

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7674243号

(P7674243)

(45)発行日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(24)登録日 令和7年4月28日(2025.4.28)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

Z N A

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 21 (全48頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-525181(P2021-525181)

(86)(22)出願日 令和1年10月29日(2019.10.29)

(65)公表番号 特表2022-528024(P2022-528024  
A)

(43)公表日 令和4年6月8日(2022.6.8)

(86)国際出願番号 PCT/AU2019/051189

(87)国際公開番号 WO2020/087116

(87)国際公開日 令和2年5月7日(2020.5.7)

審査請求日 令和4年10月31日(2022.10.31)

(31)優先権主張番号 2018904117

(32)優先日 平成30年10月30日(2018.10.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
オーストラリア(AU)

(31)優先権主張番号 2019903255

(32)優先日 令和1年9月4日(2019.9.4)

最終頁に続く

(73)特許権者 521197450

ピーター・マッカラム・キャンサー・イ  
ンスティテュートオーストラリア・ヴィクトリア・3 0 0  
0・メルボルン・グラッタン・ストリー  
ト・3 0 5

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 マイケル・カーショウ

オーストラリア・ヴィクトリア・3 2 2  
6・オーシャン・グローヴ・ビーチーズ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C A Rを発現する免疫細胞に抗原提示細胞を係合させるための二重特異性ポリペプチド及  
びそれらの使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

キメラ抗原受容体 (C A R)を発現する免疫細胞による治療を受けた又は受けている対象  
における固形腫瘍の治療における使用のための二重特異性ポリペプチドを含む医薬組成物  
であって、前記C A Rは、前記腫瘍上の抗原に結合し、前記C A Rは、親和性タグを有し、

前記二重特異性ポリペプチドは、第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを含み、前記  
第1結合ドメインは、前記対象の内因性プロフェッショナル抗原提示細胞 (A P C)上で発  
現する抗原に特異的に結合し、前記内因性プロフェッショナルA P Cは、腫瘍細胞ではな  
く；前記第2結合ドメインは、前記免疫細胞の前記C A R上の前記親和性タグに特異的に  
結合し、

前記内因性プロフェッショナル抗原提示細胞上で発現する前記抗原は、

(i) 前記腫瘍上の抗原ではない；

(i i) 前記腫瘍上の腫瘍関連抗原である抗原ではない；又は

(i i i) 同じ組織タイプの非腫瘍細胞と比較して前記腫瘍によって示差的に発現しない、  
医薬組成物。

## 【請求項2】

対象における固形腫瘍の治療のための、二重特異性ポリペプチド及び前記腫瘍上の抗原  
に結合するキメラ抗原受容体 (C A R)を発現する免疫細胞を含む医薬組成物であって、前  
記C A Rは、親和性タグを有し、

前記二重特異性ポリペプチドは、第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを含み、前記

第1結合ドメインは、前記対象の内因性プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）上で発現する抗原に特異的に結合し、前記内因性プロフェッショナルAPCは、腫瘍細胞ではなく；前記第2結合ドメインは、前記免疫細胞の前記CAR上の前記親和性タグに特異的に結合し、

前記内因性プロフェッショナル抗原提示細胞上で発現する前記抗原は、

（i）前記腫瘍上の抗原ではない；

（ii）前記腫瘍上の腫瘍関連抗原である抗原ではない；又は

（iii）同じ組織タイプの非腫瘍細胞と比較して前記腫瘍によって示差的に発現しない、医薬組成物。

【請求項3】

前記第1結合ドメインが、同じ組織タイプの非腫瘍細胞と比較して前記腫瘍によって過剰発現しない抗原に結合する、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】

前記第1結合ドメインが、前記抗原が前記腫瘍によって発現するよりも前記APCによってより高いレベルで発現する内因性プロフェッショナルAPC上の抗原に結合する、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項5】

前記免疫細胞が、T細胞、NK細胞、細胞傷害性Tリンパ球、TIL及び制御性T細胞から成る群から選択される、請求項1～4の何れか一項に記載の組成物。

【請求項6】

前記免疫細胞が、T細胞である、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記免疫細胞が、自家細胞に由来する、請求項1～6の何れか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記免疫細胞が、同種異系細胞に由来する、請求項1～6の何れか一項に記載の組成物。

【請求項9】

前記二重特異性ポリペプチドが、MHC-ハロタイプ非依存的に前記免疫細胞の活性化及び増殖を刺激する、請求項1～8の何れか一項に記載の組成物。

【請求項10】

前記対象の前記内因性プロフェッショナルAPCが、樹状細胞又はマクロファージである、請求項1～9の何れか一項に記載の組成物。

【請求項11】

前記対象の前記内因性プロフェッショナルAPCが、樹状細胞である、請求項1～10の何れか一項に記載の組成物。

【請求項12】

前記CAR上の前記親和性タグが、c-mycタグ、FLAGタグ、HAタグ、Hisタグ、Sタグ、SBPタグ、Strepタグ、eXACTタグ、GSTタグ、MBPタグ又はGFPタグから選択される、請求項1～11の何れか一項に記載の組成物。

【請求項13】

前記第1結合ドメインが、CD40、CLEC9A、MHCII、PD-L1、PD-L2、ガレクチン、CD11c、CD19及びCD83から選択される前記内因性プロフェッショナルAPC上の抗原に結合する、請求項1～12の何れか一項に記載の組成物。

【請求項14】

CD40が、前記固形腫瘍上で発現しない、請求項1～13の何れか一項に記載の組成物。

【請求項15】

CD40が、前記固形腫瘍上の腫瘍関連抗原ではない、請求項1～13の何れか一項に記載の組成物。

【請求項16】

CD40が、同じ組織タイプの非腫瘍細胞と比較して前記固形腫瘍によって示差的に発

10

20

30

40

50

現しない、請求項 1 ～ 13 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記固形腫瘍が、乳腫瘍、膵腫瘍、結腸腫瘍、又は肺腫瘍である、請求項 1 ～ 16 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

CAR-T細胞を受けた又は受けている対象における固形腫瘍の治療における使用のための、二重特異性ポリペプチドを含む医薬組成物であって、前記CAR-T細胞の前記CARは、親和性タグを有し、

前記二重特異性ポリペプチドは、第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを含み、前記第1結合ドメインは、前記対象の内因性プロフェッショナル抗原提示細胞(APC)上で発現する抗原に特異的に結合し；前記内因性プロフェッショナルAPCは、樹状細胞であり、腫瘍細胞ではなく；前記第2結合ドメインは、前記免疫細胞の前記CAR上の親和性タグに特異的に結合し、

前記内因性プロフェッショナル抗原提示細胞上で発現する前記抗原は、

(i) 前記腫瘍上の抗原ではない；

(ii) 前記腫瘍上の腫瘍関連抗原である抗原ではない；又は

(iii) 同じ組織タイプの非腫瘍細胞と比較して前記腫瘍によって示差的に発現しない、医薬組成物。

【請求項 19】

対象における固形腫瘍の治療における使用のための、二重特異性ポリペプチド及びCAR-T細胞を含む医薬組成物であって、前記CAR-T細胞の前記CARは、親和性タグを有し、

前記二重特異性ポリペプチドは、第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを含み、前記第1結合ドメインは、前記対象の内因性プロフェッショナル抗原提示細胞(APC)上で発現する抗原に特異的に結合し；前記内因性プロフェッショナルAPCは、樹状細胞であり、腫瘍細胞ではなく；前記第2結合ドメインは、前記免疫細胞の前記CAR上の親和性タグに特異的に結合し、

前記内因性プロフェッショナル抗原提示細胞上で発現する前記抗原は、

(i) 前記腫瘍上の抗原ではない；

(ii) 前記腫瘍上の腫瘍関連抗原である抗原ではない；又は

(iii) 同じ組織タイプの非腫瘍細胞と比較して前記腫瘍によって示差的に発現しない、医薬組成物。

【請求項 20】

前記第1結合ドメインが、前記腫瘍細胞上の腫瘍関連抗原ではない抗原に結合する、請求項 18 又は 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記第1結合ドメインが、同じ組織タイプの非腫瘍細胞と比較して前記腫瘍細胞によって過剰発現しないか、又は同じ組織タイプの非腫瘍細胞と比較して前記腫瘍によって示差的に発現しない、抗原に結合する、請求項 18 又は 19 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、概して、抗原提示細胞(APC)に結合することができる第1結合ドメイン及びT細胞に結合することができる第2結合ドメインを含む、その部分を含む二重特異性ポリペプチド及びその使用に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本願は、これによりそれらの全内容が参照により本明細書に組み込まれる、2018年10月30日出願のオーストラリア国仮特許出願第2018904117号明細書及び2019年9月4日出願の同第2019903255号明細書からの優先権を主張するもの

10

20

30

40

50

である。

【背景技術】

【0003】

養子細胞移入（ACT）は、癌治療のための感動的な可能性を証明しつつある。ACTでは、多数の自家腫瘍応答性T細胞が、患者に再注入される前にインビトロで生成される。腫瘍応答性T細胞は、血液又は腫瘍から単離し、ペプチド及び／又はサイトカインによる刺激を用いてインビトロで増殖させることができる。現在までのACTへの最も印象的な応答は、T細胞移入がIL-2の投与並びに化学療法及び／又は全身照射を包含するブリコンディショニングレジメンと一緒に患者93例中52例（56%）において客観的応答を生じさせた黒色腫等の特定の腫瘍タイプにおいて観察されており、この場合には患者93例中20例が完全寛解を達成し、それらの患者20例中19例は治療後5年間を超えて進行中の永続的な完全緩解を示している（非特許文献1）。骨髓移植後にエプスタイン・バー・ウイルス（EBV）関連性リンパ組織増殖性疾患を有する患者もまたACTから利益を得ることができ、実質的に全ての患者が、EBC特異的T細胞の養子移入後に、疾患の完全消退を達成した（非特許文献2）。しかしながら、他のタイプの癌に対する応答性を備える自家T細胞が単離されることは、希である。

10

【0004】

ACTに対するT細胞の応答性を向上させる方法としては、固形癌及び血液癌を含む大多数の悪性腫瘍に対する腫瘍応答性T細胞を生成するための患者リンパ球の遺伝子改変が挙げられる。遺伝子改変の2つの主要なアプローチは、T細胞受容体（TCR）又はキメラ抗原受容体（CAR）をコードする遺伝子を包含する。CARは、T細胞のエフェクター機能を腫瘍細胞に向け直すT細胞シグナル伝達ドメインと融合した抗体由来ドメインから成る。どちらのアプローチもT細胞を腫瘍応答性にさせることができるが、非MHC限定性であるCARアプローチは、より広範囲の患者により幅広く適用することができる。

20

【0005】

CARは様々な形態を取り得るが（非特許文献3）、典型的には腫瘍関連抗原（TAA）に対して特異的な抗体の一本鎖可変断片（scFv）から成る細胞外ドメインから構成される。このscFvは、ヒンジドメイン及び膜貫通ドメインを介して、1つ以上のシグナル伝達部分から構成される細胞内領域に連結されている。CARは、Her2、CEA、FBP、CD19及びCD209を含む一連のTAAに対する特性を備えて開発されてきた。最も進歩的な臨床試験は、B細胞白血病及びリンパ腫を治療するためのCD19に対して特異的なCARを利用してきた（非特許文献3）。2017年には、これらのCD19-CAR T細胞療法のうちの2つが、米国FDAによってB細胞性悪性腫瘍を治療するために承認された（非特許文献4）。これらの結果にもかかわらず、固形腫瘍について報告された客観的応答は余り多くないが、これはCAR T細胞の活性化、増殖及び存続が不十分であること及び／又は免疫抑制性の腫瘍微小環境に起因する可能性がある。

30

【0006】

このタイプの療法を最適化する試みは、CAR T細胞のα-PD-1モノクローナル抗体との共治療（非特許文献5）、シグナル伝達及びサイトカイン経路の遺伝子改変（非特許文献6）並びにアゴニスト性α-4-1BBモノクローナル抗体（mAB）（非特許文献7）、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）等のアジュバントの使用を含む腫瘍誘導性免疫抑制を克服するために設計された他の治療アプローチと組み合わせることをもたらしてきた。これらのアプローチの一部は、造血性癌細胞においてT細胞増殖をもたらし得るT細胞と癌細胞との間の直接相互作用を可能にすることに成功することを証明してきたが、固形癌の状況において有意な増殖が観察されたことは希である（非特許文献8）。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Hinrichs et al., 2014, Immunology Review

50

ws, 257 (1) : 56-71

【文献】Heslop et al., 2010, Blood, 115 (5) : 925-35

【文献】Kershaw et al., 2013, Nature Reviews Cancer, 13 (8) : 525-41

【文献】Kymriah, Novartis and Yescarta, Kite Pharma/Gilead

【文献】John et al., 2013, Clinical Cancer Research, 19 : 5636-46

【文献】Koneru et al., 2015, Oncoimmunology, 4 : e994446

【文献】Mardiana et al., 2017, Cancer Research

【文献】Huehls et al., 2015, Immunological Cell Biology, 93 (3) : 290-6

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

CAR T細胞を送達するための治療アプローチの最適化は、多剤治療歴を有する患者からの細胞のリンパ球数が低く、状態が不良であるために、インビトロでのCAR T細胞の増殖及び生成において直面する困難によって悪影響を受けることが多い（米国食品医薬品局：KYMRIAH（チサゲンレクルユーセル）、2017年8月30日）。更に、十分なドナー細胞を入手できる場合でさえ、患者にこれらの療法の有効用量を提供するにはかなりの数の細胞を生成することが必要とされ、健常ドナーからの同種異系細胞がこの問題にとっての解決策であることが示唆されてきたが、移植片対宿主病（GVHD）をもたらし得る、ドナーとレシピエントとの間のヒト白血球抗原（HLA）ミスマッチ等の数多くの問題がある。従って、ACTのためのCAR T細胞のインビトロ及びインビボ増殖を改善するための新規な試薬の開発に対する差し迫った必要が依然としてある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本明細書に開示した一態様では、第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを含む二重特異性ポリペプチドであって、第1結合ドメインは、抗原提示細胞（APC）上、好ましくはプロフェッショナルAPC上で発現する抗原に特異的に結合する抗体若しくは抗体断片であり、及び第2結合ドメインは、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫細胞上の抗原に特異的に結合する抗体若しくは抗体断片である二重特異性ポリペプチドが提供される。

【0010】

本明細書に開示した一態様では、第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを含む二重特異性ポリペプチドであって、第1結合ドメインは、抗原提示細胞（APC）上で発現する抗原に特異的に結合する抗体若しくは抗体断片であり、第2結合ドメインは、免疫細胞によって発現したキメラ抗原受容体（CAR）に特異的に結合する抗体若しくは抗体断片である二重特異性ポリペプチドが提供される。

【0011】

本明細書に開示した別の態様では、本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドをコードする核酸が提供される。

【0012】

本明細書に開示した別の態様では、制御配列に作動可能に連結した本明細書に記載した核酸配列を含むベクターが提供される。

【0013】

本明細書に開示した別の態様では、本明細書に記載したベクターを含む細胞が提供される。

【0014】

本明細書に開示した別の態様では、二重特異性ポリペプチドを生成するための方法であって：（i）二重特異性ポリペプチドを発現させるために好適である培養培地中及び条件下で本明細書に記載した細胞を培養するステップ；及び（ii）発現した二重特異性ポリペプチドを細胞又は培養培地から単離するステップを含む方法が提供される。

【0015】

本明細書に開示した別の態様では、本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。

【0016】

本明細書に開示した別の態様では、癌を治療するための方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の：（i）CARを発現する免疫細胞；及び（ii）本明細書に開示した二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物を共投与するステップを含み、ここで二重特異性ポリペプチドが、対象の内因性APC上で発現した抗原及び免疫細胞上の抗原に同時に結合し、好ましくは免疫細胞上の抗原はCAR上の抗原であり、それにより癌を治療するための免疫細胞のインビボでの活性化及び増殖を刺激する方法が提供される。

10

【0017】

本明細書に開示した別の態様では、インビボでの免疫細胞の活性化及び増殖を刺激するための方法であって、対象に有効量の：（i）CARを発現する免疫細胞；及び（ii）本明細書に開示した二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物を共投与するステップを含み、ここで二重特異性ポリペプチドは対象の内因性APC上で発現した抗原及び免疫細胞上の抗原に同時に結合し、好ましくは免疫細胞上の抗原はCAR上の抗原であり、それにより免疫細胞のインビボでの活性化及び増殖を刺激する方法が提供される。

20

【0018】

本明細書に開示した別の態様では、インビトロでの免疫細胞の活性化及び増殖を刺激するための方法であって：（i）APC又はAPC模擬体、及び（ii）本明細書に開示した二重特異性ポリペプチドを含む培養培地中でCARを発現する単離免疫細胞を培養するステップを含み、ここで二重特異性ポリペプチドが、APC又はAPC模擬体上で発現した抗原及び免疫細胞上の抗原に同時に結合し、好ましくは免疫細胞上の抗原はCAR上の抗原であり、それにより免疫細胞のインビトロでの活性化及び増殖を刺激する方法が提供される。

【0019】

本明細書に開示した別の態様では、癌を治療するための医薬品の製造における本明細書に記載した二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物の使用が提供される。

30

【0020】

更に別の態様では、癌の治療において使用するための、本明細書に記載した二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物が提供される。

【0021】

更に別の態様では、本発明は、本発明の1種以上の二重特異性ポリペプチド、上述した前記二重特異性ポリペプチドをコードする核酸及び／又は医薬組成物を含むキット又は製造品を提供する。

【0022】

他の態様では、上述した治療適用において使用するためのキットであって：

（a）本発明の二重特異性ポリペプチド、核酸、ベクター若しくは医薬組成物を保持する容器；及び

（b）使用上の注意を備えるラベル又は添付文書を含むキットが提供される。

40

【0023】

所定の実施形態では、キットは、癌を治療するための1種以上の活性成分又は有効成分を更に含み得る。例えば、キットは、CARを発現する免疫細胞を更に含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0024】

50

【図1】CAR T細胞上の抗原に対して特異的である結合ドメインは、Exp i 2 9 3細胞発現系を使用して発現させられ得ることを示す図である。

【図2】全長二重特異性ポリペプチドは、293T細胞系及びリポフェクタミン系を使用して発現させられ得ることを示す図である。(A~B) BEAT1を発現している293T細胞からのタンパク質溶解物のHisタグについてのウェスタンブロットの写真画像(9E10-M5/114)。

【図3】全長二重特異性ポリペプチドは、293T細胞系及びjetPEI系を使用して発現させられ得ることを示す図である。(A~B) BEAT2(MHCI/c-myc)及びBEAT3(CD40/CD3)を発現している293T細胞からのタンパク質溶解物のHisタグについてのウェスタンブロットの写真画像。

