

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6567425号
(P6567425)

(45) 発行日 令和1年8月28日 (2019.8.28)

(24) 登録日 令和1年8月9日 (2019.8.9)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/737 (2006.01)	A 6 1 K 31/737
A 6 1 K 31/65 (2006.01)	A 6 1 K 31/65
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 12 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2015-556506 (P2015-556506)	(73) 特許権者	512244819
(86) (22) 出願日	平成26年2月7日 (2014.2.7)		アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲー ーエムペーハー
(65) 公表番号	特表2016-514090 (P2016-514090A)		AMGEN Research (Munich) GmbH
(43) 公表日	平成28年5月19日 (2016.5.19)		ドイツ 81477 ミュンヘン シュタ ッフエルゼー シュトラッセ 2
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/052406	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02014/122251		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成26年8月14日 (2014.8.14)	(74) 代理人	100102118
審査請求日	平成29年1月24日 (2017.1.24)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	61/762, 718	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成25年2月8日 (2013.2.8)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
(31) 優先権主張番号	61/811, 526		弁理士 刑部 俊
(32) 優先日	平成25年4月12日 (2013.4.12)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD3特異的結合ドメインによって引き起こされる潜在的有害事象を緩和するための抗白血球接着

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者における、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための組成物であって、該治療がCD19 x CD3二重特異性単鎖抗体を使用するものであり、該CD19 x CD3二重特異性単鎖抗体がMT103であり、該組成物が、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する非グルコシルチコイド系化合物を含み、非グルコシルチコイド系化合物がPPSまたはミノサイクリンである、前記組成物。

【請求項 2】

組成物が、患者における、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療の最初の投薬、再曝露、および／または増加の前に／と同時に投与するためのものであり、該治療がCD19 x CD3二重特異性単鎖抗体を使用するものであり、該CD19 x CD3二重特異性単鎖抗体がMT103である、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

臨床的有害事象が神経学的有害事象を含む、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

神経学的有害事象が、(i) 失見当識／錯乱および／または喚語困難／失語症を含む認知障害、(ii) 発作、(iii) 運動性振戦、運動失調、構音障害、および筆記困難を含む、一部は (i) または (ii) の任意の前駆期として観察される小脳症状のうちの1つまたは複数

10

20

である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

患者が、B/T細胞比が1:5未満であること、またはB細胞数が約50個未満のB細胞 / μ l末梢血であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

哺乳動物T細胞が再指向化哺乳動物T細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

哺乳動物内皮細胞が大血管または毛細血管から単離される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 8】

哺乳動物内皮細胞がヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) またはヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) より選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

患者が哺乳動物、好ましくは霊長類、最も好ましくはヒトである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

患者における、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および/または改善する、および/または処置する方法において使用するための、MT103と共に請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物を含むキットであって、該治療がCD19 x CD3二重特異性単鎖抗体を使用するものであり、該CD19 x CD3二重特異性単鎖抗体がMT103である、キット。

20

【請求項 11】

MT103をさらに含む薬学的組成物である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

患者における、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、改善する、および/または処置するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物の使用であって、該治療がCD19 x CD3二重特異性単鎖抗体を使用するものであり、該CD19 x CD3二重特異性単鎖抗体がMT103である、使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は本質的に、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および/または改善する、および/または処置する方法において使用するための、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物に関する。標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を有するかまたはそのリスクがある患者を処置する方法もまた企図される。さらに、本発明は、これらの化合物のいずれかまたはそれらの組み合わせ、CD3特異的結合ドメインまたはキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸、および該化合物または該組み合わせが、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象の予防または改善のために使用されることを示す封入されたラベルまたは添付文書を含むキットに関する。

40

【0002】

本明細書の本文全体を通して、いくつかの文書が引用されている。本明細書において引用された文書(すべての特許、特許出願、科学出版物、製造業者の仕様書、説明書等を含む)の各々は、前記または下記を問わず、全体として参照により本明細書に組み入れられる。参照により組み入れられる事柄が本明細書と矛盾するかまたは相反する範囲では、本

50

明細書が任意のこのような事柄に優先する。本明細書中のいかなるものも、本発明が先行発明のせいでそのような開示に先行する権利を与えられないと承認するものとして解釈されるべきではない。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

2012年に、B細胞悪性腫瘍は、米国で新たに診断された癌のおよそ5%を占めた。急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、およびB細胞非ホジキンリンパ腫 (B-NHL) の年齢調整発生率はそれぞれ、1.6人、4.2人、および16.5人 / 男女100,000人 / 年であった (Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/、2011年11月SEERデータ提出に基づく、2012年にSEERウェブサイトに掲示された(非特許文献1))。繰り返される集中的な標準治療にもかかわらず、B細胞悪性腫瘍は、治療に対して不応性となるかまたは治療後に再発する可能性があり、治療できないままである場合が多い。したがって、これらの患者集団における転帰を改善するための革新的な処置様式に対する高い医学的必要性が存在する。

【0004】

抗体ベースの癌治療は、有効に作用するためには、癌細胞の表面に堅固に結合した標的抗原を必要とする。表面標的に結合することにより、抗体は、直接的に、またはそれが二重特異性抗体である場合には例えば細胞傷害性T細胞を動員することによって間接的に、致死シグナルを癌細胞に送達する。理想的な処置シナリオでは、標的抗原はすべての癌細胞上に豊富に存在しかつ到達可能であり、正常細胞上には存在しないか、または保護されているか、またははるかに少ない。このような状況は、規定量の抗体ベースの治療剤が癌細胞を効果的に攻撃するが、正常細胞を温存する治療域のための基礎を提供する。

【0005】

モノクローナル抗体は、約20年前に標準的化学療法に初めて加えられたが、いまだこの組み合わせがB細胞悪性腫瘍において完全に治療的であることは立証されていない。近年、二重特異性単鎖抗体を用いた新規治療アプローチが臨床試験に入り、有望な初期成果を示した。T細胞を再指向化する二重特異性抗体などの多重特異性抗体は、癌標的細胞の処置にとって特に興味深い。T細胞の再指向化は、T細胞が、T細胞のクロノタイプ天然抗原受容体特異性とは異なる抗原受容体特異性を備えていること、すなわち再指向化T細胞が、例えば該癌標的細胞を認識する結合ドメインを含むことを含む。これは例えば、T細胞が関与する二機能性もしくは多機能性の抗体もしくは抗体誘導体、例えばとりわけCD3特異的結合ドメインを含む二重特異性抗体などによって、またはCD19を認識するキメラ抗原受容体 (CAR) などのCARによるT細胞の形質導入によって (Knochenderfer et al., Nature Reviews 2013; Clinical Oncology; 「Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors」(非特許文献2)を参照されたい)、達成され得る。B細胞上のCD19またはCD20およびT細胞上のCD3を標的化する二重特異性抗体は、B細胞悪性腫瘍の処置にとって特に興味深い。ブリナツモマブ (場合によりAMG 103またはMT103としても示される) は、単一のポリペプチド鎖に組み立てられた4つの免疫グロブリン可変ドメインからなる組換えCD19xCD3二重特異性scFv抗体である。可変領域のうちの2つは、大部分の正常および悪性B細胞上に発現している細胞表面抗原であるCD19に対する結合部位を形成する。その他の2つの可変ドメインは、T細胞上のT細胞受容体複合体の一部であるCD3に対する結合部位を形成する。正常または悪性B細胞上のCD19に結合し、それと同時にCD3を介してT細胞を動員することにより、ブリナツモマブは細胞溶解性シナプスの形成を誘導し (Offner et al. Mol. Immunol. 2006; 43:763-71(非特許文献3))、それによって、結合したB細胞の根絶を引き起こす。ブリナツモマブは、身体の細胞傷害性T細胞を複数のB腫瘍細胞に対してポリクローン様式で再指向化するように設計されている。

【 0 0 0 6 】

B-NHL (Bargou et al. Science. 2008; 321:974-7(非特許文献4)) およびB-前駆体ALL (Topp et al. J Clin Oncol. 2011; 29:2493-8(非特許文献5)) の両方において、ブリナツモマブの安全性および有効性を評価する様々な臨床試験が行われた。これらの試験により、一般的に二重特異性単鎖抗体形式の、および特にブリナツモマブの治療可能性が高いという概念の臨床的証明が確立され、そのさらなる開発がB-NHL、ALL、およびCLLにおいて検証された。

【 0 0 0 7 】

抗体は、多くの障害、特に癌の処置における効果的な手段であるが、その投与は必ずしも副作用がないわけではない。臨床試験における、場合により「有害作用」またはより頻繁に「有害事象」としても示される(場合により「AE」としても示される)「副作用」は、例えばCD3特異的結合ドメインを含む多重特異性抗体またはより好ましくは二重特異性抗体による、再指向化T細胞を用いた患者の処置における薬物療法に起因する、有害でかつ望ましくない作用である。有害作用は、患者の健康状態の可逆的または非可逆的な変化を引き起こし得る。有害作用は、有害であり、潜在的にはさらに生命を脅かし得るため、それを回避することが非常に望ましい。

【 0 0 0 8 】

しかしながら、神経学的症状を引き起こすことのない、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療(例えば、CD19xCD3二重特異性単鎖抗体ベースの治療)を設計することは難しく、または別の言い方をすれば、患者の忍容性が増加した、すなわちCNS AEなどの有害な副作用が減少したまたはさらにはない、そのような治療、例えばCD19xCD3二重特異性単鎖抗体ベースの治療を提供することが望ましい。CNS AEに起因する処置の中断を回避し、ひいては患者がその処置から十分に恩恵を受けることができる程度まで、CNS AEを緩和することが特に望ましい。

【 0 0 0 9 】

したがって、典型的に再指向化T細胞に基づく治療(CD19xCD3二重特異性単鎖抗体を使用する治療など)に伴って起こる上記の副作用を軽減するかまたはさらには回避する手段および方法を提供する強い必要性が、当技術分野において存在する。

【 0 0 1 0 】

本発明はこの必要性に取り組むものであり、したがって技術的課題に対する解決策として、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および/または改善する、および/または処置する方法において使用するための、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物を提供する。

【 0 0 1 1 】

本発明のさらなる態様は、本明細書において特徴付けられ、記載され、また特許請求の範囲においても反映される。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 2 】

【 非特許文献 1 】 Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse S F, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD、http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/、2011年11月SEERデータ提出に基づく、2012年にSEERウェブサイトに掲示された

【 非特許文献 2 】 Knochenderfer et al., Nature Reviews 2013; Clinical Oncology; 「Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors」

【 非特許文献 3 】 Offner et al. Mol. Immunol. 2006; 43:763-71

10

20

30

40

50

【非特許文献4】Bargou et al. Science. 2008; 321:974-7

【非特許文献5】Topp et al. J Clin Oncol. 2011; 29:2493-8

【発明の概要】

【0013】

本発明は、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物を提供する。

【0014】

1つの態様において、前記化合物は、

10

(a) T細胞接着分子に結合することができ、

(b) T細胞接着分子の結合部位を遮断することができ、および／または

(c) T細胞接着分子の発現を阻害するかまたは減少させ、

かつ、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物である。

【0015】

さらなる態様において、前記化合物は、

20

(a) 内皮接着分子に結合することができ、

(b) 内皮接着分子の結合部位を遮断することができ、および／または

(c) 内皮接着分子の発現を阻害するかまたは減少させ、

かつ、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物である。

【0016】

本発明はまた、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための化合物を同定する方法であって、

30

(a) 該化合物を哺乳動物T細胞、哺乳動物内皮細胞、T細胞接着分子、および／または内皮接着分子と接触させること；ならびに

(b) 該化合物が、

(i) 哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかもしくは阻害するかどうか；

(ii) T細胞接着分子に結合することができるかどうか、

(iii) T細胞接着分子の結合部位を遮断することができるかどうか、

(iv) T細胞接着分子の発現を阻害するかもしくは減少させるかどうか、

(v) 内皮接着分子に結合することができるかどうか、

(vi) 内皮接着分子の結合部位を遮断することができるかどうか、および／または

40

(vii) 内皮接着分子の発現を阻害するかもしくは減少させるかどうか、

を評価すること

を含む方法を提供する。

【0017】

1つの態様において、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む前記治療は、CD3結合ドメインを含むことが想定される。

【0018】

別の態様において、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む前記治療は、キメラ抗原受容体 (CAR) を有する遺伝子操作されたT細胞を含むことが想定される。

【0019】

50

本発明に従って使用される化合物が、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む前記治療の最初の投薬、再曝露（すなわち、例えばその後の投与段階などの再投薬）、および／または投与量の増加（例えば抗体を投与する場合には一般的な習慣である）の前に、および／またはそれと同時に投与されることもまた想定される。

【0020】

本発明はさらに、CD3結合ドメインと共に、本発明に従って定義または同定された化合物を含むキットを提供する。

【0021】

本発明はまた、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸と共に、本発明に従って定義または同定された化合物を含むキットを提供する。

10

【0022】

CD3結合ドメインと共に、本発明に従って定義または同定された化合物を含む薬学的組成物。

【0023】

本発明はさらに、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化の方法において使用するためのCD3結合ドメインに関し、この場合、該患者は本明細書において定義される化合物を含む治療を受ける。

【0024】

1つの態様において、本発明は、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化の方法において使用するためのキメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸に関し、この場合、該患者は本明細書において定義される化合物を含む治療を受ける。

20

【0025】

1つの態様において、前記臨床的有害事象は神経学的有害事象を含む。

【0026】

さらなる態様において、前記神経学的有害事象は、(i) 失見当識／錯乱および／または喚語困難／失語症を含む認知障害、(ii) 発作、(iii) 運動性振戦、運動失調、構音障害、および筆記困難を含む、一部は (i) または (ii) の任意の前駆期として観察される小脳症状のうちの1つまたは複数である。

【0027】

本発明との関係において、前記CD3結合ドメインが二重特異性単鎖抗体であることが特に想定される。

30

【0028】

前記二重特異性単鎖抗体は、本発明のさらなる態様において、B細胞に特異的である、好ましくはCD19、CD22、CD20、またはCD79aなどのB細胞リンパ球上に見出され得るCDマーカー、好ましくはCD19に特異的である結合ドメインを含む。

【0029】

1つの態様において、前記二重特異性単鎖抗体はCD19 x CD3またはCD20 x CD3二重特異性単鎖抗体である。

【0030】

本発明のさらなる態様において、前記キメラ抗原受容体（CAR）は、B細胞に特異的である、好ましくはCD19、CD22、CD20、またはCD79aなどのB細胞リンパ球上に見出され得るCDマーカー、好ましくはCD19に特異的である結合ドメインを含む。

40

【0031】

本発明の特に好ましい態様において、前記CD19 x CD3二重特異性単鎖抗体はブリナツモマブ（場合によりMT103またはAMG103としても示される）である。

【0032】

本発明のさらなる好ましい態様において、前記患者は、B/T細胞比が1:5未満であること、またはB細胞数が約50個未満のB細胞／ μ l末梢血であることを特徴とする。

【0033】

本発明との関係において使用される化合物は、本明細書において開示される化合物より

50

選択されることが想定される。

【0034】

本発明はまた、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、改善する、および／または処置するための方法であって、本明細書において定義される化合物の治療有効量を投与することを含む方法に関する。

【0035】

本発明の1つの態様において、哺乳動物内皮細胞へのその結合が本明細書において定義される化合物によって減少するかまたは阻害される前記哺乳動物T細胞は、再指向化哺乳動物T細胞である。

10

【0036】

本明細書に記載される、本発明との関係において言及される哺乳動物内皮細胞は、大血管または毛細血管から単離されることもまた企図される。

【0037】

1つの態様において、前記哺乳動物内皮細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) またはヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) より選択され、HBMECが好ましい。

【0038】

T細胞接着分子は、本発明との関係においては、インテグリン (4-インテグリン ; L-2-インテグリン、 L-インテグリン、 7-インテグリンなど)、セレクチン (L-セレクチンなど)、および／またはCD44より選択される。

20

【0039】

内皮接着分子は、本発明との関係においては、セレクチン (E-セレクチンまたはP-セレクチンなど) ; 細胞接着分子CAM (ICAM-1、MAdCAM、VCAM-1など)、および／またはPAR-1より選択される。

【0040】

本発明との関係においては、前記患者が哺乳動物、好ましくは霊長類、および最も好ましくはヒトであることもまた想定される。

[本発明1001]

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物。

30

[本発明1002]

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための、

(a) T細胞接着分子に結合することができ、

(b) T細胞接着分子の結合部位を遮断することができ、および／または

(c) T細胞接着分子の発現を阻害するかまたは減少させ、

かつ哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物。

40

[本発明1003]

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための、

(a) 内皮接着分子に結合することができ、

(b) 内皮接着分子の結合部位を遮断することができ、および／または

(c) 内皮接着分子の発現を阻害するかまたは減少させ、

かつ哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物。

[本発明1004]

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨

50

床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための化合物を同定する方法であって、

(a) 該化合物を哺乳動物T細胞、哺乳動物内皮細胞、T細胞接着分子、および／または内皮接着分子と接触させること；ならびに

(b) 該化合物が、

(i) 哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかもしくは阻害するかどうか、

(ii) T細胞接着分子に結合することができるかどうか、

(iii) T細胞接着分子の結合部位を遮断することができるかどうか、

(iv) T細胞接着分子の発現を阻害するかもしくは減少させるかどうか、

(v) 内皮接着分子に結合することができるかどうか、

(vi) 内皮接着分子の結合部位を遮断することができるかどうか、および／または

(vii) 内皮接着分子の発現を阻害するかもしくは減少させるかどうか

を評価すること

を含む方法。

[本発明1005]

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療が、CD3結合ドメインを含む、本発明1001～1004のいずれかの使用のための化合物。

[本発明1006]

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療が、キメラ抗原受容体 (CAR) を有する遺伝子操作されたT細胞を含む、本発明1001～1005のいずれかの使用のための化合物。

[本発明1007]

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療の最初の投薬、再曝露、および／または増加の前に／と同時に投与される、本発明1001～1006のいずれかの使用のための化合物。

[本発明1008]

CD3結合ドメインと共に、前記本発明のいずれかにおいて定義または同定された化合物を含むキット。

[本発明1009]

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸と共に、前記本発明のいずれかにおいて定義または同定された化合物を含むキット。

[本発明1010]

CD3結合ドメインと共に、前記本発明のいずれかにおいて定義または同定された化合物を含む薬学的組成物。

[本発明1011]

患者が、前記本発明のいずれかにおいて定義された化合物を含む治療に供される、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化の方法において使用するためのCD3結合ドメイン。

[本発明1012]

患者が、前記本発明のいずれかにおいて定義された化合物を含む治療に供される、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化の方法において使用するための、キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸。

[本発明1013]

臨床的有害事象が神経学的有害事象を含む、前記本発明のいずれかのもの。

[本発明1014]

神経学的有害事象が、(i) 失見当識／錯乱および／または喚語困難／失語症を含む認知障害、(ii) 発作、(iii) 運動性振戦、運動失調、構音障害、および筆記困難を含む、一部は (i) または (ii) の任意の前駆期として観察される小脳症状のうちの1つまたは複数である、前記本発明のいずれかのもの。

10

20

30

40

50

[本発明1015]

CD3結合ドメインが二重特異性単鎖抗体である、前記本発明のいずれかのもの。

[本発明1016]

二重特異性単鎖抗体がCD19 x CD3二重特異性単鎖抗体である、前記本発明のいずれかのもの。

[本発明1017]

キメラ抗原受容体 (CAR) がCD19結合ドメインを含む、前記本発明のいずれかのもの。

[本発明1018]

CD19 x CD3二重特異性単鎖抗体がMT103/AMG103である、前記本発明のいずれかのもの。

[本発明1019]

患者が、B/T細胞比が1:5未満であること、またはB細胞数が約50個未満のB細胞 / μ l末梢血であることを特徴とする、前記本発明のいずれかのもの。

[本発明1020]

化合物がPPS、ミノサイクリン、またはナタリズマブである、前記本発明のいずれかのもの。

[本発明1021]

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、改善する、および / または処置するための方法であって、前記本発明のいずれかにおいて定義された化合物の治療有効量を投与することを含む、方法。

[本発明1022]

哺乳動物T細胞が再指向化哺乳動物T細胞である、前記本発明のいずれかのもの。

[本発明1023]

哺乳動物内皮細胞が大血管または毛細血管から単離される、前記本発明のいずれかのもの。

[本発明1024]

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) またはヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) より選択される、本発明1023の哺乳動物内皮細胞。

[本発明1025]

T細胞接着分子が、インテグリン (4-インテグリン ; L- 2-インテグリン、 L-インテグリン、 7-インテグリンなど)、セレクトイン (L-セレクトインなど)、CD44、CD162、および / またはSrcファミリーキナーゼより選択される、前記本発明のいずれかの化合物。

[本発明1026]

内皮接着分子が、セレクトイン (E-セレクトインまたはP-セレクトインなど) ; 細胞接着分子CAM (ICAM-1、MAdCAM、VCAM-1など)、および / またはPAR-1より選択される、前記本発明のいずれかの化合物。

[本発明1027]

患者が哺乳動物、好ましくは霊長類、最も好ましくはヒトである、前記本発明のいずれかのもの。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 1 】

【図 1】第1相臨床試験において $60 \mu\text{g} / \text{m}^2 / \text{日}$ のブリナツモマブ用量レベルで処置されたB-NHL患者の処置第1週目における、選択された薬理学的マーカーの例示的な時間経過。末梢血および血清中の細胞の数 / 割合およびタンパク質濃度をそれぞれ示す。A. 注入開始直後の (すなわち、既に45分の時点での) 末梢血からの迅速なT細胞消失を特徴とするT細胞再分布。B. T細胞再分布と同時にピークに達する、その細胞表面上に中等度親和性 (すなわち、活性化) LFA-1を有するT細胞数の増加。C. T細胞再分布中の、活性化内皮細胞によって放出されたAng-2の血清濃度の増加。D. T細胞再分布は、末梢血からの他の単核細胞 (例えば単球について示されているように) の消失を伴い、この消失はベースライン数への回復が長引く。

10

20

30

40

50

【図2】ブリナツモマブによって引き起こされる中枢神経系有害事象をもたらす多段階病理学的機序の現在の仮説。A：ブリナツモマブの注入の開始または段階的用量増加により、血管内皮へのT細胞接着が増加する。B：接着性T細胞は内皮を活性化し、血管外遊走し始める。活性化された内皮細胞は、他の末梢血白血球、例えば単球を誘引する。血管外遊走したT細胞はサイトカインおよびケモカインを分泌し、これらは次に一過性の神経炎症および血液-CSF関門の攪乱を引き起こす。

