これらの抗原認識成分は異なるタイプの成分である場合がある（例えば、一方がCARであり、一方がエンゲージャーである）。

20

#### 【0041】

代替の実施形態において、複数の免疫細胞が個体に送達され、ただし、この場合、前記複数においては、第1の抗原認識成分と、化学療法耐性成分とを含む細胞、および、第2の抗原認識成分と、化学療法耐性成分とを含む前記複数における別の細胞を含む細胞の混合物が存在する。

30

#### 【0042】

A. キメラな抗原受容体（CAR）

場合により、免疫細胞は、CARを発現するように改変される。腫瘍指向のキメラな抗原受容体（CAR）を発現させるためのヒトTリンパ球の遺伝子操作は、タンパク質-抗原プロセッシングおよび提示における異常に起因する腫瘍の免疫回避機構を迂回する抗腫瘍エフェクター細胞をもたらしことができる。そのうえ、これらの遺伝子組換え受容体は、タンパク質由来でない腫瘍関連抗原に向かわせることができる。本開示のある特定の実施形態において、少なくともCARを含むために改変されるCTLが存在する。

#### 【0043】

特定の場合において、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）が、キメラであり、非天然型であり、かつ、少なくとも一部が人の手によって操作される受容体を含む。特定の場合において、操作されたキメラな抗原受容体（CAR）は、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれ以上の成分を有しており、いくつかの実施形態において、そのような1つまたは複数の成分により、腫瘍抗原を含むガン細胞へのTリンパ球の標的化または結合が容易になる。具体的な実施形態において、CARは、腫瘍抗原、細胞質シグナル伝達ドメインの一部またはすべて、ならびに/あるいは、1つまたは複数の共刺激分子の一部またはすべて（例えば、共刺激分子のエンドドメイン）についての抗体を含む。具体的な実施形態において、抗体は単鎖可変フラグメント（scFv）である。ある特定の局面において、抗体は、例えば、TMZによって処置可能であるガン細胞の細胞表面における標的抗原に向けられる。ある特定の実施形態において、細胞質シグナル伝達ドメイン、例えば、T細胞受容体

40

50

鎖に由来する細胞質シグナル伝達ドメインが、キメラな受容体が標的抗原と会合した後のＴリンパ球増殖およびエフェクター機能のための刺激シグナルをもたらすために、キメラな受容体の少なくとも一部として用いられる。例には、共刺激分子（例えば、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢおよびＯＸ４０）またはサイトカイン受容体（例えば、ＩＬ７およびＩＬ１５）のシグナル伝達成分に由来するエンドドメインが含まれるであろうが、これらに限定されない。特定の実施形態において、共刺激分子が、抗原会合後にＣＡＲによってもたらされるＴ細胞の活性化、増殖および細胞毒性を高めるために用いられる。具体的実施形態において、共刺激分子が、ＣＤ２８、ＯＸ４０および４－１ＢＢならびにサイトカインであり、サイトカイン受容体がＩＬ７およびＩＬ１５である。

#### 【００４４】

ＣＡＲは、例えば、第一世代、第二世代または第三世代（シグナル伝達が、ＣＤ２８および腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦｒ）によって提供される共刺激（例えば、４－１ＢＢまたはＯＸ４０）と一緒にＣＤ３によって提供されるＣＡＲ）である場合がある。ＣＡＲはＨＥＲ２に対して特異的である場合があり、また、ＣＡＲには、他のＣＡＲが含まれる場合があり、例えば、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、カップ鎖または軽鎖、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ１２３、ＣＤ３８、ＲＯＲ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３／４、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥｐｈＡ２、ＦＡＰ、ガン胎児性抗原、ＥＧＰ２、ＥＧＰ４０、メソテリン、ＴＡＧ７２、ＰＳＭＡ、ＮＫＧ２Ｄリガンド、Ｂ７－Ｈ６、ＩＬ－１３受容体２、ＩＬ－１１受容体、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、ＣＡ９、ＧＤ２、ＧＤ３、ＨＭＷ－ＭＡＡ、ＣＤ１７１、ルイスＹ、Ｇ２５０／ＣＡＩＸ、ＨＬＡ－ＡＩＭＡＧＥＡ１、ＨＬＡ－Ａ２、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＰＳＣ１、葉酸受容体、ＣＤ４４ｖ７／８、８Ｈ９、ＮＣＡＭ、ＶＥＧＦ受容体、５Ｔ４、胎児性ＡｃｈＲ、ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＣＤ４４ｖ６、ＴＥＭ１、ＴＥＭ８、腫瘍によって発現されるウイルス関連抗原、あるいは、腫瘍のゲノム分析および／または示差的発現研究を介して特定される他の腫瘍関連抗原などに対して特異的なＣＡＲが含まれる場合がある。

#### 【００４５】

特定の場合において、ＣＡＲはＨＥＲ２に対して特異的であり、また、ある特定の実施形態においては、本開示は、例えば、ＨＥＲ２特異的抗体に由来する細胞外の抗原結合ドメインを、例示的な共刺激分子ＣＤ２８のエンドドメインとともに、Ｔ細胞受容体鎖に由来する細胞質シグナル伝達ドメインに結合することによってＨＥＲ２に対して特異的であるキメラなＴ細胞を提供する。このＣＡＲがヒトＴ細胞において発現させられ、ＨＥＲ２陽性ガンを標的とすることが本開示において包含される。場合により、この同じ細胞は、ＨＥＲ２に対して特異的なＣＡＲと、ＴＭＺによって処置可能であるガン細胞に存在していてもよい、または存在していなくてもよい別の抗原に対して特異的なＣＡＲとを含む。場合により、この同じ細胞は、ＨＥＲ２に対して特異的なＣＡＲと、神経膠芽細胞腫細胞に存在していてもよい、または存在していなくてもよい別の抗原に対して特異的なＣＡＲとを含む。

#### 【００４６】

特定の実施形態において、ＣＡＲは、化学療法耐性成分もまたコードする発現ベクターにコードされる。ベクターは特定の実施形態においてはバイシストロン性である。ＣＡＲコード配列は、化学療法耐性成分コード配列に対して５’側または３’側に配置される場合がある。ＣＡＲおよび化学療法耐性成分の発現が、同じ調節配列または異なる調節配列の指示に従っている場合がある。

#### 【００４７】

##### Ｂ．Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）

ある特定の場合において、本開示の免疫細胞は、操作されたＴＣＲを含めて、ＴＣＲを含む。特定の実施形態において、ＴＣＲは、腫瘍細胞によって発現されるＨＬＡ分子に提示されるペプチドに対して特異的である。様々なペプチドが腫瘍抗原に由来し、例として、ｇｐ１００、ｍａｇｅファミリーメンバー、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＰＲＡＭＥおよびＷＴ１に由来するペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0048】

## C. エンゲージャー分子

特定の実施形態において、本開示の免疫細胞はエンゲージャー分子をその抗原認識成分として含む。

## 【0049】

特定の局面において、抗原認識成分としてのエンゲージャー分子は、免疫細胞表面（または操作された免疫細胞の表面）において活性化分子に結合する活性化ドメインと、標的細胞抗原に結合する抗原認識ドメイン、例えば、腫瘍細胞またはガン細胞の表面に発現される抗原に結合する抗原認識ドメインとを含む。

## 【0050】

エンゲージャーは二成分型（これは、例えば、必要な場合にはリンカーによって連結されることがある活性化ドメインおよび抗原認識ドメインを含む）である場合があり、あるいは、三成分型または多成分型（これは、例えば、1つまたは複数の活性化ドメインおよび/または抗原認識ドメイン、あるいは他のドメインを含む）である場合がある。具体的な実施形態において、エンゲージャーの活性化ドメインは、抗体またはその抗原結合フラグメントもしくは抗原結合部分（例えば、単鎖可変フラグメント（s c F v））であり、あるいは、それらを含む。他の具体的な実施形態において、抗原認識ドメインは、抗体またはその抗原結合フラグメントもしくは抗原結合部分（例えば、モノクローナル抗体または s c F v）であり、あるいは、それらを含むか、あるいは、抗原認識ドメインは、リガンド、ペプチド、可溶性 T 細胞受容体またはそれらの組合せを含む場合がある。ある特定の

10

20

## 【0051】

当業者は、免疫細胞が異なる活性化受容体を有しており、エンゲージャーが、活性化される細胞に合わせて調節されるであろうことを認識する。例えば、C D 3 が T 細胞上の活性化受容体であり、これに対して、C D 1 6、N K G 2 D または N K p 3 0 が N K 細胞上の活性化受容体であり、C D 3 またはインバリアント T C R が N K T 細胞上の活性化受容体である。したがって、T 細胞を活性化するエンゲージャー分子は、N K 細胞を活性化するエンゲージャー分子とは異なる活性化ドメインを有する場合がある。具体的な実施形態において、例えば、免疫細胞が T 細胞である場合、活性化分子は、C D 3、例えば、C D 3、C D 3、もしくは C D 3 のうちの1つもしくは複数、または、C D 2 7、C D 2 8、C D 4 0、C D 1 3 4、C D 1 3 7 および C D 2 7 8 である。他の具体的な実施形態において、例えば、免疫細胞が N K 細胞である場合には、活性化分子は、C D 1 6、N K G 2 D または N K p 3 0 であり、あるいは、免疫細胞が N K T 細胞である場合には、活性化分子は C D 3 またはインバリアント T C R である。

30

## 【0052】

ある特定の他の実施形態において、エンゲージャーはさらに、1つまたは複数の副ドメイン（accessory domain）を含み、例えば、サイトカイン、共刺激ドメイン、T 細胞活性化の負の調節分子を阻害するドメイン、あるいは、それらの組合せの1つまたは複数を含む。具体的な実施形態において、サイトカインは、I L - 1 5、I L - 2 および/または I L - 7 である。他の具体的な実施形態において、共刺激ドメインは、C D 2 7、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4 または C D 1 3 7 である。他の具体的な実施形態において、T 細胞活性化の負の調節分子を阻害するドメインは、P D - 1、P D - L 1、C T L A 4 または B 7 - H 4 である。

40

## 【0053】

## I I I . 化学療法耐性成分および抗原認識成分を含む宿主細胞

本開示の宿主細胞は、化学療法耐性成分および抗原認識成分を少なくとも発現するように操作される免疫細胞である。本明細書中で使用される場合、用語「細胞」、「細胞株」および「細胞培養物」は交換可能に使用される場合がある。これらの用語のすべてはまた、ありとあらゆる後続の世代であるそれらの子孫を含む。すべての子孫は、意図的な変異

50

または故意でない変異のために同一でない場合があることが理解される。異種核酸配列を発現させることに関連して、「宿主細胞」は、ベクターを複製すること、および/または、ベクターによってコードされる異種遺伝子を発現させることが可能である真核生物細胞を示す。宿主細胞はベクターのためのレシピエントとして使用することができ、また、これまで使用されてきている。宿主細胞は「トランスフェクション」または「形質転換」される場合があり、これは、外因性の核酸が宿主細胞に移入されるか、または導入されるプロセスを示す。形質転換された細胞には、初代の対象細胞およびその子孫が含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「操作された」および「組換え(の)」細胞または宿主細胞は、外因性の核酸配列(例えば、ベクターなど)が導入されている細胞を示すことが意図される。したがって、組換え細胞は、組換え導入された核酸を含有しない天然に存在する細胞と区別可能である。本開示の実施形態において、宿主細胞は、細胞傷害性T細胞(これはまた、TC、細胞傷害性Tリンパ球、CTL、Tキラー細胞、細胞溶解性T細胞、CD8+T細胞またはキラーT細胞として知られている)を含むT細胞である;エフェクター機能を誘発することができるNK細胞、NK T細胞および他の免疫細胞もまた本開示において包含される。

10

20

30

40

50

#### 【0054】

ある特定の実施形態において、RNAまたはタンパク質配列が、同じ細胞(例えば、同じCTL)において他の選択されたRNAまたはタンパク質配列とともに共発現される場合があることが意図される。共発現が、CTLを2つ以上の異なった組換えベクターにより共トランスフェクションすることによって達成される場合がある。代替において、1つだけの組換えベクターが、RNAのための多数の異なったコード領域を含むために構築されることがあり、この場合、これらのコード領域がその後、この1つだけのベクターによりトランスフェクションされるCTLにおいて発現させられ得るかもしれない。

#### 【0055】

いくつかのベクターでは、ベクターが原核生物細胞および真核生物細胞の両方において複製され、かつ/または発現されることを可能にする制御配列が用いられる場合がある。当業者はさらに、宿主細胞を維持するために、また、ベクターの複製を可能にするために上記宿主細胞のすべてをインキュベーションするための条件を理解しているであろう。ベクターの大規模産生、同様にまた、ベクターによってコードされる核酸、および、それらの同族のポリペプチド、タンパク質またはペプチドの産生を可能にするであろう様々な技術および条件もまた理解されており、また、知られている。

#### 【0056】

細胞は、当該細胞を受ける個体に関して、自己の細胞、同系の細胞、同種の細胞、および、それどころか、場合によっては異種の細胞であることが可能である。

#### 【0057】

改変されたCTLを殺すことができることが望まれるかもしれない多くの状況で、処置を終了することが望まれる場合、細胞が存在した後での細胞の非存在に関心がある研究において、または他の事象において、細胞は新生物性になる。この目的のために、改変された細胞を制御された条件のもとで殺すことができる特定の遺伝子産物(例えば、誘導可能な自殺遺伝子)の発現を提供することができる。

#### 【0058】

抗原認識成分(例えば、HER2 CAR)および化学療法耐性成分(例えば、MGMT)をコードする発現ベクターを1つまたは複数のDNA分子または構築物として細胞に導入することができ、ただし、この場合、DNA分子または構築物には、当該構築物を含む宿主細胞の選抜を可能にするであろう少なくとも1つのマーカーが存在する場合がある。そのような構築物は従来の方法で調製することができ、この場合、遺伝子および調節領域が適するように単離され、連結され、適切なクローニング用宿主にクローン化され、制限または配列決定あるいは他の従来的手段によって分析されることがある。具体的には、PCRを使用して、機能的ユニットのすべてまたは部分を含む個々のフラグメントが単離される場合があり、この場合、1つまたは複数の変異が、「プライマー修復」、連結

、インビトロ変異誘発などを適するように使用して導入されることがある。構築物は、完了し、かつ、適切な配列を有することが明らかにされると、その後、いずれかの従来の手段によってCTLに導入される場合がある。構築物は、細胞への感染または形質導入のために、レトロウイルスベクターを含めて、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス(AAV)または単純ヘルペスウイルス(HSV)などのような複製しない不完全なウイルスゲノムに組み込まれ、パッケージングされる場合がある。構築物は、所望されるならば、トランスフェクションのためのウイルス配列を含む場合がある。代替において、構築物は、融合、エレクトロポレーション、バイオリスティック法、トランスフェクションまたはリポフェクションなどによって導入される場合がある。宿主細胞は、構築物が導入される前に培養において成長させられ、拡大され、その後、構築物の導入および構築物の組み込みのための適切な処理に供される場合がある。その後、細胞は拡大され、構築物に存在するマーカーに基づいてスクリーニングされる。首尾よく使用されることがある様々なマーカーには、hprt、ネオマイシン耐性、チミジンキナーゼ、ヒグロマイシン耐性などが含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0059】

いくつかの場合において、構築物が特定の遺伝子座において組み込まれることが所望される相対的組換えのための標的部位を有する場合がある。例えば、相対的組換えのために当技術分野において知られているような材料および方法を使用して、内因性遺伝子をノックアウトし、また、その内因性遺伝子を構築物によってコードされる遺伝子により(同じ遺伝子座において、またはどこか他のところで)置き換えることができる。相対的組換えのために、.OMEGA.またはO-ベクターのどちらかが使用される場合がある。例えば、ThomasおよびCapecechi、Cell(1987)51、503~512; Mansourら、Nature(1988)336、348~352; およびJoynerら、Nature(1989)338、153~156を参照のこと。

#### 【0060】

構築物は、少なくとも抗原認識成分および化学療法耐性成分と、必要な場合には別の遺伝子、または、1つもしくは複数の遺伝子を有する異なるDNA分子とをコードするただ1つのDNA分子として導入される場合がある。構築物が、同時に、または連続して導入される場合があり、それぞれが、同じマーカーまたは異なるマーカーを有する。