【図4】全長二重特異性ポリペプチドは、細胞均質化後に細胞から発現且つ遊離させられ得ることを示す図である。(A) 6ウェルプレートからの均質化した0.75%のSup e+細胞、及び(B) 6ウェルプレートからの非均質化細胞ペレットからのBEAT2(MHCI/c-myc)及びBEAT3(CD40/CD3)を発現している293T細胞からのタンパク質溶解物のHisタグについてのウェスタンブロットの写真画像。

【図5】二重特異性ポリペプチドであるブドウ球菌腸毒素B(Staphylococcus Enterotoxin B)(SEB)がT細胞増殖及びIFN- $\gamma$ 分泌を媒介することを示す図である。(A) SEBの存在下又は非存在下(x軸)におけるB6マウス又はヒトPBMC由来の脾細胞に対するT細胞増殖(y軸)のグラフ表示。(B) SEBの存在下又は非存在下におけるB6マウス又はヒトPBMC由来の脾細胞(x軸)に対するIFN- $\gamma$ 分泌(y軸)のグラフ表示。(C) SEBの存在下又は非存在下における48時間後の定着E0771-Her2乳癌腫瘍を有するマウスの脾臓内でのTCR-V $\beta$ 8+細胞のパーセンテージ(x軸)のグラフ表示。\* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$ (スチューデントのt検定)。

【図6A】CAR T細胞の抗腫瘍有効性がインビボでのSEBの共投与によって増強されることを示す図である。(A) 定着E0771-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する腫瘍のサイズ(mm<sup>2</sup>;y軸)のグラフ表示。(B) 定着24JK-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する腫瘍のサイズ(mm<sup>2</sup>;y軸)のグラフ表示。(C) 定着MC38-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する腫瘍のサイズ(mm<sup>2</sup>;y軸)のグラフ表示。エラーバー:SEM。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ (スチューデントのt検定)。(D) まさにSEB単独又はCAR T細胞単独の投与を受けたマウスを含む、定着E0771-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する腫瘍のサイズ(mm<sup>2</sup>;y軸)のグラフ表示。他に言及しない限り、非治療群とSEB+CAR群との間で有意性を比較した。

【図6B】CAR T細胞の抗腫瘍有効性がインビボでのSEBの共投与によって増強されることを示す図である。(A) 定着E0771-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する腫瘍のサイズ(mm<sup>2</sup>;y軸)のグラフ表示。(B) 定着24JK-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する腫瘍のサイズ(mm<sup>2</sup>;y軸)のグラフ表示。(C) 定着MC38-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する腫瘍のサイズ(mm<sup>2</sup>;y軸)のグラフ表示。エラーバー:SEM。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ (スチューデントのt検定)。(D) まさにSEB単独又はCAR T細胞単独の投与を受けたマウスを含む、定着E0771-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する腫瘍のサイズ(mm<sup>2</sup>;y軸)のグラフ表示。他に言及しない限り、非治療群とSEB+CAR群との間で有意性を比較した。

【図6C】CAR T細胞の抗腫瘍有効性がインビボでのSEBの共投与によって増強されることを示す図である。(A) 定着E0771-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する腫瘍のサイズ(mm<sup>2</sup>;y軸)のグラフ表示。(B) 定着24JK-Her2乳癌を有するマウスにおける時間(治療後日数;x軸)に対する

10

20

30

40

50

腫瘍のサイズ ( $\text{mm}^2$ ; y 軸) のグラフ表示。(C) 定着 MC38-Her2 乳癌を有するマウスにおける時間 (治療後日数; x 軸) に対する腫瘍のサイズ ( $\text{mm}^2$ ; y 軸) のグラフ表示。エラーバー: SEM。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (スチューデントの t 検定)。(D) まさに SEB 単独又は CAR T 細胞単独の投与を受けたマウスを含む、定着 E0771-Her2 乳癌を有するマウスにおける時間 (治療後日数; x 軸) に対する腫瘍のサイズ ( $\text{mm}^2$ ; y 軸) のグラフ表示。他に言及しない限り、非治療群と SEB + CAR 群との間で有意性を比較した。

【図 6 D】CAR T 細胞の抗腫瘍有効性がインビボでの SEB の共投与によって増強されることを示す図である。(A) 定着 E0771-Her2 乳癌を有するマウスにおける時間 (治療後日数; x 軸) に対する腫瘍のサイズ ( $\text{mm}^2$ ; y 軸) のグラフ表示。(B) 定着 24JK-Her2 乳癌を有するマウスにおける時間 (治療後日数; x 軸) に対する腫瘍のサイズ ( $\text{mm}^2$ ; y 軸) のグラフ表示。(C) 定着 MC38-Her2 乳癌を有するマウスにおける時間 (治療後日数; x 軸) に対する腫瘍のサイズ ( $\text{mm}^2$ ; y 軸) のグラフ表示。エラーバー: SEM。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (スチューデントの t 検定)。(D) まさに SEB 単独又は CAR T 細胞単独の投与を受けたマウスを含む、定着 E0771-Her2 乳癌を有するマウスにおける時間 (治療後日数; x 軸) に対する腫瘍のサイズ ( $\text{mm}^2$ ; y 軸) のグラフ表示。他に言及しない限り、非治療群と SEB + CAR 群との間で有意性を比較した。

【図 7】腫瘍への CAR T 細胞の浸潤が SEB の共投与によって増強されることを示す図である。SEB の非存在下 (A) 又は存在下 (B) における CD8 で染色した細胞のグラフ表示。CAR + SEB では、暗色染色は、浸潤している CAR T 細胞 (即ち、CD8<sup>+</sup>) を表す。スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ 。

【図 8】CAR 特異的結合ドメインの結合が CAR 媒介性 T 細胞機能を妨害しないことを示す図である。(A) E0771-Her2 細胞及びコントロール又は抗 myc 抗体 (y 軸) と共にインキュベートした CAR T 細胞の IFN- $\gamma$  分泌 ( $\text{pg/mL}$ ; y 軸) のグラフ表示。(B) 抗 myc 抗体の存在下又は非存在下 (x 軸) において E0771-Her2 細胞と共培養した CAR T 細胞の細胞傷害性 (殺滅率 (%); y 軸) のグラフ表示。

【図 9】二重特異性ポリペプチド (即ち、BEAT) がインビトロでの CAR T 細胞増殖を促進することを示す図である。CSFE で標識し、72 時間に渡り BEAT (抗 CD40/抗 myc) 又は抗 CD40 及び抗 myc 抗体の混合物と共にインキュベートした、トランスジェニック CAR マウス由来の脾細胞の細胞数を示すグラフ表示。

【図 10】BEAT が CAR T 細胞の活性化及び増殖を媒介することを示す図である。BEAT の 3 つの例は、myc タグ (CAR 中に存在する) に対して特異的な抗体を様々なサブセットの APC 上で発現している CD40、PD-L2 又は Clec9a の何れかに対して特異的である抗体に化学的にコンジュゲート化させることによって生成した。マウス CAR T 細胞を BEAT の存在下又は非存在下において (APC の起源としての) マウス脾細胞と共にインキュベートした。CAR の発現が欠如する T 細胞をコントロールとして使用した。(列挙した) 非コンジュゲート化抗体の存在下での CAR T 細胞と APC とのインキュベーションもまたコントロールとして使用した。(A) 各 BEAT の存在下で、CAR T 細胞 (右のパネル) は IFN- $\gamma$  を分泌するが、コントロール T 細胞 (左のパネル) は分泌しない。(B) CAR T 細胞は、蛍光色素 CFSE を装填し、各代替 BEAT の存在下又は非存在下において APC と共にインキュベートした。増殖の程度は、コントロール非形質移入 T 細胞 (左のパネル) と比較して、形質移入 CAR T 細胞の蛍光強度の減少 (右のパネル) から明らかである。

【図 11】CD40-myc BEAT がマウスにおける E0771-Her2 乳癌の根絶を可能にすることを示す図である。定着皮下 E0771-Her2 腫瘍を有する Her2-トランスジェニックマウスは、CAR T 細胞 ( $2 \times 10^6$ , i. v.) 及び/又は myc-CD40 に対して特異的な BEAT (第 0 日に 36  $\mu\text{g}$ , i. p.) を用いて治療した。他のマウス群は、非コンジュゲート化抗 myc 及び抗 CD40 抗体の投与を受け

10

20

30

40

50

た、又は非治療のまま置かれた（コントロール）。（A）腫瘍増殖率及び（B）マウス生存率。1群当たりマウス6匹を用いた3件の独立実験を表すデータ。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.001$ 、対応のないスチューデントのt検定。

【図12A】CD40-myc BEATが腫瘍内でのT細胞の蓄積を可能にすることを示す図である。皮下E0771-Her2腫瘍を有するマウスは、抗HER2 CAR T細胞（ $2 \times 10^6$ 、i.v.）をCD40-myc BEAT（第0日に $36 \mu\text{g}$ 、i.p.）と一緒に投与された。他のマウスは、CAR T細胞若しくはBEAT単独の投与を受けた、又は非治療のまま置かれた（コントロール）。（A）治療開始後第7日に、腫瘍を採取し、分離し、CD8+T細胞を検出するために染色し、フローサイトメトリーを用いて分析した。1群当たり3匹の個別マウスを表すデータ。（B）腫瘍をホルマリン固定し、切片作製し、DAPI（青色）及び抗CD8（褐色）により染色した。列挙した治療を受けているマウスからの3切片を表す画像を示した。

10

【図12B】CD40-myc BEATが腫瘍内でのT細胞の蓄積を可能にすることを示す図である。皮下E0771-Her2腫瘍を有するマウスは、抗HER2 CAR T細胞（ $2 \times 10^6$ 、i.v.）をCD40-myc BEAT（第0日に $36 \mu\text{g}$ 、i.p.）と一緒に投与された。他のマウスは、CAR T細胞若しくはBEAT単独の投与を受けた、又は非治療のまま置かれた（コントロール）。（A）治療開始後第7日に、腫瘍を採取し、分離し、CD8+T細胞を検出するために染色し、フローサイトメトリーを用いて分析した。1群当たり3匹の個別マウスを表すデータ。（B）腫瘍をホルマリン固定し、切片作製し、DAPI（青色）及び抗CD8（褐色）により染色した。列挙した治療を受けているマウスからの3切片を表す画像を示した。

20

【図13】CAR T細胞がマウスにおいて長期間存続することを示す図である。脾臓は、CAR T細胞+CD40-myc BEATによるE0771-Her2腫瘍の根絶後に長期間（ $> 200$ 日間）生残しているマウス（左のパネル）又はナীবマウス（右のパネル）から採取し、CAR T細胞を検出するために抗myc及びCD8により染色した。マウス3匹を表すデータ。

【図14】CAR T細胞+BEAT療法後にHer2-陽性腫瘍を拒絶していたマウスがHer2陽性腫瘍による再投与に対して完全に抵抗性をであることを示す図である。Her2特異的CAR T細胞及びCD40-myc BEATによって媒介された皮下E0771-Her2腫瘍を根絶した長期生存マウスに、反対側の側腹上で皮下注射により同一のHer2陽性腫瘍細胞（ $5 \times 10^5$ ）を再投与した。腫瘍増殖率（上のパネル）及びマウス生存率（下のパネル）。腫瘍増殖は、コントロールとしてのナীবマウスにおいて描出した。（再投与群のマウス8匹及びコントロール群の6匹、 $***p < 0.001$ 、 $***p < 0.0001$ ）。

30

【図15】Her2陰性腫瘍増殖は、CAR T細胞及びBEAT療法によって媒介されたHer2-陽性腫瘍を拒絶していたマウスでは阻害される。以前にHer2特異的CAR T細胞及びCD40-myc BEAT投与後のE0771-Her2腫瘍を拒絶していたマウスを同一のHer2発現が欠如するE0771（細胞 $5 \times 10^5$ 個）を用いて反対側の側腹上で再投与した。ナীবマウスにおける腫瘍増殖をコントロールとして示した。腫瘍増殖率（上のパネル）及びマウス生存率（下のパネル）。（再投与群のマウス15匹及びコントロール群のマウス5匹、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 、 $****p < 0.0001$ ）。

40

【図16】CD40-mycコンジュゲート化BEATと組み合わせた抗Her2 CAR T細胞がマウスにおけるMC38-Her2結腸癌の増殖を阻害することを示す図である。定着皮下MC38-Her2腫瘍を有するマウスを抗Her2 CAR T細胞（ $2 \times 10^6$ 、i.v.）及びCD40-myc BEAT（第0日に $36 \mu\text{g}$ ）により治療した。他のマウス群は、CAR T細胞若しくは（列挙した）抗体単独の投与を受けた、又は非治療のまま置かれた（コントロール）。マウス7匹を有していたBEAT+CAR群を除き、1群当たりマウス6匹であった。 $**p < 0.01$ ）。

【図17】PD-L2-myc及びClec9a BEATコンジュゲートが、腫瘍増殖

50

のCAR T細胞による阻害を可能にすることを示す図である。APC発現分子であるPD-L2若しくはClec9aに対して特異的なBEATは、モノクローナル抗体の抗myc抗体への化学的コンジュゲート化によって調製した。定着皮下E0771-Her2腫瘍を有するマウスは、列挙した治療を受けた、又は非治療のまま置かれた（コントロール）（1群当たり3～6匹、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ ）。

【図18】組み換えヒトCD40-myc BEATがヒトCAR T細胞の増殖を媒介することを示す図である。CAR T細胞は、Her2特異的CARのレトロウイルス導入を用いてヒト末梢血から生成した。CAR T細胞（ $2 \times 10^5 / \text{mL}$ ）をCFSEにより標識し、APCの起源としての5Gy照射CTV標識ヒト血液白血球の存在下（左のパネル）において、化学的コンジュゲート化又は組み換えCD40-myc BEAT（コンジュゲート化 $3 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、組み換え $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）を用いて、又は用いずに5日間インキュベートした。空ベクターを用いて形質移入したT細胞は、コントロール（右のパネル）として機能した。細胞は、フローサイトメトリーを用いて分析した。

【図19】組み換えヒトCD40-myc BEATがCAR T細胞からのIFN- $\gamma$ 分泌を増強することを示す図である。ヒトCAR T細胞は、抗Her2 CARをコードするレトロウイルスベクターを用いて末梢血から生成した。CAR T細胞は、化学的に又は組み換えにより調製したCD40-myc BEATの存在下又は非存在下において5日間に渡りAPCの起源としてのヒト血液白血球と共にインキュベートした。抗CD3は、陽性コントロールとして一部の培養ウェル内に含まれた。上清を採取し、ELISAを用いてIFN- $\gamma$ について分析した。

【図20】コンジュゲート化ヒトBEATと組み合わせたヒトCAR T細胞は、マウスにおける腫瘍増殖を阻害する。定着皮下MDA-MB-231ヒト乳腺腫瘍を有するNod-SCID- $\gamma$  (NSG) マウスは、コンジュゲート化ヒトCD40-myc BEATを含む又は含まないCAR T細胞の投与を受けた（第0日、 $36 \mu\text{g}$ 、i.p.）。APCの起源として機能させるために、ヒト血液由来白血球（ $1 \times 10^6$ ）もまた静脈内注射により送達した。1群のマウスは、コントロールとして非治療のまま置かれた。（1群当たりマウス5匹、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 、スチューデントのt検定）。

【図21】BEATは、一連の腫瘍抗原に対して特異的なCARを発現するT細胞及びCAR内の様々な位置に配置された様々な抗原を含むCARを発現するT細胞からの応答を誘導することができる。腫瘍抗原CEAを結合するためのCARを有し、及びmycタグ（CEA-myc CAR）を有するT細胞は、マウス脾細胞並びにmycに結合するための第1結合ドメイン及びCD40に結合するための第2結合ドメインを有するBEATと共にインキュベートしたときにより多くのIFN- $\gamma$ （ $\text{pg} / \text{mL}$ ；y軸）を分泌した。腫瘍抗原Her2を結合するためのCARを有し、及びCARのN末端に位置するa-FLAGタグ（Her2-FLAG CAR）を有するT細胞は、マウス脾細胞並びにFLAGに結合するための第1結合ドメイン及びCD40に結合するための第2結合ドメインを有するBEATと共にインキュベートした場合により多くのIFN- $\gamma$ を分泌した。FLAG及びCD40に対して特異的なBEATは、CD40発現脾細胞の存在下においてHer2-FLAG CAR T細胞からのIFN- $\gamma$ 分泌もまた誘導した。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本明細書の全体を通して、状況が他のことを要求しない限り、用語「含む（comprise）」又は「含む（comprises）」若しくは「含んでいる（comprising）」等の変形は、規定の要素若しくは整数又は要素若しくは整数の群の包含を意味するが、任意の他の要素若しくは整数又は要素若しくは整数の群を排除しないことを意味すると理解されるであろう。

【0026】

本明細書における任意の先行刊行物（又はそれに由来する情報）についての、又は公知である任意の物質についての言及は、先行刊行物（又はそれに由来する情報）又は公知の

10

20

30

40

50

内容がこの明細書が関連する努力の分野における一般的知識の一部を形成することのいかなる形での確認、承認若しくは示唆ではない、及びその確認若しくは承認であると見なすべきではない。

【0027】

他に特別に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって通例理解される意味と同一の意味を有すると見なすべきである。

【0028】

他に特に指示しない限り、本明細書で利用する分子生物学、細胞培養及び実験技術は、当業者には周知である標準手技である。そのような技術は、例えば、それらの全部が参照により本明細書に組み込まれる J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996) 及び F. M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub 等の出典において文献を通して記載及び説明されている。本明細書に記載した方法は、当分野において周知であると考えられ、読者の便宜性のために提供される。本明細書で言及した全ての他の刊行物は、それらの全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【0029】

本明細書で使用する単数形「1つの」及び「その」には、状況が明確に他のことを指示しない限り、複数の態様が含まれる。従って、例えば、「ポリペプチド」についての言及には、単一ポリペプチド、並びに2つ以上のポリペプチドが含まれ；「抗原提示細胞 (APC)」についての言及には、単一 APC 並びに2つ以上の APC が含まれる等である。

【0030】

アミノ酸及びヌクレオチド配列は、下記の表1に示したように、配列識別番号（配列番号）によって言及される。

【0031】

10

20

30

40

50

## 【表 1】

表 1.

