

(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2017-503510

(P2017-503510A)

(43) 公表日 平成29年2月2日 (2017. 2. 2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/735 (2006. 01)	C 0 7 K 14/735	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-545965 (P2016-545965)
 (86) (22) 出願日 平成27年1月8日 (2015. 1. 8)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月28日 (2016. 7. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/010708
 (87) 国際公開番号 W02015/106043
 (87) 国際公開日 平成27年7月16日 (2015. 7. 16)
 (31) 優先権主張番号 61/925, 217
 (32) 優先日 平成26年1月8日 (2014. 1. 8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516205100
 1 グローブ バイオメディカル カンパニ
 ー, リミテッド
 中華人民共和国 1 0 0 0 8 3 ペイジン
 , ハイティエン ディストリクト, シ
 ユエユエン ロード ナンバー30, テ
 ックアート プラザ, ブロック ビー,
 8 エフ
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の、合成生物学に基づく A D C C 技術

(57) 【要約】

A D C C 応答を増強もしくは可能にする、新規な合成生物学ベースの A D C C 技術が提供される。上記新規な A D C C 技術は、がん、感染性、炎症性もしくは自己免疫性の疾患、および罹病細胞の除去が望ましい他の疾患を防止もしくは処置するために使用され得る。ヒト C D 1 6 の抗体 F c 結合親和性よりも高い抗体 F c 結合親和性を有するエクドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに A D C C 活性化および増幅を媒介するためのエンドドメインを含む膜貫通キメラレセプターをコードする遺伝子構築物。

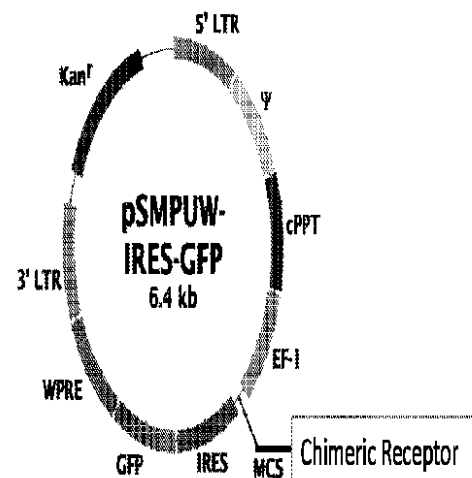


Figure 5

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトCD16の抗体Fc結合親和性よりも高い抗体Fc結合親和性を有するエクトドメイン、膜貫通ドメイン、ならびにADCC活性化および増幅を媒介するためのエンドドメインを含む膜貫通キメラレセプターをコードする遺伝子構築物。

【請求項 2】

DNA分子を含む、請求項1に記載の遺伝子構築物。

【請求項 3】

RNA分子を含む、請求項1に記載の遺伝子構築物。

【請求項 4】

CD64の実質的にEC3エキソンを含む、請求項1に記載の遺伝子構築物。

【請求項 5】

CD64の実質的にEC1エキソンおよびEC2エキソンをさらに含む、請求項4に記載の遺伝子構築物。

【請求項 6】

前記エクトドメインは、CD64中のエキソンもしくはドメインの境界に基づいて選択される、請求項1に記載の遺伝子構築物。

【請求項 7】

CD64の実質的にエクトドメインを含むエクトドメインへと翻訳されるRNAを含む、請求項1に記載の遺伝子構築物。

【請求項 8】

前記エクトドメインは、ヒトCD16のV158変体のFc親和性よりも高いFc親和性を有する、請求項1に記載の遺伝子構築物。

【請求項 9】

前記エクトドメインは、ヒトCD16のF158変体のFc親和性よりも高いFc親和性を有する、請求項1に記載の遺伝子構築物。

【請求項 10】

前記エンドドメインは、CD3ζの、CD28の、CD134の、CD137の、CD27の、CD79aの、CD79bの、CD40の、およびGM-CSFレセプターの、細胞内ドメインの一部もしくは全てからなる群より選択される、請求項1に記載の遺伝子構築物。

【請求項 11】

配列番号1、3、5、7、および9からなる群より選択されるDNA配列を含む、請求項1に記載の遺伝子構築物。

【請求項 12】

ヒトCD16の抗体Fc結合親和性よりも高い抗体Fc結合親和性を有するエクトドメイン、膜貫通ドメイン、ならびにADCC活性化および増幅を媒介するためのエンドドメインを含む、膜貫通キメラレセプター。

【請求項 13】

配列番号2、4、6、8、および10からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項12に記載の膜貫通キメラレセプター。

【請求項 14】

前記エクトドメインは、ヒトCD16のV158変体の抗体Fc結合親和性よりも高い抗体Fc結合親和性を有する、請求項12に記載の膜貫通キメラレセプター。

【請求項 15】

前記エクトドメインは、CD64のエクトドメインにおいて、CD16には存在しない実質的に免疫グロブリン様折りたたみを含む、請求項12に記載の膜貫通キメラレセプター。

【請求項 16】

前記エクトドメインは、CD64の実質的にエクトドメインを含む、請求項12に記載

10

20

30

40

50

の膜貫通キメラレセプター。

【請求項 17】

前記膜貫通ドメインは、CD16の実質的に膜貫通ドメインを含む、請求項12に記載の膜貫通キメラレセプター。

【請求項 18】

宿主免疫エフェクター細胞の生存および増幅を増強するADCC増幅モジュールをさらに含む、請求項12に記載の膜貫通キメラレセプター。

【請求項 19】

前記増幅モジュールは、CD3ζの、CD28の、CD134の、CD137の、CD27の、CD79aの、CD79bの、CD40のおよびGM-CSFレセプターの、細胞内ドメインの一部もしくは全てからなる群より選択される、請求項19に記載の膜貫通キメラレセプター。

10

【請求項 20】

請求項1～11に記載の遺伝子構築物もしくは請求項12～20のタンパク質で、エキソビボで、感染させたかもしくはトランスフェクトされた、免疫エフェクター細胞。

【請求項 21】

細胞傷害性Tリンパ球を含む、請求項21に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 22】

ナチュラルキラー細胞を含む、請求項21に記載の免疫エフェクター細胞。

20

【請求項 23】

好酸球、マクロファージ、好中球、好塩基球、単球、B細胞、および細胞傷害性因子を発現するかもしくは発現するように操作されている他の細胞からなる群より選択される、請求項21に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 24】

請求項1～11に記載の遺伝子構築物または請求項12～20に記載のレセプター、および薬学的に受容可能な賦形剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 25】

請求項22～24に記載の免疫エフェクター細胞および薬学的に受容可能な賦形剤を含む、薬学的組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の引用)

本願は、2014年1月8日出願された同じ発明の名称の同時係属中の米国仮特許出願第61/925,217号に対する優先権およびその利益を主張する。この出願は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、免疫エフェクター細胞が抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を媒介する能力または細胞にADCCを媒介させ得る能力を増強するために使用され得る合成生物学的生成物およびプロセス、ならびにがん、感染性疾患、炎症性および自己免疫疾患ならびに他の疾患の処置および防止においてそれらを使用するための方法に関する。

40

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

哺乳動物、特に高等脊椎動物(ヒトを含む)は、複数の機構およびエフェクターを使用して、外来病原体ならびに罹病したかもしくはストレスを受けた自己由来細胞を検出、破壊もしくは少なくとも封じ込める、非常に複雑な免疫系を発達させた。これらの罹病細胞は、ウイルスもしくは細菌によって感染した可能性があるか、またはがんになった可能性がある。

50

【 0 0 0 4 】

免疫系が罹病宿主細胞および侵入している細胞内微生物（例えば、ウイルス、細菌もしくは寄生生物）を認識および排除する機構のうちの1つは、細胞媒介性細胞傷害性を通してであり、これは、多くの白血球およびタンパク質によって行われ得る。これら潜在的に細胞傷害性のエフェクターとしては、以下が挙げられる：リンパ球系統からはナチュラルキラー（NK）細胞および細胞傷害性Tリンパ球（CTL）；ならびに骨髄系統からはマクロファージ、好中球および好酸球。

【 0 0 0 5 】

免疫系が細胞媒介性細胞傷害性を発揮させる（unleash）ための重要な方法は、抗体に依拠する。過去10年間にわたって、腫瘍特異的細胞表面タンパク質を標的とするモノクローナル抗体（mAb）は、がんに対する普及した治療アプローチになった。いくつかのmAbは、リツキシマブ（リツキサン、マブセラ）、トラスツズマブ（ハーセプチン）およびセツキシマブ（アービタックス）を含め、慣用的な臨床実践に入った。mAbの人気は、それらの二機能性の性質の結果である。抗体の一方の末端（Fab）は、腫瘍細胞を死滅させる種々のエフェクター細胞およびタンパク質を動員する他方の末端（Fc）を変化させることなく、特定の腫瘍タンパク質に精巧に特異的にされ得る。

10

【 0 0 0 6 】

具体的には、まず、標的細胞の表面にある抗原を認識および結合した後、抗体は、アダプターとして作用し、免疫エフェクター細胞上のある種のレセプターとの第2の結合を通じて免疫エフェクター細胞の細胞傷害性能力の活性化にすすむ。これは、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）といわれる。例えば、がんに対する先天的免疫の状況において、ADCCは主に、標的の罹病細胞（例えば、腫瘍細胞）上に多価抗原を覆っている抗体のFc（定常）部分を結合した際にのみ活性化される、相対的に低親和性のFcレセプター（FcγRIIIa（CD16aとしても公知））を発現するナチュラルキラー（NK）細胞（およびより低い程度には、好中球、単球およびマクロファージ）によって媒介される。この結合は、パーフォリンおよびグランザイム（ならびにIFN-γを含む多くのサイトカイン）のような細胞傷害性顆粒の放出の引き金となり、標的細胞の溶解をもたらす。上記ADCC応答の重要性は、インビトロで、および動物研究での両方において示されてきた。さらに、いくつかの臨床研究は、より低い親和性のCD16改変体（F158）を有する患者がより悪い臨床転帰を有することを示した。

20

30

【 0 0 0 7 】

しかし、ADCC効力は、内因性ナチュラルキラー（NK）細胞によって主に媒介されるので、以下に説明されるとおりの多くの生理学および病理学的な理由に起因して、身体では制限されている（内因性細胞傷害性Tリンパ球は、腫瘍クリアランスに少しでも参加し、それらの効力もまた、非常に限られており、欠けていると見出された程度に）。

【 0 0 0 8 】

第1に、ADCC応答に関与する大部分の細胞（例えば、マクロファージおよび好中球）は、それらが活性化されるときに増殖する傾向にない。NK細胞はまた、活性化に応じた増殖能力が制限されており、それらはまた、急速に死に絶えてしまう。従って、身体における天然のADCC応答は、ADCCエフェクターが罹病細胞を覆う抗体を認識するとしても、疾患進行（例えば、ウイルス感染、がん）によって圧倒されるリスクがある。

40

【 0 0 0 9 】

第2に、ADCCエフェクター細胞の多くはまた、それらの免疫応答性を低下させる阻害性レセプターを発現し、それによってバランスおよびチェックのシステムを設けている。これらレセプターとしては、CD56^{low} NK細胞に対する阻害性KIR（キラー免疫グロブリン様レセプター）、単球およびB細胞上のFcγRIIb、ならびにT細胞に対するCTLA-4（CD152）およびPD-1（プログラム死-1（Programmed Death-1）、CD279）が挙げられる。がん細胞およびウイルスは、このような阻害経路を異常に増幅することによって身体のADCCベースの防御システムに逆らう。

50

【 0 0 1 0 】

第3に、ADCCエフェクター細胞上の主要FcレセプターであるFcγRIIIaは、抗体に対して比較的低い親和性(K_d 約 10^{-6} M)を有する - - さらに、上記レセプターのV158改変体は、上記レセプターの無効なF158形態と比較して、2倍高いに過ぎない親和性を有する。これは、細胞表面標的の密度がいったんあるレベル未満に落ちた後、がん細胞が、一部の治療用モノクローナル抗体(mAb)に抵抗性になる1つの機構である。

【 0 0 1 1 】

増殖および親和性におけるその天然の限界、ならびに疾患(例えば、がんもしくは他の疾患)の設定において阻害性Fcレセプターによるさらなる低下に鑑みれば、身体のADCC機能は、決して十分には理解されていない大きな潜在能力を有する。従って合成生物学は、ヒト疾患の防止および処置においてADCC活性の十分な潜在能力を発揮させる、新規かつ非常に望ましいアプローチを表す。

10

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

(発明の簡単な要旨)

本発明により新たなアプローチがもたらされ、がん、感染および他の疾患に対する免疫系の防御が改善される。合成生物学および組換え技術のツールを使用して、本発明は、がんを含む多くの種類の疾患に対するADCC応答の有効性を大いに改善するADCCエンハンサーもしくは増強システムを設計および構築することを目的とする。一局面において、本発明は、特異性を損なうことなしに、ADCC防御システムの「センサー」部分におけるその結合親和性を増強することによって、ADCC防御システムの検出感度および効率を改善する。別の局面において、本発明は、細胞傷害性エフェクター細胞の増殖能力を増強することによって、上記システムの「エフェクター」部分を改善する。好ましい実施形態において、上記局面のうちの1つより多くが組み合わされる。しかし、本発明の他の実施形態は、前述の本発明の局面のうちの1つを反映するに過ぎなくてもよい。

20

【 0 0 1 3 】

本発明のADCCエンハンサーは、治療目的で投与される、天然に存在する抗体もしくは人工抗体によって認識もしくは結合される罹病細胞を標的とするために、抗体療法と組み合わせ、もしくはそれ自体でのいずれかで使用され得る。

30

【 0 0 1 4 】

ADCC増強システムの「センサー」部分に焦点を当てる第1の局面において、本発明は、野生型ヒトCD16(例えば、ヒトCD16の最も一般的な形態、F158改変体)の抗体親和性よりも高い抗体親和性を有するエクトドメイン(すなわち、細胞外ドメイン)を構築することを呈示する。これは、高親和性膜貫通Fcレセプターを生じ、その細胞外部分は、既存のFcレセプターのエクトドメインに基づき得る。「キメラ」もしくは「融合」レセプターは、一部もしくは全体が、免疫系における別の高分子から取り入れられてもよいし、新たに作られてもよい。高親和性Fcレセプターを有することにより、免疫エフェクター細胞が種々の抗体に共通する同じFcフラグメントを効率的に結合することができ、これは次いで、広く種々の細胞表面抗原を、ならびに、それによって広く種々の疾患および適応症を標的とすることを可能にする。これは、抗原依存性免疫療法(ここでは、各々の特異的抗原に対して毎回異なる抗体を構築する必要があり、時間および他の資源において高くつくプロセスである)と比較して、大いに有利である。

40

【 0 0 1 5 】

焦点がADCCシステムの「エフェクター」部分へと移る第2の局面において、本発明は、いったん発現されるとADCCエフェクター細胞の増幅を促進し得るモジュールを組み込む。

【 0 0 1 6 】

よって、一実施形態において、本発明は、ヒトCD16のF158改変体の抗体Fc結

50

合親和性よりも高い抗体Fc結合親和性を有するエクトドメイン、膜貫通ドメイン、ならびにADCC活性化および増幅を媒介するためのエンドドメインを含む膜貫通キメラレセプターをコードする遺伝子構築物を提供する。

【0017】

本発明の遺伝子構築物は、DNA分子もしくはRNA分子を含み得る。上記構築物は、（例えば、ヒトの）CD64の実質的にEC3エキソン、もしくはさらに（ヒト）CD64の実質的にEC1およびEC2エキソンを含み得る。あるいは、本発明の遺伝子構築物は、実質的にCD64のエクトドメインを含むエクトドメインへと翻訳されるRNAを含む。ある特徴において、上記エクトドメインは、CD64中のエキソンもしくはドメインの境界に基づいて選択される。好ましくは、上記エクトドメインは、ヒトCD16のV158改変体よりも高いFc親和性を有する。別の特徴において、上記膜貫通キメラレセプターは、融合タンパク質として発現される。また、上記エンドドメインは、CD3ζの、CD28の、CD134の、CD137の、CD27の、CD79aの、CD79bの、CD40の、およびGM-CSFレセプターの細胞内ドメインの一部もしくはすべてからなる群より選択され得る増幅モジュールを含み得る。

10

【0018】

さらなる実施形態において、本発明は、上記の遺伝子構築物から翻訳される膜貫通キメラレセプターを提供する。1つの特徴において、本発明のレセプターのエクトドメインは、CD16には存在しないCD64のエクトドメインにおける実質的に免疫グロブリン様折りたたみ、またはCD64の実質的にエクトドメインを含む。1つの特徴として、上記膜貫通ドメインは、CD16の実質的に膜貫通ドメインを含む。上記レセプターは、宿主免疫エフェクター細胞の生存および増殖を増強するADCC増幅モジュールをさらに含み得る。上記増幅モジュールは、CD3ζの、CD28の、CD134の、CD137の、CD27の、CD79aの、CD79bの、CD40のおよびGM-CSFレセプターの細胞内ドメインの一部もしくは全てからなる群より選択され得る。

20

【0019】

別の実施形態において、本発明は、本発明の遺伝子構築物もしくはタンパク質をエキソピボで感染させたかもしくはトランスフェクトした免疫エフェクター細胞を提供する。上記免疫エフェクター細胞は、例えば、細胞傷害性Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、好酸球、マクロファージ、好中球、好塩基球、単球、B細胞、および細胞傷害性因子を発現するもしくは発現するように操作されている他の細胞であり得る。

30

【0020】

さらに別の実施形態において、本発明は、本発明の遺伝子構築物、タンパク質、もしくは免疫エフェクター細胞、および薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0021】

さらなる実施形態において、本発明は、処置の必要性のある被験体を、ある状態について治療的もしくは予防的に処置する方法を提供し、ここでこの方法は、上記被験体に、治療上もしくは予防上有効な量の本発明の薬学的組成物を投与する工程を包含する。1つの特徴において、上記方法は、上記状態を示す少なくとも1種の細胞表面抗原に対する治療用抗体を投与する工程をさらに包含する。上記免疫エフェクター細胞は、上記被験体に対して自己由来であり得、上記状態は、がん、炎症性疾患、自己免疫疾患、移植片拒絶および感染からなる群より選択され得る。1つの特徴において、本発明の薬学的組成物は、上記状態に対するワクチンとして投与される。

40

【0022】

さらに別の実施形態において、本発明は、処置の必要性のある被験体を、ある状態について治療的もしくは予防的に処置する方法を提供し、ここでこの方法は、（a）上記被験体から単離された樹状細胞を抗原の供給源でプライミングする（priming）工程；（b）上記プライミングされた樹状細胞を上記被験体に注入し戻す工程；（c）上記被験体に、治療上もしくは予防上有効な量の本発明の薬学的組成物を投与する工程による。抗

50

原供給源は、自己由来であってもよいし外来のものであってもよく、上記状態は、がん、炎症性疾患、自己免疫疾患、移植片拒絶および感染からなる群より選択され得る。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、本発明に従うキメラ抗体レセプターの実施形態を模式的に示す。上記キメラレセプターは、抗体のFc部分に対して比較的高い親和性を有する細胞外ドメインおよび比較的高い増殖刺激活性を有する細胞内シグナル伝達ドメインを有する。

【0024】

【図2】図2は、CD16およびCD64のタンパク質ドメイン構造を模式的に比較し、ここでCD16およびCD64の細胞外ドメインは、それぞれ2つおよび3つの免疫グロブリン折りたたみからなる。類似の濃淡は、相同な折りたたみを表す。

10

【0025】

【図3】図3は、CD16およびCD64のゲノムエキソンマップを模式的に比較する：分泌シグナル配列は、白であり、細胞外領域は、平行線の陰影を付けてあり、膜貫通および細胞内の領域は、黒である。イントロン領域もエキソン領域も、縮尺を合わせて描かれていない。

【0026】

【図4】図4は、一実施形態に従う本発明のキメラレセプターを生成するためのクローニングストラテジーを模式的に図示する。脇にある文字は、クローニングの間に使用される制限酵素部位を示す：H-HindIII（「H」）、B-BamHI（「B」）、およびB-BglII（「Bg」）。

20

【0027】

【図5】図5は、本発明の一実施形態に従うレセプターをクローニングするために使用される市販のレンチウイルスベクターのマップである。

【0028】

【図6】図6は、本発明に従うレセプターをクローニングするために使用され得る代替のベクター構築物のマップである。

【0029】

【図7】図7は、発現されたベクターが発したGFPシグナルによって測定した場合の、(a)陰性コントロール、(b)空のベクター、(c)CD16Vを発現するベクター、および(d)CD64-16（エキソン）構築物を発現するベクターでトランスフェクトしたExp293細胞のフローサイトメトリー結果を示す。

30

【0030】

【図8】図8は、蛍光タグ化抗CD16（SMPUWおよびCD16V）もしくは抗CD64（エキソン-融合物に基づくCD64-16）が発した蛍光によって測定した場合の(a)陰性コントロール、(b)空のベクター、(c)CD16Vを発現するベクター、および(d)CD64-16（エキソン）構築物を発現するベクターでトランスフェクトしたExp293細胞のフローサイトメトリー結果を示す。

【0031】

【図9】図9は、Exp293細胞を、(a)陰性コントロール、(b)空のベクター、(c)CD16Vを発現するベクター、および(d)CD64-16（エキソン）構築物を発現するベクターでトランスフェクトした後に、蛍光タグ化抗ヒトIgGが発した蛍光によって測定した場合の、リツキシマブ（治療用抗体）で染色したExp293細胞のフローサイトメトリー結果を示す。

40

【0032】

【図10】図10は、ヒトCD64の細胞外領域が、ドメインベースのストラテジーを使用してヒトCD16の領域に融合されている（融合点はダッシュによって印を付けられている）、本発明の実施形態に従うキメラレセプターへと翻訳されるDNA配列（配列番号1）（上）を収載する。その対応するタンパク質配列（配列番号2）は、下に収載する。

【0033】

50

【図 1 1】図 1 1 は、ヒト C D 6 4 の細胞外領域が、エキソンベースのストラテジーを使用してヒト C D 1 6 の領域に融合されている（融合点はダッシュによって印を付けられている）、本発明の実施形態に従うキメラレセプターへと翻訳される D N A 配列（配列番号 3）（上）を収載する。その対応するタンパク質配列（配列番号 4）は、下に収載する。

【0 0 3 4】

【図 1 2】図 1 2 は、その細胞内領域がヒト C D 2 8、ヒト C D 1 3 4、ヒト C D 1 3 7 およびヒト C D 3 2 に由来する増幅モジュールからなる、本発明の一実施形態に従うキメラレセプターの細胞内領域の D N A 配列（配列番号 5）を収載する。その対応するタンパク質配列（配列番号 6）は、下に収載する。スペーサー配列は、小文字で書かれる。

【0 0 3 5】

【図 1 3】図 1 3 は、ヒト C D 6 4 の細胞外領域が、ドメインベースのストラテジーを使用してヒト C D 1 6 の領域へと融合され、図 1 3 に示される増幅モジュールへとさらに融合される、本発明の実施形態に従うキメラレセプターに翻訳される D N A 配列（配列番号 7）（上）を収載する。その対応するタンパク質配列（配列番号 8）は、下に収載する。スペーサー配列は、小文字で書かれる。

【0 0 3 6】

【図 1 4】図 1 4 は、ヒト C D 6 4 の細胞外領域が、エキソンベースのストラテジーを使用してヒト C D 1 6 の領域へと融合され、図 1 3 に示される増幅モジュールへとさらに融合される、本発明の実施形態に従うキメラレセプターへと翻訳される D N A 配列（配列番号 9）（上）を収載する。その対応するタンパク質配列（配列番号 1 0）は、下に収載する。スペーサー配列および変異配列は、小文字で書かれる。

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 7】

（発明の詳細な説明）

（I．定義）

別段示されなければ、技術用語は、従来の使用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、例えば、Benjamin Lewin, Genes VII, Oxford University Press により出版, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (編); The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Publishers により出版, 1994 (ISBN 0632021829); および Robert A. Meyers (編), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, Wiley, John & Sons, Inc. により出版, 1995 (ISBN 0471186341); ならびに他の類似の技術的参考文献に見出され得る。

【0 0 3 8】

本明細書で使用される場合、「a (1つの、ある)」もしくは「an (1つの、ある)」とは、1またはそれより多くを意味し得る。用語「comprising (含む、包含する、含有する)」とともに使用される場合、本明細書で使用されるとおり、用語「a (1つの、ある)」もしくは「an (1つの、ある)」とは、1もしくは1より多くを意味し得る。本明細書で使用される場合、「another (別の、もう1つの)」とは、少なくとも第2のもしくはより多くを意味し得る。さらに、文脈から別段必要とされなければ、単数形の用語は、複数形を包含し、複数形の用語は単数形を包含する。

【0 0 3 9】

本明細書で使用される場合、「約」とは、明示されていようが明示されていまいが、例えば、整数、分数、およびパーセンテージを含めた数値をいう。用語「約」は一般に、当業者がその記載される値と均等である（例えば、同じ機能もしくは結果を有する）とみなすある数値範囲（例えば、記載される値の $\pm 5 \sim 10\%$ ）をいう。いくつかの場合には、用語「約」とは、最も近い有効数字へと四捨五入される数値を含み得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

C D 1 6 は、2つの異なる形態 (C D 1 6 a および C D 1 6 b) として発現され、これらは、2つの異なるが非常に相同性の高い遺伝子の生成物である。C D 1 6 a は、ポリペプチドアンカーがある膜貫通タンパク質である一方で、C D 1 6 b は、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーがあるタンパク質である。本明細書で使用される場合、C D 1 6 は、当業者に明らかであるように、不適切でなければ、上記タンパク質の両方をいう。

【 0 0 4 1 】

本発明の A D C C エンハンサーは、細胞傷害性能力を有する任意の免疫エフェクター (細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) およびヘルパー T 細胞を含めた T 細胞、N K 細胞 (大顆粒リンパ球)、好酸球、マクロファージ、好中球、好塩基球、単球、および B 細胞が挙げられるが、これらに限定されない) の中に組み込まれ得る。本発明のエフェクター細胞は、自己由来であっても、同系 (syngeneic) であっても、同種異系 (allogeneic) であってもよく、選択は、処置される予定の疾患および利用可能な手段に依存する。

【 0 0 4 2 】

(I I . 組成物)

本発明は、以下の顕著な特徴のうちの 1 つまたはそれより多くを有する A D C C 増強システムを開発する： (a) 標的細胞の表面に結合した抗体の F c フラグメントに対して改善された親和性を有するキメラレセプターをコードする遺伝物質； (b) 天然に存在するかもしれない治療用の抗体によってタグ化される標的とした罹病細胞と結合すると A D C C エフェクター細胞の増殖および生存を増強するタンパク質および / もしくは R N A モジュールをコードする遺伝物質； (c) A D C C 応答の効率を増幅するタンパク質および / もしくは R N A モジュールをコードする遺伝物質。この目的に向けて、このような成分をコードする遺伝子構築物は、A D C C 増強システムとして、インビボもしくはエキソビボのいずれかで、宿主 (例えば、患者被験体) の細胞の中へと導入される：

【 0 0 4 3 】

A D C C を活性化し、エフェクター増殖をもたらす膜貫通および細胞内ドメインに融合された高親和性の F c 結合エクトドメインを含むキメラレセプター (図 1) 。

【 0 0 4 4 】

(1) キメラレセプター

上記エフェクターに依存して、上記キメラレセプターは、上記エフェクターの天然の構成要素の部分、例えば、天然のレセプターのエクトドメイン、膜貫通ドメインおよび / もしくは細胞内ドメインの一部もしくは全てを含み得る。本発明によって企図される宿主は、高等脊椎動物、好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトである。本発明のキメラレセプターは、細胞外ドメイン (エクトドメイン)、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメイン (細胞質ドメインもしくはエンドドメイン) を含む。

【 0 0 4 5 】

(1) (a) エクトドメイン

図 1 を参照すると、一実施形態 (左側) において、本発明のキメラレセプターは、C D 6 4 (F c γ R I) のエクトドメインの一部もしくは全てを組み込む。C D 6 4 および C D 1 6 の両方が、抗体の F c 領域に結合する一方で、前者は、約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 倍高い親和性を有する。高親和性 F c レセプターである F c γ R I (C D 6 4) (K d は I g G 1 および I g G 3 に関して約 10^{-9} M) は、単核ファゴサイト系統 (例えば、マクロファージおよび好中球) の全ての細胞に存在し、抗体媒介性ファゴサイトーシスおよびメディエーター放出を担う。図 2 に示されるように、F c γ R I は、細胞外ドメインが抗体への結合を担う 3 つの免疫グロブリンドメインから構成される糖タンパク質 α 鎖を含み、3 つ全ての存在が抗体との高親和性相互作用に重要であることが示された。対照的に、C D 1 6 のエクトドメインは、2 個の免疫グロブリン様ドメインを有するのみである。C D 6 4 における余分の免疫グロブリン様折りたたみの存在は、その高い F c 親和性の強力な決定因子であり得る。その程度まで、本発明はまた、抗体に対する高親和性レセプターを構

10

20

30

40

50

築するために、CD64におけるこの余分の免疫グロブリン様折りたたみもしくはその変異バージョンのみを、CD16のエクトドメインの中に挿入することを企図する。

【0046】

本発明の実施形態によれば、CD64 (FcγRI) のエクトドメインは、ADCCを媒介する高親和性Fcレセプターを生成するために、任意の適切な膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインへと融合される。好ましい実施形態において、ヒトCD64 (FcγRI) のエクトドメインは、ヒトCD16 (FcγRIII) の一部、例えば、CD16の、好ましくは、CD16a (FcγRIIIa) の、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインの両方に融合される。有利なことには、上記エクトドメインが身体に対して天然である場合、この実施形態におけるキメラレセプターは、同系のものであり、それゆえ、非免疫原性である。

10

【0047】

図1に示されるように、本発明のキメラレセプターの細胞内ドメイン中には、さらなるモジュールがあり得る。これは、増殖および増幅 (expansion) シグナルを増幅し得る1もしくはそれより多くのモジュール (例えば、CD28)、上記エフェクター細胞の生存を促進しかつ活性化誘導性アポトーシスを防止する1もしくはそれより多くのモジュール (例えば、CD134およびCD137)、増殖および細胞傷害性に関するシグナル伝達を活性化もしくはブーストする1もしくはそれより多くのモジュール (例えば、CD3ζ) を含み得る。これら増幅モジュールおよび刺激モジュールの詳細は、以下の節にさらに記載される。

20

【0048】

(1)(b) 膜貫通ドメイン

本発明のキメラレセプターの膜貫通ドメインは、(好ましくは安定した様式で) 細胞膜にまたがり得る任意の適切な疎水性領域であり得る。好ましい実施形態において、上記膜貫通ドメインは、上記細胞内ドメインのその隣接する成分に対して天然である。例えば、図1に示されるように、膜に最も近い細胞内ドメインの成分もしくは領域がCD16に由来する実施形態において、上記膜貫通ドメインは、好ましくは、CD16の膜貫通ドメインである。

【0049】

(1)(c) エンドドメイン

30

(1)(c)(i) ADCCのシグナル伝達

再び図1を参照すると、本発明の種々の実施形態において、上記キメラレセプターは、ADCCに関する1もしくはそれより多くのシグナル伝達モジュールを含む。CD16は、我々の身体においてADCC活性の大部分を担うエフェクター細胞 (特にNK細胞) を活性化する天然の抗体レセプターである。よって、種々の実施形態において、本発明のキメラレセプターのエンドドメインは、CD16 (好ましくは、CD16a) の細胞内ドメインの一部もしくは全体を含む。CD16aと類似のITAMドメインを共有する、CD3ζのような他のモジュールもまた、ADCCシグナル伝達に寄与するように含まれ得る。いくつかの実施形態において、CD3ζは、上記CD16a細胞内ドメインが、他の共刺激分子もしくはエレメントとタンデムに発現される限りにおいて、ADCCシグナル伝達に必要とされなくてもよい。逆に言えば、CD3ζのようなモジュールは、CD16の細胞内ドメインの機能を置換し得、それを不要にし得る。

40

【0050】

(1)(c)(ii) 増幅モジュール

図1に示されるように、本発明のキメラレセプターは、ADCC応答を増幅するためのエレメントを含み得る。エフェクター細胞に依存して、1もしくはそれより多くの増幅モジュールが上記キメラレセプターの中に含まれ得、種々の機能を提供する。以下のモジュールは、非限定的な例としてかつ例証目的で記載される。

【0051】

一実施形態において、本発明のキメラレセプターのエンドドメインは、CD3ζの細胞

50

内ドメインの一部もしくは全体を含む。T細胞表面に対して天然のマーカであるCD3は、リンパ球（例えば、T細胞）活性化および増殖に対する刺激効果を有し、大いに増幅された細胞傷害性T細胞応答をもたらすことが示された。

【0052】

種々の実施形態において、1もしくはそれより多くのさらなる共刺激モジュールは、活性化効果が有意により長い時間にわたって持続し、それによって、増殖および増幅の潜在能力を増大するように、本発明のキメラレセプターに付加される。一例は、CD28のシグナル伝達ドメインであり、これは、抗原依存性レセプターにおいてTCR ζ ドメインとともに発現される場合に、Tリンパ球の生存および増殖を増強することが示されている（Krause et al., J. Exp. Med. 188: 619-26, 1998）。本発明のキメラレセプターへと組みこまれ得る他の選択肢モジュールとしては、活性化誘導性アポトーシスを防止することによってエフェクター細胞の生存をブーストすることに関する腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバー（例えば、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD27）の細胞内ドメイン（例えば、Finney et al., J. Immunol., 2004, 172: 104-13を参照のこと）が挙げられる。いくつかのもしくは複数の細胞タイプにおいて増殖を補助し得る他の細胞内ドメインは、CD79a、CD79b、CD40、およびGM-CSFレセプターに見出される。

10

【0053】

（2）細胞発現

20

標準的組み換え技術を使用して、上記キメラレセプターの発現カセットのうちの1もしくはそれより多く以上が構築され、ベクター、例えば、プラスミド、アデノウイルス由来ベクター、レトロウイルス、もしくはレンチウイルスのベクターへとクローニングされる。上記ベクターは、免疫エフェクター細胞の任意のタイプへとトランスフェクトされる（またはウイルス媒介性遺伝子組み込みの場合には形質導入される）。レトロウイルス形質導入は、公知の技術（例えば、Johnson et al. (Blood 114, 535-46, 2009)のもの）を使用して行われ得る。上記キメラレセプターの成功したトランスフェクションおよび表面呈示は、従来の手段を使用して、例えば、フローサイトメトリーによって確認される。

30

【0054】

一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、ヒト患者由来の全血から末梢血単核細胞（PBMC）として抽出され、これは、リンパ球（CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、B細胞およびNK細胞）、単球、マクロファージなどを含む。必要に応じて、エフェクター細胞は、本発明を実施するために、PBMCの選択された部分セットを富化することによってさらに調製される。特定の実施形態において、B細胞は、細胞混合物から取り出される。

【0055】

形質導入した細胞が抗体を結合する能力は、フローサイトメトリーを使用して明らかにされる。細胞が抗体被覆細胞を結合し、サイトカインを放出し、ADCCを果たし、そして増殖する能力は、当業者に周知の標準的なアッセイおよびモデル（例えば、マウス異種移植片モデル）を使用して、エキソピボおよびインピボで試験および確認される。

40

【0056】

（III．治療剤およびワクチン）

がんに関するADCCエンハンサーの臨床的關係は、治療用抗体とともにヒトがん細胞を使用して明らかにされ得る。例えば、Dauid細胞は、（1）リンパ腫、自己免疫疾患および移植片拒絶に関わるCD20を標的とし、エフェクター細胞活性化、脱顆粒および増殖を生じるリツキシマブ（商用名リツキサン（登録商標））、ならびに（2）ADCCエンハンサーで形質導入された免疫エフェクター細胞で処理される。標的細胞殺傷もまた、観察される。インピボ試験は、非常に少ないT細胞およびB細胞を有しかつNK細胞を有さない市販のNOD.scid.IL2Ry $^{-/-}$ マウスを使用して行われる。ある

50

いは、非常に低いT細胞およびB細胞を有し、低下したNK細胞を有するNOD・Scidマウスが、使用される。これらマウスは、標識されたDauid細胞が移植され、任意の適切な画像化技術を使用して腫瘍増殖が観察および測定される。リツキシマブおよびADCCエンハンサーで形質導入された免疫エフェクター細胞を受容するマウスにおいて、継続した期間の腫瘍寛解、退縮、もしくは長期にわたって進行しないことが観察される。

【0057】

別の例では、SK-BR-3細胞もしくはMCF-7細胞は、(1)ADCCエンハンサーで形質導入された免疫エフェクター細胞、ならびに(2)乳がんに関わるHER2/neuを標的とし、エフェクター細胞活性化、脱顆粒および増殖を生じるトラスツズマブ(商用名ハーセプチン(登録商標))で処理される。標的細胞殺傷もまた、観察される。上記ADCCエンハンサーのインビボ抗腫瘍有効性は、直ぐ上に記載される例に類似のマウスモデルで観察される。

10

【0058】

自己免疫における上記ADCCエンハンサーの臨床上的使用は、この種の疾患に関して十分確立されたマウスモデルのうちの1つを使用して明らかにされ得る。例えば、抗体媒介性B細胞枯渇は、NODマウスにおいて1型糖尿病を防止およびさらには逆転させることが示された。しかし、この効果は、Fcレセプターの低親和性によって制限される(Huet al. J Clin Invest. 2007, 117(12):3857-67; Xiu et al. J Immunol. 2008, 180(5):2863-75)。コントロールマウスは、抗CD19抗体もしくは抗CD20抗体のいずれかのみ、または本発明のADCCエンハンサーで形質導入されたかもしくは別の方法でこれを発現するマウス免疫エフェクター細胞と組み合わせて受容するマウスと比較される。上記ADCCエンハンサーを受容するマウスは、疾患の発現の遅延または症状の継続した逆転を示す。

20

【0059】

類似の実験は、抗体媒介性枯渇が、多発性硬化症もしくは実験的自己免疫性脳脊髄炎(Barr et al. J Exp Med. 2012, 209(5):1001-10)、関節炎(Yanaba et al. J Immunol. 2007, 179(2):1369-80)などのような疾患に影響を及ぼすことが示された他のマウスモデルにおいて行われ得る。

30

【0060】

ウイルス感染(例えば、HIV感染)における上記ADCCエンハンサーの臨床上的使用は、抗体の組み合わせでの処置がHIV複製をコントロールすることが示された(Nature, 2012, 492(7427):118-22)十分に確立されたヒト化マウスモデルを使用して明らかにされ得る。ヒト化マウスは、NOD・RAG1^{-/-}・IL2Rγ^{-/-}マウスをヒト胎児肝臓由来CD34⁺造血幹細胞で再構成することによってまず生成される。これらマウスは、完全にヒトの免疫系を有し、HIVによって感染され得、ヒト抗体に対して負に(negatively)反応しない。感染したコントロールマウスは、中和抗体カクテル単独もしくは本発明のADCCエンハンサーで形質導入されたヒト免疫エフェクター細胞との組み合わせのいずれかを受容するマウスと比較される。上記ADCCエンハンサーを受容するマウスは、ウイルス血症の継続した低減およびT細胞数の回復を示す。

40

【0061】

上記ADCCエンハンサーの臨床効力を試験するための代替のモデルシステムは、中和抗体が疾患の急激な発症を防止することが示されたサル・ヒト免疫不全ウイルス(SHIV)感染アカゲザル幼獣モデルである(Jaworski et al. J Virol. 2013, 87(19):10447-59)。感染したコントロールアカゲザルは、中和抗体カクテル単独もしくは本発明のADCCエンハンサーで形質導入された免疫エフェクター細胞との組み合わせのいずれかを受容するアカゲザルと比較される。上記ADCCエンハンサーを受容するアカゲザルは同様に、ウイルス血症の継続した低減お

50

よび T 細胞数の回復を示す。

【 0 0 6 2 】

本発明の A D C C 増強システムをコードする D N A 構築物および R N A 構築物は、当業者に公知の技術を使用して被験体への投与のために製剤化され得る。上記 A D C C 増強システムをコードする D N A 構築物および R N A 構築物を含む製剤は、薬学的に受容可能な賦形剤を含み得る。上記製剤に含まれる賦形剤は、例えば、使用される遺伝子構築物もしくはエフェクター細胞の種類、および投与様式に依存して種々の目的を有する。一般に使用される賦形剤の例としては、食塩水、緩衝化食塩水、デキストロース、注射用水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせ、安定化剤、可溶化剤および界面活性剤、バッファーおよび保存剤、等張化剤 (tonicity agent)、増量剤、ならびに滑沢剤が挙げられるが、これらに限定されない。上記 A D C C エンハンサーを発現する免疫エフェクター細胞の集団は、代表的には、エキソピボで調製され培養される。

10

【 0 0 6 3 】

本発明の一方法の実施形態において、被験体由来の全血から抽出される免疫エフェクター細胞は、まず、エキソピボで本発明の A D C C エンハンサーをコードする組換えレンチウイルス (もしくは任意の他の遺伝子治療ベクター、例えば、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、A A V など) に感染させられる。上記感染した P B M C 細胞は、次いで、トランスフェクションが成功したことを確認した後に、その同じ患者被験体に注入し戻される。上記患者被験体へと輸注された免疫エフェクター細胞は、次いで、抗体で被覆された腫瘍細胞を含めた罹病細胞を見つけ出して破壊するようになる。この方法の実施形態を実施するために、本発明は、医師によって使用される予定の、本発明の製剤化された遺伝子構築物、および必要に応じて、P B M C 細胞を調製するための薬剤、ならびに説明書を含むキットを提供する。この方法の改変された実施形態は、P B M C に由来する細胞の部分セットを感染させるかもしくはトランスフェクトする工程を包含する。これは、上記 P B M C を、特定の細胞タイプの増殖を優先的に支援する条件下で培養することによって、あるいは蛍光活性化セルソーティングもしくは磁性活性化セルソーティング、または両方の組み合わせのような陽性選択技術もしくは陰性選択技術を通じて細胞を選択することによって、達成され得る。本発明の代替の方法の実施形態は、標準的なトランスフェクション技術を使用する、P B M C もしくは精製された細胞サブセットへと上記レセプターに関する D N A 構築物もしくは R N A のトランスフェクションである。

20

30

【 0 0 6 4 】

本発明の別の実施形態において、上記製剤は、リボソームもしくはナノ粒子ベースの技術によって送達される、上記 A D C C エンハンサーをコードする遺伝子構築物を含み、そして当業者に公知の様式および技術を使用して、被験体に投与され得る。例示的な様式としては、静脈内注射が挙げられるが、これらに限定されない。他の様式としては、腫瘍内、皮内、皮下 (s . c . 、 s . q . 、 s u b - Q 、 H y p o) 、筋肉内 (i . m .) 、腹腔内 (i . p .) 、動脈内、髄内 (i n t r a m e d u l l a r y) 、心内、関節内 (関節)、滑液嚢内 (関節液領域)、頭蓋内、脊髄内 (i n t r a s p i n a l) 、および髄腔内 (i n t r a t h e c a l) (脳脊髄液) が挙げられるが、これらに限定されない。上記製剤の非経口注射もしくは注入のために有用な任意の公知のデバイスは、このような投与をもたらすために使用され得る。

40

【 0 0 6 5 】

被験体に投与される上記 A D C C エンハンサーをコードする遺伝子構築物を含む製剤は、特定の適応症もしくは疾患の処置および / もしくは予防に有効である多くの遺伝子構築物もしくはエフェクター細胞を含む。従って、上記 A D C C エンハンサーをコードする治療上有効な遺伝子構築物は、本発明の方法が実施される場合に被験体に投与される。一般に、約 1×10^4 ~ 約 1×10^{10} の間のエフェクター細胞を含む細胞ベースの製剤が投与される。大部分の場合、上記製剤は、約 1×10^5 ~ 約 1×10^9 の間のエフェクター細胞を含む。しかし、被験体に投与されるエフェクター細胞の数は、がんもしくは疾患の位置、源、正体、程度および重篤度、処置される予定である個体の年齢および状態などに

50

依存して、広い範囲の間で変動する。医師は、使用される予定の適切な投与量を最終的に決定する。

【0066】

本明細書で使用される場合、用語「treat（処置する、処理する）」、「treating（処置する、処理する）」、および「treatment（処置、処理）」は、それらの通常のおよび慣習的な意味を有し、以下のうちの1以上を含む：被験体における疾患（例えば、がん）の症状を、重篤度および／もしくは頻度において、ブロック、改善もしくは低下させること、ならびに／あるいは被験体におけるがん細胞の成長、分裂、拡散もしくは増殖、またはがんの進行（例えば、新たな腫瘍の出現）を阻害すること。処置とは、本発明の方法が実施されなかった被験体と比較して約1%～約100%、ブロック、改善、低減もしくは阻害することを意味する。好ましくは、ブロック、改善、低減もしくは阻害は、本発明の方法が実施されなかった被験体と比較して約100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%もしくは1%である。

10

20

30

【0067】

本発明のADCCエンハンサーを発現する免疫エフェクター細胞の治療剤および予防剤の両方としての臨床有効性は、樹状細胞（DC）の使用を通じて、必要に応じて増強され得る。リンパ系器官において、DCは、Tヘルパー細胞に抗原を提示し、これは次に、CTL、B細胞、マクロファージ、好酸球およびNK細胞を含む免疫エフェクターを調節する。HIV抗原を発現するように操作されたかまたは外来のHIVタンパク質をパルス添加された自己由来DCが、HIVに対してインビトロでCTLをプライミングし得ることが報告された（Wilson et al., J Immunol., 1999, 162:3070-78）。従って、本発明の一実施形態において、DCは、被験体患者からまず単離され、次いで、標的抗原（例えば、ある種の腫瘍関連抗原または被験体患者もしくは外来の供給源に由来し得る疾患の他の表面マーカー）の供給源とともにインキュベートすることを通じてエキソビボでプライミングされる。これらDCは、自己由来CTLおよび／もしくは本発明のADCC増強システムでトランスフェクトされた他のエフェクター細胞によるか、または上記ADCC増強システムをコードするDNA構築物およびRNA構築物を含む製剤による処置の前に、上記患者へと最終的には注入し戻される。これは、DCの助けを借りて、上記ADCCエンハンサーを使用する増強された処置およびワクチンのモデルを提供する。

【0068】

本発明はまた、薬学的に受容可能な賦形剤とともにある量の本発明のADCCエンハンサーをコードする遺伝子構築物で満たされた1もしくはそれより多くの容器を含むキットを提供する。上記キットはまた、使用説明書を含み得る。医薬品もしくは生物学的製品の製造、使用もしくは販売を規制する政府機関によって指定された形態の注意書きがさらに、上記キットと関連づけられ得、この注意書きは、ヒトへの投与のための製造、使用もしくは販売についての上記機関による承認を反映する。

【実施例】

【0069】

IV. 実施例

(1) キメラレセプター

【0070】

本発明の実施形態に従って、上記キメラADCC増強レセプターのエクストドメインを、2つの方法で生成した：

【0071】

(a) ドメイン融合：FcγRI（CD64）およびFcγRIII（CD16）のエクストドメインと膜貫通領域との間の推定されるアミノ酸境界に基づいて、ヒトFcγRIの推定されるエクストドメインを、ヒトFcγRIIIの膜貫通領域および細胞内領域に融合した。融合レセプターにおける得られた領域のDNA配列およびアミノ酸配列（それ

50

ぞれ、配列番号 1 および 2) を、図 1 0 に示す。明らかに、配列番号 1 以外の DNA 配列もまた、配列番号 2 のタンパク質へと翻訳し得、それら DNA 配列はまた、本願全体を通じて、この場合および類似の場合に本発明によって企図される。

【 0 0 7 2 】

(b) エキソンベースの融合体： F c y R I および F c y R I I I におけるエキソン境界に基づいて、ヒト F c y R I の推定されるエクストドメインを、ヒト F c y R I I I の膜貫通領域および細胞内領域に融合した。図 3 に示されるように、両方のタンパク質は、分泌ペプチドをコードする 2 個のエキソン (S 1 および S 2)、続いて、細胞外領域をコードする 3 個のエキソン (C D 6 4) もしくは 2 個のエキソン (C D 1 6) を有する。具体的には、C D 6 4 の S 1 から E C 3 までのエキソンを、C D 1 6 における T M / C エキソンと融合した。融合レセプターにおいて得られた領域の DNA 配列およびアミノ酸配列 (それぞれ、配列番号 3 および 4) を、図 1 1 に示す。

【 0 0 7 3 】

上記キメラレセプターを作製するために、ヒト C D 6 4 および C D 1 6 の c D N A クローンを、O r i g e n e から得た (種々の他の業者からも入手可能) 。隣接プライマーを設計および合成して、上記 c D N A の選択された部分を増幅し、P C R を使用して組換えにより結合させて 1 つのベクターにした。プライマーは、上記融合構築物を生成するためのクローニングおよび種々の市販のベクターへのサブクローニングを容易にする制限部位を含んだ。標準的な制限消化およびライゲーションの手順を、全体を通じて使用した。

【 0 0 7 4 】

ここで図 4 を参照すると、ヒト C D 6 4 のエクストドメインを、ヒト C D 1 6 の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインへといったん融合した後、それらをさらに、種々のヒトタンパク質において見出される種々の増幅モジュール (具体的には、C D 2 8 (a . a . 1 6 2 ~ 2 0 2) 、 C D 1 3 4 (a . a . 2 1 3 ~ 2 4 9) 、 C D 1 3 7 (a . a . 1 8 7 ~ 2 3 2) および C D 3 7 (a . a . 3 1 ~ 1 4 2) (全てのアミノ酸位置は、成熟タンパク質配列に基づく)) に融合した。変異を、以下のとおりアスタリスクによって印を付けたとおりに配列の中に導入した：市販の C D 1 6 c D N A は、復帰した多型を有する。さらに、表面発現を下方調節することが公知の C D 2 8 中のジロイシンモチーフを変異させた。各モジュールを、2 個のスペーサーアミノ酸を導入した - G G A T C T - 配列によって分離した。上記融合レセプターにおいて得られた領域の DNA 配列およびアミノ酸配列 (それぞれ、配列番号 5 および 6) を、図 1 2 に示す。C D 6 4 、 C D 1 6 および上記の 4 個の増幅モジュール (配列番号 7 ~ 1 0) に由来する領域を伴う融合体 / キメラレセプター全体の DNA 配列およびアミノ酸配列を、それぞれ、図 1 3 (ドメイン融合体) および図 1 4 (エキソンベースの融合体) に示す。ヒト C D 1 6 の「高親和性」変異体 (V 1 5 8) を、コントロールとして使用した。

【 0 0 7 5 】

次いで、上記キメラレセプターを、代理マーカーあり (例えば、図 5 に示される p S M P U W - I R E S - G F P) もしくは代理マーカーなし (例えば、図 6 に示される p S M P U W - p u r o) のいずれかで、市販のレンチウイルスベクターへとクローニングした。

【 0 0 7 6 】

p S M P U W - I R E S - G F P (図 5) では、G F P 発現を、キメラレセプターへと内部リボソーム進入部位を通じて連結した。p S M P U W - p u r o ベクター中のビューロマイシンカセットを使用して、安定しかつ成功したクローンを選択できた。しかし、本発明によって企図された治療的使用に関しては、図 6 に × 印で示されているとおり、G F P および P u r o カセットの両方を除去して、ベクターのサイズを最小限にした。レセプター発現は、上記キメラレセプターがエキソンベースの融合を使用して生成された場合のみ G F P 発現と相関し、従って、上記キメラレセプターのそのバージョンを、本明細書において好ましかつデフォルトの実施形態となった。

【 0 0 7 7 】

(2) 細胞発現

【0078】

レンチウイルスベクター (pSMPUW) を、293T細胞もしくはExp293細胞においてトランスフェクトして、フローサイトメトリーによって上記のキメラレセプターの発現を試験した。トランスフェクションを上記の手順に類似の標準的手順で行った。pSMPUW-IRES-GFPの場合には、トランスフェクションの2~3日後に、GFP発現を通じて、トランスフェクションをまず確認した(図7)。次に、本発明のキメラレセプターの発現を、市販の蛍光タグ化抗CD16抗体もしくは抗CD64抗体で上記細胞を染色し、得られた蛍光を測定することによって確認した(図8)。

【0079】

上記レセプターの発現は、IRESエレメントとともにGFP発現に連鎖しているため、レセプター発現を、GFP発現に相関させた。抗体での染色を、代表的には、 10^6 細胞を採取し、5% ウシ胎仔血清(FBS)を含むかもしくは含まないリン酸緩衝化食塩水(PBS)で洗浄することによって達成した。細胞を、30分間4℃でPBS-FBS中、適切な量の抗体の存在下でインキュベートした。細胞を、PBS中で再度洗浄し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0080】

ドメイン融合ストラテジーを使用して作製した上記CD64-CD16キメラレセプターは、上記エキソベースの融合を使用して作製したものより遙かに弱い発現(データは示さず)を示した。

【0081】

上記pSMPUWベクターを、市販のヘルパープラスミドで共トランスフェクトして、レンチウイルス粒子を作製した。トランスフェクションの成功を、GFPおよび/もしくはレセプター発現を分析することによって確認した。

【0082】

(3) 治療剤親和性

【0083】

ヒト抗体の結合に関して上記キメラレセプターの能力を試験するために、細胞を、市販のリツキシマブ(リツキサン)抗体で上記のようにまず「染色」(stain)した。簡潔には、 10^6 細胞を採取し、PBSで洗浄し、30分間4℃において $0.1 \mu\text{g/ml}$ のリツキシマブとともにインキュベートした。細胞を、PBS中で再度洗浄し、蛍光タグ化ヤギ抗ヒトIgG(リツキシマブもしくは任意の他のヒトIgGに結合する抗体)で染色した。

【0084】

本発明者らの試験条件下では、エキソベースの融合ストラテジーで作製した上記CD64-CD16キメラレセプターは、CD16の基準V158バージョンより有意に良好なリツキシマブへの結合を示した(図9)。類似の実験を、他の治療用抗体でも行う。

【0085】

機能性のさらなるレベルは、抗体被覆標的細胞を結合する能力である。試験するために、標的細胞、例えば、Dauidi(パーキットリンバ腫系統)細胞を、細胞追跡試薬、例えば、CellTrace Far Red DDAO-SEでまず蛍光標識する。これは、 5×10^6 細胞を採取し、これらをPBSで洗浄し、次いで、5分間適切な量の試薬とともにインキュベートすることによって、代表的には行われる。その反応を、過剰量のPBS-FBSを添加することによって停止させ、次いで、上記細胞を、PBSで2回洗浄する。次いで、その標識された細胞を、上記のようにリツキシマブで被覆する。リツキシマブは、Dauidi細胞で発現された細胞表面CD20分子に結合する。上記リツキシマブ被覆細胞を、次いで、種々のキメラレセプターを発現する細胞とともに60分間37℃においてインキュベートして、フローサイトメトリーによって測定されるとおりの、それらが異種凝集物(GFP+, CellTrace+)を形成する能力を試験する。GFPのような代理マーカーなしのレンチウイルスベクターを使用する場合、上記キメラレ

10

20

30

40

50

セプターを発現する細胞はまた、適合性の色素（例えば、C F S E）で染色される必要がある。

【0086】

類似の実験は、他の細胞株と適切な標的化抗体とを用いて、例えば、R a j i 細胞もしくは R a m o s 細胞とリツキシマブとを用いて、S K - B R - 3（乳がん）細胞とトラストズマブとを用いて（など）行われ得る。

【0087】

（４）免疫エフェクター細胞

【0088】

レンチウイルス粒子を293T細胞において作製した後、それらを、T細胞におけるレセプターの機能性を試験するために使用し得る。例えば、J u r k a t（急性T細胞白血病）細胞は、初代T細胞についての一般に使用される代理である。上記レセプターの機能性は、293T細胞において上記で記載されるのとはほぼ同じ方法で明らかにされる。J u r k a t細胞を、標準的なスピノキュレーション（s p i n o c u l a t i o n）法を使用して感染させる。代表的には、100μl中の 2×10^5 細胞を、96ウェルプレートにプレートする。適切な量のウイルス上清を、ポリブレン（4μg/ml）とともに添加し、2時間にわたって30℃で、350×gにおいて遠心分離する。細胞を、感染の2日後またはそれより後に分析する。p u r o^R含有レンチウイルスベクターの場合には、ピューロマイシンで上記細胞を選択することによって安定な系統が生成され得る。

【0089】

類似の方法を使用して、抗CD3/CD28での活性化後にナイーブ初代T細胞を感染させる。J u r k a t細胞もしくは293細胞に類似の分析の他に、本発明のレセプターの能力は、活性化、増殖および細胞傷害性の誘導について明らかにされ得る。代表的には、増殖を測定するために、 10^6 の形質導入した細胞を、50 IU/mlのIL-2の存在下で増殖させる。リツキシマブ被覆D a u d i細胞を、1:1の比で異なる日に、この培養物に添加する。上記のように、他の抗体被覆細胞をまた、これら実験において使用し得る。理想的には、上記標的細胞（例えば、D a u d i）を、マイトマイシンCで予備処理して、増殖を停止させる。T細胞増殖を、フローサイトメトリーもしくは他の旧来からの方法（例えば、チミジン組み込み、C F S E希釈など）によって測定する。

【0090】

リソソーム結合膜タンパク質-1（L A M P - 1もしくはCD107a）は、刺激後の溶解顆粒（l y t i c g r a n u l e）のCD8+ T細胞およびNK細胞脱顆粒のマーカーとして記載されてきた。上記の共存培養実験では、CD107a+ T細胞のレベルを、脱顆粒の尺度としてフローサイトメトリーによって分析し得る。

【0091】

細胞傷害性を評価するために、T細胞を、適切な治療用抗体の存在下で、C e l l T r a c e タグ化標的細胞とともに数時間にわたって共存培養する。生きている標的細胞のレセプター形質導入依存性で抗体依存性の枯渇が観察される。これは、ヨウ化プロビジウムもしくは7-A A Dを使用するフローサイトメトリーによって測定され得る。

【0092】

（５）インビボでの抗腫瘍活性

【0093】

抗腫瘍活性は、ジャクソン研究所のN S Gマウスを使用して標準的異種移植片腫瘍モデルによって明らかにされる（S h u l t z e t a l . , N a t R e v I m m u n o l . , 2007 Feb; 7(2): 118-30を参照のこと）。N S Gマウスは、機能的なT細胞、B細胞またはNK細胞を欠いており、重症の免疫不全であり、初代ヒト細胞の生着（e n g r a f t m e n t）に理想的である。他の類似のマウス系統、例えば、N O Gマウスもまた使用され得る。

【0094】

例えば、ルシフェラーゼ発現標的腫瘍細胞を、腹腔内に（i . p . , 0.3×10^6 細胞

10

20

30

40

50

胞 / マウス) 注射する。マウスを、リツキシマブ (150 μ g) およびレセプター形質導入 T 細胞 (10⁷ 細胞) で、数日後に 1000 ~ 2000 IU の IL - 2 で i . p . で処理した。コントロールとして、リツキシマブ、上記レセプターもしくは T 細胞のいずれかを、マウスの部分セットの中で排除する。腫瘍の生着および増殖を、X e n o g e n I V I S システムを使用して測定する。

【0095】

代替の腫瘍モデルは、10⁷ D a u d i 細胞を s . c . 注射することおよびこの処置を i . v . で与えることを含む。腫瘍増殖を、カリパスで直接測定するか、または生存によって判断する。

【0096】

類似の実験を、他の細胞株と抗体との組み合わせ (R a j i 細胞の i . p . 注射、s . c . 注射もしくは i . v . 注射を包含する) で行う。後者では、腫瘍増殖を、生存によって測定する。

【0097】

治療目的に関しては、ピューロマイシンもしくは G F P マーカーを除去して、無関係の遺伝子の発現を最小限にする。

【0098】

別の代替の例は、m R N A を直接エレクトロポレートするかもしくはトランスフェクトすることである。これは、レンチウイルスより安全である。

【0099】

種々の改変およびバリエーションが、本発明の範囲もしくは趣旨から逸脱することなく本発明において行われ得ることは、当業者に明らかである。本発明の他の実施形態は、本明細書を考慮することから、および本明細書で開示される発明の実施から、当業者に明らかである。本明細書および実施例は、例示と見做されるに過ぎず、本発明の真の範囲および趣旨は、以下の特許請求の範囲によって示されることが意図される。

【0100】

本願全体を通じて、種々の刊行物、特許、および / もしくは特許出願が、本発明が属する分野の技術水準をより十分に記載するために参照される。これら刊行物、特許、および / もしくは特許出願の開示は、各個々の刊行物、特許、および / もしくは特許出願が、具体的かつ個々に参考として援用されることが示されるのと同程度に、それらの全体において本明細書に参考として援用される。

10

20

30

【 図 1 】

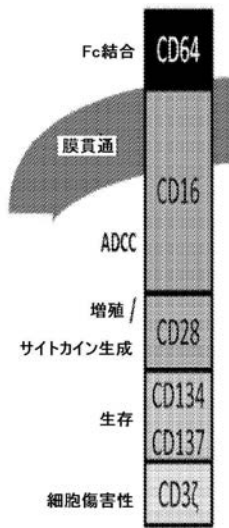


Figure 1

【 図 2 】

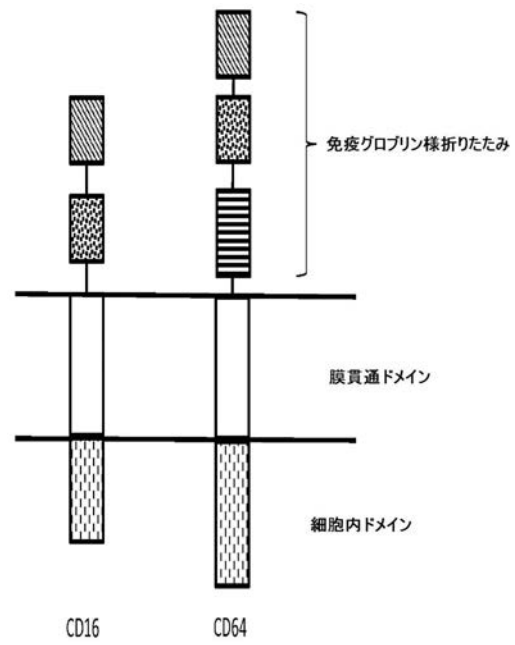


Figure 2

【 図 3 】

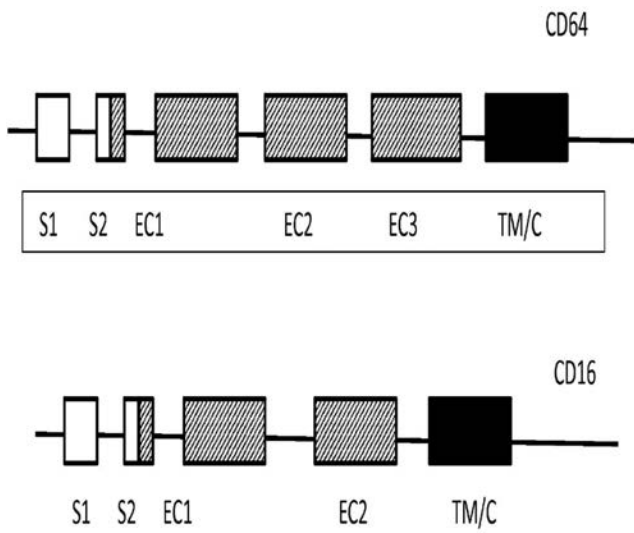


Figure 3

【 図 4 】

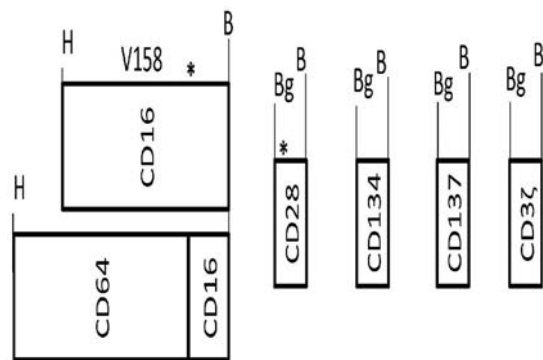


Figure 4

【 図 5 】

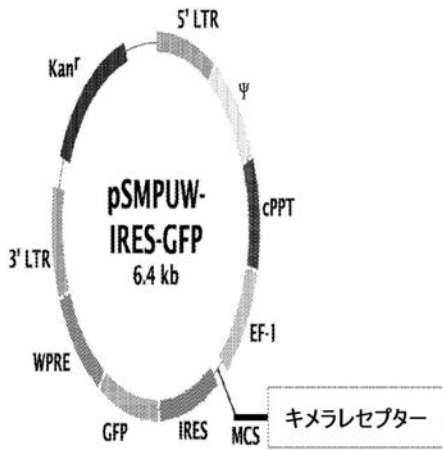


Figure 5

【 図 6 】

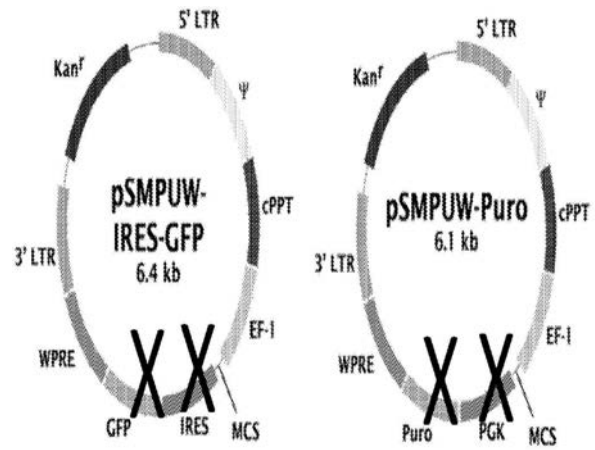


Figure 6

【 図 7 】

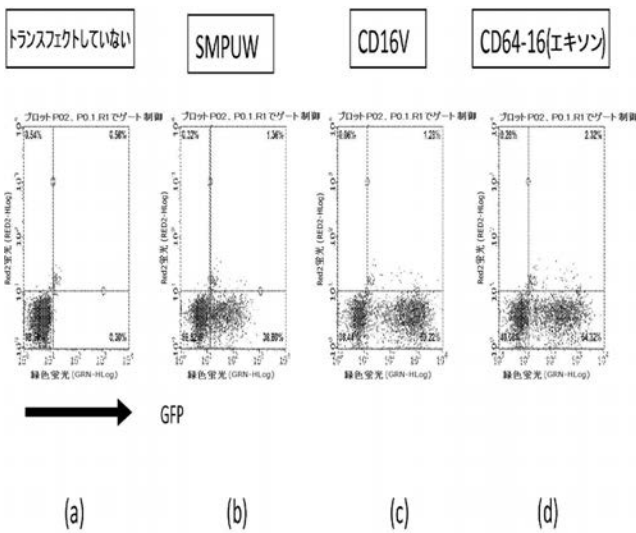


Figure 7

【 図 8 】

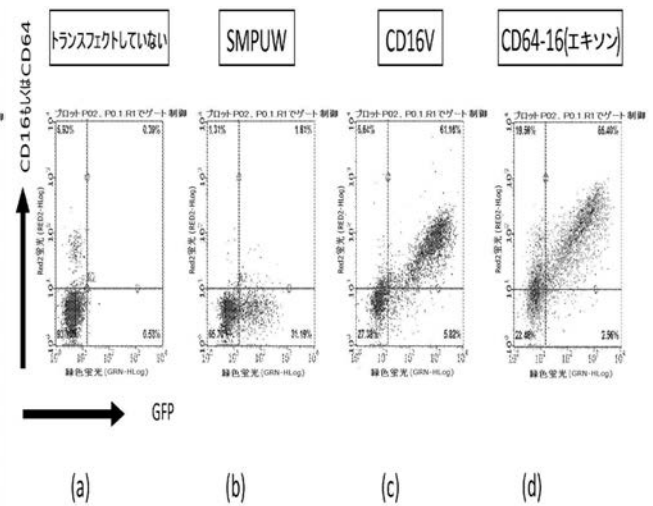


Figure 8

【 図 1 3 】

64-16D-M4G DNA

ATGTGGTCTTGAACACTCTGCTCTTTGGGTCCAGTTGATGGGCAAGTGGACACCAAGGCAAGTGCATCTTGCAGCTTCCATGGGTCA
 GGTGTTCCAGAGGAACCCGTAACCTTCATGTGAGGTGCTCCATCTGCTGGGAGCAGCTCTACACAGTGGTTCTCAATGGCAGGCCAC
 TCAGACCTCGACCCCGACACAGATCACCCTTCCAGTGTCAATGACAGTGGTGAATACAGTGCCAGAGAGGTCTTCAGGGGCGAAGTGA
 CCCCACACAGCTGGAATCCACAGAGGCTGGCTACTCTGAGGTCTCCAGCAGAGTCTTACGGAAGGAGAACCTCTGGCTTGAAGTGTCA
 TGGCTGGGAAGGATAAGCTGGTGTACAACTGTCTTACTATCGAATGGCAAGGCTTTAAGTTTTTCCACTGGAATCTAACCTCACCAITCTGAA
 AACCAACATAAGTCAACATGGCCTACCAATGCTCAGGCATGGGAAAGCATGCTACACATCAGCAGGAATATCTGCACTGTGAAGAGCTAT
 TTCCAGCTCCAGTGTCAATGATCTGTGACATCCCACTCTGGAGGGGAATCTGGTCACTTGTGAAGCAAGTGTCTTGTGACAGAG
 GCTGTGTTTGCAGCTTACTCTCTCTTACATGGGAGCAAGACCTCGGAGGCGAGGAACACATCTCTGAATACCAATACTAAGCTGTAGAA
 GAGAAGACTCTGGGTATATCTGGTGGAGGCTGCCACAGAGGATGGAATGCTTAAAGCGCAGCCCTGAGTTGGAGCTCAAGTGTCTGGCC
 TCCAGTACCAACTCTGTCTGTTTCAATACCAAGTCTCTTCTGCTTGGTGAATGATCTCTTTTGCAGTGGACAGGACATATATTTCTCTGT
 GAAGACAACATTCGAGCTCAACAAGAGACTGGAAAGGACCATAAATTAATGGAGAAAGGACCTCAAGACAAAGggatctAGGAGTAAGAG
 GAGCAGGggCggCAGAGTGAATCATGAACTGACCTCCCGCGCCCGGGCCCAACCGCAAGCATTACCAAGCCTATGCCCCACCAAGCAGC
 TTGCGAGCTATGCTCggatctCGGAGGAGCAGAGGCTGCCCCGATGCCACAGCCCCCTGGGGAGGAGGATTCGCGGACCCCATCC
 AAGAGGAGCAGGCGGACGCCACTCCACCTGGCCAGATCggatctCGTTTCTCTGTTAAACGGGGCAGAAAGAACTCTGTATATATCAAA
 CAACCTTATGAGACAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGTCCGCTTCCAGAGAAGAAGAGGAGGATGTAAGTGGgat
 ctAGAGTGAAGTTGAGCAGGAGCGAGAGCCTCCCGCGTACAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAAGCAGCTCAATCTAGCAGGAAGAGAG
 GAGTACGATGTTTGGACAGAGAGCTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAGAAGGAACCTTCAGGAAGGCTGTAC
 AATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAATGGATGAAGGCGAGCGCGGAGGGGCAAGGGGACATGAGGCTTT
 ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACTACGAGCCTTACATGAGGCGCTGCCCTCGCTAA

64-16D-M4G タンパク質 [585 a.a.]

MIWFLITLLLVVPVQDQVDTTKAVITLQPPWVSFQEEVTLHCEVLHLPSSSTQWFLNGTATQSTPSYRITSASVNDSEYRCQRLSGRSDPIQ
 LEIHRGWLQLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYVLYRNGAKFFHWNINLITKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVL
 NASVTSPLLEGNLVTLSCEKLLQRPGLQLYFSFYMSKTLRGRNTSSEYQILTAARDESGLYWCEAATEDGNVLRSPLELQVLGLQPTPVWFHY
 QVSFCLVMVLLFAVDITGLYFSVKTNRSSRDWQDKHFKWRKDPQDKGSRKSRGSHSDYMNMTPRRPPTKHYQYAPPRDFAAYRSGSRD
 QRLPPDAHKKPPGGGFRTPIQEEQADAHSTLAKIGSRFSVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEGDCSCRFPEEEEGGCELSRVKFSRSDAPAVQ
 QGQNLQYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKQRRKNPQEGLYNELQDKIMAEAYSEIGMKGERRRGKHGDLGYQLSTATKDTYDALHM
 QALPPR

Figure 13

【 図 1 4 】

64-16E-M4G DNA

ATGTGGTCTTGAACACTCTGCTCTTTGGGTCCAGTTGATGGGCAAGTGGACACCAAGGCAAGTGCATCTTGCAGCTTCCATGGGTCA
 GTGTTCAGAGGAACCCGTAACCTTCATGTGAGGTGCTCCATCTGCTGGGAGCAGCTCTACACAGTGGTTCTCAATGGCAGGCCAC
 GACCTCGACCCCGACACAGATCACCCTTCCAGTGTCAATGACAGTGGTGAATACAGTGCCAGAGAGGTCTTCAGGGGCGAAGTGA
 TACAGCTGGAAATCCACAGAGGCTGGCTACTCTGAGGTCTCCAGCAGAGTCTTACGGAAGGAGAACCTCTGGCTTGAAGTGTCAATGCTGG
 AAGGATAAGCTGGTGTACAACTGTCTTACTATGGAATGGCAAGGCTTTAAGTTTTTCCACTGGAATCTAACCTCACCAITCTGAAACCAACAT
 AAGTCAACATGGCACTACCAATGCTCAGGCATGGGAAAGCATGCTACACATCAGCAGGAATATCTGCACTGTGAAGAGCTATTTCCAGCTCC
 AGTGTCAATGATCTGTGACATCCCACTCTGAGGGGAATCTGGTCACTTGTGAGCTGTGAAACAAAGTGTCTTGCAGAGGCTGTGTTGC
 AGCTTACTTCTCTCTACATGGGAGCAGACCTTGGAGGCGAGGAACATCTCTGAATACCAATACTAAGCTGTAGAAGAGAGTCTG
 GGTATACCTGGTGGAGGCTGCCACAGAGATGGAATGCTTAAAGCGCAGCCCTGAGTTGGAGCTCAAGTGTCTGTTTGGCAGTGTCAACC
 ATCTCATCTTCTTCCACTGGGTACCAAGTCTTTCTGCTTGGTGTGATGCTCTTTTTCAGTGGACACAGGACTATATTTCTCTGTGAAGAG
 AACATTCGAAGCTCAACAAGAGACTGGAAGGACCATAAATTAATGGAGAAAGGACCTCAAGACAAAGggatctAGGAGTAAGAGGAGCAGGg
 gCggGACAGTGAATCATGAACTGACTCCCGCGCCCGGGGCCCAACCGCAAGCATTACCAAGCCTATGCCCCACCAAGCAGCAGCCT
 ATCTGCTCggatctCGGAGGAGCAGAGGCTGCCCCGATGCCACAGCCCCCTGGGGAGGAGGATTCGCGGACCCCATCC
 GCGGAGCCCCACTCCACCTTGGCCAGATCggatctCGTTTCTCTGTTAAACGGGGCAGAAAGAACTCTGTATATATCAAAACCACTTATGAG
 ACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGTGGCTGTAGTCCGCTTCCAGAGAAGAAGAGGAGGATGTAAGTGGgatctAGAGTGAAGTTCA
 CGAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACACAGGCGCAGAACAGCTCTATAAGCAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGATGATGTTTGA
 CAAGAGACGTGGCGGGAGCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCTGTACAACTGACAGAAAGATA
 AGATGGCGGAGGCTACAGTGAATGGATGAAGGCGAGCGCGGAGGGGCAAGGGGACAGTGGCTTTACAGGGTCTCAGTACAGCC
 ACCAAGGACACTACGAGCCTTACATGACAGCCTGCCCTCGCTAA

64-16E-M4G タンパク質 [588 a.a.]

MIWFLITLLLVVPVQDQVDTTKAVITLQPPWVSFQEEVTLHCEVLHLPSSSTQWFLNGTATQSTPSYRITSASVNDSEYRCQRLSGRSDPIQ
 LEIHRGWLQLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYVLYRNGAKFFHWNINLITKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVL
 ASVTSPLLEGNLVTLSCEKLLQRPGLQLYFSFYMSKTLRGRNTSSEYQILTAARDESGLYWCEAATEDGNVLRSPLELQVLGLAVSTISSFFPGY
 QVSFCLVMVLLFAVDITGLYFSVKTNRSSRDWQDKHFKWRKDPQDKGSRKSRGSHSDYMNMTPRRPPTKHYQYAPPRDFAAYRSGSRD
 QRLPPDAHKKPPGGGFRTPIQEEQADAHSTLAKIGSRFSVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEGDCSCRFPEEEEGGCELSRVKFSRSDAPAVQ
 QGQNLQYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKQRRKNPQEGLYNELQDKIMAEAYSEIGMKGERRRGKHGDLGYQLSTATKDTYDALHM
 QALPPR

Figure 14

【 配 列 表 】

2017503510000001 . app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/10708

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C12N 5/0783, 15/62; C07K 14/735 (2015.01) CPC - C12N 5/0638, 5/0646; C07K 14/70535 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) IPC(8): C12N 5/07, 5/078, 5/0781, 5/0783, 5/0787, 5/10, 15/62; C07K 14/735, 14/705 (2015.01); CPC: C12N 5/0638, 5/0635, 5/0642, 5/0646, 5/0634, 5/06, 15/62, 15/85; C07K 14/70535, 14/70503, 2319/24; USPC: 435/328, 326, 325 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) Patseer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC); The Lens.org PatSeq; PubMed/NCBI Blast; EBSO; Google; Google Scholar; Google Patents: 'ADCC,' 'Fc,' 'antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,' 'antibody-dependent cellular cytotoxicity,' transmembrane, chimeric, fusion, receptor, protein, ectodomain, extracellular, domain, region, 'CD64,' 'FcgammaRI,' 'FcγRI'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2008/0213216 A1 (SCHREIBER, AD et al.) 04 September 2008; paragraphs [0035], [0039], [0044], [0054], [0055], [0064]	1-2, 4-6, 8-9, 12, 14-17, 20/1-20/2, 20/4-20/6, 20/12, 20/14-20/17 3-5, 7-11, 13, 14, 18, 19, 20/3, 20/4, 20/5, 20/7-20/11, 20/13, 20/18-20/19, 21/20/1-21/20/19, 22/21/20/3, 22/21/20/7, 22/21/20/10, 22/21/20/11, 22/21/20/13, 22/21/20/18, 22/21/20/19, 23/21/20/3, 23/21/20/7, 23/21/20/10, 23/21/20/11, 23/21/20/13, 23/21/20/18, 23/21/20/19
Y	US 2010/0035280 A1 (KAWAI, S) 11 February 2010; paragraph [0020]	1, 2, 6, 12, 15-17, 20/1, 20/2, 20/4-20/6, 20/12, 20/15-20/17
Y	VAN DE WINKEL, JGJ et al. Gene Organization Of The Human High Affinity Receptor For IgG, Fc[gamma]RI (CD64), The Journal Of Biological Chemistry. 15 July 1991. Vol. 266. No. 20; pages 13449-13455; page 13450; figure 1; PMID: 1830050.	4, 5, 20/4, 20/5
Y	WO 2007/041635 A2 (XENCOR, INC.) 12 April 2007; figure 11	8, 9, 14, 20/8, 20/9, 20/14
☒ 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 August 2015 (06.08.2015)		Date of mailing of the international search report 19 AUG 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISAAUS, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/10708

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THIEL, V et al. Multigene RNA Vector Based On Coronavirus Transcription. Journal Of Virology, September 2003, Vol. 77, No. 18, pages 9790-9798; abstract; DOI: 10.1128/JVI.77.18.9790-9798.2003.	3, 7, 20/3, 20/7, 21/20/3, 21/20/7, 22/21/20/3, 22/21/20/7, 23/21/20/3, 23/21/20/7
Y	US 5359046 A (CAPON, DJ et al.) 25 October 1994; column 4, lines 6-28	10, 18, 19, 20/10, 20/18, 20/19, 21/20/10, 21/20/18, 21/20/19, 22/21/20/10, 22/21/20/18, 22/21/20/19, 23/21/20/10, 23/21/20/18, 23/21/20/19
Y	US 2005/0142120 A1 (KELER, T et al.) 30 June 2005; paragraphs [0019], [0025]	21/20/1-21/20/19, 22/21/20/3, 22/21/20/7, 22/21/20/10, 22/21/20/11, 22/21/20/13, 22/21/20/18, 22/21/20/19, 23/21/20/3, 23/21/20/7, 23/21/20/10, 23/21/20/11, 23/21/20/13, 23/21/20/18, 23/21/20/19
Y	ALLEN, JM et al. Nucleotide Sequence Of Three Cdnas For The Human High Affinity Fc Receptor (FcRI). Nucleic Acids Research. 1988, Vol. 16, No. 24; page 11824; PMID: 2974847.	11, 13, 20/11, 20/13, 21/20/11, 21/20/13, 22/21/20/11, 22/21/20/13, 23/21/20/11, 23/21/20/13
Y	PELTZ, GA et al. Human FcγRIII: Cloning, Expression, And Identification Of The Chromosomal Locus Of Two Fc Receptors For IgG. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Immunology. February 1989, Vol. 86, pages 1013-1017; page 1015; figure 3; PMID: 2521732.	11, 13, 20/11, 20/13, 21/20/11, 21/20/13, 22/21/20/11, 22/21/20/13, 23/21/20/11, 23/21/20/13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/10708

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 24, 25
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

-***Please See Supplemental Page-***

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US15/10708

***Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-23 are directed toward a genetic construct that encodes a transmembrane chimeric receptor comprising an ectodomain having a higher binding affinity to the Fc of an antibody than that of human CD 16, a transmembrane domain, and an endodomain for mediating ADCC activation and amplification; and the receptor encoded by said genetic construct.

The genetic construct encoding a transmembrane chimeric receptor will be searched to the extent that the DNA sequence encompasses SEQ ID NO: 1 (artificial DNA sequence), encoding amino acid sequence SEQ ID NO: 2 (artificial amino acid sequence). It is believed that Claims 1-10, 11 (in-part), 12, 13 (in-part) and 14-24 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 1 (artificial DNA sequence) and 2 (artificial amino acid sequence). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected DNA and encoded amino acid sequences. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: SEQ ID NOs: 3 (artificial DNA sequence), 4 (artificial amino acid sequence).

Groups I+ share the technical features including: a genetic construct that encodes a transmembrane chimeric receptor comprising an ectodomain having a higher binding affinity to the Fc of an antibody than that of human CD16, a transmembrane domain, and an endodomain for mediating ADCC activation and amplification; and the receptor so encoded.

However, these shared technical features are previously disclosed by EP 2,309,263 A1 (PLS-DESIGN GMBH) (hereinafter 'PLS-Design') in view of US 2010/0035280 A1 (KAWAI) (hereinafter 'Kawai').

PLS-Design discloses a genetic construct that encodes (recombinant nucleic acids encoding; abstract) a chimeric receptor (a chimeric fusion construct comprising the extracellular portion of an avian high-affinity IgY Fc receptor; paragraph [0018]) comprising an ectodomain (comprising an extracellular portion (comprising an ectodomain); paragraph [0018]) having a higher binding affinity to the Fc of an antibody than that of human CD16 (having a high affinity for Fc (having a higher binding affinity to the Fc of an antibody than that of human CD16); paragraph [0018]); and the receptor so encoded (paragraph [0018]); and full-length receptors comprising a transmembrane domain and endodomain (IgY Fc receptors include a transmembrane domain and a short cytoplasmic tail (full-length receptors comprising a transmembrane domain and endodomain); paragraph [0052]). PLS-Design does not disclose a transmembrane domain and an endodomain for mediating ADCC activation and amplification. Kawai discloses a chimeric antigen receptor comprising an Fc receptor extracellular domain (a chimeric antigen receptor comprising an Fc receptor extracellular domain; abstract), a human Fc-gamma receptor transmembrane domain (a human Fc-gamma receptor transmembrane domain; abstract) and an ectodomain (intracellular domain (ectodomain); abstract) capable of ADCC activation and amplification (capable of ADCC activation and amplification; abstract), for use in developing antibody pharmaceuticals which act by inducing ADCC (for use in developing antibody pharmaceuticals which act by inducing ADCC; paragraph [0002]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of PLS-Design, for integrating the use of transmembrane and ectodomains capable of activating and amplifying ADCC, as previously disclosed by Kawai, for enabling the high-affinity chimeric constructs of PLS-Design to have been utilized for selection and production of antibodies that are useful pharmaceuticals due to their capacity to induce ADCC, as previously disclosed by Kawai.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the PLS-Design and Kawai references, unity of invention is lacking.

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 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 K 35/15	(2015.01)	A 6 1 K	35/15	Z
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K 35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, 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, 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

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 リ, チャン ジェイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02062, ノーウッド, プロビデンス ハイウェイ
333, 1 グローブ ヘルス インスティテュート エルエルシー 気付

(72)発明者 ウニラマン, シアム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02062, ノーウッド, プロビデンス ハイウェイ
333, 1 グローブ ヘルス インスティテュート エルエルシー 気付

F ターム(参考) 4B065 AA90X AB01 BA01 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 BA34 CA26 CA53
DC50 NA14 ZB081 ZB091 ZB111 ZB261 ZB311
4C085 AA03 CC01 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 CA04 CA12 NA14 ZB08 ZB09
ZB11 ZB26 ZB31
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 EA20 FA72 FA74