【図3】PPS同時薬物療法を受けなかった患者（A、B、およびC）と比較した、CNS AEの予防または改善ならびに該CNS AEに起因する処置の中断の防止のためにPPS同時薬物療法を受けた3名の患者（D、E、およびF）におけるT細胞再分布動力学的遅延。T細胞数およびB細胞数は、末梢血1 μ l当たりの絶対数として示される。時間軸は、各処置サイクル内の時期を表す。ブリナツモマブ用量レベル、例えば5、15、または60 μ g/ m^2 /日を表示してある。T細胞再分布動力学的の違いを明らかにする、注入の開始または任意の用量ステップ後の0時間、45分、および2時間の時点を表示してある。

【図4】流動培養した内皮細胞と静置培養した内皮細胞の比較。A. HBMECをマイクロスライドI^{0.4} Luer Collagen IVにおいて、5 dyn/ cm^2 の壁剪断応力下で（左側）または静置条件下で（右側）48時間培養した。B. HUVECをマイクロスライドLuer I^{0.4} ibiTreatにおいて、10 dyn/ cm^2 の壁剪断応力下で（左側）または静置条件下で（右側）48時間培養した。顕微鏡解析は10 x対物レンズを用いて行った。

【図5】短期条件下におけるHUVEC上でのT細胞ローリングおよび接着に及ぼすAMG 103の影響。新たに単離されたT細胞を、AMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに37で40分間ブレインキュベートしてから、流動培養HUVEC上の1 dyn/ cm^2 の剪断応力での45秒間のT細胞のローリングに供した。ローリング速度および接着細胞の絶対数は、自動追跡モジュールを用いて顕微鏡によって決定した。A. データは、平均値 \pm SD T細胞ローリング速度を表す。*** : $P < 0.001$ 。B. データは、接着T細胞の絶対数を表す。C. AMG 103と共に (+AMG 103) またはこれを伴わずに (-AMG 103) ブレインキュベートしたT細胞の1 dyn/ cm^2 の剪断応力での45秒間のローリング後の、PFA固定HUVECの免疫蛍光染色。顕微鏡解析は、20 x対物レンズおよびUV光を用いて行った。ICAM-1およびP-セレクチン染色を、それぞれ赤色および緑色で示す。

【図6】長期条件下におけるHBMEC上でのT細胞ローリングに及ぼすAMG 103の影響。A. 流動培養HBMEC上の1 dyn/ cm^2 の剪断応力での120分間のローリングに対して、新たに単離されたT細胞をAMG 103 (10 ng/ml) を添加するかまたは添加せずに使用した。HBMEC上でのローリングの開始直後（0分）および継続的ローリングの45分後に、画像取得を行った。ローリング速度は、自動追跡モジュールを用いて顕微鏡によって決定した。データは、平均値 \pm SD T細胞ローリング速度を表す。*** : $P < 0.001$; ns : $P > 0.05$ (有意ではない)。B. AMG 103の存在下 (+AMG 103) または非存在下 (-AMG 103) における、1 dyn/ cm^2 の剪断応力での120分間のT細胞ローリング後の、PFA固定HBMECの免疫蛍光染色。顕微鏡解析は、20 x対物レンズおよびUV光を用いて行った。ICAM-1、P-セレクチン、およびVCAM-1染色を、それぞれ赤色、緑色、および青色で示す。

【図7】長期条件下におけるヒスタミン刺激HBMEC上でのT細胞ローリングに及ぼすPPSの影響。A. ヒスタミン刺激した、未処理のまたはPPS (200 μ g/ml) とブレインキュベートした流動培養HBMEC上での、新たに単離されたT細胞のローリングを、1 dyn/ cm^2 の剪断応力での60分の継続的ローリングについて、AMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに行った。ローリング速度は、各条件について30個のT細胞を手動で追跡することにより、顕微鏡によって決定した。データは、45分の時点の平均値 \pm SD T細胞ローリング速度を表す。*** : $P < 0.001$; ns : $P > 0.05$ (有意ではない)。B. AMG 103の存在下 (+AMG 103) または非存在下 (-AMG 103) における、1 dyn/ cm^2 の剪断応力での60分間のT細胞ローリング後の、PFA固定したヒスタミン刺激済みの、未処理の (-PPS) またはPPSとブレインキュベートした (+PPS) HBMECの免疫蛍光染色。顕微鏡解析は、20 x対物レンズおよびUV光を用いて行った。P-セレクチン染色を緑色で示す。

【図8】長期条件下における非刺激HBMEC上でのT細胞ローリングに及ぼすPPSの影響。非

10

20

30

40

50

刺激の、未処理のまたはPPS (200 $\mu\text{g/ml}$) とプレインキュベートした流動培養HBMEC上での、新たに単離されたT細胞の継続的ローリングを、1 dyn/cm^2 の剪断応力でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに60分間行った。ローリング速度は、各条件について30個のT細胞を手動で追跡することにより、顕微鏡によって決定した。データは、40分の時点の平均値 \pm SD T細胞ローリング速度を表す。**** : $P < 0.0001$; *** : $P < 0.001$; ** : $P < 0.01$; ns : $P > 0.05$ (有意ではない)。

【図9】長期条件下における非刺激HBMEC上でのT細胞ローリングに及ぼすナタリズマブの影響。非刺激の流動培養HBMEC上での、ナタリズマブ (1 $\mu\text{g/ml}$) と共にまたはこれを伴わずに37 $^{\circ}\text{C}$ で10分間プレインキュベートした、新たに単離されたT細胞の継続的ローリングを、1 dyn/cm^2 の剪断応力でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに60分間行った。ローリング速度は、各条件について30個のT細胞を手動で追跡することにより、顕微鏡によって決定した。データは、40分の時点の平均値 \pm SD T細胞ローリング速度を表す。*** : $P < 0.001$; * : $P < 0.05$; ns : $P > 0.05$ (有意ではない)。

【図10】長期条件下における非刺激HUVEC上でのT細胞ローリングに及ぼすミノサイクリンの影響。非刺激の流動培養HUVEC上での、ミノサイクリン (50 $\mu\text{g/ml}$) と共にまたはこれを伴わずに37 $^{\circ}\text{C}$ で2時間プレインキュベートした、新たに単離されたT細胞の継続的ローリングを、1 dyn/cm^2 の剪断応力でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに45分間行った。ローリング速度は、自動追跡モジュールを用いて顕微鏡によって決定した。データは、40分の時点の平均値 \pm SD T細胞ローリング速度を表す。**** : $P < 0.0001$; ns : $P > 0.05$ (有意ではない)。

【図11】長期条件下における非刺激HUVECへのT細胞接着に及ぼすミノサイクリンの影響。非刺激の流動培養HUVEC上での、ミノサイクリン (50 $\mu\text{g/ml}$) と共にまたはこれを伴わずに37 $^{\circ}\text{C}$ で2時間プレインキュベートした、新たに単離されたT細胞の継続的ローリングを、1 dyn/cm^2 の剪断応力でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに45分間行った。接着T細胞の絶対数は、手動細胞計数により顕微鏡によって決定した。データは、40分の時点の画像セクション当たりの接着T細胞の絶対数を表す。

【図12】長期条件下における非刺激HBMEC上でのT細胞ローリングに及ぼす抗ICAM-1抗体の影響。非刺激の、未処理のまたはマウス抗ヒトICAM-1抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) とプレインキュベートした流動培養HBMEC上での、新たに単離されたT細胞の継続的ローリングを、1 dyn/cm^2 の剪断応力でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに45分間行った。ローリング速度は、各条件について30個のT細胞を手動で追跡することにより、顕微鏡によって決定した。データは、30分の時点の平均値 \pm SD T細胞ローリング速度を表す。*** : $P < 0.001$; ** : $P < 0.01$; ns : $P > 0.05$ (有意ではない)。Ab : 抗体。

【図13】長期条件下における非刺激HBMEC上でのT細胞ローリングに及ぼす抗P-セ렉チン抗体の影響。非刺激の、未処理のまたはマウス抗ヒトP-セ렉チン抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) とプレインキュベートした流動培養HBMEC上での、新たに単離されたT細胞の継続的ローリングを、1 dyn/cm^2 の剪断応力でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに45分間行った。ローリング速度は、各条件について30個のT細胞を手動で追跡することにより、顕微鏡によって決定した。データは、40分の時点の平均値 \pm SD T細胞ローリング速度を表す。** : $P < 0.01$; * : $P < 0.05$; ns : $P > 0.05$ (有意ではない)。Ab : 抗体。

【図14】長期条件下における非刺激HBMEC上でのT細胞ローリングに及ぼす抗CD11a抗体の影響。非刺激の流動培養HBMEC上での、抗CD11a抗体 (5 $\mu\text{g/ml}$) と共にまたはこれを伴わずに37 $^{\circ}\text{C}$ で10分間プレインキュベートした、新たに単離されたT細胞の継続的ローリングを、1 dyn/cm^2 の剪断応力でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに45分間行った。ローリング速度は、自動追跡モジュールを用いて顕微鏡によって決定した。データは、10分の時点の平均値 \pm SD T細胞ローリング速度を表す。**** : $P < 0.0001$; ns : $P > 0.05$ (有意ではない)。Ab : 抗体。

【図15】長期条件下における非刺激HBMEC上でのT細胞ローリングに及ぼす抗CD162抗体の影響。非刺激の流動培養HBMEC上での、抗CD162抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) と共にもしくはこれを伴わずに、またはマウスアイソタイプ対照抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) と共に37 $^{\circ}\text{C}$ で10分間プレイン

10

20

30

40

50

キュベートした、新たに単離されたT細胞の継続的ローリングを、1 dyn/cm²の剪断応力でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに45分間行った。ローリング速度は、各条件について30個のT細胞を手動で追跡することにより、顕微鏡によって決定した。データは、45分の時点の平均値 ± SD T細胞ローリング速度を表す。**** : P < 0.0001 ; * : P < 0.05 ; ns : P > 0.05 (有意ではない)。Ab : 抗体。

【図16】長期条件下における非刺激HBMEC上でのT細胞ローリングに及ぼす組換えP-セレクチンの影響。非刺激の流動培養HBMEC上での、組換えP-セレクチン (5 µg/ml) と共にまたはこれを伴わずに37 °Cで15分間プレインキュベートした、新たに単離されたT細胞の継続的ローリングを、1 dyn/cm²の剪断応力でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに45分間行った。ローリング速度は、各条件について40個のT細胞を手動で追跡することにより、顕微鏡によって決定した。データは、45分の時点の平均値 ± SD T細胞ローリング速度を表す。** : P < 0.01 ; * : P < 0.05 ; ns : P > 0.05 (有意ではない)。rec. : 組換え。

【図17】半短期条件下における組換えヒト接着分子上でのT細胞ローリングに及ぼすブリナツモマブ (AMG 103) の影響。新たに単離されたT細胞を、AMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに37 °Cで35分間インキュベートしてから、組換えタンパク質上の1.1 dyn/cm²の剪断応力でAMG 103を伴うかまたは伴わない15分間の継続的ローリングに供した。ローリング速度は、自動追跡モジュールを用いて顕微鏡によって決定した。データは、A. ICAM-1 (*** : P < 0.001)、B. VCAM-1 (*** : P < 0.001) 上でのt = 45分の時点での、およびC. P-セレクチン (**** : P < 0.0001) 上でのt = 50分の時点の平均値 ± SD T細胞ローリング速度を表す。さらに、新たに単離されたT細胞の代わりに、Jurkat E6.1 T細胞を上記の通りに使用した。ローリング速度は、自動追跡モジュールを用いて顕微鏡によって決定した。データは、D. ICAM-1 / VCAM-1 (*** : P < 0.001) およびE. P-セレクチン (** : P < 0.01) 上でのt = 45分の時点の平均値 ± SD T細胞ローリング速度を表す。

【図18】半短期条件下における組換えヒト接着分子上でのT細胞ローリングに及ぼすSrcキナーゼ阻害剤PP2の影響。Srcキナーゼ阻害剤PP2 (15 µM) または媒体対照DMSOと共に37 °Cで40分間プレインキュベートした、新たに単離されたT細胞を、PP2またはDMSOの存在下でAMG 103 (10 ng/ml) と共にまたはこれを伴わずに37 °Cで35分間さらにインキュベートしてから、組換えヒトVCAM-1上の1.1 dyn/cm²の剪断応力で15分間の継続的ローリングに供した。ローリング速度は、各条件について30個のT細胞を手動で追跡することにより、顕微鏡によって決定した。データは、t = 40分の時点の平均値 ± SD T細胞ローリング速度を表す。*** : P < 0.001 ; ns : P > 0.05 (有意ではない)。

【発明を実施するための形態】

【0042】

発明の詳細な説明

B-NHL (Bargou et al. Science. 2008; 321:974-7) およびB-前駆体ALL (Topp et al. J Clin Oncol. 2011; 29:2493-8) の両方において、ブリナツモマブの安全性および有効性を評価する様々な臨床試験が行われた。B-NHLでは、0.005 mg/m²/日ほどの低い用量を4週間にわたって持続静脈内 (civ) 注入により投与すると、末梢血中のBリンパ腫細胞が完全かつ持続的に除去された。0.015 mg/m²/日という用量レベルにおいて、部分寛解および完全寛解が最初に観察され、0.06 mg/m²/日という用量レベルで処置されたB-NHL患者の大部分が、実質的な腫瘍の退縮を経験した。ブリナツモマブはまた、この適応症において骨髄および肝臓から悪性B細胞を排除した。B-前駆体ALLでは、微小残存病変および再発性または難治性疾患の両方を有する患者は、0.015 mg/m²/日という用量レベルで4週間にわたってciv注入により処置された場合に、血液学的完全寛解を達成した。これらの試験により、一般的に二重特異性単鎖抗体形式の、および特にブリナツモマブの治療可能性が高いという概念の臨床的証明が確立され、そのさらなる開発がB-NHL、ALL、およびCLLにおいて検証された。B-NHLおよびB-前駆体ALLにおけるこれらの試験を通して、いくつかの薬力学的マーカーが評価された。選択された一般的特徴を以下に記載する：T細胞

動力学は、用量レベルまたは循環B細胞の存在にかかわらず、非常に際立ったプロファイルを示した。それは、注入の開始後および任意の用量ステップ後の迅速な再分布によって特徴付けられ、すなわち最初の6～12時間以内に循環T細胞は即座に消失し、それに続いて次の2～7日間の間に再出現し、ここで初期の高いB細胞数はT細胞再出現の減速した動力学と相関した（図1A）。この過程は、絶対的血清濃度というよりは、むしろプリナツモマブの任意の顕著な用量変化によって誘発されるようであった。加えて、T細胞上のLFA-1に対する可溶性ICAM-1-F_c融合タンパク質の結合を解析することにより、T細胞接着性を処置第1週目を通して測定した。LFA-1高次構造は、注入の開始前の低親和性状態から、注入の開始後および任意の用量ステップ後の中等度の親和性状態に移行した；ICAM-1に対する結合親和性の増加は48時間以内にピークに達し、その後5日以内にベースラインに戻った（図1B）。この知見はT細胞再分布と一致し、再分布過程におけるプリナツモマブ誘導性の内皮に対するT細胞接着の概念を支持した。

10

【0043】

アンジオポエチン-2 (Ang-2) は内皮活性化（またはさらには内皮ストレス）の血清マーカーであり、これは血管裏打ち内皮細胞の細胞質内の、いわゆるバイベル・パラデ小体中に貯蔵されている。ひとたび内皮細胞が活性化されると、小胞が細胞膜と融合し、予め形成されたAng-2を血清中に放出する。加えて、小胞結合性の接着分子、例えばP-セレクチンは、それによって細胞表面上に出現し、したがって血管裏打ち内皮細胞の接着性はさらに増加する。Ang-2血清濃度の動力学は、LFA-1媒介性のT細胞接着性の増加と類似しており、T細胞再分布中にピークに達し、処置第1週目以内に低下してベースラインに戻った。最大Ang-2血清濃度はしっかりとしたT細胞消失と一致し、この知見から、T細胞再分布の根底にある機構としての、血管裏打ち内皮細胞（したがって活性化された）に対する明白なT細胞接着がさらに示された（図1C）。

20

【0044】

プリナツモマブが直接関与しないものの、単球はT細胞が示すのと同様の再分布動力学を示した。この知見は、プリナツモマブの誘導により内皮にT細胞が結合し、内皮細胞の活性化が生じ、これにより次に付加的な接着分子が上方制御され、それによって他の単核細胞および血小板の幅広い結合が可能になる（すなわち、注入の開始後および任意の用量ステップ後に、循環血小板の数もまた減少した）という概念をさらに支持した。しかしながら、活性化された（例えば、活性化内皮細胞への接着による）単球は、循環中に戻る前に下層組織中に血管外移動する傾向があったため、末梢血中の単球数の回復は長引いたのかもしれない（図1D）。

30

【0045】

上記に基づき、本発明者らは、とりわけ、再指向化哺乳動物T細胞（例えば、プリナツモマブによって再指向化されるT細胞）によって引き起こされる中枢神経系有害事象（CNS AE）をもたらし得る、可能な多段階病理学的機序の仮説を立てた。この仮説を図2において説明する。

【0046】

図2A：プリナツモマブの注入の開始または段階的用量増加により、血管内皮へのT細胞接着が増加する。図2B：接着性T細胞は内皮を活性化し、血管外遊走し始める。活性化された内皮細胞は、他の末梢血白血球、例えば単球を誘引し、これは次に一過性の神経炎症および血液CSF関門の攪乱を引き起こす。

40

【0047】

上記仮説を立証するため、本発明者らは、プリナツモマブを、P-セレクチンの小分子阻害剤であるヘパリン類似物質ペントサンポリ硫酸（PPS）（Hopfner et al. J Pharm Pharmacol. 2003; 55:697-706）と同時に投与する同時薬物療法スキームを考案した。プリナツモマブの注入の開始の前および後、ならびにプリナツモマブの任意の段階的用量増加の前および後に、患者にPPSを一過性に注入することにより、第一相臨床試験において抗白血球接着を成功裏に試験した。P-セレクチンは、内皮細胞に対する白血球接着の第1段階を媒介することが知られており、髄膜微小血管を介した軟膜腔および髄膜への循環白血球の

50

血管外遊走において特定の重要な役割を果たすようである (Kivisakk et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:8389-94)。

【 0 0 4 8 】

3名の患者は、ブリナツモマブの $5\mu\text{g}/\text{m}^2$ /日での注入の開始期、および処置第1週目後の $60\mu\text{g}/\text{m}^2$ /日への用量ステップ期の両方において、特に静脈内PPS注入を受けた（さらなる詳細については実施例の項もまた参照されたい）。末梢血中のB:T細胞比が低いために、CNS AEを発症するリスクが高かったにもかかわらず（PCT/EP2010/066207において開示された、根底にある理論的根拠を参照されたい）、これら3名の患者のうちの誰も、神経学的有害作用により、ブリナツモマブによる処置を中断する必要がなかった。したがって、本発明者らが大変驚いたことには、再指向化T細胞の各内皮細胞への接着を減少させることにより、これらの患者において予測されたCNS AEを緩和することが実際に可能であった。3名の患者のうちの2名は、ブリナツモマブによる8週間の処置後に完全寛解を達成した；患者1名は、4週間の処置後に安定疾患を有していた。さらに、潜在的CNS AEの緩和のために静脈内PPSを受けた3名の患者は全員、ブリナツモマブの注入の開始または段階的用量増加に際して、T細胞再分布動力学的遅延を示した（CD19陽性標的細胞の非存在下において）（図3）。先に記載されたように、PPSとの同時薬物療法なしでブリナツモマブを受けた患者は一貫して、注入の開始または段階的用量増加の45分後に既に、末梢血中のT細胞数の迅速な減少を示した（図3A、B、およびCに示されるように）。対照的に、注入の開始および用量ステップ期の両方においてPPSによる同時薬物療法を受けた全3名の患者では、注入の開始または段階的用量増加の45分後に、各ベースライン値と比較してT細胞数の減少は認められなかった（図3D、E、およびF）。2つの症例（DおよびE）では、45分の時点でT細胞数が増加さえしていた。1つの症例（F）では、2時間の時点でT細胞数の増加がなお観察された。末梢血中のT細胞数の減少は、ブリナツモマブの注入の開始または段階的用量増加の2時間後よりも前には検出されなかったため、再分布過程およびひいては根底にある血管内皮への白血球接着は、静脈内PPSによる介入により明らかに遅くなった。

【 0 0 4 9 】

したがって、患者において、PPSの予知されるおよび意図される作用機序のための薬力学的マーカー（すなわち、T細胞再分布動力学的遅延）が同定された。PPSによる同時薬物療法を受けた患者の臨床経過は、これらのバイオマーカーの観察、およびまた中枢神経系有害事象の病理学的機序に関する現在の仮説の予測と一致する。したがって、血管内皮への白血球接着を妨げる（すなわち、抗白血球接着）は、ブリナツモマブ（AMG 103）などの、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされるCNS AEなどの副作用を妨げるかまたは改善するための、作用機序に基づいた介入アプローチである。

【 0 0 5 0 】

再指向化（ヒト）T細胞の各（ヒト）内皮細胞への最初の結合が、実際に上記のCNS AEの原因であることをさらに調べかつ確認するため、本発明者らはさらに、インビトロ系において流体力学的流動条件下で、（ヒト脳）微小血管内皮細胞上での/への再指向化（ヒト）T細胞および他の白血球のローリング、繫留、および接着をシミュレートする試験系（「流動系」）を確立した。この試験系のさらなる詳細は、実験設定を極めてかつ十分に詳細に説明している添付の実施例から導き出すことができる（実施例の項を参照されたい）。この流動系において、細胞のローリング速度および接着細胞の数は、当業者によって容易に測定され得る。内皮細胞上での/への末梢血細胞の多段階のローリングおよび接着過程のうちの任意の（分子）段階（すなわち、必要要件）の妨害は、細胞のローリング速度および接着細胞の数の両方に影響を及ぼすことが予測される。

【 0 0 5 1 】

流動系にCD3特異的結合ドメイン、特にブリナツモマブを添加すると（それによって再指向化T細胞を生じる）、ヒト脳微小血管内皮細胞（HBMEC）上でのT細胞ローリング速度は迅速かつ有意に低下した。同時に、HBMECは、その細胞表面上の接着分子P-セレクチン

、ICAM-1、およびVCAM-1の上方制御によって示されるように、これらの再指向化T細胞によって活性化された（図6Bを参照されたい）。しかしながら、プリナツモマブなしでT細胞を添加すると（非再指向化T細胞を生じる）、前述の内皮接着分子の発現は影響を受けなかった（図6Bを参照されたい）。これらの知見は、患者において見られ、かつ本明細書において詳述されるT細胞再分布と類似しており、かつ明白に対応する。さらに、流動系にP-セレクチン遮断剤PPSを添加すると（すなわち、HBMECのPPSとのブレインキューベーション）、HBMEC上でのT細胞ローリング速度のプリナツモマブ誘導性の低下が効率的に阻止され得た。流動系へのプリナツモマブの添加後に実証されたように、PPSとのブレインキューベーションは、任意のプリナツモマブ誘導性効果を中和することができ、T細胞ローリング速度を、流動系にプリナツモマブを添加しない場合にT細胞ローリング速度について観察されたレベルに匹敵するレベルにまで戻すことができた。加えて、HBMECは、PPSが流動系中に存在する場合、P-セレクチンの細胞表面発現の減少によって示されるように、あまり活性化されなかった。これらの知見は、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物（P-セレクチン遮断剤PPSなど）の添加が実際に、内皮細胞へのT細胞接着を減少させる／遅延させることができ、それによって、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、改善する、および／または処置することができるという臨床的知見を支持する。

【0052】

したがって、確立された流動系は、流体力学的流動条件下で、例えばプリナツモマブなどのCD3特異的結合ドメインを用いて達成され得る、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む薬物で処置された患者においてT細胞再分布中に観察されるような、血管裏打ち内皮細胞上での／への再指向化T細胞のとりわけT細胞ローリングおよび接着を正確に模倣する。特に、患者へのPPSの注入および流動系へのPPSの添加が、それぞれT細胞再分布およびT細胞ローリング速度に及ぼす効果は、PPSが内皮細胞へのT細胞接着を明らかに妨げるという点で、非常に匹敵する。CNS AEの病理学的機序に関する現在の仮説によると、この妨害（すなわち、哺乳動物T細胞および特に再指向化T細胞のような白血球の哺乳動物内皮細胞に対する結合の減少または阻害である抗白血球接着）は、患者への標的細胞に対するT細胞の再指向化（例えば、CD3特異的結合ドメイン、または本明細書の他所で説明されるCARによって達成され得る）を含む薬物の投与によって引き起こされる、CNS AEなどの任意の有害副作用を処置し得る、予防し得る、または改善し得る。さらに、本明細書において例証される、確立された流動系は、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための化合物を同定する方法において、当業者が用いることができる、および当業者によって使用され得る。例証される流動系はしたがって、CD3特異的結合ドメインによって引き起こされるCNS AEの予防または改善のために、例えば該CD3特異的結合ドメインによる患者に処置の前に、それと同時に、および／またはその後投与され得る、抗接着特性を有する化合物（特に、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物）を同定／定義するのに適している。言い換えると、流動系において、白血球、特にT細胞、および最も好ましくは再指向化T細胞に対する任意の抗接着効果（すなわち、例えば、流動系へのPPSの添加に関して観察された効果に匹敵する、血管裏打ち内皮細胞上でのT細胞ローリング速度のCD3特異的結合ドメイン誘導性の低下の復帰）を示す化合物は、CD3特異的結合ドメインによる処置の前に、それと同時に、および／またはその後投与された場合に、該CD3特異的結合ドメインによる患者の処置によって引き起こされる任意のCNS AEを予防するかまたは改善することが予測される。このような化合物の同定、改変、および／または確認は、それが十分に確立された方法論を使用するという理由で、当業者にとって簡潔な課題である。

【0053】

したがって本発明者らは、本明細書において同定された技術的問題を解決するための道を開いた。

【0054】

定義：

本明細書で用いられる場合、「1つの (a)」、「1つの (an)」、および「その」という単数形は、文脈上明白に別の意味を示していない限り、複数の指示対象も含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「1つの試薬」への言及は、そのような種々の試薬の1つまたは複数を含み、「その方法」への言及は、本明細書に記載される方法に対して修正または置換され得る、当業者に公知の等価な段階および方法への言及を含む。

【0055】

別段の指示がない限り、一連の要素を先行する「少なくとも」という用語は、その一連の中のあらゆる要素を指すと理解されるべきである。当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の態様に対する多くの等価物を認識するか、または通常の実験だけを用いてこれらを確認することができるであろう。このような等価物は、本発明によって包含されることが意図される。

10

【0056】

「および/または」という用語は、本明細書で用いられる場合には常に、「および」、「または」、および該用語によってつながれた要素のすべてまたは任意の他の組み合わせ」の意味を含む。

【0057】

本明細書で用いられる「約」または「およそ」という用語は、所与の値または範囲の $\pm 20\%$ 以内、好ましくは $\pm 15\%$ 以内、より好ましくは $\pm 10\%$ 以内、および最も好ましくは $\pm 5\%$ 以内を意味する。

20

【0058】

以下の本明細書および特許請求の範囲を通して、文脈上明白に別の意味が要求されない限り、「含む (comprise)」という語、ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprising)」などの変化形は、記載の整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を含むことを意味するが、任意の他の整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を除外することを意味するものではないことが理解されよう。本明細書で用いられる「含む (comprising)」という用語は、「含有する」もしくは「含む (including)」という用語、または場合によっては、本明細書で用いられる「有する」という用語と置き換えられ得る。

【0059】

30

本明細書で用いられる「からなる」は、特許請求の範囲の要素に規定されていないいかなる要素、段階、または成分も除外する。本明細書で用いられる場合、「から本質的になる」は、特許請求の範囲の基礎的でかつ新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない材料または段階を除外しない。

【0060】

本明細書における各場合において、「含む」、「から本質的になる」、および「からなる」という用語のいずれも、他の2つの用語のいずれかと置き換えられ得る。

【0061】

本発明は、1つの態様において、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および/または改善する、および/または処置する方法において使用するための、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物に関する。

40

【0062】

哺乳動物T細胞の「結合」という用語は、典型的に、通常は白血球血管外遊走として示される過程である、血液系からの白血球の移動を特徴とする周知の連続的段階のいずれかを含むことが理解されるべきである。前述の段階は、「白血球のローリング」(白血球は内皮細胞に緩く付着するが、血流と共になお引っ張られ、その結果として内皮細胞の表面上で白血球のローリング運動が起こる)；「白血球の繫留」(場合によっては堅固な付着として示される白血球は内皮細胞に堅固に付着するが、この相互作用のための受容体は、ローリング過程に関与するものとは異なる)、および「血管外遊出段階」(場合によ

50

ては血管外移動としても示される。前もって主に球状白血球は内皮上に広がり、内皮バリアを通して能動的に血管外移動する)を含む。本発明の化合物は、これらの段階のすべて、またはこれらの段階のうちのいくつかのみ、またはこれらの段階のうちの1つのみに影響を及ぼす。

【0063】

本発明に適用される「化合物」(すなわち、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物)は、言わば、例えば、T細胞側に、すなわちT細胞接着分子に、または内皮細胞側に、すなわち内皮細胞接着分子に作用する化合物である。しかしながら、化合物はまた、T細胞側と内皮細胞側の両方に作用する化合物であってもよい。該化合物は、本発明に適用された場合、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する。したがって、本発明の化合物は、T細胞もしくは内皮細胞またはその両方に対して抗接着効果をもたらす化合物である。例えば、化合物はT細胞接着分子および内皮細胞接着分子の両方に作用し得るか、または2つもしくはそれ以上の化合物の混合物が適用され、1つがT細胞接着分子に作用し、さらなる1つ(複数可)が内皮細胞接着分子に作用する。抗接着効果は好ましくは、化合物が、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害することを含む。本発明の好ましい化合物を表1に示す。

【0064】

本発明の化合物、すなわち哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物は、+10 ng/ml AMG 103の存在下で、HBMEC上の平均T細胞ローリング速度 \pm SD ($\mu\text{m}/\text{秒}$)を約30、40、50、60、70、80、90、100%、またはさらにはそれ以上上昇させることができることもまた想定される(実施例2を参照されたい。流動系に10 ng/mlのブリナツモマブを添加してから45分後に観察される平均T細胞ローリング速度のブリナツモマブ誘導性の低下に及ぼすPPSの影響を、長期条件において評価した。AMG 103は、HBMEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを430 \pm 92 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (-AMG 103)から281 \pm 96 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (+AMG 103)まで有意に低下させたのに対して、流動系にPPSをさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような(すなわち、-AMG 103、+PPS; 442 \pm 156 $\mu\text{m}/\text{秒}$)、483 \pm 157 $\mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った。

【0065】

T細胞は、接着分子、すなわちT細胞接着分子および内皮細胞接着分子を介して内皮細胞と相互作用することが知られている。T細胞接着分子および内皮細胞接着分子はいずれも、インテグリン、セレクトインのファミリー、および免疫グロブリンG (IgG) スーパーファミリーに属する。後者は、免疫グロブリンドメインを有することを特徴とする。内皮細胞の表面上に存在するヒアルロン酸の受容体としてのCD44もまた、T細胞接着分子として見なされる。

【0066】

したがって、T細胞の内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する好ましい化合物は、それぞれインテグリンアンタゴニスト、セレクトインアンタゴニスト、Igスーパーファミリー細胞接着分子アンタゴニスト、またはCD44アンタゴニストである。したがって、本発明との関係において適用される化合物は、好ましくはそれぞれインテグリンアンタゴニスト、セレクトインアンタゴニスト、Igスーパーファミリー細胞接着分子アンタゴニスト、またはCD44アンタゴニストである。これらのアンタゴニストのいずれかは、本発明との関係において、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害することができる。

【0067】

インテグリンアンタゴニストは、当技術分野において一般的に公知である;例えば、Curley et al. (1999), Cellular and Molecular Life Science 56, 427-441を参照されたい。セレクトインアンタゴニストは、当技術分野において公知である;例えば、Lefer (2010), Ann. Rev. Pharmacol Toxicol 40 283-294を参照されたい。CD44アンタゴニストは、

10

20

30

40

50

当技術分野において公知である；例えば、Hirota-Takahata (2007), J. Antibiotics 60, 633-639を参照されたい。同じことが、IgGスーパーファミリー細胞接着分子アンタゴニストについても当てはまる。

【0068】

T細胞の内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物は、好ましくはインテグリンアンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、Igスーパーファミリー細胞接着分子アンタゴニスト、またはCD44アンタゴニストであり、好ましくは、本明細書において、特に実施例2において記載されているように、フローチャンバーアッセイにそのような潜在的アンタゴニストを適用することによって試験および/または同定することができ、これによりアンタゴニストは好ましくは、上記のように、+10 ng/ml AMG 103の存在下で、HBM EC上の平均T細胞ローリング速度 \pm SD ($\mu\text{m}/\text{秒}$) を約30、40、50、60、70、80、90、100%、またはさらにはそれ以上上昇させる。

10

【0069】

上記のようにT細胞側に作用する化合物は、

- (a) T細胞接着分子に結合することができる、
 - (b) T細胞接着分子の結合部位を遮断することができる、および/または
 - (c) T細胞接着分子の発現を阻害するかまたは減少させる、
- ことを特徴とする。

【0070】

「T細胞接着分子」とは、T細胞の表面上に存在し、かつ内皮細胞などの他の細胞に対するT細胞の接着において機能するかまたはその接着に役割を果たす分子であり、後者が本発明との関係において好ましい。典型的に、T細胞接着分子は内皮細胞の接着分子と相互作用する。したがって内皮細胞の接着分子は、T細胞接着分子のリガンドと見なされ得る。T細胞接着分子と内皮細胞の表面上に存在するリガントとの間の相互作用は、通常は、T細胞接着分子の結合部位（すなわちリガンド結合部位）とその指定されたリガンド、すなわち内皮細胞の接着分子との間で起こる。

20

【0071】

本明細書に記載されるT細胞接着分子は、好ましくは免疫グロブリンスーパーファミリードメインを有する。このような接着分子は好ましくは、好ましくはRGD結合ドメインを有するインテグリン、例えば、 α 4-インテグリン、 α L-2-インテグリン、 α L-インテグリン、 α 7-インテグリンなど；セレクチン、例えばL-セレクチンなど、またはCD44である。T細胞は、インテグリンおよび/またはセレクチンおよび/またはCD44を使用して、血管および/またはリンパ節中にまたはそこから移動して、次いで例えば他の組織、軟膜腔または血管周囲腔中に移動する。CD44は主にヒアルロン酸の受容体として働き、これは血管を裏打ちする内皮細胞の表面上に存在する。

30

【0072】

本発明の化合物は、1つの態様において、T細胞接着分子に結合することができることを特徴とする。したがって、化合物はT細胞接着分子と結合し、ひいては好ましくはこれを脱落させ、その結果としてT細胞接着分子は減少し、好ましくはもはや内皮接着分子と相互作用することができない。化合物がT細胞接着分子に結合した結果として、T細胞は少なくとも減少し、好ましくはもはや内皮接着分子と相互作用することができない。T細胞接着分子に結合する好ましい化合物は、別の分子に結合することができる分子、例えばリポカリン変異タンパク質、または抗体、好ましくはモノクローナル抗体などである。好ましくは、結合分子は、T細胞接着分子に特異的に標的化され得る。抗体はこのような基準を満たしているため、T細胞接着分子に結合する好ましい化合物は、抗体、好ましくはナタリズマブ、エファリズマブ、またはエトロリズマブなどのモノクローナル抗体である。

40

【0073】

本発明の化合物は、加えてまたはその代わりに、T細胞接着分子の結合部位を遮断することができることを特徴とする。「遮断」とは、T細胞接着分子の結合部位が、内皮細胞上のそのリガンドと、好ましくはそのリガンドの結合部位と相互作用のを妨げることを意

50

味する。化合物がT細胞接着分子の結合部位を遮断した結果として、T細胞は少なくとも減少し、好ましくはもはや内皮接着分子と相互作用することができない。T細胞接着分子の結合部位の非限定的な例は、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、VCAM-1、MadCAM、GlyCAM、CD31 (PECAM-1)、CD62P (P-セレクトイン)、CD62E (E-セレクトイン)、CD62L、フィブリノーゲン、およびコンドロイチンに対する結合部位である。

【0074】

T細胞接着分子の結合部位を遮断する好ましい化合物は、内皮細胞の細胞接着分子の可溶性断片であり、該可溶性断片は好ましくは、T細胞へのシグナルの伝達などの生理学的効果をもたらすことなくT細胞接着分子の結合部位に結合するように改変される。

【0075】

T細胞接着分子の結合部位を遮断する好ましい化合物は、T細胞接着分子上、例えばそれぞれVLA-4および/またはLPAM-1上のICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、VCAM-1、MadCAM、GlyCAM、CD31、CD62P、CD62E、CD62L、フィブリノーゲン、および/またはコンドロイチン結合部位を遮断する抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。このような抗体はナタリズマブであり、したがってこれは本発明に適用される好ましい化合物である。本発明に適用される化合物として同様に好ましいのは、T細胞接着分子上のICAM-1結合部位を遮断する抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。このような抗体はエファリズマブであり、したがってこれは本発明に適用される好ましい化合物である。

【0076】

本発明に適用される化合物としてさらに好ましいのは、T細胞接着分子上のVCAM-1および/またはMadCAM結合部位を遮断する抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。このような抗体はエトリズマブであり、したがってこれは本発明に適用される好ましい化合物である。

【0077】

別の好ましい化合物は、T細胞接着分子の結合部位を遮断する小分子であるAJM300である。

【0078】

別の好ましい化合物は、T細胞接着分子上のICAM-1、ICAM-2、および/またはICAM-3結合部位を遮断する小分子であるSAR 1118である。

【0079】

別のさらなる好ましい化合物は、インテグリン α_L 2および/または α_M 2のアンタゴニストとして働く小分子であるBOL-303225-Aである。

【0080】

別の好ましい化合物は、キレート剤、好ましくはカルシウムなどの二価陽イオンのキレート剤である。好ましいキレート剤は、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) である。

【0081】

ヒアルロン酸 (HA) またはコンドロイチン硫酸は、いずれもCD44上のHAおよびE-セレクトイン結合部位を遮断し、それによってT細胞上のCD44と内皮細胞との間の相互作用を遮断することが知られているため、さらなる好ましい化合物である。

【0082】

本発明の化合物は、加えてまたはその代わりに、T細胞接着分子の発現を阻害するかまたは減少させることを特徴とする。このような化合物は、遺伝子発現を抑制する、転写、スプライシング、または翻訳を妨げるなど、T細胞接着分子をコードする遺伝子の転写および/または翻訳を含む発現に作用し得る。これは例えば、当技術分野で公知の手段および方法により、RNA干渉によって達成され得る。しかしながら、LFA-1発現を減少させるミノサイクリン、L-セレクトイン発現を減少させる (アセチル-) サリチル酸、CD44発現を減少させるアスチルピンまたはフラボノイドのような、T細胞接着分子の発現を減少させる他の化合物も公知である (本明細書における表1もまた参照されたい)。これらの化合物は、本発明との関係において適用される好ましい化合物であり、ミノサイクリンがより好ましい。

10

20

30

40

50

【0083】

内皮細胞側に作用する化合物は、

- (a) 内皮接着分子に結合することができる、
 - (b) 内皮接着分子の結合部位を遮断することができる、および/または
 - (c) 内皮接着分子の発現を阻害するかまたは減少させる、
- ことを特徴とする。

【0084】

「内皮細胞接着分子」とは、内皮細胞の表面上に存在し、かつ白血球、特にT細胞または単球などの他の細胞に対する内皮細胞の接着において機能するかまたはその接着に役割を果たす分子である。典型的に、内皮細胞の接着分子はT細胞接着分子と相互作用する。したがってT細胞の接着分子は、内皮細胞接着分子のリガンドと見なされ得る。内皮細胞接着分子とT細胞の表面上に存在するリガントとの間の相互作用は、通常は、内皮細胞接着分子の結合部位（すなわちリガンド結合部位）とその指定されたりリガンド、すなわちT細胞の接着分子との間で起こる。

10

【0085】

本明細書に記載される内皮細胞接着分子は、好ましくは免疫グロブリンスーパーファミリードメインを有する。このような接着分子は好ましくは、好ましくはRGD結合ドメインを有するインテグリン、例えばICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、VCAM-1、GlycAM-1、またはMadCAMである。インテグリンおよび/またはセレクチンを介して、内皮細胞は、例えばT細胞と情報交換および相互作用し、その結果T細胞は最終的に上記のように血管外遊走し、移動する。

20

【0086】

本発明の化合物は、1つの態様において、内皮接着分子に結合することができることを特徴とする。したがって、化合物は内皮接着分子と結合し、ひいては好ましくはこれを脱落させ、その結果として特にT細胞の接着は減少し、好ましくは内皮細胞はもはやT細胞接着分子と相互作用することができない。化合物が内皮細胞接着分子に結合した結果として、内皮細胞は少なくとも減少し、好ましくはもはやT細胞接着分子と相互作用することができない。内皮接着分子に結合する好ましい化合物は、別の分子に結合することができる分子、例えばリポカリン変異タンパク質、または抗体、好ましくはモノクローナル抗体などである。好ましくは、結合分子は、内皮接着分子に特異的に標的化され得る。抗体はこのような基準を満たしているため、内皮接着分子に結合する好ましい化合物は、抗体、好ましくはPF-00547659などのモノクローナル抗体である。

30

【0087】

本発明の化合物は、加えてまたはその代わりに、内皮接着分子の結合部位を遮断することができることを特徴とする。「遮断」とは、内皮接着分子の結合部位が、T細胞上のそのリガンドと、好ましくはそのリガンドの結合部位と相互作用するのを妨げることを意味する。化合物が内皮接着分子の結合部位を遮断した結果として、内皮細胞は少なくとも減少し、好ましくはもはやT細胞接着分子と相互作用することができない。内皮細胞接着分子の結合部位の非限定的な例は、 α 4-インテグリン、 α L-2-インテグリン、 α L-インテグリン、 α 7-インテグリンに対する結合部位である。

40

【0088】

内皮細胞接着分子の結合部位を遮断する好ましい化合物は、T細胞の細胞接着分子の可溶性断片であり、該可溶性断片は好ましくは、T細胞へのシグナルの伝達などの生理学的効果をもたらすことなく内皮細胞接着分子の結合部位に結合するように改変される。

【0089】

内皮細胞接着分子の結合部位を遮断する好ましい化合物は、内皮細胞接着分子上の α 4-インテグリン、 α L-2-インテグリン、 α L-インテグリン、 α 7-インテグリン結合部位を遮断する抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。

【0090】

本発明に適用される化合物として同様に好ましいのは、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、VCAM

50

-1、GlycAM-1、MadCAM、またはPECAM-1などの内皮細胞接着分子と結合する抗体、好ましくはモノクローナル抗体である

【0091】

本発明に適用される化合物としてさらに好ましいのは、P-セレクチン (CD62P) と結合する抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。そのような抗体はインクラクマブである。

【0092】

別の好ましい化合物は、内皮細胞接着分子の結合部位を遮断する、好ましくは低いpM濃度のトロンピンである。

【0093】

さらなる好ましい化合物は、内皮細胞接着分子上のPSGL-1結合部位を遮断するペントサンポリ硫酸 (PPS) である。

【0094】

本発明の化合物は、加えてまたはその代わりに、内皮細胞接着分子の発現を阻害するかまたは減少させることを特徴とする。このような化合物は、遺伝子発現を抑制する、転写、スプライシング、または翻訳を妨げるなど、内皮細胞接着分子をコードする遺伝子の転写および/または翻訳を含む発現に作用し得る。これは例えば、当技術分野で公知の手段および方法により、RNA干渉によって達成され得る。しかしながら、VCAM-1の発現を減少させる小分子であるロスバスタチンのような、内皮細胞接着分子の発現を減少させる他の化合物も公知である。

【0095】

本発明はまた、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および/または改善する、および/または処置する方法において使用するための化合物を同定する方法であって、

(a) 該化合物を哺乳動物T細胞、哺乳動物内皮細胞、T細胞接着分子、および/または内皮接着分子と接触させること；ならびに

(b) 該化合物が、

(i) 哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかもしくは阻害するかどうか、

(ii) T細胞接着分子に結合することができるかどうか、

(iii) T細胞接着分子の結合部位を遮断することができるかどうか、

(iv) T細胞接着分子の発現を阻害するかもしくは減少させるかどうか、

(v) 内皮接着分子に結合することができるかどうか、

(vi) 内皮接着分子の結合部位を遮断することができるかどうか、および/または

(vii) 内皮接着分子の発現を阻害するかもしくは減少させるかどうか、

を評価すること

を含む方法に関する。

【0096】

この目的のために、例えば本明細書において開示される流動系を使用することが意図される。患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および/または改善する、および/または処置する方法において使用するための化合物を同定するために使用され得る、可能な他のインビトロアクセスの非排他的リストを以下に示す：

・血管外移動アッセイ (Rohnelt, Hoch et al. 1997、Ding, Xiong et al. 2000)

・固定化接着分子を用いる接着アッセイ (Gerli, Gresele et al. 2001、Valignat, Theodoly et al. 2013)

・静止条件下で内皮細胞およびT細胞を用いる接着アッセイ (Mobley and Shimizu 2001)

・フローサイトメトリーアッセイにおけるT細胞上の接着分子に対するそのような化合物の妨害 (Bucolo, Maltese et al. 2008)

【0097】

Bucolo, C., A. Maltese, F. Maugeri, K. W. Ward, M. Baiula, A. Sparta and S. Spampinato (2008). 「New coumarin-based anti-inflammatory drug: putative antagonist of the integrins α L β 2 and α M β 2.」 J Pharm Pharmacol 60(11): 1473-1479.

Ding, Z., K. Xiong and T. B. Issekutz (2000). 「Regulation of chemokine-induced transendothelial migration of T lymphocytes by endothelial activation: differential effects on naive and memory T cells.」 J Leukoc Biol 67(6): 825-833.

Gerli, R., P. Gresele, O. Bistoni, C. Paolucci, L. Lanfranccone, S. Fiorucci, C. Muscat and V. Costantini (2001). 「Salicylates inhibit T cell adhesion on endothelium under nonstatic conditions: induction of L-selectin shedding by a tyrosine kinase-dependent mechanism.」 J Immunol 166(2): 832-840.

Mobley, J. L. and Y. Shimizu (2001). 「Measurement of cellular adhesion under static conditions.」 Curr Protoc Immunol Chapter 7: Unit 7 28.

Rohnelt, R. K., G. Hoch, Y. Reiss and B. Engelhardt (1997). 「Immunosurveillance modelled in vitro: naive and memory T cells spontaneously migrate across unstimulated microvascular endothelium.」 Int Immunol 9(3): 435-450.

Valignat, M. P., O. Theodoly, A. Gucciardi, N. Hogg and A. C. Lellouch (2013). 「T lymphocytes orient against the direction of fluid flow during LFA-1-mediated migration.」 Biophys J 104(2): 322-331.

【 0 0 9 8 】

本明細書において表1に例証されているように、白血球および内皮細胞上の多くの標的分子ならびに対応する妨害化合物が、同定されており、現在開発中であり、またはヒトでの使用に既に認可されている。したがって、例えばCARによるT細胞形質導入、またはCD3特異的結合ドメインを含む化合物、好ましくはブリナツモマブによるT細胞動員を介した、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされるCNS AEの予防または改善のために、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む該（各）治療による患者の処置の前に、それと同時に、および/またはその後に投与するための、本明細書において定義される流動系において、白血球およびより好ましくはT細胞上で抗接着効果を示す任意の既存のまたは今後の化合物を、その作用機序にかかわらず本発明において包含することが想定される。

【 0 0 9 9 】

したがって、別の態様において、本発明は、記載される流動系において、白血球のローリングおよび接着に対して抗接着効果を示す任意の化合物に関する。該化合物またはそのような化合物の任意の組み合わせの流動系への添加は、例えばCARによるT細胞形質導入、またはCD3特異的結合ドメインを含む化合物によるT細胞動員を介した、標的細胞に対するT細胞の再指向化によって誘導される白血球接着、好ましくはブリナツモマブ誘導性の血管裏打ち内皮細胞に対するT細胞接着を中和することが予測され、例えばT細胞ローリング速度は、流動系にブリナツモマブを添加しない場合のレベルに匹敵するレベルに戻る。本発明はさらに、例えばCARによるT細胞形質導入、またはCD3特異的結合ドメインを含む化合物によるT細胞動員を介した、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされるCNS AEの予防または改善のための、該処置の前の、それと同時の、および/またはその後の、該化合物の1つまたは複数と、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む該（各）治療との併用に関する。言い換えると、抗接着特性を有する化合物と、例えばCARによるT細胞形質導入、またはCD3特異的結合ドメインを含む化合物によるT細胞動員を介した、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療との任意の併用療法は、本発明によって包含されることが想定される。さらに言い換えると、必要要件として、例えばCARによるT細胞形質導入、またはCD3特異的結合ドメインを含む化合物によるT細胞動員を介した、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされるCNS AEの予防または改善のために、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む該（各）治療による患者の処置の前に、それと同時に、および/またはその後に、該化合物のいずれかまたはそれ

らの任意の組み合わせを投与することが想定される。

【0100】

本発明との関係において、「抗白血球接着」とは、内皮細胞、好ましくは血管裏打ち内皮細胞上での白血球のローリング、該細胞への白血球の結合、接着、該細胞を介した白血球の血管外移動、または該細胞との白血球の相互作用を妨げる、最小化する、減少させる、影響を及ぼす、緩和する、または変更するための、任意の予防的および/または介入的手段、方法、および/または手順と定義される。加えて、そのような手段、方法、および/もしくは手順、または白血球に及ぼす上記の効果のいずれかの発揮に含まれる化合物は、本発明により「抗白血球接着効果を有する化合物」または「抗接着特性を有する化合物」または「本発明の化合物」または「哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物」と定義される。

10

【0101】

現在の仮説によると、血管内皮への白血球接着は、処置の中断を必要とする、CNS AEなどの重篤な有害作用を誘導するための必要条件である。したがって、CNS AEなどのAEに対する可能な緩和アプローチは、本発明との関係においては、各薬物、すなわち、内皮細胞活性化およびCNSへの白血球血管外遊走の原因である、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療、例えばブリナツモマブの注入の開始および段階的用量増加後の、再指向化T細胞および任意にまた他の白血球（すなわち、血管外遊走する哺乳動物細胞の最も顕著な型であるTリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、顆粒球、および単球）の内皮接着を減少させることを目的とした抗白血球接着である（本明細書における考察、および添付の実施例から導き出される結果を参照されたい）。「哺乳動物T細胞」という用語は、「再指向化T細胞」を含むかまたはそれからなる、というのは、本明細書において説明されるように、これらの再指向化T細胞はAEの原因であるからである。したがって、本発明の好ましい態様において、該「哺乳動物T細胞」は「再指向化哺乳動物T細胞」である。T細胞の再指向化は、T細胞が、典型的にT細胞のクロノタイプ天然抗原受容体特異性とは異なる、標的細胞を認識する抗原受容体特異性を備えていることを含む。これは例えば、T細胞受容体、好ましくはCD3に特異的に結合することができる特異的結合ドメインを含む、T細胞が関与する二機能性または多機能性の抗体または抗体誘導体によって達成され得る。そのような再指向化T細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）、例えばCD19を認識するCARによるT細胞の形質導入によって生成されることもまた可能である（および本発明との関係において明確に想定される）（例示として、Knochenderfer et al., Nature Reviews 2013; Clinical Oncology; 「Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors」を参照されたい）。したがって「再指向化T細胞」は、T細胞受容体（好ましくはCD3）に特異的に結合することができる特異的結合ドメインを含む二機能性もしくは多機能性の抗体もしくは抗体誘導体と接触したT細胞、またはキメラ抗原受容体を発現するように遺伝子操作されたT細胞（すなわちT細胞CAR参照により本明細書に組み入れられるWO2007/131092を参照されたい）を含む。

20

30

【0102】

特定の好ましい態様において、前記再指向化T細胞は、ブリナツモマブ（AMG103）と接触した（が結合している）ヒトT細胞である。

40

【0103】

「標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療」とは、「再指向化T細胞」の出現および/または存在を特徴とする、薬物などの治療として理解されるべきであり、すなわち治療は、そういうものとして再指向化T細胞を、例えば、キメラ抗原受容体CARを有する遺伝子操作されたT細胞（任意に薬学的組成物として製剤化される）、および/または本明細書において定義されるCD3特異的結合ドメインを含む、好ましくはB細胞に特異的である結合ドメインと共にCD3特異的結合ドメインを含む、より好ましくはCD19、CD22、CD20、もしくはCD79aなどのB細胞リンパ球上に見出され得るCDマーカー、好ましくはCD19に特異的である結合ドメインと共にCD3特異的結合ドメインを含む薬物によって例証される治療の過程において出現する再指向化T細胞を含むか、またはそのような細胞からなる。より好

50

ましい態様において、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む該治療は、二重特異性CD3 X CD19抗体による治療であり、および最も好ましい態様においては、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む該治療は、ブリナツモマブによる治療である。

【0104】

ブリナツモマブによる前記治療は、 $5 \sim 10 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$ またはより高い用量、例えば15、45、または $60 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$ などの投与を包含することもまた想定される。上記のCD-3特異的ドメインは、本明細書の他所で極めて詳細に説明される。

【0105】

キメラ抗原受容体 (CAR) は、抗原認識部分およびT細胞活性化ドメインを含む融合タンパク質である。B細胞悪性腫瘍の処置に関して、例えばCD3 に連結されたCD19特異的結合ドメインからなるCD19 CARが、B CLL (Porter et al. N Engl J Med. 2011; 365:725-33) およびB ALL (Grupp et al. N Engl J Med. 2013) の臨床試験において記載されている。CD19xCD3二重特異性単鎖抗体の注入で観察されたように、CD19 CAR形質導入T細胞の患者への養子移入も、正常および悪性B細胞の迅速かつ持続的な根絶をもたらした。CD19 CAR T細胞療法に伴う共通の有害事象には、サイトカイン放出症候群およびリンパ球減少症が含まれたが、CNS AEの症例もまた報告された。したがって、血管裏打ち内皮へのノを介したCD19 CAR T細胞の接着および血管外移動の妨害もまた、CD19 CAR T細胞誘導性CNS AEの予防およびノまたは改善に有用なアプローチである。注目すべきは、他のB細胞特異的抗原 (例えばCD20) を標的化するCAR T細胞による処置もまた、このようなCAR T細胞によって引き起こされるCNS AEの予防およびノまたは改善のために、抗接着特性を有する化合物との同時薬物療法から恩恵を受けることが想定される。

【0106】

本明細書で用いられる「キメラ抗原受容体 (CAR)」は、B細胞に特異的である、好ましくはCD19、CD22、CD20、またはCD79aなどのB細胞リンパ球上に見出され得るCDマーカー、好ましくはCD19に特異的である結合ドメインを含む。キメラ抗原受容体CARを発現するように遺伝子操作されたT細胞 (T細胞CAR) は、WO2007/131092において例証されている。その一方で、また、T細胞CARを含む治療が、臨床的有害事象、および特にCNS AEを誘発することが知られている。

【0107】

「標的細胞」という用語は、具体的には限定されず、好ましくは癌標的細胞 (特に、それらを攻撃できるようにする適切な標的を発現する癌細胞) を指す。Bリンパ腫細胞がより好ましく、CD19陽性B細胞 (Bリンパ腫細胞) が最も好ましい。

【0108】

「哺乳動物」という用語は、マウス、ラット、イヌ、ウマ、ラクダ、霊長類等を含むがこれらに限定されず、霊長類が好ましく、およびヒトが最も好ましい。

【0109】

哺乳動物の「内皮細胞」は、大血管または毛細血管から単離され得る。したがって「内皮細胞」という用語は、新たに単離された内皮細胞 (例えばHUVEC)、様々な製造業者 (例えばPromoCell) から市販されている内皮細胞、および内皮細胞株を含むが、内皮細胞株はあまり好ましくない。ヒト内皮細胞が好ましい。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) およびヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) が特に好ましく、HBMECが最も好ましい。

【0110】

有害事象は、有害事象共通用語基準 (CTCAE) に従って5段階に分類され得る。グレード1は軽度のAEに関連し、グレード2は中等度のAEに関連し、グレード3は重度のAEに関連し、グレード4は生命を脅かすまたは身体に障害を引き起こすAEに関連し、グレード5はAEに関連した死亡を意味する。これらのAEはすべて本発明の枠組みの中で企図され、「臨床的有害事象」もしくは「有害作用」という用語または本明細書で用いられる関連用語によって含まれる。

【0111】

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる、

10

20

30

40

50

本明細書で用いられる「臨床的有害事象」という用語は、特に神経学的有害事象を含む。該神経学的有害事象は、場合により「神経学的症状」または「神経学的有害作用」または「中枢神経系有害事象 (CNS AE)」としても示され、これには、疼痛、頭痛、筋力低下 / 筋肉協調運動障害、平衡障害、発語障害 / 損傷、肉体的障害 / 異常、浮動性めまい、運動失調、失行症、振戦、失語症、言語障害、錯乱、失見当識、幻覚、小脳症状、脳症、発作、（大発作）痙攣などのヒト患者の状態が含まれるが、これらに限定されない。具体的には、例えばCARによるT細胞形質導入、またはCD3特異的結合ドメインを含む化合物によるT細胞動員を介した、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療による処置中に観察される神経学的症状には、例えば混乱および失見当識が含まれる。本明細書で用いられる「錯乱」は、時間、場所、および個人の身元により世の中において自身を正しく位置付ける能力である見当識の喪失、ならびに多くの場合には、過去の出来事を正しく思い出すまたは新しい事柄を学ぶ能力である記憶の喪失を指す。患者は通常は集中するのが困難であり、思考は不鮮明でかつはっきりしないだけでなく、多くの場合に著しく遅くなる。神経学的症状を有する患者はまた、記憶喪失になる。頻繁に、錯乱は、人および / もしくは場所を認識する、または時間および日にちを理解する能力の喪失を招く。失見当識の感覚は錯乱では一般的であり、意思決定能力が損なわれる。神経学的症状はさらに、不鮮明な発語および / または喚語困難を含む。この障害は、言語の表現および理解ならびに読み書きを損ない得る。加えて、ある患者では、回転性めまいおよび浮動性めまいが神経学的症状に伴って起こり得る。

10

【 0 1 1 2 】

20

「臨床的有害事象」という用語は、好ましくは、(i) 失見当識 / 錯乱および / または喚語困難 / 失語症を含む認知障害、(ii) 発作、(iii) 運動性振戦、運動失調、構音障害、および筆記困難を含む、一部は (i) または (ii) の任意の前駆期として観察される小脳症状のうちの1つまたは複数を特徴とする（しかしこれらに限定されない）。さらなる神経学的有害事象は、失行症または幻覚である。喚語困難は、本発明との関係において好ましい。特に臨床的に重要であるのは、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療（好ましくは、プリナツモマブもしくは他のCD3結合薬物またはCARによる治療）による処置の中断を引き起こす臨床的有害作用であり、それは処置された患者がその処置から十分に恩恵を受けることができないためである。

【 0 1 1 3 】

30

「患者」は、哺乳動物患者、好ましくは霊長類、最も好ましくはヒトである。

【 0 1 1 4 】

好ましい態様において、患者は、悪性CD19陽性B細胞を含むことが疑われる / 推測されるか、または既に含んでいる。後者の場合、該患者はそのような細胞を含むと既に診断されている。悪性CD19陽性B細胞は、リンパ腫および / または白血病を発症しているおよび / またはそれらに罹患している患者に存在する。

【 0 1 1 5 】

本発明はまた、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化の方法において使用するためのキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸に関し、この場合、該患者は、「哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物」を含む治療を受ける。したがって核酸配列には、これに限定されるわけではないが、T細胞において所望のCARの発現を可能にするベクター等が含まれる（例えば、参照により本明細書に含まれるWO2007/131092を参照されたい）。

40

【 0 1 1 6 】

疑義を回避するため、すべての定義等を含む本発明の開示は、これらの態様が、使用化合物の態様、または処置方法の態様、または化合物態様、キット態様、組成物態様、使用態様、方法態様等として立案されているかどうかにかかわらず、本発明の一部を形成する（すなわち、本発明の要旨と関連しており、したがって本発明の状況に該当する）すべての態様に十分に適用可能であることが、本明細書によって強調される。したがって、すべての定義および態様を使用することができ、これらは本明細書において開示されるすべ

50

ての態様に適合し得る。したがって本発明はまた、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、改善する、および/または処置するための方法であって、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物の治療有効量を投与することを含む方法に関する。「治療有効量」という用語は、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象の処置、改善、または予防を提供する(すなわち、「治療有効性」を提供する)、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物の量を指すことが意図される。

【0117】

以下では、CD3特異的結合ドメインによって引き起こされる中枢神経系有害事象(CNS AE)の病因学、ならびにそのようなCNS AEの予防および改善として抗白血球接着を使用することの理論的根拠をさらに説明することが意図される。

【0118】

処置の中断を必要とするCNS AEは、現在、一過性の髄膜または血管周囲の神経炎症を引き起こす多段階病理学的機序の仮説によって最もよく説明されている。

【0119】

ブリナツモマブの注入の開始および任意の段階的用量増加は、末梢血T細胞と、NK細胞および単球などの他の末梢血白血球の、血管裏打ち内皮細胞への迅速な接着を誘導する。この過程は、循環(すなわち末梢血)標的細胞、すなわち正常および/または悪性CD19陽性B細胞の存在にかかわらず起こる。さらに、血管内皮へのT細胞接着の結果としてのT細胞再分布は、少なくとも部分的にはブリナツモマブ用量とは無関係であるようである、というのは、試験した $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$ という最低用量でさえ、それが観察されたからである。したがって、T細胞接着性の一過性増加の結果としてのT細胞再分布は、より高用量でのより高い絶対的曝露というよりは、むしろブリナツモマブ投与の開始時および用量増加中の曝露変化自体によって誘発されと考えられる。末梢血白血球の内皮接着はCNSの血管においても起こる可能性が非常に高く、この場合、特に髄膜微小血管が、末梢血からの炎症細胞の最初の侵入部位として、および神経炎症現象の潜在的開始点として示唆されている。

【0120】

本明細書においてより詳細に記載されるように、3つの重要な知見がこの仮定を支持する:(1)既に45分以内での血液細胞数の迅速な低下、およびその後の数日以内の血液細胞数の回復を含む、任意の患者における注入の開始または段階的用量増加後の循環T細胞および他の白血球の再分布;(2)T細胞上のLFA-1に対する可溶性ICAM-1- Fc 融合タンパク質の結合増加として測定される、血管裏打ち内皮細胞への循環T細胞の接着性の一過性増加;ならびに(3)末梢血における、内皮細胞の活性化の特異的マーカーを表すアンジオポエチン-2(Ang-2)の一過性増加(Fiedler and Augustin. Trends Immunol. 2006; 27:552-8)。

【0121】

白血球が髄膜微小血管および後毛細管細静脈に接着した後、これらの細胞の一部は、それぞれ軟膜腔および血管周囲腔中に血管外遊走すると考えられる(図2AおよびB)。著明なT細胞血管外遊走が存在しない場合でさえ、血管裏打ち内皮細胞への白血球接着はそれ自体が、CNS血管の漏出、および発作などの神経学的症状を誘導し得る(Fabene et al. Nat Med. 2008; 14:1377-83)。

【0122】

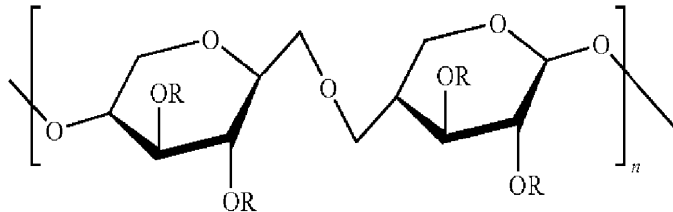
ポリ硫酸ペントサン、硫酸水素キシラン、ポリ硫酸キシランとしても知られているペントサンポリ硫酸(PPS; $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_{21}\text{S}_4$)は、半合成的に生成されたヘパリン様の高分子炭水化物誘導体であり、化学的かつ構造的にグリコサミノグリカンと類似している。これは白色で無臭の粉末であり、わずかに吸湿性で、pH 6では50%まで水に溶解する。これは4000~6000ダルトンの分子量を有する。

【0123】

PPSは、例えばOrtho-McNeil Pharmaceutical, Inc.によりElmiron（登録商標）という名称で販売されており、有痛性膀胱症候群としても知られている間質性膀胱炎の処置に関して米国FDAにより認可された、これまで唯一の経口薬である。この状態を処置するために、PPSは経口投与されるが、代わりにこれを静脈内投与することもできる。

【 0 1 2 4 】

「ペントサンポリ硫酸（またはPPS）」という用語は、半合成的に生成されたヘパリン様の高分子炭水化物誘導体を包含する。



10

【 0 1 2 5 】

本発明の意味では、ペントサンポリ硫酸は、通常は2位および3位で硫酸化されており、時折2位において4-O-メチル-β-D-グルクロン酸-2,3-O-硫酸で置換されている 1,4結合キシロースの線状ポリマーの混合物である。したがって、PPSはまた、1,4-D-キシラン-2,3-ビス(硫酸水素)と称され得る。

【 0 1 2 6 】

一例として、特にPPSなどの、半合成的に生成されるヘパリン様の高分子炭水化物誘導体は、例えば以下の通りに生成が可能である（入手可能である）：その多糖骨格であるキシランは、例えばブナの木の新皮または他の植物源から抽出され、次いでクロロスルホン酸または塩化スルフリルなどの硫酸化剤および酸で処理される。硫酸化の後、PPSは通常は水酸化ナトリウムで処理して、本発明の好ましい塩であるナトリウム塩にする。特にPPSなどの、半合成的に生成されるヘパリン様の高分子炭水化物誘導体の生成工程は、例えばUS 2,689,848またはUS 2010/105889において開示されている。

20

【 0 1 2 7 】

本発明との関係において、PPSは好ましくは患者に経口投与され、さらにより好ましくは静脈内投与される。典型的な用量は、100、150、200、または300 mgの1日当たり1～3回の投与であり、最大量は600 mg / 日である。典型的に、一日用量は、100～600 mg、例えば、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、もしくは600 mg、またはさらにそれ以上である。例えば、100 mg PPSを3～6回投与することができる。同様に、200 mg PPSを2～3回投与することができる。あるいは、300 mg PPSを2回投与することもできる。あるいは、例えば100～600 mg、例えば100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600 mgなどの量のPPSを、例えばperfusorを使用して注入により24時間かけて投与することもできる。後者の場合、例えば100、200、または300 mgの量のPPSのボラス注入を行ってから、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療を行い、その後100、200、または300 mg / 日のPPSを24、48、または72時間かけて投与してもよい。

30

【 0 1 2 8 】

PPSは、本明細書に記載されるように、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療の投与の前に（例えば、ボラス注入として予防的に）、それと同時に、またはその後に投与することができる、有利には、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療が繰り返されるかまたは増加される時点で（例えば、注入の開始または任意の用量ステップ時に）、PPSは患者に投与され得る。本発明において言及される患者に投与された特に好ましいPPSは、一般的に公知でありかつ市販されているペントサンポリ硫酸SP54（登録商標）（例えば、bene Arzneimittel GmbH製）である。

40

【 0 1 2 9 】

PPSは別として、公知の抗接着特性を有する他の臨床的に利用可能な化合物は、本明細書に記載されるミノサイクリンおよびナタリズマブである。P-セレクトインは、内皮細胞へ

50

の白血球接着の最初の段階（すなわちローリング）を媒介するが、その後の段階はインテグリンによって媒介される。特に、T細胞上のLFA-1およびVLA-4と内皮細胞上のそれぞれICAM-1およびVCAM-1との相互作用は、内皮細胞への白血球接着のこの第2段階において重要な役割を果たす。したがって、LFA-1、VLA-4、およびICAM-1はインテグリンのファミリーおよびIgGスーパーファミリーに属するため、インテグリンアンタゴニストおよびIgGスーパーファミリーアンタゴニストは、本発明の好ましい化合物である。

【0130】

LFA-1の小分子阻害剤として、テトラサイクリンがヒトにおける臨床的使用に利用可能である。テトラサイクリンファミリーの中で、ミノサイクリンはLFA-1の最もよく特徴付けられた阻害剤である (Nikodemova et al. J Neuroimmunol. 2010; 219:33-7)。ミノサイクリンは全テトラサイクリンの中で最も親油性が高く、経口投与後にほぼ100%の生物学的利用能を有する。ミノサイクリンはまた、およそ24時間という最も長いインビボ半減期を有し、これは長期にわたる不断の血清曝露の必要条件である。さらに、ミノサイクリンはCNSに最も良好に浸透し、そのためCNS障害の処置に特に適している。臨床治験において、ミノサイクリンは、多発性硬化症において神経炎症と対抗すること (Zhang et al. Can J Neurol Sci. 2008; 35:185-91)、および急性虚血性脳卒中患者において神経学的予後を改善すること (LampI et al. Neurology. 2007; 69:1404-10) が示された。脳卒中患者における神経保護剤としてのミノサイクリンに関する最近の用量設定試験において、数日間の、経口での700 mgに相当するivでの10 mg/kgまでの一日用量が、安全でかつ十分に許容されることが判明した (Fagan et al. Stroke. 2010; 41:2283-7)。作用機序的には、ミノサイクリンは、T細胞上のLFA-1の発現を下方制御すると共に、LFA-1のICAM-1に対する堅固な結合に必要であるCa²⁺およびMg²⁺などの陽イオンのキレート剤として働く。したがって、上記のように、ミノサイクリンは本発明の好ましい化合物である。ナタリズマブは、多発性硬化症の処置に認可された抗体である。これはT細胞上のVLA-4に結合し、それによって内皮細胞上のVCAM-1とのその相互作用を遮断する。結果として、T細胞接着、および特に脳への血管外遊走は減少する。したがって、ナタリズマブは、本発明の別の好ましい化合物である。

【0131】

ヒトにおける臨床的使用に利用可能であるかまたは利用可能となり得る、提唱される抗接着特性を有する他の化合物の非排他的なリストを、表1に提供する。これらの化合物はそれぞれ、本発明の好ましい化合物であり、ミノサイクリンおよびナタリズマブがより好ましい。

【0132】

本発明に関連して、場合により本明細書において「CD3結合ドメイン」としても示される「CD3特異的結合ドメイン」は、フレームワーク/フレームワーク領域、およびCD3抗原と特異的に相互作用することができる「抗原結合部位」または「抗原相互作用部位」を含む結合ドメインを特徴付ける。該結合/相互作用はまた、「特異的認識」を定義すると理解される。「特異的に相互作用する/相互作用している」という用語は、本発明に従って、結合ドメインが、CD3抗原、好ましくはCD3 抗原、およびより好ましくはヒトCD3 抗原のエピトープに結合することができることを意味する。

【0133】

本明細書で用いられる場合、「CD3」は、T細胞受容体複合体の一部として発現される分子を示し、先行技術において典型的にこれに帰する意味を有する。ヒトでは、CD3は、個別に、または独立して組み合わされた形態で、すべての公知のCD3サブユニット、例えば、CD3 、CD3 、CD3 、およびCD3 を包含する。ヒトCD3 抗原は、GenBankアクセッション番号NM_000733に示されている。

【0134】

「フレームワーク（領域）」という用語は、抗原結合部位のための足場を含む。例えば、そのような足場は、プロテインA、特にそのZドメイン（アフィボディ（affibody））、ImmE7（免疫タンパク質）、BPTI/APPI（クニツドメイン）、Ras結合タンパク質AF-6（P

10

20

30

40

50

DZドメイン)、カリブドトキシン(サソリ毒)、CTLA-4、Min-23(ノッチン)、リボカリン(anticalin)、ネオカルチノスタチン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサス反復ドメイン、またはチオレドキシニンによって提供され得る(Skerra. Curr Opin Biotechnol. 2007; 18:295-304; Hosse et al. Protein Sci. 2006; 15:14-27; Nicaise et al. Protein Sci. 2004; 13:1882-91; Nygren and Uhlen. Curr Opin Struct Biol. 1997; 7:463-9)。

【0135】

本発明との関係において、好ましいフレームワークは、抗体の可変領域内で、多様性のより高い(すなわち超可変の)相補性決定領域(CDR)の間に存在する、抗体可変領域の当技術分野で認識されている部分である。そのようなフレームワーク領域は、典型的にフレームワーク1~4(FR1、FR2、FR3、およびFR4)と称され、抗原結合表面を形成するように、三次元空間で6つのCDR(3つは重鎖由来であり、かつ3つは軽鎖由来である)を提示するための足場を提供する。

【0136】

本発明に従ったCD3特異的結合ドメインの好ましい例は、抗体である。CD3特異的結合ドメインは、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体であってよく、またはモノクローナルもしくはポリクローナル抗体に由来するものであってもよい。「抗体」という用語は、結合特異性をなお保持しているそれらの誘導体または機能的断片を含む。抗体を生成するための技法は、当技術分野で周知であり、例えば、Harlow and Lane「Antibodies, A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988、およびHarlow and Lane「Using Antibodies: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999に記載されている。「抗体」という用語はまた、異なるクラス(すなわち、IgA、IgG、IgM、IgD、およびIgE)およびサブクラス(IgG1、IgG2等など)の免疫グロブリン(Ig)を含む。「抗体」という用語の定義はまた、キメラ、単鎖、脱免疫化、およびヒト化抗体、ならびにとりわけFab断片のような抗体断片の態様も含む。抗体断片または誘導体はさらに、F(ab')₂、Fv、scFv断片、または単ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、もしくは他のV領域もしくはドメインとは独立して抗原もしくはエピトープに特異的に結合する、VHもしくはVLであってよい唯一の可変ドメインを含む免疫グロブリン単一可変ドメインを含む; 例えば、上記で引用されたHarlow and Lane (1988) および (1999)を参照されたい。そのような免疫グロブリン単一可変ドメインは、単離された抗体単一可変ドメインポリペプチドのみならず、抗体単一可変ドメインポリペプチド配列の1つまたは複数の単量体を含むより大きなポリペプチドも含む。

【0137】

二重特異性抗体形式が好ましい; しかしながら、他の多重特異性抗体形式(三重特異性、四重特異性等)は排除されない。前記CD3結合ドメインは、二重特異性単鎖抗体中に、またはそのような抗体によって含まれることが好ましい。該二重特異性単鎖抗体は、本発明の別の好ましい態様において、B細胞に特異的である、好ましくはCD19、CD22、CD20、またはCD79aなどのB細胞リンパ球上に見出され得るCDマーカー、好ましくはCD19に特異的である結合ドメインをさらに含む。特に好ましい態様において、該二重特異性単鎖抗体は、CD19 x CD3またはCD20 x CD3二重特異性単鎖抗体である。さらにより好ましい態様において、該CD19 x CD3二重特異性単鎖抗体はブリナツモマブ(MT103/AMG103)である。本発明のさらなる好ましい態様において、該CD19 x CD3二重特異性単鎖抗体は、ヒトCD3のエピトープに結合することができる第1結合ドメイン、およびヒトCD19に結合することができる第2結合ドメインを含む。ヒトCD抗原は、公的に利用可能なデータベースから容易に導出が可能である。ヒトCD19抗原は、例えばGenBankアクセッション番号AAA69966に示されている。

【0138】

その変種、断片、同等物等も含めた、本明細書において開示される特異的CD19xCD3二重特異性単鎖抗体はすべて、本発明の特に好ましいCD19xCD3二重特異性単鎖抗体である。

【0139】

本明細書で用いられる場合、「CD19xCD3二重特異性単鎖抗体」は、2つの結合ドメインを含む単一のポリペプチド鎖を示す。そのような二重特異性単鎖抗体は、本発明の方法／投与計画との関係において好ましい。各結合ドメインは、少なくとも1つの抗体重鎖由来可変領域（「VHまたはH領域」）を含み、第1結合ドメインのVH領域はCD3 に特異的に結合し、第2結合ドメインのVH領域はCD19に特異的に結合する。2つの結合ドメインは任意に、短いポリペプチドスペーサーによって互いに連結されている。ポリペプチドスペーサーの非限定的な例は、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) (SEQ ID NO: 23) およびその反復である。各結合ドメインは、1つの抗体軽鎖由来可変領域（「VLまたはL領域」）を付加的に含んでもよく、第1結合ドメインおよび第2結合ドメインの各々の中のVH領域とVL領域は、例えばEP 623679 B1において開示され、特許請求されている型のポリペプチドリンカー、しかしいずれの場合にも、第1結合ドメインのVH領域とVL領域および第2結合ドメインのVH領域とVL領域が、一緒になって各第1結合ドメインおよび第2結合ドメインに特異的に結合できるように互に対形成することを可能にするのに十分に長いポリペプチドリンカーを介して互いに連結されている。そのようなCD19xCD3二重特異性単鎖抗体は、WO 99/54440およびWO 2004/106381において極めて詳細に記載されている。

【 0 1 4 0 】

好ましくは、本発明の方法／投与計画に適用される二重特異性単鎖抗体は、(a) VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3) というドメイン配置を有する。しかしながら、本発明の方法は、

- (b) VH(CD19)-VL(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3)、
- (c) VL(CD19)-VH(CD19)-VL(CD3)-VH(CD3)、
- (d) VH(CD19)-VL(CD19)-VL(CD3)-VH(CD3)
- (e) VL(CD3)-VH(CD3)-VH(CD19)-VL(CD19)
- (f) VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CD19)-VL(CD19)
- (g) VL(CD3)-VH(CD3)-VL(CD19)-VH(CD19)、または
- (h) VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CD19)-VH(CD19)

などの他のドメイン配置のCD19xCD3二重特異性単鎖抗体を用いて実施することができることもまた想定される。

【 0 1 4 1 】

本発明の方法に適用される好ましいCD19xCD3二重特異性単鎖抗体は、

(a) SEQ ID NO: 24

(RYTMH)

、より好ましくはSEQ ID NO: 11

(GYTFTRYTMH)

のCD3 CDR-H1、SEQ ID NO: 12

(YINPSRGYTNYNQKFKD)

のCD3 CDR-H2、およびSEQ ID NO: 13

(YYDDHYCLDY)

のCD3 CDR-H3として示される重鎖の抗CD3 CDR；ならびに／または、

(b) SEQ ID NO: 14

(RASSSVSYMN)

のCD3 CDR-L1、SEQ ID NO: 15

(DTSKVAS)

のCD3 CDR-L2、およびSEQ ID NO: 16

(QQWSSNPLT)

のCD3 CDR-L3として示される軽鎖の抗CD3 CDR；ならびに／または、

(c) SEQ ID NO: 25

(SYWMN)

、より好ましくはSEQ ID NO: 17

(GYAFSSYWMN)

のCD19 CDR-H1、SEQ ID NO: 18

(QIWPGDGDNTNYNGKFKG)

のCD19 CDR-H2、およびSEQ ID NO: 19

(RETTTVGRYYYAMDY)

のCD19 CDR-H3として示される重鎖の抗CD19 CDR ; ならびに / または、

(d) SEQ ID NO: 20

(KASQSVDYDGD SYLN)

のCD19 CDR-L1、SEQ ID NO: 21

(DASNLVS)

のCD19 CDR-L2、およびSEQ ID NO: 22

(QQSTEDPWT)

のCD19 CDR-L3として示さる軽鎖の抗CD19 CDR

を含む。

【 0 1 4 2 】

本発明の方法に適用されるCD19xCD3二重特異性単鎖抗体は、重鎖および軽鎖のCD3 CDRを含むことがより好ましい。さらにより好ましくは、本発明の方法に適用されるCD19xCD3二重特異性単鎖抗体は、重鎖および軽鎖のCD3 CDRならびに重鎖および軽鎖のCD19 CDRを含む。

【 0 1 4 3 】

本明細書でいうCDRは、Kabat番号付けシステムに従う。Kabat番号付けスキームは、抗体の残基を一貫した様式で番号付けするために広く採用されている基準である (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991)。

【 0 1 4 4 】

あるいは、本発明の方法に適用されるCD19xCD3二重特異性単鎖抗体は、

(a) SEQ ID NO: 3に示されるCD19可変重鎖 (ヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 4に示される)、および / または

(b) SEQ ID NO: 5に示されるCD19可変軽鎖 (ヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 6に示される)、および / または

(c) SEQ ID NO: 7に示されるCD3可変重鎖 (ヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 8に示される)、および / または

(d) SEQ ID NO: 9に示されるCD3可変軽鎖 (ヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 10に示される)

を含むことが好ましい。

【 0 1 4 5 】

より好ましくは、本発明の方法に適用されるCD19xCD3二重特異性単鎖抗体は、CD19可変重鎖および軽鎖ならびに / またはCD3可変重鎖および軽鎖を含む。さらにより好ましくは、本発明の方法に適用されるCD19xCD3二重特異性単鎖抗体は、CD19可変重鎖および軽鎖ならびにCD3可変重鎖および軽鎖を含む

【 0 1 4 6 】

別の選択肢としては、CD19xCD3二重特異性単鎖抗体が、

(a) SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列、

(b) SEQ ID NO: 2に示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、

(c) (b) の核酸配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有する核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、CD3およびCD19に特異的に結合することができるアミノ酸配列、ならびに

(d) (b) のヌクレオチド配列に対して遺伝暗号の結果として縮重している核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、CD3およびCD19に特異的に結合することができるアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むこともまた好ましい。

【 0 1 4 7 】

配列同一性は、アミノ酸配列全体にわたって決定されると理解されるべきである。配列アライメントのためには、例えば、GCGソフトウェアパッケージ（Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711）に含まれるGapまたはBestFitというプログラムを使用することができる（Needleman and Wunsch. J Mol Biol. 1970; 48:443-53; Smith and Waterman. Adv Appl Math. 1981; 2:482-9）。本明細書に記載されるCD19xCD3二重特異性単鎖抗体（好ましくはブリナツモマブ）のアミノ酸配列と、例えば70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を決定および同定することは、当業者にとって通常の方法である。例えば、Crickのゆらぎ仮説によれば、アンチコドンの5'塩基は、他の2つの塩基ほど空間的な制限を受けず、それゆえ非標準的な塩基対形成を有し得る。言い換えると、コドントリプレット内の第3の位置は、この第3の位置において異なる2つのトリプレットが同じアミノ酸残基をコードするように変化してもよい。該仮説は、当業者に周知である（例えば、http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick. J Mol Biol. 1966; 19:548-55を参照されたい）。さらに、本明細書に記載されるCD19xCD3二重特異性単鎖抗体のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列と、例えば70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列などの細胞傷害活性を決定することは、当業者にとって通常の手段である。CD19xCD3二重特異性単鎖抗体、または本明細書に記載されるCD19xCD3二重特異性単鎖抗体のアミノ酸配列と、例えば70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する抗体構築物の細胞傷害活性は、例えばWO 99/54440において説明されている方法によって決定することができる。

【0148】

前記CD19xCD3二重特異性単鎖抗体は、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列を有することが特に好ましい。同様に特に好ましいのは、WO 99/54440に記載されているCD19xCD3二重特異性単鎖抗体、およびWO 2004/106381に記載されているCD19xCD3二重特異性単鎖抗体である。ブリナツモマブ（またはAMG 103もしくはMT103）が最も好ましい。

【0149】

本発明はさらに、CD19xCD3二重特異性単鎖抗体、ならびに／または
(a) ヒト患者における悪性のCD19陽性細胞、好ましくはリンパ球、さらにより好ましくはB細胞を処置するため、および／もしくは
(b) ヒト患者にCD19xCD3二重特異性単鎖抗体を投与するための方法に関し、この場合、抗接着特性を有する化合物は、該CD19xCD3二重特異性単鎖抗体によって引き起こされるCNS AEの予防または改善のために、該CD19xCD3二重特異性単鎖抗体によるヒト患者の処置の前に、それと同時に、またはその後投与されるべきである。

【0150】

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および／または改善する、および／または処置する方法において使用するための、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物。

【0151】

患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療（好ましくはCD3特異的結合ドメイン、より好ましくはブリナツモマブ）、抗接着特性を有する化合物（哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物）、および／または前述の成分のいずれかもしくは組み合わせを含む薬学的組成物の投与は、好ましくは静脈内投与である。これはボーラス注入としてまたは持続（連続）静脈内（civ）注入によって投与することができ、継続投与が好ましい。継続投与とは、本質的に中断のない投与を指す。「本質的に中断のない」は、通常は流動の中断または空間的拡張のない継続投与を含む。一例として、WO 2007/068354は治療計画を開示しており、これはそれを参照することにより本明細書に明確に含まれる。本発明との関係において想定される他の治療計画は、PCT/EP2010/066207に開示されている。

【0152】

患者は、B/T細胞比が1:5未満であること（PCT/EP2010/066207を参照されたい）、および/またはB細胞数が約50個未満のB細胞/μl末梢血であることを特徴とすることもまた想定される。PCT/EP2010/066207に極めて詳細に開示されているように、CD3特異的結合ドメイン、特にCD19xCD3二重特異性単鎖抗体の患者への投与は、該患者が1:5未満のB:T細胞比を特徴とする場合に、頻繁に神経学的症状を伴う。しかしながら、抗接着特性を有する化合物（本発明において定義される）を用いた同時薬物療法による、CD3特異的結合ドメインによって引き起こされるこれらの神経学的有害作用の本明細書において開示される予防または改善は、1:5以上のB:T細胞比を特徴とする患者にも適用可能である（PCT/EP2010/066207を参照されたい）。

【0153】

10

本発明はまた、「化合物」（すなわち、本明細書において定義される、哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物）、および/または「標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療」（本明細書においてまた、好ましくはCD3特異的結合ドメイン、および最も好ましくはプリナツモマブと定義される）、ならびに該化合物が、患者における標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療によって引き起こされる臨床的有害事象を予防する、および/または改善する、および/または処置する方法において使用するために用いられるべきことを示す説明書、ラベル、および/または印を含む（薬学的）キットまたはパッケージに関する。加えてまたはその代わりに、該説明書、ラベル、および/または印は、標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む治療が、AE、特にCNS AEを引き起こし得ること、およびしたがって哺乳動物T細胞の哺乳動物内皮細胞への結合を減少させるかまたは阻害する化合物でこれらの作用を緩和することが推奨される、想定される、または必要であることを示す。該化合物、および/または標的細胞に対するT細胞の再指向化を含む該治療は、好ましくは1つの密封されたキットまたはパッケージ内に包装される。このキットまたはパッケージは、その内容物を患者に投与するための手段、ならびに/または治療薬の注入のために通常用いられる緩衝液、バイアル、テフロンバッグ、もしくは輸液バッグをさらに含むこともまた想定される。したがって「手段」は、シリンジ、皮下針、カニューレ、カテーテル、静脈内投与用の輸液バッグ、静脈注射の媒体、バイアル、緩衝液、安定剤、当業者が本発明の各投与物および注入物を調製するのを助ける書面での説明書等からなる群より選択される、1つまたは複数の物品を含む。

20

30

【0154】

上記の（薬学的）キットまたはパッケージは、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸もまた含み得る。

【0155】

（表1）ヒトにおける臨床的使用に利用可能であるかまたは利用可能となり得る、公知のまたは提唱される抗接着特性を有する化合物

内皮細胞接着分子（内皮細胞上の標的としても示される）			
標的	化合物	作用機序	参考文献
P-セ렉チン	PPS, 小分子	PSGL-1結合部位の遮断	Höpfner et al. <i>J Pharm Pharmacol.</i> 2003; 55: 697-706
	インクラクマブ, mAb	PSGL-1結合部位の遮断	Kling et al. <i>Thromb Res.</i> 2013
ICAM-1	アリカホルセン注腸 (ISIS2303), siRNA	ICAM-1発現の阻害	Van Deventer et al. <i>Aliment Pharmacol Ther.</i> 2006; 23: 1415-25
MAdCAM	PF-00547659, mAb	β 7-インテグリン 結合部位の遮断	Pullen et al. <i>Br J Pharmacol.</i> 2009; 157: 281-93
VCAM-1	ロスバスタチン、小分子	VCAM-1発現の低減	Osaka et al. <i>Biomed Res Int.</i> 2013
PAR-1, フィブリノーゲン	トロンビン (低いpM濃度で)	抗白血球接着効果、血管バリアの完全性の維持	Ku and Bae. <i>Inflamm Res.</i> 2013
T細胞接着分子（T細胞上の標的としても示される）			
標的	化合物	作用機序	参考文献
α_4 -インテグリン (例えば VLA-4, LPAM-1)	ナタリズマブ, mAb	VCAM-1、MAdCAM、フィブリノーゲン、コンドロイチン結合部位の遮断	Haanstra et al. <i>J Immunol.</i> 2013
	AJM300, 小分子	リガンド結合部位の遮断	Thomas and Baumgart. <i>Inflammopharmacology.</i> 2012; 20: 1-18
$\alpha_L\beta_2$ -インテグリン (LFA-1)	ミノサイクリン	LFA-1発現の低減、イオンキレート剤	Nikodemova et al. <i>J Neuroimmunol.</i> 2010; 219: 33-7
	SAR 1118, 小分子	ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3 結合部位の遮断	Rao et al. <i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i> 2010; 51: 5198-204
	BOL-303225-A, 小分子	アンタゴニスト	Bucolo et al. <i>J Pharm Pharmacol.</i> 2008; 60: 1473-9

10

20

30

40

標的	化合物	作用機序	参考文献
α_L -インテグリン (例えば LFA-1)	エファリズマブ, mAb	ICAM-1結合部位の遮断	Kozsik et al. <i>J Dermatol Sci.</i> 2010; 60: 159-66
β_7 -インテグリン	エトロリズマブ, mAb	VCAM-1および MAdCAM結合部位の遮断	Stefanich et al. <i>Br J Pharmacol.</i> 2011; 162: 1855-70
$\alpha_5\beta_1$ -インテグリン (VLA-5)	Natramune (PDS-2865)、 PureWay-C、 アスコルビン酸； 小分子	$\alpha_5\beta_1$ -インテグリン 媒介性接着の妨害	Weeks et al. <i>Med Sci Monit.</i> 2008; 14: BR279-85; Eylar et al. <i>P R Health Sci J.</i> 1996; 15: 21-6
L-セ렉チン	(アセチル-) サリチル酸	L-セ렉チン発現の低減	Gerli et al. <i>J Immunol.</i> 2001; 166: 832-40
インテグリン (例えば LFA-1, VLA-4)	エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)	イオンキレート剤	Welzenbach et al. <i>J Biol Chem.</i> 2002; 277: 10590-8
CD44	ヒアルロン酸 (HA)、 コンドロイチン硫酸、 抗CD44 mAb	HAおよび E-セ렉チン結合部位の 遮断	Murai et al. <i>Immunol Lett.</i> 2004; 93: 163-70; Baaten et al. <i>Front Immunol.</i> 2012; 3: 23
	アスチルビン、 フラボノイド	CD44発現の低減	Yi et al. <i>Int Immunopharmacol.</i> 2008; 8: 1467-74
CD162 (PSGL-1)	mAb	P-セ렉チン結合部位の 遮断	Moore. <i>Leuk Lymphoma.</i> 1998; 29: 1-15
Src-ファミリーキナーゼ (例えば Lck, Fyn)	PP2 (4-アミノ-5-(4-クロロフェニル)-7-(<i>t</i> -ブチル)ピラゾロ [3, 4-d]ピリミジン)	Srcファミリーキナーゼ の選択的阻害剤	Feigelson et al. <i>J Biol Chem.</i> 2001; 276: 13891-901
T細胞上および／または内皮細胞上の標的			
標的	化合物	作用機序	参考文献
シアリダーゼ	シアリダーゼ阻害剤、 例えばカスタノスペルミン； 小分子	例えばLFA-1、 ICAM-1の脱シアル化の 遮断	Feng et al. <i>J Leukoc Biol.</i> 2011; 90: 313-21
接着分子	各接着分子の 組換えリガンド	天然リガンド結合の 競合的遮断	

10

20

30

40

	siRNA, shRNA	各接着分子の発現の 低減または阻害	
--	--------------	----------------------	--

mAb：モノクローナル抗体

【0156】

(表2) 新たに単離されたヒトT細胞の特徴

マーカー	CD3	CD4	CD8	CD11a	CD49d	CD162	CD69	CD25	HLA-DR
陽性細胞 ±SD (%)	93.37 ± 9.41	68.87 ± 4.02	25.10 ± 4.50	99.93 ± 0.06	32.90 ± 2.04	99.87 ± 0.23	1.10 ± 0.52	49.60 ± 13.85	5.03 ± 2.15

新たに単離されたヒトT細胞の表面上のCD3、CD4、CD8、CD11a、CD49d、CD162 (PSGL-1)、CD69、CD25、およびHLA-DRの発現を、フローサイトメトリーにより決定した。CD3陽性細胞は、3回の独立した測定の全イベントに占める平均比率 ± SDとして表される。CD4、CD8、CD11a、CD49d、CD162、CD69、CD25、およびHLA-DR陽性細胞は、3回の独立した測定のCD3陽性細胞に占める平均比率 ± SDとして表される。

【0157】

本発明の化合物は、好ましくは非グルココルチコイド系化合物である、すなわちグルココルチコイドは好ましくは排除される。「グルココルチコイド」という用語は、グルココルチコイド受容体に、好ましくは特異的に結合する化合物を意味する。該用語は、コルチゾン、コルチゾール(ヒドロコルチゾン)、クロブレドノール、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、デフラザコート、フルオコルトロン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン (beatamethasone)、コルチバゾール、パラメタゾン、および/またはフルチカゾンからなる群より選択され、その薬学的に許容される誘導体も含めた化合物を含む。

【実施例】

【0158】

以下の実施例は、本発明を説明するものである。これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。実施例は、説明の目的のために含まれる。

【0159】

実施例1：CNS AEのためにブリナツモマブ処置の中断のリスクが高い患者におけるPPSを用いた抗白血球接着によるCNS AEの緩和の成功

ブリナツモマブとPPSの同時薬物療法の投与計画

第1相臨床試験において、3名の患者を $5 \mu\text{g}/\text{m}^2$ /日の初期用量のブリナツモマブで1週間処置し、その後 $60 \mu\text{g}/\text{m}^2$ /日まで用量を増加して、さらに3~7週間処置した。併用PPSは、ブリナツモマブの注入開始および用量増加の3時間 ± 30分前に100 mgボースiv注入として投与し、その後ブリナツモマブの注入開始および用量増加後の48時間にわたり300 mg/日で灌流した。

【0160】

患者109-036 (図3Eもまた参照されたい)

患者109-036は、コーカサス人男性、62歳、体重96.8 kg、身長178 cmであり、濾胞性リンパ腫グレードI/IIを示した。以前の治療は、CHOP (02/12~03/04)、Dexa BEAM (03/05)、シクロホスファミド (03/08)、および放射線療法と、その後の自己幹細胞移植 (03/08)を含んだ。該患者は、ブリナツモマブのiv注入の57日後に完全寛解 (CR) を達成した。この患者は、B:T細胞比が低いためにCNS AEを発症するリスクが高かったが (PCT/EP2010/066207を参照されたい)、CNS AEに起因する処置の中断は必要なかった。

【0161】

患者109-040 (図3Fもまた参照されたい)

患者109-040は、コーカサス人男性、51歳、体重94.0 kg、伸長180 cmであり、リンパ形質細胞性 (Lymphoplasmocytic) リンパ腫 (モルブス・ワルデンストレーム (Morbus Waldenström)) を示した。以前の治療は、CVP (04/12~05/03)、Leukeran (05/10~05/12)、リツキシマブ (06/05~06/07)、R-CHOP (06/07~06/10)、Dexa BEAM (06/10)、BEAM (06/12)、および放射線療法と、その後の自己幹細胞移植 (06/12) を含んだ。さらなる事前の治療は、リツキシマブ + ベンダムスチン (09/04~09/12) およびリツキシマブ (09/04~09/12) を含んだ。該患者は、ブリナツモマブのciv注入の30日後に安定疾患 (SD) を達成した。この患者は、B:T細胞比が低いためにCNS AEを発症するリスクが高かったが (PCT/EP2010/066207を参照されたい)、CNS AEに起因する処置の中断は必要なかった。

10

【0162】

患者109-042 (図3Dもまた参照されたい)

患者109-042は、コーカサス人女性、49歳、体重92.0 kg、伸長169 cmであり、濾胞性リンパ腫グレードI/IIを示した。以前の治療は、R-CHOP (09/11~10/02) およびリツキシマブ (10/03~10/04) を含んだ。該患者は、ブリナツモマブのciv注入の56日後に完全寛解 (CR) を達成した。この患者は、B:T細胞比が低いためにCNS AEを発症するリスクが高かったが (PCT/EP2010/066207を参照されたい)、CNS AEに起因する処置の中断は必要なかった。

【0163】

実施例2: ブリナツモマブまたは他のCD3特異的結合薬によって誘発されるT細胞/内皮細胞相互作用を模倣するインビトロフローチャンバー系
内皮細胞の培養

20

ヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) (#1000、Sciencell Research Laboratories) またはヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) (#C-12200、Promocell) を、内皮細胞モデルとして使用した。凍結保存された継代1代目のHBMEC ($> 5 \times 10^5$ 個細胞/ml) を、最初に、製造業者の説明書に従って、フィブロネクチンコーティングされたNunclon処理75 cm²細胞培養フラスコ (#156499、Nunc) で、Heraeus Cytoperm 2 (Thermo Scientific) 内で37 °Cおよび5% CO₂にて培養した。HBMECの継代培養は、HEPES緩衝平衡塩類溶液 (#C-40000、Promocell)、トリプシン-EDTA溶液 (0.04% / 0.03%) (#C-41000、Promocell)、およびトリプシン中和溶液 (TNS、#C-41100、Promocell) からなるDetach Kit (#C-41200、Promocell) を用いて行った。簡潔に説明すると、HBMEC層から培地を吸引し、細胞を2 mlのHEPES緩衝平衡塩類溶液で洗浄した。2 mlのトリプシン-EDTA溶液を添加して、室温で1~5分間置くことにより、HBMECをフラスコの底から剥離した。トリプシン-EDTA溶液の不活化は、2 mlのトリプシン中和溶液を細胞懸濁液に添加することによって行った。細胞をHeraeus Megafuge 40 (Thermo Scientific) で300 gにて4分間遠心分離し、ゼラチンコーティングされた75 cm²細胞培養フラスコ (#L7230、Biochrom) 当たり 5×10^5 個細胞という細胞密度で播種した。ローリングおよび接着実験のためのHBMECは、Nu-Serum IV (10%) (#355505、BD Biosciences)、透析済みFBS (10%) (#SZ0115、Biochrom)、MEM-ビタミン (1%) (#K0373、Biochrom)、L-グルタミン (1%) (#K0283、Biochrom)、ピルビン酸ナトリウム (1%) (#L0473、Biochrom)、ヘパリン (10 U/ml) (#L6510、Biochrom)、および上皮細胞増殖因子 ECGS (30 μg/ml) (#02-102、Millipore) を補充したRPMI 1640培地 (#FG1215、Biochrom) 中で培養した。HUVECの培養は、ゼラチンコーティングされた75 cm²細胞培養フラスコを用いて、透析済みFBS (10%) (#SZ0115、Biochrom) を補充した内皮細胞増殖培地 (#C-2010、Promocell) 中で行った。HUVECの継代培養はDetach Kit (#C-40000、Promocell) を用いて行い、細胞は75 cm²細胞培養フラスコ当たり $4.0 \sim 7.5 \times 10^5$ 個細胞という細胞密度で播種した。

30

40

【0164】

血液からのヒト末梢血単核細胞 (PBMC) およびT細胞の単離

血液からのヒトPBMCの単離は、他所に記載されているように、改良密度勾配遠心分離によって行った。簡潔に説明すると、新たに採取しヘパリン処理した15~20 mlの血液を、B

50

iocoll (#L6115、Biochrom) 含有Leukosepチューブ (#227290、Greiner bio-one) に移し、Hettich Rotanta 460 RS Type 5606 (Hettich Laborapparate) で1066 gにて15分間遠心分離した。血漿画分を除去した後、PBMC含有相を新しいチューブに移し、FACS緩衝液 (D-PBS #L1820、5% FBS #SO115、Biochrom) で2回洗浄した。溶解緩衝液 (8.29 g/l NH_4Cl 、1.00 g/l KHCO_3 、0.037 g/l EDTA) を用いて、赤血球溶解を室温で5分間行った。それに続く非標識 (untouched) T細胞の精製には、ヒトPan T細胞単離キットII (#130-091-156、Miltenyi Biotec) を製造業者の説明書に従って使用した。

【 0 1 6 5 】

単離されたヒトT細胞のフローサイトメトリーによる特徴付け

単離されたT細胞を、フローサイトメトリーにより、接着分子および活性化マーカーの表面発現について特徴付けた。FACS染色および洗浄の手順は、冷FACS緩衝液 (5% FBSを含むD-PBS) 中で4で行った。表面に露出した接着分子を解析するため、 3×10^5 個のT細胞を、100 μl のFACS緩衝液中で、抗CD11a-APC (1:10) (#550852、BD Biosciences)、抗CD49d-PE (1:10) (#560972、BD Biosciences)、および抗CD162-PerCP-eFluor710 (1:20) (#46-1629、eBioscience) で染色した。T細胞の活性化の可能性は、 3×10^5 個のT細胞を、抗CD69-PE (1:40) (#555531、BD Biosciences)、抗CD25-APC (1:40) (#340907、BD Biosciences)、および抗HLA-DR-FITC (1:40) (#555811、BD Biosciences) で染色することによりモニターした。さらに、T細胞亜集団を特徴付けるために、抗CD3-V450 (1:40) (#560365、BD Biosciences)、抗CD4-APC-Cy7 (1:40) (#341115、BD Biosciences)、および抗CD8-V500 (1:40) (#560774、BD Biosciences) を両方の染色に含めた。 3×10^5 個のT細胞のDAPI (1 $\mu\text{g/ml}$) (#A1001.0010、Applichem) による別々の染色により、細胞生存度のモニタリングを可能にした。30分間の染色後に、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄した。染色された試料をFACSCanto II装置 (BD Biosciences) でのFACS解析に供し、FACSDivaソフトウェア (BD Biosciences) を用いて統計解析を行った。10,000イベントを記録し、CD4、CD8、CD11a、CD49d、CD162、CD69、CD25、およびHLA-DR陽性細胞を、CD3陽性細胞に占める割合として表した。

【 0 1 6 6 】

ibidi Pump Systemを用いた流動条件下での内皮細胞の培養

流動条件下での内皮細胞の培養のため、ならびに内皮細胞上でヒトT細胞の接着およびローリングアッセイを行うために、ibidi Pump System (#10902、ibidi) を使用した。このシステムはibidi Pump (#10905、ibidi) およびibidi Fluidic Unit (#10903、ibidi) からなり、これらは既定のチャネル高を有する付属のスライド内で培地の一方向流動を生じるように共に働く。このシステムは、ibidi Pump Controlソフトウェア (#10908、ノート型パソコン + ソフトウェア、ibidi) によって制御される。流動条件下でHBMECまたはHUVECを培養するために、HBMECまたはHUVECを、製造業者の説明書に従って、 2.5×10^6 個細胞/mlの細胞密度でそれぞれマイクロスライドI^{0.4} Luer Collagen IV (#80172、ibidi) またはマイクロスライドI^{0.4} Luer ibiTreat (#80176、ibidi) に播種し、灌流セット「黄色/緑色」(#10964、ibidi) を用いて、それぞれ5または10 dyn/cm^2 の壁剪断応力下で48時間培養した。単一の流体ユニットを用いて2枚以上のマイクロスライドI^{0.4} Luerを培養するために、最大4枚までのマイクロスライドをマイクロスライド用のSerial Connector (#10830、ibidi) と互いに接続した。

【 0 1 6 7 】

HBMECとペントサンポリ硫酸SP54 (登録商標) (100 mg/ml注射液、bene Arzneimittel GmbH) との付加的なプレインキュベーションのために、任意の実験の24時間前にPPSをHBMEC細胞培養液に添加した (200 $\mu\text{g/ml}$)。HBMECのヒスタミン予備刺激は、ローリングおよび接着実験の前に、HBMEC細胞培養液中に 10^{-5} Mヒスタミン (#H7125-1G、Sigma-Aldrich) を用いて37で30分間行った。

【 0 1 6 8 】

ヒトT細胞の、抗白血球接着を媒介する化合物とのインキュベーション

AMG 103媒介性の接着作用をさらに妨害するために、ローリングおよび接着実験の前に

10

20

30

40

50

、T細胞を、抗白血球接着を潜在的に媒介する化合物と共にブレインキューベートした。よって、Tysabri (ナタリズマブ、20 mg/ml溶液、Elan Pharma International Ltd.) またはMinocin (ミノサイクリン、100 mg / バイアル、Triax Pharmaceuticals) をT細胞懸濁液に添加し、37 °C でインキューベートした。

【0169】

流動条件下でのヒトT細胞とHBMECまたはHUVECとの相互作用：ローリングおよび接着実験のためのアッセイ設定

上記のような新たに単離したヒトT細胞および流動培養したHBMECまたはHUVECを用いて、既定の流体力学的流動条件下での実験を行い、倒立顕微鏡Ti-E (#MEA53100、Nikon)、デジタルカメラOrca Flash 2.8 (#C-11440-10C、Hamamatsu)、NIS-Elements ARソフトウェアバージョン3.22.00および4.10.03 (#MQS31200および#MQS31100、Nikon)、ibidi Pump System (#10902、ibidi)、細胞培養インキュベーターGalaxy 14S (#C014S-120-0000、Eppendorf)、Heating System 8 (#10925、ibidi)、ならびにCO₂ガスインキュベーションユニットI (#10920、ibidi) からなる顕微鏡システムを用いて解析した。顕微鏡Ti-Eには、同焦点変動の補正を可能にするTI-ND6-PFS Perfect Focus System (#MEP59390、Nikon) を装備した。ローリングおよび接着実験は、10 x対物レンズ (CF1 PlanFluor DL-10 X位相、#MRH20101、Nikon) でモニターした。Heating System 8およびCO₂ガスインキュベーションユニットIは、任意の実験の少なくとも3時間前に作動させ、ステージトップインキュベーターを37 °C および5% CO₂になるよう予め温めた。RPMI 1640培地 (#FG1215、Biocom) もまた、37 °C および5% CO₂で予め温めた。ローリングおよび接着実験のため、流動培養したHBMECを伴うマイクロスライドI^{0.4} Collagen IV、または流動培養したHUVECを伴うマイクロスライドI^{0.4} ibiTreatを灌流セットから外し、PPS (200 μg/ml) を含むかまたはPPSを含まない予め温めたRPMI 1640培地でリンスし、顕微鏡下のステージトップインキュベーターのマイクロスライド差し込み口に設置した。6x10⁶個の新たに単離されたヒトT細胞を、PC Vチューブ (#347759、Nunc) 中で300 gにて4分間遠心分離した。T細胞を、PPS (200 μg/ml) を含むかまたはPPSを含まないRPMI 1640培地中に、最終T細胞密度が1x10⁶個細胞/mlとなるように再懸濁した。これらの細胞は、AMG 103 (10 ng/ml) を細胞懸濁液に添加するかもしれないかまたは添加せずにローリング実験に直接使用するか、またはPC Vチューブ中でAMG 103の存在下もしくは非存在下において37 °C で45分間ブレインキューベートした。このように調製されたT細胞懸濁液を、流体ユニットおよびマイクロスライドの両方に接続した灌流セット「白色」(#10963、ibidi) に満たした。1 dyn/cm²の剪断応力におけるHBMECまたはHUVEC上でのT細胞のローリングおよび接着実験について、2つの異なる設定を適用した：

1. 45秒間の内皮細胞上でのT細胞のローリング (短期条件)
2. 45 ~ 120分間の内皮細胞上でのT細胞のローリング (長期条件、流体ユニットを細胞培養インキュベーター内に配置)

【0170】

流動条件下でのヒトT細胞とHBMECまたはHUVECとの相互作用：データの取得および解析

順にNIS-Elementsソフトウェア3.22.00によって制御されるデジタルカメラOrca Flash 2.8を用いて画像を取得することにより、内皮細胞とのT細胞相互作用をモニターした。個々の時点について微速度撮影の45秒の獲得 (遅延なし) を行い、結果として1920x1440の解像度で最大45フレーム / 秒を得た。このように記録された45秒間の画像シーケンスを、NIS-Elements AR 4.10.03の自動追跡モジュールに供するか、またはNIS-Elements AR 3.22.00を用いた手動追跡に供した。作成された追跡データをMicrosoft Excelにエクスポートし、各追跡対象の平均進行方位 (heading)、平均速度、および経路長などのパラメータにフィルターをかけることによって、さらに解析した。その後、フィルター処理した全細胞の平均ローリング速度 ± 標準偏差を算出した。手動追跡を用いた場合には、10 ~ 40個のT細胞を選択し、手動で追跡し、平均ローリング速度 ± 標準偏差を決定した。

【0171】

HBMECまたはHUVECの免疫蛍光染色

流動条件下におけるHBMECまたはHUVEC上でのT細胞のローリングおよび接着後、150 μ lの4%パラホルムアルデヒド溶液（#P-6148、Sigma-Aldrich）を用いて、内皮細胞を4で30分間固定した。マイクロスライドを150 μ lのD-PBSでリンスし、免疫蛍光染色に供した。HBMECを最初に、150 μ lのアビジンブロッキング試薬（#PHA-70871、試薬1、Dianova）で室温にて10分間ブロッキングし、150 μ lのD-PBSで洗浄し、その後150 μ lのビオチンブロッキング試薬（#PHA-70871、試薬2、Dianova）と共にインキュベートした。その後の染色手順はすべて、5% FBSを含む150 μ lのD-PBS中で室温にて暗下で行い、洗浄段階は150 μ lのD-PBS中で行った。マイクロスライドを5 μ g/mlポリクローナルウサギ抗ヒトVCAM-1（#106777、abcam）と共に1時間インキュベートした。洗浄後、20 μ g/mlヤギ抗ウサギIgG-DyLight350を添加して1時間おき、その後洗浄し、15 μ g/mlマウス抗ヒトP-セレクチンIgG1（#BBA30、R&D Systems）と共に2時間インキュベートした。洗浄後、ヤギ抗マウスIgG-Alexa488（1:100）（#A10680、Invitrogen）を添加して1時間おいた。ICAM-1染色は、10 μ g/mlポリクローナルウサギ抗ヒトICAM-1ビオチン（#AB7815、abcam）を用いて1時間行い、その後洗浄し、ストレプトアビジン-Cy3（1:100）（#016-160-084、Dianova）と共に1時間インキュベートした。PFA固定HUVEC上のICAM-1およびP-セレクチンの細胞表面染色は、HBMECについて記載される通りに行った。最後に、HBMECまたはHUVECを、UV光、およびPH-2位相モジュール（#MEH41200、Nikon）を備えたCFI Plan Apochromat DM 20 x 対物レンズ（#MRD30205、Nikon）を用いる顕微鏡解析に供した。VCAM-1染色はCFL EPI-FL Filter Block UV-2A（#MBE41200、Nikon）でモニターし、P-セレクチン染色はCFL EPI-FL Filter Block GFP-B（#MBE44740、Nikon）でモニターし、ICAM-1染色は、EPI-FL Filter Block Cy3（#MXU96213、Nikon）でモニターした。画像取得は、NIS-Elementsソフトウェアを用いて行った。

【0172】

統計データ解析

いくつかのグループのデータを比較するのに応じて、独立t検定、またはチューキーの事後検定と組み合わせた一元配置ANOVAを用いて、Prism (GraphPad Software) で統計学的有意性を解析した。P値 < 0.05を統計学的に有意と見なした。

【0173】

10 ng/mlのブリナツモマブと共に45分間ブレインキュベートしたT細胞（+AMG 103）は、陰性対照（-AMG 103； $283 \pm 82 \mu\text{m}/\text{秒}$ ）と比較した場合に、短期条件においてHUVEC上で、 $237 \pm 45 \mu\text{m}/\text{秒}$ という有意に低下した平均ローリング速度 \pm SDを示した。同時に、10 ng/mlのブリナツモマブとのブレインキュベーションにより、HUVECに堅固に接着しているT細胞の数は2.6倍増加した。加えて、対応するT細胞を10 ng/mlのブリナツモマブと共にブレインキュベートした場合、未処理のT細胞にのみ接触したHUVECでの基礎発現レベルと比較して、接着分子ICAM-1およびP-セレクチンの表面発現の増加によって示されるようなHUVEC活性化が観察された。これらの知見は、ブリナツモマブとインキュベートしたT細胞のHUVECとの/への相互作用の増加および堅固な接着と、それによって次のこれらの細胞が活性化され、接着性が増加することを実証した（図5）。

【0174】

HBMECを用いた場合、長期条件において、10 ng/mlのブリナツモマブの存在下では（+AMG 103）陰性対照（-AMG 103； $323 \pm 78 \mu\text{m}/\text{秒}$ ）と比較して、平均T細胞ローリング速度 \pm SDは $209 \pm 40 \mu\text{m}/\text{秒}$ まで有意に低下した。この低下は、流動系にブリナツモマブを添加してから45分後に観察され、ブリナツモマブの添加直後（0分）には、T細胞ローリング速度の低下は検出されなかった。ブリナツモマブで刺激されたT細胞と相互作用したHBMECは、T細胞ローリング後に、未処理のT細胞にのみ接触したHUVECでの基礎発現レベルと比較して、接着分子ICAM-1、P-セレクチン、およびVCAM-1の表面発現の増加を示した。これらの知見は、臨床試験におけるT細胞再分布の時間経過と時間的に（すなわち45分後）相関する、HBMECとのT細胞相互作用のブリナツモマブ誘導性の増加、および同時に起こるHBMEC接着性の増加を実証した（図6）。

【0175】

流動系に10 ng/mlのブリナツモマブを添加してから45分後に観察される平均T細胞ローリング速度のブリナツモマブ誘導性の低下に及ぼすPPSの影響を、長期条件において評価した。AMG 103は、HBMEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを $430 \pm 92 \mu\text{m}/\text{秒}$ (-AMG 103) から $281 \pm 96 \mu\text{m}/\text{秒}$ (+AMG 103) まで有意に低下させたのに対して、流動系にPPSをさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような(すなわち、-AMG 103、+PPS; $442 \pm 156 \mu\text{m}/\text{秒}$)、 $483 \pm 157 \mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った。HBMEC上でのP-セレクチンの細胞表面発現は、ブリナツモマブを流動系に添加した場合に増加したのに対し、PPSをさらに添加すると(すなわち、HBMECとPPSとのプレインキュベーション)、より少ない増加をもたらした。したがって、PPSによるHBMECとのT細胞相互作用の防止はまた、HBMECの活性化および接着性のT細胞媒介性の増加を減少させた(図7)。

10

【0176】

ヒスタミンで予備刺激したHBMECと組み合わせてPPSについて上記で詳述されたように、この流動系を同様に使用して、AMG 103誘導性の非刺激HBMECとのT細胞相互作用に対するPPSの妨害を解析した。

【0177】

平均T細胞ローリング速度のブリナツモマブ誘導性の低下に及ぼすPPSの影響を、長期条件下で評価した。AMG 103は、10 ng/mlブリナツモマブを流動系に添加してから40分後に、HBMEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを $399 \pm 153 \mu\text{m}/\text{秒}$ (-AMG 103) から $263 \pm 66 \mu\text{m}/\text{秒}$ (+AMG 103) まで有意に低下させたのに対して、この実験にPPSをさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような(すなわち、-AMG 103、+PPS; $514 \pm 159 \mu\text{m}/\text{秒}$)、 $465 \pm 116 \mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った。したがって、PPSは、内皮細胞とのT細胞相互作用のブリナツモマブ誘導性の増加を妨げた(図8)。

20

【0178】

ヒスタミンで予備刺激したHBMECと組み合わせてPPSについて上記で詳述されたように、この流動系を同様に使用して、AMG 103誘導性の非刺激HBMECとのT細胞相互作用に対するナタリズマブの妨害を解析した。この目的のために、ローリングおよび接着実験の前に、新たに単離されたT細胞を、RPMI 1640培地中の $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ナタリズマブと共に37 °Cで10時間インキュベートした。

30

【0179】

平均T細胞ローリング速度のブリナツモマブ誘導性の低下に及ぼすナタリズマブの影響を、長期条件下で評価した。AMG 103は、10 ng/mlブリナツモマブを流動系に添加してから40分後に、HBMEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを $482 \pm 149 \mu\text{m}/\text{秒}$ (-AMG 103) から $359 \pm 102 \mu\text{m}/\text{秒}$ (+AMG 103) まで有意に低下させたのに対して、この実験にナタリズマブをさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような(すなわち、-AMG 103、+ナタリズマブ; $445 \pm 81 \mu\text{m}/\text{秒}$)、 $444 \pm 110 \mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った。したがって、ナタリズマブは、内皮細胞とのT細胞相互作用のブリナツモマブ誘導性の増加を妨げた(図9)。

40

【0180】

ヒスタミンで予備刺激したHBMECと組み合わせてPPSについて上記で詳述されたように、この流動系を同様に使用して、AMG 103誘導性の非刺激HUVECとのT細胞相互作用に対するミノサイクリンの妨害を解析した。この目的のために、ローリングおよび接着実験の前に、新たに単離されたT細胞を、ダルベッコPBS中の $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ミノサイクリンと共に37 °Cで2時間インキュベートした。

【0181】

平均T細胞ローリング速度のブリナツモマブ誘導性の低下に及ぼすミノサイクリンの影響を、長期条件下で評価した。AMG 103は、10 ng/mlブリナツモマブを流動系に添加してから40分後に、HUVEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを $169 \pm 49 \mu\text{m}/\text{秒}$ (-AMG 103) から $127 \pm 41 \mu\text{m}/\text{秒}$ (+AMG 103) まで有意に低下させたのに対して、この実験にミ

50

ノサイクリンをさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような（すなわち、-AMG 103、+ミノサイクリン； $233 \pm 29 \mu\text{m}/\text{秒}$ ）、 $217 \pm 92 \mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った（図10）。

【0182】

さらなる別の実験において、HUVECに堅固に接着しているT細胞の絶対数のプリナツモマブ誘導性の増加に及ぼすミノサイクリンの影響を、長期条件下で評価した。10 ng/ml プリナツモマブを流動系に添加してから40分後の接着T細胞の数は、T細胞のみ（-AMG 103）と比較してプリナツモマブの存在下において（+AMG 103）有意に増加した（2.1倍）。この実験にミノサイクリンをさらに添加すると（+AMG 103、+ミノサイクリン）、接着T細胞の数の増加は、プリナツモマブの非存在下で観察されたレベル（-AMG 103； \pm ミノサイクリン）に匹敵するかまたはさらにより低いレベルにまで戻った（図11）。

10

【0183】

したがって、ミノサイクリンは、内皮細胞とのT細胞相互作用のプリナツモマブ誘導性の増加を妨げた

【0184】

ヒスタミンで予備刺激したHBMECと組み合わせてPPSについて上記で詳述されたように、この流動系を同様に使用して、AMG 103誘導性の非刺激HBMECとのT細胞相互作用に対する抗ICAM-1抗体の妨害を解析した。この目的のために、ローリングおよび接着実験の前に、HBMECを10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ マウス抗ヒトICAM-1抗体（#MAB2146Z、Millipore）と共に37 °Cで30分間インキュベートした。

20

【0185】

平均T細胞ローリング速度のプリナツモマブ誘導性の低下に及ぼす抗ICAM-1抗体の影響を、長期条件下で評価した。AMG 103は、10 ng/ml プリナツモマブを流動系に添加してから30分後に、HBMEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを $407 \pm 90 \mu\text{m}/\text{秒}$ （-AMG 103）から $335 \pm 48 \mu\text{m}/\text{秒}$ （+AMG 103）まで有意に低下させたのに対して、この実験に抗ICAM-1抗体をさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような（すなわち、-AMG 103、+抗ICAM-1 Ab； $378 \pm 64 \mu\text{m}/\text{秒}$ ）、 $416 \pm 97 \mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った。したがって、抗ICAM-1抗体は、内皮細胞とのT細胞相互作用のプリナツモマブ誘導性の増加を妨げた（図12）。

【0186】

30

ヒスタミンで予備刺激したHBMECと組み合わせてPPSについて上記で詳述されたように、この流動系を同様に使用して、AMG 103誘導性の非刺激HBMECとのT細胞相互作用に対する抗P-セレクチン抗体の妨害を解析した。この目的のために、ローリングおよび接着実験の前に、HBMECを10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ マウス抗ヒトP-セレクチン抗体（#MAB2154、Millipore）と共に37 °Cで30分間インキュベートした。

【0187】

平均T細胞ローリング速度のプリナツモマブ誘導性の低下に及ぼす抗P-セレクチン抗体の影響を、長期条件下で評価した。AMG 103は、10 ng/ml プリナツモマブを流動系に添加してから40分後に、HBMEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを $449 \pm 90 \mu\text{m}/\text{秒}$ （-AMG 103）から $370 \pm 55 \mu\text{m}/\text{秒}$ （+AMG 103）まで有意に低下させたのに対して、この実験に抗P-セレクチン抗体をさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような（すなわち、-AMG 103、+抗P-セレクチンAb； $494 \pm 105 \mu\text{m}/\text{秒}$ ）、 $440 \pm 95 \mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った。したがって、抗P-セレクチン抗体は、内皮細胞とのT細胞相互作用のプリナツモマブ誘導性の増加を妨げた（図13）。

40

【0188】

ヒスタミンで予備刺激したHBMECと組み合わせてPPSについて上記で詳述されたように、この流動系を同様に使用して、AMG 103誘導性の非刺激HBMECとのT細胞相互作用に対する抗CD11a抗体の妨害を解析した。この目的のために、ローリングおよび接着実験の前に、新たに単離されたT細胞を、RPMI 1640培地中の5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ マウス抗ヒトCD11a抗体（#217640

50

、Calbiochem)と共に37℃で10分間インキュベートした。

【0189】

平均T細胞ローリング速度のブリナツモマブ誘導性の低下に及ぼす抗CD11a抗体の影響を、長期条件下で評価した。AMG 103は、10 ng/mlブリナツモマブを流動系に添加してから10分後に、HBMEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを304 \pm 40 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (-AMG 103) から214 \pm 44 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (+AMG 103) まで有意に低下させたのに対して、この実験に抗CD11a抗体をさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような(すなわち、-AMG 103、+抗CD11a Ab; 278 \pm 48 $\mu\text{m}/\text{秒}$)、261 \pm 56 $\mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った。したがって、抗CD11a抗体は、内皮細胞とのT細胞相互作用のブリナツモマブ誘導性の増加を妨げた(図14)。

10

【0190】

ヒスタミンで予備刺激したHBMECと組み合わせてPPSについて上記で詳述されたように、この流動系を同様に使用して、AMG 103誘導性の非刺激HBMECとのT細胞相互作用に対する抗CD162抗体の妨害を解析した。この目的のために、ローリングおよび接着実験の前に、新たに単離されたT細胞を、RPMI 1640培地中の10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ マウス抗ヒトCD162抗体(#ab78188、abcam)と共に37℃で10分間インキュベートした。あるいは、T細胞を抗CD162抗体と共にインキュベートする代わりに、ローリングおよび接着実験の前に、T細胞をRPMI 1640培地中の10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ マウスアイソタイプ対照抗体(IgG1、; MOPC-21; #M5284、Sigma-Aldrich)と共に37℃で10分間インキュベートした。平均T細胞ローリング速度のブリナツモマブ誘導性の低下に及ぼす抗CD162抗体の影響を、長期条件下で評価した。AMG 103は、10 ng/mlブリナツモマブを流動系に添加してから45分後に、HBMEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを539 \pm 149 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (-AMG 103) から428 \pm 89 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (+AMG 103) まで有意に低下させたのに対して、この実験に抗CD162抗体をさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような(すなわち、-AMG 103、+抗CD162 Ab; 528 \pm 170 $\mu\text{m}/\text{秒}$)、637 \pm 191 $\mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った。対照的に、AMG 103の存在下でのアイソタイプ対照抗体の添加は、258 \pm 65 $\mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDをもたらした(+AMG 103、+マウスIgG1、)。抗CD162抗体について観察されたように、平均T細胞ローリング速度のAMG103誘導性の低下を復帰させることはなかった。したがって、抗CD162抗体は、CD162のP-セレクトリンへの結合を選択的に妨害することによって、内皮細胞とのT細胞相互作用のブリナツモマブ誘導性の増加を特異的に妨げた。この防止は、非特異的なマウスアイソタイプ対照抗体によって誘導されなかった(図15)。

20

30

【0191】

ヒスタミンで予備刺激したHBMECと組み合わせてPPSについて上記で詳述されたように、この流動系を同様に使用して、AMG 103誘導性の非刺激HBMECとのT細胞相互作用に対する組換えP-セレクトリンの妨害を解析した。この目的のために、ローリングおよび接着実験の前に、新たに単離されたT細胞を、RPMI 1640培地中の5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 組換えヒトP-セレクトリン(#ADP3-050、R&D Systems)と共に37℃で15分間インキュベートした。

【0192】

平均T細胞ローリング速度のブリナツモマブ誘導性の低下に及ぼす組換えP-セレクトリンの影響を、長期条件下で評価した。AMG 103は、10 ng/mlブリナツモマブを流動系に添加してから45分後に、HBMEC上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを386 \pm 77 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (-AMG 103) から340 \pm 68 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (+AMG 103) まで有意に低下させたのに対して、この実験に組換えP-セレクトリンをさらに添加すると、この低下は、AMG 103の非存在下でも観察されたような(すなわち、-AMG 103、+rec. P-セレクトリン; 384 \pm 70 $\mu\text{m}/\text{秒}$)、402 \pm 93 $\mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで戻った。したがって、組換えP-セレクトリンは、内皮細胞とのT細胞相互作用のブリナツモマブ誘導性の増加を妨げた(図16)。

40

【0193】

実施例3: CNS AEを緩和するための抗白血球接着の原理に従う同時薬物療法の用量および

50

スケジュール

ヒトでの使用のためのブリナツモマブ処置との静脈内PPS同時薬物療法の投与スケジュール

患者は、ブリナツモマブの注入開始および任意の用量ステップの3時間 ± 30分前に、PPSの100 mgボラス注入を受ける。ボラス注入の直後から、PPSの静脈内投与をperfusorにより300 mg/日で72時間にわたって継続する。

【0194】

ヒトでの使用のためのブリナツモマブ処置との経口PPS同時薬物療法の投与スケジュール

患者は、ブリナツモマブの注入開始および任意の用量ステップの7日前に開始して、1日当たり300 mg（例えば、3x100 mg）を3回として、900 mg PPSの経口投与を毎日受ける。900 mg PPSの毎日の経口投与は、ブリナツモマブの注入開始および任意の用量ステップ後の72時間にわたって継続する。

【0195】

ヒトでの使用のためのブリナツモマブ処置との静脈内ミノサイクリン同時薬物療法の投与スケジュール

患者は、ブリナツモマブの注入開始および任意の用量ステップの48時間、24時間、および3時間 ± 30分前、ならびに24時間、48時間、および72時間後に、短期静脈内注入により10 mg/kgミノサイクリンを受ける。

【0196】

ヒトでの使用のためのブリナツモマブ処置との経口ミノサイクリン同時薬物療法の投与スケジュール

患者は、ブリナツモマブの注入開始および任意の用量ステップの48時間、24時間、および3時間 ± 30分前、ならびに24時間、48時間、および72時間後に、700 mgミノサイクリンの経口投与を1日に1回受ける。

【0197】

ヒトでの使用のためのブリナツモマブ処置との静脈内ナタリズマブ同時薬物療法の投与スケジュール

患者は、ブリナツモマブの注入開始および任意の用量ステップの24時間前に、短期静脈内注入により300 mgナタリズマブを受ける。

【0198】

実施例4：組換え接着分子を用いたインビトロフローチャンバー系

組換えタンパク質のコーティング

組換えタンパク質（rhICAM-1 #ADP4-050、rhVCAM-1 #ADP5-050、またはrhP-セ렉チン #ADP3-050、R&D Systems）を、製造業者の説明書に従ってddH₂O中に溶解した。ローリング実験の前に、組換えタンパク質を、Ca²⁺およびMg²⁺を含むダルベッコPBS（#L1815、Biochrom）で希釈し、マイクロスライドVI^{0.4} Luer ibiTreat（#80606、ibidi）上に4で一晩コーティングした。使用前に、スライドをダルベッコPBSで3回洗浄し、記載がある場合には、PBS中の20% FBS（#10270、Gibco）で室温にて2時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を、補充物を含まないRPMI 1640培地（#FG1215、Biochrom）と交換した。

【0199】

ヒトT細胞の単離および培養

血液からのヒト末梢血単核細胞（PBMC）およびT細胞の単離および特徴付けは、実施例2（p.48、1～31）に記載された通りに行った。

【0200】

Jurkat E6.1 T細胞（#88042803、European Collection of Cell Cultures）は、10% FBS（#10270、Gibco）およびペニシリン/ストレプトマイシン（#A2213、Biochrom）を含むRPMI 1640培地（#FG1215、Biochrom）中で37 °Cおよび5% CO₂において増殖させた。

【0201】

新たに単離されたT細胞を用いたローリング実験のため、実験の開始（t = 0分；10 ng/mlブリナツモマブ（AMG 103）の添加）時に、これらの細胞を1x10⁶個細胞/mlの最終濃度

10

20

30

40

50

となるように、補充物を含まないRPMI 1640培地（#FG1215、Biochrom）中に再懸濁し、37
および5% CO₂で35分間インキュベートした。次に細胞を、流体ユニットおよびマイクロ
スライドの両方に接続した灌流セット「white」（#10963、ibidi）に満たし、45秒間の画
像シーケンスを、実施例2（p. 50、18～23）に記載された通りにt = 40分、45分、および
50分の時点で記録した。

【0202】

Jurkat E6.1 T細胞を用いたローリング実験のため、これらの細胞を1.5～3x10⁵個細胞
/mlの最終濃度となるように、補充物を含まないRPMI 1640培地（#FG1215、Biochrom）中
に再懸濁した。Jurkat E6.1 T細胞は、RPMI 1640培地中の0.5% FBSにおいて一晩かけて、
または補充物を含まないRPMI 1640培地中で40分間かけて飢餓状態にしてから、10 ng/ml
ブリナツモマブ（AMG 103）を添加した（t = 0分）。細胞を37 および5% CO₂で35分間イン
キュベートし、次いで、流体ユニットおよびマイクロスライドの両方に接続した灌流セ
ット「白色」（#10963、ibidi）に満たした。45秒間の画像シーケンスを、実施例2（p. 5
0、18～23）に記載された通りにt = 40分、45分、および50分の時点で記録した。

【0203】

ヒトT細胞と、T細胞シグナル伝達の阻害剤とのインキュベーション

AMG 103誘導性の接着効果を妨害するため、T細胞を、T細胞受容体複合体からのシグナ
ル伝達を特異的に遮断するSrcキナーゼ阻害剤と共にプレインキュベートした。この目的
のために、阻害剤PP2（#529576、Merck、15 μ）またはその媒体対照DMSO（#D2650、Sig
ma-Aldrich）をT細胞懸濁液（RPMI 1640培地中の1x10⁶個細胞/ml）に添加し、次いで37
 および5% CO₂で40分間インキュベートしてから、10 ng/mlブリナツモマブ（AMG 103）
を添加した（t = 0分）。

【0204】

流動条件下でのヒトT細胞と組換え接着分子との相互作用：ローリング実験のためのアッ
セイ設定、データの取得および解析

上記のような新たに単離したヒトT細胞またはJurkat E6.1 T細胞、および様々な組換え
タンパク質をコーティングしたマイクロスライドVI^{0.4} Luer ibiTreat（#80606、ibidi
）を用いて、既定の流体力学的流動条件下での実験を行った。アッセイ設定は、実施例2
（p. 49、23～37）に詳細に記載された。T細胞ローリング実験は、1.1 dyn/cm²の剪断応
力で行った。組換えタンパク質とのT細胞相互作用を上記のように記録し、実施例2（p. 5
0、23～30）に詳細に記載された通りにデータを解析した。

【0205】

統計データ解析

いくつかのグループのデータを比較するのに応じて、独立t検定、またはチューキーの
事後検定と組み合わせた一元配置ANOVAを用いて、Prism（GraphPad Software）で統計学
的有意性を解析した。P値 < 0.05を統計学的に有意と見なした。値はすべて、平均値 ±
SDとして示す。

【0206】

10 ng/mlブリナツモマブと共にインキュベートした、新たに単離されたT細胞（+AMG 10
3）は、陰性対照（-AMG）と比較した場合に、半短期条件下で、t = 45分の時点で組換え
ヒトICAM-1（12.5 μg/mlでコーティング、ブロッッキングあり；-AMG 103：383 ± 144 μm
/秒 対 +AMG 103：314 ± 79 μm/秒）上で、組換えヒトVCAM-1（10 μg/mlでコーティン
グ、ブロッッキングあり；-AMG 103：418 ± 136 μm/秒 対 +AMG 103：353 ± 72 μm/秒
）上で、およびt = 50分の時点で組換えヒトP-セレクチン（20 μg/mlでコーティング、ブ
ロッッキングあり；-AMG 103：402 ± 115 μm/秒 対 +AMG 103：293 ± 73 μm/秒）上で
、有意に低下した平均T細胞ローリング速度 ± SDを示した（図17A～C）。

【0207】

10 ng/mlブリナツモマブと共にインキュベートしたJurkat E6.1 T細胞（+AMG 103）は
、陰性対照（-AMG）と比較した場合に、半短期条件下で、t = 45分の時点で組換えヒトIC
AM-1 / VCAM-1（それぞれ12.5および10 μg/mlでコーティング；-AMG 103：640 ± 91 μm

/秒 対 +AMG 103 : 518 \pm 98 $\mu\text{m}/\text{秒}$) 上で、および組換えヒトP-セレクチン (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でコーティング ; -AMG 103 : 500 \pm 81 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 対 +AMG 103 : 413 \pm 104 $\mu\text{m}/\text{秒}$) 上で、有意に低下した平均T細胞ローリング速度 \pm SDを示した (図17D、E)。

【0208】

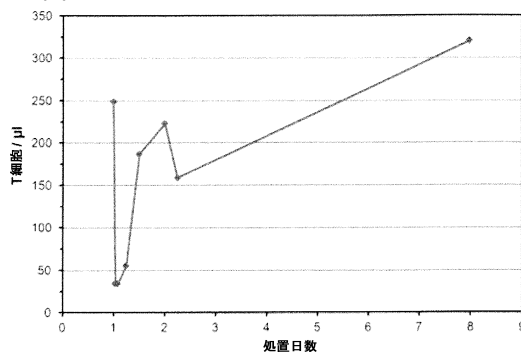
したがって、ブリナツモマブはまた、新たに単離されたT細胞および一般的なT細胞株の両方について、組換えヒト接着分子とのT細胞相互作用を増加させる。

【0209】

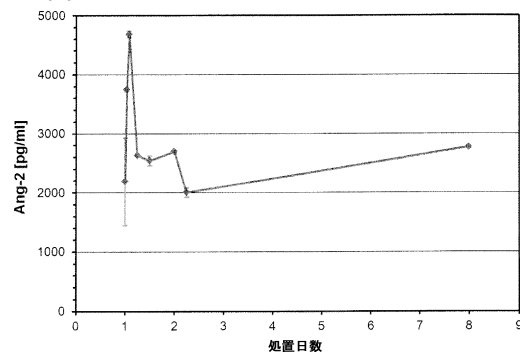
平均T細胞ローリング速度のブリナツモマブ誘導性の低下に及ぼすSrcキナーゼ阻害剤PP2の影響を、半短期条件下で評価した。媒体対照DMSOの存在下におけるAMG 103は、10 ng/mlブリナツモマブの添加後t = 40分の時点で、VCAM-1コーティングマイクロスライド (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でコーティング) 上での平均T細胞ローリング速度 \pm SDを259 \pm 35 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (-AMG 103) から205 \pm 45 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (+AMG 103) まで有意に低下させたのに対して、この実験における15 μM PP2のプレインキュベーションおよび存在は、この低下を256 \pm 50 $\mu\text{m}/\text{秒}$ という平均T細胞ローリング速度 \pm SDにまで復帰させた。AMG 103の非存在下におけるPP2処理は、267 \pm 66 $\mu\text{m}/\text{秒}$ という匹敵する平均T細胞ローリング速度 \pm SDをもたらした (-AMG103、+PP2)。したがって、Srcキナーゼ阻害剤PP2は、組換えヒトVCAM-1とのT細胞相互作用のブリナツモマブ誘導性の増加を妨げた (図18)。

10

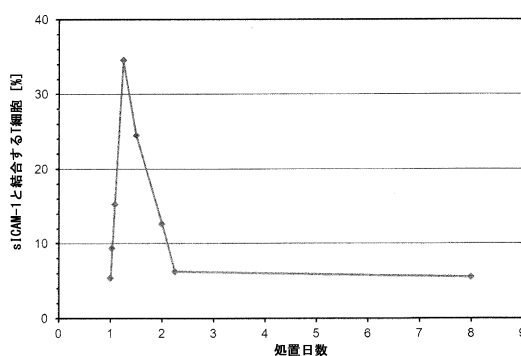
【図1A】



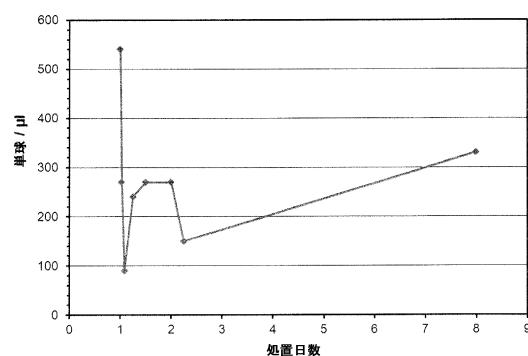
【図1C】



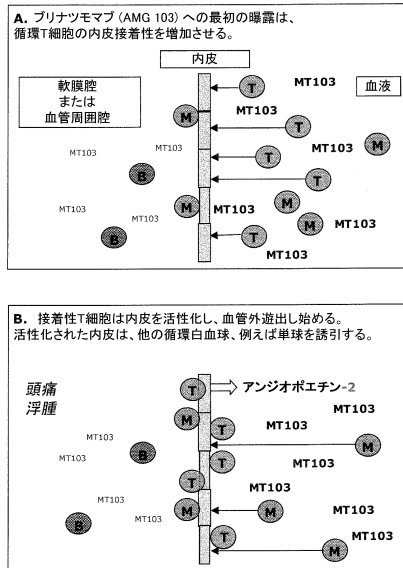
【図1B】



【図1D】

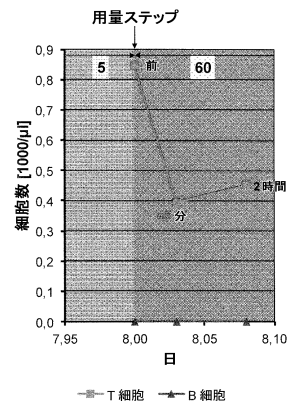


【図 2】

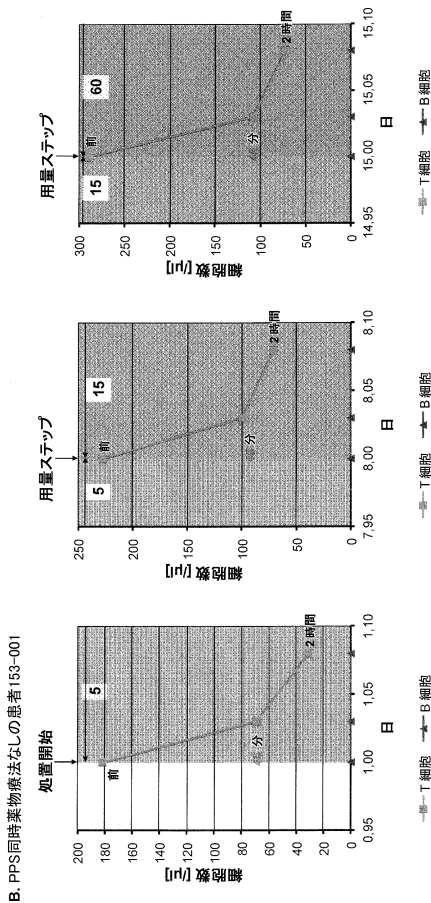


【図 3 - 1】

PPS同時薬物療法なしの患者:
A. 患者109-026

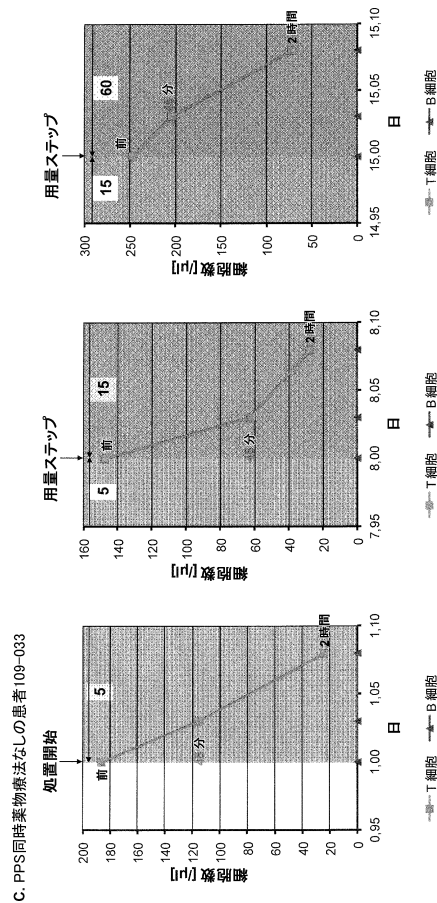


【図 3 - 2】



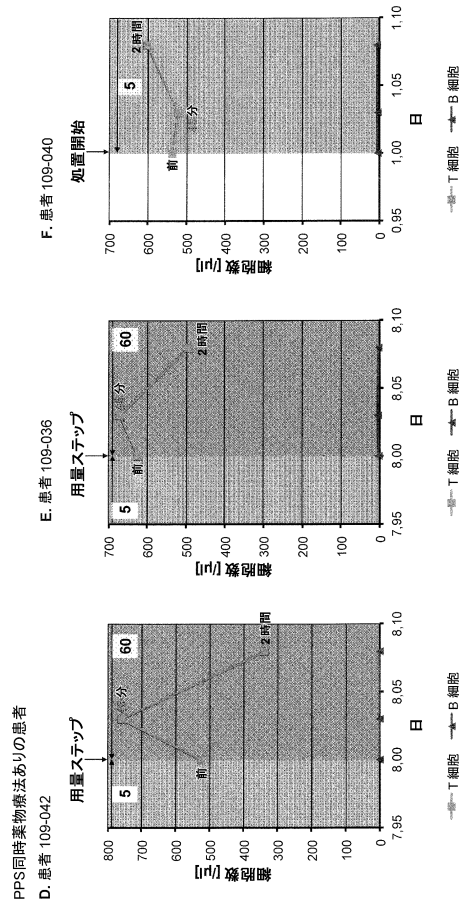
B. PPS同時薬物療法なしの患者153-001

【図 3 - 3】

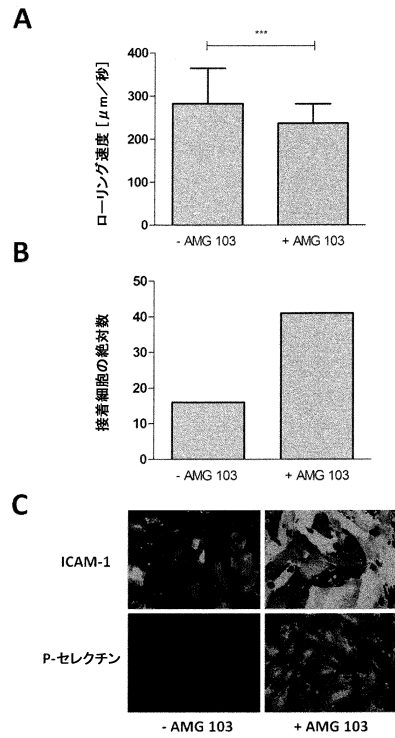


C. PPS同時薬物療法なしの患者109-033

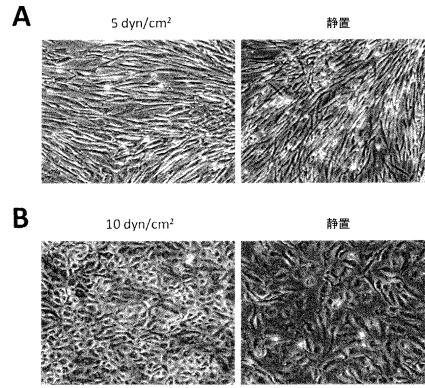
【図 3 - 4】



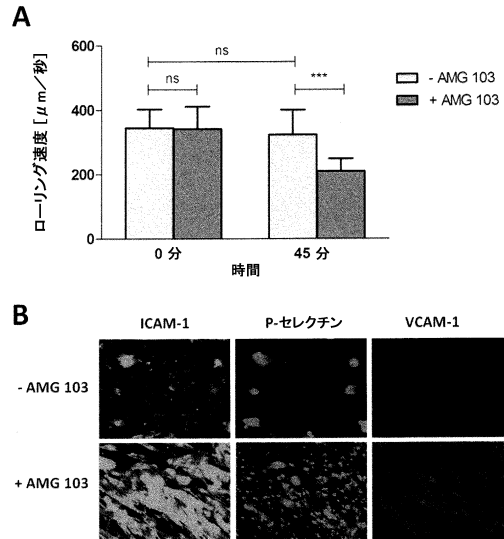
【図 5】



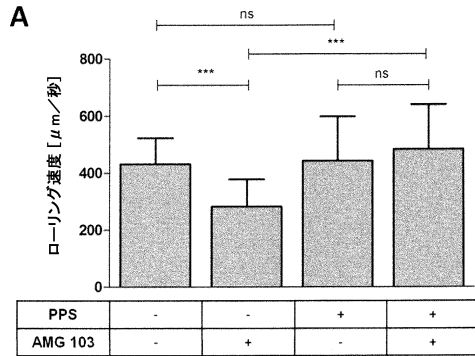
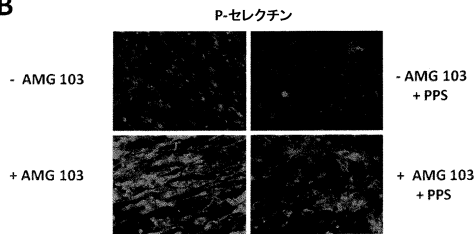
【図 4】



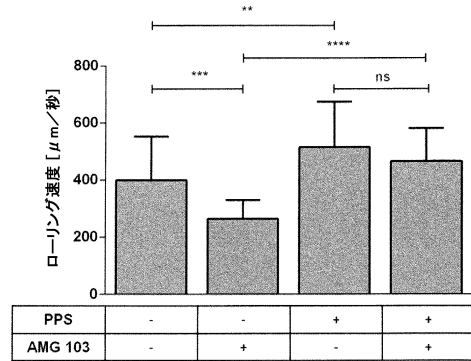
【図 6】



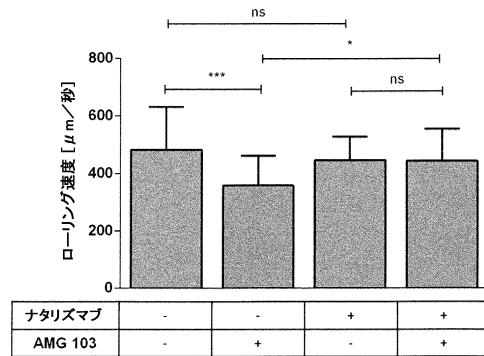
【図 7】

**B**

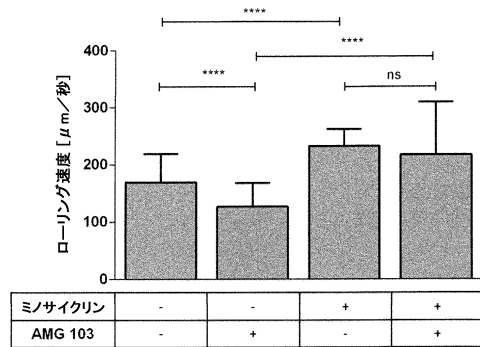
【図 8】



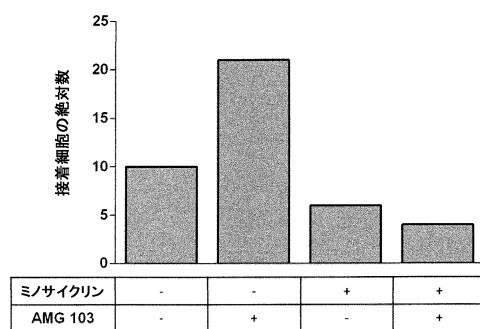
【図 9】



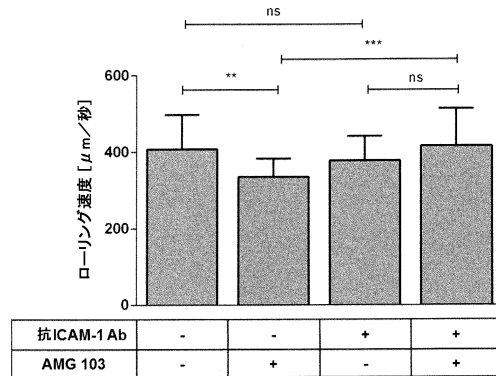
【図 10】



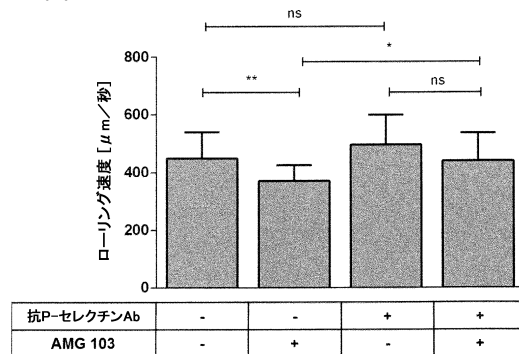
【図 11】



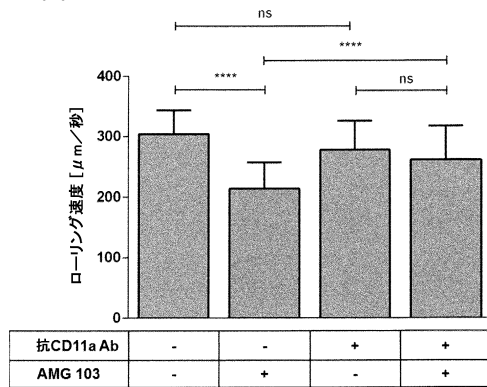
【図 12】



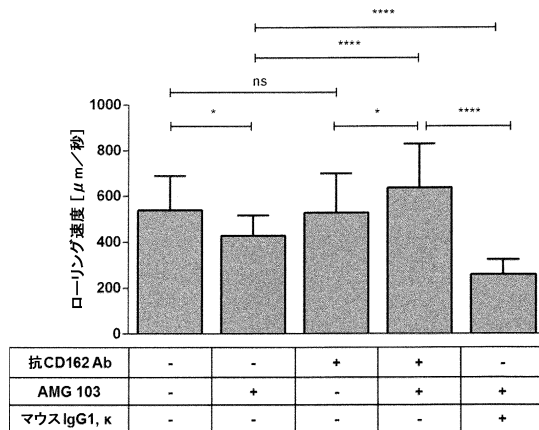
【図 13】



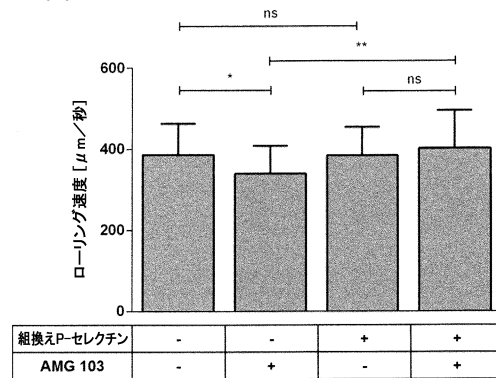
【図 14】



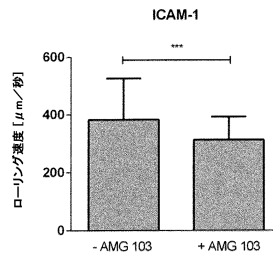
【図 15】



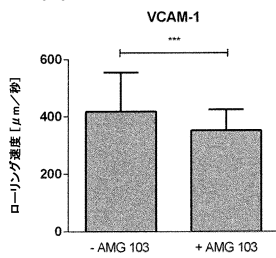
【図 16】



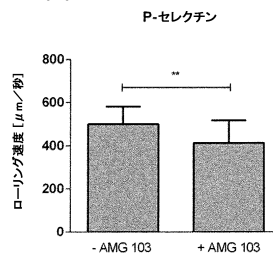
【図 17 A】



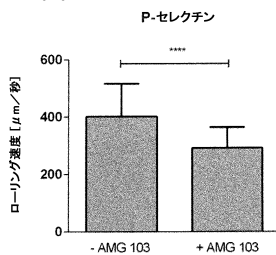
【図 17 B】



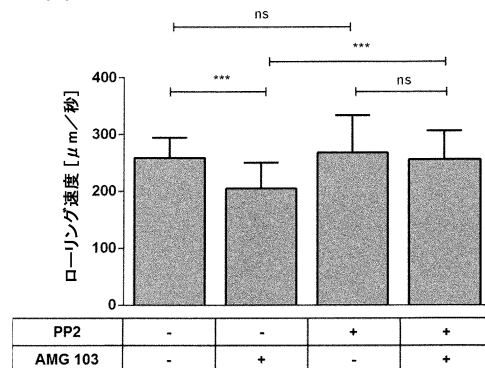
【図 17 E】



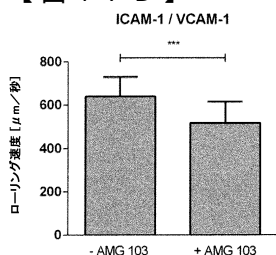
【図 17 C】



【図 18】



【図 17 D】



【配列表】

0006567425000001.app

フロントページの続き

前置審査

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 クファー ベーター
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン シュタッフエルゼーシュトラッセ 2 アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー内
- (72)発明者 クリンガー マティアス
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン シュタッフエルゼーシュトラッセ 2 アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー内
- (72)発明者 ホフマン パトリック
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン シュタッフエルゼーシュトラッセ 2 アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー内
- (72)発明者 ネーグレ ヴィルギニー
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン シュタッフエルゼーシュトラッセ 2 アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー内
- (72)発明者 ドブファー エレーヌ - パシュパティ
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン シュタッフエルゼーシュトラッセ 2 アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー内
- (72)発明者 ナゴルゼン ディルク
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン シュタッフエルゼーシュトラッセ 2 アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー内
- (72)発明者 シェーレ ユルゲン
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン シュタッフエルゼーシュトラッセ 2 アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー内
- (72)発明者 ツグマイヤー ゲアハルト
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン シュタッフエルゼーシュトラッセ 2 アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー内

審査官 新熊 忠信

- (56)参考文献 特表平08-500826(JP,A)
特表2010-535776(JP,A)
特開2012-067139(JP,A)
特表2011-530502(JP,A)
特表2012-504403(JP,A)

国際公開第2011/051307(WO, A1)

特開2002-154972(JP, A)

国際公開第2012/062596(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00 - 33/44

A61K 39/00 - 39/44

A61P 25/00

A61P 43/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)CAplus/R

EGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)