| 配列番号 | 名称                      | 配列のタイプ |
|------|-------------------------|--------|
| 1    | CD40 scFv               | 核酸     |
| 2    | CD40 scFv               | アミノ酸   |
| 3    | MHCII scFv              | 核酸     |
| 4    | MHCII scFv              | アミノ酸   |
| 5    | CD3 scFv                | 核酸     |
| 6    | CD3 scFv                | アミノ酸   |
| 7    | c-myc-tag scFv          | 核酸     |
| 8    | c-myc-tag scFv          | アミノ酸   |
| 9    | リンカー1                   | 核酸     |
| 10   | リンカー1                   | アミノ酸   |
| 11   | リンカー2                   | 核酸     |
| 12   | リンカー2                   | アミノ酸   |
| 13   | リンカー3                   | 核酸     |
| 14   | リンカー3                   | アミノ酸   |
| 15   | CD40/c-myc-tag (BEAT1)  | 核酸     |
| 16   | BEAT1                   | アミノ酸   |
| 17   | MHCII/c-myc-tag (BEAT2) | 核酸     |
| 18   | BEAT2                   | アミノ酸   |
| 19   | CD40/CD3 (BEAT3)        | 核酸     |
| 20   | BEAT3                   | アミノ酸   |
| 21   | MHCII/CD3 (BEAT4)       | 核酸     |
| 22   | BEAT4                   | アミノ酸   |
| 23   | BEAT1 ベクター              | 核酸     |
| 24   | BEAT2 ベクター              | 核酸     |
| 25   | BEAT3 ベクター              | 核酸     |
| 26   | BEAT4 ベクター              | 核酸     |

## 【0032】

本開示は、少なくとも一部には、CAR T細胞の二重特異性ポリペプチドを用いた抗原提示細胞（APC）との係合が、治療効果を達成するために必要とされるCAR T細胞の有効用量を減少させながら、傷害性を伴わずに高度の腫瘍阻害を伴ってインビトロ及びインビボでのT細胞増殖を増強するという本発明者らの予想外の発見において予測されている。重要なことに、CAR T細胞は、免疫抑制性腫瘍微小環境から離れた場所でリンパ組織における活性化シグナル及び増殖シグナルを受信する。

## 【0033】

このため、本明細書に開示した一態様では、第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを含む二重特異性ポリペプチドであって、第1結合ドメインが、抗原APC上で発現する抗原に特異的に結合する抗体若しくは抗体断片であり、第2結合ドメインは、免疫細胞によって発現したキメラ抗原受容体（CAR）上の抗原に特異的に結合する抗体若しくは抗体断片である二重特異性ポリペプチドが提供される。

## 【0034】

## 二重特異性ポリペプチド

本明細書で使用する用語「二重特異性ポリペプチド」は、2種の異なる標的抗原に同時に特異的に結合し得るポリペプチドを意味する。本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドは、それらのそれぞれが単一標的抗原に特異的に結合する、2つの構造的に別個の結合ドメイン（即ち、領域）を含む。二重特異性ポリペプチドは、APC上の標的抗原及び

CARを発現する免疫細胞上の異なる標的抗原に結合するために使用することができる。更に、二重特異性ポリペプチドは、APC上の標的抗原及び免疫細胞によって発現したCAR上の異なる標的抗原に結合するために使用することができる。二重特異性ポリペプチドは、1つ以上の抗体若しくは抗体断片（例えば、1つ以上のscFv）のポリペプチド配列（即ち、ドメイン）を含み得る。別の実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、1つ以上のリガンドのポリペプチド配列を含み得る。

#### 【0035】

一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、第1scFv及び第2scFvを有するタンデム一本鎖可変断片抗体（taFv）である。

#### 【0036】

本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドは、「APC及びT細胞の二重特異性エンゲージャー」又は「BEAT」と様々に言うことができる。

#### 【0037】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」及び「タンパク質性分子」は、アミノ酸残基のポリマーを含む、若しくはそれから成る分子及び同一物の変異体及び合成類似体を指すために、本明細書では互換的に使用される。従って、これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が合成の非天然型アミノ酸、例えば対応する天然型アミノ酸の化学的類似体であるアミノ酸ポリマーに、並びに天然型アミノ酸ポリマーに適用される。

#### 【0038】

本明細書で使用する用語「アミノ酸」は、天然型アミノ酸及び合成アミノ酸並びに天然型アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模擬体を指す。天然型アミノ酸は、遺伝子コードによってコードされたアミノ酸並びに例えばヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタメート及びO-ホスホセリン等の後に修飾されるそれらのアミノ酸である。アミノ酸類似体は、天然型アミノ酸と同一の基本化学構造を有する化合物、例えば、水素、カルボキシル基、アミノ基及びR基に結合している炭素を指す。そのような類似体は、修飾R基（例えば、ノルロイシン）又は修飾ペプチド主鎖を有し得る。アミノ酸模擬体は、アミノ酸の一般化学構造とは異なるが、天然型アミノ酸と同様に機能する構造を有する化学的化合物を指す。

#### 【0039】

アミノ酸は、本明細書では、それらの一般に使用されるフルネーム（例えば、システイン）、それらの一般に公知の3文字記号（例えば、Cys）又はIUPAC-IUB生化学命名法によって推奨される1文字記号（例えば、C）によって言及することができる。ヌクレオチドは、同様に、それらの一般に許容された1文字コードによって言及することができる。

#### 【0040】

本明細書で使用する用語「抗原」は、本明細書では「抗体」、「抗体断片」又は「二重特異性ポリペプチド」によって結合される分子を指す。抗原は、その場合には免疫グロブリンによって結合されたタンパク質上の部位が「エピトープ」と呼ばれる免疫グロブリンによって認識されるタンパク質であり得る。一実施形態では、抗原は、細胞表面受容体（例えば、MHCI I、Clec9a、PD-L1、PD-L2、ガレクチン、CD11c、CD19、CD40及びCD83）のリガンドであり得る。別の実施形態では、抗原は、免疫細胞によって発現したCAR上のタグである。

#### 【0041】

本明細書で使用する用語「抗原提示細胞」若しくは「APC」は、プロフェッショナル抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、上皮細胞等）又は非プロフェッショナル抗原提示細胞（例えば、線維芽細胞、胸腺上皮細胞、甲状腺上皮細胞、グリア細胞、脾臓β細胞等、血管内皮細胞等）であり得る。好ましい実施形態では、APCは、プロフェッショナル抗原提示細胞であり、腫瘍細胞ではない。

#### 【0042】

一実施形態では、第1結合ドメインは、MHCI I、Clec9a、PD-L1、PD

10

20

30

40

50

ーL2、ガレクチン、CD11c、CD19、CD40及びCD83から成る群から選択されるAPC上で発現した抗原に特異的に結合する。MHCIIは、樹状細胞(DC)、単核食細胞、一部の内皮細胞、胸腺上皮細胞及びB細胞上で発現する；Clec9aは、BDCA+樹状細胞及び小さなサブセットのCD14+/CD16-単球上で発現する；PD-L1及びPD-L2は、マクロファージ、骨髄性DC、B細胞及び血管内皮細胞上で発現する；ガレクチンは、Tヘルパー細胞及びB細胞によって発現する；CD11cは、DCによって高レベルで発現する；CD19は、B細胞及び小胞性DCを成熟させるために全プロフェッショナルB細胞上で発現する；CD40は、樹状細胞、B細胞及びマクロファージによって発現する；並びにCD83は、主として成熟DCによって発現する。好ましい実施形態では、第1結合ドメインによって特異的に結合される抗原は、腫瘍関連抗原ではない。

10

#### 【0043】

一実施形態では、第2結合ドメインは、CAR又は類似の受容体を発現する免疫細胞上の抗原に特異的に結合する。更に別の実施形態では、本発明の二重特異性ポリペプチドの第2結合ドメインは、免疫細胞上の抗原に結合し得るが、ここで抗原はCARの一部ではないが、免疫細胞の細胞表面上に存在する抗原である。

#### 【0044】

所定の実施形態では、免疫細胞は、典型的には遺伝子組み換えT細胞若しくはNK細胞であるが、ここで遺伝子組み換えT細胞若しくはNK細胞上の抗原は、CARの一部である。これらの実施形態によると、本発明の二重特異性ポリペプチドの第2結合ドメインは、CARの細胞外部分に結合し得る。第2結合ドメインは、CARの抗原結合ドメインに結合し得る、又は第2結合ドメインは、抗原結合に含まれていないCARの細胞外領域に結合し得る。

20

#### 【0045】

所定の実施形態では、免疫細胞上に存在するCARは、第2結合ドメインと結合するために更に追加のアミノ酸若しくは分子を含み得る。当分野において公知であるように、CAR構築物は、典型的には抗体によって特異的に認識される短鎖のアミノ酸配列である「タグ」を含むように設計することができる。一部の実施形態では、免疫細胞は、タグを含むCARを発現するように遺伝子組み換えされたT細胞若しくはNK細胞である。そのような実施形態の状況では、二重特異性ポリペプチドの第2結合ドメインは、タグに結合し得る、又はタグ以外のCARの領域に結合し得る。免疫細胞がタグを含むCARを発現するために遺伝子組み換えされたT細胞若しくはNK細胞である一部の実施形態では、二重特異性ポリペプチドの第2結合ドメインは、タグ以外のCARの一領域に結合する。

30

#### 【0046】

CAR上に存在するタグの具体的な例としては、ペプチドタグ（例えば、FLAGタグ、HAタグ、Hisタグ、Mycタグ、Sタグ、SBPタグ、Streptタグ、eXactタグ）及びタンパク質タグ（例えば、GSTタグ、MBPタグ、GFPタグ、抗体若しくは他のタンパク質に結合するためのドメインの形態にあるタグ、核タンパク質（ロイジンジッパー等）又はCARへの任意の他のタンパク質修飾）が挙げられる。一実施形態では、CAR上の抗原又は親和性タグは、c-Mycタグである。

40

#### 【0047】

一部の実施形態では、免疫細胞は、タグを含まないCARを発現するように遺伝子組み換えされたT細胞又はNK細胞である。一部の実施形態では、免疫細胞は、タグを含まないCARを発現するように遺伝子組み換えされたT細胞若しくはNK細胞、又は任意の異種腫瘍関連抗原若しくは腫瘍関連抗原の断片である。

#### 【0048】

所定の実施形態では、免疫細胞は、CARを発現するように遺伝子組み換えされたT細胞又はNK細胞であり、二重特異性ポリペプチドは、CARの細胞外部分に結合する。当分野において公知であるように、CARは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを天然では単一タンパク質中では見出されない組み合わせで含む細胞表面受容体

50

である。細胞外ドメインは、抗体又は抗体断片であり得る抗原結合ドメインを含む。抗体若しくは抗体断片は、ヒト抗体若しくは断片、ヒト化抗体若しくは断片又は非ヒト抗体若しくは断片であり得る。典型的には、抗原結合ドメインは、F a b又はs c F v等の抗体断片である。最も典型的には、抗原結合ドメインは、s c F vである。細胞外ドメインは、典型的には、膜貫通ドメインに抗原結合ドメインを連結するスペーサー（又はヒンジ）領域を更に含む。スペーサー領域は、I g G 1若しくはI g G 4等の免疫グロブリンに由来し得る、又はC D 4、C D 8若しくはC D 2 8を含むがそれらに限定されない代替細胞表面タンパク質に由来し得る。

#### 【0049】

所定の実施形態では、本発明の二重特異性ポリペプチドは、抗イディオタイプ抗体又はその抗原結合断片に由来する第2結合ドメインを含むが、ここで抗イディオタイプ抗体は、C A Rの抗体部分の抗イディオタイプ抗体である。これを言い換えると、第2結合ドメインは、C A Rの抗原結合ドメインに結合する。

#### 【0050】

抗イディオタイプ抗体は、当分野において公知であり、当業者であれば、本発明の二重特異性ポリペプチドの設計においてこれらの抗体の抗原結合ドメインを確実に利用することができるであろう。従って、一部の実施形態では、本発明の二重特異性ポリペプチドの第2結合ドメインは、抗C D 1 9、抗H e r 2又は他の抗体に対して特異的である抗イディオタイプ抗体に由来する抗体若しくは抗体断片、又はC A Rにおいて見出される抗体に結合するための抗イディオタイプ抗体の抗原結合断片を含む。

#### 【0051】

当分野においては、多数の抗イディオタイプ抗体が公知である。例えば、国際公開第2 0 1 4 / 1 9 0 2 7 3号パンフレット及びJ e n a e t a l . 2 0 1 3 , P L o S O n e , 8 ( 3 ) : e 5 7 8 3 8は、最新の開発において多数のC A R構築物において使用されている抗C D 1 9 ^ s c F v F M C 6 3を認識する抗イディオタイプ抗体（m A b クローン番号1 3 6 . 2 0 . 1）について記載している。

#### 【0052】

所定の実施形態では、本発明の二重特異性ポリペプチドの第2結合ドメインは、抗C D 1 9抗体に対して特異的である抗イディオタイプ抗体に由来する抗体若しくは抗原結合ドメイン、又は第1 3 6 . 2 0 . 1号のm A bクローンとしての同一のC D Rの1つ以上（即ち、K a b a t定義、C h o t h i a定義又はK a b a t及びC h o t h i a定義の組合せを使用して、V H C D R 1、V H C D R 2、C H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2及びV L C D R 3の1つ以上又は全部）を有する可能性がある抗イディオタイプ抗体の抗原結合断片に由来する抗体若しくは抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、多重特異性抗原結合構築物は、抗C D 1 9抗体に対して特異的である抗イディオタイプ抗体由来の抗原結合ポリペプチド構築物又は第1 3 6 . 2 0 . 1号のm A bクローン由来の1つ以上（例えば、2つ）の可変領域を有する可能性がある抗イディオタイプ抗体の抗原結合断片を含む。一部の実施形態では、多重特異性抗原結合構築物は、抗C D 1 9抗体に対して特異的である抗イディオタイプ抗体由来の抗原結合ポリペプチド構築物又は第1 3 6 . 2 0 . 1号のm A bクローンと同一エピトープに結合する、抗イディオタイプ抗体の抗原結合断片を含む。

#### 【0053】

抗イディオタイプ抗体の他の例としては、A b D S e r o t e c（登録商標）から市販で入手できる抗イディオタイプ抗体、国際公開第2 0 1 3 / 1 8 8 8 6 4号パンフレットに記載された抗C D 2 2抗体に対して特異的な抗イディオタイプ抗体、国際公開第9 7 / 3 4 6 3 6号パンフレットに記載された抗C E A抗体に対して特異的な抗イディオタイプ抗体、米国特許第5, 9 3 5, 8 2 1号明細書に記載された抗G D 2抗体に対して特異的な抗イディオタイプ抗体及びJ a k k a e t a l . 2 0 1 3 , A n t i c a n c e r R e s e a r c h , 3 3 ( 1 0 ) : 4 1 8 9 - 4 2 0に記載された抗N Y - E S O - 1抗体に対して特異的な抗イディオタイプ抗体が挙げられる。特別仕様の抗イディオタイプ抗

体もまた、AbD Serotec（登録商標）から入手できる。

【0054】

或いはまた、CD19又は他の腫瘍関連抗原を標的とするCARに対する抗イディオタイプ抗体は、上記のJena et al. に記載された方法に従って作製することができる。抗イディオタイプ抗原結合ポリペプチド構築物を構築するために使用することができる。

【0055】

一部の実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、CARの抗原結合には含まれていない細胞外領域に結合する第2結合ドメインを含む。本発明の二重特異性ポリペプチドの第2結合ドメインは、免疫細胞上に存在するCARの細胞外ドメイン上の任意の抗原に結合し得る。例えば、二重特異性ポリペプチドの第2結合ドメインは、CARのヒンジ領域（即ち、CARの膜貫通ドメインとscFv部分との間）又はCARのscFv部分の可変重鎖と可変軽鎖との間のスペーサー領域又はCARの任意の他の領域に結合し得る。

【0056】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は、第2結合ドメインによって標的化され得るネオエピトープを含む、scFv-CD28又はscFv-CD8接合部であり得る。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、第2結合ドメインによって標的化され得る突然変異（Fc結合ヌル）IgG CH2/3を含み得る。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、第2結合ドメインによって標的化され得る、Liu et al.（2016, Nature Biotechnology, 34:430-434）によって記載されたStreptag I I等のスペーサーを含み得る。

【0057】

CAR分子のヒンジ領域に結合する抗CAR抗体の例は、IgG4 CH2-CH3ヒンジ領域に結合する、国際公開第2014/190273号パンフレットに記載された2D3抗体である。一部の実施形態では、多重特異性抗原結合構築物は、IgG4 CH2-CH3ヒンジ領域に結合する抗原結合ポリペプチド構築物を含む。一部の実施形態では、多重特異性抗原結合構築物は、IgG4 CH2-CH3ヒンジ領域に結合する、及び2D3と同一のCDR（即ち、VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2及びVL CDR3の1つ以上又は全部）の1つ以上を有する、又は国際公開第2014/190273号パンフレットに記載された2D3の1つ以上（例えば、2つ）の可変領域を有する抗原結合ポリペプチド構築物を含む。一部の実施形態では、二重特異性ポリペプチドの第2結合ドメインは、IgG4 CH2-CH3ヒンジ領域に結合し、国際公開第2014/190273号パンフレットに記載された2D3と同一のエピトープに結合する。

【0058】

本明細書で使用する用語「キメラ抗原受容体」又は「CAR」は、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインに連結している抗原結合ドメインを含む組み換えポリペプチドを意味する。CARの抗原結合ドメインは、癌細胞上で発現した抗原（即ち、「腫瘍関連抗原」）に特異的に結合する（即ち、特異的に標的とする）CARの機能的部分である。腫瘍関連抗原の例は、当業者には公知であり、それらの具体的な例としては、Her2、CEA、FBP、CD19及びCD209が挙げられる。

【0059】

本明細書で使用する「腫瘍関連抗原」は、癌細胞によって発現する抗原を指す。腫瘍関連抗原は、非腫瘍細胞によって発現する場合がある、又は発現しない場合がある。腫瘍関連抗原が非腫瘍細胞によって発現しない場合は（即ち、腫瘍細胞に固有である場合は）、「腫瘍特異的抗原」と呼ぶこともできる。腫瘍関連抗原が腫瘍細胞に固有ではない場合、それは抗原に免疫寛容の状態を誘導できない条件下では非腫瘍細胞上でもまた発現する。腫瘍上の抗原の発現は、免疫系が抗原に応答することを可能にする条件下で発生し得る。腫瘍関連抗原は、免疫系が未成熟で応答できない場合に胎児の発育中に非腫瘍細胞上で発現する抗原であり得る、又は正常細胞上では通常低レベルで存在するが、腫瘍細胞上でははるかに高レベルで発現する抗原であり得る。最も臨床上関心の高いそれらの腫瘍関連抗

10

20

30

40

50

原は、対応する非腫瘍組織に比較して示差的に発現し、特異的 T 細胞若しくは免疫グロブリンによる腫瘍細胞の優先的認識を可能にさせる。

【0060】

完全及び持続性の T 細胞活性化及び増殖には、一次開始シグナル（シグナル 1）、二次共刺激性受容体係合シグナル（シグナル 2）及びサイトカイン受容体係合シグナル（シグナル 3）が必要とされる。CAR T 細胞は MHC 制限法では作動しないので、それらの APC との相互作用は一般に欠損しており、シグナル 2 及びシグナル 3 は、重度に弱まっている。従って、1 つ以上のシグナル伝達ドメインの組み込みは、腫瘍関連抗原に応答した T 細胞の活性化のレベル及び維持に強い影響を及ぼす可能性があり、これは増加したサイトカイン産生を生じさせ得る。

