

(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2016-512199

(P2016-512199A)

(43) 公表日 平成28年4月25日(2016.4.25)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/768 (2015.01)	A 6 1 K 35/768	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/763 (2015.01)	A 6 1 K 35/763	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/765 (2015.01)	A 6 1 K 35/765	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-561627 (P2015-561627)	(71) 出願人	391058060 ベイラー カレッジ オブ メディスン B A Y L O R C O L L E G E O F M E D I C I N E アメリカ合衆国、テキサス 77030, ヒューストン、ワン ベイラー プラザ (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成26年3月5日 (2014.3.5)	(74) 代理人	110000729 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成27年10月30日 (2015.10.30)	(72) 発明者	ソン、シャオートン アメリカ合衆国 テキサス州 77584 、パーランド、10011 ヒドゥン フ ォールズ ドライブ
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/020935		
(87) 國際公開番号	W02014/138314		
(87) 國際公開日	平成26年9月12日 (2014.9.12)		
(31) 優先権主張番号	61/772,803		
(32) 優先日	平成25年3月5日 (2013.3.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍溶解性ウイルス

(57) 【要約】

本開示の実施形態は、たとえば癌の治療のための、腫瘍溶解性ウイルス、たとえばワクシニアウイルスに関し、ウイルスは、T細胞上の細胞分子、たとえばC D 3を認識する活性化ドメイン及び腫瘍抗原、たとえばE p h A 2、H E R 2、G D 2又はG l y p i c a n - 3を認識する抗原認識ドメインを有するエンゲージャー分子をコードする。いくつかの実施形態において、エンゲージャー分子は、たとえばサイトカイン又は副刺激ドメインをさらに含む。1つ又は複数の組成物を使用した癌の治疗方法は本開示に包含される。

【選択図】図 1

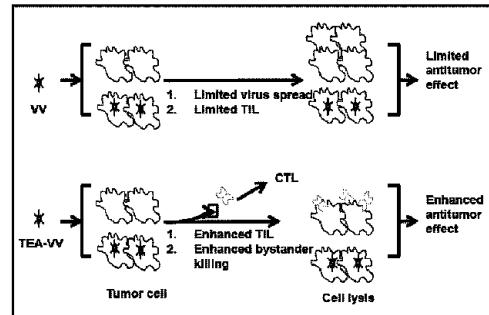


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞表面分子に特異的な単鎖可変フラグメント (scFv) と、腫瘍抗原に特異的な scFv を含む二部分分子 (bipartite molecule) をコードする、腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 2】

前記細胞表面分子がエフェクター細胞上にある、請求項 1 記載のウイルス。

【請求項 3】

前記エフェクター細胞がTリンパ球である、請求項 2 記載のウイルス。

【請求項 4】

前記腫瘍抗原が、EphA2、HER2、及びGD2からなる群から選択される、請求項 1 記載のウイルス。 10

【請求項 5】

前記細胞表面分子が、CD3、CD4、CD5、CD8、CD16、CD28、CD40、CD134、CD137、及びNKG2Dからなる群から選択される、請求項 1 記載のウイルス。

【請求項 6】

前記細胞表面分子がCD3である、請求項 1 記載のウイルス。

【請求項 7】

前記腫瘍溶解性ウイルスが、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス1型 (HSV1)、粘液腫ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、水痘性口内炎ウイルス (VSV)、麻疹ウイルス (MV)、又はニューカッスル病ウイルス (NDV) である、請求項 1 記載のウイルス。 20

【請求項 8】

治療有効量の請求項 1 記載のウイルスを個体に送達する工程を含む、癌のための個体の治療方法。

【請求項 9】

前記ウイルスの量が、 $10^5 \sim 10^{13}$ pfu のウイルスを含む、請求項 8 記載の方法。 30

【請求項 10】

追加の癌治療を前記個体に送達する工程をさらに含む、請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

前記追加の癌治療が、手術、放射線、化学療法、免疫療法、ホルモン療法、又はそれらの組合せである、請求項 10 記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本願は、2013年3月5日に出願された米国仮特許出願番号第61/772,803号の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示の分野は、少なくとも免疫学、ウイルス学、細胞生物学、分子生物学、及び癌医学を含む医学を含む。

【背景技術】**【0003】**

いくつかの悪性腫瘍の治癒率は有意に改善した一方で、進行固形腫瘍に罹患した患者の予後は、過去数十年間にわたりまったく変わらず、新規治療法の必要性を強調している。腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、その安全性に加えて、腫瘍細胞に感染し、そこで複製し、それを溶解させるその能力ゆえに、現在の固形腫瘍治療の選択肢に加えられる有用な選択肢である。臨床研究によれば、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内又は静脈内注射が安全であり、腫瘍溶解を誘導しうることが示されたとはいえ、腫瘍溶解性ワクシニア 40

ウイルスの抗腫瘍効果は最適には及ばず、ほとんどの腫瘍が発生し、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス療法のさらなる改善の必要性を強調している。

【発明の概要】

【0004】

本開示は、個体の免疫療法のための方法及び／又は組成物に関する。特定の実施形態において、個体は癌を有する哺乳動物であり、癌治療を必要とする。癌は、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、肝臓癌、結腸癌、胃癌、脾臓癌、皮膚癌、脳腫瘍、血液癌、腎臓癌、甲状腺癌等を含む、任意の種類であってよい。癌は、固体腫瘍であってもよい。特定の場合には、癌は、腫瘍抗原を含む1つ又は複数の腫瘍マーカーを有する。本開示の特定の態様において、1つ又は複数の腫瘍抗原が、少なくともいくつかの癌細胞に存在する可能性があり、1つ又は複数の腫瘍抗原が、免疫療法の標的になる可能性がある。10

【0005】

本開示の特定の実施形態において、免疫療法における使用に好適な組換え腫瘍溶解性ウイルスベクター、たとえばT細胞エンゲージャー強化腫瘍溶解性ウイルス(T cell engager - armed oncolytic viruses)(TEA-OV)に関する方法及び組成物が、本明細書において提供される。本明細書において提供されるTEA-OVは、組換え腫瘍溶解性ウイルスが、腫瘍細胞を直接殺傷することに加えて、同時に腫瘍細胞を殺傷するためにウイルスを感染させた腫瘍の近傍内でT細胞を刺激する点において、単独の腫瘍溶解性ウイルス及び単独のT細胞を超える利点を提供する。特定の実施形態において、ベクターは、腫瘍内注射されるか、又は静脈内注射されるが、他の送達手段も本開示に包含される。いくつかの実施形態において、ベクターは、二重特異性活性を含み、特定の実施形態において、それは活性化ドメイン及び抗原認識ドメインの存在に関する。特定の態様において、腫瘍溶解性ウイルスベクターは、TEA-VVと呼ばれるT細胞エンゲージャー強化ワクシニアウイルスである。20

【0006】

第1の態様において、組換え腫瘍溶解性ウイルス、たとえば腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、たとえば二重特異性T細胞エンゲージャーポリペプチド、たとえばEphA2、HER2、GD2又はGlypican-3を標的にするエンゲージャーをコードする核酸の発現を導くプロモーターを有する発現領域を含むよう組み換えたものが本明細書において提供される。特定の実施形態において、二重特異性T細胞エンゲージャーポリペプチドは、活性化ドメイン及び抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態において、活性化ドメインは、T細胞受容体ポリペプチドの受容体又はリガンド、たとえばT細胞を活性化するためにCD3に結合するポリペプチドである。いくつかの実施形態において、抗原認識ドメインは、標的細胞、たとえば癌細胞上の細胞表面タンパク質の受容体又はリガンドである。より具体的な実施形態において、活性化ドメイン及び／又は抗原認識ドメインの一方又は両方が、抗体、たとえば单鎖抗体、たとえば单鎖可変フラグメント(scfv)である。特定の実施形態において、抗原認識ドメインは標的細胞上に存在する分子に結合し、活性化ドメインは最終的には受容標的細胞に対して毒性を有するプロセスを誘発する細胞受容体に結合する。特定の実施形態において、二重特異性は、2つの抗体フラグメント若しくは抗原結合フラグメント又はそれらの誘導体、たとえば单鎖可変フラグメント(scfv)に関する。いくつかの実施形態において、1つのscfvがCD3特異的であるといえ、代替的実施形態において、scfvはTCR複合体の別の構成要素に特異的である。当業者は、TCR複合体が、3つの二量体シグナリングモジュールCD3／、CD3／及びCD3／又は／を有する可変TCR及び鎖の八量体複合体であることを認める。いくつかの場合において、本明細書に開示の組成物は、scfvを有するCD3を標的にするといえ、特異的scfvを有する他のCD3分子、とりわけCD3、又はTCR及び鎖を標的にすることは、本開示に包含される。特定の実施形態において、TCR複合体の一部ではない標的分子(CD27、CD28、CD40、CD134、CD137、及びCD278)が、本開示に包含される。特定の実施形態において、一方のscfvが、Tリンパ球上のCD3分子に特異的であり、他方304050

の s c F v は、選択される特定の腫瘍抗原に特異的である。

【 0 0 0 7 】

いくつかの実施形態において、理論に縛られるわけではないが、T 細胞エンゲージャー強化腫瘍溶解性ウイルス、たとえば T 細胞エンゲージャー強化腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、腫瘍における T 細胞浸潤を促進し、ウイルス発現性 T 細胞エンゲージャーを通じて、ウイルスを感染させていない腫瘍細胞のバイスタンダー殺傷を誘導し、抗腫瘍効果の増強をもたらす。

【 0 0 0 8 】

腫瘍抗原のための特定の s c F v は、特定の腫瘍抗原を含む、たとえばそれを細胞表面上に提示する対応する癌細胞を認識するように選択されるか又は適合させてもよい。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、G l y p i c a n - 3、5 T 4、8 H 9、_v⁶ インテグリン、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、カッパ軽鎖、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 3 / 4、F A P、F A R、F B P、胎児A ch 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、L a m b d a、L e w i s - 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、スルビピン、T A G 7 2、T E M 1、T E M 8、V E G R R 2、癌胎児性抗原、H M W - M A A、V E G F 受容体であり、他の例示的な抗原は、腫瘍の細胞外マトリックス内に存在する抗原、たとえばフィプロネクチン、テネイシンの癌胎児性変異体、又は腫瘍の壊死領域である。

【 0 0 0 9 】

特定の一実施形態において、E p h A 2 を標的にし、E p h A 2 発現腫瘍の溶解を未改变ワクシニアウイルスよりも効率的に誘導する二重特異性 T 細胞エンゲージャー分子をコードするポリヌクレオチドを含む、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが本明細書において提供される。特定の実施形態において、ウイルスベクターは、二重特異性 T 細胞エンゲージャー分子をコードし、C D 7 0、C D 8 0、C D 8 3、C D 8 6、C D 1 3 4 L (O X 4 0 L)、及び C D 1 3 7 L (4 1 B B L) を含む副刺激分子を発現させる 1 つ又は複数のポリヌクレオチドもまたコードする。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、少なくとも 1 つの二量化ドメイン又は少なくとも 1 つの三量化ドメインをコードする。ある構成において、二量化又は三量化ドメインは、ウイルスベクター上に配置されていてよい。特定の実施形態において、二量化又は三量化ドメインをコードする核酸配列は、活性化ドメイン及び抗原認識ドメインをコードする核酸の間に配置される。本開示の特定の例示的な組成物には、たとえば、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列が含まれる。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態において、ワクシニアウイルスは、W y e t h、M o d i f i e d V a c c i n i a . A n k a r a (M V A)、L i s t e r、又はW e s t e r n R e s e r v e (W R) 株であってもよい。プロモーターは、ワクシニアウイルスプロモーター、合成プロモーター、少なくとも感染初期中に転写を導くプロモーター、又は少なくとも感染後期中に転写を導くプロモーターであってもよい。

【 0 0 1 1 】

本開示の例示的な T E A - V V は、機能的二重特異性エンゲージャー分子をインビトロ及びインビボで発現し、未改变ワクシニアウイルスと比較して類似のウイルス / 複製 / 肿瘍溶解効果を示し、未改变ワクシニアウイルスと比較してヒト T 細胞の存在下で腫瘍殺傷をより効果的に誘導し、且つ / 又はウイルスに感染していない細胞のバイスタンダー殺傷を効果的に誘導し、その組成物はまた、腫瘍進行をインビボで阻害する。単に実証的な例として、A 5 4 9 ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞が、本開示の方法で殺傷される。

10

20

30

40

50

【0012】

別の一実施形態において、癌治療のための二重特異性T細胞エンゲージャー分子を発現させるために、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス以外の任意のタイプの好適な腫瘍溶解性ウイルスベクターが用いられてもよい。特定の実施形態において、ベクターは、腫瘍溶解性アデノウイルスベクター(AdV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、レオウイルス、粘液腫ウイルス(MYXV)、ポリオウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、麻疹ウイルス(MV)、及びニューカッスル病ウイルス(NDV)等である。いくつかの実施形態において、ウイルスポリヌクレオチドは、活性化ドメイン及び抗原認識ドメインを含む融合分子をコードし、特定の実施形態において、各ドメインはscFvである。活性化ドメインは、抗原認識ドメインに対してポリペプチドのN末端の方に配置されてもよく、又は活性化ドメインは、抗原認識ドメインに対してポリペプチドのC末端の方に配置されてもよい。

10

【0013】

組換え腫瘍溶解性ウイルスは、当技術分野における任意の好適な遺伝子組換え法により生成されてもよい。

【0014】

別の一態様において、個体に治療有効量のTEA-OVを投与する工程を含む、癌を有する個体の治療方法が本明細書において提供され、前記TEA-OVは、前記癌により提示されるTAA又はTSAに結合する抗原認識ドメインを含むT細胞エンゲージャーを発現させる。特定の実施形態において、個体に、組換えT細胞エンゲージャー強化ワクシニアウイルス(TEA-VV)が投与される。特定の実施形態において、TEA-VVは、腫瘍内、血管内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、髄腔内、鼻腔内投与される。

20

【0015】

いくつかの実施形態において、癌のための個体の治療方法であって、細胞表面分子に特異的なscFvと、腫瘍抗原に特異的なscFvとを含む二重特異性分子をコードする腫瘍溶解性ウイルスなどの本開示のウイルスの治療有効量を個体に送達する工程を含む、治療方法が本明細書において提供される。特定の実施形態において、個体に投与されるウイルスの量、たとえば治療有効量は、 $10^5 \sim 10^{13}$ pfuのウイルスを含む。本開示の方法は、追加の癌治療、たとえば手術、放射線、化学療法、免疫療法、ホルモン療法、又はそれらの組合せを個体に送達する工程を含んでいてもよい。本開示の方法は、個体が癌治療を必要とすることを同定する工程を含んでいてもよい。

30

【0016】

一実施形態において、免疫細胞上の標的に結合する活性化ドメイン及び標的細胞によりもたらされる又は標的細胞上に存在する1つ又は複数の分子に結合する抗原認識ドメインを含む分子をコードする核酸配列を含む、遺伝子組換え腫瘍溶解性ウイルスがある。特定の実施形態において、前記活性化ドメイン及び前記抗原認識ドメインは、リンカーにより連結される。いくつかの実施形態において、ウイルスは、1つ又は複数の副刺激分子をコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態において、ウイルスは、二量化ドメインをコードする核酸をさらに含む。特定の実施形態において、ウイルスは、三量化ドメインをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態において、活性化ドメインは、抗体、リガンド、受容体、又はペプチドを含む。いくつかの実施形態において、免疫細胞はT細胞であり、活性化ドメインはCD3を認識する抗体であり、いくつかの実施形態において、免疫細胞はNK細胞であり、活性化ドメインはCD16、NKG2D、又はNKP30を認識する抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は单鎖フラグメント可変(scFv)抗体である。いくつかの実施形態において、抗原認識ドメインは、標的細胞によりもたらされる抗原を認識する抗体である。特定の場合には、抗体はscFv抗体である。いくつかの実施形態において、抗原認識ドメインは、リガンド、ペプチド、又は可溶性TCRである。特定の実施形態において、ウイルスは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、又は配列番号7の配列を含むポリペプチドをコードする。実施形態はまた、ウイルスであって、その抗原が、たとえばEphA2

40

50

、HER2、GD2、Glypican-3、5T4、8H9、_v₆インテグリン、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、ERBB3、ERBB4、FAP、FAR、FBP、胎児AchR、FR、GD3、HLA-A1+MAGE1、IL11R₁、IL13R₂、Kappa、KDR、Lambda、Lewis-Y、MCSP、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、スルピビン、TAG72、TEM1、TEM8、及びVEGRR2からなる群から選択されるものなどの腫瘍抗原であるウイルスを含む。いくつかの実施形態において、免疫細胞上の標的は、CD3、CD16、NKG2D、NKp30、及び不变TCRからなる群から選択される。免疫細胞上の標的は、CD3であってもよい。いくつかの場合において、腫瘍溶解性ウイルスはワクシニアウイルスであるが、いくつかの実施形態において、腫瘍溶解性ウイルスは、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス1型(HSV1)、粘液腫ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、麻疹ウイルス(MV)、又はニューカッスル病ウイルス(NDV)である。特定の実施形態において、1つ又は複数の副刺激分子は、4-1BBL、CD80、CD86、CD83、及びOX40Lからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、二量化ドメインは、IgG1 CH2CH3ドメイン、ロイシンジッパー、ヘリックス-ループ-ヘリックス、アンキリン、又はPASドメインである。特定の実施形態において、三量化ドメインは、ヒトコラーゲンXV型NCI、コラーゲンI型、コラーゲンII型、コラーゲンIII型、コラーゲンIV型、コラーゲンV型、コラーゲンXI型、T4フィブリチンのC末端ドメイン、又はNemo三量化ドメインに由来する。

10

20

30

40

【0017】

本開示の一実施形態において、提供されるのは、治療有効量の本開示のウイルスを個体に送達する工程を含む、癌のための個体の治療方法である。いくつかの実施形態において、ウイルスの量は、10⁵～10¹³pfuのウイルスを含む。いくつかの実施形態において、この方法は、追加の癌治療、たとえば手術、放射線、化学療法、免疫療法、ホルモン療法、又はそれらの組合せを個体に送達する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、この方法は、個体が癌治療を必要とする同定することを同定する工程をさらに含む。

【0018】

上記において、以下の本発明の詳細な説明がよりよく理解されうるように、本発明の特徴及び技術的利点をかなり広く概括した。本発明の追加の特徴及び利点は、本明細書において以下に説明され、これが本発明の請求項の主題を形成する。本開示の発想及び特定の実施形態は、本発明と同じ目的を実施するための他の構造を修正又は設計するための基礎として容易に利用されうることが、当業者により認められものとする。またかかる等価な構造が、添付の特許請求の範囲に記載の本発明の趣旨及び範囲から逸脱しないことも当業者により認められるものとする。本発明を特徴付けると考えられる新規の特徴は、その構成及び操作方法の両方に関して、さらなる目的及び利点とともに添付の図面と併せて検討されたとき、以下の説明によってよりよく理解される。しかしながら、各図面は単に例示及び説明の目的のために提供されたにすぎず、本発明の限定の定義として意図されないことが明示的に理解されるものとする。

【0019】

ここで、本発明をより十分に理解するために、添付の図面と併せて包含される以下の説明を参照する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】TEA-VVについての例示的な原理を示す図である。

【0021】

【図2】EphA2-scFv-CD3-scFv(EphA2-TEA-VV)又はG

50

F P (G F P - V V) をコードする発現力セットの例示的な模式図を提供する図である。

【 0 0 2 2 】

【 図 3 】 F 1 7 R 後期プロモーターの転写制御下での G F P 発現のためにウイルス複製が必要であることを示す図である。

【 0 0 2 3 】

【 図 4 】 E p h A 2 - T E A - V V が、ヒト T 細胞及び腫瘍抗原 E p h A 2 の両方に結合する能力を有する、分泌性二重特異性 E p h A 2 - s c F v - C D 3 - s c F v を発現させたことを示す図である。 A 5 4 9 腫瘍細胞 (6 ウェルプレート中 1×10^6 / 2 m l / ウェル) に、 E p h A 2 - T E A - V V 又は G F P - V V を M O I 5 で感染させた。培養培地を 24 時間のインキュベーション後に回収し、 1×10^6 未刺激 P B M C に添加し、続いて E p h A 2 - F I T C 、 C D 8 - P E 及び C D 4 - A P C で染色した。挿入された数値は、ゲーティングした C D 8 + 又は C D 4 + 細胞からの E p h A 2 陽性細胞集団のパーセンテージである。

【 0 0 2 4 】

【 図 5 A - 5 B 】 E p h A 2 - T E A - V V が、親 V V と比較して、 C V - 1 細胞及び正常ヒト細胞において類似のウイルス複製能を示したことを示す図である。 C V - 1 (A) 及び正常ヒト線維芽細胞 (B) における E p h A 2 - T E A - V V 、 G F P - V V 、及び v S C 2 0 の複製が提示される。細胞は 0 . 1 の M O I で感染させ、 1 、 2 、又は 3 日後、 C V - 1 細胞におけるプラークアッセイによりウイルス価を決定した。

【 0 0 2 5 】

【 図 6 】 E p h A 2 - T E A - V V が、 G F P - V V と比較して、ヒト T 細胞の非存在下で、類似の E p h A 2 + A 5 4 9 腫瘍細胞に対する腫瘍溶解能を示したことを示す図である。 A 5 4 9 腫瘍細胞に、 E p h A 2 - T E A - V V (E p h A 2 - V V) 、又は G F P - V V を、用量を増加させながら (M O I 0 . 0 1 、 0 . 1 、 1 、又は 5) 感染させた。感染後 48 時間での細胞生存率を、 M T S アッセイにより決定した。結果は、 E p h A 2 - T E A - V V 又は G F P - V V が、ヒト T 細胞の非存在下で、類似の A 5 4 9 腫瘍細胞に対する腫瘍溶解活性を示したことを示した。

【 0 0 2 6 】

【 図 7 】 E p h A 2 - T E A - V V が、 G F P - V V と比較して、ヒト T 細胞の存在下で、増強した E p h A 2 + A 5 4 9 腫瘍細胞に対する腫瘍溶解能を示したことを示す図である。 A 5 4 9 腫瘍細胞に、 E p h A 2 - T E A - V V 又は G F P - V V を M O I 0 . 1 で感染させた。ある実験で、ヒト T 細胞を A 5 4 9 細胞と共に培養した (T : A 5 4 9 = 5 : 1) 。感染後様々な時点での細胞生存率を、 M T S アッセイにより決定した。

【 0 0 2 7 】

【 図 8 A - 8 B 】 ヒト T 細胞の存在下での腫瘍溶解性 E p h A 2 - T E A - V V の E p h A 2 + A 5 4 9 腫瘍細胞に対する腫瘍溶解能が、ウイルス用量依存性であることを示す図である。 A 5 4 9 腫瘍細胞に、 E p h A 2 - T E A - V V を用量を増加させながら (M O I 0 . 0 0 1 、 0 . 0 1 、 0 . 1 、又は 1) 感染させた。いくつかの実験において、ヒト T 細胞を A 5 4 9 細胞と共に培養した (T : A 5 4 9 = 5 : 1) 。感染後 24 又は 48 時間での細胞生存率を、 M T S アッセイにより決定した。

【 0 0 2 8 】

【 図 9 A - 9 D 】 E p h A 2 - T E A - V V がヒト T 細胞を活性化させたことを示す図である。 A 5 4 9 細胞に、 E p h A 2 - T E A - V V 又は G F P - V V を M O I 0 . 1 又は 1 で感染させた。感染させた A 5 4 9 細胞いずれかを、ヒト T 細胞の存在下で培養した (T 細胞 : A 5 4 9 比 = 5 : 1) 。 24 、 48 、又は 72 時間後、上清を回収し、 I F N - (A 及び B) 及び I L - 2 (C 及び D) 産生を E L I S A により決定した。

【 0 0 2 9 】

【 図 1 0 】 E p h A 2 - T E A - V V が腫瘍細胞のバイスタンダー殺傷を誘導したことを示す図である。 A 5 4 9 に、 E p h A 2 - T E A - V V 又は G F P - V V を様々な M O I で感染させ、 24 時間後に、上清を回収し、 P B M C 及び A 5 4 9 細胞の共培養アッセイ

10

20

30

40

50

に使用した（PBM C：腫瘍細胞 = 5 : 1）。48時間後、腫瘍細胞殺傷をMTSアッセイにより測定した。

【0030】

【図11】EphA2-TEA-VVが、A549皮下腫瘍モデルにおいて抗腫瘍応答の増強をもたらしたことを示す図である。 2×10^6 個のA549細胞を、 1×10^7 個の未刺激PBM Cと混合し、第0日のSCIDマウスの右側腹部に皮下接種し、直後に 1×10^8 PFUのEphA2-TEA-VV又はGFP-VVを腹腔内注射した。腫瘍サイズを、キャリバーで測定した。

【0031】

【図12】EphA2-TEA-VVが、A549皮下腫瘍モデルにおいて生存率の改善をもたらしたことを示す図である。マウスに腫瘍を接種し、続いて図10に記載のとおりVVを注射した。マウス生存率をモニタリングした（EphA2-TEA-VV n = 8、GFP-VV n = 7）。

10

【0032】

【図13A-13B】EphA2-TEA-VVが、A549静脈内肺癌モデルにおいて抗腫瘍応答の増強をもたらすことを示す図である。 2×10^6 個のA549.eGFP.FFLuc細胞を、第0日のSCIDマウスに静脈内注射し、第7日に、混合された 1×10^7 個の未刺激PBM C及び 1×10^8 PFUのEphA2-TEA-VV又はGFP-VVの単回注射で処置した。腫瘍進行を、インビオ生物発光画像法で追跡した。A. 代表動物の画像を示す。B. 実線は、各マウス群を表す。

20

【0033】

【図14A-14C】HER2-TEが、HER2+A549腫瘍細胞の殺傷を効果的に誘導したことを示す図である。A. レンチウイルスベクターにおけるHER2-scFv-CD3-scFv(HER2-TE)又はGFP(GFP)をコードするレンチウイルス発現力セットの模式図。B. 非感染A549(GFP-、 0.4×10^6 個/ウェル)と混合されたレンチウイルス感染A549(GFP+、 0.6×10^6 個/ウェル)を、未刺激PBM C(1×10^6 個/ウェル)と、24ウェルプレートにおいて2日間共培養した。細胞を回収し、抗CD3抗体で染色し、続いてフロー解析にかけた。C. 細胞集団のパーセンテージを示した。D. GFP発現を顕微鏡下で検査した。

30

【0034】

【図15A-15B】HER2-TEの直列バイscFv(bi-scFv)及びダイアボディの、HER2+A549(GFP+)腫瘍細胞の殺傷を誘導する能力を比較する図である。A. レンチウイルスベクターにおける直列バイscFv HER2-TE又はダイアボディHER2-TEをコードする発現力セットの模式図。B. レンチウイルス感染HER2+A549腫瘍細胞(1×10^6 個/ウェル)を、未刺激PBM C(1×10^6 個/ウェル)と、24ウェルプレートにおいて共培養した。GFP発現を24時間後に顕微鏡下で検査した。

30

【0035】

【図16A-16C】HER2-TEが、GD2+JF及びLAN1腫瘍細胞の殺傷を効果的に誘導したことを示す図である。A. レンチウイルスベクターにおけるGD2-scFv-CD3-scFv(GD2-TE)又はGFP(GFP)をコードする発現力セットの模式図。レンチウイルス感染JF(GFP+)(B)又はLAN1(GFP+)(C)腫瘍細胞(1×10^6 個/ウェル)を、未刺激PBM C(1×10^6 個/ウェル)と、24ウェルプレートにおいて共培養した。GFP発現を顕微鏡下で検査した。

40

【0036】

【図17】肝細胞癌(HCC)のためのHN3-TE及びGC33-TEの構築及び機能を示す図である。A. レトロウイルスベクターにおけるHN3-scFv-CD3-scFv(HN3-TE)又はGC33-scFv-CD3-scFv(GC33-TE)をコードする発現力セットの模式図。B. HuH7又はHepG2腫瘍細胞(5×10^3 /ウェル)を、レトロウイルス感染ヒトPBM Cと、T細胞の腫瘍細胞に対する様々な比で

50

共培養し、腫瘍溶解を標準的なCr放出CTLアッセイにより決定した。

【0037】

【図18】どのようにして三量体又は二量体形態の4-1BBL強化T細胞エンゲージャーが構築されたのかを示す図である。

【0038】

【図19】4-1BBL強化TEA-VVの抗腫瘍効果の増強を示す図である。

【0039】

【図20】副刺激シグナリング4-1BBLが、腫瘍殺傷効果をさらに増強し、T細胞活性化を誘導したことを示す図である。レトロウイルス(GFP、HER2-TE、二量体-41BBL-HER2-TE、又は三量体-41BBL-TE)感染A549腫瘍細胞(GFP+、 1×10^6 /ウェル)を、未刺激PBM Cと共に培養し、48時間後に、GFP発現を顕微鏡下で検査した。
10

【0040】

【図21】IFN及びIL2を使用したサイトカインELISAを示す図である。レトロウイルス(GFP、HER2-TE、二量体-41BBL-HER2-TE、又は三量体-41BBL-TE)感染A549腫瘍細胞(GFP+、 1×10^6 /ウェル)を、未刺激PBM Cと共に培養し、48時間後に、培養培地を回収し、IFN及びIL2のサイトカイン発現をELISAにより検査した。
20

【発明を実施するための形態】

【0041】

長年にわたる特許法の慣習に沿って、請求項を含め本明細書において、「a」及び「an」という用語は、含む(comprising)という用語とともに使用される場合、「1つ又は複数」を意味する。本発明のいくつかの実施形態は、1つ又は複数の本発明の要素、方法工程、及び/又は方法からなっていてもよく、又はそれらから本質的になっていてもよい。本明細書に記載の任意の方法又は組成物は、本明細書に記載の任意の他の方法又は組成物に関して実施できることが考慮されている。
20

【0042】

I. 特定の実施形態

本開示は、進行固形腫瘍を含む癌の治療のための新規腫瘍溶解性ウイルス方略、T細胞エンゲージャー強化腫瘍溶解性ウイルス(TEA-OV)を提供する。腫瘍溶解性ウイルス療法は、前臨床モデル及び臨床研究において、新規癌治療法として有望であることが示してきた。しかしながら、抗腫瘍効果は最適以下であり、ほとんどの腫瘍が再発し、さらなる改善の必要性を強調する。腫瘍溶解性ウイルスの主要な作用機序は、腫瘍細胞の破壊であり、次にそれが腫瘍に対する抗原特異的T細胞応答を誘導し、そのことによりウイルスの局所注射後であったとしても転移性疾患を標的とする。現在のところ、ウイルスは腫瘍を通じて拡散し、抗原特異的T細胞応答の誘導は限定的であり、観察される最適以下の腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍活性を説明する。本開示の実施形態において、腫瘍環境内の常在T細胞を活性化することは、これらの限界を克服する。なぜなら、抗原特異的T細胞が、ワクシニアウイルスに感染していない腫瘍細胞を殺傷できる(バイスタンダー殺傷)からであり、活性化の際にそれらが放出するサイトカインは、内因性腫瘍特異的T細胞応答の誘導を促進する炎症促進性微小環境を生み出す。
30
40

【0043】

腫瘍内のT細胞を活性化させるため、本明細書に記載されているのは、活性化ドメイン及び抗原認識ドメインを含む二重特異性分子であるT細胞エンゲージャーをコードする、T細胞エンゲージャー強化腫瘍溶解性ウイルス(TEA-OV)である。特定の場合には、エンゲージャーは、CD3単鎖可変フラグメント(CD3-scFv)を含む。腫瘍溶解性ワクシニアウイルスをプラットフォームとして使用した例示的な研究において、CD3-scFvは、CD3及び例示的な腫瘍細胞表面抗原EphA2の両方と結合する分泌性二重特異性scFv(EphA2-TEA-VV)として発現した。EphA2-TEA-VVは、対照VVと比較して、VVに感染していない腫瘍細胞のバイスタンダー殺傷
50

を誘導することにより有意に増強された腫瘍溶解活性を示した。したがって、CD3及び腫瘍細胞表面抗原の両方と結合する二重特異性scFvをコードするT細胞エンゲージャー強化腫瘍溶解性ワクシニアウイルス(TEA-VV)は、T細胞の存在下で有意に増強された腫瘍溶解活性を示し、癌治療のためにT細胞と接合する独自の能力を有する新規及び増強腫瘍溶解性ウイルス方略を代表する。

【0044】

本開示の実施形態は、腫瘍溶解性VVをT細胞エンゲージャー(たとえば少なくともCD3-scFvを含むもの)で強化することが、増強された抗腫瘍効果をもたらし、そのことにより、効果的な腫瘍溶解性ウイルス療法の開発及び使用のための新たな道を開くことを示す。TEA-OVは、現在の治療方略では多くの場合不治である進行固形腫瘍を含む癌の治療に有用である。

10

【0045】

I I . エンゲージャー分子及びその適用

いくつかの実施形態において、本明細書において提供される腫瘍溶解性ウイルスベクターは、エンゲージャー分子をコードするポリヌクレオチド、たとえばエンゲージャーポリペプチドを含むよう遺伝子組換えされる。かかるエンゲージャーポリペプチドは、一般に、抗原認識ドメイン及び活性化ドメインを含む。エンゲージャー分子の抗原認識ドメインは、標的細胞上に存在する1つ又は複数の分子と結合するよう設計されてもよく、一方でエンゲージャー分子の活性化ドメインは、エフェクター細胞、たとえばTリンパ球上に存在する分子に結合する。エンゲージャー分子の活性化ドメインがエフェクター細胞に結合すると、活性化ドメインはエフェクター細胞を活性化できる。いくつかの実施形態において、エンゲージャーの活性化ドメインが免疫細胞上の活性化分子に結合し、抗原認識ドメインが標的細胞抗原に結合するとき、免疫細胞は標的細胞を殺傷する。

20

【0046】

エンゲージャーは、二部分(たとえば、任意選択でリンカーにより結合されうる活性化ドメインと抗原認識ドメインとを含む)であってもよく、三部分又は多部分(たとえば、1つ又は複数の活性化ドメイン及び/又は抗原認識ドメイン、又は他のドメイン、たとえば1つ又は複数の副刺激ドメイン及び/又は1つ又は複数の二量化若しくは三量化ドメインを含む)であってもよい。

30

【0047】

いくつかの実施形態において、エンゲージャーはタンパク質、たとえば改変タンパク質である。特定の実施形態において、エンゲージャーの活性化ドメインは、抗体若しくは抗原結合性フラグメント又はそれらの部分、たとえば単鎖可変フラグメント(scFv)であるか、又はそれを含む。他の特定の実施形態において、抗原認識ドメインは、抗体若しくは抗体フラグメント若しくは抗原結合性フラグメント又はそれらの部分、たとえばモノクローナル抗体、Fv、若しくはscFvであるか、又はそれを含み、又はそれは、リガンド、ペプチド、可溶性T細胞受容体、又はそれらの組合せを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、活性化ドメイン及び抗原認識ドメインは、リンカー、たとえばペプチドリンカーにより連結される。

【0048】

エンゲージャー分子の活性化ドメインは、免疫細胞に活性化を提供できる。当業者は、免疫細胞が、異なる活性化受容体を有することを認める。たとえば、CD3はT細胞上の活性化受容体であり、一方でCD16、NKG2D、又はNkp30はNK細胞上の活性化受容体であり、CD3又は不变TCRはNKT細胞上の活性化受容体である。したがって、T細胞を活性化させるエンゲージャー分子は、NK細胞を活性化させるエンゲージャー分子とは異なる活性化ドメインを有しうる。特定の実施形態において、たとえば、免疫細胞はT細胞であり、活性化分子は、CD3、たとえばCD3、CD3若しくはCD3、又はCD27、CD28、CD40、CD134、CD137、及びCD278のうちの1つ又は複数である。他の特定の実施形態において、たとえば免疫細胞がNK細胞である場合、活性化分子は、CD16、NKG2D、若しくはNkp30であり、又は免

40

50

疫細胞がNKT細胞である場合、活性化分子は、CD3若しくは不变TCRである。

【0049】

いくつかの他の実施形態において、エンゲージャーは、1つ又は複数の他のドメイン、たとえば、1つ又は複数のサイトカイン、副刺激ドメイン、T細胞活性化の負の調節分子を阻害するドメイン、又はそれらの組合せを追加で含む。特定の実施形態において、サイトカインは、IL-15、IL-2、及び/又はIL-7である。他の特定の実施形態において、副刺激ドメインは、CD27、CD80、CD83、CD86、CD134、又はCD137である。他の特定の実施形態において、T細胞活性化の負の調節分子を阻害するドメインは、PD-1、PD-L1、CTLA4、又はB7-H4である。

【0050】

具体的なエンゲージャー分子の例。以下に、エンゲージャー分子の具体的な例を示す。一般に、scFvは、リンカーペプチドにより接続されたVH及びVLドメインを含有する。たとえば、配列番号1は、下式を含むEphA2-CD3 T細胞エンゲージャーである。

【0051】

EphA2-CD3 T細胞エンゲージャー

リーダー-VH4H5-(G4S1)3-VL4H5-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

【0052】

配列番号1は以下のとおりであり、第1の下線部はリーダーであり、以降の下線部は、上式に記載のそれぞれのscFvの間のリンカー配列である。

【0053】

M D W I W R I L F L V G A A T G A H S Q V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S
C A A S G F T F S S Y T M S W V R Q A P G Q A L E W M G T I S S G G T Y T Y Y P
D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E A I
F T Y W G R G T L V T S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q L T Q S P S S L S
A S V G D R V T I T C K A S Q D I N N Y L S W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y R A N
R L V D G V P D R F S G S G Y G T D F T L T I N N I E S E D A A Y Y F C L K Y D
V F P Y T F G Q G T K V E I K S G G G G S D I K L Q Q S G A E L A R P G A S V K
M S C K T S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N
Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y
Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q L T
Q S P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R
W I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y
Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K S

【0054】

HER2-CD3 T細胞エンゲージャー

リーダー-VHFRP5-(G4S1)3-VLFRP5-G4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

【0055】

配列番号2は以下のとおりであり、第1の下線部はリーダーであり、以降の下線部は、上式に記載のそれぞれのscFvの間のリンカー配列である。

【0056】

M D W I W R I L F L V G A A T G A H S E V Q L Q Q S G P E L K K P G E T V K I S
C K A S G Y P F T N Y G M N W V K Q A P G Q G L K W M G W I N T S T G E S T F A
D D F K G R F D F S L E T S A N T A Y L Q I N N L K S E D M A T Y F C A R W E V
Y H G Y V P Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q L T Q S
H K F L S T S V G D R V S I T C K A S Q D V Y N A V A W Y Q Q K P G Q S P K L L
I Y S A S S R Y T G V P S R F T G S G S G P D F T F T I S S V Q A E D L A V Y F
C Q Q H F R T P F T F G S G T K L E I K A L G G G G S D I K L Q Q S G A E L A R

10

20

30

40

50

P G A S V K M S C K T S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P
 S R G Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V
 Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S G G G G S G G G S G G G G
S D I Q L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q K S
 G T S P K R W I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A
 E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K S

【0057】

G D 2 - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H 1 4 g 2 a - (S G 4 S G 2) - V L 1 4 g 2 a - G 4 S - V H O K T
 3 - (G 4 S 1) 3 - V L O K T 3

10

【0058】

配列番号 3 は以下のとおりであり、第 1 の下線部はリーダーであり、以降の下線部は、
 上式に記載のそれぞれの s c F v の間のリンカー配列である。

【0059】

M E F G L S W L F L V A I L K G V Q C S R D I L L T Q T P L S L P V S L G D Q A
 S I S C R S S Q S L V H R N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I H K V S N R
 F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V
 P P L T F G A G T K L E L K R A D A A P T V S I F P G S G G G S G G E V K L Q
 Q S G P S L V E P G A S V M I S C K A S G S S F T G Y N M N W V R Q N I G K S L
 E W I G A I D P Y Y G G T S Y N Q K F K G R A T L T V D K S S S T A Y M H L K S
 L T S E D S A V Y Y C V S G M E Y W G Q G T S V T V S S G G G G S D I K L Q Q S
 G A E L A R P G A S V K M S C K T S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W
 I G Y I N P S R G Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T
 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S G G G G S G G G
G S G G G G S D I Q L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N
 W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G T S Y S L T
 I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K S

20

【0060】

H N 3 - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H H N 3 - G 4 S - V H O K T 3 - (G 4 S 1) 3 - V L O K T 3

30

【0061】

配列番号 4 は以下のとおりであり、第 1 の下線部はリーダーであり、以降の下線部は、
 上式に記載の V H と s c F v との間のリンカー配列である。

【0062】

M D W I W R I L F L V G A A T G A H Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L R L S C
 A A S Y F D F D S Y E M S W V R Q A P G K G L E W I G S I Y H S G S T Y Y N P S
 L K S R V T I S R D N S K N T L Y L Q M N T L R A E D T A T Y Y C A R V N M D R
 F D Y W G Q G T L V T V S S S G G G G S D I K L Q Q S G A E L A R P G A S V K M
 S C K T S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y
 N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y
 D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q L T Q
 S P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W
 I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y
 C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K S

40

【0063】

G C 3 3 - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H G C 3 3 - (G 4 S 1) 3 - V L G C 3 3 - G 4 S - V H O K T 3 - (G 4 S 1) 3 - V L O K T 3

【0064】

配列番号 5 は以下のとおりであり、第 1 の下線部はリーダーであり、以降の下線部は、

50

上式に記載のそれぞれの s c F v の間のリンカー配列である。

【0065】

M DWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLS
CKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYS
QKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSA VYYCTRIFYS
YTYWGQGTLVTVSAGGGGGGGGGSDVVMQTPLSL
PVSLGDQASI SCRSSQSLVHSNGNTYLNHWYLQKPGQSPKL
LIYKVSNRFSGVPDRFGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVY
FCSQNTHVPPTFGSGTKLEIKSGGGGSDIKLQQSGAELAR
PGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINP
SRGYTNYNQKFKD KATLT TDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA V
YYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGGGGGGGGGGGGG
SDIQLTQS PAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKS
G TSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGT SYSLTISSMEA
EDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK S

10

【0066】

二量化 4 1 BBL - HER2 - CD3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - VHGC33 - (G4S1)3 - VLGC33 - CH2CH3 - (G4S1)
) - 4 1 BBL - (G4S1) - VHOKT3 - (G4S1)3 - VLOKT3

20

【0067】

配列番号 6 は以下のとおりであり、第 1 の下線部はリーダーであり、以降の下線部は、
上式に記載のそれぞれの s c F v 又は CH2CH3 ドメイン又は 4 - 1 BBL の間のリン
カーパ配列である。

【0068】

M DWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELK K PGETVKIS
CKASGYPFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFA
DDFKGRFDFSL ETSANTAYLQINNLKSEDMATYFCARWEV
YHGYVPYWGQGTTTVTSSGGGGGGGGGGGGSDIQLTQS
HKFLSTSVDGRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLL
IYSASSRYTGVP S RFTGSGSGPDFTFTI SS VQAEDLA VYF
CQQHFRTPTFTFGSGTKLEIKALFE EPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESEN G Q PENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSSLSPGKG GGGG SASACPWA VSGARASPGSAA
SPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGP
LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ
LELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLP
PASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAW
QLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGSGGGGGGG
GGGGSVDDIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYT
MHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTTD
KSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCARYYDDHYCLDYWGQGT
TLTVSSGGGGSGGGGGGGSDIQLTQS PAIMSASPGEK V
TMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDT SKVASGV PY
RFSGSGSGT SYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGA
G T KLELK S

30

【0069】

40

50

三量化 4 1 B B L - H E R 2 - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H G C 3 3 - (G 4 S 1) 3 - V L G C 3 3 - リンカー - C o 1 - リンカ
- - 4 1 B B L - (G 4 S 1) - V H O K T 3 - (G 4 S 1) 3 - V L O K T 3

【 0 0 7 0 】

配列番号 7 は以下のとおりであり、第 1 の下線部はリーダーであり、以降の下線部は、上式に記載のそれぞれの s c F v 又は C o 1 ドメイン又は 4 - 1 B B L の間のリンカー配列である。

【 0 0 7 1 】

M D W I W R I L F L V G A A T G A H S E V Q L Q Q S G P E L K K P G E T V K I S
C K A S G Y P F T N Y G M N W V K Q A P G Q G L K W M G W I N T S T G E S T F A 10
D D F K G R F D F S L E T S A N T A Y L Q I N N L K S E D M A T Y F C A R W E V
Y H G Y V P Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q L T Q S
H K F L S T S V G D R V S I T C K A S Q D V Y N A V A W Y Q Q K P G Q S P K L L
I Y S A S S R Y T G V P S R F T G S G S G P D F T F T I S S V Q A E D L A V Y F
C Q Q H F R T P F T F G S G T K L E I K A L F E G A G G S G G S S G S D G A S G
S R V T A F S N M D D M L Q K A H L V I E G T F I Y L R D S T E F F I R V R D G
W K K L Q L G E L I P I P A D S P P P P A L S S N P G A G G S G G S S G S D G A
S G S R A S A C P W A V S G A R A S P G S A A S P R L R E G P E L S P D D P A G
L L D L R Q G M F A Q L V A Q N V L L I D G P L S W Y S D P G L A G V S L T G G
L S Y K E D T K E L V V A K A G V Y Y V F F Q L E L R R V V A G E G S G S V S L
A L H L Q P L R S A A G A A A L A L T V D L P P A S S E A R N S A F G F Q G R L
L H L S A G Q R L G V H L H T E A R A R H A W Q L T Q G A T V L G L F R V T P E
I P A G L P S P R S E G S G G G G S G G G G S G G G G S V D D I K L Q Q S G A E
L A R P G A S V K M S C K T S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y
I N P S R G Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D
S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S G G G G S G G G G S G
G G G S D I Q L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q
Q K S G T S P K R W I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G T S Y S L T I S S
M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K S

【 0 0 7 2 】

本明細書に記載の任意のエンゲージャーについて、それぞれのドメインは、N 末端から C 末端までどのような順序であってもよく、たとえば、活性化ドメインを抗原認識ドメインの N 末端側に有すること、活性化ドメインを抗原認識ドメインの C 末端側に有すること等を含む。いくつかの実施形態において、T 細胞は、抗原認識ドメインを活性化ドメインの N 末端側に有するエンゲージャー分子を分泌するよう改変される。特定の実施形態において、エンゲージャー分子の 2 つ以上のドメインがリンカーにより分けられる。リンカーは、任意の好適な長さのものであってよく、かかるパラメータは当技術分野において常法で最適化される。たとえば、リンカーは、第 1 及び第 2 のドメインのそれぞれが、互いに独立に、それらの異なる結合特異性を保持できることを確保するのに十分な長さ及び配列のものであってもよい。

【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態において、抗原認識ドメインにより結合される抗原は、腫瘍関連抗原 (T A A) 又は腫瘍特異性抗原 (T S A) である。いくつかの実施形態において、エンゲージャーの抗原認識ドメインは、T A A 又は T S A に特異的な s c F v である。特定の一実施形態において、T A A 又は T S A は、癌細胞上に発現する。一実施形態において、T A A 又は T S A は、血液癌細胞上に発現する。別の一実施形態において、T A A 又は T S A は、固形腫瘍の細胞上に発現する。より具体的な実施形態において、固形腫瘍は、グリア芽腫、非小細胞肺癌、非小細胞肺癌以外の肺癌、乳癌、前立腺癌、脾臓癌、肝臓癌、結腸癌、胃癌、脾臓癌、皮膚癌、神経グリア芽腫以外の脳腫瘍、腎臓癌、甲状腺癌等である。より具体的な実施形態において、T A A 又は T S A は、個体において腫瘍細胞により

10

20

30

40

50

発現させられる。特定の実施形態において、TAA又はTSAは、EphA2、HER2、GD2、Glypican-3、5T4、8H9、 ν_6 インテグリン、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD19、CD20、CD22、カッパ軽鎖、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPICAM、ERBB3、ERBB4、Erbb3/4、FAP、FAR、FBP、胎児AchR、葉酸受容体、GD2、GD3、HLA-A1 MA GE A1、HLA-A2、IL11Ra、IL13Ra2、KDR、Lambda、Lewis-Y、MCSP、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSC1、PSMA、ROR1、スルビシン、TAG72、TEM1、TEM8、VEGRR2、癌胎児性抗原、HMW-MAA、VEGF受容体のうちの1つ又は複数のものであり、たとえば、エンゲージャー上のscFvはこれらのうちの1つ又は複数に特異的であり、他の例示的な抗原は、腫瘍の細胞外マトリックス内に存在する抗原、たとえばフィプロネクチン、テネイシンの癌胎児性変異体、又は腫瘍の壞死領域である。

10

【0074】

本開示の実施形態において、方法及び組成物は、二重特異性单鎖抗体コンストラクトを含む組成物に関する。二重特異性单鎖抗体コンストラクトは、少なくとも2つのドメインを含んでいてもよく、又はそれらからなっていてもよく、又はそれらから本質的になっていてもよく、前記少なくとも2つのドメインの1つは、腫瘍抗原、たとえばEphA2、HER2、GD2又はGlypican-3に特異的に結合し、第2のドメインは、T細胞タンパク質、たとえばCD3抗原に結合する。

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

アロガングリオシドであり、正常組織上では非常に限定的に発現し、主にヒトの小脳及び末梢神経に発現する。Gd2は、細胞表面上に存在し集中し、セラミド成分の2つの炭化水素鎖が細胞膜に埋め込まれており、オリゴ糖が細胞外表面上に位置し、それらは細胞外分子又は隣接する細胞の表面のための認識点を提示する。本開示の抗体の実施形態は、細胞外ドメインを標的にしてもよい。

【0079】

「二重特異性单鎖抗体コンストラクト」という用語は、2つの抗体に由来する結合ドメインを含むコンストラクトに関する。特定の実施形態において、二重特異性单鎖抗体コンストラクトは、直列バイscFv又はダイアボディであってもよい。結合ドメインのうちの1つは、たとえばEphA2、HER2、GD2又はGlypican-3と特異的に結合／相互作用可能な、抗体、抗体フラグメント又はそれらの誘導体の重鎖(VH)及び軽鎖(VL)の両方の可変領域(又はそれらの一部)を含んでいてもよい。第2の結合ドメインは、たとえばヒトCD3抗原と特異的に結合／相互作用可能な、抗体、抗体フラグメント又はそれらの誘導体の重鎖(VH)及び軽鎖(VL)の両方の可変領域(又はそれらの一部)を含んでいてもよい。特定の実施形態において、可変領域の一部は、少なくとも1つのCDR(「相補性決定領域」)、たとえば少なくともCDR3領域であってもよい。

10

【0080】

特定の実施形態において、本開示の組成物において用いられる「二重特異性单鎖抗体コンストラクト」は、二重特異性单鎖Fv(scFv)である。scFvは一般に、リンカーペプチドにより接続されたVH及びVLドメインを含有する。分泌可能エンゲージャーは、細胞からのシグナルペプチド(分泌を可能にする)から構成され、リンカーペプチド(Lx、Ly、Lz)により接続された2つのscFvが続く。リンカーは、第1及び第2のドメインのそれぞれが、互いに独立に、それらの異なる結合特異性を保持できることを確保するのに十分な長さ及び配列のものであってもよい。二重特異性单鎖分子は、当技術分野において知られており、WO99/54440; Mack, J. Immunol. (1997年)、158、3965～3970頁；Mack, PNAS, (1995年)、92、7021～7025頁；Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997年)、45、193～197頁；Loffler, Blood, (2000年)、95、6、2098～2103頁；及びBruhl, J. Immunol., (2001年)、166、2420～2426頁に記載されている。

20

30

【0081】

本開示の特定の実施形態において、本開示の例示的な分子フォーマットが、シグナルペプチドとそれに続く2つの抗体由来領域を含むポリペプチドをコードする腫瘍溶解性ウイルスポリヌクレオチドコンストラクトを提供する。各抗体由来領域(scFv)は、1つのV_H及び1つのV_L領域を含む。特定の実施形態において、二重特異性scFvは、直列バイscFv又はダイアボディであってもよい。二重特異性scFvは、以下の様々なフォーマットに配置されうる。すなわち、V_H-Lx-V_L-Ly-V_H-Lz-V_L、V_L-Lx-V_H-Ly-V_L-Lz-V_H、V_H-Lx-V_L-Ly-V_H-Lz-V_L、V_L-Lx-V_H-Ly-V_L-Lz-V_H、V_H-Lx-V_L-Ly-V_H-Lz-V_L、V_H-Lx-V_L-Ly-V_H-Lz-V_H、V_L-Lx-V_H-Ly-V_L-Lz-V_H、V_H-Lx-V_L-Ly-V_H-Lz-V_H、V_H-Lx-V_L-Ly-V_H-Lz-V_H。したがって、上の可能な配置を有する二重特異性scFvは、二重特異性单鎖コンストラクトの特定の実施形態である。

40

【0082】

本開示の特定の実施形態において、抗体コンストラクトはまた、たとえば組換えて製造されたコンストラクトの単離及び／又は調製のための、追加のドメインを含んでいてもよ

50

い。加えて、抗原結合ドメインは、複数の抗原を標的にすることを可能にする複数の抗原認識結合ドメインを含有していてもよい一方で、活性化ドメインは、細胞を活性化する複数のドメインを含有していてもよい。

【0083】

本開示により使用される「単鎖」という用語は、二重特異性単鎖コンストラクトの前記第1及び第2のドメインが、好ましくは单一の核酸分子によりコード可能な共直線アミノ酸配列の形態で、共有結合で結合されることを意味する。

【0084】

本開示の文脈において使用される「と結合／相互作用する」という用語は、少なくとも2つの「抗原相互作用部位」の互いとの結合／相互作用を定義する。「抗原相互作用部位」という用語は、本開示によれば、特異的抗原又は特異的抗原の群との特異的相互作用の能力を示すポリペプチドのモチーフを定義する。結合／相互作用はまた、「特異的認識」を定義するものと理解される。「特異的に認識する」という用語は、本発明によれば、抗体分子が、本明細書に定義される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及び／又は結合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、すなわち本明細書に定義されるヒト標的分子の特異的領域間を識別するその能力に関する。抗原相互作用部位とその特異的抗原との特異的相互作用は、たとえば抗原のコンフォメーションの変化の誘導、抗原のオリゴマー化等による、シグナルの開始をもたらしてもよい。さらに、この結合は、「鍵と鍵穴の原理」の特異性により例示できる。したがって、いくつかの実施形態において、抗原相互作用部位及び抗原のアミノ酸配列における特異的モチーフが、それらの一次、二次又は三次構造の結果として、並びに前記構造の二次改変の結果として、互いに結合する。抗原相互作用部位とその特異的抗原との特異的相互作用は、この部位の抗原との単純な結合ももたらしうる。

10

20

30

40

【0085】

本開示により使用される「特異的相互作用」という用語は、二重特異性単鎖コンストラクトが類似の構造の（ポリ）ペプチドと交差反応しないか、又は本質的に交差反応しないことを意味する。研究対象の一群の二重特異性単鎖コンストラクトの交差反応性は、たとえば、その二重特異性単鎖コンストラクトの群の、目的の（ポリ）ペプチド並びに数多くの多かれ少なかれ（構造的及び／又は機能的に）密接に関連する（ポリ）ペプチドに対する結合を、従来の条件下（たとえば、Harlow及びLane、Antibodies：A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988年並びにUsing Antibodies：A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999年を参照のこと）で評価することにより試験されうる。目的の（ポリ）ペプチド／タンパク質と結合するが、任意の他の（ポリ）ペプチドとは結合しないか、又はそれらとは本質的に結合しない抗体のみが、目的の（ポリ）ペプチド／タンパク質に特異的であると考えられる。抗原相互作用部位と特異的抗原との特異的相互作用の例には、リガンドのその受容体への特異性が含まれる。この定義は、リガンドの相互作用を特に含み、リガンドはその特異的受容体との結合の際にシグナルを誘導する。対応するリガンドの例には、サイトカインが含まれ、サイトカインはその特異的サイトカイン受容体と相互作用／結合する。前記相互作用の別の一例は、抗原決定基（エピトープ）と抗体の抗原結合部位との相互作用である。

【0086】

「と結合／相互作用する」という用語はまた、ヒト標的分子又はそれらの一部の2つの領域からなる、立体構造エピトープ、構造エピトープ又は不連続エピトープに関する。本開示の文脈において、立体構造エピトープは、一次配列においては分かれているが、ポリペプチドが折り畳まれて天然タンパク質になるときに分子の表面上で一体となる、2つ以上の別個のアミノ酸配列により定義される（Sel a、（1969年）Science 166、1365頁及びLayer、（1990年）Cell 61、553～6頁）。

【0087】

50

本開示のコンストラクトはまた、本明細書で下に開示のとおり、本明細書に記載のヒトCD3複合体の2つの領域又はそれらの一部から構成される且つ／又はそれらを含む、立体構造／構造エピトープと特異的に結合／相互作用するよう想定される。

【0088】

したがって、特異性は、当技術分野において知られている方法並びに本明細書に開示及び記載の方法により、実験的に決定できる。かかる方法は、ウエスタンプロット、ELISA、RIA、ECL、IRMA、EIA試験及びペプチドスキャンを含むが、これに限定されるものではない。

【0089】

「抗体フラグメント又はその誘導体」という用語は、単鎖抗体又はそのフラグメント、合成抗体、抗体フラグメント、たとえばCamel Ig、Ig NAR、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab2)'フラグメント、F(ab)'3フラグメント、Fv、単鎖Fv抗体（「scFv」）、ビス-scFv、(scFv)2、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）、及び單一ドメイン抗体（sdAb、ナノボディ）等、又はこれらの任意のものの化学修飾誘導体に関する。本開示により用いられる抗体又はそれらの対応する免疫グロブリン鎖を、当技術分野において知られている常法を使用して、たとえばアミノ酸欠失、挿入、置換、付加及び／又は組換え、及び／又は当技術分野において知られている任意の他の修飾（たとえば翻訳後及び化学修飾、たとえばグリコシル化及びリン酸化）を、単独で又は組み合わせて使用することにより、さらに修飾できる。免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の基礎となるDNA配列におけるかかる修飾を導入する方法は、当業者によく知られており、たとえばSambrookら（1989年）を参照のこと。10
20

【0090】

「抗体フラグメント又はその誘導体」という用語は、特に、少なくとも1つのCDRを含む（ポリ）ペプチドコンストラクトに関する。

【0091】

記載した抗体分子のフラグメント又は誘導体は、上の抗体分子の一部であり、且つ／又は化学的／生化学的若しくは分子生物学的方法により修飾された（ポリ）ペプチドを定義する。対応する方法は、当技術分野において知られ、とりわけ実験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年及び第3版 2001年；Gerhardtら、Methods for General and Molecular Bacteriology、ASM Press、1994年；Lefkovits、Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques、Academic Press、1997年；Golemis、Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2002年を参照のこと）。30

【0092】

本明細書に記載の二重特異性单鎖コンストラクトに含まれる可変ドメインは、追加のリンカー配列により接続されていてもよい。「ペプチドリンカー」という用語は、本開示によれば、定義されたコンストラクトの第1のドメイン及び第2のドメインのアミノ酸配列が互いに結合されているアミノ酸配列を定義する。かかるペプチドリンカーの本質的な技術的特徴は、前記ペプチドリンカーが重合活性を一切含まないことである。二次構造の促進を含まないペプチドリンカーの特徴は、当技術分野において知られており、たとえば、Dall'Acquaら（Biochem.（1998年）37、9266～9273頁）、Cheadleら（Mol Immunol（1992年）29、21～30頁）並びにRaag及びWhitlow（FASEB（1995年）9（1）、73～80頁）に記載されている。5個未満のアミノ酸を有する想定されるペプチドリンカーは、4個、40
50

3個、2個又は1個のアミノ酸を含みうる。「ペプチドリンクター」の文脈において特に好みしい「単一」アミノ酸は、Glyである。したがって、ペプチドリンクターは、単一のアミノ酸Glyからなっていてもよい。さらにまた、二次構造を一切促進しないペプチドリンクターが好みしい。ドメインの互いとの連結は、たとえば、遺伝子工学により提供されうる。融合及び作動可能に連結された二重特異性单鎖コンストラクトを調製し、それらを哺乳類細胞又は細菌において発現させるための方法は、当技術分野においてよく知られている(たとえば、WO 99/54440、Ausubel、Current Protocols in Molecular Biology、Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N.Y. 1989年及び1994年又はSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、2001年)。
10

【0093】

本明細書で上及び下に記載の二重特異性单鎖抗体コンストラクトは、ヒト化又は脱免疫化(deimmunized)抗体コンストラクトであってもよい。(ポリ)ペプチド及び、特に、抗体コンストラクトのヒト化及び/又は脱免疫化のための方法は、当業者に知られている。

【0094】

本開示の医薬組成物の一実施形態において、ヒトCD3特異的ドメインのV_H及びV_L領域は、X35-3、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPV-T3b、11D8、XIIX-141、XIIX-46、XIIX-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、WT31及び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において知られており、とりわけ、Tunnac1iffe(1989)、Int. Immunol. 1、546~550頁に記載されている。特定の実施形態において、V_H及びV_L領域は、ヒトCD3-鎖又はヒトCD3-鎖を特異的に認識することが可能な抗体/抗体誘導体等に由来する。
20

【0095】

本開示はまた、上に定義した二重特異性单鎖抗体コンストラクトをコードする腫瘍溶解性ウイルス核酸配列を含む組成物及びこの核酸配列を有する細胞を包含する。腫瘍溶解性ウイルス核酸分子は、組換え核酸分子であり、特定の態様において合成であってもよい。

【0096】

別の一態様において、エンゲージャー分子、たとえば任意の本明細書に記載のエンゲージャー分子をコードするウイルスポリヌクレオチドが本明細書において提供される。特定の一実施形態において、ウイルスポリヌクレオチドは、ウイルスを含有する細胞におけるエンゲージャー分子の誘導性発現を可能にする。本明細書において提供される任意の実施形態において、ウイルスは、好ましくは細胞により分泌可能な形態のエンゲージャーをコードする。上記ポリヌクレオチドは、活性化ドメイン及び抗原認識ドメインを含む融合分子をコードし、特定の実施形態において、各ドメインはscFvである。活性化ドメインは、抗原認識ドメインに対してポリペプチドのN末端の方に配置されてもよく、又は活性化ドメインは、抗原認識ドメインに対してポリペプチドのC末端の方に配置されてもよい。
40

【0097】

調節配列を本開示の組成物に含まれる腫瘍溶解性ウイルス核酸分子に追加してもよいことは当業者にとって明らかである。たとえば、プロモーター、転写エンハンサー、及び/又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てもよい。好適な誘導系は、たとえばGossen及びBujsard(Proc. Natl. Aca
50

d . S c i . U S A 8 9 (1 9 9 2 年) 、 5 5 4 7 ~ 5 5 5 1 頁) 並びに G o s s e n ら (T r e n d s B i o t e c h . 1 2 (1 9 9 4 年) 、 5 8 ~ 6 2 頁) により記述されているテトラサイクリン調節遺伝子発現、又はたとえば C r o o k (1 9 8 9 年) E M B O J . 8 、 5 1 3 ~ 5 1 9 頁により記述されているデキサメタゾン誘導性遺伝子発現系である。

【 0 0 9 8 】

さらに、腫瘍溶解性ウイルス核酸分子が、たとえばチオエステル結合及び／又はヌクレオチド類似体を含有していてもよいことが、さらなる目的のために想定される。細胞におけるエンド - 及び／又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、修飾が有用でありうる。核酸分子は、細胞における核酸分子の転写を可能にするキメラ遺伝子を含む適切な腫瘍溶解性ベクターにより転写されてもよい。この点に関して、かかるポリヌクレオチドを、「遺伝子ターゲティング」又は「遺伝子治療」アプローチのために使用できることもまた理解されるべきである。別の一実施形態において、核酸分子は標識化される。核酸の検出のための方法は、当技術分野においてよく知られており、たとえば、サザン及びノーザンプロッティング、P C R 又はプライマー伸長である。この実施形態は、たとえば遺伝子治療アプローチ中に、上述の核酸分子の導入の成功を検証するためのスクリーニング方法のために有用でありうる。

10

【 0 0 9 9 】

腫瘍溶解性ウイルス核酸分子は、任意の前述の核酸分子を単独で又は組み合わせて含む、組換えにより製造されたキメラ核酸分子であってもよい。特定の態様において、核酸分子はベクターの一部である。

20

【 0 1 0 0 】

したがって、本開示はまた、本開示に記載の核酸分子を含む腫瘍溶解性ウイルスベクターを含む組成物に関する。

【 0 1 0 1 】

特定の実施形態において、本明細書に定義される二重特異性单鎖抗体コンストラクトをコードする核酸配列に作動可能に連結されている調節配列である核酸配列を含む腫瘍溶解性ウイルスベクターがある。かかる調節配列（制御要素）は、当業者に知られており、プロモーター、スプライシングカセット、翻訳開始コドン、インサートをベクターに導入するための翻訳及び挿入部位を含んでいてもよい。特定の実施形態において、核酸分子は、真核又は原核細胞における発現を可能にする前記発現制御配列に作動可能に連結される。

30

【 0 1 0 2 】

腫瘍溶解性ウイルスベクターが、本明細書に定義される二重特異性单鎖抗体コンストラクト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。特定の態様において、腫瘍溶解性ウイルスベクターは、ワクシニアウイルスベクターである。ワクシニアウイルスは、W y e t h 又は W e s t e r n R e s e r v e (W R) 株であってもよい。ワクシニアウイルスは、そのゲノムに欠失又は1つ若しくは複数の遺伝子に変異を有していてもよい。ワクシニアウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子は、欠失していてもよい。ワクシニアウイルスは、ワクシニアウイルス成長因子をコードする遺伝子に変異を有していてもよい。特定の態様において、腫瘍溶解性ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスベクターは市販されており、たとえば、C l o n t e c h 社 (M o u n t a i n V i e w , C A) 又は G e n e C o p o e i a 社 (R o c k v i l l e , M D) 製のものを含む。

40

【 0 1 0 3 】

「調節配列」という用語は、それらが連結されるコーディング配列の発現を実現するのに必要なD N A配列を指す。かかる制御配列の性質は、宿主生物により異なる。原核生物では、制御配列は一般に、プロモーター、リボソーム結合部位及びターミネーターを含む。真核生物では、制御配列は一般に、プロモーター、ターミネーター及び、いくつかの例において、エンハンサー、トランス活性化因子又は転写因子を含む。「制御配列」という用語は、最低でも、その存在が発現に必要な全構成要素を含むことが意図されており、追

50

加の有利な構成要素もまた含んでいてもよい。

【0104】

「作動可能に連結される」という用語は並置を指し、そのように記載される構成要素は、それらが意図される仕方で機能することを可能にする関係にある。コーディング配列に「作動可能に連結される」制御配列は、コーディング配列の発現が、制御配列に適合する条件下で達成されるように連結される。制御配列がプロモーターである場合、二本鎖核酸が好ましくは使用されることは、当業者にとって明らかである。

【0105】

したがって、いくつかの実施形態において、記載のベクターは、腫瘍溶解性ウイルス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でき、選択された宿主におけるコーディング配列の発現を提供するコンストラクトである。発現ベクターは、たとえばクローニングベクター、バイナリーベクター又は組込みベクターでありうる。発現は、好ましくは翻訳可能なmRNAへの核酸分子の転写を含む。真核生物における発現を確保する調節要素は、当業者によく知られている。真核細胞の場合には、それらは、転写の開始を確保するプロモーター並びに、任意選択で転写の終結及び転写物の安定化を確保するポリAシグナルを通常は含む。真核生物宿主細胞における発現を可能にする調節要素の例は、酵母菌のAOX1若しくはGAL1プロモーター、又は哺乳類若しくは他の動物細胞のCMV-、SV40-、RSV-プロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、CMV-エンハンサー、SV-40エンハンサー若しくはグロビンイントロンがある。

10

20

30

40

50

【0106】

転写の開始の原因となる要素に加えて、かかる調節要素はまた、ポリヌクレオチドの下流に、転写終結シグナル、たとえばSV40-ポリA部位又はtk-ポリA部位を含んでいてもよい。さらに、使用される発現系によって、ポリペプチドを細胞内コンパートメントに導くこと又はそれを培地中に分泌することが可能なリーダー配列を、記載の核酸配列のコーディング配列に追加してもよく、これは当技術分野においてよく知られている。リーダー配列は、翻訳、開始及び終結配列と適切な段階で組み合わされ、好ましくは、リーダー配列は、翻訳されたタンパク質又はその一部を細胞膜周辺腔又は細胞外培地へ分泌するよう導くことが可能である。任意選択で、異種配列が、所望の特性、たとえば発現した組換え産物の安定化又は簡易精製を付与するN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードしうる。上記を参照のこと。この文脈において、好適な発現ベクターが当技術分野において知られており、たとえばOkayama-Berg cDNA発現ベクターpcDV1（Pharmacia）、pEF-Neo、pCDM8、pRc/CMV、pCDNA1、pCDNA3（Invitrogen）、pEF-DHFR及びpEF-ADA（Raumら Cancer Immunol Immunother (2001年) 50(3)、141~150頁）又はpSPORT1（GIBCO BRL）がある。

【0107】

いくつかの実施形態において、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換又は形質移入することが可能なベクターにおける真核生物プロモーター系であるが、原核生物宿主の制御配列もまた使用できる。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に好適な条件下で維持され、所望の場合には、本開示のポリペプチドの回収及び精製を続けてよい。

【0108】

追加の調節要素には、転写エンハンサーが翻訳エンハンサーとともに含まれる。有利には、上述の本開示のベクターは、選択可能及び/又はスコアリング可能マーカーを含む。形質転換された細胞の選択に有用な選択可能マーカー遺伝子は当業者によく知られており、たとえば、メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr（Reiss、Plant Physiol. (Life Sci.) 13 (1994年)、143~149頁）、アミノグリコシドであるネオマイシン、カナマイシン及びパロマイシンに対する耐性を付与するnpt（Herrera-Estrella、EMBO J. 2 (1

983年)、987~995頁)、並びにハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygro(Marsh、Gene 32(1984年)、481~485頁)の選択の根拠としての代謝拮抗物質耐性を含む。追加の選択可能遺伝子が記述されてきたのであり、すなわち、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trpB、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hisD(Hartman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(1988年)、8047頁)、細胞がマンノースを利用することを可能にするマンノース-6-ホスフェートイソメラーゼ(WO94/20627)及びオルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤である2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン、DFMOに対する耐性を付与するODC(オルニチンデカルボキシラーゼ)(McConlogue、1987年: Current Communications in Molecular Biology、Cold Spring Harbor Laboratory編収録)又はプラストジンSに対する耐性を付与するアスペルギルス・テルレウス(Aspergillus terreus)由来のデアミナーゼ(Tamura、Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(1995年)、2336~2338)である。

【0109】

有用なスコアリング可能なマーカーもまた、当業者に知られており、市販されている。有利には、前記マーカーは、ルシフェラーゼ(Giacomin、Pl. Sci. 116(1996年)、59~72頁; Scikantha、J. Bact. 178(1996年)、121頁)、緑色蛍光タンパク質(Gerdes、FEBS Lett. 389(1996年)、44~47頁)又は-グルクロニダーゼ(Jefferson、EMBO J. 6(1987年)、3901~3907頁)をコードする遺伝子である。この実施形態は、記載のベクターを含有する細胞、組織及び生物の簡便で迅速なスクリーニングのために特に有用である。

【0110】

上述のとおり、記載の腫瘍溶解性ウイルスベクター核酸分子は、癌治療のために単独で使用できる。上述の二重特異性单鎖抗体コンストラクトのうちの任意の1つをコードするDNA配列を含有するベクターは、対象に送達され、ひいては目的のポリペプチドをもたらす。

【0111】

上記によれば、本開示は、本明細書に定義される二重特異性单鎖抗体コンストラクトのポリペプチド配列をコードする核酸分子を含む、遺伝子工学において従来使用されている腫瘍溶解性ウイルスベクターを得る方法に関する。好ましくは、腫瘍溶解性ベクターは、発現ベクター及び/又は遺伝子導入若しくはターゲティングベクターである。組換えベクターを構築するために、当業者によく知られている方法を使用できる。たとえば、Sambrookら(上記引用)、Ausubel(1989年、上記引用)又は他の標準的教科書に記載の技術を参照のこと。本開示の核酸分子を含有する腫瘍溶解性ウイルスベクターは、細胞宿主のタイプにより変わるよく知られている方法により、宿主細胞内に導入できる。たとえば、リン酸カルシウム処置又は電気穿孔法が、細胞宿主について使用できる。上記Sambrookを参照のこと。

【0112】

本開示の医薬組成物は、本明細書で上に定義される腫瘍溶解性ウイルスベクターで形質転換又は形質移入された宿主を含むことがさらに想定される。宿主は、上述のベクターのうちの少なくとも1つ又は上述の核酸分子のうちの少なくとも1つを宿主内に導入することにより製造できる。宿主における少なくとも1つのベクター又は少なくとも1つの核酸分子の存在は、上述の特異的单鎖抗体コンストラクトをコードする遺伝子の発現を媒介することができる。

【0113】

宿主内に導入された記載の核酸分子又はベクターは、宿主のゲノムに統合されてもよく、又はそれは染色体外に維持されてもよい。

10

20

30

40

50

【0114】

宿主は、任意の真核細胞又は原核細胞でありうる。記載の宿主は、哺乳類細胞であってもよいことが特に想定される。特に好ましい宿主細胞には、CV-1、BS-C-1、HUTK-143B、BHK-21、CEF、CHO細胞、COS細胞、ミエローマ細胞株、たとえばSP2/0又はNS/0細胞が含まれる。

【0115】

本開示の医薬組成物はまた、細胞増殖又は細胞刺激のために有用な免疫エフェクター細胞のための活性化シグナルを提供することが可能な、タンパク質様化合物を含んでいてもよい。タンパク質様化合物は、上に定義した二重特異性单鎖抗体コンストラクトの追加のドメインとしてではなく、本開示の医薬組成物の少なくとも1つの追加構成要素として理解される。10

【0116】

本開示に照らし、免疫エフェクター細胞のための活性化シグナルを提供する「タンパク質様化合物」は、たとえば、T細胞のためのさらなる活性化シグナル（たとえばさらなる副刺激分子、すなわちB7-ファミリーの分子、OX40-L、4.1BB-L）、又はさらなるサイトカイン、すなわちインターロイキン（たとえばIL-2）、又はNKG-2D接合化合物であってもよい。タンパク質様化合物の好ましいフォーマットには、追加の二重特異性抗体及びフラグメント又はそれらの誘導体、たとえば二重特異性scFvが含まれる。タンパク質様化合物には、T細胞受容体又はスーパー抗原に特異的なscFvフラグメントが含まれうるが、これに限定されるものではない。スーパー抗原は、MHCから独立した仕方でT細胞受容体可変領域のいくつかのサブファミリーに直接結合し、そのことにより一次T細胞活性化シグナルを媒介する。タンパク質様化合物はまた、非T細胞である免疫エフェクター細胞のための活性化シグナルを提供してもよい。非T細胞である免疫エフェクター細胞の例には、とりわけ、NK細胞が含まれる。20

【0117】

本開示の一実施形態は、本開示の組成物の製造のための方法に関し、この方法は、本明細書に定義される宿主を、コンストラクトの発現を可能にする条件下で培養する工程、及び製造された二重特異性单鎖抗体コンストラクトを培養物から回収する工程を含む。

【0118】

本開示の一実施形態は、上に定義した方法により製造され且つ／又は上に定義した二重特異性单鎖抗体コンストラクト、上に定義した核酸配列、上に定義したベクター、上に定義した宿主の、癌性疾患、たとえば腫瘍性疾患の予防、治療又は寛解のための医薬組成物の調製のための使用に関する。特に、本開示の医薬組成物は、たとえば固形腫瘍を有する癌を含む癌の予防、寛解及び／又は治療において特に有用でありうる。30

【0119】

上に定義した細胞、二重特異性单鎖抗体コンストラクト、核酸分子及びベクターが、単独又は任意の組合せで、標準的なベクター及び／又は遺伝子送達系を使用して、少なくともいくつかの場合において、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤とともに投与されることが本開示により想定される。投与に統一して、前記核酸分子又はベクターは、対象のゲノムに安定的に統合されうる。40

【0120】

特定の実施形態において、いくつかの細胞又は組織に特異的で、前記細胞内に持続するウイルスベクターを使用できる。好適な医薬担体及び賦形剤は、当技術分野においてよく知られている。本開示により調製される組成物は、上に同定される疾患の予防又は治療又は遅延のために使用できる。

【0121】

さらに本開示は、上に定義した方法により製造され且つ／又は上に定義した二重特異性单鎖抗体コンストラクト、上に定義した核酸配列、上に定義したベクターを有する有効量の細胞を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、腫瘍性疾患の予防、治療又は寛解のための方法に関する。50

【0122】

本開示の実施形態は、上に定義した二重特異性单鎖抗体コンストラクト、上に定義した核酸配列、上に定義したベクター及び／又は上に定義した宿主を含むキットに関する。本開示のキットが、医学的治療又は介入を必要とする個体に投与される本明細書で上に記載の医薬組成物を、単独で又はさらなる薬剤と組み合わせて含むこともまた想定される。

【0123】

I I I . 腫瘍溶解性ウイルスの治療的使用

例示のため、癌患者又は癌に罹患しやすい患者又は癌に罹患していることが疑われる患者を、本明細書に記載のとおり治療できる。本明細書に記載の腫瘍溶解性ウイルスが、個体に投与され、長期間保持されてもよい。個体は、ウイルスの1回又は複数の投与を受けてもよい。いくつかの実施形態において、ウイルスは、免疫認識を抑制するためにカプセル化され、腫瘍の部位に置かれる。本開示の実施形態は、本開示の組成物の製造のための方法、癌の予防、治療又は寛解のための方法、及び腫瘍溶解性ウイルスの癌の予防、治療又は寛解における使用をさらに包含する。

10

【0124】

様々な実施形態において、発現コンストラクト、核酸配列、宿主細胞及び／又はそれらを含む医薬組成物が、癌性疾患、たとえば腫瘍性疾患の予防、治療又は寛解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、たとえば固形腫瘍を有する癌を含む癌の予防、寛解及び／又は治療において特に有用でありうる。

20

【0125】

本開示の組成物の投与のための可能な適応症は、癌性疾患、たとえば腫瘍性疾患、たとえば乳癌、前立腺癌、肺癌、及び結腸癌又は上皮癌／細胞癌、たとえば乳癌、結腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、皮膚癌、泌尿生殖器の癌、たとえば卵巣癌、子宮体癌、子宮頸癌及び腎臓癌、肺癌、胃癌、小腸癌、肝臓癌、脾臓癌、胆嚢癌、胆管癌、食道癌、唾液腺癌、及び甲状腺癌である。特定の実施形態において、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、及び骨髄異形成症候群を含むが、これに限られない血液悪性腫瘍は、本開示の方法及び組成物で治療される。特定の実施形態において、癌は、たとえばE p h A 2 - 、H E R 2 - 、G D 2 - 又はG l y p i c a n - 3 - 陽性である。他の特定の実施形態において、癌は、たとえば、その細胞表面上の提示される、本明細書に列挙された任意の腫瘍関連抗原又は腫瘍特異性抗原について陽性である。本開示の組成物の投与は、微小残存病変、初期固形腫瘍、進行固形腫瘍及び／又は転移性固形腫瘍を含む、あらゆるステージ及びタイプの癌について有用である。

30

【0126】

本明細書において使用される「治療」又は「治療する」は、疾患又は病態の症状又は病理に対する任意の有益又は所望の効果を含み、治療されている疾患又は病態、たとえば癌の1つ又は複数の測定可能なマーカーにおける極小の減少をも含みうる。治療は、疾患若しくは病態の症状の減少若しくは寛解、又は疾患若しくは病態の進行の遅延を、任意選択で伴いうる。「治療」は、疾患若しくは病態、又はそれらの関連症状の完全な根絶又は治癒を必ずしも指さない。

40

【0127】

本明細書において使用される「予防する」、及び類似する用語、たとえば「予防される」、「予防すること」等は、疾患又は病態、たとえば癌の発生又は再発の可能性を予防、阻害、又は低減するためのアプローチを指す。それはまた、疾患若しくは病態の発症若しくは再発を遅延させること、又は疾患若しくは病態の症状の発生若しくは再発を遅延させることを指す。本明細書において使用される「予防する」及び類似する用語はまた、疾患又は病態の発症又は再発前の疾患又は病態の強度、影響、症状及び／又は負担を減少させることを含む。

【0128】

特定の実施形態において、本発明は、部分的に、単独又は別の治療との任意の組合せで、少なくともいくつかの態様において、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤とともに投与

50

できるウイルス、発現コンストラクト、核酸分子及び／又はベクターを考慮する。いくつかの実施形態において、ウイルスの投与前に、それらは当技術分野においてよく知られている好適な医薬担体及び賦形剤と組み合わされてもよい。本開示により調製される組成物は、癌の発生又は悪化の予防又は治療又は遅延のために使用できる。

【0129】

さらに、本開示は、有効量の本開示の腫瘍溶解性ウイルスをそれを必要とする対象に投与する工程を含む、癌性（腫瘍性を含む）疾患の予防、治療又は寛解のための方法に関する、ウイルスは、免疫細胞上の標的に結合する活性化ドメイン及び標的細胞によりもたらされる又は標的細胞上に存在する1つ又は複数の分子に結合する抗原認識ドメインを含む分子を発現させる。本開示は、本明細書において考慮される且つ／又は本明細書において考慮される方法によりもたらされる、エンゲージャーをコードする核酸配列、エンゲージャーをコードするベクターを含む。

10

【0130】

本開示は、他の癌治療、たとえば二重特異性抗体コンストラクト、標的化毒素又は他の化合物、たとえば免疫細胞を介して作用するもの、たとえばT細胞療法との併用投与プロトコルをさらに包含する。本発明の組成物の併用投与のための臨床的投与計画は、他の構成要素の投与と同時、その前及び／又は後の併用投与を包含しうる。特定の併用療法には、化学療法、放射線、手術、ホルモン療法、及び／又は他のタイプの免疫療法が含まれる。

20

【0131】

実施形態は、本明細書に記載の1つ又は複数の腫瘍溶解性ウイルス、本明細書に記載の核酸配列、本明細書に記載のベクター及び／又は本明細書に記載の宿主を含むキットに関する。本開示のキットが、医学的治療又は介入を必要とする個体に投与される本明細書で上に記載の医薬組成物を、単独で又はさらなる薬剤と組み合わせて含むこともまた考慮される。

【0132】

ウイルスは、宿主生物、たとえば哺乳動物に、多様な仕方で導入されうる。特定の実施形態において、ウイルスは腫瘍の部位に導入されてもよく、代替的実施形態において、ウイルスは癌にホーミングする（hone）か、又は癌にホーミングするよう改変される。用いられるウイルスの数は、多くの状況、導入の目的、細胞寿命、使用されるプロトコル、たとえば投与の回数、ウイルスの安定性等に依存する。ウイルスは、分散液で適用されてもよく、目的の部位に、又はその近傍に注射されてもよい。ウイルスは、生理的に許容される媒体中にあってもよい。

30

【0133】

腫瘍溶解性ウイルスは、静脈内又は動脈内投与されてもよい。腫瘍溶解性ウイルスは、注射のための薬学的に許容可能な配合物中に分散されてもよい。個体に、約 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} pfuの間のウイルスが投与されてもよい。個体は、腫瘍溶解性ウイルスを、1回、2回、3回、4回、5回、6回又はそれを超える回数を含む複数回、投与されてもよい。

【0134】

系は変数の影響を受けることが認められるべきである。したがって、各個の患者について、集団全体に投与されうるウイルスが存在したとしても、各患者は、個体にとって適切な投与量についてモニタリングされるだろうことが予測され、患者をモニタリングするかかるプラクティスは、当技術分野において常法である。

40

【0135】

I V . 医薬組成物

本開示によれば、「医薬組成物」という用語は、個体への投与のための組成物に関する。好ましい一実施形態において、医薬組成物は、非経口、経皮、腔内、動脈内、髄腔内又は静脈内投与のための、又は癌への直接注射のための組成物を含む。前記医薬組成物が、注入又は注射を介して個体に投与されることが特に想定される。好適な組成物の投与は、

50

様々な方法により、たとえば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、局所又は皮内投与により実施できる。本開示の医薬組成物はさらに、薬学的に許容可能な担体を含んでいてもよい。好適な医薬担体の例は、当技術分野においてよく知られており、リン酸緩衝生理食塩水、水、エマルジョン、たとえば油／水エマルジョン、様々なタイプの湿潤剤、無菌液等を含む。かかる担体を含む組成物は、よく知られている従来の方法により配合できる。これらの医薬組成物を、対象に好適な用量で投与できる。投与計画は、主治医及び臨床因子により決定されると考えられる。医療技術分野においてよく知られているとおり、任意の一患者についての投与量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間及び経路、全般的健康状態、並びに同時に投与される他の薬物を含めた、多数の要因に依存する。本開示の組成物は、局所的又は系統的に投与されてもよい。投与は一般に非経口、たとえば静脈内であると考えられる。DNAもまた標的部位に、たとえばバイオリストイック送達により内部若しくは外部標的部位へと、又はカテーテルにより動脈内部位へと、直接投与できる。好ましい一実施形態において、医薬組成物は皮下投与され、より一層好ましい一実施形態において、静脈内投与である。非経口投与のための調製物は、無菌水性溶液又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルジョンを含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、たとえばオリーブ油、及び注射可能な有機エステル、たとえばオレイン酸エチルである。水性担体には、水、アルコール／水性溶液、エマルジョン又は懸濁液、たとえば生理食塩水及び緩衝媒体が含まれる。非経口媒体には、塩化ナトリウム溶液、リゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リゲル、又は固定油が含まれる。静脈内媒体には、流体及び栄養補充液、電解質補充液（たとえばリゲルデキストロースベースのもの）等が含まれる。保存剤及び他の添加剤、たとえば抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤、及び不活性ガス等もまた存在してよい。加えて、本開示の医薬組成物は、タンパク質担体、たとえば好ましくはヒト由来の血清アルブミン又は免疫グロブリン等を含んでいてもよい。本開示の医薬組成物は、医薬組成物の意図される用途に応じて、タンパク質様二重特異性单鎖抗体コンストラクト又はこれをコードする核酸分子又はベクター（本開示に記載のとおり）に加えて、さらなる生物活性剤を含んでいてもよいことが想定される。

【0136】

V. 腫瘍溶解性ウイルス

腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、腫瘍細胞に感染し、そこで複製し、それを溶解し、以降の複製ラウンドにおいて他の腫瘍細胞へと拡散するそれらの能力ゆえに、有望な抗癌剤である。腫瘍溶解性ワクシニアウイルス療法は、前臨床モデル及び臨床研究において、有望であることが示されてきた。しかしながら、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの抗腫瘍効果は最適以下である。これは、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍を通じた限定的なウイルス拡散及び腫瘍内での抗腫瘍T細胞応答の限定的な活性化ゆえである可能性がもっとも高い。したがって、本開示は、1) T細胞腫瘍浸潤及び活性化を促進し、2) ワクシニアウイルスに感染していない腫瘍細胞を効果的に溶解する（バイスタンダー殺傷）、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを提供する。これらの態様は、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの現在の限界を克服する。

【0137】

腫瘍溶解性ウイルスは、DNA又はRNAをそれらの遺伝物質として利用できる。腫瘍溶解性DNAウイルスは、正20面体又は複雑なカプシド対称性を有していてもよい。正20面体腫瘍溶解性DNAウイルスは、裸であってもよく、又はエンベロープを含んでいてもよい。腫瘍溶解性DNAウイルスのファミリーには、アデノウイルス科（Adenoviridae）（たとえば、36～38kbのゲノムサイズを有するアデノウイルス）、ヘルペスウイルス目（Herpesviridae）（たとえば、120～200kbのゲノムサイズを有するHSV1）及びポックスウイルス科（Poxviridae）（たとえば、130～280kbのゲノムサイズを有するワクシニアウイルス及び粘液腫ウイルス）が含まれる。腫瘍溶解性RNAウイルスには、正20面体又はらせんカプシド対称性を有するものが含まれる。正20面体腫瘍溶解性ウイルスはエンベロープがなく裸で

10

20

30

40

50

あり、レオウイルス科 (Reoviridae) (たとえば、22~27 kbのゲノムを有するレオウイルス) 及びピコルナウイルス科 (Picornaviridae) (たとえば、7.2~8.4 kbのゲノムサイズを有するポリオウイルス) を含む。らせん腫瘍溶解性RNAウイルスは、エンベロープで包まれ、ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae) (たとえば、13~16 kbのゲノムサイズを有するVSV) 及びパラミクソウイルス科 (たとえば16~20 kbのゲノムサイズを有するMV及びNDV) を含む。

【0138】

任意のこれらのタイプの腫瘍溶解性ウイルスが、本開示において用いられる。特定の実施形態において、ワクシニアウイルスが用いられる。

10

【0139】

V I . キット

本明細書に記載の任意の組成物が、キットに含まれてもよい。非限定的な一例において、1つ又は複数のウイルス及び／又はウイルスを生成又は操作するための試薬が、キットに含まれてもよい。キットの構成要素は、好適な容器手段中に提供される。

【0140】

キットのいくつかの構成要素は、水性媒体中又は凍結乾燥形態で包装できる。キットの容器手段は、一般に、構成要素を入れることができ、好ましくは好適に等分できる、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリング、又は他の容器手段を含むと考えられる。キットに2つ以上の構成要素が存在する場合、キットはまた、一般に、追加の構成要素を別個に入れることができる第2、第3、又は他の追加容器を含有すると考えられる。しかしながら、構成要素の様々な組合せが1つのバイアル内に含まれる。キットはまた、典型的には、構成要素を含有するための手段を市販用に厳重に密閉されて含むと考えられる。かかる容器には、内部に所望のバイアルが保持された射出成形又はプロー成形プラスチック容器が含まれる。

20

【0141】

キットの構成要素が1つ及び／又は複数の液体溶液中に提供されるとき、液体溶液は水性溶液であり、無菌水性溶液が特に有用である。いくつかの場合において、容器手段は、それ自体シリング、ピペット、及び／又は他のかかる器具であってもよく、そこから配合物を身体の感染領域に適用し、動物に注射し、且つ／又はキットの他の構成要素に適用し且つ／又はそれと混合することさえできる。

30

【0142】

しかしながら、キットの構成要素は、乾燥粉末として提供できる。試薬及び／又は構成要素が乾燥粉末として提供されるとき、粉末は好適な溶媒の添加により液状に戻しうる。溶媒はまた、別の容器手段内に提供されうることが想定される。キットはまた、無菌で薬学的に許容可能な緩衝液及び／又は他の希釀液を含有するための第2の容器手段を含んでいてもよい。

【0143】

特定の実施形態において、治療において使用するためのウイルスは、キットにおいて提供され、いくつかの場合において、ウイルスは本質的にキットの唯一の構成要素である。キットは、所望のウイルスを改変するための試薬及び材料を含んでいてもよい。特定の実施形態において、試薬及び材料は、発現コンストラクト、所望の配列を増幅するためのプライマー、制限酵素、ウイルスを含むための1つ又は複数のDNA、スクレオチド、好適な緩衝液又は緩衝試薬、塩等を含み、いくつかの場合において、試薬は、本明細書に記載のエンゲージャー分子をコードするベクター及び／若しくはDNA並びに／又はそれらのための調節要素を含む。

40

【0144】

特定の実施形態において、キットにおいて、個体から1つ又は複数の試料を抽出するために好適な1つ又は複数の器具がある。器具は、シリング、メス等であってもよい。

【0145】

50

いくつかの場合において、キットはまた、ウイルス実施形態に加えて、第2の癌治療、たとえば化学療法、ホルモン療法、及び／又は免疫療法を含む。キットは、個体のために特定の癌に合わせて製造されてもよく、個体のためのそれぞれの第2の癌治療を含んでいてもよい。

【実施例】

【0146】

以下の実施例は、本開示の好ましい実施形態をより完全に示すために提示される。しかしながら、それらは決して本開示の広い範囲を限定するものとして解釈されないものとする。

【0147】

実施例1

新規癌治療としてのT細胞エンゲージャー強化腫瘍溶解性ウイルス（T E A - O V）
本開示の少なくともいくつかの実施形態の意義は、ワクシニアウイルスに感染していない腫瘍細胞のバイスタンダー殺傷を誘導する独自の能力を有する改善した腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの開発が、増強された抗腫瘍効果をもたらすことである。本明細書において確立されたのは、新規腫瘍溶解性ワクシニアウイルス療法として、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスをT細胞エンゲージャーで強化する原理であり、そのことにより効果的な腫瘍溶解性ウイルス療法の開発のための新たな道を開く。本開示の実施形態の腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、T細胞エンゲージャーを組み込むことにより腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを増強する第1の実施例を代表する。この新しい方略は、様々な形態の腫瘍溶解性ウイルス、たとえば腫瘍溶解性アデノウイルス（A d V）、単純ヘルペスウイルス（H S V）、レオウイルス、粘液腫ウイルス（M Y X V）、ポリオウイルス、水疱性口内炎ウイルス（V S V）、麻疹ウイルス（M V）、及びニューカッスル病ウイルス（N D V）の効果の改善に適用可能である。

10

20

30

40

50

【0148】

重要なことに、本開示の実施形態は、進行固形腫瘍の治療のために有用な治療組成物を提供する。以下の実施例は、ヒト腫瘍異種移植モデルにおける新規腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの効果を評価する。T E A - V V 実施形態は、たとえば、少なくとも現在の治療方略では多くの場合不治であるものを含む進行固形腫瘍の治療に有用である。

【0149】

特定の態様において、T E A - O V 技術は、高度に革新的である。なぜならそれは、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスをT細胞エンゲージャーC D 3 - s c F vで強化することが、増強された抗腫瘍効果をもたらすかどうかを試験したからである。特定の実施形態において、T E A - O V は、1つ又は2つの機構を通じてその抗腫瘍活性を及ぼす。すなわちi) 二重特異性s c F vにより、T細胞が、ワクシニアウイルスに感染していない腫瘍細胞を認識及び殺傷するように導き（バイスタンダー殺傷）、増強された腫瘍溶解をもたらし、ii) C D 3 - s c F vが腫瘍内のT細胞を活性化し、それらが活性化の際に放出するサイトカインが、炎症促進性微小環境を生み出し、腫瘍成長を阻害する。

【0150】

実施例2

進行固形腫瘍のためのT細胞エンゲージャー強化腫瘍溶解性ワクシニアウイルス（T E A - V V）の開発

T細胞が、疾患の初期及び後期の両方において、癌患者における腫瘍成長及び生存率を制御可能であるという証拠が増加している。たとえば、T細胞の養子移入が、ホジキンリンパ腫、上咽頭癌、神経芽腫及び黑色腫を含む播種性腫瘍を効果的に治療することが示された。しかしながら、腫瘍特異的T細胞応答を、癌患者において開始させて維持することは困難であり、それは、イムノエディティング中に選択される、腫瘍細胞の数多くの免疫回避機序により限定的であった。したがって、腫瘍の免疫回避機序を克服する能力をもってT細胞を癌治療に関与させるための代替的方略を開発することが所望されると考えられる。本開示は、かかる方略を提供する。

【0151】

腫瘍溶解性ワクシニアウイルスをT細胞エンゲージャーCD3-scFvで強化することは、T細胞を癌治療に関与させる有用な手段である。CD3-scFvは、CD3-scFv及び腫瘍表面抗原に特異的なscFvからなる二重特異性T細胞エンゲージャー(BiT E)において使用してきた。臨床研究は、BiTE療法が、非ホジキンリンパ腫及びB前駆細胞急性リンパ芽球性白血病に罹患した患者において、かなり効果的な腫瘍細胞の殺傷をもたらすことを示してきた。本開示においては、T細胞エンゲージャーCD3-scFv強化腫瘍溶解性ワクシニアウイルス(TEA-VV)がある。TEA-VVは、T細胞がワクシニアウイルスに感染していない腫瘍細胞を認識及び殺傷する(バイスタンダー殺傷)よう導く二重特異性scFvをコードし、増強された腫瘍溶解をもたらす。加えて、CD3-scFvは、腫瘍内へのT細胞浸潤及びそれらの活性化を促進すると考えられ、それらが活性化の際に放出するサイトカインは、炎症促進性微小環境を作り出すと考えられ、腫瘍成長を阻害する。重要なことに、CD3-scFvは、患者における膨大な数の存在するT細胞クローニングを、腫瘍細胞にリダイレクトすることが可能であり、したがって、腫瘍の多くの免疫回避機序を克服する。加えて、腫瘍溶解性ウイルスは、T細胞エンゲージャーの局所産生を誘導し、これは標的でのより高い濃度を可能にしうる一方で、全身性副作用を減少させる。したがって、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを二重特異性scFvで強化することは、T細胞を癌治療に関与させる代替的アプローチを提供し、バイスタンダー殺傷を誘導することにより、現在のワクシニアウイルス療法の抗腫瘍活性の所望の増加をもたらす(図1)。

10

20

【0152】

CD3-scFv強化ワクシニアウイルスが、進行固形腫瘍のための効果的なウイルス療法アプローチとして開発される。本開示の特定の実施形態において、二重特異性scFvを発現させる腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、CD3及び腫瘍細胞抗原の両方に結合し、腫瘍内へのT細胞浸潤及びワクシニアウイルスに感染していない腫瘍細胞のバイスタンダー殺傷を促進し、増強された抗腫瘍活性をもたらす。本研究において、CD3及び腫瘍細胞抗原EphA2と結合する、分泌性二重特異性scFvとして発現したヒトCD3-scFvを製造した(EphA2-TEA-VV)(図2)。ヒト肺癌細胞株A549に発現する分泌性EphA2-CD3-scFvは、ウイルスに感染していないEphA2陽性A549の殺傷を誘導し、バイスタンダー腫瘍殺傷の誘導を示唆する(図10)。例示的な実施形態(図2)において、EphA2-TEA-VVは、二重特異性EphA2-scFv-CD3-scFvを調節するF17Rプロモーター及び標識、たとえばDsRedを調節するPselプロモーターを含む1つの分子を含む。構成要素の代替的構成もまた好適でありうる。

30

【0153】

いくつかの実施形態において、本開示は、進行固形腫瘍の治療のための効果的な腫瘍溶解性VVを提供する。本開示は、新規腫瘍溶解性VV療法として、腫瘍溶解性VVをT細胞エンゲージャーで強化する原理を確立したのであり、そのことにより改善した腫瘍溶解性ウイルス療法の開発及び使用のための新たな道を開いた。この方略は、様々な形態の腫瘍溶解性ウイルスに適用可能である。

40

【0154】

実施例3

EphA2-TEA-VVの構築

T細胞エンゲージャーをWRワクシニアウイルスのVSC20株のTK遺伝子内に含有するpSELシャトルプラスミドの1バージョンの組換えにより、分泌性EphA2-scFv-CD3-scFv(EphA2-TEA-VV)又はGFP(GFP-VV)を発現するワクシニアウイルス(Western Reserve株)を生成した。最初に、シャトルベクターpSELを構築し、EphA2-scFv-CD3-scFv、又はGFPを含有させた(図2)。挿入されたT細胞エンゲージャーを、F17R後期プロモーターの転写制御下で発現させ、T細胞活性化前の十分なウイルス複製を可能にした。V

50

Vはまた、感染性のモニタリングを可能にするためにD s R e d 2を発現させる(図3)。T Eをコードする組換えウイルスを構築するために、シャトルベクターp S E Lをヒト143TK細胞内に形質移入した。次に、細胞をウイルスV S C 2 0に0.1の感染多度(M O I)で感染させた。3ラウンドのブラーク選択及び増幅とT E Aの発現の確認後、クローンのうちの1つを増幅及び精製のために選択した。

【0155】

実施例4

E P H A 2 - T E A - V Vは分泌性機能的二重特異性E P H A 2 - S C F V - C D 3 - S C F Vを発現させた

E p h A 2 - T E A - V V 感染腫瘍細胞が分泌性二重特異性E p h A 2 - s c F v - C D 3 - s c F vを発現するかどうかを研究した。このために、肺癌細胞株A 5 4 9に、E p h A 2 - T E A - V V又はG F P - V VをM O I 5で形質導入し、インキュベーション24時間後に、細胞培養培地を回収した。次に、新鮮なヒトP B M Cを、V V感染A 5 4 9培養物から回収された培地とともにインキュベートし、続いてE p h A 2 - F I T C(F I T Cで標識されたE p h A 2タンパク質)、C D 8 - P E、及びC D 4 - A P Cで染色した。フロー解析は、E p h A 2 - T E A - V V感染A 5 4 9が、ヒトT細胞及びE p h A 2の両方に結合する機能を有する、分泌性二重特異性E p h A 2 - s c F v - C D 3 - s c F vを発現させたことを示した(図3)。この結果は、E p h A 2 - T E A - V V感染腫瘍細胞が、ヒトT細胞及び腫瘍抗原E p h A 2の両方に結合する能力を有する、分泌性二重特異性E p h A 2 - s c F v - C D 3 - s c F vを発現させたことを示す。

10

20

30

【0156】

実施例5

E P H A 2 - T E 発現はV V複製能を損なわない

E p h A 2 - T EがE p h A 2 - T E A - V Vの複製能を損なわないと示すため、C V - 1細胞及び正常ヒト線維芽細胞にE p h A 2 - T E A - V V、G F P - V V及び親v S C 2 0 V Vを感染させた。C V - 1のE p h A 2 - T E A - V V、G F P - V V、又はv S C 2 0への感染は、様々な時点で類似のウイルス量をもたらした(図5)。対照的に、すべての3つのウイルスについて、正常ヒト線維芽細胞において複製が乏しかった(図5)。したがって、E p h A 2 - T Eは、V V複製に干渉しない。

【0157】

実施例6

E P H A 2 - T E 発現はV Vの腫瘍細胞溶解誘導能を損なわない

ヒトT細胞の非存在下でのE p h A 2 - T E A - V V又はG F P - V Vの腫瘍細胞溶解誘導能を比較した。A 5 4 9細胞に、E p h A 2 - T E A - V V又はG F P - V VをM O Iを増加させながら(0、0.01、0.1、1、又は5)感染させ、ウイルス感染48時間後、A 5 4 9生存率をMTSアッセイにより決定した。A 5 4 9細胞は、使用されたV Vと無関係にM O Iの増加とともに殺傷された(図6)。E p h A 2 - T E A - V VとG F P - V Vとの間に差はなかったのであり、これはE p h A 2 - T Eの発現がV V腫瘍細胞溶解誘導能に干渉しないことを示す。

【0158】

実施例7

E P H A 2 - T E A - V VはヒトT細胞の存在下で有意に増強されたA 5 4 9に対する腫瘍溶解活性を示した

次に、ヒトT細胞の存在下でE p h A 2 - T E A - V Vの腫瘍溶解活性が存在するかどうかを決定した。最初に、A 5 4 9細胞に、E p h A 2 - T E A - V V又はG F P - V Vを0.1のM O Iで感染させた。上述のとおりヒトT細胞を添加し、ウイルス感染24又は48時間後、A 5 4 9生存率をMTSアッセイにより決定した。E p h A 2 - T E A - V Vのみが、ヒトT細胞の存在下で増強された腫瘍溶解活性を24時間(E p h A 2 - T E A - V V対G F P - V V、75%対100%)及び48時間(E p h A 2 - T E A - V V対G F P - V V、35%対81%)で示した(図7)。

40

50

【0159】

EphA2 - TEA - VVがヒトT細胞をA549細胞にリダイレクトするかどうかをさらに決定するため、細胞に、EphA2 - TEA - VVをMOIを増加させながら(MOI 0.001、0.01、0.1、又は1)感染させた。次に、ヒトT細胞、CD4/CD8マイクロビーズを有するPBM Cから単離された未刺激T細胞をA549細胞に、5:1のT細胞対A549の比で添加した。ウイルス感染24、48、72又は96時間後に、A549生存率をMTSアッセイにより決定した。EphA2 - TEA - VVのみに感染したA549細胞を対照とした。EphA2 - TEA - VVはそれ自体で、細胞殺傷を用量依存的な仕方で誘導した。しかしながら、試験されたもっとも高いMOIでも、15%の腫瘍細胞が依然として感染96時間後に生存していた(図8B)。ヒトT細胞の培養物への添加は、抗腫瘍効果を有意に($p < 0.05$)増加させ、すべての腫瘍細胞が感染96時間以内に0.1及び1のMOIで殺傷された(図8A)。

10

【0160】

まとめると、データは、EphA2 - TEA - VVがヒトT細胞をA549細胞にリダイレクトすることを示す。

【0161】

実施例8

EphA2 - TEA - VVはT細胞を活性化させる

EphA2 - TEA - VVにより分泌されるEphA2 - TEがT細胞を腫瘍細胞にリダイレクトするだけでなく、ヒト細胞を活性化させるかどうかを決定するため、A549細胞をEphA2 - TEA - VV又はGFP - VVに1又は0.1のMOIで感染させた。上述のとおりヒトT細胞を添加し、ウイルス感染24又は48時間後、細胞培養培地を回収し、炎症促進性サイトカインの存在をELISAにより決定した。ヒトT細胞は、GFP - VV感染A549及びヒトT細胞のものと比較した、EphA2 - TEA - VV感染A549及びヒトT細胞の細胞培養上清における炎症誘発性サイトカイン、たとえばIFN - ベータ及びIL - 2の産生($p < 0.05$)により証明されるとおり、EphA2 - TEにより活性化させられた。T細胞は、GFP - VV感染A549に応答して、ほとんど又はまったくIFN - ベータ及びIL - 2を産生しなかった(図9)。これらの結果は、T細胞活性化が腫瘍細胞によるEphA2 - TEの発現に依存することを示す。

20

【0162】

実施例9

TEA - VVは非感染腫瘍細胞のバイスタンダー殺傷を誘導した

ワクシニアウイルスに感染していない腫瘍細胞のバイスタンダー殺傷を誘導するTEA - VVの能力を検討した。まず、EphA2陽性肺癌細胞株A549にEphA2 - TEA - VV、mTEA - VV、又はGFP - VVを様々なMOIで形質導入した。細胞培養培地を48時間培養後に回収した。次に、TEA - VV感染A549の培養物から回収された細胞培養培地の存在下で、非感染A549を新鮮なPBM Cと共に培養した。48時間後、腫瘍殺傷をMTSアッセイを使用して測定した。結果は、A549が、EphA2 - TEA - VV感染A549の細胞培養培地の存在下でのみ殺傷されたことを示し、腫瘍細胞のバイスタンダー殺傷を示す(図9)。

30

【0163】

実施例10

ワクシニアウイルスにおけるEphA2 T細胞エンゲージャーは増強された抗腫瘍効果を示す

例示的なEphA2 - TEA - VVの効果を、インビボ腫瘍モデルを使用した、ヒトT細胞の存在下でのその抗腫瘍効果の増強において特徴付けた。

40

【0164】

インビボでのEphA2 - TEA - VVの抗腫瘍効果を研究するため、本発明者らは、皮下A549腫瘍モデルを最初に使用した。A549腫瘍を確立するため、 2×10^6 個のA549細胞を、健常ドナーからの未刺激PBM Cと混合し、SCID - Bgマウスの

50

右側腹部に皮下接種し、続いて 1×10^8 vp の E ph A 2 - T E A - V V 又は G F P - V V を第 0 日に腹腔内注射した。P B S を受けたマウスを対照とした。G F P - V V は、対照マウスにおけるのと比較して、腫瘍成長を中程度に阻害した。対照的に、E ph A 2 - T E A - V V を受けたマウスは、G F P - V V 又は P B S を受けたマウスと比較して、腫瘍成長の有意な減少を示した (E ph A 2 - T E A - V V 対 G F P - V V p < 0.001) (図 11)。加えて、E ph A 2 - T E A - V V はまた、G F P - V V 又は P B S 群と比較して、マウス生存率を大きく増加させた (図 12)。

【0165】

E ph A 2 - T E A - V V の抗腫瘍効果を研究するため、第 0 日にルシフェラーゼ発現 A 5 4 9 細胞 (A 5 4 9 . e G F P . f f l u c) を S C I D - B g マウスに静脈内注射した。第 7 日に、 10×10^6 未処置 P B M C 及び 1×10^8 vp の E ph A 2 - T E A - V V 又は G F P - V V の混合物を静脈内投与した。P B M C のみを受けたマウスを対照とした。生物発光画像法の定量は、G F P - V V プラス P B M C のみが、対照と比較して腫瘍成長を中程度に阻害したことを示した。対照的に、E ph A 2 - T E A - V V プラス P B M C を受けたマウスは、G F P - V V プラス P B M C 又は P B M C のみを受けたマウスと比較して、腫瘍成長の有意な減少を示した (図 12、E ph A 2 - T E A - V V 対 G F P - V V p < 0.05)。したがって、両方の動物モデルにおいて、E ph A 2 - T E A - V V は、G F P - V V と比較して増強された抗腫瘍活性をもたらした。

10

【0166】

実施例 1 1

20

H E R 2 - T E の構築及び機能

分泌性二重特異性 H E R 2 - T E の H E R 2 + 腫瘍細胞の殺傷を誘導する能力を特徴付けるため、分泌性二重特異性 H E R 2 - T E 及び G F P (H E R 2 - T E)、又は G F P のみ (G F P) をコードするレンチウイルスを構築した (図 14 A)。L v - H E R 2 - T E 又は L v - G F P 感染 A 5 4 9 を、非感染 A 5 4 9 (G F P -) と混合し、続いて未刺激 P B M C と 2 日間共培養した。腫瘍細胞殺傷をフローサイトメトリーにより測定した。L v - H E R 2 - T E は、G F P + 及び G F P - A 5 4 9 細胞の両方の殺傷を誘導した一方で、L v - G F P は A 5 4 9 の殺傷を誘導しなかったのであり、これは、感染腫瘍細胞による分泌性二重特異性 T E の発現が、ウイルスに感染していない腫瘍細胞のバイスタンダー殺傷を誘導したことを見出す (図 14 B)。まとめると、これらの結果は、H E R 2 - T E が非感染 A 5 4 9 細胞の C D 3 + T 細胞介在性殺傷を誘導したことを示した。

30

【0167】

実施例 1 2

30

バイ S C F V 直列 H E R 2 - T E 及びダイアボディ H E R 2 - T E の比較

二重特異性直列 H E R 2 - T E 及びダイアボディ H E R 2 - T E の G D 2 + 腫瘍細胞の殺傷を誘導する能力を比較するため、分泌性二重特異性直列 H E R 2 - T E (B i - s c F v - H E R 2 - T E)、ダイアボディ H E R 2 - T E (ダイアボディ - H E R 2 - T E) 又は G F P のみ (G F P) をコードするレンチウイルスを構築した (図 15)。L v - B i - s c F v - H E R 2 - T E 、L v - ダイアボディ - H E R 2 - T E 、又は L v - G F P 感染 H E R 2 + 腫瘍細胞株 A 5 4 9 を、未刺激 P B M C と共に培養した。腫瘍細胞殺傷を顕微鏡下で 24 時間後にモニタリングした。L v - B i - s c F v - H E R 2 - T E 又は L v - ダイアボディ - H E R 2 - T E の両方が、H E R 2 + A 5 4 9 腫瘍細胞の殺傷を効果的に誘導した一方で、L v - G F P は、それらの殺傷を誘導しなかった (図 16 B)。これらの結果は、二重特異性直列 H E R 2 - T E 及びダイアボディ H E R 2 - T E の両方が、H E R 2 + 腫瘍細胞の C D 3 + T 細胞介在性殺傷を効果的に誘導したことを示した。

40

【0168】

実施例 1 3

G D 2 - T E の構築及び機能

二重特異性 G D 2 - T E の G D 2 + 腫瘍細胞の殺傷を誘導する能力を特徴付けるため、

50

分泌性二重特異性 G D 2 - T E 及び G F P (G D 2 - T E)、又は G F P のみ (G F P) をコードするレンチウイルスを構築した (図 16 A)。 L v - G D 2 - T E 又は L v - G F P 感染 G D 2 + 腫瘍細胞株 J F 又は L A N 2 を、未刺激 P B M C と共に培養した。腫瘍細胞殺傷を顕微鏡下でモニタリングした。 L v - G D 2 - T E は、 G D 2 + 腫瘍細胞株 J F 及び L A N 1 の両方の殺傷を誘導した一方で、 L v - G F P はそれらの殺傷を誘導しなかった (図 16 B)。これらの結果は、 G D 2 - T E が G D 2 + 腫瘍細胞の C D 3 + T 細胞介在性殺傷を誘導したことを見た。

【 0169 】

T E A - O V 技術は、癌治療として増強された腫瘍溶解性ウイルスを生成するために開発された。この技術は、任意の既知の腫瘍溶解性ウイルス及び任意の既知の腫瘍抗原に適合できる。腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及び E p h A 2 腫瘍抗原をモデルとして使用して、T 細胞エンゲージャーを発現する腫瘍溶解性ウイルスが、 i) E p h A 2 陽性腫瘍細胞を殺傷し、 ii) ウィルスに感染していない E p h A 2 陽性腫瘍細胞のバイスタンダーキルを誘導することが示された。この技術は、ウイルス癌治療の分野全体について広い適用範囲を有し、選択される任意の腫瘍溶解性ウイルス及び腫瘍抗原に適合できる。

10

【 0170 】

実施例 14

例示的な実施例

肝細胞癌 (H C C) のための H N 3 - T E 及び G C 3 3 - T E の構築及び機能 (H N 3 及び G C 3 3 は、 H C C 抗原 G l y p i c a n - 3 に対する 2 つの抗体クローニングである) 。二重特異性 E p h A 2 - T E 、 H N 3 - T E 及び G C 3 3 - T E の H C C の殺傷を誘導する能力を特徴付けるため、分泌性二重特異性 E p h A 2 - T E 、 H N 3 - T E 、 G C 3 3 - T E 、及び G D 2 - T E をコードするレトロウイルス (R v) を構築した (図 17 A)。レトロウイルス感染ヒト P B M C を H C C 株 H u h 7 又は H e p G 2 と共に培養し、腫瘍細胞傷害性を 6 時間 C r 放出 C T L アッセイにより決定した。結果は、 E p h A 2 - T E 、 H N 3 - T E 、又は G C 3 3 - T E が、 H C C H u h 7 又は H e p G 2 の溶解を効果的に誘導したことを示した。

20

【 0171 】

図 18 は、三量体又は二量体形態の 4 - 1 B B L 強化 T 細胞エンゲージャーが構築されるのを示す。三量体 - 4 1 B B L - H E R 2 - T 細胞エンゲージャーは、安定な三量体を形成するコラーゲン X V N C 1 ドメイン (c o l) の N 末端三量化領域をコードする。二量体 - 4 1 B B L - H E R 2 - T 細胞エンゲージャーは、安定な二量体を形成するヒト I g G 1 C H 2 C H 3 ドメインをコードする。 4 - 1 B B L は、 T N F スーパーファミリーに属し、その二量体又は三量体形態は、有意な副刺激機能のために必要とされる。

30

【 0172 】

図 19 は、 4 - 1 B B L 強化 T E A - V V の増強された抗腫瘍効果を示す。 4 - 1 B B L 強化 T E A - V V は、 T E A - V V の抗腫瘍効果を 3 つの機序を通じて増強する。すなわち、 1) T 細胞エンゲージャーの三量化又は二量化が s c F v の標的に対する結合親和性を増加させる、 2) 4 1 B B - L が T 細胞をさらに活性化させる、 3) 4 1 B B - L 副刺激が、 T 細胞に調節性 T 細胞により媒介される免疫抑制を克服する能力を付与する。

40

【 0173 】

図 20 は、副刺激シグナリング 4 - 1 B B L が、腫瘍殺傷効果をさらに増強し、 T 細胞活性化を誘導したことを示す。 4 1 B B L - H E R 2 - T 細胞エンゲージャー又は制御レンチウイルスベクターを発現するレンチウイルスを生成した (L v - G F P 、 L v - H E R 2 - T E 、 L v - 二量体 - 4 1 B B L - H E R 2 - T E 、又は三量体 - 4 1 B B L - H E R 2 - T E)。ヒト A 5 9 4 - G F P 肺腫瘍細胞 (H E R 2 陽性) を、レンチウイルスに感染させ、未刺激ヒト P B M C と共に培養した。 4 8 時間後、 4 - 1 B B L の副刺激が、 T E A - V V の溶解活性を有意に増強したことが観察された。加えて、細胞培養上清をサイトカイン E L I S A のために回収した。炎症誘発性サイトカイン、たとえば I F N 及び I L 2 の産生により判断されるとおり、未刺激ヒト P B M C を 4 1 B B L により活性化

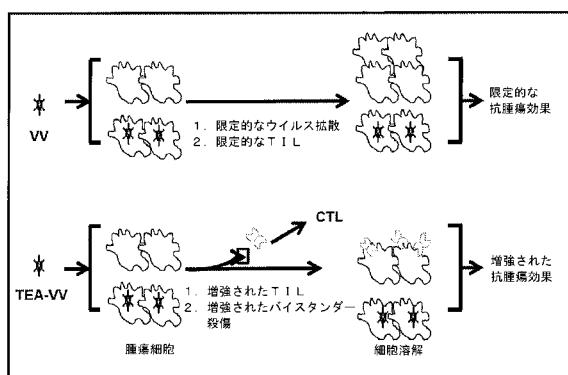
50

させた（図21）。

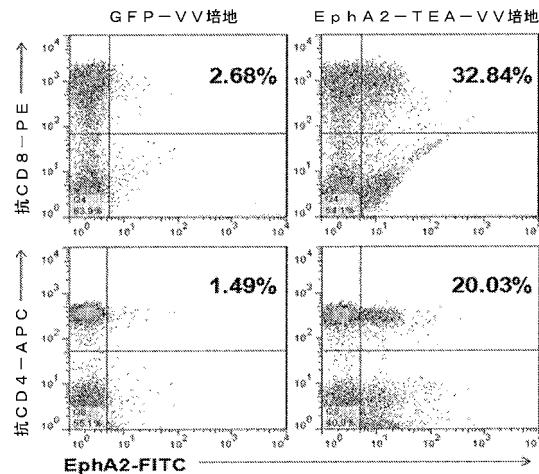
【0174】

本発明及びその利点が詳細に記載されたとはいえ、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の趣旨及び範囲を逸脱することなく、様々な変更、置換及び改変が本明細書においてなされうることが理解されるべきである。さらに、本願の範囲は、本明細書に記載のプロセス、機械、製造、物の組成、手段、方法及び工程の特定の実施形態に限定されることが意図されてはいない。本発明の開示から当業者が容易に認めると考えられるよう¹⁰に、現在存在しているか又は後になって開発され、本明細書に記載の対応する実施形態と実質的に同じ機能を果たすか、又は実質的に同じ結果を達成するプロセス、機械、製造、物の組成、手段、方法、又は工程は、本発明により利用できる。したがって、添付の特許請求の範囲はその範囲内に、かかるプロセス、機械、製造、物の組成、手段、方法、又は工程を含むことが意図されている。

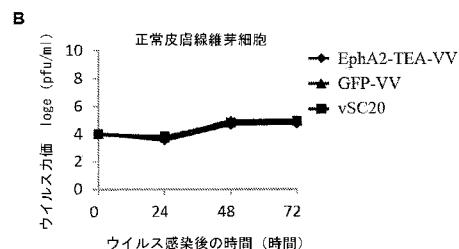
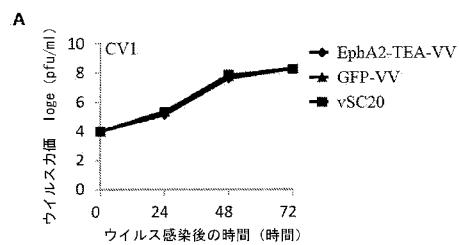
【図1】



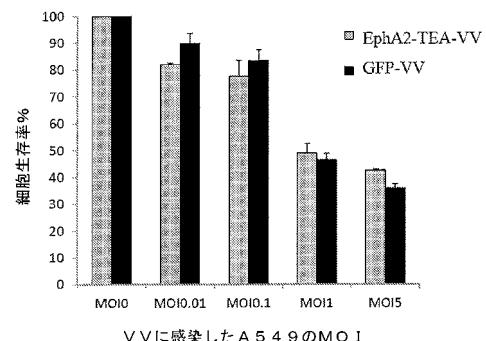
【図4】



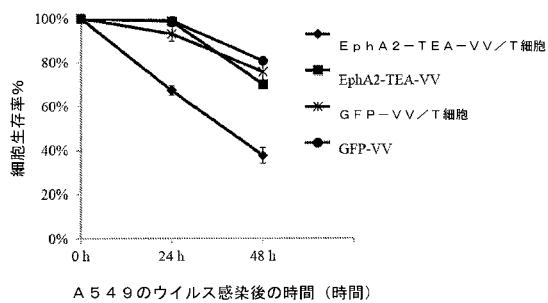
【図5】



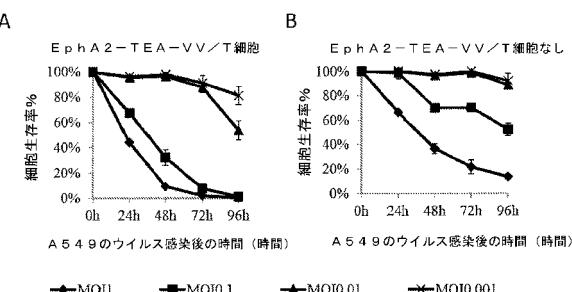
【図6】



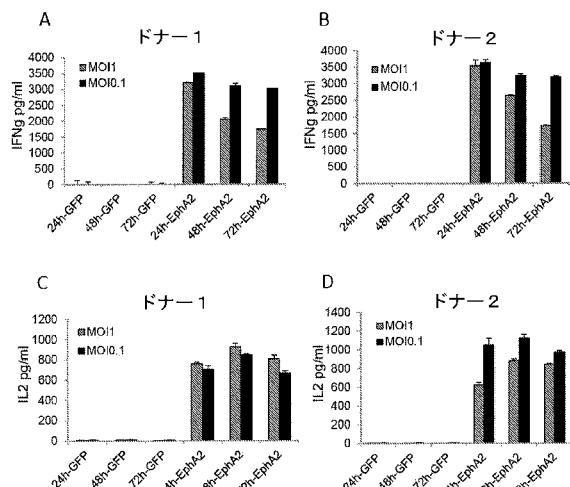
【図7】



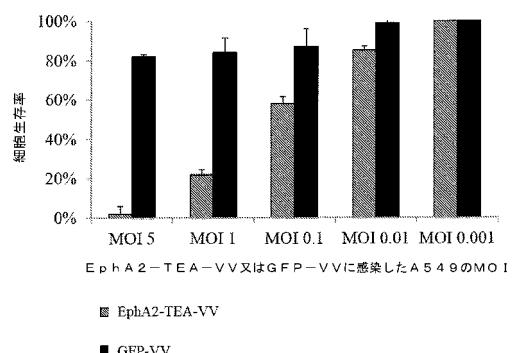
【図8】



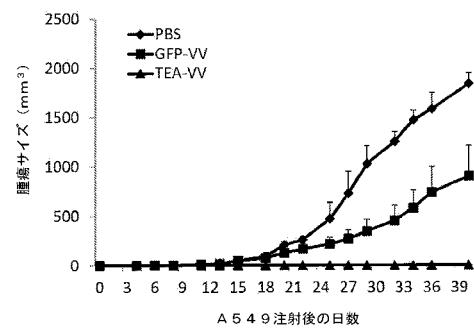
【図9】



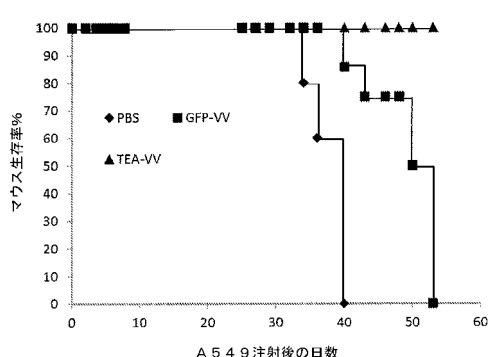
【図10】



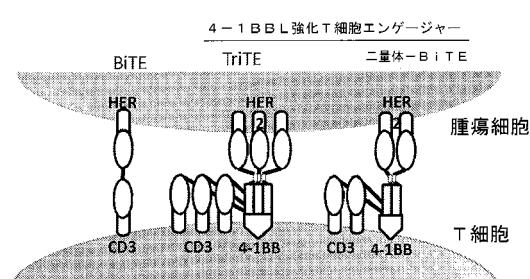
【図11】



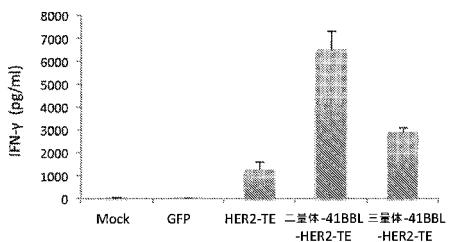
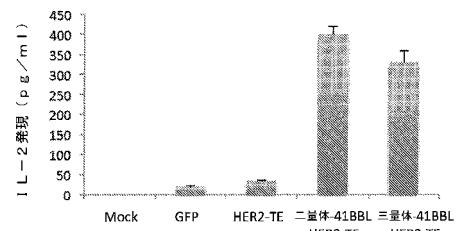
【図12】



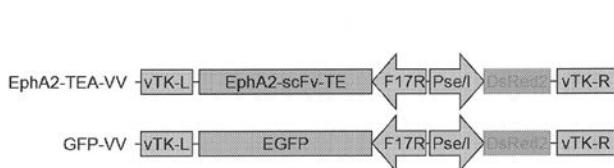
【図19】



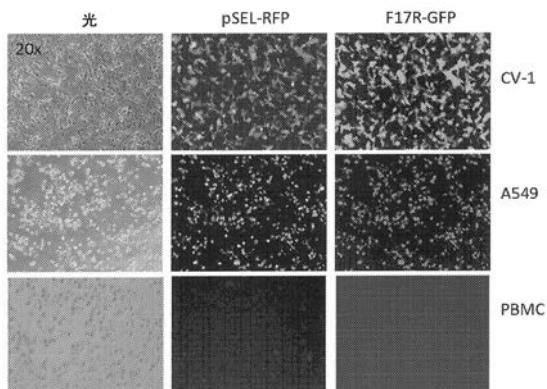
【図21】



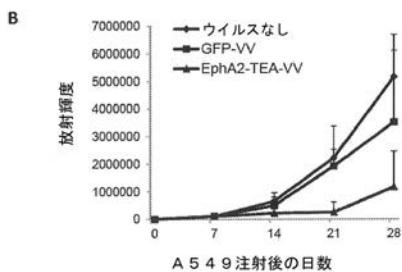
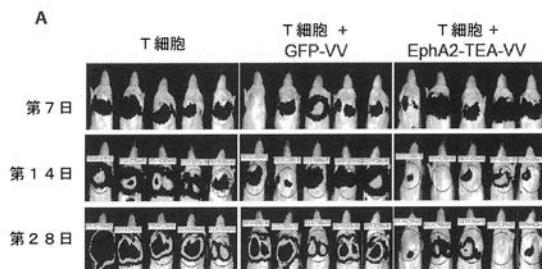
【図2】



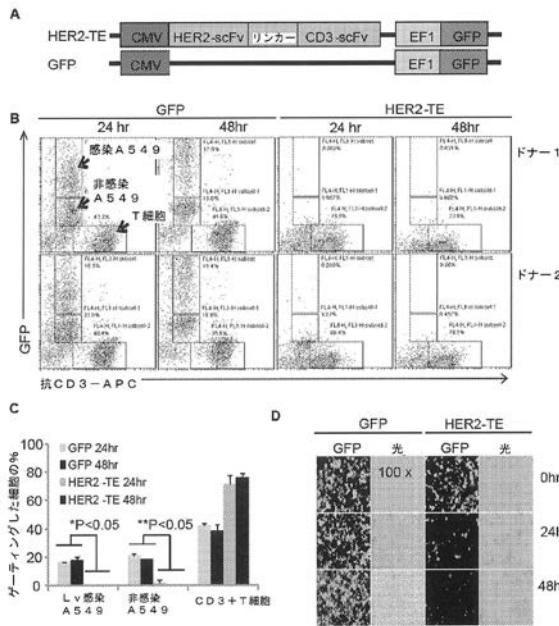
【図3】



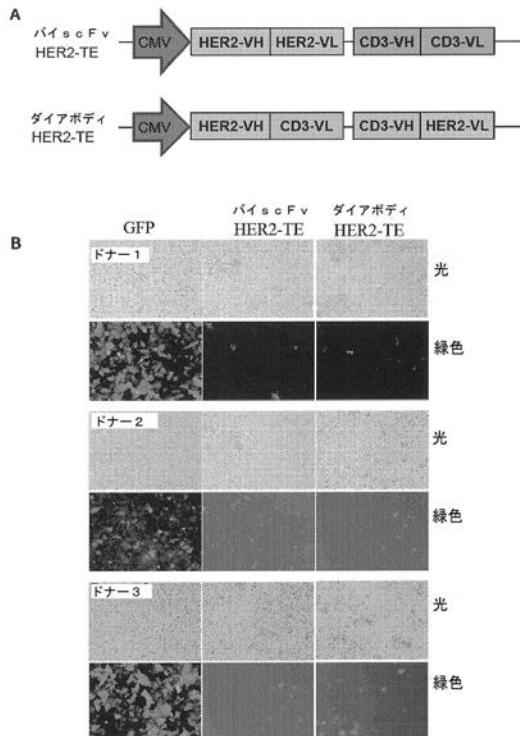
【図 1 3】



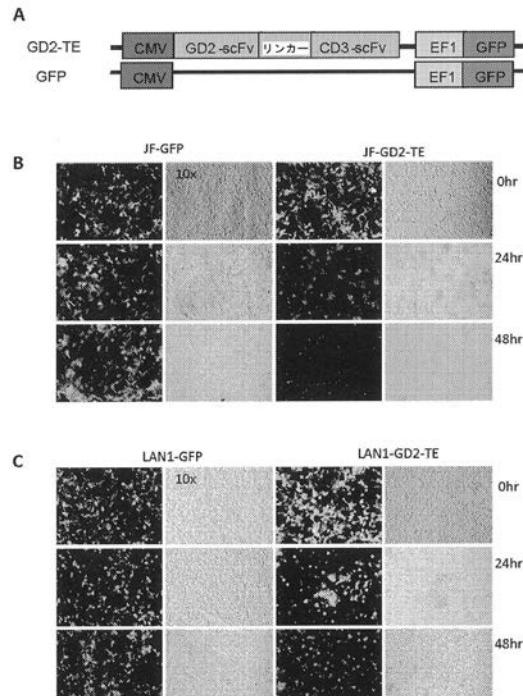
【図 1 4】



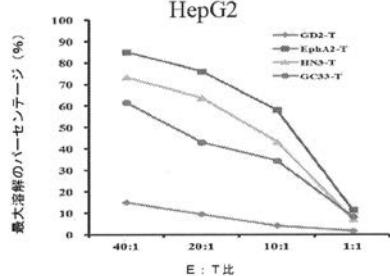
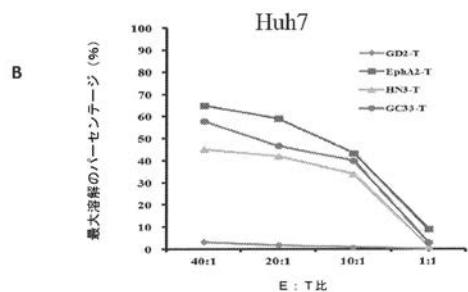
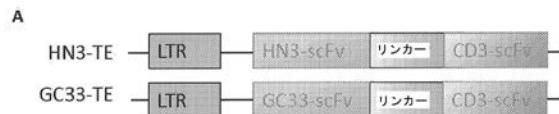
【図 1 5】



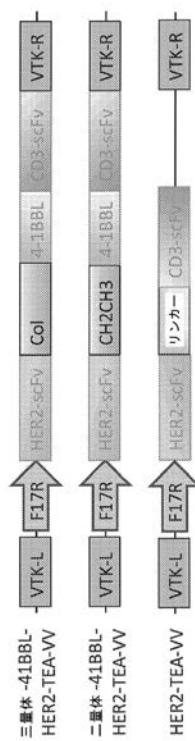
【図 1 6】



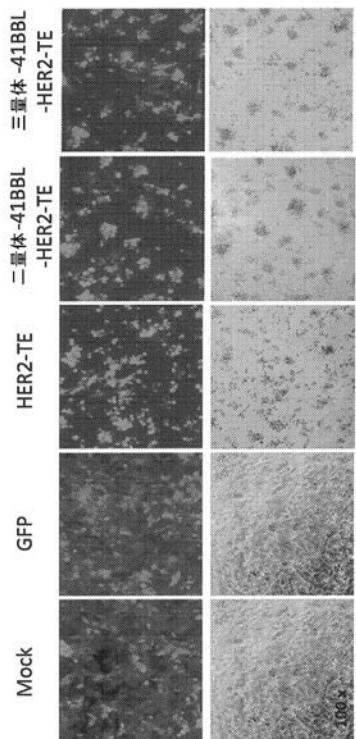
【図17】



【図18】



【図20】



【配列表】

2016512199000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2014/020935
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K35/76 C12N27/24 C07K16/28 C07K16/30 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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J CONNER ET AL: "A strategy for systemic delivery of the oncolytic herpes virus HSV1716: redirected tropism by antibody-binding sites incorporated on the virion surface as a glycoprotein D fusion protein", <i>GENE THERAPY</i> , vol. 15, no. 24, 14 December 2008 (2008-12-14), pages 1579-1592, XP055123512, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2008.121 the whole document ----- -/-/	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
2 July 2014	29/07/2014	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hix, Rebecca	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/020935

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIU FANG ET AL: "Cancer gene therapy of adenovirus-mediated anti-4-1BB scFv in immunocompetent mice.", CANCER BIOLOGY & THERAPY MAR 2008, vol. 7, no. 3, March 2008 (2008-03), pages 448-453, XP002725948, ISSN: 1555-8576 the whole document -----	1-11
Y	LIU FANG ET AL: "Anti-4-1BB scFv immunogene therapy and low dose cyclophosphamide exhibit a synergistic antitumor effect in established murine lung tumors.", CANCER BIOLOGY & THERAPY APR 2009, vol. 8, no. 8, April 2009 (2009-04), pages 707-713, XP002725949, ISSN: 1555-8576 the whole document -----	1-11
Y	MENOTTI L ET AL: "A herpes simplex virus recombinant that exhibits a single-chain antibody to HER2/neu enters cells through the mammary tumor receptor, independently of the gD receptors", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 80, no. 11, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 5531-5539, XP002498830, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.02725.05 the whole document -----	1-11
Y	KAH-WHYE PENG ET AL: "Oncolytic measles viruses displaying a single-chain antibody against CD38, a myeloma cell marker", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 101, no. 7, 1 April 2003 (2003-04-01) , pages 2557-2562, XP002656476, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2002-07-2195 [retrieved on 2002-11-14] the whole document -----	1-11
Y	COLE CAROLINE ET AL: "Tumor-targeted, systemic delivery of therapeutic viral vectors using hitchhiking on antigen-specific T cells", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 11, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 1073-1081, XP002470982, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM1297 the whole document -----	1-11
2		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/020935

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAMMOND SCOTT A ET AL: "Selective targeting and potent control of tumor growth using an EphA2/CD3-bispecific single-chain antibody construct", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 67, no. 8, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 3927-3935, XP002578205, ISSN: 0008-5472 the whole document -----	1-11
Y	TSAI Y-S ET AL: "Enhancement of antitumor activity of gammaretrovirus carrying IL-12 gene through genetic modification of envelope targeting HER2 receptor: a promising strategy for bladder cancer therapy.", CANCER GENE THERAPY JAN 2010, vol. 17, no. 1, January 2010 (2010-01), pages 37-48, XP002725950, ISSN: 1476-5500 the whole document -----	1-11
A	WEAVER ERIC A ET AL: "Comparison of adenoviruses as oncolytics and cancer vaccines in an immunocompetent B cell lymphoma model.", HUMAN GENE THERAPY SEP 2011, vol. 22, no. 9, September 2011 (2011-09), pages 1095-1100, XP002725951, ISSN: 1557-7422 the whole document -----	1-11
A	WO 2009/091826 A2 (UNIV TEXAS [US]; COOPER LAURENCE J N [US]; MANURI PALLAVI [US]; OLIVAR) 23 July 2009 (2009-07-23) the whole document -----	1-11
E	WO 2014/047350 A1 (MORNINGSIDE TECHNOLOGY VENTURES LTD [MC]; NOLIN WESTLEY B [US]) 27 March 2014 (2014-03-27) the whole document -----	1-11
Y, P	US 2013/071414 A1 (DOTTI GIANPIETRO [US] ET AL) 21 March 2013 (2013-03-21) the whole document -----	1-11
T	YU FENG ET AL: "T-cell engager-armed oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy.", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY JAN 2014, vol. 22, no. 1, January 2014 (2014-01), pages 102-111, XP002725956, ISSN: 1525-0024 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/020935

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009091826 A2	23-07-2009	NONE	
WO 2014047350 A1	27-03-2014	NONE	
US 2013071414 A1	21-03-2013	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 12 N 7/01 (2006.01)	C 12 N 7/01	Z N A
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A

(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,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 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

(72) 発明者 ユイ、フォン

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210-600ディー、
ワン ベイラー プラザ

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA07 DA02 EA04 FA01 GA11
 4B065 AA90X AA90Y AA95X AB01 BA02 CA44
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA05 ZB26