#### 【0061】

有用なエレメント(例えば、細菌または酵母の複製起点、選択マーカーおよび/または増幅可能マーカー、原核生物または真核生物における発現のためのプロモーター/エンハンサーエレメントなど)を含有するベクターで、構築物DNAのストックを調製するために、また、トランスフェクションを行うために使用されることがある様々なベクターが当技術分野では広く知られており、多くが市販されている。

#### 【0062】

##### IV. 医薬組成物

本開示によれば、用語「医薬組成物」は、個体に投与するための組成物に関連する。好ましい実施形態において、医薬組成物は、非経口投与、経皮投与、腔内投与、動脈内投与、クモ膜下腔内投与または静脈内投与のための、あるいは、ガンに直接に注入するための組成物を含む。前記医薬組成物が個体に注入または注射により投与されることが特に想定される。好適な組成物の投与が、種々の方法によって、例えば、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、局所的投与または皮内投与によって行われる場合がある。

#### 【0063】

本開示の医薬組成物はさらに、医薬的に許容されるキャリアを含む場合がある。好適な医薬用キャリアの様々な例が当技術分野では広く知られており、これらには、リン酸塩緩衝化生理的食塩水溶液、水、エマルション(例えば、油/水エマルション)、様々なタイプの湿潤化剤、無菌溶液などが含まれる。そのようなキャリアを含む組成物を広く知られている従来の方法によって配合することができる。これらの医薬組成物は好適な用量で対象に投与することができる。



## 【 0 0 6 4 】

投薬計画が主治医および様々な臨床上の要因によって決定されるであろう。医療技術分野では広く知られているように、あらゆる 1 人の患者のための投薬量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与されるべき具体的な化合物、性別、投与時間および投与経路、全身の健康状態、ならびに、同時に投与されている他の薬物を含めて、多くの要因に依存する。投与のための好ましい投薬量が、体重 1 キログラムあたり 1 日につき、 $0.24 \mu\text{g} \sim 48 \text{mg}$ 、好ましくは  $0.24 \mu\text{g} \sim 24 \text{mg}$ 、より好ましくは  $0.24 \mu\text{g} \sim 2.4 \text{mg}$ 、一層より好ましくは  $0.24 \mu\text{g} \sim 1.2 \text{mg}$ 、最も好ましくは  $0.24 \mu\text{g} \sim 240 \text{mg}$  の単位量の範囲であるかもしれない。特に好ましい投薬量が本明細書中下記において示される。進行を定期的な評価によってモニターすることができる。細胞の多数回の投与が本開示の方法において包含される。細胞用量の一例が、6 週間～8 週間の服用間隔で与えられる  $1 \times 10^7$  細胞～ $1 \times 10^{10}$  細胞の範囲であるかもしれない。使用されることがある他の間隔が、2 週間～10 週間、2 週間～8 週間、2 週間～6 週間、4 週間～10 週間、4 週間～8 週間、4 週間～6 週間などである。具体的な実施形態において、細胞は個体に 1 回与えられる。

10

## 【 0 0 6 5 】

本開示の組成物は局所投与または全身投与により投与される場合がある。投与は一般には非経口的（例えば、静脈内）であろう；DNA はまた、標的部位に対して直接に、例えば、バイオリスティック送達によって内部または外部の標的部位に、あるいは、カテーテルによって動脈内の部位に投与される場合がある。好ましい実施形態において、医薬組成物は皮下投与され、一層より好ましい実施形態においては静脈内投与される。非経口投与のための調製物には、無菌の水性または非水性の溶液、懸濁物およびエマルションが含まれる。非水性溶媒の例として、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、および、注射可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）が挙げられる。水性キャリアには、生理的食塩水および緩衝化媒体を含めて、水、アルコール性溶液／水溶液、エマルションまたは懸濁物が含まれる。非経口用ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース液（Ringer's dextrose）、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲルまたは固定油が含まれる。静脈内用ビヒクルには、補液および栄養補充液ならびに電解質補充液（例えば、リンゲルのデキストロース液に基づくもの）などが含まれる。保存剤および他の添加剤もまた存在する場合がある（例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤および不活性ガスなど）。加えて、本開示の医薬組成物は、タンパク質性キャリア、例えば、血清アルブミンまたは免疫グロブリン、好ましくはヒト起源の血清アルブミンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質性キャリアを含む場合があるかもしれない。本開示の医薬組成物は、（本開示において記載されるような）タンパク質性の二重特異性単鎖抗体構築物あるいは該構築物をコードする核酸分子またはベクターに加えて、医薬組成物の意図された使用に依存して、さらなる生物学的活性作用因を含むことがあるかもしれないことが想定される。

20

30

## 【 0 0 6 6 】

本明細書中に記載される組成物のどれもがキットに含まれる場合がある。限定されない一例において、組換え発現ベクターを含んでいる細胞療法における使用のための 1 つまたは複数の細胞、ならびに／あるいは、組換え発現ベクターを含んでいる細胞療法における使用のための 1 つまたは複数の細胞を作製するための試薬が、キットに含まれる場合がある。キットの構成成分は、好適な容器手段において提供される。

40

## 【 0 0 6 7 】

キットのいくつかの構成成分が、水性媒体において、または凍結乾燥形態でそのどちらかで包装される場合がある。キットの容器手段には一般に、構成成分が入れられることがある、好ましくは、好適に小分けして入れられることがある少なくとも 1 つのバイアル、試験チューブ、フラスコ、ビン、シリンジまたは他の容器手段が含まれるであろう。2 つ以上の構成成分がキットに存在する場合、キットはまた一般には、さらなる構成成分が別々に入れられることがある第 2、第 3 または他のさらなる容器を含有するであろう。しか

50

しながら、構成成分の様々な組合せがバイアルに含まれる場合がある。キットはまた典型的には、構成成分を商用販売のための厳重な閉じ込めで含有するための手段を含むであろう。そのような容器には、所望されるバイアルが保持される射出成形されたプラスチック容器またはブロー成形されたプラスチック容器が含まれる場合がある。

#### 【0068】

キットの構成成分が1つおよび/または複数の液体溶液で提供されるとき、液体溶液は水溶液であり、無菌の水溶液が特に有用である。場合により、容器手段はそれ自体が、配合物が身体の疾患領域に適用されることがある、動物に注射されることがある、ならびに/あるいは、それどころか、キットの他の構成成分に適用されることがある、および/または、キットの他の構成成分と混合されることがあるシリンジ、ピペットおよび/または他のそのような同様の装置である場合がある。

10

#### 【0069】

しかしながら、キットの構成成分は、乾燥された粉末として提供される場合がある。試薬および/または構成成分が乾燥粉末として提供されるとき、粉末は、好適な溶媒を加えることによって再構成されることが可能である。溶媒もまた別の容器手段において提供される場合があることが想定される。キットはまた、無菌の医薬的に許容される緩衝剤および/または他の希釈剤を含有するための第2の容器手段を含む場合がある。

#### 【0070】

特定の実施形態において、細胞療法のために使用されることになる細胞がキットにおいて提供され、また、場合により、そのような細胞がキットの本質的には唯一の構成成分である。キットは、所望される細胞を作製するための試薬および材料を含む場合がある。具体的な実施形態において、そのような試薬および材料には、所望される配列を増幅するためのプライマー、ヌクレオチド、好適な緩衝剤または緩衝剤試薬、塩などが含まれ、また、場合により、そのような試薬には、本明細書中に記載されるようなエンゲージャー分子および/またはそのための調節エレメントをコードするベクターおよび/またはDNAが含まれる。

20

#### 【0071】

特定の実施形態において、1つまたは複数のサンプルを個体から取り出すために好適である1つまたは複数の装置がキットには存在する。そのような装置はシリンジおよび外科用メスなどである場合がある。

30

#### 【0072】

特定の局面において、キットは本開示の細胞療法を含み、しかも、細胞が影響を受けない化学療法もまた含む。場合により、キットは、細胞療法実施形態に加えて、例えば、第2のガン治療法を含み、例えば、化学療法、ホルモン療法および/または免疫療法などを含む。キットは個体のために特定のガンに合わせて調整される場合があり、また、当該個体のためのそれぞれの第2のガン治療法を含む場合がある。

#### 【0073】

V. 化学療法耐性成分および抗原認識成分を発現する宿主T細胞の治療的使用

例示として、ガン患者、あるいは、ガンに罹りやすいか、または、ガンを有することが疑われる患者が、本明細書中に記載されるように処置される場合がある。本明細書中に記載されるように改変される免疫細胞が個体に投与され、長期間にわたって保持される場合がある。個体は細胞の1回または複数回の投与を受ける場合がある。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された細胞は、免疫認識を妨げるためにカプセル封入され、腫瘍の部位に置かれる。

40

#### 【0074】

様々な実施形態において、発現構築物、核酸配列、ベクター、宿主細胞、および/または、これらを含む医薬組成物が、ガン性疾患（例えば、腫瘍性疾患）の防止、処置または改善のために使用される。特定の実施形態において、本開示の医薬組成物は、例えば、固形腫瘍を有するガンを含めて、ガンを防止すること、改善すること、および/または処置することにおいて特に有用である場合がある。

50

## 【 0 0 7 5 】

本明細書中で使用される場合、「処置」または「処置する」には、疾患または病理学的状態の症状または病理に対するあらゆる有益な影響または望ましい影響が含まれ、また、処置されている疾患または状態（例えば、ガン）の1つまたは複数の測定可能なマーカーにおける最小限の低下さえも含まれる場合がある。処置は場合により、疾患または状態の症状の軽減または改善、あるいは、疾患または状態の進行を遅らせることのどちらかを伴うことが可能である。「処置」は、疾患または状態あるいはその関連した症状の完全な根絶または治癒を必ずしも示していない。

## 【 0 0 7 6 】

本明細書中で使用される場合、「prevent」（防止する）および類似する言葉、例えば、「prevented」（防止される）、「preventing」（防止する）などは、疾患または状態（例えば、ガン）の出現または再発の可能性を防止するための、阻害するための、または低下させるのための取り組みを示している。疾患または状態の発症または再発を遅らせること、あるいは、疾患または状態の症状の出現または再発を遅らせることもまた示す。本明細書中で使用される場合、「prevention」（防止）および類似する言葉はまた、疾患または状態の発症または再発の前における当該疾患または状態の強さ、影響、症状および/または負荷を軽減することを包含する。

10

## 【 0 0 7 7 】

特定の実施形態において、本発明は一部においては、発現構築物、核酸分子および/またはベクターを含んでいる細胞で、単独で、または、別の治療とのあらゆる組合せでそのどちらかで投与することができ、また、少なくともいくつかの局面では医薬的に許容されるキャリアまたは賦形剤と一緒に投与することができる細胞を意図する。特定の実施形態において、細胞が投与される前に、前記核酸分子またはベクターが細胞のゲノムの中に安定に組み込まれる場合がある。具体的な実施形態において、ある特定の細胞または組織に対して特異的であり、前記細胞において持続するウイルスベクターが使用される場合がある。好適な医薬用の様々なキャリアおよび賦形剤が当技術分野では広く知られている。本開示に従って調製される組成物は、上記で特定された疾患の防止または処置または遅延化のために使用することができる。

20

## 【 0 0 7 8 】

さらに、本開示は、腫瘍性疾患の防止、処置または改善のための方法であって、その必要性のある対象に、本明細書中で意図されるような、および/または、本明細書中で意図されるようなプロセスによって製造されるような、抗原認識成分分子および化学療法耐性分子を含んでいる細胞、それらをコードする核酸配列、それらをコードするベクター（1つまたは複数）の効果的な量を投与する工程を含む方法に関連する。

30

## 【 0 0 7 9 】

例示的な改変された免疫細胞の組成物を投与するための可能な適用症が、腫瘍性疾患を含めて、ガン性疾患であり、これらには、乳房、前立腺、肺および結腸のガンまたは上皮ガン/ガン腫、例えば、乳ガン、結腸ガン、前立腺ガン、頭頸部ガン、皮膚ガン、尿生殖路のガン（例えば、卵巣ガン、子宮内膜ガン、子宮頸ガンおよび腎臓ガン）、肺ガン、胃ガン、小腸のガン、肝臓ガン、膵臓ガン、胆嚢ガン、胆管のガン、食道ガン、唾液腺のガンおよび甲状腺のガンが含まれる。特定の局面において、ガンは、例えば、TMZによって処置可能である。細胞の組成物を投与するための例示的な適用症がガン性疾患であり、これには、例えば、HER2を発現するどのような悪性腫瘍も含まれる。加えて、HER2を異常に発現する悪性腫瘍が含まれる。本開示の組成物の投与は、例えば、最小限の残存疾患、早期ガン、進行ガン、ならびに/あるいは、転移性ガンおよび/または難治性ガンの場合を含めて、ガンのすべての段階およびタイプについて有用である。

40

## 【 0 0 8 0 】

本開示はさらに、免疫細胞を介して作用する他の化合物（例えば、二重特異性抗体構築物、標的化毒素または他の化合物）との共投与プロトコルを包含する。本発明の化合物を共投与するための臨床的療法は、他の成分を投与するのと同時に、他の成分を投与する前、

50

または、他の成分を投与した後での共投与を包含する場合がある。特定の併用療法には、化学療法、放射線、手術、ホルモン療法または他のタイプの免疫療法が含まれる。

【 0 0 8 1 】

様々な実施形態が、本明細書中に記載されるような1つまたは複数の免疫細胞、本明細書中に記載されるような核酸配列、本明細書中に記載されるようなベクター、および/または、本明細書中に記載されるような宿主を含むキットに関連する。本開示のキットは、本明細書中上記で記載されるような医薬組成物を、単独で、あるいは、医学的な処置または介入の必要性のある個体に投与されるためのさらなる医薬品との組合せでそのどちらかで含むこともまた意図される。

【 0 0 8 2 】

構築物により改変されているC T Lはその後、選抜的条件のもとでの培養において成長させられ、その後、構築物を有するとして選抜される細胞が拡大され、そして、例えば、宿主細胞における構築物の存在を明らかにするためのポリメラーゼ連鎖反応を使用してさらに分析される場合がある。改変された宿主細胞が特定されると、改変された宿主細胞はその後、計画されるように使用される場合があり、例えば、培養で拡大される場合があり、または、宿主生物に導入される場合がある。

【 0 0 8 3 】

細胞の性質に依存して、細胞は広範囲の様々な方法で宿主生物（例えば、哺乳動物）に導入される場合がある。細胞は、具体的な実施形態においては腫瘍の部位において導入される場合があるが、代替の実施形態においては、細胞はガンに向かうか、または、ガンに向かうように改変される。用いられる細胞の数は、いくつかの状況、導入目的、細胞の寿命、使用されることになるプロトコル（例えば、投与回数）、細胞増殖能力および組換え構築物の安定性などに依存するであろう。細胞は、分散物として、一般には目的とする部位またはその近くに注入される分散物として適用される場合がある。細胞は、生理学的に許容される媒体において存在する場合がある。

【 0 0 8 4 】

D N A 導入は組み込みをどの場合においても必ずしも生じさせない。いくつかの状況では、導入されたD N Aの一過性の維持が十分である場合がある。このようにして、短期間の効果を、細胞が宿主に導入され、その後、所定の時間の後で、例えば、細胞が特定の部位に向かうことができた後で刺激され得る場合にはもたらされ得るかもしれない。

【 0 0 8 5 】

細胞は、所望される通りに投与される場合がある。所望される応答、投与様式、細胞の寿命、存在する細胞の数に依存して、様々なプロトコルが用いられる場合がある。投与回数は、少なくとも部分的には上記で記載される要因に依存するであろう。

【 0 0 8 6 】

系は多くの変数に左右されやすいこと、例えば、リガンドに対する細胞応答、発現効率、および、必要に応じて、分泌レベル、発現産物の活性、患者の特定の必要性（これは時間および状況とともに変化する場合がある）、および、細胞または個々の細胞の発現活性の喪失の結果としての細胞活性の喪失速度などに左右されやすいことを理解しなければならない。したがって、それぞれの個々の患者について、全体として集団に投与することが可能であると思われる万能的な細胞がたとえ存在したとしても、それぞれの患者が、当該個体のための適切な投薬量についてモニターされるであろうことが予想され、患者をモニターするそのような慣行は当技術分野では日常的である。

【 0 0 8 7 】

特定の場合において、個体には、T M Z と、1) H E R 2 に対して特異的なC A R、および、2) M G M T をコードする発現ベクターを含むために改変される治療用C T L とが与えられる。細胞は、T M Z と同時に、または、T M Z とは異なるときに送達される場合がある。細胞およびT M Z は、同じ配合物または別個の配合物において送達される場合がある。細胞およびT M Z は別個の送達経路で個体に与えられる場合がある。細胞および/またはT M Z は、例えば、腫瘍部位における注射によって、あるいは、静脈内送達または

10

20

30

40

50

経口送達により送達される場合がある。そのような組成物のための様々な日常的送達経路が当技術分野では知られている。

#### 【0088】

##### V I . テモゾロミド

具体的な実施形態において、テモゾロミド（商品名、Temodar（登録商標）ならびにTemodalおよびTemcad；TMZ）が、免疫細胞が抵抗性である化学療法として用いられる。TMZは、少なくともI V度星状膠細胞腫（浸襲性の脳腫瘍、これはまた、多形性神経膠芽細胞腫として知られている）の処置のために、同様にまた、メラノーマ（皮膚ガンの一形態）および他の悪性腫瘍を処置するために使用される経口アルキル化剤である。TMZはまた、3 - メチル - 4 - オキソ - 3 H , 4 H - イミダゾ [ 4 , 3 - d ] [ 1 , 2 , 3 , 5 ] テトラジン - 8 - カルボキサミドとして示される場合がある。テモゾロミドはまた、再発したI I I度未分化星状細胞腫のために使用される場合があり、また、乏突起膠腫脳腫瘍を処置するために使用される場合がある。この薬剤はイミダゾテトラジンの誘導体であり、テモゾロミドはMTIC（3 - メチル - （トリアゼン - 1 - イル）イミダゾール - 4 - カルボキサミド）のプロドラッグである。

10

#### 【0089】

テモゾロミドは、5 - （3 - メチルトリアゼン - 1 - イル）イミダゾール - 4 - カルボキサミド（MTIC）の活性形態に生体内で加水分解されるまでは最小限の薬理学的活性を有するか、または薬理学的活性を全く有しないプロドラッグである。インビボ投与されたとき、テモゾロミドは、水の影響による生理学的pHでの迅速な非酵素的加水分解をテモゾロミドの非常に電気陽性のC 4位において受け、この加水分解により、テモゾロミドの環が開環し、二酸化炭素を放出し、MTICを生成することが生じる。

20

#### 【0090】

いくつかの実施形態において、個体は、例えば、神経膠芽細胞腫、メラノーマ（転移性メラノーマを含む）、前立腺ガン、神経芽細胞腫、あるいは、再発した悪性神経膠腫、難治性の悪性神経膠腫または進行性の悪性神経膠腫を有する。本開示のTMZおよびT細胞の併用療法を受ける個体は、小児、未成年者または成人である場合がある。TMZの用量が当業者によって常法により決定され、また、例えば、薬剤の強さ、処置されているガンのタイプおよび段階に依存している。

30

#### 【0091】

##### V I I . キメラな抗原受容体（CAR） - 一般的概念

ある特定の実施形態において、抗原認識成分は、化学療法によって処置可能であるガン細胞の表面に存在する腫瘍抗原に対して特異的であるCARを含む。具体的な実施形態において、CARは、scFvを含む二重特異性単鎖抗体構築物を含む。

#### 【0092】

用語「二重特異性単鎖抗体構築物」は、2つの抗体由来結合ドメインを含む構築物に関連する。これらの結合ドメインの一方が、標的抗原に特異的に結合する / 標的抗原と特異的に相互作用することができる、抗体、抗体フラグメントまたはその誘導体の可変領域（またはその一部）を含む場合がある。第2の結合ドメインが、活性化分子（例えば、ヒトCD3抗原）に特異的に結合する / 活性化分子（例えば、ヒトCD3抗原）と特異的に相互作用することができる、抗体、抗体フラグメントまたはその誘導体の可変領域（またはその一部）を含む場合がある。具体的な実施形態において、可変領域の一部が、少なくとも1つのCDR（「相補性決定領域」）を含み、例えば、CDR1領域、CDR2領域またはCDR3領域を少なくとも含む。単鎖抗体構築物における2つのドメイン / 領域は好ましくは、単一鎖として互いに共有結合によりつながれる。

40

#### 【0093】

scFvは一般には、リンカーペプチドによってつながれるVHドメインおよびVLドメインを含有する。分泌可能なエンゲージャーが、細胞からの（分泌に備えるための）シグナルペプチド、それに続く、リンカーペプチド（Lx、Ly、Lz）によってつながれる2つ以上のscFvから構成される。リンカーは、第1のドメインおよび第2のドメイ

50

ンのそれぞれが互いに独立してそれらの示差的な結合特異性を保持することができることを保証するために十分な長さおよび配列のものである場合がある。二重特異性 s c F v を下記のような種々の形式で配置することができる： $V_H - L_X - V_L - L_Y - V_H - L_Z - V_L$ 、 $V_L - L_X - V_H - L_Y - V_H - L_Z - V_L$ 、 $V_L - L_X - V_H - L_Y - V_L - L_Z - V_H$ 、 $V_H - L_X - V_L - L_Y - V_H - L_Z - V_L$ 、 $V_H - L_X - V_L - L_Y - V_H - L_Z - V_L$ 、 $V_H - L_X - V_L - L_Y - V_H - L_Z - V_L$ 、 $V_L - L_X - V_H - L_Y - V_L - L_Z - V_H$ 、 $V_L - L_X - V_H - L_Y - V_L - L_Z - V_H$ 。

#### 【0094】

具体的な実施形態において、本開示の組成物において用いられるための「二重特異性単鎖抗体構築物」は二重特異性単鎖 F v ( s c F v ) を含む。二重特異性単鎖分子の様々な例示的な例が当技術分野では知られており、国際公開 WO 99 / 54440 ; Mack、J. Immunol. ( 1997 )、158、3965 ~ 3970 ; Mack、PNAS ( 1995 )、92、7021 ~ 7025 ; Kufer、Cancer Immunol. Immunother. ( 1997 )、45、193 ~ 197 ; Löffler、Blood ( 2000 )、95、6、2098 ~ 2103 ; および Bruhl、J. Immunol. ( 2001 )、166、2420 ~ 2426 において記載される。

#### 【0095】

具体的な実施形態において、本開示の 1 つの例示的な分子形式により、抗体由来領域が 1 つの  $V_H$  領域と 1 つの  $V_L$  領域とを含むポリペプチド構築物が提供される。特定の実施形態において、s c F v 形式における  $V_H$  ドメインおよび  $V_L$  ドメイン（これらはリンカードメインによって互いに連結される）の分子内配向は、示された二重特異性単鎖構築物のために決定的ではない。両方の可能な配置（ $V_H$  ドメイン - リンカードメイン -  $V_L$  ドメイン； $V_L$  ドメイン - リンカードメイン -  $V_H$  ドメイン）を有する s c F v が二重特異性単鎖構築物の特定の実施形態において意図される。

#### 【0096】

用語「単鎖」は、いくつかの実施形態において本開示に従って使用される場合、当該二重特異性単鎖構築物の第 1 のドメインおよび第 2 のドメインが共有結合により、好ましくは、1 つだけの核酸分子によってコードされる共直線的なアミノ酸配列の形態で連結されることを意味する。

#### 【0097】

用語「( . . . ) に結合する / ( . . . ) と相互作用する」は、本開示との関連で使用される場合、少なくとも 2 つの「抗原相互作用部位」の相互での結合 / 相互作用を規定する。用語「抗原相互作用部位」は本開示によれば、特異的な抗原または抗原の特異的な基との特異的な相互作用の能力を示すポリペプチドのモチーフを規定する。結合 / 相互作用はまた、「特異的 ( な ) 認識」を規定するために理解される。用語「特異的に認識する」は本開示によれば、抗体分子が、本明細書中で定義されるような標的分子のそれぞれの少なくとも 2 つのアミノ酸と特異的に相互作用することが可能であること、および / または、それらに結合することが可能であることを意味する。この用語は、抗体分子の特異性に、すなわち、本明細書中で定義されるようなヒト標的分子の特異的領域を識別するその能力に関連する。抗原相互作用部位の、その特異的抗原との特異的な相互作用は、シグナルの開始を、例えば、抗原の立体配座の変化、抗原のオリゴマー化などの誘導に起因してもたらず場合がある。さらに、結合が、「鍵 - 鍵穴原理」の特異性によって例示される場合がある。したがって、抗原相互作用部位のアミノ酸配列における特異的モチーフと抗原とが、いくつかの実施形態においては、それらの一次構造、二次構造または三次構造の結果として、同様にまた、前記構造の二次的な修飾の結果として互いに結合する。抗原相互作用部位の、その特異的抗原との特異的な相互作用は、当該抗原に対する当該部位の単純な結合も同様にもたらず場合がある。

#### 【0098】

用語「特異的 ( な ) 相互作用」は本開示に従って使用される場合、二重特異性単鎖構築

10

20

30

40

50

物が、類似する構造の（ポリ）ペプチドと交差反応しないこと、または、それらと本質的には交差反応しないことを意味する。研究中的一群の二重特異性単鎖構築物の交差反応性が、例えば、目的とする（ポリ）ペプチドに対する、同様にまた、いくつかの多少なりとも（構造的および／または機能的に）近縁の（ポリ）ペプチドに対する従来の条件のもとでの当該一群の二重特異性単鎖構築物の結合を評価することによって調べられる場合がある（例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988、および、Using Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999を参照のこと）。目的とする（ポリ）ペプチド／タンパク質には結合するが、それ以外の（ポリ）ペプチドのいずれにも結合しないか、または本質的に結合しないそのような抗体のみが、目的とする（ポリ）ペプチド／タンパク質に対して特異的であると見なされる。特異的抗原との抗原相互作用部位の特異的な相互作用についての様々な例が、リガンドの、その受容体に対する特異性を含む。定義は特に、その特異的な受容体に結合したときにシグナルを誘導するリガンドの相互作用を含む。対応するリガンドについての様々な例が、その特異的なサイトカイン受容体と相互作用する／その特異的なサイトカイン受容体に結合するサイトカインを含む。前記定義によってまた特に含まれる前記相互作用についての別の一例が、抗体の抗原結合部位との抗原決定基（エピトープ）の相互作用である。

#### 【0099】

用語「（・・・）に結合する／（・・・）と相互作用する」はまた、ヒト標的分子またはその一部分の2つの領域からなる立体配座エピトープ、構造的エピトープまたは不連続エピトープに関連する場合がある。本開示の関連では、立体配座エピトープは、ポリペプチドが生来的タンパク質に折り重なるときに分子の表面に集まる、一次配列において隔てられる2つ以上の離れたアミノ酸配列によって定義される（Selal（1969）、Science、166、1365、および、Layer（1990）、Cell、61、553～6）。

#### 【0100】

特定の実施形態において、本開示の構築物はまた、本明細書中下記において開示されるように、本明細書中に記載されるヒトCD3複合体またはその一部分の2つの領域から構成される、ならびに／あるいは、それらを含む立体配座的／構造的エピトープに特異的に結合する／そのような立体配座的／構造的エピトープと特異的に相互作用することが想定される。

#### 【0101】

したがって、特異性を、当技術分野において知られている方法、ならびに、本明細書中に開示される方法および記載される方法によって実験的に求めることができる。そのような方法には、ウエスタンブロット、ELISA試験、RIA試験、ECL試験、IRMA試験、EIA試験およびペプチドスキャンが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0102】

用語「抗体フラグメントまたはその誘導體」は、単鎖抗体またはそのフラグメント、合成抗体、抗体フラグメント、例えば、ラクダIg、Ig NAR、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)'<sub>2</sub>フラグメント、F(ab)'<sub>3</sub>フラグメント、Fv、単鎖Fv抗体（「scFv」）、bis-scFv、（scFv）<sub>2</sub>、ミニボディー、ジアボディー、トリアボディー、テトラボディー、ジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）および単ドメイン抗体（sdAb、ナノボディー）など、あるいは、これらのいずれかの化学修飾された誘導體に関連する。本開示に従って用いられるための様々な抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖はさらに、当技術分野において知られている従来の技術を使用して改変することができ、例えば、当技術分野において知られているアミノ酸欠失、アミノ酸挿入、アミノ酸置換、アミノ酸付加および／または組換えならびに／あるいはいずれかの他の改変（例えば、翻訳後修飾および化学的修飾、例えば

、グリコシル化およびリン酸化)を単独で、または組合せでのどちらかで使用することによって改変することができる。そのような改変を免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の根底にあるDNA配列に導入するための様々な方法が、当業者には広く知られている；例えば、Sambrookら(1989)を参照のこと。

【0103】

用語「抗体フラグメントまたはその誘導体」は特に、少なくとも1つのCDRを含む(ポリ)ペプチド構築物に関連する。

【0104】

示された抗体分子のフラグメントまたは誘導体により、上記抗体分子の一部である(ポリ)ペプチド、ならびに/あるいは、化学的/生化学的または分子生物学的な方法によって改変される(ポリ)ペプチドが規定される。対応する様々な方法が当技術分野では知られており、とりわけ研究室マニュアルに記載されている(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版(1989)および第3版(2001)；Gerhardtら、Methods for General and Molecular Bacteriology、ASM Press、1994；Lefkovits、Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques、Academic Press、1997；Golemis、Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2002を参照のこと)。

【0105】

本明細書中に記載された二重特異性単鎖構築物に含まれる可変ドメインが、さらなるリンカー配列によってつながれる場合がある。用語「ペプチドリinker」は本開示によれば、規定された構築物の第1のドメインおよび第2のドメインのアミノ酸配列が互いに連結されるアミノ酸配列を規定する。そのようなペプチドリinkerの本質的な技術的特徴が、前記ペプチドリinkerは重合活性を何ら含まないということである。ペプチドリinkerの特徴(二次構造の促進の非存在を含む)が当技術分野では知られており、例えば、Dall'Aquilaら(Biochem.(1998)、37、9266~9273)、Cheadleら(Mol Immunol(1992)、29、21~30)、および、RaagおよびWhitlow(FASEB(1995)、9(1)、73~80)に記載される。5個未満のアミノ酸を有する想定されるペプチドリinkerは、4個、3個、2個または1個のアミノ酸を含むことができる。「ペプチドリinker」の関連での特に好ましい「ただ1つだけ」のアミノ酸がGlyである。したがって、ペプチドリinkerは、1つまたは複数のGly残基からなる場合がある。さらに、二次構造もまた何ら促進しないペプチドリinkerが好ましい。ドメイン相互の連結を、例えば、遺伝子操作によって提供することができる。融合され、かつ、機能的に連結された二重特異性単鎖構築物を調製し、それらを哺乳動物細胞または細菌において発現させるための様々な方法が当技術分野では広く知られている(例えば、国際公開99/54440、Ausubel、Current Protocols in Molecular Biology、Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N.Y.、1989および1994、または、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、2001)。

【0106】

本明細書中上記および下記で記載される二重特異性単鎖抗体構築物はヒト化抗体構築物または脱免疫化(deimmunized)抗体構築物である場合がある。(ポリ)ペプチド、特に抗体構築物のヒト化および/または脱免疫化のための様々な方法が当業者には



知られている。

【0107】

本開示の医薬組成物の1つの実施形態において、ヒトCD3特異的ドメインのV<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域が、X35-3、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPV-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、WT31およびF101.01からなる群から選択されるCD3特異的抗体に由来する。これらのCD3特異的抗体は当技術分野では広く知られており、とりわけ、Tunnaclyffe(1989)、Int. Immunol.、1、546~550に記載される。具体的な実施形態において、V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域が、ヒトCD3-鎖またはヒトCD3-鎖を特異的に認識することができる抗体/抗体誘導体などに由来する。

10

【0108】

VIII. 化学療法耐性成分および/または抗原認識成分をコードするポリヌクレオチド

本開示は、本明細書中で定義されるような化学療法耐性成分、抗原認識成分または両方をコードする核酸配列と、前記核酸配列を含んでいる細胞とを含む組成物を包含する。核酸分子は特定の局面においては組換え核酸分子であり、また、合成である場合がある。核酸分子は、DNA、RNA、同様にまた、PNA(ペプチド核酸)を含む場合があり、核酸分子はそれらのハイブリッドである場合がある。

20

【0109】

1つまたは複数の調節配列が、本開示の組成物に含まれる核酸分子に加えられる場合があることが当業者には明らかである。例えば、プロモーター、転写エンハンサー、および/または、本開示のポリヌクレオチドの誘導された発現を可能にする配列が用いられる場合がある。好適な誘導可能な系が、例えば、テトラサイクリンによって調節される遺伝子発現、例えば、GossenおよびBujard(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89(1992)、5547~5551)、ならびに、Gossenら(Trends Biotech.、12(1994)、58~62)によって記載されるような遺伝子発現、または、デキサメタゾンにより誘導可能な遺伝子発現系、例えば、Crook(1989)、EMBO J.、8、513~519によって記載されるような遺伝子発現系である。

30

【0110】

さらに、核酸分子が、例えば、チオエステル結合および/またはヌクレオチドアナログを含有する場合があることが、さらなる目的のために想定される。これらの修飾は、細胞内のエンドヌクレアーゼおよび/またはエキソヌクレアーゼに対する核酸分子の安定化のために有用である場合がある。核酸分子が、細胞における前記核酸分子の転写を可能にするキメラな遺伝子を含む適切なベクターによって転写される場合がある。この点で、そのようなポリヌクレオチドは「遺伝子標的化」または「遺伝子治療」の取り組みのために使用され得ることもまた理解されなければならない。別の実施形態において、核酸分子は標識される。核酸の検出のための様々な方法が当技術分野では広く知られている(例えば、サザンブロッティングおよびノーザンブロッティング、PCRまたはプライマー伸長)。この実施形態は、上記で記載される核酸分子の成功した導入を遺伝子治療取り組みの期間中に確認するためのスクリーニング方法のために有用である場合がある。

40

【0111】

核酸分子は、上記核酸分子のいずれかを単独で、または組合せでのどちらかで含む組換え産生されたキメラな核酸分子である場合がある。具体的な局面において、核酸分子はベクターの一部である。

【0112】

したがって、本開示はまた、本開示において記載される核酸分子を含むベクターを含む

50

組成物に関連する。

【0113】

多くの好適なベクターが分子生物学における当業者には知られており（ただし、その選定は、所望される機能に依存するであろう）、これらには、遺伝子操作において従来から使用されるプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージおよび他のベクターが含まれる。当業者には広く知られている様々な方法を、様々なプラスミドおよびベクターを構築するために使用することができる；例えば、Sambrookら（1989）およびAusubel、Current Protocols in Molecular Biology、Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N.Y.（1989）、（1994）に記載される技術を参照のこと。代替において、本開示のポリヌクレオチドおよびベクターは、標的細胞への送達のためにリボソーム中に再構成することができる。クローニングベクターが、DNAの個々の配列を単離するために使用される場合がある。関連のある配列を、特定のポリペプチドの発現が要求される発現ベクターに移入することができる。典型的なクローニングベクターには、pBluescript SK、pGEM、pUC9、pBR322およびpGBT9が含まれる。典型的な発現ベクターには、pTRE、pCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CATが含まれる。

10

【0114】

具体的な実施形態において、本明細書中で定義される二重特異性単鎖抗体構築物をコードする核酸配列に機能的に連結される調節配列である核酸配列を含むベクターが存在する。様々なそのような調節配列（制御エレメント）が当業者には知られており、これらには、プロモーター、スプライスカセット、翻訳開始コドン、翻訳、および、挿入物をベクターに導入するための挿入部位が含まれる場合がある。具体的な実施形態において、核酸分子は、発現を真核生物細胞または原核生物細胞において可能にする前記発現制御配列に機能的に連結される。

20

【0115】

ベクターが、本明細書中で定義されるような化学療法耐性成分および/または抗原認識成分をコードする核酸分子を含む発現ベクターであることが想定される。具体的な局面において、ベクターはウイルスベクターであり、例えば、レンチウイルスベクターである。様々なレンチウイルスベクターが、例えば、Clontech（Mountain View、CA）またはGeneCopoeia（Rockville、MD）を含めて様々なところから市販されている。

30

【0116】

用語「調節配列」は、DNA配列が連結されるコード配列の発現を達成するために必要であるDNA配列を示す。そのような制御配列の性質は、宿主生物に依存して異なる。原核生物では、制御配列には一般に、プロモーター、リボソーム結合部位およびターミネーターが含まれる。真核生物では一般に、制御配列には、プロモーター、ターミネーター、および、場合により、エンハンサー、トランス活性化因子または転写因子が含まれる。用語「制御配列」は、発現のためにその存在が必要であるすべての成分を少なくとも含むことが意図され、また、さらなる好都合な成分を含む場合がある。

40

【0117】

用語「機能的に連結される」は、そのように記載される様々な成分が、これらの成分がそれらの意図された様式で機能することを可能にする関係にある状態での並置を示す。コード配列に「機能的に連結される」制御配列は、このコード配列の発現がそのような制御配列と適合し得る条件のもとで達成されるような様式で連結される。制御配列がプロモーターである場合には、二重鎖の核酸が好ましくは使用されることが当業者にとって明白である。

【0118】

したがって、示されたベクターはある特定の実施形態においては発現ベクターである。「発現ベクター」は、選択された宿主を形質転換するために使用することができ、また、

50

コード配列の発現をその選択された宿主においてもたらず構築物である。発現ベクターは、例えば、クローニングベクター、バイナリーベクターまたは組み込みベクターであることが可能である。発現は、核酸分子が好ましくは翻訳可能な mRNA に転写されることを含む。発現を原核生物および/または真核生物細胞において保証する様々な調節エレメントが当業者には広く知られている。真核生物細胞の場合には、調節エレメントは通常、転写の開始を保証するプロモーターと、必要な場合には、転写の終結および転写物の安定化を保証するポリ A シグナルとを含む。発現を原核生物宿主細胞において可能にする可能な調節エレメントは、例えば、大腸菌における P<sub>L</sub> プロモーター、lac プロモーター、trp プロモーターまたは tac プロモーターを含み、発現を真核生物宿主細胞において可能にする調節エレメントの例には、酵母における AOX1 プロモーターまたは GAL1 プロモーター、あるいは、哺乳動物細胞および他の動物細胞における CMV プロモーター、SV40 プロモーター、RSV プロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、CMV エンハンサー、SV40 エンハンサーまたはグロビンイントロンが挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0119】

転写の開始に関わるエレメントのほかに、そのような調節エレメントはまた、転写終結シグナル（例えば、SV40 ポリ A 部位または tk ポリ A 部位）をポリヌクレオチドの下流側に含む場合がある。さらに、使用される発現系に依存して、ポリペプチドを細胞区画に向かわせることが可能である、または、ポリペプチドを培地中に分泌させることが可能であるリーダー配列が、示された核酸配列のコード配列に加えられる場合があり、様々なそのようなリーダー配列が当技術分野では広く知られている。リーダー配列は、翻訳、開始配列および終結配列、ならびに、好ましくは翻訳されたタンパク質またはその一部を細胞膜周辺腔または細胞外培地に分泌することを導くことができるリーダー配列と適切に同調して組み立てられる。必要な場合には、異種配列は、所望される特徴、例えば、発現された組換え産物の安定化または簡略化された精製をもたらす N 末端の同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる；上掲を参照のこと。これに関連して、好適な発現ベクターが当技術分野では知られている；例えば、Okayama - Berg cDNA 発現ベクター pcDV1 (Pharmacia)、pEF-Neo、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen)、pEF-DHF R および pEF-ADA (Raumr, Cancer Immunol Immunother (2001)、50 (3)、141 ~ 150) または pSPORT1 (GIBCO BRL) など。

#### 【0120】

いくつかの実施形態において、発現制御配列は、真核生物宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションが可能であるベクターにおける真核生物プロモーター系であるが、原核生物宿主のための制御配列もまた使用される場合がある。ベクターが適切な宿主に組み込まれると、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベル発現のために好適である条件のもとで維持され、そして、所望に応じて、本開示のポリペプチドの回収および精製が続く場合がある。

#### 【0121】

さらなる調節エレメントには、転写エンハンサー、同様にまた、翻訳エンハンサーが含まれる場合がある。好都合には、本開示の上記ベクターは選択マーカーおよび/またはスコア化可能 (scorable) マーカーを含む。形質転換細胞の選抜のために有用である様々な選択マーカー遺伝子が当業者には広く知られており、これらは、例えば、代謝拮抗剤抵抗性を dhfr (これは、メトトレキサートに対する抵抗性を与える) (Reiss, Plant Physiol. (Life-Sci. Adv.), 13 (1994)、143 ~ 149) についての選抜の基礎として含む；npt (これは、アミノグリコシドのネオマイシン、カナマイシンおよびパロマイシンに対する抵抗性を与える) (Herrera-Estrella, EMBO J., 2 (1983)、987 ~ 995)、および、hygro (これは、ヒグロマイシンに対する抵抗性を与える) (Marsh, Gene, 32 (1984)、481 ~ 485)。さらなる選択遺伝子が記載されている；

すなわち、*trpB*（これは、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にする）；*hisD*（これは、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする）（Hartman、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、85（1988）、8047）；マンノース-6-リン酸イソメラーゼ（これは、細胞がマンノースを利用することを可能にする）（国際公開WO94/20627）、および、ODC（オルニチンデカルボキシラーゼ）（これは、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤の2-（ジフルオロメチル）-DL-オルニチン（DFMO）に対する抵抗性を与える（McConlogue、1987、Current Communications in Molecular Biology、Cold Spring Harbor Laboratory編））、または、アスペルギルス・テレウス（*Aspergillus terreus*）由来のデアミナーゼ（これは、プラストサイジンSに対する抵抗性を与える）（Tamura、Biosci. Biotechnol. Biochem.、59（1995）、2336～2338）。

#### 【0122】

有用なスコア化可能マーカーもまた当業者には知られており、また、市販されている。好都合には、前記マーカーは、ルシフェラーゼをコードする遺伝子（Giacomini、PI. Sci.、116（1996）、59～72；Scikantha、J. Bact.、178（1996）、121）、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子（Gerdies、FEBS Lett.、389（1996）、44～47）、または、 $\beta$ -グルクロニダーゼをコードする遺伝子（Jefferson、EMBO J.、6（1987）、3901～3907）である。この実施形態は、示されたベクターを含有する細胞、組織および生物の簡便かつ迅速なスクリーニングのために特に有用である。

#### 【0123】

上記で記載されるように、示された核酸分子は、コードされたポリペプチドを細胞において発現させるために単独で、またはベクターの一部として細胞において使用することができる。上記で記載された二重特異性単鎖抗体構築物のいずれか1つをコードするDNA配列（1つまたは複数）を含有する核酸分子またはベクターは、目的とするポリペプチドを結果として産生する細胞に導入される。示された核酸分子およびベクターは、直接的な導入のために、あるいは、リボソームを介した、またはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス型、レトロウイルス型）を介した細胞内への導入のために設計される場合がある。ある特定の実施形態において、細胞は、例えば、T細胞、CAR T細胞、NK細胞、NKT細胞、MSC、ニューロン幹細胞または造血幹細胞である。

#### 【0124】

上記によれば、本開示は、本明細書中で定義される二重特異性単鎖抗体構築物のポリペプチド配列をコードする核酸分子を含む、遺伝子操作において従来から使用されるベクター（特に、プラスミド、コスミド、ウイルスおよびバクテリオファージ）を得るための方法に関連する。好ましくは、前記ベクターは発現ベクターおよび/または遺伝子移入ベクターもしくは遺伝子標的化ベクターである。ウイルスに由来する発現ベクター、例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルスまたはウシパピローマウイルスに由来する発現ベクターが、標的化された細胞集団への示されたポリヌクレオチドまたはベクターの送達のために使用される場合がある。当業者には広く知られている様々な方法を、組換えベクターを構築するために使用することができる；例えば、Sambrookら（上記引用文献中）、Ausubel（1989、上記引用文献中）または他の標準的教本に記載される技術を参照のこと。代替において、示された核酸分子およびベクターは、標的細胞への送達のためにリボソーム中に再構成することができる。本開示の核酸分子を含有するベクターは、広く知られている方法によって宿主細胞に移入することができ、ただし、この場合、その方法は細胞宿主のタイプに依存して変わる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが原核生物細胞のために一般に利用され、これに対して、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが他の細胞宿主のために使用される場合がある；Sambrook（上掲）を参照のこと。

## 【 0 1 2 5 】

## A . ベクター

化学療法耐性成分のためのコード配列および / または抗原認識成分のためのコード配列を含む発現ベクターが本開示において包含される。用語「ベクター」は、核酸配列を、当該核酸配列が複製され得る細胞への導入のために挿入することができるキャリア核酸分子を示すために使用される。核酸配列は「外因性」であることが可能であり、この場合、「外因性」は、当該核酸配列が、ベクターが導入されようとしている細胞に対して外来であること、または、当該配列が細胞における配列に対し相長的であるが、当該配列が通常の場合には見出されない宿主細胞核酸の内部における位置にあることを意味する。ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルスおよび植物ウイルス）および人工染色体（例えば、YAC）が含まれる。当業者は、ベクターを標準的な組換え技術により構築する能力に十分に備えているであろう（例えば、Maniatisら（1988）およびAusubelら（1994）を参照のこと。これらはともに参照によって本明細書中に組み込まれる）。

10

## 【 0 1 2 6 】

用語「発現ベクター」は、転写されることが可能であるRNAをコードする核酸を含むあらゆるタイプの遺伝子構築物を示す。場合により、RNA分子はその後、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに翻訳される。他の場合には、これらの配列は、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの産生においては翻訳されない。発現ベクターは、様々な「制御配列」を含有することができ、ただし、この場合、「制御配列」は、機能的に連結されたコード配列の特定の宿主細胞における転写およびもしかすると翻訳のために必要である核酸配列を示す。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能を同様にもち、下記に記載される核酸配列を含有する場合がある。

20

## 【 0 1 2 7 】

## B . プロモーターおよびエンハンサー

[ 0 1 7 6 ] 「プロモーター」は、転写の開始および速度が制御される核酸配列の領域である制御配列である。プロモーターは、核酸配列の特異的な転写を開始するために、調節タンパク質および調節分子（例えば、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子）が結合することがある遺伝子エレメントを含有する場合がある。表現「機能的に配置される」、「機能的に連結される」、「制御下で（において）」および「転写制御下で（において）」は、プロモーターが、核酸配列に関して、その配列の転写開始および / または翻訳を制御するための正しい機能的な位置および / または配向にあることを意味する。

30

## 【 0 1 2 8 】

プロモーターは一般に、RNA合成のための開始部位を定めるために機能する配列を含む。この配列の最もよく知られている例がTATAボックスであるが、TATAボックスを欠くいくつかのプロモーターでは、例えば、哺乳動物のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のためのプロモーター、および、SV40後期遺伝子のためのプロモーターなどでは、開始部位そのものに重なる離れたエレメントが、開始位置を確定することを助ける。さらなるプロモーターエレメントにより、転写開始の頻度が調節される。典型的には、これらが開始部位から30bp ~ 110bp上流側の領域に位置しているが、数多くのプロモーターが機能的エレメントを開始部位の下流側にも同様に含有することが示されている。コード配列をプロモーター「の制御のもとに」置くために、転写読み枠の転写開始部位の5'端が、選ばれたプロモーターの「下流側に」（すなわち、3'側に）配置される。「上流側」のプロモーターにより、DNAの転写が刺激され、コードされたRNAの発現が促進される。

40

## 【 0 1 2 9 】

プロモーターエレメント間の間隔はしばしば柔軟であり、その結果、エレメントが反転されたとき、または相対的に動かされたとき、プロモーター機能が保たれる。tkプロモーターにおいては、プロモーターエレメント間の間隔を、活性が低下し始める前に50b

50

p 離れるまで増大させることができる。プロモーターに依存して、個々のエレメントが、転写を活性化するために協奏的または独立的にそのどちらかで機能し得るようである。プロモーターは「エンハンサー」とともに使用されてもよく、または使用されなくてもよく、この場合、「エンハンサー」は、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用調節配列を示す。

#### 【0130】

プロモーターは、コーディングセグメントおよび/またはエクソンの上流側に位置する5'非コード配列を単離することによって得られる場合があるように、核酸配列と自然界では会合するものである場合がある。そのようなプロモーターは「内因性」として示すことができる。同様に、エンハンサーは、核酸配列と自然界では会合し、その配列の下流側または上流側のどちらかに位置するものである場合がある。代替において、ある特定の利点が、コードする核酸セグメントを組換え型または異種のプロモーター（これは、その天然の環境では核酸配列と通常の場合には会合しないプロモーターを示す）の制御下に配置することによって得られるであろう。組換え型または異種のエンハンサーもまた、その天然の環境では核酸配列と通常の場合には会合しないエンハンサーを示す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、ならびに、どのような他のウイルスあるいは原核生物細胞または真核生物細胞からであっても単離されるプロモーターまたはエンハンサー、ならびに、「天然には存在」しないプロモーターまたはエンハンサー、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、および/または、発現を変化させる変異を含有するプロモーターまたはエンハンサーが含まれる場合がある。例えば、組換えDNA構築物において最も一般に使用されるプロモーターには、ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトースプロモーター系およびトリプトファン（trp）プロモーター系が含まれる。プロモーターおよびエンハンサーの様々な核酸配列を合成的に産生させることに加えて、様々な配列が、本明細書中に開示される組成物に関連して、組換えクローニング技術および/または核酸増幅技術（PCR（商標）を含む）を使用して産生される場合がある（米国特許第4,683,202号および同第5,928,906号を参照のこと。これらはそれぞれが参照によって本明細書中に組み込まれる）。さらに、配列の転写および/または発現を無核オルガネラ（例えば、ミトコンドリアおよび葉緑体）の内部において指揮する制御配列が同様に用いられ得ることが意図される。

#### 【0131】

当然のことながら、発現のために選ばれるオルガネラ、細胞タイプ、組織、器官または生物におけるDNAセグメントの発現を効果的に指揮するプロモーターおよび/またはエンハンサーを用いることが重要であろう。分子生物学の当業者は一般に、プロモーター、エンハンサーおよび細胞タイプの組合せをタンパク質発現のために使用することを理解している（例えば、Sambrookら（1989）を参照のこと。これは参照によって本明細書中に組み込まれる）。用いられるプロモーターは、例えば、組換えタンパク質および/または組換えペプチドの大規模な産生において好都合であるように、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指揮するための適切な条件のもとで構成的、組織特異的、誘導可能および/または有用である場合がある。プロモーターは異種または内因性である場合がある。

#### 【0132】

加えて、どのようなプロモーター/エンハンサー組合せであってもまた、発現を行わせるために使用され得るであろう。T3、T7またはSP6の細胞質発現系の使用が、別の可能な実施形態である。真核生物細胞は、適切な細菌ポリメラーゼが送達複合体の一部として、または、さらなる遺伝子発現構築物としてそのどちらかで提供されるならば、ある特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支援することができる。

#### 【0133】

組織特異的なプロモーターまたはエンハンサーの正体が、それらの活性を特徴づけるためのアッセイと同様に、当業者には広く知られている。

## 【 0 1 3 4 】

特異的な開始シグナルもまた、コード配列の効率的な翻訳のために要求される場合がある。これらのシグナルには、A T G 開始コドンまたは隣接配列が含まれる。A T G 開始コドンを含めて、外因性の翻訳制御シグナルが提供される必要があるかもしれない。当業者は、このことを決定すること、および、必要なシグナルを提供することが容易にできるであろう。

## 【 0 1 3 5 】

[ 0 1 5 4 ] 本開示のある特定の実施形態において、配列内リボソーム進入部位 ( I R E S ) エLEMENTの使用が、多重遺伝子のメッセージ、すなわち、多シストロン性のメッセージを生じさせるために使用され、これらが本開示において使用される場合がある。

10

## 【 0 1 3 6 】

ベクターは多重クローニング部位 ( M C S ) を含むことができ、この場合、多重クローニング部位は、多数の制限酵素部位を含有する核酸領域であり、これらの制限酵素部位のどれもが、ベクターを消化するために標準的な組換え技術とともに使用することができる。「制限酵素消化」は、核酸分子における特異的位置においてのみ機能する酵素による核酸分子の触媒的切断を示す。これらの制限酵素の多くが市販されている。そのような酵素の使用が当業者によって広く理解されている。しばしば、ベクターが、外因性配列がベクターに連結されることを可能にするために M C S 内で切断する制限酵素を使用して線状化またはフラグメント化される。「連結」は、互いに隣接していてもよく、または隣接していなくてもよい2つの核酸フラグメントの間でのホスホジエステル結合を形成するというプロセスを示す。制限酵素および連結反応を伴う様々な技術が組換え技術の当業者には広く知られている。

20

## 【 0 1 3 7 】

スプライシング部位、終結シグナル、複製起点および選択マーカ―もまた用いられる場合がある。

## 【 0 1 3 8 】

## C . プラスミドベクター

ある特定の実施形態において、プラスミドベクターが、宿主細胞を形質転換するための使用のために意図される。一般には、宿主細胞との適合性がある生物種に由来するレプリコンおよび制御配列を含有するプラスミドベクターが、これらの宿主に関連して使用される。ベクターは通常、複製部位、同様にまた、表現型選抜を形質転換細胞においてもたすことができる標識化配列を有する。限定されない一例において、大腸菌が多くの場合、p B R 3 2 2 (大腸菌種に由来するプラスミド) の誘導体を使用して形質転換される。p B R 3 2 2 はアンピシリン抵抗性およびテトラサイクリン抵抗性のための遺伝子を含有しており、したがって、形質転換細胞を特定するための容易な手段を提供する。p B R プラスミドあるいは他の微生物プラスミドまたはファージはまた、例えば、微生物がそれ自体のタンパク質の発現のために使用することができるプロモーターを含有しなければならないか、または含有するように改変されなければならない。

30

## 【 0 1 3 9 】

加えて、宿主微生物との適合性があるレプリコンおよび制御配列を含有するファージベクターを、これらの宿主に関連して形質転換ベクターとして使用することができる。例えば、ファージのラムダ G E M T M 1 1 が、宿主細胞 (例えば、大腸菌 L E 3 9 2 など) を形質転換するために使用することができる組換えファージベクターを作製する際に利用される場合がある。

40

## 【 0 1 4 0 】

さらに有用なプラスミドベクターには、p I N ベクター ( I n o u y e ら、1985 )、ならびに、後での精製および分離または切断のためのグルタチオン S トランスフェラーゼ ( G S T ) 可溶性融合タンパク質を作製することにおいて使用されるための p G E X ベクターが含まれる。他の好適な融合タンパク質が、ガラクトシダーゼおよびユビキチンなどとの融合タンパク質である。

50

## 【 0 1 4 1 】

発現ベクターを含む細菌宿主細胞（例えば、大腸菌）が、数多くの好適な培地のいずれかにおいて、例えば、LBにおいて成長させられる。ある特定のベクターにおける組換えタンパク質の発現が、当業者によって理解されるであろうように、宿主細胞をある特定のプロモーターに対して特異的な作用因と接触させることによって、例えば、IPTGを培地に加えることによって、または、インキュベーションをより高い温度に切り替えることによって誘導される場合がある。細菌を一般には2時間～24時間の間でのさらなる期間にわたって培養した後で、細胞が遠心分離によって集められ、残留培地を除くために洗浄される。

## 【 0 1 4 2 】

## D．ウイルスベクター

ある特定のウイルスは細胞に感染し、または、受容体媒介エンドサイトーシスを介して細胞に進入し、かつ、宿主細胞のゲノムに一体化し、ウイルス遺伝子を安定的かつ効率的に発現することができることにより、そのようなウイルスは、外来核酸を細胞（例えば、哺乳動物細胞）に移入するための魅力的な候補物になっている。本開示の成分は、本開示の1つまたは複数のCARをコードするウイルスベクターである場合がある。本開示の核酸を送達するために使用されることがあるウイルスベクターの限定されない例が下記において記載される。

## 【 0 1 4 3 】

## 1．アデノウイルスベクター

核酸を送達するための特定の方法では、アデノウイルス発現ベクターの使用が伴う。アデノウイルスベクターは、ゲノムDNAへの組み込みについては低い能力を有することが知られているにもかかわらず、この特徴は、これらのベクターによってもたらされる遺伝子移入の大きい効率によって相殺される。「アデノウイルス発現ベクター」は、(a)構築物のパッケージングを支援するために、また、(b)クローン化されている組織特異的または細胞特異的な構築物を最終的には発現するために十分であるアデノウイルス配列を含有するそのような構築物を包含することが意味される。遺伝子構成またはアデノウイルス(36kbの線状の二重鎖DNAウイルス)の知識は、アデノウイルスDNAの大きい断片が7kBまでの外来配列により置き換えられることを可能にしている(GrunhausおよびHorwitz、1992)。

## 【 0 1 4 4 】

## 2．AAVベクター

核酸が、アデノウイルス支援トランスフェクションを使用して細胞に導入される場合がある。増大したトランスフェクション効率が、アデノウイルス連係システムを使用して様々な細胞系において報告されている(KelleherおよびVos、1994; Cottenら、1992; Curriel、1994)。アデノ関連ウイルス(AAV)は高頻度の組み込みを有しており、また、非分裂細胞に感染することができ、したがって、このことは、アデノ関連ウイルスを、例えば、組織培養における(Muzyczka、1992)、またはインビボにおける哺乳動物細胞へのゲノムの送達のために有用にするので、本開示の細胞における使用のための魅力的なベクター系である。AAVは感染性については広い宿主範囲を有する(Tratschinら、1984; Laughlinら、1986; Lebkowskiら、1988; McLaughlinら、1988)。rAAVベクターの作製および使用に関する詳細が米国特許第5,139,941号および同第4,797,368号に記載される（これらはそれぞれが参照によって本明細書中に組み込まれる）。

## 【 0 1 4 5 】

## 3．レトロウイルスベクター

様々なレトロウイルスが、それらの遺伝子を宿主ゲノムに組み込むそれらの能力、多量の外来遺伝物質を移入すること、広範囲の種および細胞タイプに感染すること、ならびに、特別な細胞株においてパッケージングされることのために送達ベクターとして有用であ

10

20

30

40

50



る (Miller、1992)。

【0146】

レトロウイルスベクターを構築するために、核酸 (例えば、所望される配列をコードする核酸) が、複製欠陥であるウイルスを生じさせるための特定のウイルス配列のところに於いてウイルスゲノムに挿入される。ビリオンを産生させるために、gag 遺伝子、pol 遺伝子およびenv 遺伝子を含むが、LTR およびパッケージング成分を有しないパッケージング用細胞株が構築される (Mannら、1983)。cDNA をレトロウイルスのLTR およびパッケージング成分と一緒に含む組換えプラスミドが特別な細胞株に (例えば、リン酸カルシウム沈殿によって) 導入されるとき、パッケージング配列により、組換えプラスミドのRNA 転写物がウイルス粒子にパッケージングされることが可能になり、その後、ウイルス粒子が培養培地中に分泌される (Nicolas および Rubenstein、1988; Temin、1986; Mannら、1983)。組換えレトロウイルスを含む培地がその後、回収され、必要な場合には濃縮され、遺伝子移入のために使用される。レトロウイルスベクターは広範囲の様々な細胞タイプに感染することができる。しかしながら、組み込みおよび安定な発現は宿主細胞の分裂を必要とする (Paskindら、1975)。

10

【0147】

レンチウイルスは、共通のレトロウイルス遺伝子 (gag、pol およびenv) に加えて、調節機能または構造的機能を有する他の遺伝子を含む複合レトロウイルスである。様々なレンチウイルスベクターが当技術分野では広く知られている (例えば、Naldiniら、1996; Zuffereyら、1997; Blomerら、1997; 米国特許第6,013,516号および同第5,994,136号を参照のこと)。レンチウイルスのいくつかの例には、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1、HIV-2) およびサル免疫不全ウイルス (SIV) が含まれる。様々なレンチウイルスベクターが、HIV の毒性遺伝子を多重に弱めることによって作製されてきており、例えば、env、vif、vpr、vpu およびnef の各遺伝子が欠失され、これにより、ベクターが生物学的に安全にされている。

20

【0148】

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染する能力を有しており、インビボおよびエクシボの両方での遺伝子移入および核酸配列の発現のために使用することができる。例えば、非分裂細胞に感染することができる組換えレンチウイルスであって、好適な宿主細胞が、パッケージング機能を有する、すなわち、gag、pol およびenv、同様にまた、rev およびtat を有する2つ以上のベクターによりトランスフェクションされる組換えレンチウイルスが、米国特許第5,994,136号に記載される (これは参照によって本明細書中に組み込まれる)。組換えウイルスが、特定の細胞タイプの受容体に対する標的化のための抗体または特定のリガンドとの外皮タンパク質の連結によって標的化される場合がある。目的とする配列 (調節領域を含む) を、特異的な標的細胞の表面における受容体に対するリガンドをコードする別の遺伝子と一緒にウイルスベクターに挿入することによって、このベクターは今度は標的的特異的である。

30

【0149】

E. 他のウイルスベクター

他のウイルスベクターが本開示においてワクチン構築物として用いられる場合がある。様々なウイルス由来のベクター、例えば、ワクシニアウイルス由来のベクター (Ridgeway、1988; Baichwal および Sugden、1986; Couparrら、1988)、シンドビスウイルス由来のベクター、サイトメガロウイルス由来のベクターおよび単純ヘルペスウイルス由来のベクターなどが用いられる場合がある。それらは、様々な哺乳動物細胞のためのいくつかの魅力的な特徴を提供する (Friedman、1989; Ridgeway、1988; Baichwal および Sugden、1986; Couparrら、1988; Horwichら、1990)。

40

【0150】

50

#### F．改変ウイルスを使用する送達

送達されるための核酸は、特異的な結合性リガンドを発現するように操作されている感染性ウイルスの内部に収容される場合がある。したがって、ウイルス粒子は標的細胞の同族受容体に特異的に結合し、内容物を細胞に送達するであろう。レトロウイルスベクターの特異的な標的化を可能にするために設計される新規な取り組みが、ウイルス外皮へのラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学的改変に基づいて開発された。この改変は、シアロ糖タンパク質受容体を介した肝細胞の特異的な感染を可能にすることができる。

##### 【0151】

組換えレトロウイルスの標的化に対する別の取り組みが設計され、この取り組みでは、レトロウイルスの外皮タンパク質に対するビオチン化抗体および特異的な細胞受容体に対するビオチン化抗体が使用された。これらの抗体が、ストレプトアビジンを使用することによってビオチン成分を介してつながれた(Rouxら、1989)。主要組織適合遺伝子複合体のクラスⅠ抗原およびクラスⅡ抗原に対する抗体を使用して、Rouxらは、そのような表面抗原を有した様々なヒト細胞のエコトロピックウイルスによる感染をインビトロにおいて実証した(Rouxら、1989)。

10

##### 【0152】

#### G．ベクターの送達および細胞の形質転換

細胞のトランスフェクションまたは形質転換のための核酸送達のための好適な方法が当業者には知られている。そのような方法には、例えば、エキスピボでのトランスフェクションおよび注入などによるDNAの直接的送達が含まれるが、これらに限定されない。当技術分野において知られている技術の適用により、細胞が安定的または一過性に形質転換される場合がある。

20

##### 【0153】

#### H．エキスピボでの形質転換

生物から取り出される真核生物細胞および組織をエキスピボ状況においてトランスフェクションするための様々な方法が当業者には知られている。したがって、細胞または組織が取り出され、本開示の核酸を使用してエキスピボでトランスフェクションされる場合があることが意図される。特定の局面において、移植された細胞または組織が生物の体内に置かれる場合がある。好ましい様相において、核酸が、移植された細胞において発現せられる。

30

##### 【0154】

#### I X．併用療法

本開示のある特定の実施形態において、臨床的局面的ための本開示の免疫療法/化学療法方法は、過剰増殖性疾患の処置において効果的である他の作用因(例えば、抗ガン剤)と組み合わせられる。「抗ガン」剤は、対象においてガンに負の影響を与えることが、例えば、ガン細胞を殺すこと、アポトーシスをガン細胞において誘導すること、ガン細胞の成長速度を低下させること、転移物の発生または数を減らすこと、腫瘍サイズを低下させること、腫瘍成長を阻害すること、腫瘍細胞またはガン細胞への血液供給を減らすこと、免疫応答をガン細胞または腫瘍に対して促進させること、ガンの進行を防止または阻害すること、あるいは、ガンに罹患する対象の寿命を増大させることによって可能である。より一般的には、これらの他の組成物が、細胞を殺すために、または細胞の増殖を阻害するために好適である併用量で与えられるであろう。このプロセスは、ガン細胞を同時に発現構築物および作用因または多数の因子と接触させることを伴う場合がある。このことが、細胞を、両方の作用因を含む1つの組成物または薬理的配合物と接触させることによって、あるいは、細胞を同時に2つの異なった組成物または配合物(ただし、一方の組成物が発現構築物を含み、他方が第2の作用因を含む)と接触させることによって達成される場合がある。

40

##### 【0155】

化学療法剤および放射線療法剤に対する腫瘍細胞耐性は臨床腫瘍学における大きな問題

50

を表す。現在のガン研究の1つの目標が、他の治療法と組み合わせることによって化学療法および放射線療法の効力を改善するための方法を見出すことである。例えば、単純ヘルペスのチミジンキナーゼ（H S - t K）遺伝子は、脳腫瘍にレトロウイルスベクター系によって送達されたとき、抗ウイルス剤のガンシクロビルに対する感受性を首尾よく誘導した（C u l v e r ら、1992）。本開示の関連において、T M Z および細胞療法が、化学療法介入、放射線療法介入または免疫療法介入、しかもまた、他のアポトーシス促進剤または細胞周期調節剤とともに同様に使用され得るであろうことが意図される。

#### 【0156】

代替において、本発明の治療法は、数分から数週間にまで及ぶ間隔によって他の作用因処置の前または後で行われる場合がある。他の作用因および本開示が個体に対して別々に適用される実施形態においては、有意な期間がそれぞれの送達のと看との間において終了していないこと、その結果、作用因および本発明の治療法が依然として細胞に対する好都合な併用効果を発揮することができるであろうようになることが一般に保証されるであろう。そのような場合において、細胞が、互いに約12時間～24時間のうちに、より好ましくは互いに約6時間～12時間のうちに両方の様式と接触させられることがあることが意図される。いくつかの状況においては、処置のための期間を有意に延ばすことが望ましい場合があるが、この場合、数日（2、3、4、5、6または7）から数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）がそれぞれの施与の間で経過する。

#### 【0157】

様々な組合せが用いられる場合があり、例えば、本開示が「A」であり、第2の作用因（例えば、放射線療法または化学療法）が「B」である場合：

#### 【0158】

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

#### 【0159】

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

#### 【0160】

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

#### 【0161】

処置サイクルは、必要であるように繰り返されるであろうことが予想される。様々な標準的治療法、同様にまた、外科的介入が、本発明の細胞療法との組合せで適用される場合があることもまた意図される。

#### 【0162】

##### A . 化学療法

ガン治療法にはまた、化学剤処置および放射線に基づく処置の両方との様々な併用療法が含まれる。抗ガン剤には、例えば、下記のものが含まれる：アシピシン；アクリルピシン；アコダゾール（a c o d a z o l e）塩酸塩；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン（a m b o m y c i n）；酢酸アメタントロン；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリン（a s p e r l i n）；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマスタット；ベンゾデパ（b e n z o d e p a）；ピカルタミド；ピサントレン塩酸塩；ビスナフィドジメシラート（b i s n a f i d e    d i m e s y l a t e）；ビゼレシン（b i z e l e s i n）；硫酸プレオマイシン；プレキナルナトリウム；プロピリミン；プスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド（c a r a c e m i d e）；カルベチマー（c a r b e t i m e r）；カルボプラチン；カルムスチン；カルピシン塩酸塩；カルゼレシン（c a r z e l e s i n）；セデフィンゴール（c e d e f i n g o l）；セレコキシブ（C O X - 2 阻害剤）；クロラムブシル；シロレマイシン（c i r o l e m y c i n）；シスプラチン；クラドリピン；クリスナトールメシラート（c r i s n a t o

10

20

30

40

50

l mesylate) ; シクロホスファミド ; シタラビン ; ダカルバジン ; ダクチノマイシン ; ダウノルピシン塩酸塩 ; デシタビン ; デキソルマブラチン ; デザグアニン ( dezaguanine ) ; デザグアニンメシラート ; ジアジクオン ; ドセタキセル ; ドキソルピシン ; ドキソルピシン塩酸塩 ; ドロロキシフェン ; クエン酸ドロロキシフェン ; プロピオン酸ドロモスタノロン ; デュアゾマイシン ; エダトレキサート ; エフロルニチン塩酸塩 ; エルサミトルシン ( elsamitrucin ) ; エンロブラチン ( enloplatin ) ; エンプロマート ( enpromate ) ; エピプロピジン ( epipropidine ) ; エピルピシン塩酸塩 ; エルプロゾール ( erbulozole ) ; エソルピシン塩酸塩 ; エストラルヌスチン ( estrarnustine ) ; リン酸エストラムスチンナトリウム ; エタニダゾール ; エトボシド ; リン酸エトボシド ; エトプリン ( etoprine ) ; ファドロゾール塩酸塩 ; ファザラビン ; フェンレチニド ; フロクスウリジン ; リン酸フルダラビン ; フルオロウラシル ; フルオロシタビン ( fluorocitabine ) ; ホスキドン ( fosquidone ) ; ホストリエシンナトリウム ; ゲムシタビン ; ゲムシタビン塩酸塩 ; ヒドロキシ尿素 ; イダルピシン塩酸塩 ; イホスファミド ; イルモホシン ( ilmofosine ) ; イプロブラチン ; イリノテカン ; イリノテカン塩酸塩 ; 酢酸ランレオチド ; レトロゾール ; 酢酸ロイプロリド ; リアロゾール塩酸塩 ; ロメトレキソールナトリウム ; ロムスチン ; ロソキサントロン ( losoxantrone ) 塩酸塩 ; マソプロコル ; メイタンシン ; メクロレタミン塩酸塩 ; 酢酸メゲストロール ; 酢酸メレンゲストロール ; メルファラン ; メノガリル ; メルカプトプリン ; メトトレキサート ; メトトレキサートナトリウム ; メトプリン ( metoprine ) ; メツレデバ ; ミチンドミド ( mitindomide ) ; ミトカルシン ; ミトクロミン ; ミトギリル ( mitogillin ) ; ミトマルシン ; マイトマイシン ; ミトスペル ; ミトタン ; ミトキサントロン塩酸塩 ; ミコフェノール酸 ; ノコダゾール ; ノガラマイシン ; オルマブラチン ( ormaplatin ) ; オキシスラン ( oxisuran ) ; バクリタキセル ; ベグアスバルガーゼ ; ペリオマイシン ( peliomycin ) ; ペンタムスチン ( pentamustine ) ; 硫酸ペプロマイシン ; ペルホスファミド ( perfosfamide ) ; ピボプロマン ; ピボスルファン ; ピロキサントロン塩酸塩 ; プリカマイシン ; プロメスタン ( plomestane ) ; ポルフィマーナトリウム ; ポルフィロマイシン ; プレドニムスチン ; プロカルバジン塩酸塩 ; ピューロマイシン ; ピューロマイシン塩酸塩 ; ピラゾフリン ( pyrazofurin ) ; リボプリン ( riboprine ) ; サフィンゴール ; サフィンゴール塩酸塩 ; セムスチン ; シムトラゼン ( simtrazene ) ; スパルホサート ( sparfosate ) ナトリウム ; スパルソマイシン ; スピロゲルマニウム塩酸塩 ; スピロムスチン ( spiromustine ) ; スピロブラチン ; ストレプトニグリン ; ストレプトゾシン ; セロフェヌル ( sulofenur ) ; タリソマイシン ( talisomycin ) ; テコガラ ( tecogalan ) ナトリウム ; タキソテル ; テガフル ; テロキサントロン塩酸塩 ; テモボルフィン ; テニボシド ; テロキシロン ( teroxirone ) ; テストラクトン ; チアミプリン ( thiamiprine ) ; チオグアニン ; チオテバ ; チアゾフリン ; チラバザミン ; クエン酸トレミフェン ; 酢酸トレストロン ( trestolone ) ; リン酸トリシリピン ; トリメトレキサート ; グルクロン酸トリメトレキサート ; トリプトレリン ; ツプロゾール ( tubulozole ) 塩酸塩 ; ウラシルマスタード ; ウレデバ ( uredepa ) ; バブレオチド ( vaporeotide ) ; ベルテボルフィン ; 硫酸ビンブラスチン ; 硫酸ビンクリスチン ; ビンデシン ; 硫酸ビンデシン ; 硫酸ビンピジン ( vinepidine ) ; 硫酸ビングリシナート ( vinglycin ate ) ; 硫酸ビンレウロシン ; 酒石酸ビノレルピン ; 硫酸ビンロシジン ( vinrosidine ) ; 硫酸ビンゾリジン ( vinzolidine ) ; ボロゾール ; ゼニブラチン ( zeniplatin ) ; ジノスタチン ; ゾルピシン塩酸塩 ; 20 - epi - 1 , 25ジヒドロキシビタミンD3 ; 5 - エチニルウラシル ; アピラテロン ; アクラルピシン ; アシルフルベン ; アデシペノール ( adecypenol ) ; アドゼレシン ; アルデスロイキン ; ALL - TKアンタゴニスト ; アルトレタミン ; アンバムスチン ( ambamustine ) ; アミドクス ( amidox ) ; アミホスチ

ン；アミノレブリン酸；アムルピシン；アムサクリン；アナグレリド；アナストロゾール  
 ；アンドログラホリド ( andrographolide ) ；血管形成阻害剤；アンタゴ  
 ニストD；アンタゴニストG；アンタレリクス ( antarelix ) ；抗背側化形態形  
 成タンパク質 ( anti-dorsalizing morphogenetic pr  
 otein ) - 1 ；抗アンドロゲン物質、前立腺ガン；抗エストロゲン物質；アンチネオ  
 プラストン；アンチセンスオリゴヌクレオチド；アフィジコリングリシナート；アボト  
 シス遺伝子調節剤；アボトシス調節因子；アプリン酸；ara - CDP - DL - PTB  
 A ；アルギニンデアミナーゼ；アスラクリン ( asulacrine ) ；アタメスタン ( atamestane ) ；アトリムスチン ( atrimustine ) ；アキシナスタチ  
 ン ( axinastatin ) 1 ；アキシナスタチン2 ；アキシナスタチン3 ；アザセト 10  
 ロン；アザトキシン；アザチロシン；バックチンIII誘導体；バラノール；バチマスタ  
 ット；BCR / ABLアンタゴニスト；ベンゾクロリン類；ベンゾイルスタウロスポリン  
 ；ベータラクタム誘導体；ベータ - アレチン ( alethine ) ；ベタクラマイシン ( betaclamycin ) B ；ベツリン酸；bFGF阻害剤；ピカルタミド；ピサント  
 レン ( bisantrene ) ；ビスアジリジニルスペルミン ( bisaziridin  
 ylspermine ) ；ビスナフィド；ビストラテン ( bistratene ) A ；ビ  
 ゼレシン；ブレフラート ( breflate ) ；プロピリミン；ブドチタン ( budoti  
 tane ) ；ブチオニンスルホキシミン；カルシボトリオール；カルホスチンC；カン  
 プトテシン誘導体；カベシタピン；カルボキサミド - アミノ - トリアゾール；カルボキシ  
 アミドトリアゾール ( carboxyamidotriazole ) ；CaRest M 20  
 3 ；CARN700 ；軟骨由来阻害剤；カルゼレシン；カゼインキナーゼ阻害剤 ( ICOS ) ；カスタノスペルミン；セクロピンB；セトロレリクス；クロルルン類 ( chlor  
 lns ) ；クロロキノキサリンスルホンアミド；シカプロスト；cis - ポルフィリン；  
 クラドリピン；クロミフェンアナログ；クロトリマゾール；コリスマイシン ( collis  
 mycin ) A ；コリスマイシンB；コンプレタスタチンA4 ；コンプレタスタチンA  
 ナログ；コナゲニン ( conagenin ) ；クラムベシジン ( crambescidin ) 816 ；クリスナトール ( crisnatol ) ；クリプトフィシン8 ；クリプトフ  
 イシンA誘導体；クラシン ( curacin ) A ；シクロペンタアントラキノン類 ( cy  
 clopentanthraquinones ) ；シクロプラタム ( cycloplat  
 am ) ；シペマイシン ( cypemycin ) ；シタラビンオクホスファート；細胞溶解 30  
 因子；サイトスタチン ( cytostatin ) ；ダクリキシマブ ( daclicixima  
 b ) ；デシタピン；デヒドロジデンミン ( dehydrodidenmin ) B ；デスロ  
 レリン ( deslorelin ) ；デキサメタゾン；デキシホスファミド ( dexifos  
 famide ) ；デクスラゾキサナ；デクスベラパミル；ジアジクオン；ジデムニンB  
 ；ジドクス ( didox ) ；ジエチルノルスペルミン；ジヒドロ - 5 - アザシチジン；ジ  
 ヒドロタキソール, 9 - ；ジオキサマイシン ( dioxamycin ) ；ジフェニルスピ  
 ロムスチン；ドセタキセル；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン；ドキソル  
 ビシン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカルマイシンSA ；エブセレン；エ  
 コムスチン ( ecomustine ) ；エデルホシン ( edelfosine ) ；エドレ  
 コロマブ；エフロルニチン；エレメン；エミテフル ( emittefur ) ；エビルピシン 40  
 ；エプリステリド；エストラムスチンアナログ；エストロゲンアゴニスト；エストロゲン  
 アンタゴニスト；エタニダゾール；リン酸エトポシド；エキセメスタン；ファドロゾール  
 ；ファザラビン ( fazarabine ) ；フェンレチニド；フィルグラスチム；フィナ  
 ステリド；フラボピリドール；フレゼラスチン ( flezelelastine ) ；フルアス  
 テロン ( fluasterone ) ；フルダラビン；フルオロダウノルピシン塩酸塩；ホル  
 フェニメクス ( forfenime x ) ；ホルメスタン；ホストリエシン ( fostrie  
 cin ) ；ホテムスチン；ガドリニウムテクキサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタピ  
 ン ( galocitabine ) ；ガニレリクス；ゼラチナーゼ阻害剤；ゲムシタピン；  
 グルタチオン阻害剤；ヘプスルファム ( hepsulfam ) ；ヘレグリン；ヘキサメチ  
 レンビスアセトアミド；ヒペリシン；イバンドロン酸；イダルピシン；イドキシフェン； 50

イドラマントン (idramantone) ; イルモホシン (ilmofosine) ;  
 イロマスタット ; イマチニブ (例えば、GLEEVEC (登録商標)) ; イミキモド ; 免  
 疫刺激ペプチド ; インスリン様増殖因子 - 1 受容体阻害剤 ; インターフェロンアゴニスト  
 ; インターフェロン ; インターロイキン ; イオベンゲアン ; ヨードドキシソルピシン ; イボ  
 メアノール, 4 - ; イロプラクト (iroplact) ; イルソグラジン ; イソベンガゾ  
 ール (isobengazole) ; イソホモハリコンドリノ (isohomohalicondrin) B ; イタセトロン ; ジャスブラキノリド ; カハラリド (kahalalide) F ; ラメラリン (lamellarin) - N トリアセタート ; ランレオチド ;  
 レイナマイシン ; レノグラスチム ; レンチナン硫酸 ; レプトルスタチン (leptostatin) ; レトロゾール ; 白血病阻害因子 ; 白血球アルファインターフェロン ; ロイ  
 プロリド + エストロゲン + プロゲステロン ; リュープロレリン ; レバミソール ; リアロゾ  
 ール ; 線状ポリアミンアナログ ; 親油性二糖ペプチド ; 親油性白金化合物 ; リソクリナミ  
 ド (lissoclinamide) 7 ; ロバプラチン (lobaplatin) ; ロン  
 ブリシン (lombricine) ; ロメトレキソール ; ロニダミン ; ロソキサントロン  
 ;  
 ロキソリピン ; ルルトテカン (lurtotecan) ; ルテチウムテキサフィリン ; リ  
 ソフィリン (lysofylline) ; 溶解性ペプチド ; マイタンシン (maitansine) ; マンノスタチン (mannostatin) A ; マリマスタット ; マソプロ  
 コル ; マスピン ; マトリライシン阻害剤 ; マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤 ; メ  
 ノガリル ; メルバロン ; メテレリン (meterelin) ; メチオニナーゼ (methioninase) ; メトクロプラミド ; MIF 阻害剤 ; ミフェプリストン ; ミルテホシ  
 ン ; ミリモスチム ; ミトグアゾン ; ミトラクトール ; マイトマイシンアナログ ; ミトナフ  
 イド (mitonafide) ; ミトトキシノ (mitotoxin) 線維芽細胞増殖因  
 子 - サボリン ; ミトキサントロン ; モファロテン (mofarotene) ; モルグラモ  
 スチム ; Erbitux ; ヒト絨毛性ゴナドトロピン ; モノホスホリル脂質 A + ミオバク  
 テリウム (myobacterium) 細胞壁 sk ; モビダモール ; マスタード抗ガン剤  
 ; ミカペルオキシド (mycaperoxide) B ; マイコバクテリア細胞壁抽出物 ;  
 ミリアポロン (myriaporone) ; N - アセチルジナリン (acetyl dinaline) ; N - 置換ベンズアミド ; ナファレリン ; ナグレスチブ (nagrestip) ; ナロキソン + ペンタゾシン ; ナパビン (napavin) ; ナフテルピン (naph  
 terpin) ; ナルトグラスチム ; ネダプラチン ; ネモルビシン (nemorubicin) ; ネリドロニ酸 (neridronic acid) ; ニルタミド ; ニサマイシ  
 ン (nisamyacin) ; 一酸化窒素調節剤 ; ニトロキシド抗酸化剤 ; ニトルリン (nitrolyllyl) ; オブリメルセン (GENASENSE (登録商標)) ; O . sup  
 . 6 - ベンジルグアニン ; オクトレオチド ; オキセノン (okicenone) ; オリゴ  
 ヌクレオチド ; オナプリストン (onapristone) ; オンダンセトロン ; オンダ  
 ンセトロン ; オラシン (oracin) ; 経口サイトカイン誘導剤 ; オルマプラチン (ormaplatin) ; オサテロン (osaterone) ; オキサリプラチン ; オキサ  
 ウノマイシン (oxaunomyacin) ; パクリタキセル ; パクリタキセルアナログ ;  
 パクリタキセル誘導体 ; パラウアミン (palauamine) ; パルミトイルリゾキシ  
 ン (palmitoyl rhizoxin) ; パミドロニ酸 ; パナキシトリオール (panaxytriol) ; パノミフェン (panomifene) ; パラバクチン (parabactin) ; パゼリブチン (pazelliptine) ; ペグアスバルガーゼ ;  
 ペルデシン (peldesine) ; ペントサンポリ硫酸ナトリウム ; ペントスタチン ;  
 ペントラゾール (pentrozole) ; ペルフルブロン ; ペルホスファミド (perfosfamide) ; ペリリルアルコール ; フェナジノマイシン ; フェニルアセタート  
 ; ホスファターゼ阻害剤 ; ピシバニール ; ピロカルピン塩酸塩 ; ピラルビシン ; ピリトレ  
 キシム ; プラセチン (placetin) A ; プラセチン B ; プラスミノーゲン活性化因  
 子阻害剤 ; 白金錯体 ; 白金化合物 ; 白金 - トリアミン錯体 ; ポルフィマーナトリウム ; ポ  
 ルフィロマイシン ; プレドニゾン ; プロビルビス - アクリドン ; プロスタグランジン J 2

10

20

30

40

50

；プロテアソーム阻害剤；プロテインAに基づく免疫調節剤；プロテインキナーゼC阻害剤；プロテインキナーゼC阻害剤、微細藻類；プロテインチロシンホスファターゼ阻害剤；プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤；プルプリン類；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化（pyridoxylated）ヘモグロビンポリオキシエチレンコンジュゲート；rafアンタゴニスト；ラルチトレキセド；ラモセトロン；rasファルネシルプロテイントランスフェラーゼ阻害剤；ras阻害剤；ras-GAP阻害剤；レテリプチン（retelliptine）脱メチル化体；エチドロン酸レニウムRe186；リゾキシシン（rhizoxin）；リボザイム；RIIレチンアミド；ロヒツキン（rohitukine）；ロムルチド；ロキニメクス；ルビギノン（rubiginone）B1；ルボキシル（ruboxyl）；サフィンゴール；サイントピン（saintopin）；SarCNU；サルコフィトールA；サルグラモスチム；Sdi1模倣体；セムスチン；老化由来阻害剤1；センスオリゴヌクレオチド；シグナル伝達阻害剤；シゾフラン（sizofuran）；ソブゾキサシ；ナトリウムボロカプタート（sodium borocaptate）；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール（solverol）；ソマトメジン結合タンパク質；ソネルミン；スパルホス酸（sparfosic acid）；スピカマイシンD；スピロムスチン（spiromustine）；スプレノペンチン（splenopentin）；スポンギスタチン（spongistatin）1；スクアラミン；スチピアミド（stipiamide）；ストロメライシン阻害剤；スルフィノシン（sulfinosine）；超活性な血管作用性腸管ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ（suradista）；スラミン；スワインソニン；タリムスチン（tallimustine）；タモキシフェンメチオジド（methiodide）；タウロムスチン；タザロテン；テコガラシ（tecogalan）ナトリウム；テガフル；テルラピリリウム（tellurapyrylium）；テロメラゼ阻害剤；テモボルフィン；テニボシド；テトラクロロデカオキシド；テトラゾミン（tetrazomine）；タリブラスチン（thaliblastine）；チオコラリン（thiocoralline）；トロンボボエチン；トロンボボエチン模倣体；チマルファシン（thymalfasin）；サイモボエチン受容体アゴニスト；チモトリナン（thymotrinan）；甲状腺刺激ホルモン；スズエチルエチオプルプリン（tin ethyletiopurpurin）；チラバザミン；チタノセン二塩化物；トプセンチン（topsentin）；トレミフェン；翻訳阻害剤；トレチノイン；トリアセチルウリジン；トリシリピン；トリメトレキサート；トリプトレリン；トロピセトロン；ツロステリド（turosteride）；チロシンキナーゼ阻害剤；チルホスチン類；UBC阻害剤；ウベニメクス；尿生殖洞由来成長阻害因子；ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト；バプレオチド（vapreotide）；バリオリン（variolin）B；ベラレソル（velaresol）；ベラミン（veramine）；ベルジン類（verdins）；ベルテボルフィン；ビノレルピン；ビンキサリチン（vinxaltine）；ビタキシシン（vitaxin）；ボロゾール；ザノテロン（zanoterone）；ゼニプラチン（zeniplatin）；ジラスコルブ（zilascorb）；およびジノスタチンスチマラー、あるいは、前記のどのようなアナログまたは派生変化体、しかもまた、それらの組合せ。

10

20

30

40

50

#### 【0163】

具体的な実施形態において、個体のための化学療法が、例えば、本開示の施与の前に、期間中に、および／または後で本開示とともに用いられる。

#### 【0164】

##### B．放射線療法

DNA損傷を引き起こし、これまで広く使用されている他の因子には、線、X線、および／または、腫瘍細胞への放射性同位体の指向送達として一般に知られているものが含まれる。DNA損傷因子の他の形態もまた意図される（例えば、マイクロ波およびUV線など）。これらの因子のすべてが、DNAに対して、DNAの前駆体に対して、DNAの複製および修復に対して、また、染色体の組立ておよび維持に対して広範囲の損傷をもた

らすことが最も考えられる。X線についての適用線量範囲が、長期間（3週間～4週間）にわたる50レントゲン～200レントゲンの1日線量から、2000レントゲン～6000レントゲンの単回線量までに及ぶ。放射性同位体についての適用線量範囲は広範囲に変化し、同位体の半減期、放射される放射線の強さおよびタイプ、ならびに、新生物細胞による取り込みに依存する。

#### 【0165】

用語「接触される（させられる）」および「さらされる」は、細胞に対して適用される時、治療用構築物および化学療法剤または放射線療法剤が標的細胞に送達され、または標的細胞と直接に並置して置かれるプロセスを記載するために本明細書中では使用される。細胞の殺傷または静止を達成するために、両方の作用因が、細胞を殺すために、または、細胞が分裂することを妨げるために細胞に効果的である併用量で送達される。

10

#### 【0166】

##### C．免疫療法

免疫治療学は一般には、ガン細胞を標的とし、破壊するために免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター分子を使用することに依拠する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面における何らかのマーカに対して特異的な抗体である場合がある。抗体は単独で治療のエフェクターとして役立つ場合があり、または、抗体は、細胞殺傷を実際に行うための他の細胞を補充する場合がある。抗体はまた、薬物または毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）にコンジュゲート化される場合があり、単に標的化剤として役立つ場合がある。代替において、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接的または間接的のどちらかで相互作用する表面分子を有するリンパ球である場合がある。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性のT細胞およびNK細胞が含まれる。

20

#### 【0167】

したがって、本明細書中に記載される本発明の治療法とは異なる免疫療法が、現在の細胞療法と併せて併用療法の一部として使用され得るかもしれない。併用療法のための一般的な取り組みが下記で議論される。一般には、腫瘍細胞は、標的化を受け入れる何らかのマーカ、すなわち、大多数の他の細胞には存在しない何らかのマーカを有しなければならない。多くの腫瘍マーカが存在し、これらのどれもが本開示の関連において標的化のために好適である場合がある。一般的な腫瘍マーカには、ガン胎児性抗原、前立腺特異的抗原、泌尿器腫瘍関連抗原、胎児性抗原、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMGF、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、erbBおよびp155が含まれる。

30

#### 【0168】

##### D．遺伝子

[0187]さらに別の実施形態において、二次的処置が、治療用ポリヌクレオチドが本開示の臨床実施形態の前に、後で、または同時に施される遺伝子治療である。様々な発現産物が本開示の範囲内に包含され、これらには、細胞増殖の誘導因子、細胞増殖の阻害剤、または、プログラム化細胞死の調節因子が含まれる。

#### 【0169】

##### E．手術

およそ60%のガン患者が何らかのタイプの手術を受けるであろう。この場合、そのような手術には、予防的、診断的または病期分類、治療的または緩和的な手術が含まれる。治療的手術は、他の治療法と併せて、例えば、本開示の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子治療、免疫療法および/または代替療法などと併せて使用される場合があるガン処置である。

40

#### 【0170】

治療的手術には、ガン性組織のすべてまたは一部が物理的に除かれる、摘出される、および/または破壊される切除が含まれる。腫瘍切除は、腫瘍の少なくとも一部の物理的な除去を示す。腫瘍切除に加えて、手術による処置には、レーザー手術、凍結手術、電気手

50



術および顕微鏡下手術（モース術）が含まれる。本開示は、表在性ガン、前ガン物または偶発的量の正常組織の除去と併せて使用される場合があることがさらに意図される。

【0171】

ガン性の細胞、組織または腫瘍の一部またはすべてが摘出されるとき、空洞が体内に形成される場合がある。処置が、さらなる抗ガン治療法による領域の灌流、直接的注入または局所的適用によって達成される場合がある。そのような処置が、例えば、1日毎、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎または7日毎に、あるいは、1週間毎、2週間毎、3週間毎、4週間毎および5週間毎に、または、1ヶ月毎、2ヶ月毎、3ヶ月毎、4ヶ月毎、5ヶ月毎、6ヶ月毎、7ヶ月毎、8ヶ月毎、9ヶ月毎、10ヶ月毎、11ヶ月毎もしくは12ヶ月毎に繰り返される場合がある。これらの処置は同様に、様々な投薬量のものである場合がある。

10

【0172】

F. 他の作用因

他の作用因が、処置の治療効力を改善するために本開示との組合せで使用される場合があることが意図される。これらのさらなる作用因には、免疫調節剤、細胞表面受容体およびGAPジャンクションのアップレギュレーションに影響を及ぼす作用因、細胞増殖抑制剤および分化剤、細胞接着の阻害剤、または、アポトーシス誘導剤に対する過剰増殖性細胞の感受性を増大させる作用因が含まれる。免疫調節剤には、腫瘍壊死因子、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータおよびインターフェロンガンマ、IL-2および他のサイトカイン、F42Kおよび他のサイトカインアナログ、または、MIP-1、MIP-1ベータ、MCP-1、RANTESおよび他のケモカインが含まれる。細胞表面受容体またはそれらのリガンド（例えば、Fas/Fasリガンド、DR4またはDR5/TRAIL）のアップレギュレーションは、過剰増殖性細胞に対するアークリン影響またはパラクリン影響の確立によって本開示のアポトーシス誘導能を増強する場合があることがさらに意図される。GAPジャンクションの数を高めることにより細胞間のシグナル伝達を増大させることは、隣接する過剰増殖性細胞集団に対する抗過剰増殖効果を増大させるであろう。他の実施形態において、細胞増殖抑制剤または分化剤を、処置の抗過剰増殖効果を改善するために本開示との組合せで使用する事ができる。細胞接着の阻害剤が、本開示の効力を改善するために意図される。細胞接着阻害剤の例には、フォーカルアドヒージョンキナーゼ（FAK）阻害剤およびロバスタチンが挙げられる。アポトーシスに対する過剰増殖性細胞の感受性を増大させる他の作用因（例えば、抗体c225）が、処置効力を改善するために本開示との組合せで使用され得るかもしれないことがさらに意図される。

20

30

【実施例】

【0173】

下記の実施例は、本発明の好ましい実施形態を明らかにするために含まれる。下記の実施例において開示される技術は、本発明の実施において十分に機能すると本発明者らによって認められる技術を表しており、したがって、その実施のための様々な好ましい態様を構成すると見なされ得ることが、当業者によって理解されなければならない。しかしながら、当業者は、多くの変化が、開示される具体的な実施形態において行われ得ること、そして、多くの変化により、同様な結果または類似する結果が依然として、本発明の精神および範囲から逸脱することなく得られ得ることを、本開示を考慮して理解しなければならない。

40

【0174】

実施例1

TMZをHER2、CAR T細胞と組み合わせることにより、高まった腫瘍殺傷が引き起こされる

TMZおよびHER2、CAR T細胞はともに、抗GBM活性をそれら自体で有する；しかしながら、これらの作用因を組み合わせることにより、さらなる利益がもたらされるかどうかは不明である。このことを検証するために、U373、eGFP、FFLuc

50

細胞を、T細胞単独による不完全な腫瘍殺傷を生じさせたエフェクター対標的比でTMZとともに、またはTMZを用いることなく、非形質導入(NT)T細胞またはHER2・CAR T細胞のどちらかと共培養した。TMZの非存在下におけるNT-T細胞は抗腫瘍活性を全く有していなかった(図1)。HER2・CAR T細胞は、NT-T細胞に関してのTMZと同様に、限定された抗腫瘍活性をTMZの非存在下において有していた。しかしながら、TMZおよびHER2・CAR T細胞の両方を受ける群は完全な腫瘍殺傷を示し、このことは、GBMのための化学免疫療法が有益であることを示していた(図1)。

#### 【0175】

##### 実施例2

TMZはT細胞拡大を阻害する

TMZをHER2・CAR T細胞と組み合わせることにより、腫瘍細胞の殺傷が強化され得ることが示されたが、T細胞そのものに対するTMZの影響、具体的には、T細胞拡大に対するTMZの影響を明らかにすることが望まれた。このことを行うために、 $1 \times 10^6$ 個のHER2・CAR T細胞を100 U/mlのIL-2とともに播き、100  $\mu$ MのTMZにより処置した(1日目)。3日毎に、T細胞を計数し、新鮮なIL-2を与え、TMZにより再び処置した。HER2・CAR T細胞がTMZの非存在下において拡大したが、TMZによる処置はインビトロでのT細胞拡大を効果的に妨げた(図2;  $p < 0.05$ )。この影響により、TMZ治療の期間中に養子移入されるT細胞の効力が制限される場合があり、したがって、このことは、TMZ耐性であるHER2・CAR T細胞を作製するための理論的根拠を提供する。

#### 【0176】

##### 実施例3

TMZ耐性のHER2・CAR T細胞の作製

MGMTを、CD28およびCD3- のシグナル伝達ドメインを含有する第二世代のHER2・CAR(図3)を有するSFGLTROウイルスベクターにクローン化した。これら2つの遺伝子を、1つのベクターからの2つの別個のタンパク質産物の生成を可能にする2A配列によって連結した。このHER2・MGMT構築物を使用して、HER2・CARと機能的MGMTタンパク質との両方を発現したT細胞(HER2・MGMT T細胞)を作製した。MGMT配列におけるシステインからアラニンへのアミノ酸置換(これは、タンパク質を不活性にすることが示されている)を含有する第2の構築物を使用して、HER2・CARと非機能的MGMTタンパク質とを発現するコントロールT細胞(HER2・MGMTCA T細胞; 図3)を作製した。これらの構築物をコードするRD114偽型レトロウイルス粒子を使用して、正常な健康ドナーから得られるCD3/CD28活性化T細胞を形質導入した。FACS分析を、HER2・CARの細胞表面発現を明らかにするために使用し、一方で、定量的RT-PCRを、細胞内におけるMGMTのmRNA発現を明らかにするために使用した。HER2・MGMT T細胞およびHER2・MGMTCA T細胞はともに、同程度のレベルのHER2・CAR mRNAおよびMGMT mRNAを発現する(図3)。

#### 【0177】

##### 実施例4

活性型MGMTが形質導入されたT細胞はTMZの存在下で拡大する

活性型MGMTの発現がT細胞をTMZのリンパ球毒性影響から救うことができるかを明らかにするために、T細胞拡大研究を、HER2・MGMT T細胞を用いて繰り返した。 $1 \times 10^6$ 個のHER2・MGMT T細胞を100 U/mlのIL-2とともに1日目に播き、100  $\mu$ MのTMZにより処置した。3日毎に、T細胞を計数し、新鮮なIL-2を与え、TMZにより再び処置した。平行して培養されるHER2・MGMTCA T細胞がコントロールとして役立った。HER2・MGMT T細胞およびHER2・MGMTCA T細胞はともに、TMZの非存在下で拡大したが、HER2・MGMT T細胞のみがTMZの存在下で拡大した(図4;  $p < 0.05$ 、HER2・MGMT + T

MZ対HER2・MGMTCA+TMZ(7日目から22日目まで)について)。不活性型MGMTを有するコントロールのHER2・MGMTCA T細胞は、遺伝子組換えMGMTを欠いた図2に示されるHER2・CAR T細胞と同様に挙動した。

#### 【0178】

##### 実施例5

HER2・MGMT T細胞はTMZの存在下ではより少ないアポトーシスを受ける

上記で記載されるように、TMZは、最終的には細胞死をアポトーシス経路によってもたらしDNA損傷を引き起こすことによって働く。したがって、遺伝子改変されたT細胞のTMZ耐性をさらに特徴づけるために、遺伝子改変されたT細胞をTMZの非存在下または存在下で培養し、アネキシンおよび7-AAD(アポトーシス細胞死のマーカー)について染色した。図5に示されるように、非形質導入(NT)T細胞、HER2・MGMTCA T細胞またはHER2・MGMT T細胞は、非常に低い同程度のレベルのアポトーシス細胞死をTMZの非存在下において受ける。しかしながら、増大する量のTMZにより処置されたとき、HER2・MGMT T細胞は、NT T細胞またはHER2・MGMTCA T細胞よりも少ないアポトーシスを受けた(図5)。T細胞拡大データと一緒に、このことは、活性型MGMTの発現がTMZ耐性をT細胞に効果的に与えることを示している。

#### 【0179】

##### 実施例6

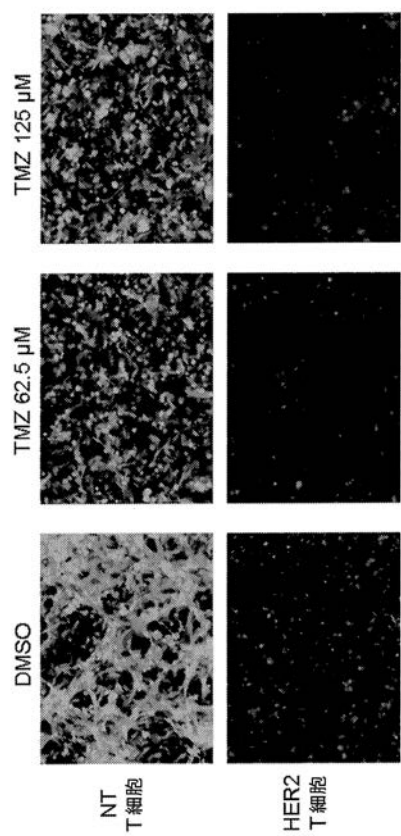
HER2・MGMT T細胞のTMZによる前処理は腫瘍殺傷を損なわない

TMZ耐性が、腫瘍細胞をTMZの存在下で殺すT細胞の能力を高めることができるかを明らかにするために、 $5 \times 10^5$ 個の非形質導入(NT)T細胞、HER2・MGMTCA T細胞またはHER2・MGMT T細胞を1週間にわたってTMZにより前処理し、その後、 $5 \times 10^5$ 個のU373・eGFP・FFLuc細胞による抗原投与に供した。48時間後、T細胞を除き、腫瘍細胞を蛍光顕微鏡法によって画像化した。HER2・MGMTCA T細胞とは対照的に、HER2・MGMT T細胞は、TMZにより前処理された後でさえ、腫瘍細胞を完全に殺傷することができた(図6)。HER2・MGMTCA T細胞は、TMZ前処理により損なわれたTMZの非存在下での完全な腫瘍殺傷を示した。NT T細胞は抗腫瘍活性を何ら有していなかった。

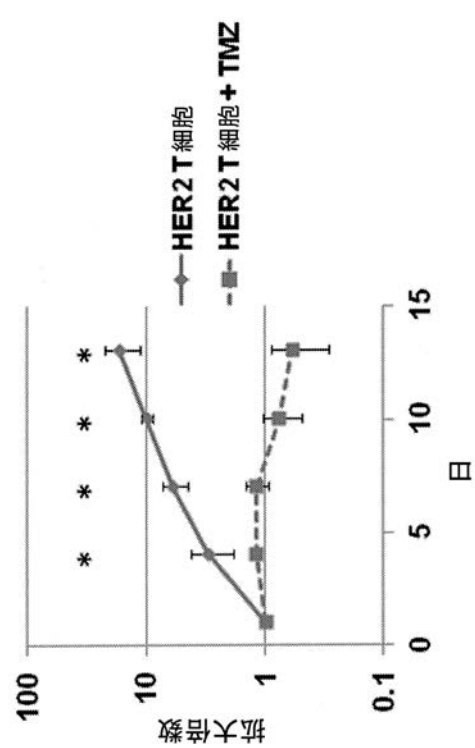
#### 【0180】

本発明およびその利点が詳しく記載されているにもかかわらず、様々な変更、置換および変化が、添付された請求項によって規定されるような本発明の精神及び範囲から逸脱することなく本明細書中において行われ得ることが理解されなければならない。そのうえ、本出願の範囲は、本明細書に記載されるプロセス、装置、製造、組成物、手段、方法および工程の特定の実施形態に限定されることは意図されない。当業者は、本明細書中に記載される対応する実施形態が本発明に従って利用され得るのと実質的に同じ機能を成し遂げるか、または実質的に同じ結果を達成する現在存在する、または、今後開発されることになるプロセス、装置、製造、組成物、手段、方法または工程を本発明の開示から容易に理解するであろう。したがって、添付された請求項は、そのようなプロセス、装置、製造、組成物、手段、方法または工程をその範囲の範囲内に包含することが意図される。

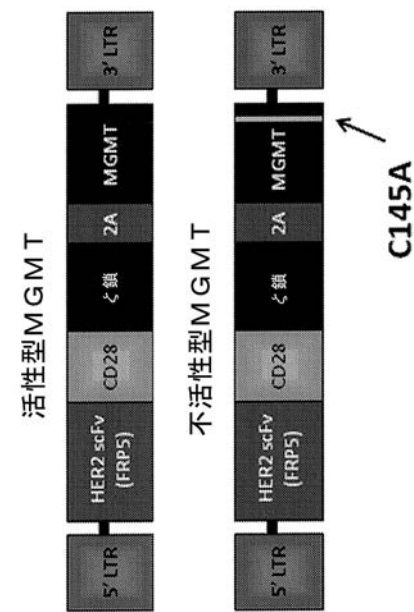
【 図 1 】



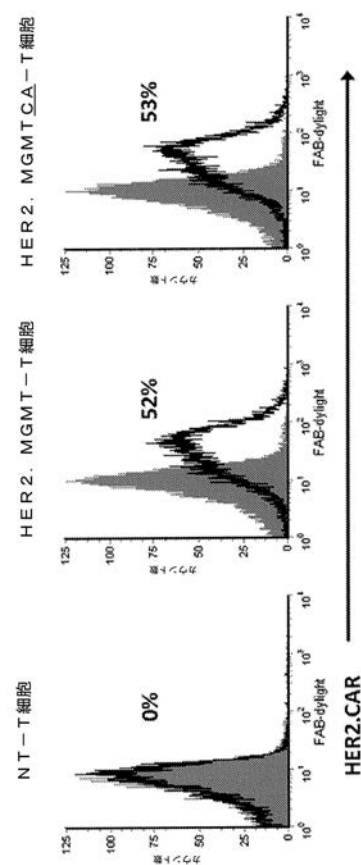
【 図 2 】



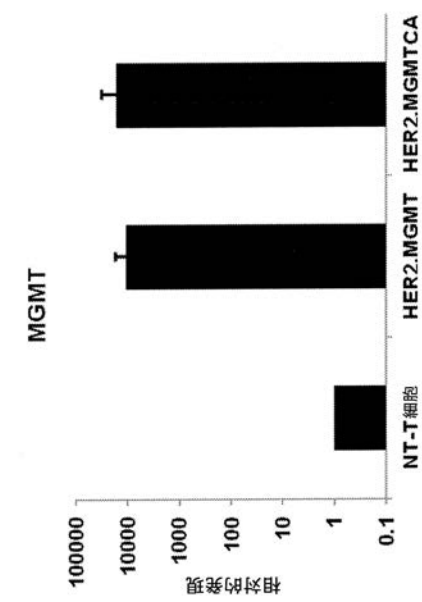
【 図 3 A 】



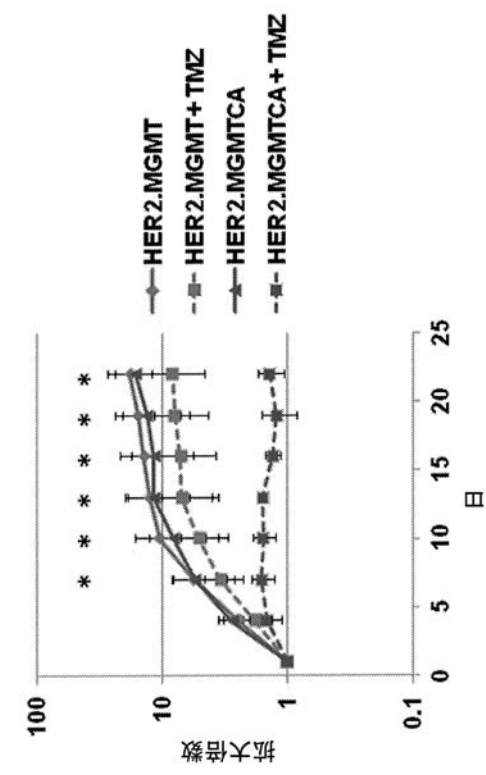
【 図 3 B 】



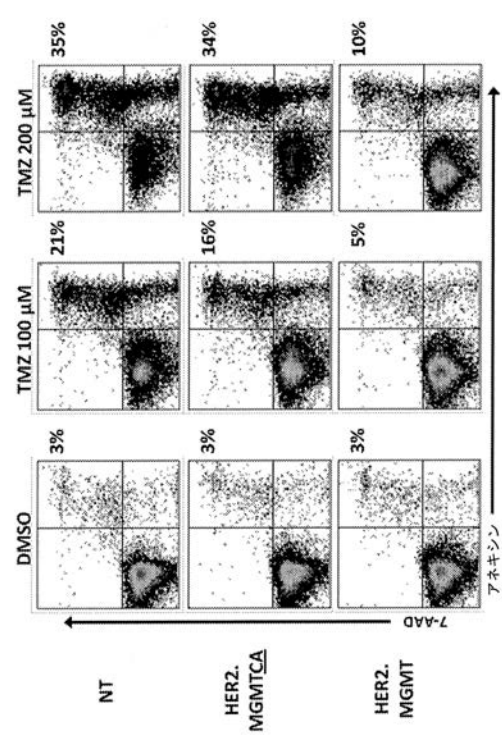
【 図 3 C 】



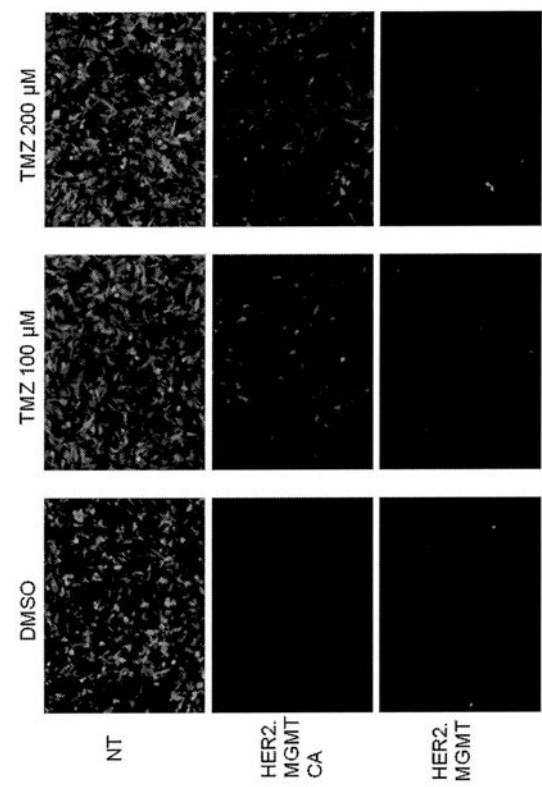
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/022786

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K48/00 C12N9/10 C07K14/47 A61P35/00  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAWRENCE S. LAMB ET AL: "Engineered Drug Resistant [gamma][delta] T Cells Kill Glioblastoma Cell Lines during a Chemotherapy Challenge: A Strategy for Combining Chemo- and Immunotherapy", PLOS ONE, vol. 8, no. 1, 11 January 2013 (2013-01-11), page e51805, XP055127744, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0051805	2-13
Y	the whole document ----- -/--	1,14-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 2014

Date of mailing of the international search report

18/07/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Renggli-Zulliger, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/022786

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANINDYA DASGUPTA ET AL: "Engineered drug resistant immunocompetent cells enhance tumor cell killing during a chemotherapy challenge", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 391, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 170-175, XP008156422, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2009.11.026 [retrieved on 2009-11-10]	2-13
Y	abstract; figures 1,2 -----	1,14-27
X	ANINDYA DASGUPTA ET AL: "Treatment of a Solid Tumor Using Engineered Drug-Resistant Immunocompetent Cells and Cytotoxic Chemotherapy", HUMAN GENE THERAPY, vol. 23, no. 7, 1 July 2012 (2012-07-01), pages 711-721, XP055127754, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2011.172	2-13
Y	abstract; figures 1,2, 5, 6 -----	1,14-27
X	NABIL AHMED ET AL: "Immunotherapy for Osteosarcoma: Genetic Modification of T cells Overcomes Low Levels of Tumor Antigen Expression", MOLECULAR THERAPY, vol. 17, no. 10, 16 June 2009 (2009-06-16) , pages 1779-1787, XP055127295, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2009.133	2-13
Y	figures 3,5,6 -----	1,14-27
X	N. AHMED ET AL: "HER2-Specific T Cells Target Primary Glioblastoma Stem Cells and Induce Regression of Autologous Experimental Tumors", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 16, no. 2, 15 January 2010 (2010-01-15), pages 474-485, XP055127702, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1322	2-13
Y	abstract; figures 4,5 -----	1,14-27

## 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 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/4188 (2006.01)	A 6 1 K 31/4188	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 5/09 (2010.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/82 (2006.01)	C 1 2 N 5/09	
	C 0 7 K 14/82	

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

(72)発明者 イー、チョンチェン

アメリカ合衆国 テキサス州 77030、ヒューストン、ピーシーエム210-600ディー、  
ワン ベイラー プラザ

(72)発明者 シェーファー、ドナルド、アール、

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02215、ボストン、アパートメント シー、32 ク  
イーンズベリー ストリート

(72)発明者 ゴットシャルク、ステファン、エム、ジー、

アメリカ合衆国 テキサス州 77030、ヒューストン、1908 カンタベリー

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA03 GA11 HA01 HA17  
4B065 AA90X AA90Y AC20 BA02 CA26 CA44  
4C084 AA13 MA16 MA22 MA55 MA56 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB26  
ZC75  
4C085 AA14 AA26 CC23 DD62 EE03 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06  
GG10  
4C086 AA01 AA02 CB05 MA01 MA02 MA04 MA16 MA23 MA44 MA56  
MA63 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZC75  
4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 BC83 CA12 MA16 MA22 MA44 MA55  
MA56 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZC75  
4H045 BA10 BA40 BA41 CA40 DA50 EA20 EA22 FA74