10

【0061】

一実施形態では、CAR は、少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。好適なシグナル伝達ドメインは、当業者であれば習熟しており、それらの具体的な例としては、CD3 $\zeta$ 、CD28、41BB、DAP10、OX40、ICOS、DAP12、KIR2DS2、4-1BB、CD3 $\epsilon$ 、CD35、CD3u、CD25、CD27、CD79A、CD79B、CARD11、FcRa、Fc $\gamma$ tp、Fc $\gamma$ y、Fyn、HVE M、Lck、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slip76、pTa、TCRa、TCR $\beta$ 、TRIM、Zap70、PTCH2 及び LIGHT が挙げられる。一実施形態では、CAR は、少なくとも 2 つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。別の実施形態では、CAR の細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28 及び CD3 $\zeta$  シグナル伝達ドメインを含む。

20

【0062】

別の実施形態では、第 2 結合ドメインは、CAR を発現する免疫細胞上の抗原に結合するが、ここで抗原は、CAR ではない、又は CAR の上に存在しない。これを言い換えると、CAR を発現する免疫細胞は、本発明の二重特異性ポリペプチドの第 2 結合ドメインによって結合され得る 1 つ以上の抗原を更に含み得る。例えば、抗原は、免疫細胞表面上に存在する天然型タンパク質（CD3、CD4、CD8、CD25、CD127、CD196（CCR6）、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD197 及び HLA-DR 等）を含み得る。或いは、免疫細胞上の抗原は、親和性タグ等の人工的に導入された抗原であり得る。免疫細胞の表面上に存在し得るペプチドタグの例としては、ペプチドタグ（例えば、FLAG タグ、HA タグ、His タグ、Myc タグ、S タグ、SBP タグ、Strep タグ、eXact タグ）及びタンパク質タグ（例えば、GST タグ、MBP タグ、GFP タグ）が挙げられる。

30

【0063】

本発明の二重特異性ポリペプチドの第 1 及び第 2 結合ドメインは、好ましくは抗体又は抗体断片の形態にある。本明細書で使用する用語「抗体」は、広範に 4 本のポリペプチド鎖、2 本の重鎖（H）及び 2 本の軽鎖（L）から構成される任意の免疫グロブリン（Ig）分子を指す。本明細書で更に開示されるのは、抗体分子の必須エピトープ結合機能を保持している抗原結合断片、それらの突然変異体、変異体及び誘導体である。そのような突然変異体、変異体及び誘導体は、当業者には公知であり、それらの具体例は、本明細書の他の場所で記載されている。

40

【0064】

抗体重鎖は、典型的には重鎖可変領域（HCVR 又は VH）及び重鎖定常領域を含むであろう。重鎖定常領域は、典型的には 3 つのドメインである CH1、CH2 及び CH3 から構成される。軽鎖は、典型的には軽鎖可変領域（LCVR 又は VL）及び軽鎖定常領域 CL を含むであろう。VH 及び VL 領域は、フレームワーク領域（FR）を間に挟んで、相補性決定領域（CDR）としても公知である超可変性領域に更に細分化され得る。各 VH 及び VL は、典型的には次の：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及び FR4 の順番でアミノ末端からカルボキシ末端に配列された 3 つの CDR 及び 4 つ

50

のFRから構成される。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又はサブクラスであり得る。

【0065】

本明細書で使用する用語「抗原結合断片」若しくは「抗体断片」は、標的抗原に特異的に結合する能力を維持している抗体の1つ以上の断片を意味する。抗原結合断片の具体的な例としては、(i) VL、VH、CL及びCH1ドメインから成る一価断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結した2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片；(iii) VH及びCH1ドメインから成るFd断片；(iv) 抗体の単一アームのVL及びVHドメインから成る一本鎖可変断片(scFv)；(v) 単一可変ドメインを含む、dAb断片(Ward et al. 1989, Nature, 341:544-6)；及び(vi) 単離CDRが挙げられる。

10

【0066】

一実施形態では、第1結合ドメインは、scFvを含む。別の実施形態では、第2結合ドメインは、scFvを含む。

【0067】

好適な免疫細胞は、当業者であれば習熟しており、それらの具体的な例としては、T細胞、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。一実施形態では、細胞は、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞又は腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)である。

20

【0068】

1つの好ましい実施形態では、CARを発現する免疫細胞は、T細胞である。好適なT細胞の具体的な例としては、ヘルパーT細胞(HTL；CD4<sup>+</sup>T細胞)、細胞傷害性T細胞(CTL；CD8<sup>+</sup>T細胞)、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>T細胞又はT細胞の任意の他のサブセットのT細胞が挙げられる。好適なT細胞の他の具体的な例としては、次のマーカー：CD3、CD4、CD8、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD127、CD197及びHLA-DRの1つ以上を発現するT細胞が挙げられる。

【0069】

本発明に従って使用するための細胞の起源は、当業者には公知であり、それらの具体的な例としては、末梢血、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織及び腫瘍が挙げられる。一実施形態では、細胞は、全血に由来する。

30

【0070】

本明細書で使用する用語「配列同一性」若しくは「配列相同性」は、2つのポリマー分子間、例えば、2つのDNA分子若しくは2つのDNA分子等の2つの核酸分子間、又は2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列同一性を指す。2つの分子の両方におけるサブユニット位置が同一モノマーサブユニットによって占められる場合、例えば、各2つのDNA分子内の1つの位置がアデニンによって占められる場合は、それらは相同である、又はその位置で同一である。2つの配列間の相同性は、整合又は相同位置の数の一次関数である、例えば、2つの配列における位置の半数（例えば、長さが10サブユニットのポリマーにおける5つの位置）が相同である場合、2つの配列は50%相同である；位置の90%（即ち、10中9）が整合又は相同である場合、2つの配列は90%相同である。

40

【0071】

一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、配列番号2若しくは4から成る群から選択されるアミノ酸配列又は配列番号2若しくは4から成る群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも70%、好ましくは少なくとも71%、好ましくは少なくとも72%、好ましくは少なくとも73%、好ましくは少なくとも74%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも76%、好ましくは少なくとも77%、好ましくは少なくとも7

50

**【 0 0 7 2 】**

**【 0 0 7 3 】**

**【 0 0 7 4 】**

一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸、又は配列番号2と少なくとも少なくとも70%、好ましくは少なくとも71%、好ましくは少なくとも72%、好ましくは少なくとも73%、好ましくは少なくとも74%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも76%、好ましくは少なくとも77%、好ましくは少なくとも78%、好ましくは少なくとも79%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%、好ましくは少なくとも82%、好ましくは少なくとも83%、好ましくは少なくとも84%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも86%、好ましくは少なくとも87%、好ましくは少なくとも88%、好ましくは少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、好ましくは少なくとも92%、好ましくは少なくとも93%、好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少な

10

## 20

30

## 40

50

2%、好ましくは少なくとも93%、好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%若しくはより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1結合ドメイン；及び配列番号6のアミノ酸、又は配列番号6との少なくとも70%、好ましくは少なくとも71%、好ましくは少なくとも72%、好ましくは少なくとも73%、好ましくは少なくとも74%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも76%、好ましくは少なくとも77%、好ましくは少なくとも78%、好ましくは少なくとも79%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%、好ましくは少なくとも82%、好ましくは少なくとも83%、好ましくは少なくとも84%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも86%、好ましくは少なくとも87%、好ましくは少なくとも88%、好ましくは少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、好ましくは少なくとも92%、好ましくは少なくとも93%、好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%又はより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2結合ドメインを含む。

【0077】

一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸、又は配列番号4と少なくとも70%、好ましくは少なくとも71%、好ましくは少なくとも72%、好ましくは少なくとも73%、好ましくは少なくとも74%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも76%、好ましくは少なくとも77%、好ましくは少なくとも78%、好ましくは少なくとも79%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%、好ましくは少なくとも82%、好ましくは少なくとも83%、好ましくは少なくとも84%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも86%、好ましくは少なくとも87%、好ましくは少なくとも88%、好ましくは少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、好ましくは少なくとも92%、好ましくは少なくとも93%、好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%若しくはより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1結合ドメイン；及び配列番号8のアミノ酸、又は配列番号8との少なくとも70%、好ましくは少なくとも71%、好ましくは少なくとも72%、好ましくは少なくとも73%、好ましくは少なくとも74%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも76%、好ましくは少なくとも77%、好ましくは少なくとも78%、好ましくは少なくとも79%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%、好ましくは少なくとも82%、好ましくは少なくとも83%、好ましくは少なくとも84%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも86%、好ましくは少なくとも87%、好ましくは少なくとも88%、好ましくは少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、好ましくは少なくとも92%、好ましくは少なくとも93%、好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%又はより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2結合ドメインを含む。

【0078】

本発明の二重特異性ポリペプチドは、第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを連結するリンカー配列を含み得る。リンカーは、例えば、抗原結合ポリペプチド構築物の2つのドメイン（scFv又はダイアボディのVH及びVL等）を結合するために機能するか、又はそれらは2つの抗原結合ポリペプチド構築物（2つ以上のFab又はsdAb等）と一緒に結合させるために機能し得るか、又はそれらは抗原結合ポリペプチド構築物をスカフォールドに結合させるために機能し得る。一部の実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、複数（即ち、2つ以上）のリンカーを含むことができ、例えば、スカフォールドに

10

20

30

40

50

連結した1つ以上のs c F vは、s c F vのV H及びV Lを結合するリンカー及びs c F vをスカフォールドに結合するリンカーを含み得る。適切なリンカーは当分野において公知であり、当業者であれば、リンカーの意図された使用に基づいて容易に選択することができる（例えば、Mueller & Kontermann, “Bispecific Antibodies” in Handbook of Therapeutic Antibodies, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2014を参照されたい）。

#### 【0079】

有用なリンカーとしては、当分野において周知であり、様々な順序で組み合わせられたグリシン及びセリン単位を含むグリシン-セリン（GlySer）リンカーを含む。例としては、（GS）、（SGGS）<sub>n</sub>、（GGGS）<sub>n</sub>及び（GGGS）<sub>n</sub>（式中、nは、少なくとも1、典型的には1～約10の間、例えば、1～約8、1～約6又は約1～約5の間の整数が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0080】

他の有用なリンカーとしては、免疫グロブリンヒンジ配列に由来する配列が挙げられる。リンカーは、4つのIgGクラスの任意の1つからのヒンジ配列の全部又は一部を含むことができ、任意選択的に追加の配列を含むことができる。例えば、リンカーは、免疫グロブリンヒンジ配列及びグリシン-セリン配列の一部分を含み得る。非限定的な例は、IgG1ヒンジの最初の15残基、その後続く上述したような長さが約10アミノ酸であるGlySerリンカー配列を含むリンカーである。

#### 【0081】

リンカーの長さは、その用途に基づいて変動するであろう。適切なリンカーの長さは、当業者が容易に選択することができる。例えば、リンカーがs c F vのV H及びV Lのドメインを結合しなければならない場合は、リンカーは、典型的には長さが約5～約20アミノ酸、例えば、約10～約20アミノ酸又は長さが約15～約20アミノ酸である。リンカーがダイアボディのV H及びV Lドメインを結合しなければならない場合、リンカーは、同一鎖内のこれらの2つのドメインの結合を防止するために十分に短くなければならない。例えば、リンカーは、長さが約2～約12アミノ酸、例えば長さが約3～約10アミノ酸又は長さが約5アミノ酸であり得る。

#### 【0082】

一部の実施形態では、リンカーが2つのFab断片を結合しなければならない場合は、リンカーは、F（ab'）断片のパラトープの相対的空間構造を維持するように、及びIgGのコアヒンジ内のジスルフィド結合と同等である共有結合を形成することができるように選択され得る。この状況では、好適なリンカーとしては、例えば、IgG1、IgG2又はIgG4からのようなIgGヒンジ領域が挙げられる。これらの典型的なリンカーの修飾バージョンもまた使用することができる。例えば、IgG4ヒンジの安定性を向上させるための修飾は、当分野において公知である（例えば、Labrijn et al. 2009, Nature Biotechnology, 27: 767-771を参照されたい）。

#### 【0083】

リンカーは、第1及び第2結合ドメインを結合するアミノ酸残基の配列を含み得る。又は、第1及び第2結合ドメインは、化学的結合によって（例えば、ドメイン間でビスーアリアル結合を形成するために）連結させられ得る。結合ドメインの化学的結合のための好適な方法の例は、当分野において公知である。そのような方法としては、TriLink Technologiesのバイオコンジュゲーション試薬において使用される、リシン残基上に存在する第1級アミンのスクシニミジル化合物修飾の使用が挙げられる。一実施形態では、第1及び／又は第2結合ドメインがs c F vである場合は、二重特異性ポリペプチドは、s c F vのV HとV Lドメインとの間のリンカー配列を含む。好適なリンカー配列は、当業者には公知であろうと思われ、それらの具体的な例としては、相当にフレキシブル且つ親水性のアミノ酸残基が挙げられる。一実施形態では、リンカー配列は、配

10

20

30

40

50

列番号 10、12 若しくは 14、又は配列番号 10、12 若しくは 14 との少なくとも 70% の配列同一性、好ましくは少なくとも 71%、好ましくは少なくとも 72%、好ましくは少なくとも 73%、好ましくは少なくとも 74%、好ましくは少なくとも 75%、好ましくは少なくとも 76%、好ましくは少なくとも 77%、好ましくは少なくとも 78%、好ましくは少なくとも 79%、好ましくは少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 81%、好ましくは少なくとも 82%、好ましくは少なくとも 83%、好ましくは少なくとも 84%、好ましくは少なくとも 85%、好ましくは少なくとも 86%、好ましくは少なくとも 87%、好ましくは少なくとも 88%、好ましくは少なくとも 89%、好ましくは少なくとも 90%、好ましくは少なくとも 91%、好ましくは少なくとも 92%、好ましくは少なくとも 93%、好ましくは少なくとも 94%、好ましくは少なくとも 95%、好ましくは少なくとも 96%、好ましくは少なくとも 97%、好ましくは少なくとも 98% 又はより好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択される。

10

#### 【0084】

抗体若しくは抗体断片は、精製又は同定のための追加のアミノ酸若しくは分子を含有し得る。例えば、抗体は、エピトープ又は親和性タグを含有し得る。そのようなエピトープ又は親和性タグの具体的な例としては、ペプチドタグ（例えば、FLAG タグ、HA タグ、His タグ、Myc タグ、S タグ、SBP タグ、Strep タグ、eXact タグ）及びタンパク質タグ（例えば、GST タグ、MBP タグ、GFP タグ）が挙げられる。一実施形態では、エピトープ又は親和性タグは、His タグである。

20

#### 【0085】

##### 核酸及びベクター

本明細書に開示した別の態様では、本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドをコードする核酸が提供される。更に尚別の態様では、本明細書に記載したベクターを含む細胞が提供される。

#### 【0086】

本明細書では用語「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」、「ヌクレオチド配列」「核酸」又は「核酸配列」は、mRNA、RNA、cRNA、cDNA 又は DNA を指定するために互換的に使用される。用語は、典型的には、リボヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチド何れか又はヌクレオチドの修飾形若しくは何れかのタイプの、長さが少なくとも 10 塩基のヌクレオチドのポリマー形を指す。この用語には、RNA 及び DNA の一本鎖形及び二本鎖形が含まれる。

30

#### 【0087】

本明細書で使用する用語「遺伝子」には、任意選択的にこのプロセスに役立つように要素を追加して mRNA を生成するために使用され得る核酸分子が含まれる。遺伝子は、機能的タンパク質を生成するために使用できる場合がある、又は使用できない場合がある。遺伝子は、コーディング領域及び非コーディング領域（例えば、イントロン、制御要素、プロモーター、エンハンサー、終結配列並びに 5' 及び 3' 非翻訳領域）の両方を含み得る。

#### 【0088】

本明細書では、「導入遺伝子」は、宿主生物のゲノム内に人工的に導入されている、又は導入されようとしている、及び宿主の子孫に遺伝される遺伝物質を記載するために使用される。一部の実施形態では、導入遺伝子は、それが導入される T 細胞に所望の特性を付与する、又はさもないければ所望の治療転帰をもたらす。

40

#### 【0089】

本明細書で使用する用語「コードする」、「コードすること」等は、核酸が別の核酸若しくはポリペプチドを提供する能力を指す。例えば、核酸配列は、それがポリペプチドを生成するために転写及び／又は翻訳され得る場合、又はポリペプチドを生成するために転写及び／又は翻訳され得る形態に加工されなければならない場合に、「コードする」と言われる。そのような核酸配列は、コーディング配列又はコーディング配列及び非コーディング配列の両方を含み得る。従って、用語「コードする」、「コードすること」等として

50

は、DNA分子の転写の結果として生じるRNA生成物、RNA分子の翻訳の結果として生じるタンパク質、RNA生成物を生成するためのDNA分子の転写並びにRNA生成物のその後の翻訳の結果として生じるタンパク質、又はRNA生成物を提供するためのDNA分子の転写の結果として生じるタンパク質、プロセスされたRNA生成物（例えば、mRNA）を提供するためのRNA生成物をプロセスするステップ及びプロセスされたRNA生成物のその後の翻訳が挙げられる。

【0090】

一実施形態では、二重特異性ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号15、17、19、21、31若しくは33から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列、又は配列番号15、17、19、21、31若しくは33との少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも71%、好ましくは少なくとも72%、好ましくは少なくとも73%、好ましくは少なくとも74%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも76%、好ましくは少なくとも77%、好ましくは少なくとも78%、好ましくは少なくとも79%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%、好ましくは少なくとも82%、好ましくは少なくとも83%、好ましくは少なくとも84%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも86%、好ましくは少なくとも87%、好ましくは少なくとも88%、好ましくは少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、好ましくは少なくとも92%、好ましくは少なくとも93%、好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%又はより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を有する。

【0091】

別の態様では、制御配列に作動可能に連結した本明細書に記載した核酸を含むベクターが提供される。

【0092】

用語「制御エレメント」若しくは「制御配列」は、特定細胞において作動可能に連結したコーディング配列を発現させるために必要とされる核酸配列（例えば、DNA）を指す。真核細胞のために好適な制御配列としては、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、転写エンハンサー、翻訳エンハンサー、mRNA安定性を制御するリーダー若しくは末尾配列並びに転写ポリヌクレオチドによってコードされた生成物を細胞内の細胞内区画又は細胞外環境へ標的化する配列が挙げられる。

【0093】

典型的には、制御配列としては、プロモーター配列、5'非コーディング領域、転写制御タンパク質若しくは翻訳制御タンパク質のための機能的結合部位等のシス制御領域、上流オープンリーディングフレーム、リボソーム結合配列、転写開始部位、翻訳開始部位及び／又はリーダー配列、終止コドン、翻訳停止部位及び3'非翻訳領域をコードする核酸配列が挙げられるが、それらに限定されない。当分野において公知である構成的若しくは誘導性プロモーターは企図されている。プロモーターは、天然型プロモーター又は2つ以上のプロモーターの要素を結合するハイブリッドプロモーターの何れかであり得る。

【0094】

企図されたプロモーター配列は、哺乳動物細胞にとって天然であり得る、又はその領域が選択された生体において機能的である別の起源に由来し得る。プロモーターの選択は、意図された宿主細胞に依存して異なるであろう。例えば、哺乳動物細胞において発現させるために使用できるプロモーターとしては、カドミウム等の重金属に応答して誘導され得るメタロチオネインプロモーター、β-アクチンプロモーター並びに特にSV40ラージT抗原プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）前初期（IE）プロモーター、ラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP）、単純ヘルペスウイルスプロモーター及びHPVプロモーター、特にHPV上流制御領域（URR）等のウイルスプロモーターが挙げられる。これら全てのプロモーターは、当分野において明確に記載されてお

り、容易に入手できる。

【0095】

エンハンサーエレメントは、本明細書ではベクター構築物内の核酸配列の発現レベルを増加させるために使用され得る。例としては、Dijkema et al. (1985, EMBO Journal, 4:761) において記載されたSV40初期遺伝子エンハンサー、例えばGorman et al., (1982, Proceedings of the National Academy of Science. USA, 79:6777) に記載されたラウス肉腫ウイルスの長末端反復(LTR)に由来するエンハンサー／プロモーター及びCMVイントロンA配列に含まれるエレメント等の例えばBoshart et al. (1985, Cell, 41:521) に記載されたヒトCMVに由来するエレメントが挙げられる。

10

【0096】

ベクター構築物は、更に3'非翻訳配列も含み得る。3'非翻訳配列は、ポリアデニル化シグナル並びにmRNAプロセッシング若しくは遺伝子発現を実行できる任意の他の制御シグナルを含有するDNAセグメントを含む遺伝子のその部分を指す。ポリアデニル化シグナルは、mRNA前駆体の3'末端へのポリアデニル酸区域の付加を実行することによって特徴付けられる。ポリアデニル化シグナルは、一般に変形が珍しくはないが、カノニカル形5' AATAAA-3'との相同性の存在によって認識される。3'非翻訳制御DNA配列は、好ましくは約50~1,000ntを含み、ポリアデニル化シグナル並びにmRNAプロセッシング若しくは遺伝子発現を実行できる任意の他の制御シグナルに加えて転写及び翻訳終結配列を含有し得る。

20

【0097】

本明細書で使用する用語「作動可能に結合した(operably connected)」若しくは「作動可能に連結した(operably linked)」は、そのように記載された成分がそれらがそれらの意図された方法において機能することを許容する関係にある並置を指す。例えば、コーディング配列に「作動可能に連結した」制御配列は、制御配列と適合性のある条件下でコーディング配列の発現を許容するコーディング配列に比較した制御配列のポジショニング及び／又は配向を指す。

【0098】

本明細書で使用する用語「オープンリーディングフレーム」及び「ORF」は、本明細書ではコーディング配列の翻訳開始コドンと終結コドンとの間でコードされたアミノ酸配列を指すために互換的に使用される。用語「開始コドン」(例えば、ATG)及び「終結コドン」(例えば、TGA、TAA、TAG)は、タンパク質合成(mRNA翻訳)の開始及び鎖終結を各々特定するコーディング配列内の3つの隣接ヌクレオチドの単位(「コドン」)を指す。

30

【0099】

「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」等に適用される、本明細書で使用する用語「組み換え」は、本明細書で記載した細胞内で転写及び／又は翻訳できる人工核酸構造(即ち、非複製cDNA若しくはRNA;又はレプリコン、自己複製cDNA若しくはRNA)を意味すると理解されている。

40

【0100】

組み換え核酸分子若しくはポリヌクレオチドは、ベクター内に挿入され得る。プラスミド発現ベクター等の非ウイルスベクター又はウイルスベクターを使用することができる。本発明に従ったベクターの種類及び核酸構築物の挿入技術は、当分野において公知であり、それらの具体的な例としては、コスミド、プラスミド(例えば、裸のプラスミド又はリポソーム内に含有されるプラスミド)及びウイルス(例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス)が挙げられる。

【0101】

一実施形態では、ベクターは、配列番号23~26から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

50

## 【0102】

本明細書で記載する核酸配列、ポリヌクレオチド若しくはベクター構築物は、天然では発生しない異種配列を含む。

## 【0103】

更に尚別の態様では、本明細書に記載したベクターを含む宿主細胞が提供される。好適な宿主細胞は、当業者には公知であろうと思われ、その具体的な例としては、細菌細胞（例えば、大腸菌（*E. coli*）、*P. ミラビリス*（*P. mirabilis*）、真菌細胞（例えば、*S. セレビジエ*（*S. cerevisiae*）、*P. パストリア*（*P. pastoria*）、*T. リーゼイ*（*T. reesei*））、植物細胞、昆虫細胞（例えば、*SF-9*、*SF21*、*Hi-5*）又は哺乳動物細胞が挙げられる。一実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。好適な哺乳動物細胞は、当業者には公知であろうと思われ、それらの具体的な例としては、*CHO*又は*293T*細胞が挙げられる。これらの細胞は、市販の供給業者から広く入手することができる。

10

## 【0104】

二重特異性ポリペプチドを生成するための方法

別の態様では、本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドを生成するための方法であって：（i）二重特異性ポリペプチドを発現させるために好適である培養培地中及び条件下で本明細書に記載した細胞を培養するステップ；及び（ii）二重特異性ポリペプチドを細胞又は培養培地から単離するステップを含む方法が提供される。

## 【0105】

本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドは、当業者には公知であろう任意の数の発現系を用いて生成することができるが、それらの具体的な例としては、細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*）、*P. ミラビリス*（*P. mirabilis*））、真菌（例えば、*S. セレビジエ*（*S. cerevisiae*）、*P. パストリア*（*P. pastoria*）、*T. リーゼイ*（*T. reesei*））、植物若しくは植物細胞、昆虫若しくは昆虫細胞（例えば、*SF-9*、*SF21*、*Hi-5*）又は哺乳動物細胞中の生成又はそれらによる生成が挙げられる。一実施形態では、発現系は、哺乳動物発現系である。好適な哺乳動物発現系は、当業者には公知であろうと思われ、それらの具体的な例としては、*CHO*又は*293T*発現系が挙げられる。これらの発現系は、市販の供給業者から広く入手することができる。一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、哺乳動物発現系を用いて生成される。

20

30

## 【0106】

他の態様では、本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドを生成するための方法であって、第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを含む化学的にコンジュゲート化された二重特異性ポリペプチドを生成するために好適である条件下で第1結合ドメイン及び第2結合ドメインを結合するステップを含む方法が提供される。

## 【0107】

1つの好ましい実施形態では、化学的コンジュゲート化二重特異性ポリペプチドは、本明細書のどこかで記載したように、リシン残基上に存在する第1級アミンのスクシミジル化合物の修飾後に形成される。

40

## 【0108】

本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドを生成するためには、市販で入手できる抗体又はそれらの抗原結合ドメインを利用することは当業者の範囲内に含まれるであろう。更に、所望の特異性を有する抗体若しくは抗原結合ドメインに関する公表された配列情報に基づいて抗体若しくは抗原結合ドメインを複製すること及びそれにより本発明に従って二重特異性ポリペプチドにおけるそのような抗体若しくは抗原結合ドメインを含めることは、当業者の能力の範囲内に含まれる。特に、本発明が本明細書に記載した第1及び第2結合ドメイン（即ち、抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞等のプロフェッショナル抗原提示細胞上の抗原に結合するための第1結合ドメイン及び抗原が*CAR*上の抗原である場合を含む、*CAR*を発現する免疫細胞上の抗原に結合するための第2結合ドメイン）の特異

50

的結合親和性を有するように設計されている任意の二重特異性抗体の生成を含むことは理解されるであろう。当業者であれば、抗原結合ドメインと所望の結合特異性との任意の組み合わせが本発明の二重特異性ポリペプチドを得るために利用できることを理解するであろう。

#### 【0109】

##### 医薬組成物

別の態様では、本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。

#### 【0110】

本明細書に記載した組成物は、当分野において公知の方法で調製することができ、哺乳動物、特にヒトへの非経口投与のために好適であり、1種以上の薬学的に許容される担体又は希釈剤を備える治療有効量の組成物を含む組成物である。

10

#### 【0111】

本明細書で使用する用語「薬学的に許容される担体」は、好適な担体、希釈剤又は賦形剤を意味する。これらには、酸化防止剤、緩衝剤及び溶質を含有し得る、組成物を意図されるレシピエントの血液と等張性にさせる全ての水性及び非水性等張性無菌注射液；懸濁化剤及び増粘剤、分散媒、抗真菌剤及び抗菌剤、等張剤及び吸収剤等を含み得る水性及び非水性無菌懸濁剤が含まれる。本発明の組成物は、更に他の追加の生理学的活性剤もまた含み得る。

#### 【0112】

担体は、組成物中の他の成分と適合性であり、対象にとって有害ではないという意味で、典型的には薬学的に「許容される」。組成物としては、皮下、筋肉内、静脈内及び皮内投与を含む非経口投与のために好適な組成物が挙げられる。組成物は、便宜的には単位剤形で提示することができ、製薬学の分野において周知の任意の方法によって調製することができる。そのような方法としては、単離T細胞と結び付けるための担体を調製するステップが含まれる。一般に、組成物は、任意の有効成分と液体担体とを均一且つ密接に結合させるステップによって調製される。

20

#### 【0113】

一実施形態では、本組成物は、非経口投与のために好適である。別の実施形態では、本組成物は、静脈内投与のために好適である。

30

#### 【0114】

非経口投与のために好適な組成物としては、酸化防止剤、緩衝剤、殺菌剤及び溶質を含有し得る、組成物を意図されるレシピエントの血液と等張性にさせる水性及び非水性等張性無菌注射液；並びに懸濁化剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性無菌懸濁剤が挙げられる。

#### 【0115】

本開示は更に、本明細書に記載した組成物の他の活性物質との組み合わせ及び／又は放射線療法又は手術等の他の治療レジメン又は治療様式に加えた組み合わせもまた企図している。本明細書に記載した組成物が公知の活性物質と組み合わせて使用される場合、この組み合わせは、連続して（連続的又は治療のない期間を挟んで）又は同時に又は混合物としての何れかで投与することができる。好適な抗癌剤は、当業者には公知であろう。本発明の組成物の後に公知の治療が続く、又は公知の物質を用いた治療の後に維持療法としての本発明の組成物を用いた治療が続く、組み合わせ治療もまた企図されている。例えば、癌の治療においては、本発明の組成物をアルキル化剤（メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、イフォスファミドシスプラチン又はシスプラチン、カルボプラチン及びオキシプラチン等の白金含有アルキル化剤）、代謝拮抗物質（プリン若しくはピリミジン類似体又は例えばアザチオプリン及びメルカプトプリン等の抗葉酸剤）、アントラサイクリン（ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、バルビシン、ミトキサントロン若しくはアントラサイクリン類似体等）、植物性アルカロイド（ビンカアルカロイド等又はビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、

40

50

パクリタキセル若しくはドエスタキセル (doestaxel) 等のタキサン)、トポイソメラーゼ阻害剤 (I 型若しくはII型トポイソメラーゼ阻害剤等)、ポドフィロトキシン (エトポシド若しくはテニポシド等)、チロシンキナーゼ阻害剤 (イマチニブメシレート、ニロチニブ若しくはダサチニブ等)、アデノシン受容体阻害剤 (A2aR 阻害剤、SCH58261、CPI-444、SYN115、ZM241385、FSPTP 若しくはA2BR 阻害剤、PSB-1115 等)、アデノシン受容体アゴニスト (CCPA、IB-MECA 及びCIE-IB-MECA 等)、PDL-1: PD-1 軸、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、アテゾリズマブ、BMS-936559、MED14736、MPDL33280A 若しくはMSB0010718C のチェックポイント阻害剤を含むチェックポイント阻害剤)、CTLA-4 経路の阻害剤 (イピリマブ及びトレメリマブ等)、TIM-3 経路の阻害剤若しくはT細胞機能を促進することが公知であるアゴニストモノクローナル抗体 (MED16469 等の抗OX40; 及びPF-05082566 等の抗BBを含む) と組み合わせ投与できることが企図されている。

10

#### 【0116】

更に別の態様では、本発明は、本発明の1つ以上の二重特異性ポリペプチド、上述した前記二重特異性ポリペプチド及び／又は医薬組成物をコードする核酸を含むキット又は製造品を提供する。

#### 【0117】

更に他の態様では、上述した治療適用において使用するためのキットであって：

(a) 本発明の二重特異性ポリペプチド、核酸、ベクター若しくは医薬組成物を保持する容器；及び

20

(b) 使用上の注意を備えるラベル又は添付文書を含むキットが提供される。

#### 【0118】

キットは、癌を治療するための1種以上の有効成分 (active principles 又は ingredients) を更に含み得る。例えば、キットは、CARを発現する免疫細胞を更に含み得る。

#### 【0119】

「キット」又は「製造品」は、容器及び容器上若しくは容器と結び付いているラベル又は添付文書を含み得る。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、プリスターパック等が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成することができる。容器は、その状態を治療するために有効である治療用組成物を保持し、無菌アクセスポートを有し得る (例えば、容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈注射液バッグ若しくはバイアルであり得る)。ラベル又は添付文書は、その治療用組成物が最適条件を治療するために使用されることを示す。一実施形態では、ラベル又は添付文書は、使用上の注意を含み、その治療用又は予防用組成物が本明細書に記載した癌又は他の状態を治療するために使用できることを示す。

30

#### 【0120】

本キットは、(a) 治療用又は予防用組成物；及び (b) その中に含有される第2の有効成分を有する第2容器を含み得る。本発明の実施形態によるキットは、本組成物及び他の有効成分が本明細書に記載した癌又は状態を治療するために使用できることを示す添付文書を更に含み得る。代わりに、又は追加して、本キットは、無菌注射用水 (BWF I)、リン酸緩衝食塩液、リンゲル液及びデキストロース液等の薬学的に許容される緩衝剤を含む第2 (又は第3) 容器を更に含み得る。キットは、当業者には公知であろう、商業的及び使用者の観点から望ましい他の物質を更に含み得るが、それらの好適な例としては、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針及びシリンジが挙げられる。

40

#### 【0121】

##### 治療方法

別の態様では、癌を治療するための方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の：(i) CARを発現する免疫細胞；及び (ii) 本明細書に記載した二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物を共投与するステップを含み、ここで二重特異性ポリペプチドが

50

、対象の内因性APC上で発現した抗原及び癌を治療するための免疫細胞の活性化及び増殖を刺激するためにインビボで免疫細胞によって発現したCAR上の抗原に同時に結合する方法が提供される。

#### 【0122】

CARを発現する免疫細胞と本明細書に記載した二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物の共投与は、免疫細胞及び二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物を（例えば、同時共投与のために）同一組成物中で薬剤化することによって、又は連続投与するための異なる組成物として製剤化することによって達成され得る。「連続的」投与は、免疫細胞と二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物との投与の間に間隔があることが意味される。連続的投与の間の間隔は、数秒間、数分間、数時間又は数日間であり得る。一実施形態では、免疫細胞と二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物との定期的再投与が、所望の治療効果を達成するために必要とされることがある。連続的投与は、任意の順序であり得る。

#### 【0123】

本発明者らは、驚くべきことに、本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドが、免疫細胞のインビボでの活性化及び増殖を刺激し、それによりCAR T細胞療法等の免疫細胞療法の有効性を向上させることを証明した。従って、二重特異性ポリペプチドは、「アジュバント」と呼ぶことができる。本明細書で使用する用語「アジュバント」は、CAR単独を発現する免疫細胞から予測されるであろう免疫応答の大きさを超えてCARを発現する免疫細胞によって引き出される免疫応答の大きさを増加させ得る二重特異性ポリペプチドを指す。

#### 【0124】

免疫細胞の活性化は、例えば、T細胞TCR／CD3複合体若しくはCD2表面タンパク質の刺激を通しての一次刺激シグナルを提供するステップ、及び例えば、CD28若しくは4-1BB等のアクセサリー分子を通しての第2共刺激シグナルを提供するステップによって遂行することができる。TCR／CD3複合体を通して、又はCD2を介して提供される一次刺激シグナルに加えて、T細胞応答を誘導するには、第2の共刺激シグナルが必要とされる。特定の実施形態では、CD28結合剤は、共刺激シグナルを提供するために使用され得る。好適な共刺激リガンドとしては、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、4-1BB、OX40L、誘導性共刺激リガンド（ICOS-L）、細胞内接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンホトキシンβ受容体、ILT3、ILT4、Tollリガンド受容体に結合するアゴニスト又は抗体及びB7-H3と特異的に結合するリガンドが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0125】

用語「増殖した」、「増殖」、「増殖させるステップ（expanding）」、「伝播」等は、本明細書では、対象への細胞の投与前又は投与後の医薬組成物の調製何れかにおける多数の免疫細胞における増加を指すために互換的に使用される。免疫細胞は、当分野において公知の任意の細胞培養法を用いて増殖させることができる。例えば、免疫細胞は、液体培養、単層等を含むインビトロ組織培養系において増殖させることができる。

#### 【0126】

癌を治療するための治療レジメンは、当業者によって決定され得るが、典型的には、対象の年齢、体重及び全身的健康に加えて、腫瘍のタイプ、サイズ、病期及び受容体の状態を含むがそれらに限定されない因子に左右されるであろう。別の決定因子は、再発疾患を発生するリスクであり得る。例えば、再発疾患を発生する高リスク若しくはより高リスク状態にある、又は再発疾患を発生している対象については、再発疾患を発生する低リスク若しくはより低リスク状態にある対象と比較して、より積極的な治療レジメンが処方され得る。同様に、癌のより進行した病期、例えば、第III期若しくはIV期の疾患を有すると同定された対象については、癌のより進行性の低い病期を有する対象と比較して、より積極的な治療レジメンが処方され得る。

#### 【0127】

本明細書で使用する用語「癌」は、異常な細胞増殖と関連する任意の状態を意味する。そのような条件は、当業者には公知である。一実施形態では、癌は、固形癌である。別の実施形態では、癌は、Her2陽性癌である。別の実施形態では、癌は、乳癌、前立腺癌及び肺癌から成る群から選択される。

#### 【0128】

本明細書で使用する用語「治療する」、「治療」及び「治療すること」は、それが何であれ何らかの方法で癌の状態若しくは症状、又はさもなければ癌又は他の望ましくない症状の発生又は進行を防止する、妨げる、遅延させる、無効にする、又は逆転させる任意及びあらゆる使用を指す。従って、用語「治療すること」等は、それらの極めて広い可能性のある状況において考察することができる。例えば、治療は、対象が完全回復若しくは治癒まで治療されることを必ずしも意味しない。複数の症状を提示する、又は複数の症状を特徴とする状態では、治療は、前記症状の全部を必ずしも救済する、予防する、妨害する、遅延させる、無効にする、又は逆転する必要はないが、前記症状の1つ以上を救済する、予防する、妨害する、遅延させる、無効にする、又は逆転することができる。

10

#### 【0129】

癌が治療されなければならない対象は、ヒト又はヒトにとって経済的に重要及び／又は社会的に重要な哺乳動物、例えば、それらがヒトにとって経済的に重要であるので、ヒト以外の肉食動物（例えば、ネコ及びイヌ）、ブタ（例えば、ブタ、家畜のブタ及びイノシシ）、反芻動物（例えば、ウシ、雄牛、ヒツジ、キリン、シカ、ヤギ、バイソン及びラクダ）、ウマ及び絶滅危惧の動物園で飼養されている鳥の種類を含む鳥類及び家禽類及びより特別には飼い慣らされた家禽、例えば七面鳥、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ホロホロチョウ等であり得る。用語「対象」は、特定の年齢を示さない。従って、成体、若年及び新生対象が含まれることが意図されている。

20

#### 【0130】

用語「対象」、「個体」及び「患者」は、本明細書では本開示を適用可能であるあらゆる対象を言及するために互換的に使用される。一実施形態では、対象は、哺乳動物である。別の実施形態では、対象は、ヒトである。

#### 【0131】

本明細書で使用する用語「治療有効量」は、そのような治療を必要とする哺乳動物、特にヒトに投与された場合に癌を治療するために十分である細胞の量を意味する。投与されるべき修飾細胞の正確な量は、対象の年齢、体重、腫瘍のサイズ、感染又は転移の程度及び状態における個々の差を考慮に入れて医師が決定できる。

30

#### 【0132】

典型的には、免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）療法の投与は、体重1kg当たりの細胞数によって規定される。しかしながら、修飾細胞は、導入後に複製及び増殖するであろうから、投与される細胞用量は、細胞の最終定常状態数には似ていないであろう。一実施形態では、本発明の修飾細胞を含む医薬組成物は、細胞 $10^4 \sim 10^9$ 個/kg（体重）の用量で投与することができる。別の実施形態では、本発明の修飾細胞を含む医薬組成物は、それらの範囲内の全整数値を含む細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg（体重）の用量で投与することができる。

40

#### 【0133】

本明細書に記載した二重特異性ポリペプチドを含む組成物は、これらの用量で複数回投与することができる。特定の対象にとって最適な用量及び治療レジメンは、当業者であれば、疾患の徴候について患者を監視し、それに従って治療を調整することによって容易に決定することができる。

#### 【0134】

一実施形態では、免疫細胞は、自家細胞に由来する。別の実施形態では、免疫細胞は、同種異系細胞に由来する。

#### 【0135】

用語「自家」は、その物質がその個体に後に再導入されるべき同一個体に由来する任意

50

の物質を指す。

【0136】

用語「同種異系」は、物質が導入される個体と同一種の異なる個体に由来する任意の物質を指す。2体以上の個体は、1つ以上の遺伝子座にある遺伝子が同一ではない場合に相互に同種異系であると言われる。一部の態様では、同一種の個体由来の同種異系の物質は、抗原性で相互作用するには遺伝学的に十分に別個である。

【0137】

細胞の製造

十分な治療用量の免疫細胞組成物を達成するためには、免疫細胞を生成するための方法は、典型的には、1ラウンド以上の刺激、活性化及び／又は増殖を包含した。本明細書に開示した方法に従うと、免疫細胞は、インビボ及びインビトロで活性化及び増殖するために刺激することができる。

10

【0138】

従って、本明細書に開示した別の態様では、インビボでの免疫細胞の活性化及び増殖を刺激するための方法であって、対象に有効量の：(i) CARを発現する免疫細胞；及び(ii) 本明細書に記載した二重特異性ポリペプチド又は医薬組成物を共投与するステップを含み、ここで二重特異性ポリペプチドが、対象の内因性APC上で発現した抗原及びインビボで免疫細胞によって発現したCAR上の抗原に同時に結合する方法が提供される。

【0139】

本明細書に記載した免疫細胞のインビボ活性化及び増殖は、免疫細胞の各治療用量のために必要とされる免疫細胞の数の減少を促進する。

20

【0140】

別の態様では、免疫細胞のインビトロでの活性化及び増殖を刺激するための方法であって：(i) APC又はAPC模擬体、及び(ii) 本明細書に開示した二重特異性ポリペプチドを含む培養培地中でCARを発現する単離免疫細胞を培養するステップを含み、ここで二重特異性ポリペプチドが、APC又はAPC模擬体上で発現した抗原及び免疫細胞によって発現したCAR上の抗原に同時に結合する方法が提供される。

【0141】

免疫細胞生成法は、本明細書では、極めて優れた治療用生成物である結果として生じる免疫細胞組成物に寄与する、単純及び堅牢な培養の開始及び活性化ステップを企図した。一実施形態では、培養の開始及び活性化は、細胞培養容器、例えば、細胞培養バッグ、GREXバイオリアクター、WAVEバイオリアクター等において細胞集団を播種するステップ並びに一次及び共刺激免疫細胞シグナル伝達経路を通して免疫細胞を活性化するステップを含む。細胞組成物は、更に、1種以上の追加の増殖因子若しくはサイトカイン、例えば、IL-2、IL7及び／又はIL-15又はそれらの任意の好適な組み合わせの存在下で更に培養され得る。

30

【0142】

別の実施形態では、免疫細胞の活性化及び増殖は、単離免疫細胞をAPC若しくはAPC模擬体と培養するステップを含む。一実施形態では、APC若しくはAPC模擬体は、ドナー由来APC、合成人工的APC(aAPC)、CD3及びCD8のための活性化抗体を用いて官能化したマイクロビーズ(Dynabeads)、自家単球由来樹状細胞(mo-DC)及びAPCを模擬するスカフォールドから成る群から選択される。

40

【0143】

特定の実施形態では、培養の開始は、例えば1種以上の追加のサイトカイン、一次刺激性リガンド及び共刺激性リガンドを含有する好適な細胞培養培地中の細胞培養容器中でT細胞を含む細胞の集団、例えばPBM Cを所望の密度、細胞 $1 \sim 5 \times 10^6$ 個/mLで播種するステップを含む。別の実施形態では、サイトカイン、刺激性及び共刺激性リガンドは、引き続いて細胞培養培地中のPBM Cに添加することができる。

【0144】

一実施形態では、細胞培養容器は、本明細書の他の場所で検討したように、MACS (

50

登録商標) GMP細胞増殖バッグ、MACS (登録商標) GMP細胞分化バッグ、EXP-Pak (商標) 細胞増殖用バイオコンテナ、VueLife (商標) バッグ、KryoSure (商標) バッグ、KryoVue (商標) バッグ、LifeCell (登録商標) バッグ、PermaLife (商標) バッグ、X-Fold (商標) バッグ、Si-Culture (商標) バッグ及びVectraCell (商標) バッグを含むがそれらに限定されない細胞培養バッグである。

#### 【0145】

特定の実施形態では、細胞は、好適な細胞培養培地を含む細胞培養容器中で播種される。好適な細胞培養培地の具体的な例としては、無血清又は適切な量の血清(若しくは血漿)又は規定セットのホルモン及び/又は免疫細胞を成長及び増殖させるために十分な量のサイトカインが補給された何れかを含む、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム及びビタミン類が添加されたTCGM; 2mMのGlutaMAX (商標) -I、10mMのHEPES及び5%のヒトAB血清が補給されたX-VIVO (商標) 15)、CTS (商標) Optmizer (商標) T細胞増殖用SFM (Life Technologies)、CTS (商標) AIM V (登録商標) 培地 (Life Technologies)、RPMI 1640、Clicks、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 15 (Lonza)、CellGro (登録商標) 無血清培地 (CellGenix) 及びX-Vivo 20 (Lonza) が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0146】

本明細書で企図される細胞培養培地は、血清(例えば、胎児ウシ若しくはヒト血清)、インターロイキン-2 (IL-2)、インスリン、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-7、IL-21、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF $\beta$ 及びTNF- $\alpha$ を含むがそれらに限定されない1種以上の因子を更に含み得る。

#### 【0147】

一実施形態では、APC又はAPC模擬体は、ドナー由来APC、合成人工的APC (aAPC)、CD3及びCD8のための活性化抗体を用いて官能化したマイクロビーズ (Dynabeads)、自家単球由来樹状細胞 (mo-DC) 及びAPCを模擬するスカフォールドから成る群から選択される。

#### 【0148】

当業者であれば、本明細書に記載した本発明は、詳細に記載した以外の変形及び修飾を受け易いことを理解するであろう。本発明が本発明の精神及び範囲内に含まれる全てのそのような変形及び修飾を含むことを理解すべきである。本発明は、本明細書に言及又は指示したステップ、特徴、組成物及び化合物の全てを個別に、又は集合的に、並びに前記ステップ若しくは特徴の2つ以上の任意及び全ての組み合わせを更に含む。

#### 【0149】

他に定義されない限り、本明細書で使用する全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。

#### 【0150】

本明細書で可能にされる様々な実施形態について下記の非限定的な実施例によって詳細に記載する。

#### 【実施例】

#### 【0151】

#### A. 材料

##### 細胞培養

E0771は、マウス乳癌細胞系であり (Johnstone et al., 2015, Disease Models & Mechanisms, 8:237-51)、24JKは、メチルコラントレン誘導性線維肉腫であり (Shiloni et al., 1993, Cancer Immunology and Immunotherapy, 37:286-92)、及びMC38は、化学的誘導性結腸腺癌である (Corbett et al., 1975, Cancer Research, 35:2434-9)。これらの

細胞系はC57BL/6マウスを起源とし、親細胞系は、マウス幹細胞ウイルスLTRプロモーターの制御下でヒトHer2抗原を発現するようにレトロウイルスによって形質移入された。これらのHer2+細胞系は、24JK-Her2、MC38-Her2及びE0771-Her2と呼ばれる。MDA-MB-231、PANC1及びA549細胞系は、Her2+である。

#### 【0152】

全細胞系は、10%の熱不活化ウシ胎児血清(FBS)、1mmol/Lのピルビン酸ナトリウム、2mmol/Lのグルタミン、0.1mmol/Lの非必須アミノ酸、10mMの4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)、100U/mLのペニシリン及び100µg/mLのストレプトマイシンを含む補給物を含むRPMI培地中において37℃、5%のCO<sub>2</sub>中で維持した。E0771-Her2は補給されたDMEM中で培養したが、DMEMはフラスコへの付着を強化した。

#### 【0153】

##### CAR T細胞

PBMCは、ヒト又はマウスドナーから採取した全血の軟膜から収集した。Her2特異的CARレトロウイルスベクター若しくはコントロール空ベクターを用いたヒトT細胞の形質導入は、Ritchie et al. (2013, Molecular Therapy, 21(11):2122-29)に記載された方法に従って実施した。Her2特異的CARレトロウイルスベクター若しくはコントロール空ベクターを用いたマウスT細胞の形質導入は、Mardiana et al. (2017, Cancer Research)に記載された方法に従って実施した。

#### 【0154】

##### 他の免疫細胞

APCは、照射PBMC、PBMCからのFACS分別CD19+B細胞又は単球由来樹状細胞(Mo-DC)を用いて生成した。市販で入手できるキット(Miltenyi Biotec)を使用して、未成熟及び成熟mo-DCの混合物中でmo-DCを生成した。

#### 【0155】

##### B. BEATの設計

BEATは、2つの抗体scFvドメインを単一ポリペプチド鎖内にフレキシブルリンカーを用いて結び付けることによって設計した。第1scFvドメインは、CD40(配列番号2)又はMHCI(配列番号4)に特異的に結合するように設計した。cDNAは、CD40(FGK45)及びMHCI(M5/114)に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系から単離した。これらのモノクローナル抗体の可変H及びLドメインをコードする遺伝子をクローン化し、APC特異的scFvを生成するために(G4S)3-リンカー配列によって遺伝的に融合させた。第2scFvドメインは、上述したHer2特異的CARのCD3(配列番号6)又はc-mycタグ(配列番号8)に特異的に結合するように設計し、CAR特異的scFvは、同一方法を用いて生成した。

#### 【0156】

APC特異的scFv及びCAR特異的scFvは、BEATをコードする遺伝子(配列番号17及び19)を生成するために組み換え的に連結された。

#### 【0157】

##### C. BEATの生成

BEATコーディング配列は、哺乳動物細胞培養中で天然タンパク質を高レベルで発現させるためにサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターを含有するpCDNA3.4TOPOベクター内にクローン化した。インサートのコーディング配列は、標準プロトコールに従って検証した。BEATの迅速且つ超高収率のタンパク質産生を得る目的で哺乳動物細胞をトランスフェクトするために、Expi293発現系(Invitrogen)、jetPEI(Polyplus-transfection S.A.)及びリポ

10

20

30

40

50

フェクタミンを使用した。

#### 【0158】

BEATの細菌生成のためには、Gatewayクローニング系 (Invitrogen) を使用した。従って、pDONR221ZeoBEATを作製するために、BEATコーディング配列をエントリープラスミド内に挿入した。次にコンピテント大腸菌 (E. coli) を形質転換させ、pDONR221ZeoBEATを含有する陽性クローンを選択且つ配列決定した。その後、pDONR221ZeoBEATをpDestinationベクターpET15bGWと組み合わせてpET15bBEATを作製した。次にコンピテント大腸菌 (E. coli) を形質転換させ、pET15bBEATを含有する陽性クローンを選択且つ配列決定した。次にpET15bBEATをBL21DE3大腸菌 (E. coli) 内に形質変換させ、IPTGを用いて誘導してBEATポリペプチドを生成した。

10

#### 【0159】

Hisタグを含有するBEATポリペプチドは、His60 Ni Superflow樹脂 / Nickelビーズを用いて収集した。BEATの純度及び濃度は、6Hisチェックキット (Cisbio) エレクトロフォレーシス及びウェスタンブロットを用いて試験した。

#### 【0160】

組み換えBEATポリペプチドの結合を確認するためには、BEATは、蛍光染料とコンジュゲート化されるであろう。標識化BEATの結合は、フローサイトメトリーを用いて確認されるであろう。更に、本発明者らは、競合的結合アッセイを用いてBEAT及び元のモノクローナル抗体が同一分子に結合することを確認するであろう。

20

#### 【0161】

化学的にコンジュゲート化したBEATポリペプチドは、タンパク質-タンパク質コンジュゲーションキット (TriLink Bio Technologies) を用いて調製した。手短には、mycタグ (CAR中に存在する)、CD40、PD-L2又はClec9aに対して特異的な抗体を脱塩し、zebraカラムを用いて修飾用緩衝剤に濃縮した。

#### 【0162】

BEATポリペプチドを調製する場合、どちらもモル置換比5で、一方の抗体はS-HyNicによって、他方の抗体はS-4FBによって修飾した。抗体を室温で2.5時間に渡りS-HyNic又はS-4FBと共にインキュベートした後、zebraカラムを用いて修飾抗体を脱塩し、コンジュゲーション緩衝剤に移した。続いて、等モル量のS-HyNic及びS-4FB修飾抗体と一緒に混合し、10倍のTurboLink触媒緩衝剤を混合物に1/10の体積で添加した。タンパク質混合物を次に4℃で一晩インキュベートした。コンジュゲーションプロトコルの第2日に、凝集物を除去するために5000gで5分間に渡り試料を遠心分離した。

30

#### 【0163】

抗体のコンジュゲーションは、エレクトロフォレーシス (NuPAGEゲル、Invitrogen) によって確認した。その後、コンジュゲート化生成物は、PBS-/-に対する高速タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC) 上でHiLoad 16/600 Superdex (商標) 200pgカラム (GE Healthcare Life Sciences) を用いて精製した。FPLCを用いた精製後、化学的にコンジュゲート化したBEATの異なる画分の分子量は、エレクトロフォレーシス (NuPAGE gel, Invitrogen) によって確認した。一部の例では、精製化学的コンジュゲート化BEATは、Vivaspins (Sartorius Stedim) を用いて更に濃縮した。

40

#### 【0164】

### E. SEBの機能分析

ヒト又はマウスT細胞をAPC及びSEBと共培養し、共培養の24~72時間後に細

50

胞増殖、 $IFN-\gamma$ 分泌及び脾臓への $TCRV\beta 8^+$ T細胞の浸潤について評価した。

【0165】

SEBがT細胞増殖を増強することによってCAR T細胞治療有効性を増強できたかどうかを決定するために、本発明者らは、3種の異なるマウス癌モデルE0771-Her2乳癌、24JK-Her2肉腫及びHer2トランスジェニックマウスに移植されたMC38-Her2癌腫について試験した。これらの免疫応答性Her2トランスジェニックマウスは、乳清酸性タンパク質(WAP)プロモーターの制御下で正常乳房及び大脳内でヒトHer2を発現するので、それらはHer2+細胞系に対して耐性である(Piechocki et al., 2003, Journal of Immunology, 171:5787-94)。Her2+腫瘍が定着したら、CAR T細胞を養子移入し、SEBの2回の投与は、同日及び5日後にi.p.投与した。

【0166】

#### F. BEATの機能分析

細胞増殖にBEATが及ぼす作用を評価するために、化学的にコンジュゲート化された二重特異性ポリペプチドを抗CD40/抗myc抗体から生成した。上述したHer2特異的CAR上に既に存在するc-mycタグは、CAR特異的抗原として機能した。

【0167】

T細胞、BEAT及びAPCは、共培養され、T細胞及びAPC上の機能的変化を確認するためには多数のアッセイが使用されるであろう。細胞増殖(トリチウム化チミジン組み込み、CFSE標識化及び細胞計数)、サイトカイン分泌(ELISA、サイトカイン・ビーズアレイアッセイ及び細胞内染色)及び細胞活性化/分化状態(CD25、CD69、CD45RA、CD45RO、CD27、CD28、MHCII、CD80、CD86及びCCR7を含むマーカー)は、共培養の24~72時間後に計測されるであろう。

【0168】

BEATによって刺激されたT細胞の細胞傷害性能力は、細胞溶解について試験するためのクロム遊離アッセイ、T細胞上のグランザイムB及びCD107a染色、Annexin V/7AAD並びにリアルタイムアポトーシス/ネクローシス分析(RealTime-Glo Annexin Vアポトーシス及びネクローシスアッセイキット、Promega)を含む一連のアッセイを用いて評価されるであろう。特異性を決定するためには、適切なBEAT、T細胞及び腫瘍細胞コントロールが使用されるであろう。

【0169】

BEAT生成CAR T細胞が様々な固形腫瘍細胞系に対して応答する能力を決定するために、本発明者らは、免疫欠損性マウスにおける移植後の標的として、Her2陽性ヒト細胞系MDA-MB-231乳癌、PANC1膵臓癌及びA549肺癌細胞系(又はコントロール)又はHer2トランスジェニックマウスにおけるE0771-Her2、MC38-Her2、24JK-Her2マウス腫瘍細胞系を使用するであろう。Her2+腫瘍が定着したら、CAR T細胞を養子移入し、BEATの2回の投与は、同日及び5日後にi.p.投与される。

【0170】

#### 結果

##### 哺乳動物系を用いたBEATの生成

哺乳動物系は、可溶性形態にあるBEATを生成するために使用することができ、適切な翻訳後修飾の利点を有するが、収率は相当に低い(即ち、細胞 $10^8$ 個当たり1nmol未満のscFvタンパク質を生成した)。

【0171】

Exp293細胞発現系を用いると、CD3に対してscFvを生成するのに成功した(CAR-特異的;配列番号6;図1)。全長BEATは、リポフェクタミン(図2)及びjetPEI(図3)系の両方を用いてBEAT2(MHCII/c-myc);配列番号18)及びBEAT3(CD40/CD3;配列番号20)に対して生成した。しかしながらjetPEI系は、細胞均質化後の組み換えBEATより効率的な遊離を可能

10

20

30

40

50

にした（図4）。

#### 【0172】

SEBはインビトロでのT細胞増殖及びIFN- $\gamma$ 分泌を増強した

SEBは、APC上のペプチド結合溝及び特にTCR V $\beta$ 鎖、特にマウスにおけるV $\beta$ 3、7、8及び17を有するT細胞上のTCRの外側でMHCII分子に特異的に結合する二重特異性ポリペプチドである。MHCII及びTCRへのSEBの同時結合は、極めて多数のCD4+及びCD8+両方のT細胞を刺激し、それらの活性化及び増殖をもたらす。MHCIIによって提示された従来型抗原は0.0001~0.001%のT細胞を活性化するが、他方SEB等の二重特異性ポリペプチドは、全T細胞の2~20%を刺激する（Fraser and Proft, 2008, Immunology Reviews, 225:226-43; Arcus et al., 2000, Journal of Molecular Biology, 299(1):157-68）。従って、SEBは、インビボでのCAR T細胞を活性化及び増殖させるための戦略を開発するための概念実証の分子として使用されたが、しかしながら、本明細書に記載したアプローチ及び試薬は、最小傷害性を備えるより制御された方法でこの目的を達成する。

#### 【0173】

SEBとのインキュベーション後、マウス及びヒトT細胞は有意により大きな程度まで増殖し（図5A）、及びSEBが存在する場合はより多量のIFN- $\gamma$ を分泌した（図5B）。SEBを定着E0771-Her2乳癌を有するマウスに注射すると、脾臓内のTCR-V $\beta$ 8+（SEB係合のためのTCR $\beta$ 型の1つ）細胞のパーセンテージは、非処理群（図5C）におけるより有意に高かった（図5C）。

#### 【0174】

驚くべきことに、腫瘍増殖は、CAR T細胞の養子移入及びSEBの2回の投与後に全3種のマウスモデルにおいて有意に阻害され、マウスの30~50%は腫瘍がない状態になり、長期生存を獲得した（図6）。腫瘍は、CAR T細胞又はSEB単独の投与を受けたマウスと比較した場合に、CAR T細胞及びSEBの組み合わせの投与を受けているマウスにおいて有意により大きな程度まで阻害された。

#### 【0175】

腫瘍の抑制率は、腫瘍部位内へのCAR T細胞浸潤における>10倍の増加と関連していた（図7）。SEBの係合のための正しいV $\beta$ タイプであった用量当たりのCAR T細胞の数は、およそ $2 \times 10^5$ （形質移入された全CAR T細胞の10%）であると推定された。免疫応答性モデルにおけるそのような低有効用量のCAR T細胞を用いて観察された、傷害性を伴わない高度の腫瘍阻害は、CAR T細胞についての他の公知の有効量と比較して有意且つ予想外の結果を提示し、CAR T細胞とAPCとの係合が非MHC制限法又は非V $\beta$ 制限法で発生する場合にはより大きな有効性さえ可能であることを示唆している。

#### 【0176】

BEATによるCAR T細胞の活性化及び増殖

重要なことに、CAR T細胞への抗mycの結合がCAR媒介性T細胞機能を妨害しないことが確証された（図8）。更に、化学的にコンジュゲート化した二重特異性ポリペプチドは、インビトロでのCAR T細胞増殖を極めて大きく増強したこともまた証明された（図9）。対照的に、同一モル濃度での2つの単一抗体の組み合わせは、CAR T細胞増殖を媒介しなかった。これらのデータは、二重特異性ポリペプチドがAPCにCAR T細胞と共に係合すること、及びこの係合が増強したCAR T細胞増殖をもたらすことを示唆している。

#### 【0177】

BEATは、CAR T細胞の活性化及び増殖を媒介する

BEATの3つの例は、mycタグ（CAR中に存在する）に対して特異的な抗体を様々なサブセットのAPC上で発現しているCD40、PD-L2又はClec9a何れかに対して特異的である抗体に化学的にコンジュゲート化させることによって生成した。マ

ウスCAR T細胞をBEATの存在下又は非存在下において（APCの起源としての）マウス脾細胞と共にインキュベートした。CARの発現が欠如するT細胞をコントロールとして使用した。CAR T細胞と非コンジュゲート化抗体の存在下でのAPCとのインキュベーションもまたコントロールとして使用した。

【0178】

図10に示した結果は、各BEATの存在下においてCAR T細胞はIFN- $\gamma$ を分泌するがコントロールT細胞は分泌しないことを証明している。（図10A）。

【0179】

CAR T細胞は、蛍光色素CFSEを装填し、各代替BEATの存在下又は非存在下においてAPCと共にインキュベートした。増殖の程度は、コントロール非形質移入T細胞と比較して形質移入CAR T細胞の蛍光強度における減少から明らかである（図10B）。

【0180】

これらをまとめると、これらの結果は、BEATがCAR T細胞を活性化して、それらの増殖を誘導できることを証明している。更に、様々なAPC分子及びAPCサブセットがBEATの標的として使用できることを示している。

【0181】

CD40-myc BEATはマウスにおけるE0771-Her2乳癌の根絶を可能にする

定着皮下E0771-Her2腫瘍を有するHer2-トランスジェニックマウスは、CAR T細胞（ $2 \times 10^6$ 、i.v.）及び／又はmyc-CD40に対して特異的なBEAT（第0日に36  $\mu$ g、i.p.）を用いて治療した。他のマウス群は、非コンジュゲート化抗myc及び抗CD40抗体の投与を受けた、又は非治療に置かれた（コントロール）。

【0182】

図11の結果は、CAR T細胞と結び付けたBEATの投与後の腫瘍増殖及びマウス生存率を示している。このデータは、正常乳腺及び脳においてHer2を発現する免疫応答性マウスにおける定着乳癌腫瘍のCAR T細胞媒介性根絶を可能にするCD40-myc BEAT の能力を証明している。

【0183】

CD40-myc BEATは腫瘍内でのT細胞の蓄積を可能にする

皮下E0771-Her2腫瘍を有するマウスは、抗HER2 CAR T細胞（ $2 \times 10^6$ 、i.v.）をCD40-myc BEAT（第0日に36  $\mu$ g、i.p.）の投与と一緒に受けた。他のマウスは、CAR T細胞若しくはBEAT単独の投与を受けた、又は非治療のまま置かれた（コントロール）。

【0184】

治療開始後第7日に、腫瘍を採取し、分離し、CD8+T細胞を検出するために染色し、フローサイトメトリーを用いて分析した。1群当たり3匹の個別マウスを表すデータ。腫瘍をホルマリン固定し、切片作製し、DAPI（青色）及び抗CD8（褐色）により染色した。列挙した治療を受けているマウスからの3切片を表す画像を示した。

【0185】

図12に示した結果は、BEATが、BEATの非存在下におけるよりはるかに大きな程度までCAR T細胞が腫瘍内で蓄積することを可能にする能力を証明している。

【0186】

CAR T細胞はマウスにおいて長期間存続する

脾臓は、CAR T細胞+CD40-myc BEATによるE0771-Her2腫瘍の根絶後に長期間（>200日間）生残しているマウス又はナイーブマウスから採取し、CAR T細胞を検出するために抗myc及びCD8により染色した。マウス3匹を表すデータ。

【0187】

10

20

30

40

50

図13に示したデータは、BEATがマウスにおけるCAR T細胞の長期存続を可能にする能力を証明しており、これはマウスが腫瘍再投与から保護されるであろうことを示唆している。

【0188】

CAR T細胞+BEAT療法後にHer2-陽性腫瘍を拒絶したマウスはHer2陽性腫瘍による再投与に対して完全に抵抗性である

Her2特異的CAR T細胞及びCD40-myc BEATによって媒介された皮下E0771-Her2腫瘍を根絶した長期生存マウスを同一のHer2陽性腫瘍細胞（ $5 \times 10^5$ ）を用いて反対側の側腹上で皮下注射により再投与した。腫瘍増殖率（上のパネル）及びマウス生存率（下のパネル）は、図14に示した。腫瘍増殖は、コントロールとしてのナイーブマウスにおいて描出した。（再投与群のマウス8匹及びコントロール群の6匹、\*\*\* $p < 0.001$ 、\*\*\*\* $p < 0.0001$ ）。

10

【0189】

これらのデータは、CAR T+BEAT療法後に（移植された）存続しているCAR T細胞がHer2陽性腫瘍のその後の再発に対して応答できるという結論を支持している。

【0190】

Her2陰性腫瘍増殖はCAR T細胞及びBEAT療法によって媒介されたHer2-陽性腫瘍を拒絶したマウスでは阻害される

以前にHer2特異的CAR T細胞及びCD40-myc BEATの投与を受けた後にE0771-Her2腫瘍を拒絶していたマウスにHer2発現が欠如するE0771（細胞 $5 \times 10^5$ 個）を反対側の側腹上に再投与した。ナイーブマウスにおける腫瘍増殖をコントロールとして示した。腫瘍増殖率（上のパネル）及びマウス生存率（下のパネル）は、図15に示した（再投与群のマウス4匹及びコントロール群のマウス5匹、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 、\*\*\*\* $p < 0.0001$ ）。

20

【0191】

これらのデータは、CAR T細胞+BEAT療法がエピトープ拡散を誘導し、それによりHer2とは異なる他の特異性のT細胞が誘導され、これが抗腫瘍活性に参加し得ることを示唆している。

【0192】

CD40-mycコンジュゲート化BEATと組み合わせた抗Her2 CAR T細胞がマウスにおけるMC38-Her2結腸癌の増殖を阻害する

30

定着皮下MC38-Her2腫瘍を有するマウスを抗Her2 CAR T細胞（ $2 \times 10^6$ 、i.v.）及びCD40-myc BEAT（第0日に $36 \mu\text{g}$ ）により治療した。他のマウス群は、CAR T細胞若しくは（列挙した）抗体単独の投与を受けた、又は非治療で置かれた（コントロール）。（マウス7匹を有していたBEAT+CAR群を除き、1群当たりマウス6匹。\*\*\* $p < 0.001$ ）。

【0193】

図16に示した結果は、乳癌以外の腫瘍タイプがCAR T細胞+BEATを用いて制御され得ることを示している。

【0194】

40

PD-L2-myc及びClec9a BEATコンジュゲートは腫瘍増殖のCAR T細胞による阻害を可能にする

APC発現分子であるPD-L2又はClec9aに対して特異的なBEATは、モノクローナル抗体の抗myc抗体への化学的コンジュゲート化によって調製した。定着皮下E0771-Her2腫瘍を有するマウスは、列挙した治療を受けた、又は非治療のまま置かれた（コントロール）（1群当たり3～6匹、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ ）。

【0195】

図17に示した結果は、様々なAPCサブセット上で見出される数種の異なる分子に対して特異的なBEATがマウスにおける腫瘍に対するCAR T細胞応答を増強できることを証明している。

50

## 【0196】

組み換えヒトCD40-myc BEATはヒトCAR T細胞の増殖を媒介する

CAR T細胞は、Her2特異的CARのレトロウイルス導入を用いてヒト末梢血から生成した。CAR T細胞 ( $2 \times 10^5 / \text{ml}$ ) をCFSEにより標識し、APCの起源としての5Gy照射CTV標識ヒト血液白血球の存在下において、化学的にコンジュゲート化させた、又は組み換えCD40-myc BEAT (コンジュゲート化  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、組み換え  $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) を用いて、又は用いずに5日間インキュベートした。空ベクターを用いて形質移入したT細胞は、コントロールとして機能した。細胞は、フローサイトメトリーを用いて分析した。

## 【0197】

図18に示した結果は、抗ヒトCD40を用いて抗mycに連結したBEATがヒトCAR T細胞の増殖を媒介できることを証明している。その結果は更に、組み換えBEATがCAR T細胞の増殖を媒介することに関して化学的にコンジュゲート化したBEATと同様に有効であることも証明している。

## 【0198】

組み換えヒトCD40-myc BEATは、CAR T細胞からのIFN- $\gamma$ 分泌を増強する

ヒトCAR T細胞は、抗Her2 CARをコードするレトロウイルスベクターを用いて末梢血から生成した。CAR T細胞は、化学的に又は組み換えにより調製したCD40-myc BEATの存在下又は非存在下において5日間に渡りAPCの起源としてのヒト血液白血球と共にインキュベートした。抗CD3は、陽性コントロールとして一部の培養ウェル内に含めた。上清を採取し、ELISAを用いてIFN- $\gamma$ について分析した。

## 【0199】

図19に示したように、組み換えBEATは、ヒトCAR T細胞を活性化してIFN- $\gamma$ を分泌させることができる。

## 【0200】

コンジュゲート化ヒトBEATと組み合わせたヒトCAR T細胞はマウスにおける腫瘍増殖を阻害する

定着皮下MDA-MB-231ヒト乳腺腫瘍を有するNod-SCID- $\gamma$  (NSG) マウスは、コンジュゲート化ヒトCD40-myc BEATを含む又は含まないCAR T細胞の投与を受けた(第0日、 $36 \mu\text{g}$ 、i.p.)。APCの起源として機能させるために、ヒト血液由来白血球 ( $1 \times 10^6$ ) もまた静脈内注射により送達した。1群のマウスは、コントロールとして非治療のまま置かれた(1群当たりマウス5匹、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 、スチューデントのt検定)。

## 【0201】

図20に示したデータは、マウスにおいて定着したヒト癌に対するヒトCAR T細胞の効力を増強する能力を証明している。

## 【0202】

CAR内の様々な位置に所在する一連の抗原に対して特異的なBEATはCAR T細胞からの応答を誘導することができる

CAR内の一連の抗原に対して特異的なBEATの能力は、CAR内の異なる場所に組み込まれた抗原(即ち、親和性タグ)を備えるCARを生成することによって評価した。特に、癌胎児性抗原(CEA)特異的CARは、CAR内の中心に所在するmyc抗原を組み込むことによって調製し、Her2-FLAG CARは、CARのアミノ末端内にFLAG抗原を組み込むことによって調製した。

## 【0203】

CEA-myc CAR又はHer2-FLAG CARを有している  $5 \times 10^5$  個のマウスCAR T細胞を  $5 \times 10^5$  個のCD40陽性マウス脾細胞(APCの起源として)と共に抗myc抗体に対するモノクローナル抗体の化学的コンジュゲート化によって調製

10

20

30

40

50

したAPC発現分子CD40に対して特異的なBEAT (BEAT1; 本明細書の別の場所で記載) 又は抗FLAG抗体に対するモノクローナル抗体の化学的コンジュゲート化によって調製したAPC発現分子CD40に対して特異的なBEAT (BEAT5) の存在下又は非存在下でインキュベートした。非形質移入脾細胞をコントロールとして使用した。CAR T細胞と非コンジュゲート化抗体の存在下でのAPCとのインキュベーションもまたコントロールとして使用した。IFN- $\gamma$ の分泌は、共培養の72時間後にELISAによって決定した。

【0204】

図21に示した結果は、CEA-myc CAR T細胞がコントロールと比較すると、BEAT1の存在下でIFN- $\gamma$ を分泌したことを証明している。同様に、HER2-FLAG CAR T細胞は、コントロールと比較すると、BEAT5の存在下でIFN- $\gamma$ を分泌した。

【0205】

これらの結果は、BEATがCAR T細胞療法の有効性を向上させることに幅広い用途を有することを証明している。第一に、BEATは、CAR T細胞からの応答を誘導することが証明されてきたが、ここでCAR T細胞は、様々な腫瘍関連抗原に向けられる。

【0206】

第二に、BEATは、様々な組織タイプにおいて発生する癌の状況においてCAR T細胞が使用される場合に、T細胞からの応答を誘導することが証明されている。

【0207】

BEATの広範な有用性は、CAR T療法の状況において様々な異なるCARの構造の有効性を増加させるために、BEATの設計を修飾することが可能であるという事実によって更に証明されている。例えば、本明細書に提示した結果は、BEATがCAR上の様々な抗原に結合し、CAR T細胞からの応答を誘導する能力を保持するように設計され得ることを証明している。従って、CAR内の一連の抗原は、BEATの標的として使用することができる。

【0208】

重要なことには、更に、CAR上の抗原の場所をBEATの有効性に有意に影響を及ぼすことなく変化させられることもまた証明されてきた。より特別には、中央に所在するmycタグ (即ち、Her2-myc及びCEA-myc CAR) 及びN末端に所在するFLAGエピトープ (即ち、Her2-FLAG CAR) は、どちらもBEATにとっての有用な結合標的であることが明らかになった。これらのデータは、CAR内の様々な位置に所在する抗原がCAR T細胞応答を誘導するために有効であることも更に証明している。

【0209】

結論

本明細書に提示した結果は、CAR T療法の有効性を増加させるために広範囲の様々なCAR構造と結び付けて使用できるように、BEATを設計且つ特別仕立てできることを証明している。

【0210】

本試験で生成した二重特異性ポリペプチド (即ち、BEAT) は、APCの係合を通してCAR T細胞を活性化及び増殖させることに効果的であることが証明されている。更に、BEATは、様々な腫瘍抗原及び／又はCAR内の異なる位置での様々な異なる抗原を標的とする場合に有効であることが証明されている。このアプローチは、MHCハプロタイプに関する制限がないので、T細胞療法を支持する他の方法に比して特に有利である。

【0211】

BEATの薬物動態学は、有利にも、「要求に応じた」活性化及び増殖を誘導し、それにより抗腫瘍有効性の要求をワクチン等のCAR T細胞支持の他の方法を用いては達成されていない正常組織に対する傷害性を制御しながらバランスをとることによってCAR

10

20

30

40

50

T細胞全体へのより高度の制御を可能にする。

【図面】

【図 1】

【図 2】

図 1

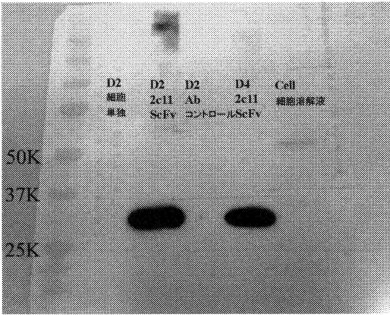
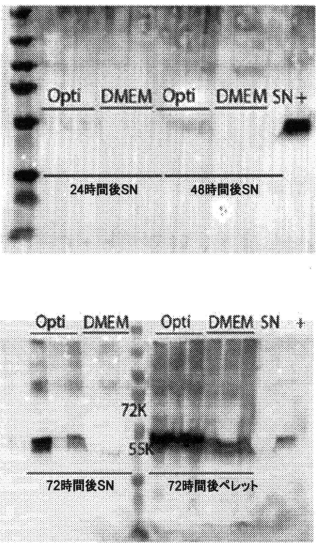


図 2



【図 3】

【図 4】

図 3

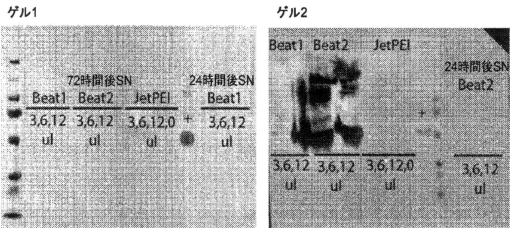
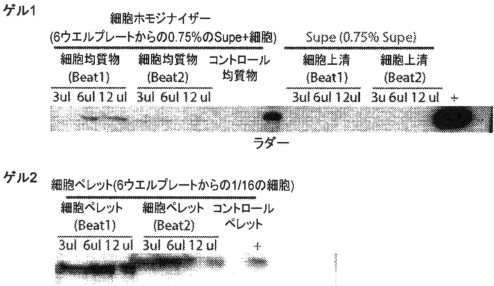


図 4



10

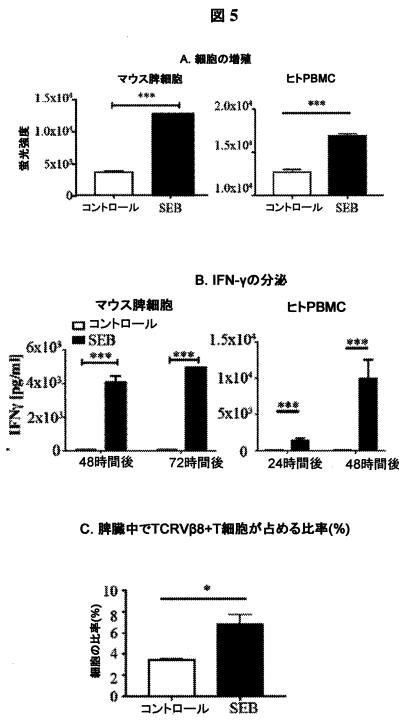
20

30

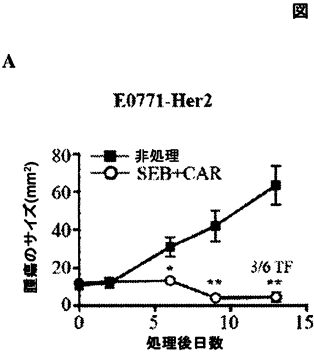
40

50

【図 5】



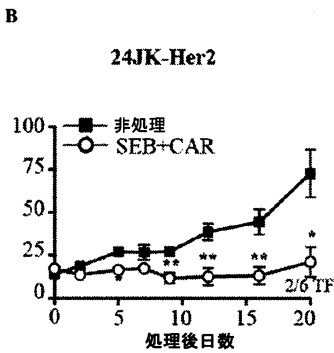
【図 6 A】



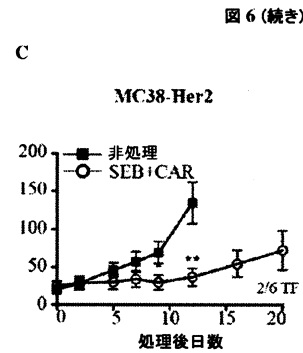
10

20

【図 6 B】



【図 6 C】

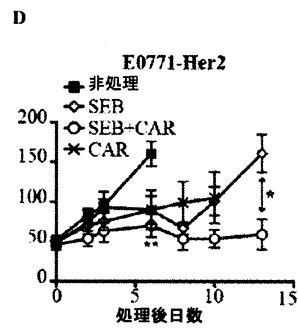


30

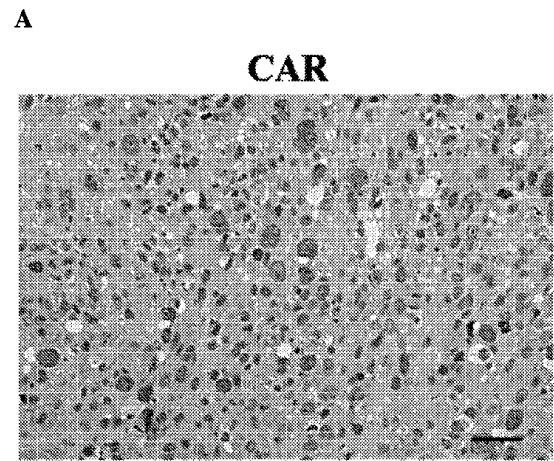
40

50

【図 6 D】

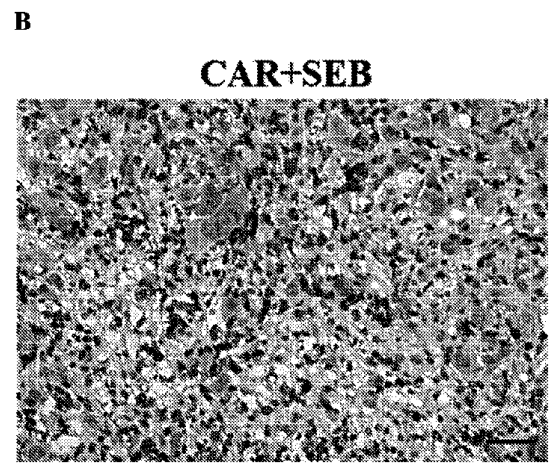


【図 7 A】

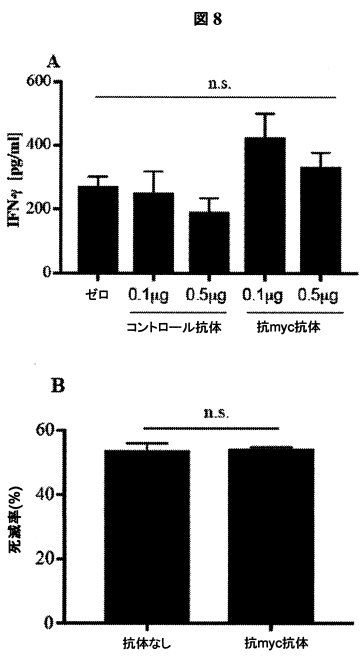


10

【図 7 B】



【図 8】



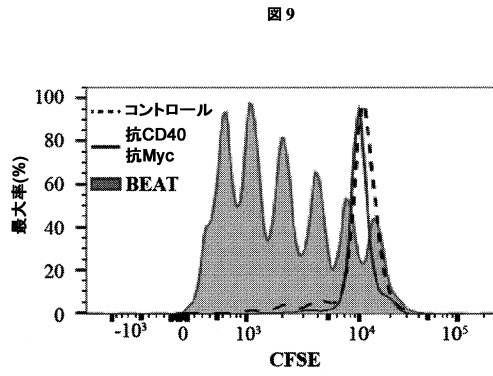
20

30

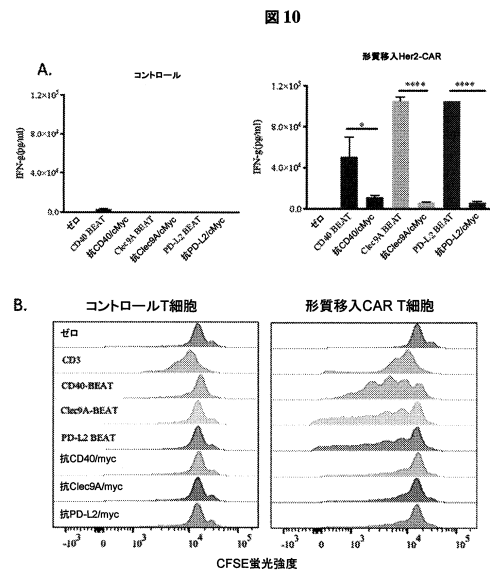
40

50

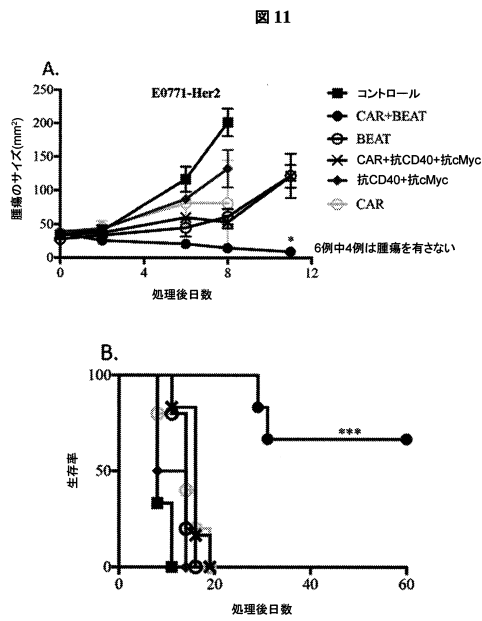
【図 9】



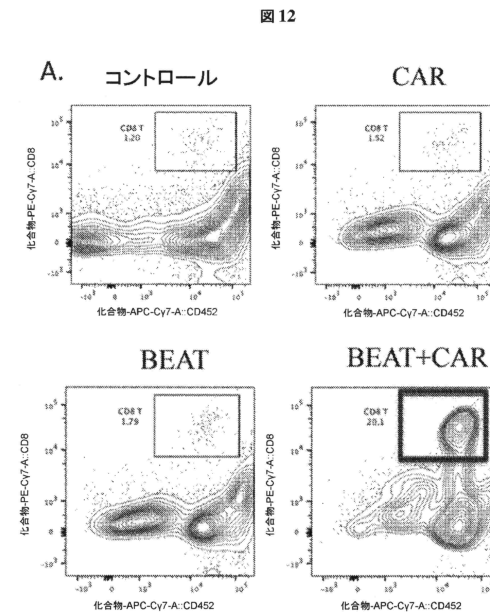
【図 10】



【図 11】



【図 12 A】



10

20

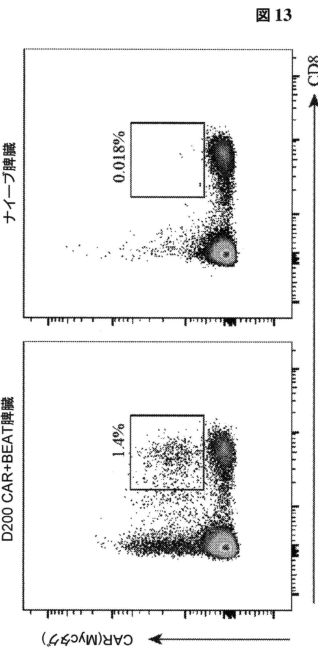
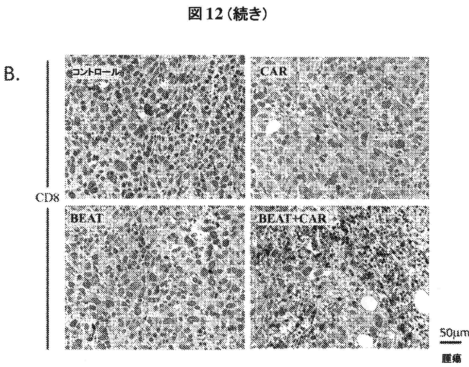
30

40

50

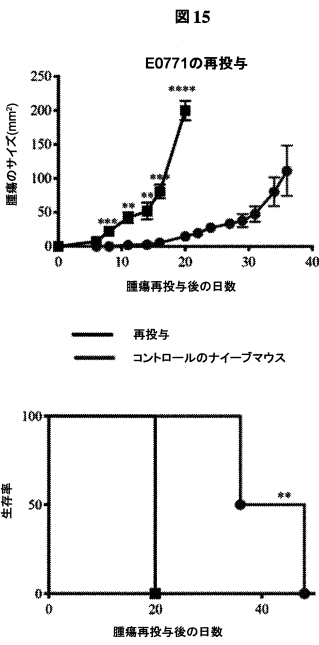
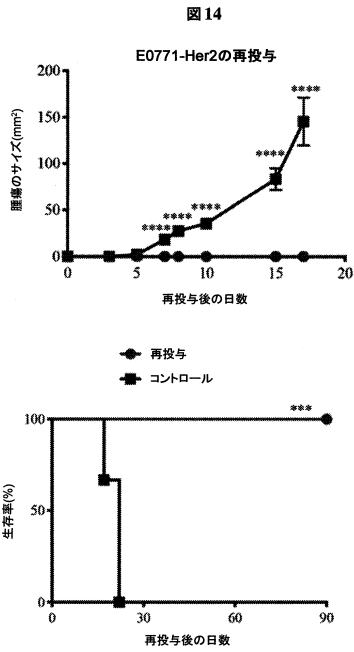
【図 1 2 B】

【図 1 3】



【図 1 4】

【図 1 5】



10

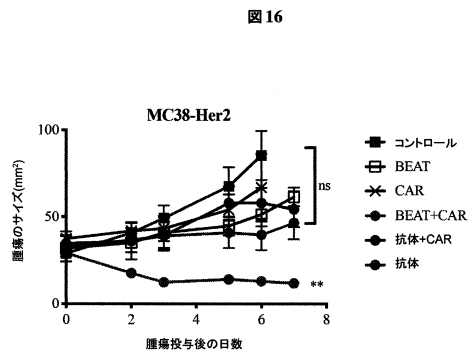
20

30

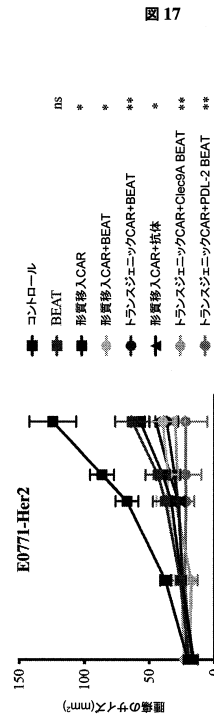
40

50

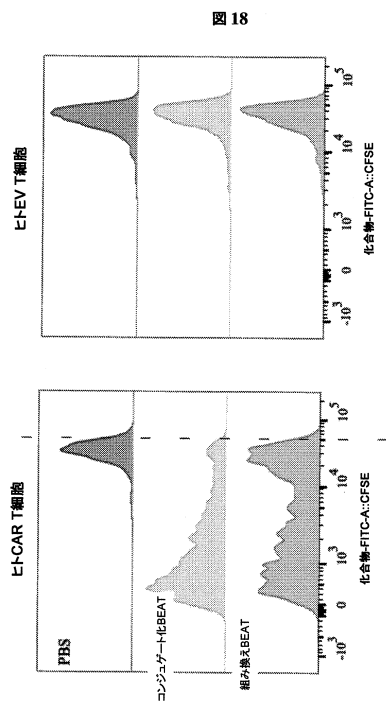
【図 16】



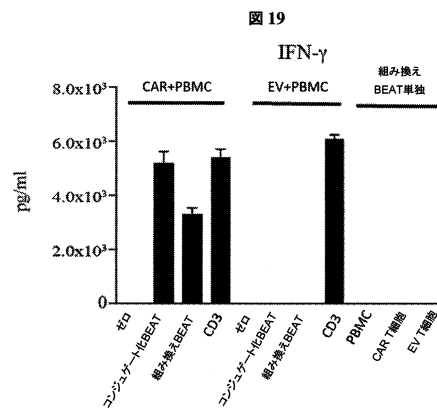
【図 17】



【図 18】



【図 19】



10

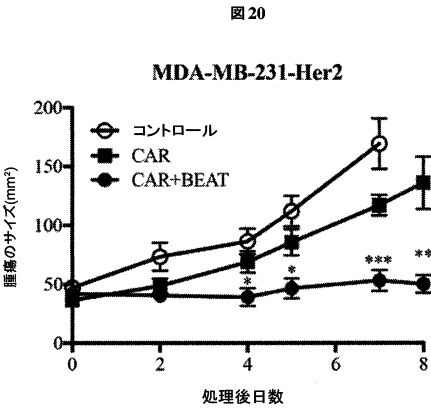
20

30

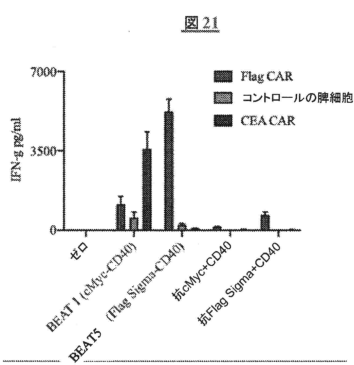
40

50

【図 2 0】



【図 2 1】



【配列表】

0007674243000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/17 (2025.01)

A 6 1 K 35/17

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

## (33)優先権主張国・地域又は機関

オーストラリア(AU)

・コート・5

## (72)発明者 クレア・スレイニー

オーストラリア・ヴィクトリア・3 0 8 8・グリーンズボロー・ドゥ・プロネ・クレセント・1 7

## (72)発明者 ビアンカ・フォン・シャイト

オーストラリア・ヴィクトリア・3 0 3 2・アスコット・ベール・エンクレーブ・アベニュー・2  
1

審査官 坂井田 京

## (56)参考文献

国際公開第2 0 1 7 / 1 7 7 3 3 7 (WO, A 1)

中国特許出願公開第1 0 7 4 1 7 7 9 2 (CN, A)

最新医学, 2003年, 58(12), P.2793-2801

臨床血液, 2017年, 58(8), P.966-976

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq