

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7458318号  
(P7458318)

(45)発行日 令和6年3月29日(2024.3.29)

(24)登録日 令和6年3月21日(2024.3.21)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 35/13 (2015.01)	A 6 1 K 35/13	
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
請求項の数 26 (全47頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-542989(P2020-542989)	(73)特許権者	500545311
(86)(22)出願日	平成31年2月11日(2019.2.11)		ハダシット メディカル リサーチ サー
(65)公表番号	特表2021-516668(P2021-516668 A)		ビシーズ アンド ディベロップメント
(43)公表日	令和3年7月8日(2021.7.8)		リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/IL2019/050163		Hadasit Medical Res
(87)国際公開番号	WO2019/155474		earch Services and
(87)国際公開日	令和1年8月15日(2019.8.15)		Development Ltd.
審査請求日	令和4年2月10日(2022.2.10)		イスラエル国 エルサレム ピー.オー.
(31)優先権主張番号	62/629,129		ボックス 12000 ハダサー イン
(32)優先日	平成30年2月12日(2018.2.12)		ケレム メディカル センター エルサレム
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		バイオパーク
			Jerusalem BioPark,
			Hadassah Ein Kerem
			Medical Center, P.O
			.B. 12000 Jerusalem
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌治療のための S L A M F 6 スプライズバリエントの調節

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌または感染症疾患を治療するための細胞組成物であって、ヒト S L A M F 6 のアミノ酸 17 ~ 65 の選択的欠失を特徴とする S L A M F 6 スプライズバリエント ( S L A M F 6 v a r 3 ) を他のヒト S L A M F 6 スプライズバリエントよりも優先的に発現するように操作された細胞集団を含み、

前記細胞集団は T 細胞集団、腫瘍細胞集団、または樹状細胞 ( D C ) 集団である、細胞組成物。

【請求項 2】

養子移入 T 細胞組成物、腫瘍細胞ワクチンおよび D C ワクチンからなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記細胞集団はヒト T 細胞集団であり、前記組成物は養子移入 T 細胞組成物である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記細胞集団はヒト腫瘍細胞集団であり、前記組成物は腫瘍細胞ワクチンである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記細胞集団はヒトDC集団であり、前記組成物はDCワクチンである、請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

前記細胞集団は、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている、請求項2～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記細胞集団は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作されている、請求項2～7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

前記細胞集団は、SLAMF6<sup>var3</sup>を外因的に発現するように操作されている、請求項2～7のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項10】

癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療における使用のための請求項2～9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項11】

前記細胞集団はヒトT細胞集団であり、前記組成物は養子移入T細胞組成物であり、前記T細胞は、自家性であるか、または前記対象と組織適合性の同種T細胞である、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】

前記T細胞は、前記対象のエキスピボT細胞、または前記対象と組織適合性のあるドナーのエキスピボT細胞を調節して、SLAMF6<sup>var3</sup>を他のヒトSLAMF6スプライスバリエーションよりも優先的に発現させることと、得られたT細胞を癌治療のための養子移入組成物として配合することと、を含む方法によって生成されている、請求項11に記載の組成物。

20

【請求項13】

前記T細胞は、単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインとのインキュベーションによってさらに増殖および/または活性化されている、請求項11または12に記載の組成物。

【請求項14】

前記細胞集団はヒト腫瘍細胞集団であり、前記組成物は腫瘍細胞ワクチンである、請求項10に記載の組成物。

30

【請求項15】

前記腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

前記細胞集団はDC集団であり、前記組成物はDCワクチンである、請求項10に記載の組成物。

【請求項17】

癌または感染症疾患を治療するための細胞組成物を生成する方法であって、

a) T細胞、腫瘍細胞およびDCからなる群から選択される細胞集団を得ることと、  
b) 前記細胞をエキスピボで調節して、ヒトSLAMF6のアミノ酸17～65の選択的欠失を特徴とするSLAMF6スプライスバリエーション(SLAMF6<sup>var3</sup>)を他のヒトSLAMF6スプライスバリエーションよりも優先的に発現させることと、  
を含む、方法。

40

【請求項18】

癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療における使用のための医薬組成物であって、単離された、ヒトSLAMF6のアミノ酸17～65の選択的欠失を特徴とするSLAMF6スプライスバリエーション(SLAMF6<sup>var3</sup>)のエクストドメインを含む、医薬組成物。

【請求項19】

前記使用は、前記対象の癌を治療するのに有効な量での前記対象への投与を含む、請求

50

項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記使用は、前記対象の T 細胞を、前記 T 細胞を増殖および/または活性化するのに有効な量の前記単離されたヒト S L A M F 6<sup>var3</sup> エクトドメインとエクスピボで接触させることと、得られた T 細胞を前記対象に養子移入し、それによって前記対象の癌を治療することと、を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

その N 末端でヒト S L A M F 6<sup>var1</sup> のシグナルペプチドに融合されている、単離された、ヒト S L A M F 6 のアミノ酸 17 ~ 65 の選択的欠失を特徴とする S L A M F 6 スプライズバリエーション ( S L A M F 6<sup>var3</sup> ) のエクトドメインを含む、キメラポリペプチド前駆体であって、

前記シグナルペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸の 1 ~ 21 に対応する、キメラポリペプチド前駆体。

【請求項 22】

配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 21 に記載のポリペプチド前駆体。

【請求項 23】

配列番号 19 に示されるポリヌクレオチドによってコードされる、請求項 21 に記載のポリペプチド前駆体。

【請求項 24】

請求項 21 に記載のポリペプチド前駆体をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 25】

請求項 21 に記載のポリペプチド前駆体を哺乳動物発現系で発現させることと、得られたエクトドメインポリペプチドを単離することと、を含むプロセスによって作製される、単離されたヒト S L A M F 6<sup>var3</sup> エクトドメイン。

【請求項 26】

癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療における使用のための医薬組成物であって、請求項 25 に記載の単離されたヒト S L A M F 6<sup>var3</sup> エクトドメインを含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌免疫療法、特に、S L A M F 6 スプライズバリエーションの発現および/または活性の差次的調節を含む改善された治療モダリティに関する。

【背景技術】

【0002】

S L A M (シグナル伝達リンパ球活性化分子)ファミリーの受容体は、造血起源の細胞で発現する免疫調節に参与する同型結合分子の典型である。S L A Mファミリータンパク質は、免疫グロブリン ( I g ) スーパーファミリーの C D 2 サブグループのメンバーである。NK - T B 抗原 ( N T B - A )、C D 3 5 2、L y - 1 0 8、S F 2 0 0 0 および K A L I としても知られる S L A Mファミリーメンバー 6 ( S L A M F 6 ) は、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞、T 細胞および B 細胞で発現する I 型膜貫通タンパク質である。S L A M F 6 は、受容体複合体に S L A M 関連タンパク質 ( S A P ) およびさらなるアダプタータンパク質を動員することによって媒介される同型相互作用を示す。

【0003】

ヒト S L A M F 6 遺伝子は、S L A M F 6 ポリペプチドをコードする 8 エクソン m R N A に転写される。しかしながら、特定のインフレーム配列の欠失を特徴とする追加の S L A M F 6 アイソフォーム ( O t a e t a l , N a t u r e G e n e t i c s 3 6 , 4 0 - 4 5 ( 2 0 0 4 ) ) の存在が示唆されている。別途指示されない限り、また特定のアイソフォームの同定を伴わない限り、本明細書で使用される「S L A M F 6」および「

10

20

30

40

50

NTB-A」という用語は、古典的SLAMF6（本明細書ではSLAMF6アイソフォーム1、バリエーション1またはSLAMF6<sup>var1</sup>とも称される）を指す。

【0004】

SLAMF6は、2つの細胞外Ig様ドメインおよび3つの細胞質チロシンベースのシグナル伝達モチーフを含み、これらのうちの1つは従来の免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフに含まれる。ヒトT細胞上のSLAMF6の会合は、CD28共刺激経路に取って代わり、Th1表現型への分極を誘導することができる。しかしながら、Ly-108ノックアウトマウス（マウスSLAMF6オルソログ）からのCD4陽性T細胞は、IL-4産生において障害を示し、Th2分極におけるSLAMF6の役割が示唆される。この矛盾の理由は完全には解明されていない。ヒトNK細胞上のSLAMF6の活性化は、細胞傷害性および増殖、ならびにIFN- およびTNF- 産生も刺激する。

10

【0005】

Valdez et al. (J Biol Chem 2004, 279(18), pp. 18662-18669)は、SLAMF6が同型相互作用によりT細胞を活性化し、Th1の特性を特異的に増強することを教示している。NTB-Aの最初の226アミノ酸をマウスIgG1のFc部分に融合することにより作製されるNTB-A-Fc融合タンパク質は、Th1型サイトカインによって一般的に誘導されるB細胞アイソタイプスイッチングを阻害することが見いだされ、Th1依存性自己免疫疾患（EAEモデル）を阻害した。したがって、報告されたNTB-A融合タンパク質は、Valdezらによって報告された実験系でSLAMF6アンタゴニストとして作用することが分かった。

20

【0006】

ValdezらへのUS2009/017014は、PRO20080ポリペプチド（古典的SLAMF6のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する）、その細胞外部分、そのホモログ、アゴニストおよびアンタゴニストを対象としており、それらは免疫疾患の推定上の調節因子として示唆されている。'014刊行物は、癌の治療のための免疫アジュバント療法においてそこに開示される特定の免疫刺激化合物の使用を示唆している。

【0007】

Uzana et al. (J Immunol 2012, 188, pp. 632-640)は、特異的抗体による抗原提示細胞（APC）上でのSLAMF6遮断が、CD8<sup>+</sup>リンパ球からのサイトカイン分泌を阻害したことを開示している。この刊行物は、抗癌免疫療法を改善するための潜在的な標的として古典的SLAMF6を示唆しているが、CD28等の他の共刺激受容体をアゴニスト抗体で標的化する類似のアプローチが臨床試験において致命的転帰で終了したため、このアプローチに関連する実験的調査を正当化するべきであると考えられる。

30

【0008】

SLAMF6は特定の造血器腫瘍で発現するため、この抗原を異常に発現する腫瘍に対して抗腫瘍免疫応答を誘導するように、この分子に由来するペプチドエピトープを使用したワクチン接種が提案されている。例えば、WO2006/037421は、ヒト腫瘍細胞株のHLAクラスII分子に由来する338のペプチド配列を開示しており、それらは抗腫瘍免疫応答を誘発するためのワクチン組成物に使用することができる。これらの配列の中には、SLAMF6の103~118位に対応する16アミノ酸ペプチドがある。さらに、これらのエピトープに抗体またはその免疫毒素複合体を標的化させることが示唆されている。例えば、US2011/171204は、抗NTB-A抗体およびその抗原結合断片、ならびにNTB-Aに結合して、NTB-Aの発現を特徴とする血液悪性腫瘍等の疾患を治療するためにそれらを使用する方法を開示している。NTB-Aに対するさらなる抗体は、例えばKrover et al. (British Journal of Haematology 2007, 137, pp. 307-318)によって記載されている。これらの抗体は、NTB-Aを発現するリンパ球に細胞傷害効果を発揮し、T細胞の増殖またはサイトカインの分泌には影響を与えなかった。

40

【0009】

50

EP 2083088は、とりわけSLAMF6からなる群から選択される遺伝子の発現産物のレベルを調節することを含む、患者の癌を治療するための方法を開示しており、癌は、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌からなる群から選択される。この刊行物は、該方法が前記遺伝子の過剰発現を特徴とする患者を治療するのに有用であることを開示している。

【0010】

WO 03/008449は、NTB-Aポリペプチド、それをコードする核酸分子およびその使用に関する。この刊行物はまた、NTB-Aの活性をインビトロ、エクスピボまたはインビボで調節することによりNK細胞活性を調節する方法、およびNTB-Aもしくはその断片、またはそれをコードする核酸、または前記ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞を使用して活性化化合物をスクリーニングする方法にも関する。対象における免疫機能を調節するための薬物の調製における、NTB-Aポリペプチドの活性を調節する化合物の使用がさらに開示される。

10

【0011】

Snowら(J. Clin. Invest. 2009, 119, pp. 2976-2989; Immunol Rev. 2010, 236, pp. 68-82)は、健康なドナーおよびX連鎖リンパ増殖性疾患(XLP、稀な先天性免疫不全症)患者から得られたT細胞の再刺激誘発性細胞死(RICD)の調節における、NTB-Aとその下流エフェクターSAPの役割を検討した。この刊行物は、正常なドナーT細胞において、NTB-AがTCR誘導アポトーシスに積極的に関与し、かつ必要であると報告している。対照的に、XLP患者では、NTB-AがXLP T細胞においてRICD耐性に寄与することが分かっているため、この現象は逆行する。

20

【0012】

本発明者らの一部に対するWO 2015/104711は、癌患者の治療のため、感受性患者の血球減少症を予防および治療するため、ならびに養子細胞療法のための改善されたT細胞組成物のエクスピボ調製のための、可溶性NTB-Aポリペプチドまたはそのアゴニストの使用を開示している。具体的には、WO '711は、特に、実質的なNTB-A表面発現の欠如を特徴とする腫瘍、固形腫瘍、およびCD137の表面発現を特徴とする腫瘍の塗料における、単離されたNTB-Aエクトドメインもしくはそのアゴニストの対象への投与、またはT細胞と単離されたNTB-Aエクトドメインもしくはそのアゴニストとのインキュベーションを開示している。WO '711の実施例に開示されているNTB-Aの配列は、古典的ヒトSLAMF6の配列に対応している。

30

【0013】

本発明者らの一部であるEisenbergら(Cancer Immunol Res; 6(2)2018)は、CD8<sup>+</sup>T細胞エフェクター機能および抗メラノーマ活性に関する古典的ヒトSLAMF6エクトドメインの203アミノ酸配列(C-末端、ノボプロテイン)を使用して行われた実験をさらに記載している。

【0014】

異なる細胞および異なる臨床環境または実験環境で同定されているSLAMF6の様々な生物学的効果のために、それは免疫調節との関連において活性化または阻害効果のいずれかを発揮することができる二重受容体として特徴付けられている。完全には解明されていないものの、マウスモデルにおける実験に基づくと、応答の方向はSLAMF6の細胞内チロシンスイッチモチーフ(ITSM)に起因している(Keszei et al., J. Exp. Med. 2011, 208(4): 811-822)。

40

【0015】

癌の発生に対する不均衡な選択的スプライシングの寄与、および腫瘍形成性アイソフォームの形成に関して、多くの情報が蓄積されている(Kozlovski, I., et al., Hum Genet, 2017, 136(9): p. 1113-1127)。選択的スプライシングは癌に特有のものではなく、遺伝子の90%以上がこのプロセスを経

50

験する。免疫受容体も例外ではなく、最もよく認識されている例は膜貫通タンパク質 CD 45 であり、そのスプライスされたアイソフォームは活性化された T 細胞からナイーブ細胞を区別する (Oberdoerfer, S., et al., Science, 2008, 321 (5889): p. 686 - 91)。他の免疫調節受容体に関しては、それらの Ig 可変ドメインをコードするエクソン 2 の欠落は、全ての Ig SF 受容体に共通である。驚くべきことに、機能的な結果はほとんど分かっていない。単一の研究は、古典的 CD 28 との非共有結合に起因して、2 番目のエクソンを欠く CD 28 アイソフォームが CD 28 媒介シグナル伝達を増強し、シグナル増幅器として機能することを示した (Hanawa, H., et al., Blood, 2002, 99 (6): p. 2138 - 45)。抗 CD 28 治療の悲惨な記録のために、この観察はこれ以上行われなかった。

10

## 【0016】

US 2014/0302070 は、エクソン 2 ドメインに位置する 42 ヌクレオチドのフレーム内欠失を含むヒト PD 1 のアイソフォーム (42 PD 1) に関連している。US '070 は、このアイソフォームが、PD-L1/PD-L2 に関与せず、炎症誘発性サイトカインの産生を誘導できることを開示しており、また、抗原特異的 CD 8<sup>+</sup> T 細胞免疫を増強するため、ならびに病原性感染症および/または癌の予防のための融合 DNA ワクチンを開発するための分子内アジュバントとしての使用を示唆している。US '070 はさらに、自己免疫疾患の治療標的としての可溶性 42 PD 1 タンパク質または中和抗体の使用を示唆している。

## 【0017】

20

マウス SLAMF6 (Ly-108) のアイソフォームが報告され、特徴付けされている (Keszei et al., 2011 (同所), Wu et al., Nat Immunol. 2016, Apr; 17 (4): 387 - 96)。選択的スプライシングの結果として、識別された 3 つの Ly-108 アイソフォームは、同一の細胞外ドメインを有するが、(とりわけ ITSM モチーフをコードする) エクソン 7 ~ 9 のうちの 1 つ以上の欠落のために細胞質の尾部が異なる。Ly-108 アイソフォームは、マウスの狼瘡関連自己免疫に対する感受性またはそれからの保護のいずれかに関連していることが判明した。しかしながら、抗腫瘍免疫との関連において Ly-108 アイソフォームの活性における差は見られなかった。むしろ、Wu らは、トランスフェクトされたアイソフォームに関係なく、NK 細胞における異なる Ly-108 アイソフォームの発現が非造血器腫瘍細胞株に対する応答性の向上をもたらしたと報告している。Wu らはまた、ヒト NK 細胞のゲノム編集による SLAMF6 ノックアウトにより、抗癌活性が低下したことも報告している。

30

## 【0018】

ヒト SLAMF6 では、(マウスにおいて検出および特徴付けされた) 細胞質尾部が変化した同等のアイソフォームは同定されなかった。むしろ、SLAMF6 バリエント 2 (SLAMF6<sup>var2</sup>) は、266 位の単一アラニン (細胞質尾部に対応する) の欠失によって古典的 SLAMF6 (SLAMF6<sup>var1</sup>) と異なり、SLAMF6 バリエント 3 (SLAMF6<sup>var3</sup>) は、エクソン 2 のアミノ酸 (aa) 17 ~ 65 (細胞外ドメインに対応する) を欠き、SLAMF6 バリエント 4 (SLAMF6<sup>var4</sup>) は、aa 17 ~ 128 をエンコードするエクソン 2 の大部分を欠いている。ヒト SLAMF6 の任意の意図的な選択的にスプライスされたバリエントの生物学的および臨床的重要性は、これまで説明または決定されていない。

40

## 【0019】

伝えられるところでは、癌免疫療法の進歩は患者の生存の増加に大きな影響を示したしかしながら、CTLA-4 または PD-1 標的化に基づくものを含むこれらの治療の部分的な有効性は、効果的な抗癌免疫応答を妨げる障壁を克服するためのさらなる解決策を見つける必要性を示している。効力および/または安全性が強化された免疫療法のための組成物および方法の開発に関する満たされていない必要性が存在する。

## 【発明の概要】

50

## 【0020】

本発明は、癌免疫療法、特に、SLAMF6 スプライスバリアントの発現および/または活性の調節を含む改善された治療様式モダリティに関する。より具体的には、本発明の実施形態は、養子T細胞移入療法、細胞ワクチンおよび/またはポリペプチドベースの薬物を含む、ヒト対象の癌治療のための組成物および方法を提供する。

## 【0021】

本発明は、様々なSLAMF6 アイソフォームが休止T細胞および活性化T細胞で同時に発現し、抗腫瘍免疫の観点から異なるおよび反対の生物学的効果さえも示すという驚くべき発見の一部に基づいている。具体的には、細胞外ドメインの配列をコードするエクソン2の一部を欠くヒトSLAMF6のスプライスバリアント、すなわちSLAMF6 バリアント3 (SLAMF6<sup>var3</sup>) がT細胞活性および抗腫瘍免疫に強力なアゴニスト効果を及ぼすことを、ここで初めて開示する。対照的に、古典的ヒトSLAMF6 (バリアント1、SLAMF6<sup>var1</sup>) を含む他のSLAMF6 バリアント、およびエクソン2のより大きな部分を欠くスプライスバリアント (バリアント4、SLAMF6<sup>var4</sup>) は、著しく弱いアゴニスト効果を発揮するか、または下方制御効果を媒介して、結果的に抗腫瘍免疫を低下させる。本発明はさらに、本明細書に記載されるように、単離されたヒトSLAMF6<sup>var3</sup> エクトドメインを含む卓越した抗癌活性を示す治療用組成物の開発の一部に基づいている。

10

## 【0022】

様々な実施形態によれば、本発明の組成物および方法は、治療される対象にSLAMF6 バリアント3 (SLAMF6<sup>VAR3</sup>) を標的とするT細胞刺激を提供するのに有用である (SLAMF6<sup>VAR3</sup> またはそのエクトドメインの会合または投与によってまたはそれを通して媒介される活性を提供する)。いくつかの実施形態において、SLAMF6<sup>VAR3</sup> を標的とする刺激は、後にさらに詳述するように、例えば、前記対象に、単離されたSLAMF6<sup>var3</sup> エクトドメイン、SLAMF6<sup>var3</sup> を標的とするT細胞刺激を増強するようにエキスピボでマニピュレートされたT細胞組成物、および/または、SLAMF6<sup>var3</sup> を選択的もしくは優先的に発現するように操作された細胞ワクチンを投与することによって提供されてもよい。いくつかの実施形態において、SLAMF6<sup>var3</sup> を標的とするT細胞刺激を提供することは、後にさらに詳述するように、古典的SLAMF6 (バリアント1、SLAMF6<sup>var1</sup>) の発現および/または活性を選択的もしくは優先的に阻害もしくは下方制御することを含む。

20

30

## 【0023】

一態様では、本発明は、SLAMF6<sup>var3</sup> を優先的に発現するように操作された細胞集団を含む治療用細胞組成物を提供する。

## 【0024】

本明細書で使用される場合、優先的 (または差次的) 発現は、マニピュレーション前のそれぞれの発現レベルと比較した相対的な発現レベルを指す。SLAMF6<sup>var3</sup> に関して、この用語はさらに、他のSLAMF6 バリアント、特にSLAMF6<sup>var1</sup> と比較した、その相対的な発現レベルを指す。したがって、一実施形態において、SLAMF6<sup>var3</sup> を優先的に発現する細胞 (例えば、T細胞) は、SLAMF6<sup>var3</sup> 発現を選択的に上方制御するように操作 (または別様にマニピュレート) されている。例えば、限定されないが、細胞 (例えば、T細胞) は、強力なまたは誘導可能なプロモーターにより調節される、SLAMF6<sup>var3</sup> をコードする核酸構築物でトランスフェクトまたは形質導入され得る。別の実施形態において、前記細胞 (例えば、T細胞) は、SLAMF6<sup>var1</sup> 発現を選択的に下方制御するように操作されている。様々な実施形態において、SLAMF6<sup>var1</sup> 発現を下方制御するのに適した方法は、アンチセンス、RNA干渉分子 (例えば、siRNA)、遺伝子編集構築物 (例えば、CRISPR-Cas9 ベースの構築物) 等を含むがこれらに限定されない核酸物質の使用を含み得る。これらの方法に従って使用するのに適した薬剤は、その発現を選択的に低下させるように、すなわち、SLAMF6<sup>var3</sup> 発現を同時に低下させることなく、SLAMF6<sup>var1</sup> に特有の領域を標的と

40

50

することを理解されたい。

【0025】

様々な実施形態において、SLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現するように操作された細胞集団を含む治療用細胞組成物は、養子移入T細胞組成物、腫瘍細胞ワクチンおよび樹状細胞(DC)ワクチンからなる群から選択される。一実施形態において、細胞集団はヒトT細胞集団であり、組成物は養子移入T細胞組成物である。別の実施形態において、細胞集団はヒト腫瘍細胞集団であり、細胞ワクチンは腫瘍細胞ワクチンである。特定の実施形態において、前記腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である。さらに別の実施形態において、細胞集団はヒトDC集団であり、細胞ワクチンはDCワクチンである。別の実施形態において、細胞集団は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作されている。別の実施形態において、細胞集団は、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。さらに別の実施形態において、細胞集団は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御し、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。別の実施形態において、細胞集団は、SLAMF6<sup>var3</sup>を外因的に発現するように操作されている。

10

【0026】

別の態様では、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための、本明細書に記載のSLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現するように操作された細胞集団を含む治療用細胞組成物が提供される。一実施形態において、細胞集団はヒトT細胞集団であり、前記組成物は養子移入T細胞組成物であり、前記T細胞は、自家性であるか、または前記対象と組織適合性の同種T細胞である。別の実施形態において、前記T細胞は、対象の、または前記対象と組織適合性のあるドナーのエキスピボT細胞を調節して、SLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現させることと、得られたT細胞を癌治療のための養子移入組成物として配合することと、を含む方法によって生成されている。別の実施形態において、前記T細胞は、単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインとのインキュベーションによってさらに増殖および/または活性化されている。別の実施形態において、細胞集団はヒト腫瘍細胞集団であり、細胞ワクチンは腫瘍細胞ワクチンである。別の実施形態において、腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である。別の実施形態において、細胞集団はDC集団であり、細胞ワクチンはDCワクチンである。

20

【0027】

別の態様では、SLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現するように操作されたT細胞を対象に投与することを含む、癌の治療を必要とするヒト対象の癌を治療するための方法が提供される。一実施形態において、T細胞は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作されている。別の実施形態において、T細胞は、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。さらに別の実施形態において、T細胞は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御し、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように設計されている。別の実施形態において、前記T細胞は自家性である。別の実施形態において、前記T細胞は、前記対象と組織適合性の同種T細胞である。

30

【0028】

別の実施形態において、方法は、

- a) 対象から、または対象と組織適合性のあるドナーからT細胞を得ることと、
- b) 細胞をエキスピボで調節して、SLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現させることと、
- c) 得られたT細胞を前記対象に養子移入し、それによって前記対象の癌を治療することと、を含む。

40

【0029】

別の実施形態において、T細胞は、前記対象への投与前に、単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインとのインキュベーションによってさらに増殖および/または活性化される。

【0030】

別の態様では、SLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現するように操作された細胞集団を含

50

む細胞ワクチンを前記対象に投与することを含む、癌の治療を必要とするヒト対象の癌を治療するための方法が提供される。一実施形態において、細胞集団は腫瘍細胞集団であり、細胞ワクチンは腫瘍細胞ワクチンである。特定の実施形態において、腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である。別の実施形態において、細胞集団は樹状細胞(DC)であり、細胞ワクチンはDCワクチンである。別の実施形態において、細胞集団は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作されている。別の実施形態において、細胞集団は、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。さらに別の実施形態において、細胞集団は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御し、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。別の実施形態において、SLAMF6<sup>var3</sup>を外因的に発現するように操作されている。

10

**【0031】**

別の態様では、治療用細胞組成物を生成する方法であって、

- a) T細胞、腫瘍細胞およびDCからなる群から選択される細胞集団を得ることと、
  - b) 細胞をエクスピボで調節して、SLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現させることと、
- を含む、方法が提供される。

**【0032】**

別の態様では、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための単離されたヒトSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインが提供される。一実施形態において、使用は、前記対象の癌を治療するのに有効な量での前記対象への投与を含む。別の実施形態において、使用は、前記対象のT細胞を、前記T細胞を増殖および/または活性化するのに有効な量の前記単離されたヒトSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインとエクスピボで接触させることと、得られたT細胞を前記対象に養子移入し、それによって前記対象の癌を治療することと、を含む。

20

**【0033】**

別の態様では、本発明は、癌の治療を必要とするヒト対象の癌を治療するための方法であって、有効量の単離されたヒトSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインを、対象に投与するか、または前記対象のT細胞と接触させ、それによって前記対象の癌を治療することを含む、方法を含む。一実施形態において、方法は、前記対象に有効量の単離されたヒトSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインを投与することを含む。別の実施形態において、方法は、前記対象のT細胞を、前記T細胞を増殖および/または活性化するのに有効な量の単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインとエクスピボで接触させることと、得られたT細胞を前記対象に養子移入し、それによって前記対象の癌を治療することと、を含む。

30

**【0034】**

別の態様では、N<sup>'</sup>SLAMF6<sup>var1</sup>シグナルペプチドに融合した、単離されたヒトSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインを含む、キメラポリペプチド前駆体が提供される。一実施形態において、ポリペプチド前駆体は、配列番号15に示されるアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、前記ポリペプチド前駆体は、配列番号19に示されるポリヌクレオチドによってコードされる。別の実施形態において、本明細書に開示されるポリペプチド前駆体をコードするポリヌクレオチドが提供される。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、配列番号19に示されるとおりである。別の実施形態において、ポリペプチド前駆体を哺乳動物発現系で発現させることと、得られたエクドメインポリペプチドを単離することと、を含むプロセスによって作製される、単離されたヒトSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインが提供される。別の実施形態において、本発明は、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための、本明細書に開示されるポリペプチド前駆体に関する。

40

**【0035】**

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の説明および図面から明らかになるであろう。

**【図面の簡単な説明】****【0036】**

50

【図1】メラノーマ細胞株におけるSLAMF6スプライスバリエーションの異常発現。mRNAは、SLAMF6でトランスフェクトしたメラノーマ細胞株から抽出した。RT-PCRは、古典的なvar3およびvar4 mRNAスプライスバリエーションにまたがるように設計されたプライマーを用いて行った。

【図2A-2B】標的メラノーマ細胞におけるSLAMF6 var3発現は、TILによるIFN- $\gamma$ 分泌の増加を誘導する。図2Aは、-2つの独立した実験の結果。図2Bは、2つの実験における3つのTILからの統合データの概要。両側t検定 \* p < 0.05、\*\*\* p < 0.0001

【図3A-3B】標的メラノーマ細胞におけるSLAMF6 var3発現は、IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + TILを増加させる。図3Aは、-ドットプロット、図3Bは、陽性細胞の割合を示す3点測定の概要。両側t検定 \* p < 0.05、\*\*\* p < 0.01

10

【図4A-4B】SLAMF6バリエーションはT細胞で発現している。図4Aでは、mRNAは、ヒトPBMC、Jurkat細胞およびCD8<sup>+</sup>TILから抽出した。Jurkat細胞は、PMAおよびイオノマイシンで活性化した。RT-PCRは、異なるSLAMF6バリエーション(var1: SLAMF6 var1 + SLAMF6 var2、var3: SLAMF6 var3、var4: SLAMF6 var4)に対して異なるサイズのPCR産物を生成するように設計されたプライマーを用いて行った。図4Bでは、-定量的RT-PCRの場合、RNAをJurkat細胞から単離し(PMAおよびイオノマイシンによる非活性化または活性化)、qScript cDNA Synthesisキットを使用してcDNAに転写し、Perfect SYBR Green Fast MIX ROXを使用してリアルタイムPCRを行った。

20

【図5】SLAMF6 KO Jurkat細胞の生成。古典的SLAMF6を欠くJurkat細胞は、CRISPR-Cas9ゲノム編集によって作製した。トランスフェクション後、古典的ヒトSLAMF6を欠く細胞を単一細胞選別によって選択し、コロニーの確立のために培養した。

【図6】古典的(var1)SLAMF6-ノックアウト(KO)Jurkat細胞の増強されたT細胞活性化。SLAMF6を標的とするsgCRISPR-Cas9を使用して、5つの単一細胞Jurkatクローンを生成した。細胞をPMAおよびイオノマイシンで48時間活性化し、IL-2分泌を測定した。値は野生型と比較している。2つの実験の概要を示す。両側t検定 \* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001。

30

【図7】SLAMF6 var1 KO Jurkat細胞の増強されたT細胞活性化は、残りのSLAMF6バリエーションをサイレンシングすると逆転される。野生型Jurkat細胞およびクローンC細胞に、エレクトロポレーションを使用してSLAMF6に対するsiRNAまたはsiRNA対照(QIAGEN)をトランスフェクトした。エレクトロポレーションの24時間後、細胞をPMAおよびイオノマイシンで48時間活性化し、IL-2分泌を測定した。1元配置分散分析試験 \* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001。

【図8】SLAMF6アイソフォームの略図。左のパネル: 「SLAMF6」古典的な全長アイソフォーム(SLAMF6 var1)。細胞外ドメイン、22-226aa; Ig様V-型ドメイン、35-120aa; Ig様C-型ドメイン、132-209aa; 膜貫通ドメイン、227-247aa; 細胞質ドメイン、248-331aa。中央パネル- 「SLAMF6 17-65」-3'でスプライスされたアイソフォーム(SLAMF6 var3); 右パネル- 「SLAMF6 Exon 2」総エクソン2スキップアイソフォーム(SLAMF6 var4)。

40

【図9A-9B】図9A~図9B。SLAMF6 var3の可溶性エクストドメイン(seSLAMF6-V3)は、T細胞の活性化誘導細胞死(AICD)を防止する。図9Aでは、Pmelマウスの脾細胞を、それらの同族抗原とIL2を用いてインビトロで増殖させ、IL-2、seSLAMF6-V3を添加した培地または培養液のみ(処理を行わない: 「未処理」)でさらに4日間維持した。生存細胞%(アネキシンV-/PI-)は、フローサイトメトリーによって決定した。図9Bは、-生存細胞%を示す3点測定の平均値

50

。両側 t 検定 \*\*  $p < 0.01$ 。

【図 10】T 細胞の共刺激。ヒト PBMC を seSLAMF6-V3 とともに 3 日間インキュベートした後、抗 CD3 抗体で一晩活性化した。培地への IFN- $\gamma$  分泌を ELISA で測定した。両側 t 検定 \*\*\*  $p < 0.001$ 。

【図 11】ELISA を用いた seSLAMF6-V3 の全長 seSLAMF6-Fc への結合。seSLAMF6-Fc は MaxiSorb プレートにプレコートした。次いで、様々な SLAMF ファミリーメンバーからの可溶性エクドメイン (seSLAMF6、seSLAMF6-V3、seSLAMF1、seSLAMF7、および seSLAMF8、全て 6-ヒスチジンタグを含む) を添加した。検出には抗ヒスチジン抗体を使用した。

【発明を実施するための形態】

【0037】

本発明は、癌免疫療法、特に、SLAMF6 スプライズバリエーションの発現および/または活性の調節を含む改善された治療様式モダリティに関する。より具体的には、本発明の実施形態は、養子 T 細胞移入療法、腫瘍細胞ワクチンおよび/またはポリペプチドベースの薬物を含む、ヒト対象の癌治療のための組成物および方法を提供する。

【0038】

本発明は、部分的には、特定のヒト SLAMF6 バリエーションの発現および/または活性の差次的調節が改善された癌治療を提供するという驚くべき発見に一部基づいている。特に、様々な SLAMF6 アイソフォームが、休止 T 細胞および活性化 T 細胞で同時に発現し、抗腫瘍免疫の観点から異なるおよび反対の生物学的効果さえも示すことが分かった。具体的には、細胞外ドメインの配列をコードするエクソン 2 の一部を欠くヒト SLAMF6 のスプライズバリエーション、すなわち SLAMF6 バリエーション 3 (SLAMF6<sup>var3</sup>) が T 細胞活性および抗腫瘍免疫に強力なアゴニスト効果を及ぼすことを、ここで初めて開示する。対照的に、古典的ヒト SLAMF6 (バリエーション 1、SLAMF6<sup>var1</sup>) を含む他の SLAMF6 バリエーション、およびエクソン 2 のより大きな部分を欠くスプライズバリエーション (バリエーション 4、SLAMF6<sup>var4</sup>) は、この後に詳述するように、著しく弱いアゴニスト効果を発揮するか、または下方制御効果を媒介して、結果的に抗腫瘍免疫を低下させる。

【0039】

より具体的には、SLAMF6<sup>var3</sup> を異常に発現するようにヒトメラノーマ細胞を操作すると、非トランスフェクション細胞に対するそれらの活性と比較して、抗メラノーマヒト CD8<sup>+</sup> T 細胞活性が高まることが予期せず判明した。対照的に、他の SLAMF6 バリエーションの異常な発現はそのような増強をもたらさなかったか、またはさらには抗メラノーマ活性の低下をもたらした。さらに、驚くべきことに、遺伝子編集による SLAMF6<sup>var1</sup> 発現の特異的下方制御は、正常な SLAMF6<sup>var3</sup> 発現レベルが維持されている間に、活性化刺激に対する T 細胞応答の著しい増強をもたらすことが分かった。エクソン 2 における欠失を特徴とするものおよびそのような欠失を欠くものを含む、複数の SLAMF6 バリエーションの非特異的下方制御は、そのような増強をもたらさなかった。

【0040】

本発明はさらに、ヒト SLAMF6<sup>var3</sup> エクドメイン (seSLAMF6<sup>var3</sup>) を含む単離されたポリペプチドを使用して行われた実験に一部基づいている。特に、seSLAMF6<sup>var3</sup> は、マウス T 細胞とヒト T 細胞の両方において、T 細胞の共刺激を提供するだけでなく、活性化誘導 T 細胞死を減少させるのにも有効であった。また、驚くべきことに、seSLAMF6<sup>var3</sup> は、SLAMF6<sup>var1</sup> エクドメインで同定された同型結合よりも高い親和性で単離された SLAMF6<sup>var1</sup> エクドメインに結合することが見いだされた。

【0041】

したがって、SLAMF6 は元々デュアル受容体として説明され、活性効果または阻害効果は、その細胞内チロシンスイッチモチーフ (ITSM) に起因していた。しかしながら、本開示は、受容体の細胞外部分がヒト T 細胞における免疫応答の方向を決定すること

10

20

30

40

50

を予期せず実証している。特に、本発明は、S L A M F 6 を発現する腫瘍のT細胞媒介性治療は、実質的なS L A M F 6 表面発現を欠く腫瘍の治療よりも効果的ではないかもしれないが、T細胞および/または腫瘍細胞におけるS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> の発現または活性の特異的増強により、治療効果の改善が提供されることを実証する。

#### 【0042】

したがって、本発明の実施形態は、癌の治療を必要とする対象の癌の治療のための方法に関する。これらの実施形態によれば、本発明の方法は、後にさらに詳述するように、例えば、単離されたS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> エクトドメイン、S L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> を標的とするT細胞刺激を増強するようにエキスピボでマニピュレートされたT細胞組成物、および/またはS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> を選択的もしくは優先的に発現するように操作された細胞ワ  
クチンを対象に投与することによって、前記対象にS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> を標的とするT細胞刺激を提供することによって達成される。特定の理論または作用機序によって拘束されることを望むものではないが、細胞表面に発現したS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> 分子(トランス)による、または単離された(可溶性、無細胞)S L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> エクトドメインによるヒトT細胞の会合(結合)は、細胞内シグナル伝達を調節し、それによって前記T細胞を刺激する。様々な実施形態によれば、方法は、S L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> を標的とするT細胞刺激を提供するように、前記対象のT細胞上のS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> の選択的または優先的な会合を含む。好ましい実施形態によれば、前記方法は、実質的S L A M F 6 <sup>v a r 1</sup> を標的とするT細胞刺激を実質的に提供することなく、S L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> を標的とするT細胞刺激を提供することを含む。他の実施形態において、方法は、S L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> または  
そのエクトドメインの投与(例えば、T細胞集団を細胞表面に発現したS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> または単離されたS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> エクトドメインとインキュベートするかまたは別様に接触させることによる)を含み、それによってT細胞を刺激する。様々な実施形態によれば、S L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> を標的とするT細胞刺激は、後にさらに詳述するように、例えば、単離されたS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> エクトドメイン、S L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> を標的とするT細胞刺激を増強するようにエキスピボでマニピュレートされたT細胞組成物、および/またはS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> を選択的もしくは優先的に発現するように操作された細胞ワ  
クチンを前記対象に投与することによって、提供される。

#### 【0043】

いくつかの実施形態において、前記刺激は、前記対象に単離されたS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> エクトドメイン(またはその特定のアゴニスト)を投与し(または対象のT細胞と接触させる)、それによって前記対象の癌を治療することを含む。したがって、一態様では、対象に単離されたS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> エクトドメインを投与し、それによって前記対象の癌を治療することを含む、癌の治療を必要とする対象の癌を治療するための方法が提供される。特定の実施形態において、前記方法は、前記対象に単離されたヒトS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> エクトドメインを投与することを含む。

#### 【0044】

別の態様では、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための単離されたヒトS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> エクトドメインが提供される。一実施形態において、使用は、前記対象の癌を治療するのに有効な量の前記対象への投与を含む。別の実施形態において、使用は、前記対象のT細胞を、前記T細胞を増殖および/または活性化するのに有効な量の前記単離されたヒトS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> エクトドメインとエキスピボで接触させることと、得られたT細胞を前記対象に養子移入し、それによって前記対象の癌を治療することと、を含む。

#### 【0045】

他の実施形態によれば、本発明の治療法は、養子T細胞移入療法による癌治療を提供する。様々な実施形態において、治療は、前記対象にS L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> を標的とするT細胞刺激を増強するようにエキスピボでマニピュレートされたT細胞組成物を投与し、それによって前記対象の癌を治療することによって提供される。様々な実施形態において、マニピュレーションは、S L A M F 6 <sup>v a r 3</sup> 発現を特異的に増強すること、S L A M F 6 <sup>v</sup>

$ar^3$  活性を特異的に増強すること、 $SLAMF6^{var1}$  発現を特異的に低下させること、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0046】

したがって、別の態様では、 $SLAMF6^{var3}$  を優先的に（本明細書では「差次的に」とも称される）発現するように操作されたT細胞を対象に投与することを含む、癌の治療を必要とする対象の癌を治療するための方法が提供される。

【0047】

本発明の養子移入法の別の実施形態において、前記T細胞は自家性である。別の実施形態において、前記T細胞は同種であり、典型的には治療される対象と組織適合性である。他の実施形態において、前記T細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、末梢血単核細胞（PBMC）、および操作されたT細胞株（例えば、キメラ抗原受容体を発現する）からなる群から選択される。別の実施形態において、前記T細胞は、 $CD8^+$ T細胞を含む。別の実施形態において、前記T細胞は、 $CD8^+$ T細胞および $CD4^+$ T細胞を含む。さらに他の実施形態において、前記T細胞は、精製された $CD8^+$ T細胞または $CD4^+$ T細胞である。

【0048】

別の実施形態において、方法は、

- a) 対象から、または対象と組織適合性のあるドナーからT細胞を得ることと、
- b) 細胞をエクスピボで調節して、 $SLAMF6^{var3}$  を優先的に発現させることと、
- c) 得られたT細胞を前記対象に養子移入し、それによって前記対象の癌を治療することと、を含む。

【0049】

例えば、本明細書に開示および例示されているように、本発明の方法における使用に適した $SLAMF6^{var3}$  を優先的に発現するように調節されたT細胞集団を生成および選択する非限定的な手段が利用可能である。例えば、限定されないが、本明細書の実施例2は、 $SLAMF6^{var3}$  対 $SLAMF6^{var1}$  のmRNA比が約1:1になるように増加されたT細胞集団の生成および選択を示しており、前記T細胞集団は、活性化にตอบสนองして平均4.5倍のIL-2分泌の増加を示す（PMAおよびイオノマイシンによる、マニピュレートされていないT細胞と比較）。

【0050】

さらに他の実施形態によれば、本発明の治療法は、腫瘍細胞ワクチン接種を使用する癌治療を提供する。したがって、他の実施形態において、前記活性化は、 $SLAMF6^{var3}$  を優先的に発現するように操作された（または別様にマニピュレートされた）腫瘍細胞ワクチンを前記対象に投与することを含む。例えば、 $SLAMF6$  および/またはそのバリエーションの実質的な発現を欠く腫瘍細胞（例えば固形腫瘍）は、外因性 $SLAMF6^{var3}$  を発現するように操作され得るが、 $SLAMF6$  および/またはそのバリエーションを発現する腫瘍細胞（例えば造血器腫瘍）は、T細胞に関連して上述したようにマニピュレートされ得、 $SLAMF6^{var3}$  発現を選択的に上方制御するように、かつ/または $SLAMF6^{var1}$  発現を選択的に下方制御する。そのような腫瘍細胞ワクチンは、前記対象への投与前の照射または別様の弱毒化を含む適切なプロトコルによって調製される。別の実施形態において、 $SLAMF6^{var3}$  を優先的に発現する樹状細胞（DC）ワクチンの使用が企図される。そのようなDCワクチンには、対象への投与前に適切な腫瘍抗原が負荷され、典型的には、前記対象と組織適合性である。細胞ワクチンは、任意選択的にアジュバントまたは他の免疫調節因子と組み合わせて、適切な免疫プロトコルによって投与される。特定の実施形態において、腫瘍細胞ワクチンはメラノーマ細胞ワクチンである。

【0051】

本発明の他の実施形態は、癌治療のための改善された細胞組成物に関する。様々な実施形態によれば、本発明は、養子移入および/またはワクチン接種に有用な細胞組成物を提供する。様々な実施形態において、本発明は、本明細書に詳述されるように、 $SLAMF6^{var3}$  を優先的に発現するように操作された（または別様にマニピュレートされた）T

10

20

30

40

50

細胞組成物および細胞ワクチンを提供する。他の実施形態において、本発明は、本明細書に詳述されるように、前記改善された細胞組成物およびワクチンを生成するための方法に関する。他の実施形態において、治療有効量の S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> エクトドメイン、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、癌免疫療法用のための医薬組成物が提供される。

#### 【 0 0 5 2 】

したがって、別の態様では、本発明は、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> を優先的に発現するように操作された細胞集団を含む治療用細胞組成物を提供する。様々な実施形態において、組成物は、養子移入 T 細胞組成物、腫瘍細胞ワクチンおよび D C ワクチンからなる群から選択される。一実施形態において、細胞集団はヒト T 細胞集団であり、組成物は養子移入 T 細胞組成物である。別の実施形態において、細胞集団はヒト腫瘍細胞集団であり、細胞ワクチンは腫瘍細胞ワクチンである。特定の実施形態において、前記腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である。さらに別の実施形態において、細胞集団はヒト D C 集団であり、細胞ワクチンは D C ワクチンである。別の実施形態において、細胞集団は、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> 発現を選択的に上方制御するように操作されている。別の実施形態において、細胞集団は、S L A M F 6<sup>v a r 1</sup> 発現を選択的に下方制御するように操作されている。さらに別の実施形態において、細胞集団は、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> 発現を選択的に上方制御し、S L A M F 6<sup>v a r 1</sup> 発現を選択的に下方制御するように操作されている。別の実施形態において、細胞集団は、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> を外因的に発現するように操作されている。

#### 【 0 0 5 3 】

別の態様では、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための、本明細書に記載の S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> を優先的に発現するように操作された細胞集団を含む治療用細胞組成物が提供される。一実施形態において、細胞集団はヒト T 細胞集団であり、前記組成物は養子移入 T 細胞組成物であり、前記 T 細胞は、自家性であるか、または前記対象と組織適合性の同種 T 細胞である。別の実施形態において、前記 T 細胞は、対象の、または前記対象と組織適合性のあるドナーのエキスピボ T 細胞を調節して、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> を優先的に発現させることと、得られた T 細胞を癌治療のための養子移入組成物として配合することと、を含む方法によって生成されている別の実施形態において、前記 T 細胞は、単離された S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> エクトドメインとのインキュベーションによってさらに増殖および/または活性化されている。別の実施形態において、細胞集団はヒト腫瘍細胞集団であり、細胞ワクチンは腫瘍細胞ワクチンである。別の実施形態において、腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である。別の実施形態において、細胞集団は D C 集団であり、細胞ワクチンは D C ワクチンである。

#### 【 0 0 5 4 】

別の態様では、治療用細胞組成物を生成する方法であって、

- a) T 細胞、腫瘍細胞および D C からなる群から選択される細胞集団を得ることと、
  - b) 細胞をエキスピボで調節して、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> を優先的に発現させることと、
- を含む、方法が提供される。

#### 【 0 0 5 5 】

別の態様では、N' S L A M F 6<sup>v a r 1</sup> シグナルペプチドに融合した、単離されたヒト S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> エクトドメインを含む、キメラポリペプチド前駆体が提供される。一実施形態において、ポリペプチド前駆体は、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、前記ポリペプチド前駆体は、配列番号 19 に示されるポリヌクレオチドによってコードされる。別の実施形態において、ポリペプチド前駆体をコードするポリヌクレオチドが提供される。特定の実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、配列番号 19 に示されるとおりである。別の実施形態において、ポリペプチド前駆体を哺乳動物発現系で発現させることと、得られたエクトドメインポリペプチドを単離することと、を含むプロセスによって作製される、単離されたヒト S L A M F 6<sup>v a r 3</sup> エクトドメインが提供される。別の実施形態において、本発明は、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための、本明細書に開示されるポリペプチド前駆体に関する。

【 0 0 5 6 】

S L A M F 6 バリエーション

一般に、S L A M F 6 は、N ' から C ' の順序で次のドメインから構成される。

I . N 末端シグナルペプチド、

II . 2つの保存された免疫グロブリン ( I g ) 様モチーフを含む細胞外部分 ( エクトドメイン ) : N ' I g 様 V 型ドメイン ( I g V 、 2 層の シート構造を有し、主に中性であるが極性の前面を有する ) 、および C ' I g 様 C 2 型ドメイン ( I g C 2 、 全体的な 鎖トポロジーといくつかのジスルフィド結合を特徴とする ) 、

III . らせん膜貫通ドメイン、ならびに

IV . S L A M 関連タンパク質 ( S A P ) の S H 2 ドメインと、関連するユーイング肉腫関連転写産物とのドッキング部位である免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ ( I T S M ) を含む、トポロジカル ( 細胞質 ) ドメイン。I T S M モチーフは、活性化および阻害結合パートナーに対する重複した特異性を有するコンセンサス配列 T x Y x x V / I / L を担持する。

10

【 0 0 5 7 】

古典的なヒト S L A M F 6 ( 例えば、アクセシオン番号 Q 9 6 D U 3 、アイソフォーム 1 ) では、シグナルペプチドは転写されたポリペプチドの 1 ~ 2 1 位に位置することが同定されており、エクトドメインは 2 2 - 2 2 6 位に位置することが同定されており ( I g V は 3 5 ~ 1 2 0 位に位置し、I g C 2 は 1 3 2 ~ 2 0 9 位に位置していた ) 、膜貫通ドメインは 2 2 7 ~ 2 4 7 位に位置し、細胞質 ( 細胞内 ) ドメインは 2 4 8 ~ 3 3 1 位に位置していた。エクソン 2 は、1 7 ~ 1 2 7 位のアミノ酸をコードする。

20

【 0 0 5 8 】

ヒト S L A M F 6 <sup>var 1</sup> ( 前駆体、アクセシオン番号 NM\_001184714.1 に おいても提供される ) のアミノ酸配列は以下のとおりである :

M L W L F Q S L L F V F C F G P G N V V S Q S S L T P L M V N G I L G E S V T L  
P L E F P A G E K V N F I T W L F N E T S L A F I V P H E T K S P E I H V T N P  
K Q G K R L N F T Q S Y S L Q L S N L K M E D T G S Y R A Q I S T K T S A K L S  
S Y T L R I L R Q L R N I Q V T N H S Q L F Q N M T C E L H L T C S V E D A D D  
N V S F R W E A L G N T L S S Q P N L T V S W D P R I S S E Q D Y T C I A E N A  
V S N L S F S V S A Q K L C E D V K I Q Y T D T K M I L F M V S G I C I V F G F  
I I L L L L V L R K R R D S L S L S T Q R T Q G P A E S A R N L E Y V S V S P T  
N N T V Y A S V T H S N R E T E I W T P R E N D T I T I Y S T I N H S K E S K P  
T F S R A T A L D N V V ( 配列番号 1 ) 。

30

【 0 0 5 9 】

ヒト S L A M F 6 <sup>var 2</sup> は、配列番号 1 と比較して 2 6 6 位の単一アラニンの欠失によって S L A M F 6 <sup>var 1</sup> とは異なる。

【 0 0 6 0 】

ヒト S L A M F 6 <sup>var 3</sup> ( 前駆体、NM\_001184715.1 ) は、配列番号 1 と比較してアミノ酸 ( a a ) 1 7 ~ 6 5 の欠失によって S L A M F 6 <sup>var 1</sup> とは異なる。欠失は、シグナルペプチド ( すなわち、ペントペプチド G N V V S ( 配列番号 2 0 ) ) に存在する a a 1 7 ~ 2 1 と、エクトドメインに存在する a a 2 2 ~ 6 5 を含む。アクセシオン番号 NM\_001184715.1 で示される前駆体配列は以下のとおりである :

40

M L W L F Q S L L F V F C F G P V P H E T K S P E I H V T N P K Q G K R L N F T  
Q S Y S L Q L S N L K M E D T G S Y R A Q I S T K T S A K L S S Y T L R I L R Q  
L R N I Q V T N H S Q L F Q N M T C E L H L T C S V E D A D D N V S F R W E A L  
G N T L S S Q P N L T V S W D P R I S S E Q D Y T C I A E N A V S N L S F S V S  
A Q K L C E D V K I Q Y T D T K M I L F M V S G I C I V F G F I I L L L L V L R  
K R R D S L S L S T Q R T Q G P E S A R N L E Y V S V S P T N N T V Y A S V T H  
S N R E T E I W T P R E N D T I T I Y S T I N H S K E S K P T F S R A T A L D N  
V ( 配列番号 : 1 6 ) 、

50

## 【0061】

ヒトSLAMF6<sup>var4</sup> (前駆体、NM\_001184716.1、配列番号17)は、配列番号1と比較してaa17~128の欠失によってSLAMF6<sup>var1</sup>とは異なる。

## 【0062】

したがって、本発明の実施形態において有用な、ヒトSLAMF6<sup>var3</sup>の単離されたエクストドメインのアミノ酸配列は以下のとおりである：

K S P E I H V T N P K Q G K R L N F T Q S Y S L Q L S N L K M E D T G S Y R A Q  
I S T K T S A K L S S Y T L R I L R Q L R N I Q V T N H S Q L F Q N M T C E L H  
L T C S V E D A D D N V S F R W E A L G N T L S S Q P N L T V S W D P R I S S E  
Q D Y T C I A E N A V S N L S F S V S A Q K L C E D V K I Q Y T D T K M (配列番号18)。

10

## 【0063】

本発明のさらなる実施形態において有用な、ヒトSLAMF6<sup>var3</sup>の単離されたエクストドメインのアミノ酸配列は以下のとおりである：

V P H E T K S P E I H V T N P K Q G K R L N F T Q S Y S L Q L S N L K M E D T G  
S Y R A Q I S T K T S A K L S S Y T L R I L R Q L R N I Q V T N H S Q L F Q N M  
T C E L H L T C S V E D A D D N V S F R W E A L G N T L S S Q P N L T V S W D P  
R I S S E Q D Y T C I A E N A V S N L S F S V S A Q K L C E D V K I Q Y T D T K  
M (配列番号14)。

20

## 【0064】

本明細書で使用される「エクストドメイン」という用語は、少なくともIgVおよびIgC2ドメインを含む、SLAMF6ポリペプチドの細胞外の表面露出部分を指す。典型的にかつ有利には、本発明の方法および組成物で使用されるSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインは、シグナルペプチド、膜貫通ドメインおよびトポロジードメイン等の、本明細書に記載される他のSLAMF6ドメインを実質的に除外する。そのような有利なポリペプチドは、本明細書において「単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメイン」と称される。単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインは、典型的にかつ好都合には、例えば、本明細書に記載されるような組換え法によって、合成的に作製される。換言すると、単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインポリペプチドは、残留SLAMF6配列(例えば、1-10、好ましくは5以下のアミノ酸)を含み得るが、それらはインタクトなSLAMF6ポリペプチド(本明細書に記載の完全な機能的ドメイン等)にあった場合に機能する任意の追加のSLAMF6構造を欠く。単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインポリペプチドの他の例では、そのような残留SLAMF6配列(例えば、最大約10個のaa)は、非連続的な方法で、つまり自然発生型SLAMF6<sup>var3</sup>とは異なる順序または構成でポリペプチド内に配置される。そのような操作されたポリペプチドの非限定的な例は、以下にさらに詳細に記載されるキメラポリペプチド構築物によって表される。さらに、本発明の実施形態で言及される特に有利なSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインは、配列番号1と比較して、aa17~65または18~65を欠くが、aa66~128を保持する。

30

40

## 【0065】

特定の実施形態において、SLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインは、エピトープタグ(例えば、ポリヒスチジンタグ)および/または血漿半減期延長部分を含むがこれらに限定されない追加の外因性配列にコンジュゲートまたは融合され得る。哺乳動物発現系における組換え産生に適した単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインの例示的な配列は、本明細書において配列番号15に示されている。コードされた配列は、本明細書の実施例3に記載されるように、発現されたポリペプチドの単離に有用なN'シグナルペプチド、ヒトSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメイン、およびC'6-ヒスチジンタグを含む。

## 【0066】

具体的には、本明細書に記載されるように、配列番号15に示される(および配列番号

50

19に示されるポリヌクレオチドによってコードされる)ポリペプチドは、N' S L A M F 6<sup>var 1</sup>シグナルペプチドに融合した単離されたヒトS L A M F 6<sup>var 3</sup>エクトドメインを含むキメラポリペプチド前駆体である。本明細書の特定の実施形態においてさらに開示および例示されるように、哺乳動物発現系(HEK293細胞)で発現させると、配列番号15のポリペプチドをコードする構築物は、異種シグナルペプチドの一部を保持する単離されたヒトS L A M F 6<sup>var 3</sup>エクトドメインを生じた。

【0067】

本発明の実施形態において有用なポリペプチドおよびペプチド(例えば、S L A M F 6<sup>var 3</sup>エクトドメイン)は、当該技術分野で既知の任意の組換えまたは合成方法を使用して単離または合成することができる。例えば、ペプチドまたはポリペプチド断片は、固相(例えば、Bocまたはf-Moc化学)および液相合成法を含むがこれらに限定されない方法によって合成され得る。例えば、ペプチドは、Merrifieldの固相ペプチド合成法(1963, J Am Chem Soc 85, 2149)によって合成することができる。代替として、ペプチドは、当該技術分野で周知の標準的な溶液方法を使用して、またはペプチド合成について当該技術分野で既知の任意の他の方法によって合成され得る。

10

【0068】

ポリペプチドおよびペプチドは、組換え技術によって都合よく作製され得る。タンパク質およびペプチドを設計、発現および精製するための組換え法は当該技術分野で既知である(例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New Yorkを参照)。核酸分子は、DNA、RNA、またはDNAもしくはRNAのいずれかの誘導体を含み得る。ポリペプチドまたはペプチドをコードする単離された核酸配列は、その天然の供給源から、遺伝子全体(すなわち、完全)またはその一部として得ることができる。核酸分子は、組換えDNA技術(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、クローニング)または化学合成を使用して作製することもできる。核酸配列は、天然の核酸配列およびそのホモログを含み、それには、限定されないが、ヌクレオチドが挿入、欠失、置換、および/または反転されているが、そのような修飾は、機能的産物をコードする核酸分子の能力に実質的に干渉しない、修飾された核酸配列が含まれる。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列は、タンパク質の遺伝暗号から推定できるが、いわゆる「ゆらぎの法則」によって与えられる、コドンの3番目の位置における古典的な塩基対合の例外の許容だけでなく、コードの縮重も考慮に入れなければならない。より多いまたはより少ないヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、同じまたは同等のタンパク質をもたらし得る。組換え産生法を使用して、例えば、E. coliまたは酵母等の微生物の選択された宿主細胞は、ポリペプチドをコードする特定のDNA配列を含むハイブリッドウイルスまたはプラスミドDNAベクターで形質転換され、ポリペプチドは、DNA配列の転写および翻訳時に宿主において合成される。

20

30

【0069】

別の態様では、本発明の方法は、対象から得られた細胞集団においてS L A M F 6<sup>var 3</sup>またはS L A M F 6<sup>var 3</sup>エクトドメインを含む単離されたポリペプチドを発現させることによって影響され得る(例えば、対象から細胞を単離し、該当するポリペプチドを発現することができるベクターを導入し、細胞を対象に再導入することによる)。S L A M F 6<sup>var 3</sup>エクトドメインの発現に関して、ベクターは、ポリペプチドが対象で分泌され、対象のT細胞に接触できるように設計される。

40

【0070】

所望の遺伝子産物を送達および発現するために使用される発現構築物またはベクターの調製は、当該技術分野で既知である。そのような構築物は、典型的には、当該技術分野で既知の調節配列または選択可能なマーカーを含む。核酸構築物(本明細書では「発現ベクター」とも称される)は、このベクターを原核生物、真核生物、または任意選択的にその両方(例えば、シャトルベクター)における複製および組み込みに適したものに追加

50

の配列を含み得る。さらに、典型的なクローニングベクターはまた、転写および翻訳開始配列、転写および翻訳ターミネーター、ならびにポリアデニル化シグナルを含み得る。

【0071】

哺乳動物発現ベクターの例として、限定されないが、Invitrogenから入手可能なpcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、およびpNMT81、Promegaから入手可能なpCI、Stratageneから入手可能なpMbac、pPbac、pBK-RSVおよびpBK-CMV、Clontechから入手可能なpTRES、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。これらは、本明細書に記載される実施形態において有用な構築物のためのベクター骨格として役立ち得る。

10

【0072】

組換えウイルスベクターは、水平感染および標的特異性等の利点を提供するため、本発明の遺伝子のインピボ発現に有用である。水平感染は、例えば、レトロウイルスの生活環に固有であり、単一の感染細胞が多くの子孫ビリオンを生成し、それが発芽して隣接する細胞に感染するプロセスである。その結果、初めはほとんどが元のウイルス粒子に感染していなかった大きな領域の細胞が急速に感染する。これは、感染病原体が娘子孫を通してのみ広がる垂直感染とは対照的である。水平方向に広がることのできないウイルスベクターも作製され得る。この特徴は、局在化したいいくつかの標的細胞のみに特異的遺伝子を導入することが所望の目的である場合に有用であり得る。

20

【0073】

特定の例示的な実施形態において、本明細書に記載されるキメラポリペプチド前駆体を哺乳動物発現系で発現させ、得られたエクトドメインポリペプチドを単離することを含むプロセスによって作製される単離されたヒトSLAMF6<sup>var3</sup>エクトドメインは、本明細書に記載のその異種シグナルペプチド配列の最大11個のN<sup>o</sup>酸残基を保持し得る(例えば、1~11個、1~10個、5~11個、または他の実施形態では5、6、7、または8個の残基)。いくつかの実施形態において、前記単離されたヒトSLAMF6<sup>var3</sup>エクトドメインは、少なくともペンタペプチドGNVVS(配列番号20)を保持する。

【0074】

細胞工学

特定の実施形態によれば、本発明は、細胞工学、ならびにSLAMF6アイソフォームの発現を差次的に変化させるように選択された細胞集団が修飾されるまたはマニピュレートされる組成物および方法に関する。特に、本発明の実施形態は、SLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現するように操作された細胞を用いる。ある特定の実施形態において、細胞集団は、T細胞、腫瘍細胞および樹状細胞(DC)からなる群から選択される。このような細胞は、いくつかの実施形態において、本明細書に詳述されるように、遺伝子工学または他の形態のエクスピボ調節を使用して作製される。

30

【0075】

特定の実施形態において、細胞は、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。したがって、本発明の実施形態は、例えば、プラスミド、人工的に操作された制限酵素、メガヌクレアーゼを特異的にコードするプラスミド、または転写または転写後の遺伝子調節のためのツールを含むがこれらに限定されない工学ツールによる、遺伝子発現のゲノム編集、ゲノムサイレンシング、または翻訳後制御の使用を用いる。特定の実施形態において、アンチセンス分子、RNA干渉(RNAi)分子(例えば、低分子干渉RNA(sRNA)およびヘアピンRNA)および酵素的核酸分子(例えば、リボザイムおよびDNAザイム)からなる群から選択されるツールの使用が企図される。他の特定の実施形態において、遺伝子編集剤(例えば、Cas9/gRNA RNP)の使用が企図される。SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するためのそのような薬剤の使用に関する非限定的な例は、後述の実施例の項に提供される。

40

50

## 【0076】

RNA干渉は2段階のプロセスである。開始ステップと称される第1段階の間に、投入されたdsRNAが21~23ヌクレオチド(nt)の低分子干渉RNA(siRNA)に消化されるが、これはおそらく、dsRNA(直接的に、または発現ベクター、カセット、もしくはウイルスを介して導入される)をATP依存的に切断する、dsRNA特異的リボヌクレアーゼのRNase IIIファミリーのメンバーであるDicerの作用によると考えられる。連続的な切断事象により、RNAは、それぞれの鎖が2ヌクレオチドの3'オーバーハングを有する19~21bpの二本鎖(siRNA)に分解される。

## 【0077】

エフェクター段階において、siRNA二重鎖がヌクレアーゼ複合体に結合して、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)を形成する。RISCの活性化には、siRNA二重鎖のATP依存的な巻き戻しが必要である。次いで、活性なRISCは、塩基対形成相互作用によって相同な転写産物を標的化し、mRNAを切断してsiRNAの3'末端から12ヌクレオチドの断片にする。切断の機序は依然として解明されていないが、研究により、各RISCが単一のsiRNAおよびRNaseを含むことが示されている。

## 【0078】

先験的siRNAを提供することにより、「開始ステップ」を排除することができる。RNAiの顕著な効力のために、RNAi経路内での増幅ステップが示唆されている。増幅は、より多くのsiRNAを生成したであろう投入されたdsRNAのコピーによって、または形成されるsiRNAの複製によって行うことができる。代替的または追加的に、RISCの複数の代謝回転事象によって増幅を達成することができる。

## 【0079】

本発明での使用に適したRNAi分子の合成は、以下のように達成することができる。初めに、核酸配列標的を、AAジヌクレオチド配列について下流で任意選択的に走査する。各AAの出現および3'に隣接する19ヌクレオチドを、潜在的なsiRNA標的部位として記録する。次に、NCBIサーバー([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/))から利用可能なBLASTソフトウェア等の任意の配列アライメントソフトウェアを使用して、潜在的な標的部位を適切なゲノムデータベース(例えば、ヒト、マウス、ラット等)と比較する。他のコード配列に有意な相同性を示す推定上の標的部位は除外する。

## 【0080】

適格な標的配列をsiRNA合成のための鋳型として選択する。好ましい配列は低いG/C含量を含むものであり、これは、G/C含量が55%より高いものと比較して、遺伝子サイレンシングの仲介により有効であることが証明されているためである。評価のために、標的遺伝子の長さに沿って、いくつかの標的部位が選択されることが好ましい。選択されたsiRNAのより良好な評価のために、陰性対照を併せて使用することが好ましい。陰性対照siRNAは、siRNAと同じヌクレオチド組成を含むが、ゲノムとの有意な相同性を欠くことが好ましい。したがって、任意の他の遺伝子に対して有意な相同性を全く示さない限り、siRNAのスクランブルヌクレオチド配列が使用されることが好ましい。

## 【0081】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のタンパク質をコードするmRNAのコード鎖(センス鎖)に相補的(またはアンチセンス)な核酸である(マイナス鎖としても知られる)。アンチセンスオリゴ核酸は、典型的にはRNAベースであるが、DNAベースでもあり得る。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、それらの安定性を高めるためにしばしば修飾される。これらの修飾は、当該技術分野で既知であり、限定されないが、オリゴヌクレオチド骨格の修飾、糖部分の修飾、または塩基の修飾を含む。また、これらの修飾には、一般に「ギャップのある」オリゴヌクレオチドと称される様々なDNA-RNAハイブリッドまたは構築物が含まれる。

## 【0082】

10

20

30

40

50

理論に拘束されるものではないが、これらのアンチセンス分子の mRNA への結合は、内因性 RNA によるメッセージの分解を引き起こす二本鎖 RNA のストレッチを誘導すると考えられている。代替的に、RNA からタンパク質を作る最中のリボソームは、形成される二本鎖 RNA の領域に沿って移動できないため、進行が妨げられる。さらに、時折、オリゴヌクレオチドは、メッセージのプロモーター付近に結合するように特異的に設計され、これらの状況下で、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、メッセージの翻訳にさらに干渉し得る。

【0083】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが機能する特定の機序に関係なく、細胞または組織へのそれらの投与により、特定のタンパク質をコードする mRNA の分解またはその翻訳の防止が可能になる。したがって、アンチセンス分子は、特定のタンパク質の発現および/または活性を低下させる。

10

【0084】

特定のタンパク質に特異的に結合してその分解を媒介するアンチセンスオリゴ核酸を設計するためには、オリゴ核酸によって認識される配列がその特定のタンパク質に固有または実質的に固有であることが重要である。例えば、タンパク質全体にわたって頻繁に繰り返される配列は、特定のメッセージを特異的に認識して分解するオリゴ核酸の設計にとって理想的な選択ではない場合がある。当業者は、オリゴ核酸を設計し、そのオリゴ核酸の配列を、公的に利用可能なデータベースに寄託されている核酸配列と比較して、配列が特定のタンパク質に特異的または実質的に特異的であることを確認できる。

20

【0085】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを生成する方法は、例えば、米国特許第 7,022,832 号、同第 6,972,171 号、同第 6,277,981 号、および米国特許出願公開第 2005/0261485 号に見いだすことができる。

【0086】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で既知の方法により（例えば、エクソン 2 の）エクソンスキッピングを誘導し、それにより SLAMF6<sup>var1</sup> 発現を下方制御するように設計され得る。

【0087】

「酵素的核酸分子」または「酵素的オリゴ核酸」という用語は、基質結合領域において特定の遺伝子標的に対する相補性を有し、また、標的 RNA を特異的に切断するように活性である酵素活性も有し、それによって標的遺伝子をサイレンシングする核酸分子を指す。相補的領域は、酵素的核酸分子の標的 RNA への十分なハイブリダイゼーションおよびその後の切断を可能にする。酵素的核酸という用語は、例えば、リボザイム、触媒 RNA、酵素 RNA、触媒 DNA、アプタザイムまたはアプタマー結合リボザイム、触媒オリゴヌクレオチド、ヌクレオザイム、DNA ザイム、RNA 酵素と互換的に使用される。

30

【0088】

いずれか特定の標的 RNA を切断するリボザイムを設計する可能性により、リボザイムは基礎研究および治療用途の両方で貴重なツールとなった。治療において、リボザイムは、感染症疾患におけるウイルス RNA、癌における優性癌遺伝子、および遺伝的障害における特定の体細胞変異を標的とするために利用されてきた。リボザイムおよびリボザイム誘導体は、例えば、米国特許第 5,436,330 号、同第 5,545,729 号および同第 5,631,115 号に記載されている。

40

【0089】

ゲノム編集は、1つ以上の細胞（対象内を含む）に存在する内因性染色体配列を編集することができる、例えば、標的エンドヌクレアーゼおよび一本鎖核酸を使用して修飾することができる方法である。ゲノム編集法は、ゲノム内の特定の領域での核酸配列の挿入、ゲノムからの特定の配列の切除、および/または特定のゲノム配列の新しい核酸配列との置換をもたらすことができる。例えば、また限定ではなく、ゲノム編集法は、ヌクレアーゼ、例えばエンドヌクレアーゼを特定のゲノム配列に導くために、ゲノム内の特定の配列

50

、例えば、融合遺伝子に関連する染色体切断点に相補的な、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）を含むガイドRNA（gRNA）の使用を含むことができる。エンドヌクレアーゼの非限定的な例として、CRISPR関連タンパク質9（Cas9）が挙げられる。エンドヌクレアーゼは、標的ゲノム配列の切断をもたらすことができ、非同末端結合（NHEJ）または相同組換えにより切断部位でのゲノムの修飾を可能にする。ゲノム編集方法の非限定的な例は、PCT出願第WO2014/093701号に開示されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

#### 【0090】

遺伝子発現を阻害するために使用されるCRISPR/Cas系の1つの非限定的な例であるCRISPRiは、米国特許出願公開US2014/0068797号に記載されている。CRISPRiは、RNA誘導型Cas9エンドヌクレアーゼを利用して永続的な遺伝子破壊を誘導してDNAの二本鎖切断を導入し、誤差が発生しやすい修復経路の引き金となってフレームシフト変異をもたらす。触媒作用のないCas9は、エンドヌクレアーゼ活性を欠いている。ガイドRNAと共発現させると、転写伸長、RNAポリメラーゼ結合、または転写因子結合に特異的に干渉するDNA認識複合体が生成される。このCRISPRi系は、標的遺伝子の発現を効率的に阻止する。CRISPR/Cas遺伝子破壊は、標的遺伝子に特異的なガイドヌクレオチド配列、およびCasエンドヌクレアーゼが細胞に導入され、Casエンドヌクレアーゼが標的遺伝子に二本鎖切断を導入できるようにする複合体を形成したときに生じる。特定の実施形態において、CRISPR/Cas系は発現ベクターを含む。他の実施形態において、Cas発現ベクターはCas9エンドヌクレアーゼの発現を誘導する。T7、Cas3、Cas8a、Cas8b、Cas10d、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Cas10、Csm2、Cmr5、FokI、当該技術分野で既知の他のヌクレアーゼ、およびそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない、他のエンドヌクレアーゼが使用されてもよい。

#### 【0091】

追加的または代替的に、細胞は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作されている。特定の実施形態において、細胞は、SLAMF6<sup>var3</sup>（例えば、ヒトSLAMF6<sup>var3</sup>）を外因的に発現するように操作されている。したがって、本発明の実施形態は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を誘導または増強するために、プラスミドおよびウイルスベクターを含むがこれらに限定されない、本明細書に記載の発現構築物およびベクターの使用を用いる。

#### 【0092】

SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作された細胞では、SLAMF6<sup>var3</sup>の実質的な下方制御が発揮されていないことを理解されたい。同様に、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作された細胞では、SLAMF6<sup>var1</sup>の実質的な上方制御は発揮されない。したがって、SLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現するように操作された細胞は、典型的には、SLAMF6<sup>var3</sup>対SLAMF6<sup>var1</sup>の発現比の増大によって特徴付けられる。そのため、いくつかの実施形態において、SLAMF6<sup>var1</sup>発現の選択的な下方制御は、SLAMF6<sup>var2</sup>の下方制御を伴い得る。

#### 【0093】

さらに他の実施形態において、本発明は、追加的または代替的に、SLAMF6<sup>var4</sup>発現を選択的に上方制御するために、本発明の組成物および方法で使用されるT細胞、腫瘍細胞および/またはDCを操作することを含む。さらに別の実施形態において、本発明は、追加的または代替的に、単離されたSLAMF6<sup>var4</sup>エクドメインの投与を利用する。

#### 【0094】

別の態様では、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されたT細胞を対象に投与することを含む、癌の治療を必要とするヒト対象の癌を治療するための方法が提供される。

10

20

30

40

50

## 【0095】

別の実施形態において、方法は、

- a) 対象から、または対象と組織適合性のあるドナーからT細胞を得ることと、
- b) 細胞をエキスピボで調節して、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御することと、
- c) 得られたT細胞を前記対象に養子移入し、それによって前記対象の癌を治療することと、を含む。

## 【0096】

別の態様では、本発明は、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作された細胞集団を含む治療用細胞組成物を提供する。

10

## 【0097】

他の実施形態において、調節はインピボで達成され得る。したがって、いくつかの実施形態において、SLAMF6<sup>var3</sup>を優先的に発現するように対象の細胞（例えば、T細胞、腫瘍細胞またはDC）をインピボでマニピュレートすることを含む、癌の治療を必要とするヒト対象の癌を治療するための方法が提供される。様々な実施形態において、マニピュレーションは、遺伝子治療、ゲノム編集、エクソスキッピング等を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知の方法によって行われる。例えば、限定されないが、方法は、SLAMF6<sup>var3</sup>の発現を誘導もしくは増強する発現ベクター、SLAMF6<sup>var1</sup>の発現を低下させる遺伝子編集剤（例えば、エクソン2を標的とするCas9/gRNA RNP）、および/またはSLAMF6<sup>var1</sup>の発現を低下させるエクソンをスキップするオリゴヌクレオチド（エクソン2を標的とする）を対象に投与することによって行われ得る。

20

## 【0098】

養子細胞療法

別の態様では、養子移入を必要とするレシピエント対象への養子移入に適した、本明細書に記載されるように調製されたT細胞組成物が提供される。本明細書で使用される場合、また別段の規定のない限り、用語「養子移入」は、以前に感作された免疫性物質（例えば、細胞または血清）がレシピエントに移入される受動免疫療法の形態を指す。「養子移入免疫療法」、「養子細胞療法」および「養子細胞免疫療法」という語句は、本明細書において互換的に使用され、癌または感染症疾患の発生または症状を緩和または改善するために、本発明のT細胞組成物等のエフェクター免疫担当細胞がそれを必要とする対象に投与（養子移入）される、治療または予防レジメンまたはモダリティを表す。

30

## 【0099】

Tリンパ球（T細胞）は、免疫応答に関与する様々な異なる細胞型の1つである。T細胞の活性は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子に関連してT細胞に提示される抗原によって調節される。次いで、T細胞受容体（TCR）がMHC-抗原複合体に結合する。一旦、抗原がMHCと複合体を形成すると、MHC-抗原複合体がT細胞上の特異的TCRによって結合され、それによってそのT細胞の活性を変化させる。抗原提示細胞によるTリンパ球の適切な活性化には、TCRの刺激だけでなく、その共受容体の複合的かつ協調的な会合も必要である。

40

## 【0100】

Tヘルパー細胞（TH細胞）は、形質細胞および記憶B細胞へのB細胞の成熟化、ならびに細胞障害性T細胞およびマクロファージの活性化を含む免疫学的プロセスにおいて他の白血球を助ける。これらの細胞は、その表面上にCD4糖タンパク質を発現するため、CD4<sup>+</sup>T細胞としても知られている。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞（APC）の表面上に発現するMHCクラスII分子によってペプチド抗原が提示されると活性化される。一旦、活性化されると、それらは急速に分裂し、活発な免疫応答を調節または補助するサイトカインと呼ばれるタンパク質を分泌する。

## 【0101】

細胞傷害性T細胞（TC細胞、またはCTL）は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を

50

破壊し、移植拒絶反応にも関与する。これらの細胞は、その表面上にCD8糖タンパク質を発現するため、CD8<sup>+</sup>T細胞としても知られている。これらの細胞は、全ての有核細胞の表面上に存在するMHCクラスI分子に関連する抗原に結合することにより、その標的を認識する。

#### 【0102】

以前はサプレッサーT細胞として知られていた調節性T細胞(T<sub>reg</sub>細胞)は、免疫寛容の維持に不可欠である。それらの主要な役割は、免疫反応の終盤にかけてT細胞媒介性の免疫を停止し、胸腺における負の選択のプロセスを回避した自己反応性T細胞を抑制することである。

#### 【0103】

TCRは内在性膜タンパク質の複合体であり、特異的MHC提示抗原認識による刺激およびクロナイブ特異的 / ヘテロダイマーによる結合が、転写の活性化と、それに続く増殖およびエフェクター機能(CD8<sup>+</sup>Tにおける細胞傷害活性およびCD4<sup>+</sup>T細胞におけるサイトカイン分泌等)とをもたらす。この活性化は、タンパク質のリン酸化、イノシトールリン酸の放出、および細胞内カルシウムレベルの上昇等の下流シグナル伝達経路に細胞外リガンド事象を関連付ける、以下に詳述する受容体複合体の他のサブユニットに関与する。

#### 【0104】

CD3、  
、およびサブユニットの細胞内部分には、ITAM(免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ)と称される配列モチーフのコピーが含まれる。ITAMは、タンパク質チロシンキナーゼ基質として、またリン酸化後、さらに他のキナーゼのSH2ドメインの結合部位として機能する。活性化T細胞受容体へのプロテインキナーゼの動員の調節および機序には、キナーゼのSykファミリー(ZAP-70)とSrcファミリー(Lck)の両方のメンバーが関与している。

#### 【0105】

上記で詳述したTCR刺激は、抗原特異的または抗原非特異的(ポリクローナル)であり得る。適切な抗原特異的TCR活性化因子は、典型的には抗原提示細胞(APC)に関連して、MHC分子に結合した抗原を含む。ポリクローナルTCR活性化因子は、特定の抗原の非存在下で、特異的TCRの会合に関連するシグナル伝達および転写活性化経路を開始することができる。適切なポリクローナルT細胞活性化因子は、T細胞受容体/CD3複合体、例えば本明細書に記載されるサブユニットを結合および架橋する抗体を含む。T細胞受容体を架橋する例示的な抗体として、HIT3a、UCHL1およびOKT3モノクローナル抗体が挙げられる。刺激は、上記の機能的効果を誘発するように、当該技術分野で既知の量および条件下で提供される。TCR刺激の様々な非限定的な例(抗原特異的およびポリクローナルの両方)は、後述の実施例に提供される。

#### 【0106】

典型的には、養子細胞移入のための組成物は、TCR刺激によりT細胞集団を活性化すること、および細胞を増殖させて投与のための治療有効量のエフェクターT細胞を得ることを含む方法によって調製される。このような方法は、限定されないが、急速増殖プロトコル(Rapid Expansion Protocol: REP)を含む。

#### 【0107】

様々な実施形態において、TCR刺激は、抗原非特異的(例えば、結合すると受容体を活性化するCD3に特異的な抗体、例えばOKT3を使用して行われる)または抗原特異的(適切な抗原提示細胞および抗原を使用する)であり得る。癌治療に関連して、抗原特異的の刺激は、典型的には、腫瘍関連抗原に対する刺激を用いる。「腫瘍関連抗原」(TAA)という用語は、腫瘍または腫瘍細胞に関連する(それらによって運搬される、発現される、産生される、分泌される等)任意のタンパク質、ペプチド、または抗原を指す。腫瘍関連抗原は、腫瘍または腫瘍細胞(複数可)に(ほぼ)排他的に関連し得るが、健全な正常細胞には関連しないか、または健全な正常組織もしくは細胞と比較して腫瘍組織もしくは腫瘍細胞(複数可)において過剰発現し得る(例えば、2倍、5倍、10倍、50倍

10

20

30

40

50

、100倍、1000倍またはそれ以上)。より具体的には、TAAは、腫瘍細胞のMHC決定基によって(処理された形態で)提示されることが可能な抗原である。したがって、腫瘍関連抗原は、MHC分子を発現する腫瘍または腫瘍細胞のみと関連している可能性が高い。周知のTAAの非限定的な例は、MART-1、gp100<sub>209-217</sub>、gp100<sub>154-163</sub>、CSPG4、NY-ESO、MAGE-A1、チロシナーゼである。

#### 【0108】

いくつかの実施形態において、特にCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を刺激するために一般的に用いられる1つのアプローチは、Fc受容体保有アクセサリ細胞(フィーダー細胞)の存在下で、T細胞を可溶性抗CD3抗体とインキュベーションする、REPと称されるアプローチである。この様式でT細胞に「提示」された抗体は、可溶性抗CD3単独または可塑性表面に固定化された抗CD3よりも効果的な増殖シグナルを生成する。癌の治療において、養子細胞療法は、典型的には、患者の腫瘍内に見られるT細胞(腫瘍浸潤リンパ球、TILと称される)を回収することを含み、それを高濃度のIL-2、抗CD3およびアロ反応性フィーダー細胞を用いてエクスピボで増殖することが推奨される。これらのT細胞は、次いで、IL-2の外因性投与とともに患者に戻され、抗癌活性をさらに高める。

#### 【0109】

したがって、特定のさらなる有利な実施形態によれば、活性化および/または増殖は、フィーダー細胞の存在下で行われる。「フィーダー細胞」という用語は一般に、第2のタイプの細胞を維持および増殖させることができる環境を提供するために、第2のタイプの細胞と共培養される1つのタイプの細胞を指す。本発明の目的のために、この用語は、具体的には、増殖されるT細胞含有集団と典型的にはアロ反応性である、Fc受容体保有アクセサリ細胞を指す。換言すると、フィーダー細胞は、増殖されるT細胞含有集団と組織適合性である必要はなく、特定の有利な実施形態において、2つの集団は典型的にはHLA不適合である。本発明の実施形態で使用されるフィーダー細胞の典型的な例は、同種正常ドナーの末梢血単核細胞、PBMCである。典型的かつ有利には、そのようなフィーダー細胞の使用は、例えば、本明細書に詳述されるように、抗原非特異的刺激抗体とのインキュベーションによって、抗原非特異的TCR刺激と組み合わせで行われる。

#### 【0110】

別の実施形態において、養子移入T細胞組成物は、照射されたPBMC(増殖が不可能)を用いて調製される。例えば、PBMCは、細胞を6000RADに曝露することにより、照射によって簡便に減弱され得る。別の実施形態において、養子移入T細胞組成物は、抗原提示細胞および抗原を担持する不活性粒子を含む人工抗原提示物を用いて調製され、抗原特異的の刺激を提供する。

#### 【0111】

様々な実施形態において、T細胞増殖は、少なくとも5日間、典型的には少なくとも6、7、または8日間行われ得る。典型的には、増殖は、最大約16、15、14、13、または12日間、例えば5~15日間、例えば6~12日間、またはより典型的には8~15日間行われる。別の実施形態において、集団は、CD8<sup>+</sup>T細胞を含む。別の実施形態において、T細胞はCD8<sup>+</sup>T細胞である。別の実施形態において、細胞はさらに遺伝子操作または修飾される(例えば、所望の抗原特異性を発揮するため)。例えば、別の実施形態において、細胞は、癌細胞または病原体(例えばウイルス)に対してそれらを再誘導するように予め設計されたTCRを発現するように遺伝子操作されたリンパ球(例えばCTL等の精製T細胞)である。非限定的な例として、T細胞は、多くの固形腫瘍、例えば、滑膜肉腫に発現する抗原NY-ESO-1を標的とするTCRを発現するように操作される。別の実施形態において、細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現してそれらを癌細胞または病原体に再誘導するように遺伝子操作された末梢血単核細胞である。例えば、限定されないが、CD19を標的とするCAR-T細胞は、急性リンパ芽球性白血病等のB細胞悪性腫瘍の治療に使用することができる。別の実施形態において、細胞は、それらの生物学的機能を増強する遺伝子を発現するように遺伝子操作された末梢血単核細胞

10

20

30

40

50

である。例えば、限定されないが、そのような遺伝子は、膜結合サイトカインおよびサイトカイン受容体（例えば、IL-2およびIL-2R）を含み得る。別の実施形態において、集団はCD4<sup>+</sup>T細胞を含む。別の実施形態において、集団は、CD8<sup>+</sup>T細胞とCD4<sup>+</sup>T細胞との組み合わせを含む。

#### 【0112】

細胞組成物は、有効量のT細胞含有集団を含み得る。例えば、養子移入免疫療法に有効な量は、抗腫瘍応答等の有益な免疫応答を誘導または増強するのに十分な量であり、例えば、 $10^6 \sim 10^{12}$ 個の細胞である。特にヒト対象のためのインビボ投与に適した細胞調製物は、薬学的に許容される賦形剤または希釈剤を含み得るが、そのような調製物は、病原体、毒素、発熱物質、ならびに薬学的に許容されると認識されていない任意の他の生物学的および非生物学的生物物質による混入が十分に回避されていることを理解されたい。例えば、限定されないが、養子移入免疫療法のためのT細胞は、2%ヒトアルブミンおよび任意選択的にIL-2（例えば300IU/ml）とともに滅菌生理食塩水を含む注射に適した緩衝液に都合よく懸濁され得る。

10

#### 【0113】

特定の好ましい実施形態によれば、細胞組成物は、治療される対象と組織適合性である（例えば、自家細胞またはMHC II適合の同種細胞）。

#### 【0114】

「組織適合性」という用語は、異なる個体間の組織の類似性を指す。組織適合性のレベルは、患者とドナーがどれだけ良好に適合しているかを示す。主要な組織適合性決定因子は、ヒト白血球抗原（HLA）である。潜在的なドナーと潜在的なレシピエントとの間でHLAタイピングが行われ、2つのHLAがいかに密接に適合しているかを決定する。本明細書で使用される「組織適合性」という用語は、ドナーとレシピエントとの間で6つ全てのHLA抗原（2つのA抗原、2つのB抗原、および2つのDR抗原）が同じである実施形態を指す。

20

#### 【0115】

しかしながら、ドナーとレシピエントが完全な適合を有しないにもかかわらず、他の実施形態において、2つ以上の抗原、例えば、6つのうちの5つの抗原で「不適合」である、または他の実施形態において、6つのうちの4つ、もしくは6つのうちの3つで不適合であるドナーおよびレシピエントが、本発明の特定の実施形態によって包含され得る。本明細書で使用される「実質的に組織適合性」という用語は、HLA抗原6つのうち5つがドナーとレシピエントとの間で同じである実施形態を指す。

30

#### 【0116】

##### 細胞ワクチン

いくつかの実施形態によれば、本発明は、改善された腫瘍細胞ワクチンの生成および使用に関する。ワクチンおよび免疫原性組成物の調製において使用するための腫瘍細胞株は、周知の方法を使用して入手および調製され得る。確立された腫瘍細胞株、例えば、その全体が本明細書に組み入れられるWO2012/156969に開示されているものが使用されてもよいが、または腫瘍生検から得られてもよい。例えば、細胞は、生検を化学的（酵素的）または物理的方法（破壊または濾過）によって破壊することによって得ることができる。細胞は、細胞懸濁液（新鮮細胞または凍結保存細胞）から得ることもできる。

40

#### 【0117】

本発明の原理によれば、腫瘍細胞は、本明細書に記載されるように操作される。様々な実施形態において、操作またはマニピュレートされる腫瘍細胞集団は、SLAMF6および/またはそのバリエーション（例えば、SLAMF6<sup>var1</sup>またはSLAMF6<sup>var3</sup>）を最初に発現する。他の実施形態において、前記腫瘍細胞は、マニピュレーションの前にSLAMF6の実質的な発現を欠いている。例えば、SLAMF6および/またはそのバリエーションの実質的な発現を欠く腫瘍細胞（例えば固形腫瘍）は、外因性SLAMF6<sup>var3</sup>を発現するように操作され得るが、SLAMF6および/またはそのバリエーションを発現する腫瘍細胞（例えば造血器腫瘍）は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御する

50

ように、かつ/またはSLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作され得る。別の特定の実施形態において、前記腫瘍細胞は、CD137を実質的に発現しない。

#### 【0118】

細胞の成長を改善することが判明した場合、細胞を増殖するために使用される培地の成分のうち1つ以上が変更されてもよい。典型的には、精製された腫瘍細胞は、ワクチン接種の前に照射されるか、さもなければ減弱される。例えば、腫瘍細胞を洗浄して、5,000~35,000ラドで照射することができる。例えば、典型的なワクチンの調製のために、細胞は、(110Gyまたは170Gyまで)照射されてもよく、DNPとコンジュゲートされてもよく、また $10^6 \sim 10^9$ 、典型的には約 $1 - 3 \times 10^7$ 腫瘍細胞での皮下投与のために調製されてもよく、任意選択的に、BCGまたは当該技術分野で既知の他のアジュバントと混合される。限定されないが、完成品は、0.6mlの体積のハンクス緩衝塩溶液(HBSS)に懸濁された、例えば1500~2000万の照射されたDNP修飾メラノーマ細胞を含み得る。

10

#### 【0119】

精製された腫瘍細胞は、短期または長期保存のために、適切な培地、賦形剤、溶液、または容器に入れることができる。前記保存は、細胞を冷蔵または冷凍環境に維持することを必要とする場合がある。腫瘍細胞は、凍結環境で保存する前に急速に凍結することができる。凍結サンプルは、ジメチルスルホキシド(DMSO)、グリセロール、エチレングリコール、スクロース、またはグルコースを含むがこれらに限定されない適切な凍結保存培地または化合物と接触させることができる。適切な培地、賦形剤、または溶液は、ハンクス塩溶液、生理食塩水、細胞増殖培地、または水を含み得るが、これらに限定されない。培地、賦形剤、または溶液は、滅菌されていてもいなくてもよい。

20

#### 【0120】

培地、賦形剤、または溶液は、その後の診断もしくはマニピュレーションのためにサンプルを適切な状態に維持するため、または凝固を防止するために保存剤を含んでもよい。前記保存剤は、クエン酸塩、エチレンジアミン四酢酸、アジ化ナトリウム、またはチメルソル(thimerisol)を含み得る。サンプルはグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、またはメタノールを使用する等の当該技術分野で既知の任意の方法によって、保存前または保存中に固定することができる。容器は、カップ、蓋付きカップ、チューブ、滅菌チューブ、真空チューブ、シリンジ、ボトル、顕微鏡スライド、または任意の他の適切な容器を含むがこれらに限定されない、生体サンプルの保存および/または輸送に適した任意の容器であり得る。容器は、滅菌されていてもいなくてもよい。場合によっては、サンプルは、限定されないがCyttyc ThinPrep、SurePath、MonoPrep等の、その後の細胞学的分析のための細胞の保存に適した市販の調製物に保存されてもよい。

30

#### 【0121】

いくつかの実施形態において、精製された照射腫瘍細胞は、免疫原性を高めるためにアジュバントで刺激される。アジュバントは、それ自体に特定の抗原効果を有することなく、免疫系を刺激してワクチンに対する反応を増加させることができる薬剤である。免疫学的アジュバントは、特定のワクチン抗原と組み合わせて使用すると、抗原特異的免疫応答を加速、延長、または増強するように作用し、特定の疾患に対する免疫増加を提供する任意の物質として定義される。アジュバントは、リポソーム、リポ多糖(LPS)、抗原の分子ケージ、細菌細胞壁の成分、およびエンドサイトーシスされた核酸(二本鎖RNA(dsRNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、および非メチル化CpGジヌクレオチド含有DNA等)を含む、いわゆるPAMPと称される進化的に保存された分子の特定のセットを模倣することによってこのタスクを達成する。免疫系は、これらの特定の抗原性部分を認識するように進化してきたため、ワクチンと組み合わせたアジュバントの存在は、自然感染を模倣することによって樹状細胞(DC)、リンパ球、およびマクロファージの活性を増強することにより、抗原に対する自然免疫応答を高めることができる。さらに、アジュバントは病原性の任意の機能を越えて弱毒化されているため、宿主生物に対して独立

40

50

した脅威をほとんどまたはまったくもたらさない。特定の実施形態において、細胞は、本明細書に記載されるように、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクトドメインでさらに刺激され、および/または組成物は、単離された可溶性S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクトドメインをさらに含む。

#### 【0122】

いくつかの実施形態において、ワクチンを生成するために使用される腫瘍細胞集団は、造血器腫瘍細胞集団（例えば、白血病、リンパ腫または骨髄腫の集団）であり得る。他の実施形態において、前記腫瘍細胞集団は、固形腫瘍細胞集団であり得る。他の実施形態において、前記腫瘍細胞集団は、癌腫細胞集団であり得る。例えば、限定されないが、前記腫瘍細胞集団は、メラノーマ、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、肝臓癌、肺癌、前立腺癌、子宮頸癌または結腸癌細胞を含むがこれらに限定されない固形腫瘍細胞集団であり得る。他の例示的な実施形態において、前記腫瘍細胞集団は、メラノーマ、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、結腸癌または肺癌細胞を含むがこれらに限定されない癌細胞集団であり得る。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。特定の実施形態において、前記腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である。

10

#### 【0123】

本発明の組成物は、様々な方法で投与することができる。非限定的な例として、組成物は、静脈内に、もしくは腹腔内等の固形腫瘍の位置に隣接する体腔内に送達され得るか、または固形腫瘍内にもしくは隣接して直接注入され得る。特定の実施形態において、好ましい経路として、本発明の腫瘍ワクチン組成物は、リンパ内または静脈内注射によって、腫瘍に近接した皮下または皮内注射を介して投与され得る。

20

#### 【0124】

注射用途に適した医薬形態は、滅菌された水溶液または分散液、および滅菌された注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。全ての場合において、形態は無菌でなければならず、容易な注射可能性が存在する程度まで流動性でなければならない。それは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌等の微生物の汚染作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、それらの適切な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒子径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。

30

#### 【0125】

樹状細胞ワクチン接種は、癌特異的T細胞依存性抗腫瘍免疫等のT細胞依存性免疫を誘導するように設計された免疫療法の形態であり、DCを使用した耐久性のある完全な応答をもたらすことができる。DCワクチン接種の重要なステップは、T細胞に対する疾患特異的抗原の効率的な提示である。DCは、T細胞に抗原を捕捉、処理、および提示するそれらの能力によって、ワクチン接種の必要不可欠な成分である。活性化された（成熟した）抗原負荷DCは、抗原特異的T細胞の、特有の機能およびサイトカインプロファイルを示すエフェクターT細胞への分化を開始する。「DC成熟」はさらに、DCの未成熟な表現型から成熟した表現型への分化を指し、（1）抗原捕捉活性の低下、（2）表面MHCクラスII分子および共刺激分子の発現増加、（3）遊走を導くケモカイン受容体（例えば、CCR7）の獲得、および（4）T細胞の分化を制御する異なるサイトカイン（例えば、インターロイキン12 [IL-12]）を分泌する能力を含む、多様な細胞変化に関連している。いくつかの実施形態によれば、細胞は、治療される疾患の病因および/またはは病態に関連する抗原でパルスまたは負荷される。

40

#### 【0126】

本発明のDCワクチンは、いくつかの実施形態において、少なくとも1つの癌関連抗原でパルスされた本発明のDC細胞調製物を含み、前記ワクチンは、薬学的に許容される担体、賦形剤および/またはアジュバントをさらに含む。

#### 【0127】

50

本明細書で使用される場合、単数または複数の抗原（例えば、腫瘍細胞溶解物等の腫瘍関連抗原）でDCに負荷を与えることに関連する「抗原負荷」または「抗原パルス」という用語は、DCが抗原（複数可）を取り込み（例えば、貪食し）、かつ/または抗原（複数可）もしくはDC細胞表面上のMHC分子に関連する抗原（複数可）由来のペプチドを発現するのを可能にするのに十分な条件下で、DCと抗原（複数可）を接触させることを意味する。

【0128】

本明細書で使用される「抗原の食作用および/または発現を可能にするのに十分な条件」という表現は、適切な培地中で、免疫原の捕捉と、免疫系の他の細胞への前記免疫原のプロセッシングおよび提示を可能にするのに十分な時間、樹状細胞をインキュベートすることを指す。

10

【0129】

細胞集団および組成物は、ヒトの治療において使用するための任意の便利な方法での投与のために配合され得る。ヒトへのインビボ投与のために、本明細書に開示される細胞および組成物は、薬学的に有用な組成物を調製するために使用される既知の方法に従って配合することができる。DCは、単一の活性物質として、または薬学的に適切な希釈剤（例えば、Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、保存剤（例えば、チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン）、乳化剤、可溶化剤、アジュバントおよび/もしくは担体とともに、他の既知の活性物質（例えば、1つ以上の化学療法剤）と混合して組み合わせることができる。いくつかの実施形態において、細胞は、非経口経路による投与のために配合される。「非経口」という用語は、皮下注射、静脈内、筋肉内、大槽内注射、または注入技術を含む。腫瘍内注射、および直接臓器内注射（例えば、脾臓内または肝臓内注射）も含まれる。注射または注入技術のために、DCは、限定されないが、PBSまたは抗凝固剤を含むPBS等の任意の適切な注射緩衝液に懸濁され得る。

20

【0130】

別の態様では、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作された細胞集団を含む細胞ワクチンを前記対象に投与することを含む、癌の治療を必要とするヒト対象の癌を治療するための方法が提供される。

【0131】

医薬組成物

他の実施形態において、本発明の方法で使用されるSLAMF6<sup>var3</sup>エクトドメインおよびそのアゴニストは、任意選択的に薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤をさらに含む、医薬組成物の形態で提供される。

30

【0132】

前記組成物は、溶液、懸濁液、使用前に適切なビヒクルまたは希釈剤で再構成される凍結乾燥粉末、カプセル、錠剤、徐放性製剤等を含むがこれらに限定されない、患者への投与に適した任意の医薬形態であり得る。組成物は、好ましくは精製された形態の、本発明の治療有効量の薬剤と、医薬賦形剤と、を含み得る。本明細書で使用される場合、「医薬賦形剤」は、薬学的投与に適合する、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等、ならびにそれらの組み合わせを含む。これ以降、「治療的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という語句は、互換的に使用されてもよく、生物に著しい刺激を引き起こさず、投与される化合物の生物学的活性および特性を抑制しない担体または希釈剤を指す。組成物はまた、補助的、追加的、または増強された治療的機能を提供する他の活性化合物を含んでもよい。別の実施形態において、組成物は、本質的にSLAMF6<sup>var3</sup>エクトドメインまたはそのアゴニストと、1つ以上の医薬賦形剤とからなる。別の実施形態において、組成物は、精製されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクトドメイン（またはそのアゴニスト）と、1つ以上の医薬賦形剤とからなる。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

40

【0133】

特定の実施形態において、SLAMF6<sup>var3</sup>エクトドメインは、エピトープタグ（例

50

例えば、ポリヒスチジンタグ)および/または血漿半減期延長部分をさらに含む。例えば、SLAMF6<sup>var3</sup>ポリペプチドは、免疫グロブリンまたはその一部に融合またはコンジュゲートされ得る。他の半減期延長物質は、生物学的に適切なポリマーまたはコポリマー、例えば、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコール等のポリアルキレングリコール化合物を含む。他の適切なポリアルキレングリコール化合物は、限定されないが、以下の種類の家電または中性ポリマーを含む：デキストラン、ポリリジン、コロミン酸または他の炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマー、およびビオチン誘導体。

【0134】

本発明による半減期延長部分の他の例として、エチレングリコールのコポリマー、プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(例えば、ポリリジン)、デキストランn-ビニルピロリドン、ポリn-ビニルピロリドン、プロピレングリコールホモポリマー、プロピレンオキシドポリマー、エチレンオキシドポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、直鎖もしくは分岐グリコシル化鎖、ポリアセタール、長鎖脂肪酸、長鎖疎水性脂肪族基、免疫グロブリン軽鎖および重鎖、免疫グロブリンFcドメインもしくはその一部(参照、例えば、米国特許第6,660,843号)、FcのCH<sub>2</sub>ドメイン、アルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン(HSA))；例えば、米国特許第6,926,898号およびUS2005/0054051；米国特許第6,887,470号)、トランスサイレチン(TTR；例えば、US2003/0195154 A1；2003/0191056 A1を参照)、またはチロキシン結合グロブリン(TBG)が挙げられる。

【0135】

得られるポリペプチドまたはコンジュゲートは、SLAMF6<sup>var3</sup>が媒介する活性が、本明細書に記載されるように、実質的に維持されるように選択されることを理解されたい。

【0136】

様々な他の実施形態において、SLAMF6<sup>var3</sup>特異的抗体等のSLAMF6<sup>var3</sup>アゴニストの使用が企図される。本明細書で使用される「抗体(単数)」または「抗体(複数)」という用語は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体またはその断片を指し、限定されないが、ヒト免疫グロブリン定常領域を有する全長抗体、モノクローナルIgG、一本鎖抗体、ヒト化モノクローナル抗体、F(ab')<sub>2</sub>断片、F(ab)断片、Fv断片、標識抗体、固定抗体および異種化合物とコンジュゲートした抗体を含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。一実施形態において、抗体はモノクローナル抗体である。別の実施形態において、抗体はポリクローナル抗体である。別の実施形態において、抗体はヒト化抗体である。

【0137】

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を生成する方法は、当該技術分野で周知である。抗体は、いくつかの既知の方法のいずれか1つによって生成することができ、抗体分子のインビボ産生の誘導、免疫グロブリンライブラリーのスクリーニング、または培養中の連続細胞株によるモノクローナル抗体分子の生成を利用することができる。これらは、限定されないが、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびエプスタイン・バー・ウイルス(EBV)ハイブリドーマ技術を含む。抗体をインビボで生成する従来の方法に加えて、当該技術分野で周知の方法によって、ファージディスプレイ技術を用いてインビトロで抗体を生成することができる(例えば、Current Protocols in Immunology, Colligan et al (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), Chapter 17, Section 17.1)。

【0138】

本発明の医薬組成物は、当該技術分野で周知のプロセスによって、例えば、従来の混合、溶解、造粒、粉碎、微粉碎、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、封入または凍結乾

燥プロセスによって製造されてもよい。本発明の医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように配合される。投与を達成する方法は、当業者に既知である。組成物を配合するための適切な賦形剤および様式の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」の最新版に記載されている。

【0139】

本発明による医薬組成物（例えば、SLAMF6<sup>var3</sup>エクトドメインを含む）は、典型的には、注射または注入に適した液体製剤である。医薬組成物の投与の例として、経口摂取、吸入、静脈内および持続注入、腹腔内、筋肉内、腔内、皮下、皮膚、または経皮投与が挙げられる。ある特定の実施形態によれば、組成物は、病巣内（例えば、腫瘍内）投与に適している。他の実施形態において、組成物は静脈内投与に適している。

10

【0140】

例えば、生理食塩水、ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液を、特に注射液のための液体担体として用いることができる。適切な医薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦、チヨーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等を含む。

【0141】

静脈内投与に使用される溶液または懸濁液は、典型的には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, NJ）、エタノール、またはポリオール等の担体を含む。全ての場合において、容易な注射針通過性のために、組成物は無菌かつ流動的でなければならない。適切な流動性は、多くの場合、レシチンまたは界面活性剤を使用して得ることができる。組成物はまた、製造および保存の条件下で安定でなければならない。微生物の予防は、抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成することができる。多くの場合、等張剤（糖）、多価アルコール（マンニトールおよびソルビトール）、または塩化ナトリウムが組成物中に含まれてもよい。組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを添加することにより達成することができる。必要な場合、組成物はまた、注射部位の痛みを和らげるためにリグノカイン等の局所麻酔薬を含んでもよい。一般に、成分は別々に、または単位投与剤型と一緒に混合されて、例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェ等の密閉容器中の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給される。組成物が注入によって投与される場合、無菌の医薬品グレードの水または生理食塩水を含む輸液ボトルで分注することができる。組成物が注射によって投与される場合、投与前に成分が混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

20

30

【0142】

経口組成物は、不活性希釈剤または食用担体を含む。組成物は、ゼラチンに封入するか、または錠剤に圧縮することができる。経口投与の目的のために、活性剤を賦形剤とともに組み込み、錠剤、トローチ、またはカプセルに入れることができる。薬学的に適合する結合剤またはアジュバント材料を組成物に含めることができる。錠剤、トローチ、およびカプセルは、微結晶性セルロース、トラガカントガムもしくはゼラチン等の結合剤；デンプンもしくはラクトース等の賦形剤；アルギン酸、Primogel、もしくはコーンスターチ等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素等の流動促進剤；または甘味剤もしくは香剤を任意選択的に含んでもよい。

40

【0143】

組成物はまた、経粘膜または経皮経路によって投与されてもよい。例えば、Fc部分を含む抗体は、（Fc受容体を介して）腸、口、または肺の粘膜を通過することが可能であり得る。経粘膜投与は、ロゼンジ、鼻腔用スプレー、吸入器、または坐剤の使用を通して達成することができる。経皮投与も、当該技術分野で既知の軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームを含む組成物の使用を通して達成され得る。経粘膜投与または経皮投与の場合、透

50

過する障壁に適した浸透剤が使用される。吸入による投与の場合、抗体は、噴射剤（例えば、液体または気体）またはネブライザーを含む加圧容器またはディスペンサーからのエアロゾルスプレーの状態で送達される。組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリド等の担体とともに、坐剤として配合することができる。

#### 【0144】

皮内または皮下投与に使用される溶液または懸濁液は、典型的には、以下の成分の少なくとも1つを含む：水、生理食塩液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒等の滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベン等の抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等のキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩等の緩衝剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロース等の等張化剤。pHは、酸または塩基で調整することができる。そのような調製物は、アンプル、使い捨て注射器、または複数回投与用バイアルに封入され得る。

10

#### 【0145】

特定の実施形態において、ポリペプチド活性剤（例えば、SLAMF6<sup>Var3</sup>エクトドメイン）は、体からの急速な排出からポリペプチドを保護するための担体とともに調製される。生分解性ポリマー（例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）がしばしば使用される。そのような製剤の調製方法は、当業者に知られている。リポソーム懸濁液も、薬学的に許容される担体として使用され得る。リポソームは、当該技術分野で既知の確立された方法に従って調製することができる（米国特許第4,522,811号）。他の特定の実施形態において、PEG部分または糖脂質を含むリポソームは、血漿中滞留性を向上させるため、および/または肝臓取り込みを低減させるために有利に使用され得る。

20

#### 【0146】

いくつかの実施形態において、より大きなリポソーム（例えば、300nm以上）が使用され、それらは脾臓による取り込みおよびクリアランスを優先的に媒介し、低減した肝臓クリアランスを有する。他の実施形態において、より小さなリポソーム（例えば、40nm以下）が使用され、それらは肝臓の取り込みおよびクリアランスを優先的に媒介する。さらに他の実施形態において、40~300nmのリポソームが使用され、それらは血漿中滞留性を向上させ得る。他の実施形態において、リポソームはさらに、PEG等のポリマーを含んでもよい。US2011/160642は、肝臓および脾臓における蓄積が減少したペグ化リポソーム製剤を開示している。細網内皮系による取り込みを回避し、より長時間循環するように配合された様々なリポソームが、米国特許第6,284,267号に記載されている。

30

#### 【0147】

さらに、本発明のSLAMF6<sup>Var3</sup>エクトドメインまたはアゴニストは、異種ポリペプチド、薬物、放射性ヌクレオチド、または毒素等の様々なエフェクター分子とともに投与され得る。したがって、いくつかの実施形態において、SLAMF6<sup>Var3</sup>エクトドメインまたはアゴニストは、癌治療、例えば、放射線照射または化学療法と組み合わせて（同時または連続的に）投与されてもよい。

40

#### 【0148】

連続的および断続的な静脈内投与は、埋め込み型または外部ポンプ（例えば、INFUSIONポンプ）を使用して達成することができる。そのようなポンプの使用および必要なパラメータに対する投与プロトコルの調整は、十分に当業者の能力の範囲内である。

#### 【0149】

別の実施形態において、本発明のSLAMF6<sup>Var3</sup>ポリペプチドまたはアゴニストの投与または添加は、他の免疫調節因子、例えば、免疫細胞機能に対する修飾効果を示すシグナル伝達受容体標的化試薬の投与と組み合わせて（同時または連続的に）行われ得る。そのような試薬の例として、CTLA-4、PD-1、またはPD-L1のアンタゴニストまたは阻害剤（抗体等）が挙げられる。市販のまたは臨床試験中の抗体の非限定的な例

50

として、CTLA-4 ブロッキング抗体 (YERVOY (商標)、BMS、1 ~ 3 mg / kg でのクリニックでの使用が承認されている)、PD-1 ブロッキング抗体 (KEYTRUDA (商標)、Merck、0.5 ~ 2 mg / kg ; OPDIVO (商標)、BMS、1 ~ 3 mg / kg)、および PD-L1 標的化抗体 (ROCHE、臨床試験中) が挙げられる。

【0150】

他の態様によれば、本発明は、SLAMF6<sup>var3</sup> エクトドメインまたはそのアゴニストを含むポリペプチドと、本発明の方法においてポリペプチドを使用するための指示書と、を含むキットに関する。

【0151】

別の実施形態において、組成物は、追加の抗原をさらに含むワクチンの形態で投与されない。別の実施形態において、組成物は、ワクチン接種に適合した治療レジメンによって投与されない。ワクチンおよびワクチン接種プロトコルは、当該技術分野で周知である。ワクチンは、典型的には、所望の免疫応答が誘発される1つ以上の抗原 (例えば、弱毒化された癌細胞または腫瘍関連抗原) を含み、免疫応答を促進または増強するために使用される追加のアジュバント (例、ミョウバンまたは鉱油) を含むことが多い。

【0152】

「有効量」または「治療有効量」は、本発明の方法において有益な結果を発揮するのに十分な量を指す。より具体的には、治療有効量は、障害 (例えば、癌) の症状を予防、緩和、もしくは改善する、または治療される対象の生存を延長するのに有効な活性成分 (例えば、SLAMF6<sup>var3</sup> エクトドメインまたは細胞組成物) の量を意味する。したがって、本発明の単離された SLAMF6<sup>var3</sup> エクトドメインは、いくつかの実施形態において、抗腫瘍免疫の誘導または増強を必要とするヒト対象において抗腫瘍免疫を誘導または増強するのに有効な量で使用され得る。本明細書に示されるように、本発明の組成物および方法は、有利には増強された抗腫瘍活性を提供する。したがって、ある特定の実施形態において、本発明の組成物および方法に関連して使用される有効量は、従来の組成物および方法 (例えば、SLAMF6<sup>var1</sup> エクトドメインの投与) と比較して、最大5%、10%、15%、20%、または最大50%まで都合よく低減され得る。

【0153】

治療上の使用

別の態様では、SLAMF6<sup>var3</sup> を差次的に発現するように操作されたT細胞を対象に投与することを含む、癌の治療を必要とするヒト対象の癌を治療するための方法が提供される。一実施形態において、T細胞は、SLAMF6<sup>var3</sup> 発現を選択的に上方制御するように操作されている。別の実施形態において、T細胞は、SLAMF6<sup>var1</sup> 発現を選択的に下方制御するように操作されている。さらに別の実施形態において、T細胞は、SLAMF6<sup>var3</sup> 発現を選択的に上方制御し、SLAMF6<sup>var1</sup> 発現を選択的に下方制御するように設計されている。別の実施形態において、前記T細胞は自家性である。別の実施形態において、前記T細胞は、前記対象と組織適合性の同種T細胞である。

【0154】

別の実施形態において、方法は、

- a) 対象から、または対象と組織適合性のあるドナーからT細胞を得ることと、
- b) 細胞をエクスピゴで調節して、SLAMF6<sup>var3</sup> を差次的に発現させることと、
- c) 得られたT細胞を前記対象に養子移入し、それによって前記対象の癌を治療することと、を含む。

【0155】

別の実施形態において、T細胞は、前記対象への投与前に、単離されたSLAMF6<sup>var3</sup> エクトドメインとのインキュベーションによってさらに増殖および/または活性化される。

【0156】

別の態様では、本発明は、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための

10

20

30

40

50

、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>を差次的に発現するように操作されたT細胞に関する。一実施形態において、T細胞は、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作されている。追加的または代替的に、T細胞は、S L A M F 6<sup>v a r 1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。様々な実施形態において、前記T細胞は、自家性であるか、または前記対象と組織適合性の同種T細胞である。別の実施形態において、前記T細胞は、対象の、または前記対象と組織適合性のあるドナーのエキスピボT細胞を調節して、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>を差次的に発現させることと、得られたT細胞を癌治療のための養子移入組成物として配合することと、を含む方法によって生成されている別の実施形態において、前記T細胞は、単離されたS L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクドメインとのインキュベーションによってさらに増殖および/または活性化されている（例えば、癌治療のための養子移入組成物としての配合前、または前記組成物を前記対象に養子移入する前）。

10

## 【0157】

別の態様では、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>を差次的に発現するように操作された細胞集団を含む細胞ワクチンを前記対象に投与することを含む、癌の治療を必要とするヒト対象の癌を治療するための方法が提供される。一実施形態において、細胞集団は腫瘍細胞集団であり、細胞ワクチンは腫瘍細胞ワクチンである。特定の実施形態において、腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である。別の実施形態において、細胞集団は樹状細胞(DC)であり、細胞ワクチンはDCワクチンである。別の実施形態において、細胞集団は、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作されている。別の実施形態において、T細胞は、S L A M F 6<sup>v a r 1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。さらに別の実施形態において、T細胞は、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>発現を選択的に上方制御し、S L A M F 6<sup>v a r 1</sup>発現を選択的に下方制御するように設計されている。別の実施形態において、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>を外因的に発現するように操作されている。

20

## 【0158】

別の態様では、本発明は、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>を差次的に発現するように操作された細胞集団を含む治療用細胞組成物が提供される。一実施形態において、細胞集団は腫瘍細胞集団であり、細胞ワクチンは腫瘍細胞ワクチンである。特定の実施形態において、腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である。別の実施形態において、細胞集団は樹状細胞(DC)集団であり、細胞ワクチンはDCワクチンである。いくつかの実施形態において、細胞集団は、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作されている。追加的または代替的に、細胞集団は、S L A M F 6<sup>v a r 1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。他の実施形態において、S L A M F 6<sup>v a r 3</sup>を外因的に発現するように操作されている。

30

## 【0159】

別の態様では、本発明は、癌の治療を必要とするヒト対象の癌を治療するための方法であって、有効量の単離されたヒトS L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクドメインを、対象に投与するか、または前記対象のT細胞と接触させ、それによって前記対象の癌を治療することを含む、方法を含む。一実施形態において、方法は、前記対象に有効量の単離されたヒトS L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクドメインを投与することを含む。別の実施形態において、方法は、前記対象のT細胞を、前記T細胞を増殖および/または活性化するのに有効な量の単離されたS L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクドメインとエキスピボで接触させることと、得られたT細胞を前記対象に養子移入し、それによって前記対象の癌を治療することと、を含む。

40

## 【0160】

別の態様では、本発明は、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための単離されたヒトS L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクドメインに関する。一実施形態において、単離されたヒトS L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクドメインは、前記対象の癌を治療するのに有効な量での前記対象への投与によって使用するためのものである。別の実施形態において、単離されたヒトS L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクドメインは、前記対象のT細胞を、前記T細胞を増殖および/または活性化するのに有効な量の前記単離されたヒトS L A M F 6<sup>v a r 3</sup>エクドメインとエキスピボで接触させることと、得られたT細胞を前記対象に養子移入し、

50

それによって前記対象の癌を治療することによって使用するためのものである。別の実施形態において、単離されたヒトSLAMF6<sup>Var3</sup>エクトドメインは、哺乳動物発現系で、N<sup>1</sup>SLAMF6<sup>Var1</sup>シグナルペプチドに融合した、単離されたヒトSLAMF6<sup>Var3</sup>エクトドメインを含むポリペプチド前駆体を発現させることと、得られたエクトドメインポリペプチドを単離することと、を含むプロセスによって作製されている。特定の実施形態において、ポリペプチド前駆体は、配列番号15に示されるアミノ酸配列を有する。

【0161】

治療有効量（対象の癌を治療するのに有効な量等）の決定は、特に本明細書で提供される詳細な開示に照らして、十分に当業者の能力の範囲内である。本明細書に記載される活性成分の毒性および治療有効性は、細胞培養または実験動物におけるインビトロでの標準的な製薬手順によって決定することができる。これらのインビトロおよび細胞培養アッセイならびに動物試験から得られたデータは、ヒトに使用するための様々な投与量を処方する際に使用することができる。投与量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて異なり得る。正確な処方、投与経路、および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択され得る（例えば、Fingl, E. et al. (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Ch. 1, p. 1を参照）。

【0162】

例えば、限定されないが、（例えば、本明細書に開示されるキメラポリペプチド前駆体の発現により生成される）単離されたヒトSLAMF6<sup>Var3</sup>エクトドメインの投与に適した用量範囲は、0.01~50mg/kg、典型的には0.05mg/kg~40mg/kg、例えば、0.1~20、0.05~0.5、0.1~1、1~10、2~20または1~40mg/kgである。投与は、例えば、7~90日ごと、例えば、投与間は7、10、14、30、60または90日であり得る。治療は、臨床的利益を維持し、治療プログラム全体の毒性を制限することを回避するために、担当医によって維持または調整されてもよいことを理解されたい。

【0163】

いくつかの例示的な実施形態において、T細胞（例えば養子移入療法のためのT細胞組成物）を増殖および/または活性化するのに有効な単離されたヒトSLAMF6<sup>Var3</sup>エクトドメインの量は、例えば0.1~400μg/ml、典型的には1~200μg/ml、例えば、10~50、2~100、または50~200μg/mlであり得る。例えば、限定されないが、癌の養子移入治療のためのT細胞組成物は、1ng/ml~1μg/ml、好ましくは10~100ng/mlの抗CD3抗体（例えば、30ng/mlのOKT3抗体）と、1~200μg/ml、好ましくは10~50μg/mlの単離されたヒトSLAMF6<sup>Var3</sup>エクトドメインの存在下で、照射PBMC（フィーダー細胞として）で対象の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）200:1~1:300、例えば、1:200~1:100のTIL対PBMCの比でインキュベートすることを含む、改変された急速増殖プロトコルによって生成され得る。インキュベーションは、5~15日、典型的には8~15日であり得る。

【0164】

様々な実施形態において、本発明の組成物および方法は、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療において、例えば、限定されないが、非固形癌、例えば、全種類の白血病等の造血器腫瘍、例えば、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、骨髄異形成症候群（MDS）、マスト細胞白血病、有毛細胞白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫および多発性骨髄腫の治療または阻害、ならびに頭頸部腫瘍、唇および口腔内の腫瘍、咽頭、喉頭、副鼻腔、大唾液腺、甲状腺、食道、胃、小腸、結腸、結腸直腸、肛門管、肝臓、胆嚢、肝外胆管、ファーター膨大部、膵外分泌部、肺、胸膜中皮腫、骨、軟部組織肉腫、皮膚の癌腫および悪性メラノーマ、乳房、外陰部、膣、子宮頸部、子宮体部、卵巣、卵管、妊娠性絨毛腫瘍、陰茎、前立腺、精巣、腎臓、腎盂、尿管、膀胱、尿道、

10

20

30

40

50

眼瞼癌腫、結膜癌腫、結膜の悪性メラノーマ、ブドウ膜の悪性メラノーマ、網膜芽細胞腫、涙腺の癌腫、眼窩の肉腫、脳、脊髄、血管系、血管肉腫およびカポジ肉腫等の固形腫瘍の治療または阻害に使用され得る。ある特定の実施形態において、治療される癌は、メラノーマ、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、肝臓癌、肺癌、前立腺癌、子宮頸癌または結腸癌からなる群から選択される。他の実施形態において、前記癌は、メラノーマ、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、結腸癌または肺癌細胞からなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。特定の実施形態において、前記癌はメラノーマである。

【0165】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物および方法によって治療される前記癌は、SLAMF6および/またはその1つ以上のバリエーションの表面発現を特徴とする。例えば、癌は、SLAMF6<sup>var1</sup>、SLAMF6<sup>var2</sup>、SLAMF6<sup>var3</sup>、SLAMF6<sup>var4</sup>またはそれらの任意の組み合わせの表面発現を特徴としてもよく、各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。他の実施形態において、前記癌は、SLAMF6および/またはその1つ以上のバリエーションの実質的な（検出可能な）表面発現の欠如を特徴とする。例えば、癌は、SLAMF6<sup>var1</sup>、SLAMF6<sup>var2</sup>、SLAMF6<sup>var3</sup>、SLAMF6<sup>var4</sup>またはそれらの任意の組み合わせの実質的な表面発現の欠如を特徴としてもよく、各可能性は本発明の別個の実施形態を表す。例えば、限定されないが、癌がSLAMF6<sup>var1</sup>の表面発現を特徴とする場合、前記癌の治療に有用な細胞ワクチン（例えば自家細胞ワクチン）は、SLAMF6<sup>var1</sup>表面発現を低下させるように（および/またはSLAMF6<sup>var3</sup>発現を誘導するように）エキスピボで調節された対象の弱毒腫瘍細胞を含み得る。癌がSLAMF6<sup>var1</sup>の実質的な表面発現を欠いている場合、前記腫瘍細胞ワクチンは、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を誘導または増強するようにエキスピボで調節された細胞集団を含み得る。

【0166】

別の態様では、本発明は、SLAMF6<sup>var3</sup>を差次的に発現するように操作された細胞集団を含む治療用細胞組成物を提供する。様々な実施形態において、組成物は、養子移入T細胞組成物、腫瘍細胞ワクチンおよびDCワクチンからなる群から選択される。一実施形態において、細胞集団はヒトT細胞集団であり、組成物は養子移入T細胞組成物である。別の実施形態において、細胞集団はヒト腫瘍細胞集団であり、細胞ワクチンは腫瘍細胞ワクチンである。特定の実施形態において、前記腫瘍細胞集団はメラノーマ細胞集団である。さらに別の実施形態において、細胞集団はヒトDC集団であり、細胞ワクチンはDCワクチンである。別の実施形態において、細胞集団は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御するように操作されている。別の実施形態において、T細胞は、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。さらに別の実施形態において、T細胞は、SLAMF6<sup>var3</sup>発現を選択的に上方制御し、SLAMF6<sup>var1</sup>発現を選択的に下方制御するように操作されている。別の実施形態において、細胞集団は、SLAMF6<sup>var3</sup>を外因的に発現するように操作されている。別の態様では、癌の治療を必要とするヒト対象の癌の治療に使用するための、本明細書に記載のSLAMF6<sup>var3</sup>を差次的に発現するように操作された細胞集団を含む治療用細胞組成物が提供される。

【0167】

別の態様では、治療用細胞組成物を生成する方法であって、  
 a) T細胞、腫瘍細胞およびDCからなる群から選択される細胞集団を得ることと、  
 b) 前記細胞をエキスピボで調節して、SLAMF6<sup>var3</sup>を差次的に発現させることと、を含む、方法が提供される。

【0168】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態をさらに詳しく示すために提示される。しかしながら、それらは決して本発明の広い範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0169】

## 材料および方法

### スプライスバリエーションmRNAの検出

mRNAは、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)、Jurkat T細胞、CD8<sup>+</sup>腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、およびSLAMF6トランスフェクトメラノーマ細胞から抽出した。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)は、以下のように、異なるSLAMF6バリエーションに対して異なるサイズのPCR産物を生成するように設計されたプライマーを用いて行った。

フォワードプライマー - GCGGAAAGCATGTTGTGGCTG (エクソン1、配列番号2) ;

リバースプライマー - GGAGACAGTGAGGTTTGGCTG (エクソン3、配列番号3)。

#### 【0170】

定量的RT-PCRでは、Jurkat細胞( $4 \times 10^6$ )を、PMA(200 ng/ml)およびイオノマイシン(300 ng/ml)の存在下で、24ウェルプレートで48時間37°Cでインキュベートした。細胞を回収し、製造業者のプロトコルに従ってGeneLute Mammalian Total RNAキット(Sigma、RTN70)を使用してRNAを単離した。次いで、qScript cDNA合成キット(Quanta、95047-100)を使用して、RNAをcDNAに転写した。

#### 【0171】

リアルタイムPCRは、PerfeCT SYBR Green FastMIX ROX (Quanta、95073-012)を使用して行った。使用したプライマーは以下のとおりである。

SLAMF6<sup>var1</sup>+SLAMF6<sup>var2</sup>フォワード: CTGTTCCAATCGCTCCTGTT (配列番号: 4) ;

SLAMF6<sup>var1</sup>+SLAMF6<sup>var2</sup>リバース: GGGGTTAAGCTGCTTTGTGA (配列番号: 5) ;

SLAMF6<sup>var4</sup>フォワード: CTGTTCCAATCGCTCCTGTT (配列番号6)。

SLAMF6<sup>var4</sup>リバース: CAGATGGAGCTCACAGGTCA (配列番号: 7) ;

SLAMF6<sup>var3</sup>フォワード: CTGTTCCAATCGCTCCTGTT (配列番号: 8) ;

SLAMF6<sup>var3</sup>リバース: CAGGGAGTAGGACTGGGTGA (配列番号9)。

#### 【0172】

### CRISPR-Cas9プラスミド

SLAMF6特異的CRISPR-Cas9ゲノム編集用の核酸構築物を生成するために、下の表1に指定される配列を、本質的には記載されているように(Wuet al. 2016、同所)、ベクターpSpCas9(BB)-2A-GFP(Addgene、Cambridge, MA)にクローニングした。構築物1はエクソン2を標的としているため、SLAMF6<sup>var1</sup>のみに影響を与えるが、構築物2はシグナルペプチド領域を標的としているため、3つのバリエーション全てに影響を与える。表1は、転写されたシングルガイドRNA(sgRNA)配列の配列を指定する。

10

20

30

40

50

## 【表 1】

表 1. 遺伝子編集用の S g R N A 配列

配列番号	詳細	配列
10	構築物 1 (SLAMF6 <sup>var1</sup> 特異的)、シングルガイド RNA、フォワード (SgRNA Fw)	CACCGAGAATCCCGTTCACCATCAA
11	構築物 1、SgRNA リバース (Rev)	AAACTTGATGGTGAACGGGATTCT
12	構築物 2 (バリエント非特異的)、SgRNA Fw	CACCGAGAAGACAAACAGGAGCGATGTT
13	構築物 2、SgRNA Rev	AAACAACATCGCTCCTGTTTGTCTTCT

10

## 【 0 1 7 3 】

SLAMF6 ノックアウト (KO) Jurkat 細胞の生成

Jurkat 細胞を RPMI - / - で 2 回洗浄し、 $10 \times 10^6$  細胞 / ml の RPMI に再懸濁した。ECM 630 Electro Cell Manipulator (BTX Harvard) を 260 V、975  $\mu$ F、1575 で使用して、 $5 \times 10^6$  Jurkat 細胞を SLAMF6 - CRISPR プラスミド 5  $\mu$ g とともに Biorad 0.4 cm キュベット中でエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後、完全 RPMI 培地に細胞を直ちに播種した。トランスフェクションの 48 時間後、GFP を発現する細胞をソーティング (ARIA - III Sorter) により選択した。NT-7 抗体 (Biolegend、バリエント 1 および 2 を特異的に認識する) を使用した単一細胞選別によりヒト SLAMF6 を欠く細胞を選択し、コロニーの確立のために培養した。

20

## 【 0 1 7 4 】

メラノーマ細胞上での異常な SLAMF6 発現

異なる SLAMF6 バリエントをコードする pCDNA3.1 + / C - (K) DYK プラスミドを GenScript から購入した (クローン ID: SLAMF6<sup>var1</sup>、SLAMF6<sup>var3</sup>、および SLAMF6<sup>var4</sup> のための OHu04772、OHu04774、OHu04776、それぞれ、アクセション番号 NM\_001184714.1、NM\_001184715.1 および NM\_001184716.1)。リポフェクタミンを使用してヒトメラノーマ細胞をトランスフェクトした。G-418 耐性メラノーマ細胞をサブクローニングし、安定にトランスフェクトされた細胞を実験に使用した。SLAMF6<sup>var1</sup> の場合、細胞を抗 NTB-A 抗体 (NT-7、Biolegend) で染色し、ソートした (ARIA - III)。陽性細胞を培養して実験に使用した。

30

## 【 0 1 7 5 】

インターフェロン (IFN - ) の分泌

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL、 $1 \times 10^5$ ) を、指示された標的メラノーマ細胞と 1 : 1 の比で一晩共培養した。別のタイプの実験では、健康なドナーから末梢血単核細胞を入手し、seSLAMF6 - var3 または IL-2 の存在下で 3 日間インキュベートした。インキュベーション終了時に、細胞を洗浄し、抗 CD3 を結合させた 1  $\mu$ g / ml プレートで一晩活性化した。両方の実験で、馴化培地を回収し、製造業者のプロトコルに従って ELISA (R&D) により IFN - 分泌を検出した。

40

## 【 0 1 7 6 】

細胞内染色

TIL ( $1 \times 10^5$ ) を、指示された標的メラノーマ細胞と 1 : 1 の比で、37 で 6 時間共培養した。2 時間後、プレフェルジン A (eBioscience、1  $\mu$ g / ml) を 4 時間かけて加えた。インキュベーション後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、抗 CD8 抗体 (Biolegend) で染色した。固定および透過処理 (eBioscience プロトコル) に続いて、細胞内 IFN - および腫瘍壊死因子 (TNF - ) を室温で

50

30分間、抗IFN- $\gamma$  および抗TNF- $\alpha$  (Biolegend)で標識した。細胞を透過処理緩衝液で洗浄し、FACS緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリーに供した。

【0177】

インターロイキン2 (IL-2)の分泌

野生型 (WT) Jurkat細胞または単一細胞KO Jurkat細胞 ( $1 \times 10^5$ )を、ホルボール12-ミリストート13-アセタート (PMA、200 ng/ml) およびイオノマイシン (300 ng/ml) を使用して、37°Cで48時間活性化した。馴化培地を回収し、ELISA (R&D) を使用してIL-2分泌を検出した。

【0178】

SLAMF6結合ELISA

Maxisorbプレートを、SLAMF6<sup>var1</sup>のFc融合エクトドメイン (seSLAMF6<sub>-Fc</sub>、Creative Biomart、1  $\mu$ g/ml および4°C) で一晩プレコートした。翌日、プレートを洗浄し、PBSX1中に1%BSAを含むブロッキング緩衝液を使用してブロックした。次に、SLAMF6<sup>var1</sup> (Prospect、seSLAMF6) もしくはSLAMF6<sup>var3</sup> (Novoprotein/Bonopus、seSLAMF6-V3) から、またはSLAMF1、SLAMF7もしくはSLAMF8 (それぞれ、seSLAMF1、seSLAMF7およびseSLAMF8) からの異なる濃度の単離されたエクトドメイン (6-ヒスチジンタグを含む) で、プレートを2時間インキュベートした。受容体結合エクトドメインポリペプチドの量は、ヒスチジンタグ (抗HIS抗体) を標的とする、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗体を使用して検出し、ELISAリーダーを使用して定量化した。

【0179】

細胞生存率アッセイ

Pmelマウス脾細胞を、1  $\mu$ g/mlのgp100 (25-33) ペプチドおよび300 U/mlのIL-2を使用して7日間活性化した。増殖後、脾細胞を洗浄し、カウントし、 $1 \times 10^5$ 細胞をIL-2もしくはseSLAMF6<sup>var3</sup>のいずれかを添加した培地で培養するか、または未処理のままにした (「未処理」)。さらに4日後、細胞を採取し、洗浄し、アネキシンVアポトーシス検出キットで標識した。生存細胞 (アネキシンVおよびヨウ化プロピジウム) の両方に陰性、アネキシンV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) をフローサイトメトリーにより分析した。

【0180】

**実施例1** ヒトメラノーマ細胞でのSLAMF6バリエーション3の異常な発現は、抗メラノーマT細胞活性の増強をもたらす

SLAMF6相互作用をトランスで (隣接する細胞間で) 評価するために、またSLAMF6は、典型的には造血細胞でのみ発現されるため、SLAMF6を異常に発現するメラノーマ標的細胞を生成した。このために、SLAMF6バリエーションを、上記のようにpcDNA3.1+/C-(K)DYKプラスミド (Genscript) を使用して、メラノーマ株526melにおいて安定に発現させた。トランスフェクトされたメラノーマ細胞における異なるバリエーションのmRNA発現を図1に示す。

【0181】

古典的SLAMF6 (var1) は、同族 (A2<sup>+</sup>) 抗メラノーマTILを刺激する能力の低下を示した。対照的に、SLAMF6<sup>var3</sup> (526mel-var3) をトランスフェクトしたメラノーマ細胞は、IFN- $\gamma$  分泌 (図2A~図2B)、ならびにIFN- $\gamma$  およびTNF- $\alpha$  を発現するCD8<sup>+</sup>細胞の割合増加 (図3A~図3B) によって決定されるように、抗メラノーマTILを刺激する能力の増加を予期せず実証した。図2A~図3Bにさらに見られるように、SLAMF6<sup>var4</sup> をトランスフェクトしたメラノーマ細胞は、これらの実験条件下で抗メラノーマTILを刺激する能力の増加を示さなかった。

【0182】

図2A~図2Bに記載される実験では、mel526株のSLAMF6をトランスフェクトしたメラノーマ細胞を、メラノーマ患者3人 (676、463、209) のHLA適

10

20

30

40

50

合腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) と一晩共培養した。培養中の I F N -  $\gamma$  を E L I S A で測定した。値を親 m e l 5 2 6 と比較する。各 T I L を 2 つの独立した実験で試験した ( 図 2 A に示す ) 。 2 つの実験における 3 つの T I L からのデータを組み合わせた概要を図 2 B に示す。

#### 【 0 1 8 3 】

図 3 A ~ 図 3 B に記載される実験では、 T I L 2 0 9 (  $1 \times 10^5$  ) を、指示された標的メラノーマ細胞と 1 : 1 の比で、 3 7 ° C で 6 時間共培養した。 2 時間後、プレフェルジン A を加えた。インキュベーション終了時に、細胞を P B S で 2 回洗浄し、抗 C D 8 で染色した。固定および透過処理に続いて、細胞内 I F N -  $\gamma$  および T N F -  $\alpha$  を標識した。細胞を透過処理緩衝液で洗浄し、 F A C S 緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリーに供した。図 3 A : ドットプロット、図 3 B : 陽性細胞の割合を示す 3 点測定の概要。

10

#### 【 0 1 8 4 】

このように、本明細書に提示される結果は、ヒトメラノーマ細胞での S L A M F 6  $\text{var}^3$  の異常な発現は、非トランスフェクト細胞と比較して抗メラノーマヒト C D 8  $^+$  T 細胞活性の増強をもたらす一方で、他の S L A M F 6 バリエーションの異常な発現はそのような増強をもたらさなかったか、またはさらには抗メラノーマ活性の低下をもたらしたことを予期せず実証するものである。

#### 【 0 1 8 5 】

**実施例 2** T 細胞における S L A M F 6 バリエーションの発現と、それが T 細胞応答レベルに与える影響

20

リンパ球における S L A M F 6 バリエーションの役割をさらに探求するために、異なるバリエーションの発現を休止および活性化 T 細胞において R T - P C R によりアッセイした。図 4 A に見られるように、試験した全てのバリエーションの m R N A は、 J u r k a t ( C D 4  $^+$  ) T 細胞、抗メラノーマ T I L ( C D 8  $^+$  )、および P B M C を含む様々な T 細胞集団において検出され、  $\text{var}^1$  m R N A のレベルは全てのセルで最高であった。図 4 A ( 中央パネル、 J u r k a t 細胞 ) および図 4 B にさらに示されるように、全てのバリエーションの発現レベルが T 細胞の活性化後に増加した。

#### 【 0 1 8 6 】

1 つのアミノ酸が異なる S L A M F 6  $\text{var}^1$  と S L A M F 6  $\text{var}^2$  の類似性に起因して、 S L A M F 6  $\text{var}^2$  が鋳型として使用される場合、 S L A M F 6  $\text{var}^1$  を同定するために使用されるプライマーも、同様のサイズを有する P C R 産物を生成することに留意されたい。したがって、図 4 A ~ 図 4 B において、  $\text{var}^1$  は S L A M F 6  $\text{var}^1$  および S L A M F 6  $\text{var}^2$  に対応する m R N A を示し、  $\text{var}^3$  は S L A M F 6  $\text{var}^3$  に対応する m R N A を示し、  $\text{var}^4$  は S L A M F 6  $\text{var}^4$  に対応する m R N A を示す。

30

#### 【 0 1 8 7 】

次に、 S L A M F 6  $\text{var}^1$  を特異的に標的化するか ( 構築物 1、 S L A M F 6  $\text{var}^2$  も標的化する )、または全ての S L A M F 6 バリエーション 1 ~ 4 を非特異的に標的化するか ( 構築物 2 ) のいずれかである 2 つの s g C R I S P R - C a s 9 構築物を使用して、 J u r k a t 細胞の 5 つの単一細胞コロニーを生成した。トランスフェクション後、 S L A M F 6  $\text{var}^1$  および S L A M F 6  $\text{var}^2$  の表面発現を欠く細胞を単一細胞選別によって選択し、コロニーの確立のために培養した。図 5 に見られるように、両方の構築物が S L A M F 6 発現の低下によって特徴付けられる S L A M F 6  $\text{var}^1$  - ノックアウトコロニーを生じた。

40

#### 【 0 1 8 8 】

次いで、得られたコロニーを、活性化刺激 ( P M A およびイオノマイシン ) に対する応答について機能的に試験した。図 6 に見られるように、コロニーの 1 つ ( クローン C ) からのリンパ球は、活性化にตอบสนองして I L - 2 分泌において平均 4 . 5 倍の増加を示した。 R T - P C R によってさらに確認されたように、構築物 1 によるトランスフェクションから得られたクローン C は、 S L A M F 6  $\text{var}^3$  m R N A レベルの低下なしに S L A M F 6  $\text{var}^1$  m R N A レベルが低下することにより特徴付けられる ( 2 つのバリエーションの m R N

50

Aレベル比が約1 : 1になる)。

【0189】

構築物2によるトランスフェクションから生じたクローンDおよびE、ならびにクローンAおよびBを含む残りのクローンでは、追加のSLAMF6スプライスバリエーション(SLAMF6<sup>var3</sup>および/またはSLAMF6<sup>var4</sup>)のmRNA発現がさらに調節される。これらのクローンは、図6に示されるように、クローンCによって示される活性化応答の強化を明らかにできなかったか、またはさらには活性化の大幅な低下を示した。

【0190】

これらの発見の特異性は、SLAMF6特異的遺伝子サイレンシングを用いてさらに確認した。この目的のために、Jurkat細胞(野生型およびクローンCノックアウト細胞)に、エレクトロポレーション(250V、300μF、1000、ECM630 Electro Cell Manipulator BTX HARVARD APPARATUS)を使用して、SLAMF6に対するsiRNAまたはsiRNA対照(QIAGEN)をトランスフェクトした。siRNA配列は非コード領域3'から遺伝子までであるため、SLAMF6の全てのバリエーションをサイレンシングする。エレクトロポレーションの24時間後、細胞をPMAおよびイオノマイシンで48時間活性化し、IL-2分泌を測定した。1元配置分散分析試験 \* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001。図7に見られるように、細胞を抗SLAMF6 siRNAで処理した場合、クローンCで観察された活性化刺激に対する増強された応答は完全に逆転された。

【0191】

したがって、異なるSLAMF6バリエーションの発現レベルは、T細胞の応答および活性化のレベルに影響を与える。SLAMF6<sup>var3</sup>が下方制御されない場合のSLAMF6<sup>var1</sup>の特異的下方制御は、T細胞活性化の増加をもたらすが、SLAMF6バリエーションの非特異的下方制御は、そのような増強はもたらさず、T細胞活性化の低下に関連している可能性がある。

【0192】

実施例3 単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクドメインの合成

以下の配列を発現プラスミド(Novoprotein/BonOpus)にクローニングし、哺乳動物細胞株に組換え発現した。

核酸配列: ATGTTGTGGCTGTTCCAATCGCTCCTGTTTGTCTTCTGCTTTGGCCAGGGAATGTAGTTTCAGTACCCCATGA AACCAAAGTCCAGAAATCCACGTGACTAATCCGAAACAG GGAAAGCGACTGAACCTTCACCCAGTCTACTCCCTGCAAC TCAGCAACCTGAAGATGGAAGACACAGGCTCTTACAGAGC CCAGATATCCACAAAGACCTCTGCAAAGCTGTCCAGTTAC ACTCTGAGGATATTAAGACAACCTGAGGAACATACAAGTTA CCAATCACAGTCAAGCTATTTTCAGAAATATGACCTGTGAGCT CCATCTGACTTGCTCTGTGGAGGATGCAGATGACAATGTC TCATTCAGATGGGAGGCCTTGGGAAACACACTTTCAAGTC AGCCAAACCTCACTGTCTCCTGGGACCCAGGATTTCCAG TGAACAGGACTACACCTGCATAGCAGAGAATGCTGTCAAGT AATTTATCCTTCTCTGTCTCTGCCAGAAAGCTTTGCGAAG ATGTTAAATTC AATATACAGATACCAA AATGGGATCTCA CCACCAACCACCACTGA (配列番号19)。

アミノ酸配列:

MLWLFQSLLFVFCFGPGNVVSVPHETKSP EIHVTNPKQGK RLNFTQSYSLQLSNLKMEDTGSYRAQISTKTS AKLSSSYTL RILRQLRNIQVTNHSQLFQNMTC EHLTCSVEDADDNV SF RWEALGNTLSSQPNLTVSWDPRISSEQDYTC IAENAVSNL SF SVSAQKLCEDVKIQYTDTKMGSHHHHHH (配列番号15)。

10

20

30

40

50

## 【0193】

配列には、N'シグナルペプチド(太字)およびC'6-ヒスチジンタグが含まれる。ポリペプチドをHEK293細胞において発現させたところ、トランスフェクションの5日後に採取された細胞で分泌発現が観察された。得られたSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインポリペプチドを、キレートSFF(Ni)カラムで精製した。

## 【0194】

配列番号15で示されるSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメイン前駆体は、SLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメイン配列に融合した異種シグナルペプチド(すなわち、下線付きのペントペプチド配列をさらに含むことによりSLAMF6<sup>var3</sup>のシグナルペプチドとは異なるSLAMF6<sup>var1</sup>のシグナルペプチド)を含むキメラポリペプチドであるため、作製および単離された、成熟した処理済みの組換えSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインポリペプチドを質量分析によってさらに特徴付けた。この系で単離された成熟SLAMF6<sup>var3</sup>は、少なくともペントペプチドGNVVS(配列番号20)を含むシグナルペプチドの一部、および異種シグナルペプチド配列の最大11個のアミノ酸を保持することが分かった。したがって、配列番号15のアミノ酸10~21に由来する配列は、単離されたエクストドメイン調製物中に少なくとも一部保持された。本明細書で「seSLAMF6<sup>var3</sup>」と称される、この単離されたSLAMF6<sup>var3</sup>エクストドメインを、この後に詳述するように、治療薬としてさらに特徴付けた。

## 【0195】

実施例4. seSLAMF6<sup>var3</sup>は、T細胞の活性化誘導細胞死(AICD)を防止し、活性化されたT細胞を共刺激するように作用する

次いで、単離されたseSLAMF6<sup>var3</sup>ポリペプチドの機能特性を決定した。この目的のために、実施例3に記載されるエクストドメインポリペプチド(実施例および図全体を通してseSLAMF6<sup>var3</sup>またはseSLAMF6-V3として示されている)を、長期T細胞活性化および二次アポトーシス(活性化誘導細胞死、AICD)を測定するように設計された系においてマウス脾細胞とインビトロでインキュベートした。図9Aおよび図9Bに見られるように、seSLAMF6<sup>var3</sup>はAICDを有意に減少させ、1週間の激しい活性化後のT細胞生存を改善した。ヒトPBMCを使用して行った実験で、ヒトT細胞について同様の結果が得られた。図9A~図9Bにさらに見られるように、マウス脾細胞におけるAICDの防止にseSLAMF6<sup>var3</sup>が与える効果は、IL-2の効果と比較して著しく顕著であった。

## 【0196】

次に、seSLAMF6<sup>var3</sup>がT細胞の共刺激を提供する能力を、3日間の活性化プロトコルにおいてアッセイした。この目的のために、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)をseSLAMF6<sup>var3</sup>とともに3日間インキュベートした後、抗CD3抗体を(PBS中1μg/mlで1時間)プレコートしたプレート上で一晩活性化させた。図10に見られるように、seSLAMF6<sup>var3</sup>によって共刺激されたT細胞は、活性化前の段階でseSLAMF6<sup>var3</sup>を投与されなかったT細胞「未処理」と比較して、活性化後に増加したレベルのインターフェロン-(IFN-)を分泌した。

## 【0197】

最後に、SLAMF6<sup>var1</sup>エクストドメインへのseSLAMF6<sup>var3</sup>の結合(Fcコンジュゲート、seSLAMF6-Fc)を、ELISAを用いて検証した(図11)。図11に見られるように、SLAMファミリーの他のメンバーが結合したかどうかにかかわらず、seSLAMF6<sup>var3</sup>は、seSLAMF6-Fcに用量依存的に結合することができた。さらに、驚くべきことに、seSLAMF6<sup>var3</sup>が、単離されたSLAMF6<sup>var1</sup>エクストドメイン(seSLAMF6)で同定された同型結合よりも高い親和性でseSLAMF6-Fcに結合することが実証された。

10

20

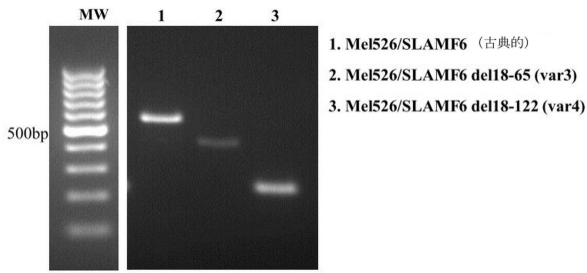
30

40

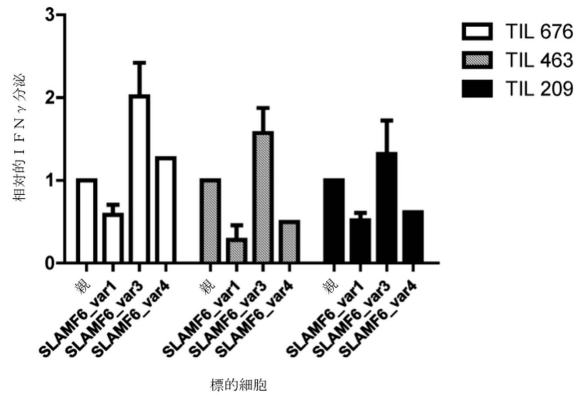
50

【 図面 】

【 図 1 】

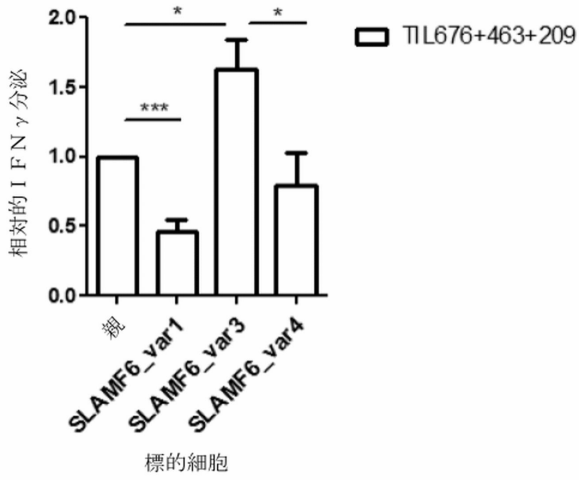


【 図 2 A 】

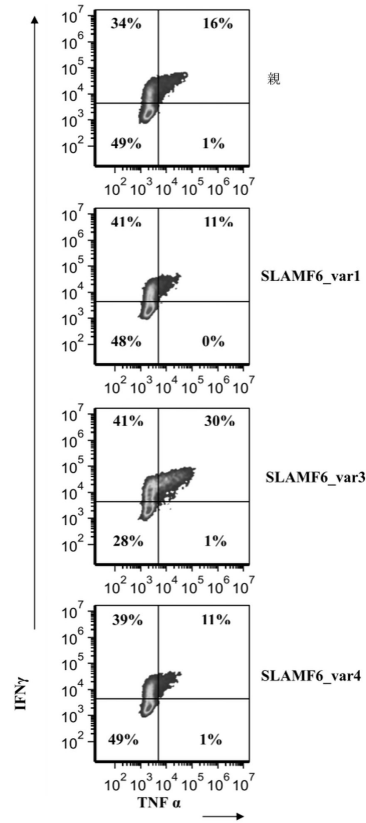


10

【 図 2 B 】



【 図 3 A 】



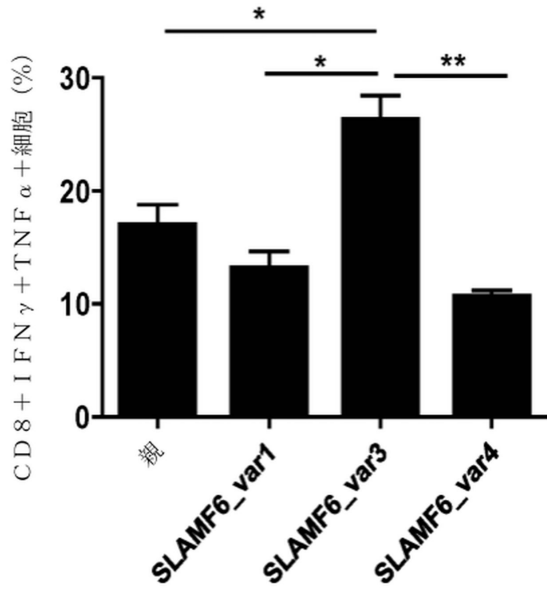
20

30

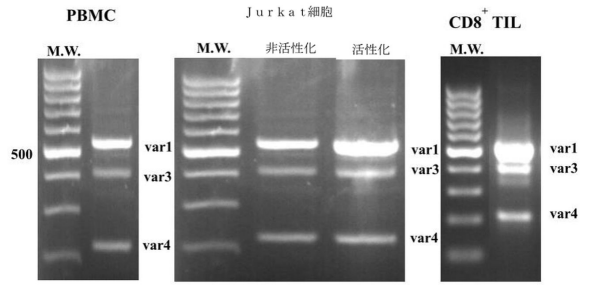
40

50

【 図 3 B 】

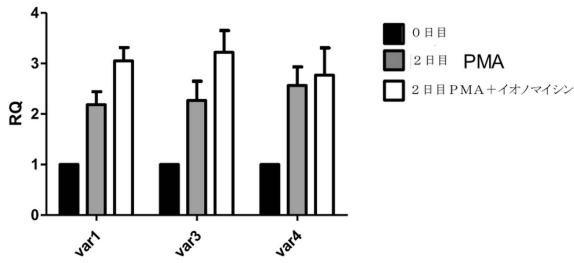


【 図 4 A 】

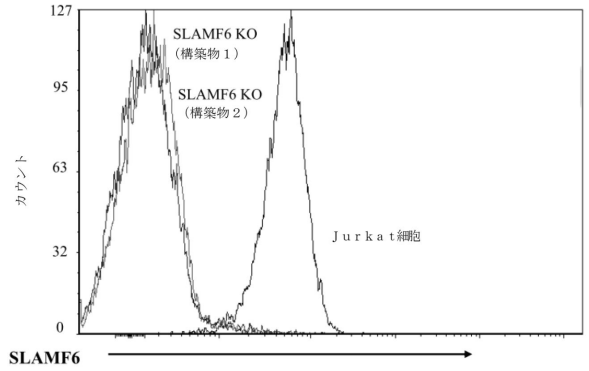


10

【 図 4 B 】



【 図 5 】



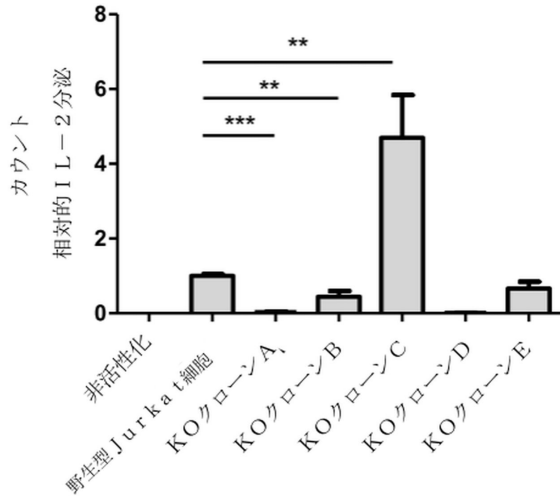
20

30

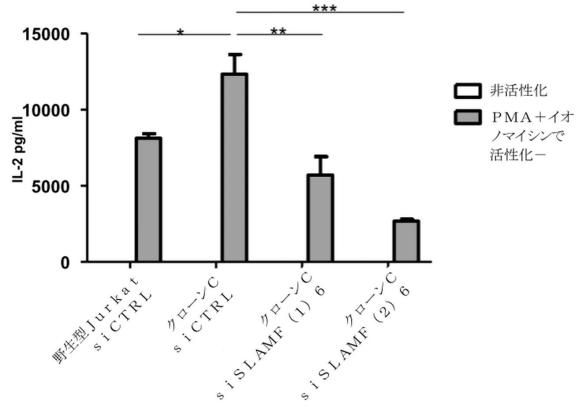
40

50

【 図 6 】

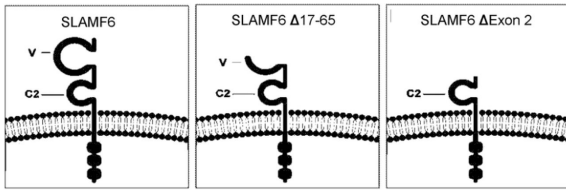


【 図 7 】

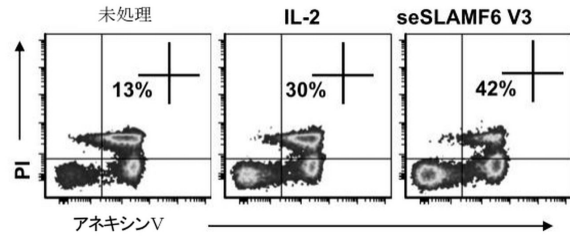


10

【 図 8 】



【 図 9 A 】



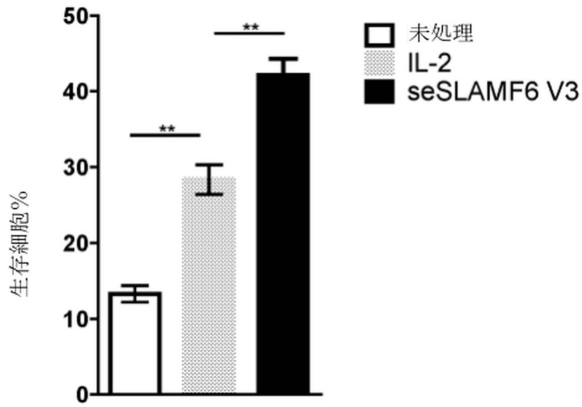
20

30

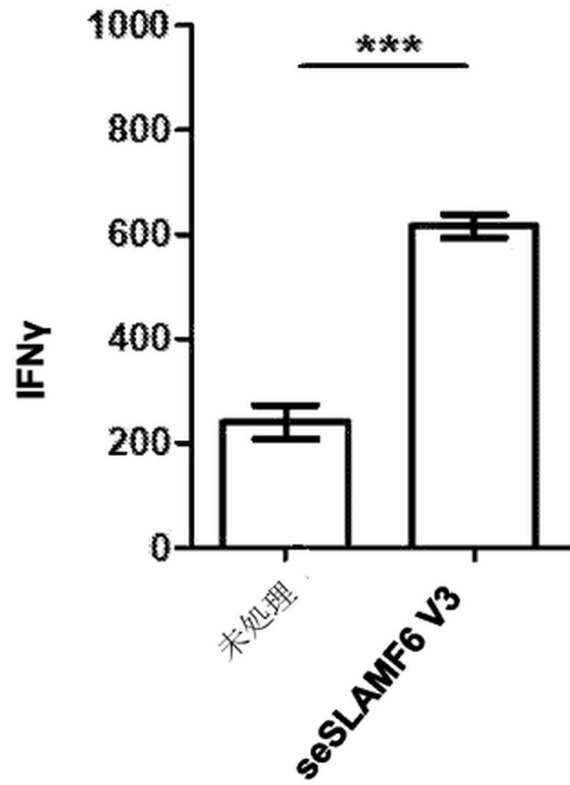
40

50

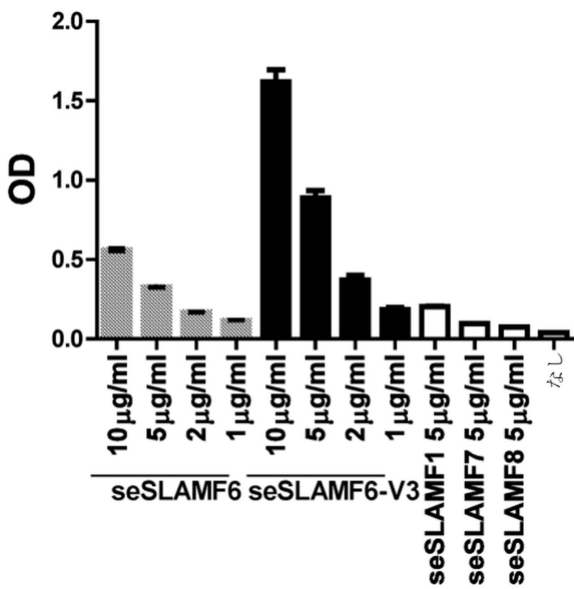
【 図 9 B 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 配列表 】

0007458318000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
 C 0 7 K 14/705 (2006.01)  
 C 0 7 K 19/00 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/0783(2010.01)  
 C 1 2 N 5/0784(2010.01)  
 C 1 2 N 5/09 (2010.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/62 (2006.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)

## F I

A 6 1 P 35/00  
 C 0 7 K 14/705  
 C 0 7 K 19/00  
 C 1 2 N 5/0783  
 C 1 2 N 5/0784  
 C 1 2 N 5/09  
 C 1 2 N 5/10 Z N A  
 C 1 2 N 15/12  
 C 1 2 N 15/62 Z  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 K 35/12

, I s r a e l

## (74)代理人

100114775  
 弁理士 高岡 亮一

## (74)代理人

100121511  
 弁理士 小田 直

## (74)代理人

100202751  
 弁理士 岩堀 明代

## (74)代理人

100208580  
 弁理士 三好 玲奈

## (74)代理人

100191086  
 弁理士 高橋 香元

## (72)発明者

ロテム, ミハエル

イスラエル国, 7 1 7 9 9 0 2 マカビム ルート, 17 スデロット オマリム ストリート

## (72)発明者

ミシャン, アイゼンバーグ, ガリト

イスラエル国, 7 1 7 5 9 8 6 モディイン, ナハール ハヤルデン 10, アパートメント 5

## (72)発明者

ハジャジ, エマ

イスラエル国, 4 2 1 7 0 0 2 ネタニヤ, ピー . オー . ボックス 7 0 8 2

## 審査官

松浦 安紀子

## (56)参考文献

特表 2 0 1 7 - 5 0 3 8 1 0 ( J P , A )

米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 1 7 0 1 4 ( U S , A 1 )

Cancer Immunology Research , 2018年02月01日 , Vol. 6, No. 2 , pp. 127-138

Accession No. AK303990.1, Homo sapiens cDNA FLJ52047 complete cds, highly similar to

SLAM family member 6 precursor , Database GenBank [online] , 2008年07月24日 , [Retri

eved on 2023.06.09], Retrieved from the Internet, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/194384267>

ccore/194384267

## (58)調査した分野

(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 1 2

A 6 1 K 3 5 / 1 3

A 6 1 K 3 5 / 1 5

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 K 3 8 / 1 7

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C 0 7 K 1 4 / 7 0 5

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3

C 1 2 N 5 / 0 7 8 4

C 1 2 N 5 / 0 9

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 1 2

C 1 2 N 1 5 / 6 2

A 6 1 K 4 8 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )