

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6895380号
(P6895380)

(45) 発行日 令和3年6月30日(2021.6.30)

(24) 登録日 令和3年6月9日(2021.6.9)

| | |
|--------------|-----------|
| (51) Int.Cl. | F 1 |
| C 12 N 5/10 | (2006.01) |
| C 12 N 5/078 | (2010.01) |
| C 12 N 15/13 | (2006.01) |
| C 12 N 15/62 | (2006.01) |
| C 07 K 16/28 | (2006.01) |
| C 12 N | 5/10 |
| C 12 N | 5/078 |
| C 12 N | 15/13 |
| C 12 N | 15/62 |
| C 07 K | 16/28 |

請求項の数 15 (全 38 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------------|-------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2017-541243 (P2017-541243) | (73) 特許権者 | 509034605 ナショナル ユニバーシティ オブ シン ガポール シンガポール共和国 シンガポール 11 9077 ロウワー ケント リッジ ロ ード 21 |
| (86) (22) 出願日 | 平成28年2月5日(2016.2.5) | (74) 代理人 | 100079108 弁理士 稲葉 良幸 |
| (65) 公表番号 | 特表2018-507685 (P2018-507685A) | (74) 代理人 | 100109346 弁理士 大貫 敏史 |
| (43) 公表日 | 平成30年3月22日(2018.3.22) | (74) 代理人 | 100117189 弁理士 江口 昭彦 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/SG2016/050063 | (74) 代理人 | 100134120 弁理士 内藤 和彦 |
| (87) 國際公開番号 | W02016/126213 | | |
| (87) 國際公開日 | 平成28年8月11日(2016.8.11) | | |
| 審査請求日 | 平成31年1月31日(2019.1.31) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 62/112,765 | | |
| (32) 優先日 | 平成27年2月6日(2015.2.6) | | |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 62/130,970 | | |
| (32) 優先日 | 平成27年3月10日(2015.3.10) | | |
| (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】治療免疫細胞の有効性を改良するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸と、局在化ドメインに連結した抗体をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸と、を含む、操作された免疫細胞であって、

前記抗体が：

CD3、TCR、TCR、TCR、TCR、CD3、CD3、及びCD3からなる群から選択される、CD3/T細胞受容体 (TCR) 複合体中の因子；または

プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4)、T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有3 (Tim3)、キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR) 2DL1、KIR2DL2/3、並びにNK

G2Aからなる群から選択される、免疫応答を下方制御する前記受容体；

に結合し、前記局在化ドメインに連結した抗体が、前記因子または前記受容体の細胞表面発現を下方制御する、操作された免疫細胞。

【請求項 2】

前記操作された免疫細胞が、操作されたT細胞、操作されたナチュラルキラー (NK) 細胞、操作されたNK/T細胞、操作された単球、操作されたマクロファージ、または操作された樹状細胞である、請求項1に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 3】

10

20

前記 C A R が、抗 C D 1 9 - 4 - 1 B B - C D 3 C A R である、請求項 1 または 2 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 4】

前記抗体が、単鎖可変断片 (s c F v) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 5】

前記抗体または s c F V が、 C D 3 に結合し、かつ：

配列番号 1 2 のアミノ酸配列と C D R 1 ~ 3 内の配列が同一であり、配列番号 1 2 のア

ミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有する可変重鎖 (V H) ; 及び

配列番号 1 3 のアミノ酸配列と C D R 1 ~ 3 内の配列が同一であり、配列番号 1 3 のア

ミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有する可変軽鎖 (V L) ;

を含む、請求項 1 または 4 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 6】

前記抗体または s c F V が、 N K G 2 A に結合し、かつ：

配列番号 3 2 のアミノ酸配列と C D R 1 ~ 3 内の配列が同一であり、配列番号 3 2 のア

ミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有する可変重鎖 (V H) ; 及び

配列番号 3 3 のアミノ酸配列と C D R 1 ~ 3 内の配列が同一であり、配列番号 3 3 のア

ミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有する可変軽鎖 (V L) ;

を含む、請求項 1 または 4 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 7】

前記抗体または s c F V が、 K I R 2 D L 1 及び K I R 2 D L 2 / D L 3 に結合し、かつ：

配列番号 3 6 のアミノ酸配列と C D R 1 ~ 3 内の配列が同一であり、配列番号 3 6 のア

ミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有する可変重鎖 (V H) ; 及び

配列番号 3 7 のアミノ酸配列と C D R 1 ~ 3 内の配列が同一であり、配列番号 3 7 のア

ミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有する可変軽鎖 (V L) ;

を含む、請求項 1 または 4 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 8】

前記局在化ドメインが、小胞体 (E R) またはゴルジ保持配列；プロテオソーム局在化配列；あるいは C D 8 、 C D 8 、 4 - 1 B B 、 C D 2 8 、 C D 3 4 、 C D 4 、 F c R I 、 C D 1 6 、 O X 4 0 、 C D 3 、 C D 3 、 C D 3 、 T C R 、 C D 3 2 、 C D 6 4 、 V E G F R 2 、 F A S 、または F G F R 2 B に由来する膜貫通ドメイン配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 9】

前記 E R またはゴルジ保持配列が、アミノ酸配列 K D E L (配列番号 4) 、 K K X X (配列番号 9) 、 K X D / E (配列番号 1 0) 、または Y Q R L (配列番号 1 1) を含み、ここで、 X は、任意のアミノ酸であるか、あるいは前記プロテオソーム局在化配列が、 P E S T モチーフを含む、請求項 8 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 10】

対象における癌を治療するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞を含む医薬組成物。

【請求項 11】

静脈内注入、動脈内注入、腫瘍への直接注射及び / または手術後の腫瘍母地の灌流、人工スキャフォールドにおける腫瘍部位での移植、髄腔内投与、または眼内投与によって前記対象に投与するのに適している、請求項 1 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記癌が、固体腫瘍または血液学的悪性腫瘍である、請求項 1 0 または 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞を生成するためのインビトロ

20

30

40

50

の方法であって、

免疫細胞に、キメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結した抗体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを導入する工程であって、それによって操作された免疫細胞を生成する、工程、を含み、

前記抗体が：

CD3、TCR、TCR、TCR、TCR、CD3、CD3、及びCD3からなる群から選択される、CD3/T細胞受容体(TCR)複合体中の因子；または

プログラム細胞死タンパク質1(PD-1)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4)、T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有3(TIM3)、キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)2DL1、KIR2DL2/DL3、並びにNK

10

G2Aから成る群から選択される、免疫応答を下方制御する前記受容体；

に結合し、前記局在化ドメインに連結した抗体が、前記因子または前記受容体の細胞表面発現を下方制御する、方法。

【請求項14】

前記操作された免疫細胞が、同種細胞から生成される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記操作された免疫細胞が、自家細胞から生成される、請求項13に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

[背景技術]

免疫細胞は、強力かつ特異的な「生きた薬剤」であり得る。免疫細胞は、正常な組織を温存しながら腫瘍細胞を標的化する潜在性を有し、いくつかの臨床的観察は、それらが主要な抗癌活性を有し得ることを示している。したがって、同種造血幹細胞移植(HSCT)を受ける患者において、T細胞媒介移植片対宿主病(GVHD)(Weiden, et al., N. Engl. J. Med. 1979; 300(19): 1068-1073; Appelbaum, FR Nature, 2001; 411(6835): 385-389; Porter, DL et al., N. Engl. J. Med. 1994; 330(2): 100-106; Kolb, HJ et al. Blood. 1995; 86(5): 2041-2050; Slavin, S. et al., Blood. 1996; 87(6): 2195-2204)、及びドナーナチュラルキラー(NK)細胞アロ反応性(Ruggeri, L, et al. Science. 2002; 295(5562): 2097-2100; Giebel, S, et al. Blood. 2003; 102(3): 814-819; Cooley, S, et al. Blood. 2010; 116(14): 2411-2419)は、白血病再発と逆関係にある。HSCTの文脈に加えて、抑制性シグナルからT細胞を放出する(Sharma, P, et al., Nat Rev Cancer. 2011; 11(11): 805-812.; Pardoll, DM, et al. Nat Rev Cancer. 2012; 12(4): 252-264)、またはそれらを腫瘍細胞に架橋する(Topp, MS, et al. J. Clin. Oncol. 2011; 29(18): 2493-2498)抗体の投与は、固形腫瘍または白血病のいずれかを有する患者において主要な臨床的応答を生成した。最後に、遺伝子改変自家Tリンパ球の注入は、治療抵抗性白血病及びリンパ腫を有する患者において完全かつ持続的な寛解を誘導した(Maude, SL, et al. N. Engl. J. Med. 2014; 371(16): 1507-1517)。

30

【0002】

それにも関わらず、その適用性を広げ、その有効性を改良することによって、免疫細胞治療法を改善することに対する著しい必要性が存在する。

【発明の概要】

【0003】

40

50

本発明は、例えば、癌治療のための改良された治療有効性を有する、操作された免疫細胞に関する。特定の実施形態において、本発明は、免疫活性化受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結した標的結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む、操作された免疫細胞を提供する。

【0004】

他の実施形態において、本発明は、癌を治療するための、免疫活性化受容体をコードする遺伝子と、局在化ドメインに連結した標的結合分子をコードする遺伝子とを含む、操作された免疫細胞の使用であって、治療量の操作された免疫細胞を、それを必要とする対象に投与することを含む、使用を提供する。

【0005】

様々な実施形態において、本発明はまた、操作された免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞に、免疫活性化受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結した標的結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを導入し、それによって操作された免疫細胞を生成することを含む、方法も提供する。

【0006】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、宿主における移植片対宿主病 (GvHD) の低減、宿主による拒絶の低減もしくは除去、宿主における生存の延長、宿主における腫瘍による抑制の低減、宿主における自己死滅の低減、宿主における炎症カスケードの低減、または宿主における天然 / 人工受容体媒介 (例えば、CAR媒介) シグナル形質導入の持続のうちの 1 つ以上の結果として、改良された治療有効性を持つ。

【0007】

前述のことは、添付の図面 (異なる見方を通して、同様の参照文字が同一の部分を指す) に説明されるように、本発明の例示的な実施形態についての以下のより具体的な説明から明らかとなるだろう。図面は必ずしも縮尺には従っておらず、代わりに、本発明の実施形態を説明することに重点が置かれる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図 1】本発明において用いられる計画の概略図である。図 1 A は、癌細胞の CAR 媒介殺傷の全体的機構である。図 1 B は、異なる形式の区画配向 s c F v (局在化ドメインに連結した標的結合分子の一例) による CAR の組み合わせ発現、及び可能性のある標的の例を示す。CAR は、免疫細胞能力を改良することができる他の受容体によって置換されてもよい。

【図 2】s c F v を特定の細胞区画に局在化するドメインとともに、s c F v を含有する構築物の概略図である。略称：2M、-2ミクログロブリン；SP、シグナルペプチド；VL、可変軽鎖；VH、可変重鎖；TM、膜貫通ドメイン；HA、ヒトイソフルエンザヘマグルチニン。図面に列挙されない追加の構築物としては、膜結合型 (mb) myc

EEKKMP、mb myc KKTN、mb myc YQL、mb TGN38 細胞質ドメイン、mb myc RNICKD、リンカー (20 - アミノ酸) mb EE K K M P、及び CD8 膜貫通ドメイン中にシグナリングペプチドを有さず、かつ様々な数のアミノ酸を有する構築物のバリエントが挙げられる。10 - アミノ酸リンカーのヌクレオチド配列は、GGTGGTGGCGGCAGTGGTGGCGGTGGCTCA (配列番号 61) であり、アミノ酸配列は、GGGGSGGGGS (配列番号 62) である。20 - アミノ酸リンカーのヌクレオチド配列は、GGTGGTGGCGGCAGTGGTGGCGGTGGCTC T (配列番号 63) であり、アミノ酸配列は、GGGGSGGGGS GGGS GGGS (配列番号 41) である。様々な局在化ドメインが、「局在化ドメイン」という表題の下に示され、示されるように、いくつかの例におけるリンカーを描写する。構築物「myc KDEL」及び「PEST KDEL」は、单一構築物における 2 つ以上の局在化ドメインの使用を示す。

【図 3 A - 3 B】図 3 A ~ 図 3 C は、CD3 の s c F v 標的化による、T 細胞中の CD

10

20

30

40

50

3 / T C R の下方制御を示す。図 3 A は、緑色蛍光タンパク質 (G F P) のみを含有するレトロウイルスベクター（「偽」）、または G F P プラス示される異なる構築物を含有するベクターのいずれかで形質導入した、ジャーカット細胞中の表面 C D 3 の発現を示す。形質導入の 1 週間後、アロフィコシアニン (BD Biosciences) に共役した抗 C D 3 抗体を使用して、細胞膜上の C D 3 の発現を偽形質導入した細胞の発現と比較した。全ての比較は、G F P 陽性細胞のゲーティング後に実行した。図 3 B は、抗 C D 3 / C D 2 8 ビーズ (Life Sciences) で増殖させた末梢血 T リンパ球で実行した、類似する実験を描写する。染色は、形質導入の 1 週間後に実行した。

【図 3 C】図 3 C は、示される構築物での形質導入後の、ジャーカット細胞中の膜 C D 3 の下方制御を説明するフローサイトメトリー プロットを示す。各プロットの右上の象限上の破線付きの四角形は、G F P + C D 3 + 細胞を囲む。

【図 4】抗 C D 3 s c F v - K D E L もしくは - P E S T、または - m b E E K K M P での形質導入時の、ジャーカット T 細胞中の細胞膜上での C D 3 及び T C R の下方制御を示す。膜マーカ発現は、アロフィコシアニン (BD Biosciences) に共役した抗 C D 3 抗体、またはフィコエリトリン (Biologegend) に共役した抗 T C R を使用した形質導入の 1 週間後に測定した。「対照」と標識される線は、偽形質導入した細胞の標識を表す。垂直破線は、アイソタイプ適合非反応性抗体で得られた染色の上限を表す。

【図 5】抗 s c F v 及び C A R が同時に発現され得ることを示す。フローサイトメトリー ドットプロットは、抗 C D 3 アロフィコシアニン抗体、及びヤギ抗マウス F a b 2 ビオチンプラス (CAR を検出するため) フィコエリトリンに共役したストレプトアビジンでの、ジャーカット細胞 (上列) または末梢血リンパ球 (下列) の染色を表す。細胞を、抗 C D 3 s c F v - m y c K D E L 構築物、抗 C D 1 9 - 4 - 1 B B - C D 3 構築物、または両方で形質導入した。G F P 陽性細胞のゲーティング後、抗 C D 3 s c F v - m y c K D E L で形質導入したものは C D 3 を下方制御し (左列、左下の象限)、抗 C D 1 9 - 4 - 1 B B - C D 3 構築物で形質導入したものは C A R を発現した (中列、右上の象限)。両方の構築物で形質導入した細胞のうちのかなりの割合が、C D 3 陰性かつ C A R 陽性であった (右列、左上の象限)。

【図 6】抗 C D 1 9 C A R が、C D 3 / T C R 下方制御に関わらず、T 細胞活性化及び脱顆粒を引き起こすことを説明する。ジャーカット細胞を、抗 C D 3 s c F v - m y c K D E L 構築物、抗 C D 1 9 - 4 - 1 B B - C D 3 構築物、または両方で形質導入した。T 細胞活性化及び脱顆粒を、偽形質導入した細胞の T 細胞活性化及び脱顆粒と比較した。細胞を、単独で、または 1 : 1 の比率の C D 1 9 + 白血病細胞株 O P - 1 とともに共培養した。18 時間後、C D 6 9 及び C D 2 5 の発現を、特定の抗体 (BD Biosciences より) を使用するフローサイトメトリーによって試験し、6 時間後、C D 1 0 7 a の発現を試験した (BD Biosciences の抗体)。O P - 1 細胞の存在下で、C A R 発現細胞中の C D 6 9 及び C D 2 5 発現は、細胞がまた抗 C D 3 s c F v - K D E L でも形質導入されるかどうかに関わらず生じ、活性化は、偽もしくは抗 C D 3 s c F v - m y c K D E L 形質導入した細胞中、または O P - 1 細胞の不在下では生じなかつた。C A R 刺激は C D 1 0 7 発現を改良し、これは C D 3 / T C R 下方制御によって影響されなかつた。

【図 7】T 細胞中で発現される抗 C D 1 9 C A R が、C D 3 / T C R 下方制御に関わらず、T 細胞増殖を引き起こすことを示す。末梢血 T リンパ球を、抗 C D 3 s c F v - m y c K D E L 構築物及び抗 C D 1 9 - 4 - 1 B B - C D 3 構築物の両方で形質導入した。形質導入した T リンパ球を、Streck (Omaha, NE) で処理した O P - 1 細胞とともに共培養して、示される時間、それらの増殖を抑制した。抗 C D 1 9 C A R を発現する C D 3 陽性及び C D 3 陰性 T リンパ球の増殖を、偽形質導入した T 細胞の増殖と比較した。各記号は、2 つの平行培養物の平均細胞数を示す。C A R T 細胞は、C D 3 / T C R 発現に関わらず、同様に良好に増殖した。

【図 8】G F P のみを含有するレトロウイルスベクター（「偽」）、または G F P プラス

10

20

30

40

50

抗CD7scFv-my c KDEL構築物を含有するベクターのいずれかで形質導入した、末梢血Tリンパ球の膜上のCD7の発現を示す。形質導入の1週間後、フィコエリトリン(BD Biosciences)に共役した抗CD7抗体を使用して、細胞膜上のCD7の発現を偽形質導入した細胞の発現と比較した。各プロットの右上の象限上の破線付きの四角形は、GFP+CD7+細胞を囲む。

【図9】2-ミクログロブリンのscFv標的化による、T細胞中のHLAクラスIの下方制御を描写する。ジャーカットT細胞を、抗2MscFv-my c KDELで形質導入した。形質導入の1週間後、フィコエリトリン(BD Biosciences)に共役した抗HLA-ABC抗体を使用して、細胞膜上のHLA-ABCの発現を、偽形質導入した細胞の発現と比較した。アイソタイプ適合対照抗体での染色もまた示す。G 10 FP陽性細胞のゲーティング後に分析を実行した。

【図10】KIR2DL1及びKIR2DL2/DL3のscFv標的化による、ヒトNK細胞中のキラー免疫グロブリン様受容体(KIR)2DL1及びKIR2DL2/DL3の下方制御を描写する。生体外で増殖させ、KIR2DL1発現について選択したNK細胞を、抗KIR2DL1-KIR2DL2/DL3scFv-リンカー(20)AEK 20 DELまたは-EEKKMPで形質導入した。形質導入の8日後、アロフィコシアニン(R&D Systems)に共役した抗KIR2DL1抗体、またはフィコエリトリン(BD Biosciences)に共役した抗KIR2DL2/DL3抗体を使用して、細胞膜上の対応するKIRの発現を偽形質導入した細胞の発現と比較した。アイソタイプ適合対照抗体での染色もまた示す。GFP陽性細胞のゲーティング後に分析を実行した。

【図11】scFv標的化による、ヒトNK細胞中のNKG2Aの下方制御を描写する。生体外で増殖させたNK細胞を、抗NKG2A scFv-EEKKMPで形質導入した。形質導入の8日後、フィコエリトリン(Beckman Coulter)に共役したNKG2A抗体を使用して、細胞膜上のNKG2Aの発現を偽形質導入した細胞の発現と比較した。アイソタイプ適合対照抗体での染色もまた示す。GFP陽性細胞のゲーティング後に分析を実行した。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明の例示的な実施形態についての説明が続く。

【0010】

近年、免疫細胞を制御する分子経路についての知識の獲得に、それらを生体外で操作する能力(それらの増殖及び遺伝子操作を含む)の顕著な発展が匹敵してきている。現在、時宜を得た様式で、高度に複雑化した臨床等級の免疫細胞生成物を確実に調製することが可能である。生体外細胞操作によって免疫細胞の抗癌活性をいかに配向し、拡大し得るかについての主要な例は、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞の開発である(Eshhar, Z. et al., PNAS. 1993; 90(2): 720-724)。

【0011】

CARは、以前に説明されている人工多分子タンパク質である(Geiger TL, et al., J Immunol. 1999; 162(10): 5931-5939; Brentjens RJ, et al., Nat Med. 2003; 9(3): 279-286; Cooper LJ, et al., Blood. 2003; 101(4): 1637-1644)。CARは、特定の標的に結合する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを含む。例えば、米国特許第8,399,645号(その全体が本明細書に参照によって組み込まれる)に説明されるように、細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインは、そのようなドメインの任意の所望される供給源に由来し得る。簡潔には、CARは、ある標的に特異的に結合する抗体の単鎖可変領域(scFv)を含有するように設計され得る。scFvは、膜貫通ドメイン及びヒンジドメインを介して、CD3などのT細胞受容体(TCR)関連シグナリング分子に連結され得る。同族抗原へのscFvのライゲーションは、シグナル形質導入を引き起こす。したがって、CARは、細胞傷害性Tリンパ球を癌細胞に向かって瞬時に再配向し、腫瘍細胞の溶解を誘発することができ 40

る (Eshhar, Z. et al., PNAS. 1993; 90 (2) : 720 - 724; Geiger TL, et al., J Immunol. 1999; 162 (10) : 5931 - 5939; Brentjens RJ, et al., Nat Med. 2003; 9 (3) : 279 - 286; Cooper LJ, et al., Blood. 2003; 101 (4) : 1637 - 1644; Imai C, et al., Leukemia. 2004; 18 : 676 - 684)。CD3 シグナリング単独では、T細胞を持続的に活性化するには十分ではないため (Schwartz RH. Annu Rev Immunol. 2003; 21 : 305 - 334; Zang X and Allison JP. Clin Cancer Res. 2007; 13 (18 Pt 1) : 5271 - 5279)、シグナル形質導入を後押しするために、CD28 及び 4-1BB (または CD137) などの同時刺激分子がCAR構築物に組み込まれている。この二重シグナリング設計 (「第2世代CAR」) は、T細胞から効果的な抗腫瘍活性を引き出すのに有用である。 (Imai C, et al., Leukemia. 2004; 18 : 676 - 684; Campana D, et al., Cancer J. 2014; 20 (2) : 134 - 140)。

【0012】

4-1BB 及び CD3 の両方を含有する特定のCAR、抗CD19CARは、米国特許第8,399,645号に説明されている。抗CD19-4-1BB-CD3 CARを発現する自家T細胞の注入は、慢性リンパ球性白血病(CLL) (Porter DL, et al., Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia; 2011; N Engl J Med. 2011; 365 (8) : 725 - 733、Kaloos M, et al., Sci Transl Med. 2011; 3 (95) : 95ra73)、及び急性リンパ芽球性白血病(ALL) (Grupp SA, et al., N Engl J Med. 2013; 368 (16) : 1509 - 1518; Maudé SL, et al., N Engl J Med. 2014; 371 (16) : 1507 - 1517) を有する患者において劇的な臨床的応答をもたらした。これらの研究、及び異なるシグナリングモジュールを担持するCARによる研究 (Till BG, et al., Blood. 2012; 119 (17) : 3940 - 3950; Kochenderfer JN, et al., Blood. 2012; 119 (12) : 2709 - 2720; Brentjens RJ, et al., Blood. 2011; 118 (18) : 4817 - 4828; Brentjens RJ, et al., Sci Transl Med. 2013; 5 (177) : 177ra138) は、この技術の臨床的潜在性について、及び一般的な免疫治療についての有力な実証を提供する。

【0013】

本明細書に説明される方法は、天然または人工受容体(例えば、CAR)によって再配向される、免疫細胞中の特定のタンパク質の迅速な除去または非活性化を可能にし、したがって、操作された細胞の用途潜在性を広げ、その機能を著しく改善する。本方法は、除去または中和される標的(例えば、タンパク質)に結合する標的結合分子とともに、免疫活性化受容体、例えば、CAR(特定の標的に結合する細胞外ドメイン(例えば、scFv)、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを含む)を含有する単一構築物または複数構築物に一部依存し、標的結合分子は、用途によってそれを特定の細胞区画(ゴルジもしくは小胞体など)、プロテアソーム、または細胞膜へと配向するドメイン(すなわち、局在化ドメイン)に連結される。単純化のため、局在化ドメイン(LD)に連結した標的結合分子は、本明細書において「LD連結標的結合分子」と呼ばれることがある。

【0014】

本明細書の教示から明らかとなるように、本発明の方法には、様々な免疫活性化受容体が好適であり得る。つまり、癌細胞上に発現されるリガンド(例えば、ペプチドまたは抗原)への結合(ライゲーション)時に免疫応答を活性化することができる分子を含む、任意の受容体を、本方法に従って使用することができる。例えば、上述のように、免疫活性

化受容体はキメラ抗原受容体（CAR）であってもよく、CARを設計し、操作するための方法は当該技術分野において既知である（Geiger TL, et al., J Immunol. 1999; 162(10): 5931-5939; Brentjens RJ, et al., Nat Med. 2003; 9(3): 279-286; Cooper LJ, et al., Blood. 2003; 101(4): 1637-1644を参照されたい）。更に、抗体結合能力を有する受容体を使用してもよく（例えば、CD 16-4-1BB-CD3ゼータ受容体-Kudo K, et al. Cancer Res. 2014; 74(1): 93-103）、これはCARに類似しているが、scFvが抗体結合分子（例えば、CD16、CD64、CD32）で置換されたものである。更に、腫瘍細胞HLAの文脈において、腫瘍細胞上に発現されるペプチドに結合するT細胞受容体アルファ鎖及びベータ鎖を含むT細胞受容体もまた、本方法に従って使用することができる。更に、癌細胞上に発現されるリガンドに結合することによって免疫応答を活性化する分子を担持する、他の受容体（例えば、腫瘍細胞上に発現されるNKG2Dリガンドに結合するNKG2D-DAP10-CD3ゼータ受容体）もまた、使用することができる（例えば、Chang YH, et al., Cancer Res. 2013; 73(6): 1777-1786を参照されたい）。本明細書で使用される場合、全てのそのような好適な受容体はまとめて「免疫活性化受容体」または「癌細胞リガンドへの結合時に免疫応答を活性化する受容体」と呼ばれる。したがって、癌細胞リガンドによって活性化された分子を有する免疫活性化受容体は、本方法に従って、LD連結標的結合分子とともに発現され得る。

10

20

【0015】

本方法は、人工受容体によって再配向される免疫細胞の注入に基づく免疫治療の潜在的用途を、著しく拡大する。説明される方法は実用的であり、臨床等級の細胞プロセシングに容易に組み込むことができる。例えば、CAR及びLD連結標的結合分子（例えば、scFv-myc-KDEL（またはPESTもしくは膜貫通）を含有する単一のバイオストリオニック構築物は、例えば、内部リボソーム侵入部位（IRES）または2Aペプチド-コード領域部位を、CAR及びLD連結標的結合分子をコードする2つのcDNAの間に挿入することによって、調製することができる。2つ以上の標的を削除するためのトリオストリオニック送達系の設計もまた、実行可能であるだろう。あるいは、（同時または連続での）2つの遺伝子の別個の形質導入が実行されてもよい。癌細胞治療法の文脈において、CARは、抗体結合シグナリング受容体（Kudo K, et al., Cancer Res. 2014; 74(1): 93-103）、特定のHLA-ペプチドの組み合わせに対して配向されるT細胞受容体、または癌細胞との接触によって活性化される任意の受容体（Chang YH, et al., Cancer Res. 2013; 73(6): 1777-1786）によって置換されてもよい。同時の抗CD19-4-1BB-CD3 CAR及び抗CD3 scFv-KDELによる、本明細書に説明される研究の結果は、CARのシグナリング能力が損なわれなかつたことを実証する。

30

【0016】

本明細書において試験される両方の抗CD3 scFv-KDEL（及び-PEST）は、CD3及びTCR発現を安定して下方制御する。残留するCD3+T細胞はCD3ビーズを使用して除去することができ、このアプローチは臨床等級の形式においても利用可能なものである。CARシグナリングに応答するCD3/TCR陰性細胞を作製する能力は、重要な進歩を表す。CAR-T細胞による臨床研究は一般に、自家T細胞を使用して実行されている。したがって、細胞生成物の品質は患者によって異なり、応答は不均一である。同種T細胞の注入は、レシピエントの組織抗原による内在性TCRの刺激を原因とする許容しがたく高い潜在性に致命的なGVHDのリスクを有するため、現在不可能である。内在性TCRの欠如はGVHD能力を除去するため、CD3/TCRの下方制御は同種T細胞を注入する可能性を開く。同種生成物は、最適な細胞組成物（例えば、高度に細胞傷害性のT細胞に富むもの、制御T細胞が枯渇したものなど）によって調製し、注入される細胞が高いCAR発現及び機能的効力を有するように選択することができる。更に

40

50

、完全に標準化された生成物は凍結保存され、患者の免疫細胞の状態、及び除去療法または広範囲の採血を受ける彼／彼女の適応度に関わらず、使用のために利用可能であり得る。T C R 発現の除去は、ヌクレアーゼなどの遺伝子編集ツールを使用して対処されている (T o r i k a i H , et al . B l o o d , 2 0 1 2 ; 1 1 9 (2 4) : 5 6 9 7 - 5 7 0 5)。これは効果的なアプローチであるものの、それは延長培養による数回の細胞選択及び増殖を必要とするため、臨床設定において実装するのは困難である。本明細書に説明される方法は、多くの実用的な利点を有する。

【 0 0 1 7 】

更に、LD 連結標的結合分子（例えば、s c F v - m y c K D E L、s c F v - E E K K M P、またはs c F v - P E S T、ここで、s c F v は、特定のタンパク質／分子を標的化する）を本発明に従って使用して、H L A クラス I 分子を削除し、同種細胞の拒絶の可能性を低減することができる。同種T細胞の注入はC A R - T 細胞治療法の将来的な目標である一方で、同種ナチュラルキラー（N K ）細胞の注入は、癌を有する患者を治療するために既に使用されている。N K 細胞に基づく治療法の成功を決定する重要な因子は、N K 細胞が、腫瘍細胞切除を生成する可能性のある効果器：標的比率を達成するのに十分な数で残留しなければならないことである (M i l l e r J S . H e m a t o l o g y A m S o c H e m a t o l E d u c P r o g r a m . 2 0 1 3 ; 2 0 1 3 : 2 4 7 - 2 5 3)。しかしながら、同種細胞が注入される時、それらの残留性は限定されている。患者に与えられる免疫抑制化学療法は注入されたN K 細胞の一過的な生着を可能にするが、これらは注入の2～4週間以内に拒絶される (M i l l e r J S , et al . B l o o d . 2 0 0 5 ; 1 0 5 : 3 0 5 1 - 3 0 5 7 ; R u b n i t z J E , et al . , J C l i n O n c o l . 2 0 1 0 ; 2 8 (6) : 9 5 5 - 9 5 9)。臓器移植に反して、免疫抑制薬剤はN K 細胞機能も抑制するため、継続的な免疫抑制は選択肢ではない。拒絶は主に、レシピエントのC D 8 + T リンパ球によるH L A クラス I 分子の認識によって媒介されるため、注入されたN K 細胞（またはT細胞）からH L A クラス I 分子を除去すると、拒絶率が減少または抑止され、同種細胞の生存、及びそれ故に抗腫瘍能力が延長されるだろう。

【 0 0 1 8 】

更に、LD 連結標的結合分子を本発明に従って使用して、抑制性受容体を標的化することができる。具体的には、抗P D 1 または抗C T L A - 4 などの抑制性シグナルからT細胞を放出する抗体の投与が、劇的な臨床的応答を生成した (S h a r m a P , et al . , N a t R e v C a n c e r . 2 0 1 1 ; 1 1 (1 1) : 8 0 5 - 8 1 2 、 P a r d o l l D M . N a t R e v C a n c e r . 2 0 1 2 ; 1 2 (4) : 2 5 2 - 2 6 4)。C A R - T 細胞、特に固形腫瘍に対して配向されるものが、類似する機構によって抑制され得る。したがって、P D 1 、C T L A - 4 、T i m 3 、または他の抑制性受容体に対する標的結合分子（例えば、s c F v またはリガンド）の発現は、（例えば、K D E L（配列番号4）、E E K K M P（配列番号64）、またはP E S TモチーフS H G F P P E V E E Q D D G T L P M S C A Q E S G M D R H P A A C A S A R I N V（配列番号7）に連結される場合）これらの分子の発現を防止し、または（膜貫通ドメインに連結される場合）受容体のそれらのリガンドへの結合を防止し、C A R 媒介シグナル形質導入を持続するだろう。N K 細胞において、抑制性受容体の例としては、キラー免疫グロブリン様受容体（K I R ）及びN K G 2 A が挙げられる (V i v i e r E , et al . , S c i e n c e , 2 0 1 1 ; 3 3 1 (6 0 1 3) : 4 4 - 4 9)。

【 0 0 1 9 】

本発明の方法はまた、C A R 配向T細胞治療法を受け入れられる、より多数の標的の標的化も可能にする。C A R 配向治療法の主な制限のうちの1つは、腫瘍細胞によって発現される特定の抗原の不足である。白血病及びリンパ腫などの血液学的悪性腫瘍の場合、非造血細胞中で発現されない分子は潜在性な標的ではあり得るが、それらはT細胞及び／またはN K 細胞上でも発現されるため、C A R 標的としては使用することができない。免疫細胞上でそのようなC A R の発現は、「殺同胞」機構による免疫細胞自体の消滅をもた

10

20

30

40

50

らし、それらの抗癌能力を無効にする可能性があるだろう。標的分子が、機能的な有害作用なく免疫細胞から除去され得る場合、対応する特異性を有するCARが発現され得る。これは、血液学的悪性腫瘍を標的化する多くの新しい機会を開く。可能性のある標的の例としては、多発性骨髄腫において発現されるCD38、T細胞白血病及びリンパ腫において発現されるCD7、急性白血病において発現されるTim-3、ホジキン病において発現されるCD30、全ての血液学的悪性腫瘍において発現されるCD45及びCD52が挙げられる。これらの分子はまた、かなりの割合のT細胞及びNK細胞中でも発現される。

【0020】

更に、活性化された免疫細胞によるサイトカインの分泌が、サイトカイン放出症候群及びマクロファージ活性化症候群を引き起こし、免疫細胞治療法の深刻な有害作用を呈することが示されている (Lee DW, et al., Blood. 2014; 124 (2): 188-195)。したがって、LD連結標的結合分子を本発明に従って使用して、そのような炎症カスケードに寄与し得る、IL-6、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-27、IL-35、インターフェロン(IFN)-、IFN-、IFN-、腫瘍壊死因子(TNF)-、及びトランスフォーミング増殖因子(TGF)-などのサイトカインを遮断することができる。

【0021】

したがって、一実施形態において、本発明は、免疫活性化受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結した標的結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む、操作された免疫細胞に関する。

【0022】

本明細書で使用される場合、「操作された」免疫細胞は、天然に存在する免疫細胞と比較して遺伝子改変されている免疫細胞を含む。例えば、本方法に従って生成された操作されたT細胞は、それが由来するT細胞中に天然には存在しないヌクレオチド配列を含む核酸を保有する。いくつかの実施形態において、本発明の操作された免疫細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)、及び局在化ドメインに連結した標的結合分子(LD連結標的結合分子)を含む。特定の一実施形態において、本発明の操作された免疫細胞は、抗CD19-4-1BB-CD3 CAR、及び局在化ドメインに連結した抗CD3scFvを含む。

【0023】

特定の実施形態において、操作された免疫細胞は、操作されたT細胞、操作されたナチュラルキラー(NK)細胞、操作されたNK/T細胞、操作された単球、操作されたマクロファージ、または操作された樹状細胞である。

【0024】

特定の実施形態において、本明細書で使用される場合、「免疫活性化受容体」は、癌細胞リガンドへの結合時に免疫応答を活性化する受容体を指す。いくつかの実施形態において、免疫活性化受容体は、癌細胞上に発現されるリガンド(例えば、ペプチドまたは抗原)への結合(ライゲーション)時に免疫応答を活性化することができる分子を含む。一実施形態において、免疫活性化受容体はキメラ抗原受容体(CAR)であり、CARを設計し、操作するための方法は当該技術分野において既知である。他の実施形態において、免疫活性化受容体は抗体結合受容体であり、これはCARに類似しているが、scFvが抗体結合分子(例えば、CD16、CD64、CD32)で置換されたものである(例えば、CD16-4-1BB-CD3ゼータ受容体-Kudo, et al. Cancer Res. 2014; 74 (1): 93-103)。様々な実施形態において、腫瘍細胞HLAの文脈において、腫瘍細胞上に発現されるペプチドに結合するT細胞受容体アルファ鎖及びベータ鎖を含むT細胞受容体もまた、本方法に従って使用することができる。特定の実施形態において、癌細胞上に発現されるリガンドに結合することによって免疫応答を活性化する分子を担持する、他の受容体(例えば、腫瘍細胞上に発現されるNKG2Dリガンドに結合するNKG2D-DAP10-CD3ゼータ受容体)もまた、使用する

10

20

30

40

50

ことができる（例えば、Chang YH, et al., Cancer Res. 20 13; 73 (6): 1777-1786 を参照されたい）。癌細胞上に発現されるリガンド（例えば、ペプチドまたは抗原）への結合（ライゲーション）時に免疫応答を活性化することができる全てのそのような好適な受容体はまとめて「免疫活性化受容体」と呼ばれる。当業者によって認識されるように、免疫活性化受容体は、抗体または抗原結合断片（例えば、scFv）を含有する必要はなく、むしろ、標的分子に結合する免疫活性化受容体の部分は、例えば、受容体-リガンド対中の受容体または受容体-リガンド対中のリガンドに由来し得る。

【0025】

特定の態様において、免疫活性化受容体は、CD20、CD22、CD33、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD45、CD52、CD38、CS-1、TIM3、CD123、メソセリン、葉酸受容体、HER2-neu、上皮増殖因子受容体、及び上皮増殖因子受容体を含むが、これらに限定されない、腫瘍細胞の表面上に発現される分子に結合する。いくつかの実施形態において、免疫活性化受容体は、CAR（例えば、抗CD19-4-1BB-CD3 CAR）である。特定の実施形態において、免疫活性化受容体は、CD20、CD22、CD33、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD45、CD52、CD38、CS-1、TIM3、CD123、メソセリン、葉酸受容体、HER2-neu、上皮増殖因子受容体、及び上皮増殖因子受容体を含むが、これらに限定されない、腫瘍細胞の表面上に発現される分子に結合する、抗体またはその抗原結合断片（例えば、scFv）を含む。腫瘍細胞の表面上に発現されるそのような分子に対する抗体は、当該技術分野において既知かつ入手可能である。一例として、CD3及びCD7に対する抗体は、当該技術分野において商業的に入手可能かつ既知である。本明細書に例証されるように、そのような抗体及びそれらに由来する抗体の断片（例えば、scFv）を本発明において使用することができる。更に、標的タンパク質に対する抗体及び抗体断片を生成する方法は、当該技術分野において周知かつ通例である。

【0026】

本発明に従う免疫活性化受容体（例えば、CAR）の膜貫通ドメインは、CD8、CD8、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc RI、CD16（例えば、CD16AまたはCD16B）、OX40、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32（例えば、CD32AまたはCD32B）、CD64（例えば、CD64A、CD64B、またはCD64C）、VEGFR2、FAS、及びFGFR2Bを含むが、これらに限定されない、1回貫通膜タンパク質に由来してもよい。いくつかの例において、膜タンパク質はCD8ではない。膜貫通ドメインはまた、天然に存在しない疎水性タンパク質セグメントであってもよい。

【0027】

免疫活性化受容体（例えば、CAR）のヒンジドメインは、CD8などのタンパク質またはIgGに由来し得る。ヒンジドメインは、CD8の膜貫通ドメインもしくはヒンジドメインの断片、または様々な長さの親水性残基からなるポリペプチドなどの天然に存在しないペプチド、または(GGGGS)_n（配列番号8）ポリペプチド（nは、例えば、3~12（これらを含む）の整数である）であってもよい。

【0028】

免疫活性化受容体（例えば、CAR）のシグナリングドメインは、CD3、Fc RI、DAP10、DAP12、または免疫細胞中の活性化シグナルを送達することが既知である他の分子に由来し得る。受容体の少なくとも1つの同時刺激シグナリングドメインが、4-1BB（CD137としても知られる）、CD28、CD28_{LLGG}バリアント、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1、またはCD2などの同時刺激分子であってもよい。そのような分子は、当該技術分野において容易に入手可能かつ既知である。

【0029】

10

20

30

40

50

当業者によって認識されるように、免疫活性化受容体の構成要素は、所望される結果を生成するため、本明細書に説明されるようにいくつかの機能的組み合わせを含むように操作され得る。特定のCAR抗CD19-4-1BB-CD3を一例として使用すると、本明細書に説明されるように、分子に結合する抗体（例えば、またはその抗原結合断片（scFvなど））は、異なる分子に結合する抗体（例えば、抗CD19の代わりに抗CD20、抗CD33、抗CD123など）で置換されてもよい。他の実施形態において、同時刺激分子（この具体例においては4-1BB）はまた、異なる同時刺激分子（例えば、CD28）によって異なってもよい。いくつかの実施形態において、刺激分子（この具体例においてはCD3）は、別の既知の刺激分子で置換されてもよい。様々な実施形態において、所望される場合、受容体の膜貫通ドメインもまた異なってもよい。そのような免疫活性化受容体の設計、生成、及び機能性の試験は、当業者によって容易に決定され得る。同様に、そのような免疫活性化受容体をコードする核酸の設計、細胞への送達、及び発現は、当該技術分野において容易に既知かつ入手可能である。

【0030】

本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、複数のヌクレオチドモノマー（例えば、リボヌクレオチドモノマーまたはデオキシリボヌクレオチドモノマー）を含むポリマーを指す。「核酸」は、例えば、ゲノムDNA、cDNA、RNA、及びDNA-RNAハイブリッド分子を含む。核酸分子は、天然に存在するもの、組み換え型のもの、または合成のものであってもよい。更に、核酸分子は、一本鎖、二本鎖、または三本鎖であってもよい。いくつかの実施形態において、核酸分子は改変されてもよい。二本鎖ポリマーの場合、「核酸」は、分子のいずれかまたは両方の鎖を指し得る。

【0031】

核酸に関連して、「ヌクレオチド配列」という用語は、リン結合（例えば、リン酸ジエステル結合、アルキル及びアリール-ホスホネート結合、ホスホロチオエート結合、ホスホトリエステル結合）ならびに／または非リン結合（例えば、ペプチド結合及び／もしくはスルファメート結合）などの共有結合によって接合される、一連の近接ヌクレオチドを指す。特定の実施形態において、例えば、局在化ドメインに連結した標的結合分子をコードするヌクレオチド配列は、異種配列（例えば、異なる種または細胞型を起源とする遺伝子）である。

【0032】

「ヌクレオチド」及び「ヌクレオチドモノマー」という用語は、天然に存在するリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドモノマー、ならびに天然に存在しないそれらの誘導体及び類似体を指す。したがって、ヌクレオチドは、例えば、天然に存在する塩基（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、イノシン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、またはデオキシシチジン）を含むヌクレオチド、及び当該技術分において既知である改変された塩基を含むヌクレオチドを含み得る。

【0033】

当業者によって認識されるように、いくつかの態様において、核酸は、プラスミド配列を更に含む。プラスミド配列は、例えば、プロモータ配列、選択マーカ配列、及び遺伝子座標的化配列からなる群から選択される1つ以上の配列を含み得る。

【0034】

本明細書で使用される場合、局在化ドメインに連結した標的結合分子をコードする遺伝子は、「LD連結標的結合分子」と呼ばれることがある。

【0035】

特定の実施形態において、標的結合分子は、抗体またはその抗原結合断片である。本明細書で使用される場合、「抗体」は、改変もしくは操作されているか、またはヒト抗体である、インタクトな抗体または抗原結合断片を含む、インタクトな抗体または抗体の抗原結合断片を意味する。改変または操作されている抗体の例は、キメラ抗体、ヒト化抗体、多重パラトピック抗体（例えば、二重パラトピック抗体）、及び多重特異性抗体（例えば

10

20

30

40

50

、二重特異性抗体）である。抗原結合断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单鎖抗体（例えば、scFv）、ミニボディ、及びダイアボディが挙げられる。

〔 0 0 3 6 〕

「F a b 断片」は、1つの軽鎖、及びC_H1、及び1つの重鎖の可変領域を含む。F a b分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することはできない。

【 0 0 3 7 】

「Fc」領域は、ある抗体のCH2及びCH3ドメインを含む2つの重鎖断片を含有する。2つの重鎖断片は、2つ以上のジスルフィド結合によって、及びCH3ドメインの疎水性相互作用によって、ともに保持される。

〔 0 0 3 8 〕

「F a b 断片」は、2つのF a b 断片の2つの重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合が形成されて、 $F(a b)_2$ 分子を形成し得るように、1つの軽鎖、ならびにV Hドメイン及びC H 1ドメイン及びC H 1ドメインとC H 2ドメインとの間の領域またも含有する1つの重鎖の一部分を含有する。

【 0 0 3 9 】

「F (a b)₂ 断片」は、2つの重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合が形成されるように、2つの軽鎖、ならびにC_H1ドメインとC_H2ドメインとの間の定常領域の一部分を含有する2つの重鎖を含有する。したがって、F (a b)₂ 断片は、2つの重鎖の間のジスルフィド結合によってともに保持される、2つのF a b 断片で構成される。

【 0 0 4 0 】

「Fv領域」は、重鎖及び軽鎖の両方に由来する可変領域を含むが、定常領域は欠如する。

【 0 0 4 1 】

特定の一実施形態において、標的結合分子は、単鎖 Fv 抗体（「scFv 抗体」）である。scFv は、ある抗体の VH 及び VL ドメインを含む抗体断片を指し、これらのドメインは、単一ポリペプチド鎖中に存在する。一般に、Fv ポリペプチドは、VH ドメインと VL ドメインとの間に、scFv が抗原結合に所望される構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーを更に含む。scFv の概説については、Pluckthun (1994) The Pharmacology Of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 を参照されたい。PCT 公開第 WO 88/01649 号、ならびに米国特許第 4,946,778 号及び同第 5,260,203 号もまた参考されたい。一例として、本明細書に開示される scFv の VH ドメインと VL ドメインとの間のリンカーは、例えば、GGGGSGGGGSGGGGGSGGGGS (配列番号 41) または GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 43) を含む。当業者によって認識されるように、様々な好適なリンカーが、当該技術分野において提供されるように、及び本明細書に開示されるように、最適な機能のために設計され、試験され得る。

(0 0 4 2)

L D 連結標的結合分子の部分である s c F v は、例えば、キメラ抗原受容体 (C A R) または類似する抗体結合シグナリング受容体の文脈において生じる s c F v と必ずしも同一ではない。いくつかの実施形態において、L D 連結標的結合分子の部分である s c F v は、例えば、キメラ抗原受容体 (C A R) または類似する抗体結合シグナリング受容体の文脈において生じる s c F v と同一である。

[0 0 4 3]

いくつかの実施形態において、標的結合分子（例えば、LD連結標的結合分子の文脈におけるscFv）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、配列番号14、15、18、19、22、23、26、27、30、31、34、35、38、または39のうちのいずれか1つ以上に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも88%

、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する 1 つ以上の配列を含む。

【 0 0 4 4 】

「配列同一性」という用語は、デフォルトギャップ重量を使用するプログラム G A P または B E S T F I T などによって最適に整列される時、2 つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列が、少なくとも、例えば、7 0 % の配列同一性、または少なくとも 8 0 % の配列同一性、または少なくとも 8 5 % の配列同一性、または少なくとも 9 0 % の配列同一性、または少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を共有することを意味する。配列比較について、典型的には 1 つの配列が基準配列（例えば、親配列）としての役割を果たし、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する時には、試験配列及び基準配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。その後、配列比較アルゴリズムが、指定されたプログラムパラメータに基づいて、基準配列に対する試験配列（複数可）の配列同一性パーセントを計算する。

【 0 0 4 5 】

比較のための配列の最適な整列は、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) の相同性整列アルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988) の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. における G A P、B E S T F I T、F A S T A、及び T F A S T A) によって、または目視検査（一般に、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology を参照されたい）によって、実行することができる。配列同一性パーセント及び配列類似性の決定に好適であるアルゴリズムの一例は、Altenschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990) に説明される B L A S T アルゴリズムである。B L A S T 分析を実行するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) を通して公的に入手可能（国立衛生研究所 (National Institutes of Health) の N C B I インターネットサーバを通して公的にアクセス可能）である。典型的には、デフォルトプログラムパラメータを使用して、配列比較を実行することができるが、カスタム化パラメータもまた使用されてもよい。アミノ酸配列について、B L A S T P プログラムは、3 のワード長 (W)、10 の期待値 (E)、及び B L O S U M 6 2 スコア行列 (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989) を参照されたい）をデフォルトとして使用する。

【 0 0 4 6 】

特定の実施形態において、抗体（例えば、s c F v）は、それぞれ配列番号 1 2 及び 1 3、それぞれ配列番号 1 6 及び 1 7、それぞれ配列番号 2 0 及び 2 1、それぞれ配列番号 2 4 及び 2 5、それぞれ配列番号 2 8 及び 2 9、それぞれ配列番号 3 2 及び 3 3、またはそれぞれ配列番号 3 6 及び 3 7 に規定されるアミノ酸配列を有する V H 及び V L を含む。いくつかの実施形態において、抗体（例えば、s c F v）は、それぞれ配列番号 1 2 及び 1 3、それぞれ配列番号 1 6 及び 1 7、それぞれ配列番号 2 0 及び 2 1、それぞれ配列番号 2 4 及び 2 5、それぞれ配列番号 2 8 及び 2 9、それぞれ配列番号 3 2 及び 3 3、またはそれぞれ配列番号 3 6 及び 3 7 に規定される V H 及び V L 配列に対して、それぞれが少なくとも 9 0 % の配列同一性、少なくとも 9 1 % の配列同一性、少なくとも 9 2 % の配列同一性、少なくとも 9 3 % の配列同一性、少なくとも 9 4 % の配列同一性、少なくとも 9

10

20

30

30

40

50

5 % の配列同一性、少なくとも 9 6 % の配列同一性、少なくとも 9 7 % の配列同一性、少なくとも 9 8 % の配列同一性、少なくとも 9 9 % の配列同一性、または 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を有する V H 及び V L を含む。

【 0 0 4 7 】

「ダイアボディ」は、2 つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。断片は、同一のポリペプチド鎖中で軽鎖可変領域 (V L) に接続した重鎖可変領域 (V H) (V H - V L または V L - V H) を含む。同一鎖上の 2 つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは、別の鎖の相補ドメインとの対合、及び 2 つの抗原結合部位の作製を強制される。ダイアボディは、例えば、特許文書 E P 4 0 4 , 0 9 7 、 W O 9 3 / 1 1 1 6 1 、及び Holliger et al . , (1 9 9 3) Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 に説明される。 10

【 0 0 4 8 】

特定の実施形態において、抗体は、トリアボディまたはテトラボディである。トリアボディ及びテトラボディを設計し、生成する方法は、当該技術分野において既知である。例えば、 T o d o r o v s k a et al . , J . Immunol . Methods 2 4 8 (1 - 2) : 4 7 - 6 6 , 2 0 0 1 を参照されたい。

【 0 0 4 9 】

「ドメイン抗体断片」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する、免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片である。いくつかの例において、2 つ以上の V H 領域がペプチドリンカーで共有結合されて、二価のドメイン抗体断片が作製される。二価のドメイン抗体断片の 2 つの V H 領域は、同一の抗原を標的化しても、異なる抗原を標的化してもよい。 20

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態において、抗体は、改変または操作される。改変または操作された抗体の例としては、キメラ抗体、多重パラトピック抗体（例えば、二重パラトピック抗体）、及び多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）が挙げられる。

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される場合、「多重パラトピック抗体」は、少なくとも 2 つの單一ドメイン抗体を含む抗体を意味し、そのうち、少なくとも一方の單一ドメイン抗体が、抗原上の第 1 の抗原決定基に対して配向され、少なくとも 1 つの他方の單一ドメイン抗体が、同一の抗原上の第 2 の抗原決定基に対して配向される。したがって、例えば、「二重パラトピック」抗体は、抗原上の第 1 の抗原決定基に対して配向される少なくとも 1 つの單一ドメイン抗体、及び同一の抗原上の第 2 の抗原決定基に対して配向される少なくとも 1 つの更なる單一ドメイン抗体を含む。 30

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用される場合、「多重特異性抗体」は、少なくとも 2 つの單一ドメイン抗体を含む抗体を意味し、そのうち、少なくとも一方の單一ドメイン抗体が、第 1 の抗原に対して配向され、少なくとも 1 つの他方の單一ドメイン抗体が、（第 1 の抗原とは異なる）第 2 の抗原に対して配向される。したがって、例えば、「二重特異性」抗体は、第 1 の抗原に対して配向される少なくとも 1 つの單一ドメイン抗体、及び例えば、第 1 の抗原とは異なる第 2 の抗原に対して配向される少なくとも 1 つの更なる單一ドメイン抗体を含む抗体である。 40

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される抗体は、モノクローナル抗体、例えば、マウスモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体を生成する方法は、当該技術分野において既知である。例えば、 Pluckthun (1 9 9 4) The Pharmacology of Monoclonal Antibodies , Vol . 1 1 3 , Rosenberg and Moore eds . Springer - Verlag , New York , pp . 2 6 9 - 3 1 5 を参照されたい。 50

【0054】

様々な実施形態において、LD連結標的結合分子の文脈における標的結合分子は、標的分子に結合する受容体またはリガンドである。例えば、その標的結合分子は、PD-1に結合するリガンド（例えば、PD-L1またはPD-L2）であってもよい。したがって、当業者によって認識されるように、標的結合分子は、抗体であっても、標的分子に結合するリガンド／受容体であってもよい。

【0055】

本明細書で使用される場合、LD連結標的結合分子の文脈における「連結した」は、1つ以上の局在化ドメインをコードする1つ以上の遺伝子に隣接する枠内に直接ある（例えば、リンカーを有さない）標的結合分子をコードする遺伝子を指す。あるいは、標的結合分子をコードする遺伝子は、本明細書に説明されるように、リンカー配列を通して、1つ以上の局在化ドメインをコードする1つ以上の遺伝子に接続されてもよい。当該技術分野において既知である様々な好適なリンカーを使用して、標的結合分子を局在化ドメインに繋留することができる。例えば、様々な長さの親水性残基からなるポリペプチドなどの天然に存在しないペプチド、または(G G G G S)_n（配列番号8）ポリペプチド（nは、例えば、3～12（これらを含む）の整数である）を、本発明に従って使用してもよい。特定の実施形態において、リンカーは、例えば、G G G G S G G G G S（配列番号62）を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、例えば、G G G G S G G G G S G G G G S G G G S（配列番号41）を含む。様々な実施形態において、約5～約100（これらを含む）のアミノ酸長を有するペプチドリンカーを、本発明において使用することができる。特定の実施形態において、約20～約40（これらを含む）のアミノ酸長を有するペプチドリンカーを、本発明において使用することができる。いくつかの実施形態において、少なくとも5のアミノ酸長、少なくとも10のアミノ酸長、少なくとも15のアミノ酸長、少なくとも20のアミノ酸長、少なくとも25のアミノ酸長、少なくとも30のアミノ酸長、少なくとも35のアミノ酸長、または少なくとも40のアミノ酸を有するペプチドリンカーを、本発明において使用することができる。当業者によって認識されるように、そのようなリンカー配列及びそのようなリンカー配列のバリエントは、当該技術分野において既知である。リンカー配列を組み込む構築物を設計する方法、及び機能性を評価する方法は、当業者にとって容易に入手可能である。

【0056】

特定の実施形態において、LD連結標的結合分子は、免疫細胞の表面上に発現される標的に結合する。いくつかの実施形態において、LD連結標的結合分子は、標的分子の活性または機能を抑制する。一例として、本明細書に開示されるように、LD連結標的結合分子は、例えば、CD3、CD7、CD45、hB2MG、KIR2DL1、KIR2DL2/DL3、またはNK2Aに結合し、それによってそのような分子の細胞表面発現を下方制御するように設計されてもよい。そのような分子の下方制御は、例えば、分解及び／または内在化のための分子の局在化／標的化を通して達成することができる。他の実施形態において、LD連結標的結合分子は、標的を非活性にする（例えば、標的は、もはやその同族リガンドもしくは受容体に相互作用及び／または結合することができない）。

【0057】

いくつかの実施形態において、本発明の操作された免疫細胞は、改良された治療有効性を有する。本明細書で使用される場合、「改良された治療有効性」は、宿主における移植片対宿主病（GVHD）の低減、宿主による拒絶の低減もしくは除去、宿主における生存の延長、宿主における腫瘍による抑制の低減、宿主における自己死滅の低減、宿主における炎症カスケードの低減、または宿主におけるCAR媒介シグナル形質導入の持続のうちの1つ以上を指す。

【0058】

本発明の特定の実施形態において、LD連結標的結合分子の文脈における標的結合分子は、CD3/T細胞受容体（TCR）複合体中の分子、サイトカイン、ヒト白血球抗原（HLA）クラスI分子、または免疫応答を下方制御する受容体に結合する。

10

20

30

40

50

【0059】

特定の実施形態において、CD3/TCR複合体中の分子は、CD3、TCR、TCR、TCR、CD3、CD3、またはCD3であり得る。特定の一実施形態において、分子はCD3である。

【0060】

別の実施形態において、HLAクラスI分子は、ベータ-2ミクログロブリン、1-ミクログロブリン、2-ミクログロブリン、または3-ミクログロブリンである。

【0061】

他の実施形態において、免疫応答を下方制御する受容体は、例えば、PD-1、CTL A-4、Tim3、キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR-例えば、KIR2DL1 (CD158aとしても知られる)、KIR2DL2/DL3 (CD158bとしても知られる))、CD94またはNKG2A (CD159aとしても知られる)、タンパク質チロシンホスファターゼ (Src相同性領域2ドメイン含有ホスファターゼ (SHP)-1及びSHP-2など)から選択される。したがって、そのような受容体は、本明細書に説明されるように、部分LD連結標的結合分子によって標的化することができる。

【0062】

様々な実施形態において、部分LD連結標的結合分子によって標的化され得るサイトカインの例としては、例えば、インターロイキン (IL)-6、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-27、IL-35、インターフェロン (IFN)-、IFN-、IFN-、腫瘍壊死因子 (TNF)-、またはトランスフォーミング増殖因子 (TGF)-が挙げられる。

【0063】

更なる一態様において、LD連結標的結合分子は、例えば、CD2、CD4、CD5、CD7、CD8、CD30、CD38、CD45、CD52、またはCD127から選択される分子に結合する。

【0064】

任意の標的タンパク質に対する抗体及びそれらの抗体断片を生成する方法は、当該技術分野において周知かつ通例である。更に、本明細書に例証されるように、様々な標的 (例えば、CD3及びCD7)に対する商業的に入手可能な抗体を使用して、本明細書に例証されるように、LD連結標的結合分子を作製することができる。本明細書に例証されるように、当該技術分野において既知である抗体及びそれらに由来する抗体の断 (例えば、scFv)を本発明において使用することができる。

【0065】

他の態様において、LD連結標的結合分子の局在化ドメインは、小胞体 (ER) 保持配列 KDEL (配列番号4)、またはKKXX (配列番号9)、KXD/E (配列番号10) (式中、Xは、任意のアミノ酸であり得る-Gao et al., Trends in Plant Science 19:508-515, 2014を参照されたい)、及びYQRL (配列番号11) (Zhan J, et al., Cancer Immunol Immunother 46:55-60, 1998を参照されたい)などの他のERもしくはゴルジ保持配列; 例えば、「PEST」モチーフ-SHGFPPPEVE QDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINV (配列番号7)を含むプロテオソーム標的化配列; ならびに/あるいはCD8膜貫通ドメイン、または本明細書に説明される別の1回膜貫通タンパク質の膜貫通 (例えば、CD8、CD8、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc RI、CD16 (CD16AもしくはCD16Bなど)、OX40、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32 (CD32AもしくはCD32Bなど)、CD64 (CD64A、CD64B、もしくはCD64Cなど)、VEGFR2、FAS、またはFGFR2B)などの細胞膜に標的結合分子を標的化する配列を含む。本明細書に例証される具体的な局在化ドメイン (配列) の例を、図2に示す。様々な他の局在化配列が、当該技術分野において既知かつ入手可能である。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

図2に示されるように、本発明のLD連結標的結合分子は、1つ以上の局在化ドメインを含んでもよい。例えば、LD連結標的結合分子は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または少なくとも10のともに連結した局在化ドメインを有してもよい。所与のLD連結標的結合分子において、2つ以上の局在化ドメインが使用される場合、各局在化ドメインは、任意の介在リンカーありまたはなしで連結され得る。一例として、図2に示されるように、単一のLD連結標的結合分子において、局在化ドメインCD8TM、PESTモチーフ、及びEEKKMPを使用することができる。この特定の構築物は、いかなる介在リンカーも有さない局在化ドメインを示す一方で、局在化ドメインのうちのいくつかまたは全ての間に、様々な介在リンカーが組み込まれてもよい。他の例が、図2に示される。

10

【 0 0 6 7 】

当業者によって認識されるように、免疫活性化受容体及び/またはLD連結標的結合分子は、本明細書に開示される標的、及び本明細書に開示される標的のバリアントに結合するように設計されてもよい。一例として、免疫活性化受容体及び/またはLD連結標的結合分子は、CD3/TCR複合体中の分子、またはその天然に存在するバリアント分子に結合するように設計されてもよい。そのような天然に存在するバリアントは、その分子の野生型形態と同一の機能を有し得る。他の実施形態において、バリアントは、その分子の野生型形態と比較して変化した機能を有し得る（例えば、疾患状態を与える）。

20

【 0 0 6 8 】

当業者によって認識されるように、図2に示されるLD連結標的結合分子構築物の様々な構成要素は、その組み合わせが機能的LD連結標的結合分子を生成する限り、（例えば、異なるリンカー、異なる局在化配列、異なるscFvなどを含有するように）異なる組み合わせで置換されてもよい。特定の構築物の機能性を評価する方法は、本明細書に開示される当業者の領域内である。

【 0 0 6 9 】

更なる態様において、本発明は、癌を治療するための、免疫活性化受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結した標的結合分子（例えば、scFv）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む、操作された免疫細胞の使用であって、治療量の操作された免疫細胞を、それを必要とする対象に投与することを含む、使用に関する。

30

【 0 0 7 0 】

別の態様において、本発明は、癌を治療するための、キメラ抗原受容体（CAR）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結した単鎖可変断片（scFv）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む、操作された免疫細胞の使用であって、治療量の操作された免疫細胞を、それを必要とする対象に投与することを含む、使用に関する。

【 0 0 7 1 】

他の態様において、本発明は、自己免疫障害を治療するための、免疫活性化受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結した標的結合分子（例えば、scFv）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む、操作された免疫細胞の使用であって、治療量の操作された免疫細胞を、それを必要とする対象に投与することを含む、使用に関する。

40

【 0 0 7 2 】

他の態様において、本発明はまた、感染性疾患を治療するための、免疫活性化受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結した標的結合分子（例えば、scFv）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む、操作された免疫細胞の使用であって、治療量の操作された免疫細胞を、それを必要とする対象に投与することを含む、使用にも関する。

50

【0073】

様々な実施形態において、免疫活性化受容体は、CAR（例えば、抗CD19-4-1BB-CD3 CAR）である。

【0074】

他の実施形態において、局在化ドメインに連結した単鎖可変断片（scFv）は、図2に示されるいづれか1つ以上の構築物から選択される。

【0075】

いくつかの態様において、操作された免疫細胞は、対象への注入によって投与される。免疫細胞（例えば、同種または自家免疫細胞）を注入する方法は、当該技術分野において既知である。疾患の症状を寛解させるために、十分な数の細胞がレシピエントに投与される。典型的には、 $10^7 \sim 10^{10}$ 個の細胞の薬用量、例えば、 10^9 個の細胞の薬用量が、単回設定で注入される。注入は、単回の 10^9 個の細胞の用量として投与されるか、またはいくつかの 10^9 個の細胞の薬用量に分割される。注入頻度は、3～30日に1回、または所望もしくは指示される場合、それよりも長い間隔ですらあり得る。注入量は一般に、一対象当たり少なくとも1回の注入、及び許容される場合好ましくは少なくとも3回の注入、または疾患症状が寛解されるまでである。細胞は、50～250ml/時の速度で静脈内注入され得る。他の好適な投与様式としては、動脈内注入、腫瘍への直接注射及び/または手術後の腫瘍母地の灌流、人工スキヤフォールドにおける腫瘍部位での移植、髄腔内投与、ならびに眼内投与が挙げられる。本発明をそのような送達様式に適合させる方法は、当業者にとって容易に入手可能である。

10

20

【0076】

特定の態様において、治療される癌は、固体腫瘍または血液学的悪性腫瘍である。血液学的悪性腫瘍の例としては、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、脊髄形成異常症、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫が挙げられる。固体腫瘍の例としては、肺癌、黑色腫、乳癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、腋窩癌、肝細胞癌腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、脳腫瘍が挙げられる。

【0077】

別の実施形態において、本発明は、本発明の操作された免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞に、免疫活性化受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結した標的結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを導入し、それによって操作された免疫細胞を生成することを含む、方法に関する。

30

【0078】

特定の実施形態において、ヌクレオチド配列を含む核酸は、生体外で免疫細胞に導入される。他の実施形態において、ヌクレオチド配列を含む核酸は、生体内で免疫細胞に導入される。

【0079】

いくつかの実施形態において、「免疫細胞」は、例えば、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK/T細胞、単球、マクロファージ、または樹状細胞を含む。

【0080】

導入されるヌクレオチド配列を含む核酸は、本明細書に説明される免疫活性化受容体と、局在化ドメインに連結した標的結合分子（例えば、scFv）とを含有する単一バイリストロニック構築物であってもよい。本明細書に説明されるように、単一バイリストロニック構築物は、内部リボソーム侵入部位（IRES）または2Aペプチドコード領域部位を、本明細書に説明される免疫活性化受容体（例えば、CAR）及び標的結合分子（例えば、scFv）をコードする2つのcDNAの間に挿入することによって、調製することができる。2つ以上の標的を削除するためのトリリストロニック送達系の設計もまた、実行可能であるだろう。あるいは、個々の構築物（例えば、CAR及びLD連結標的結合分子）の（同時または連続での）別個の形質導入が実行されてもよい。外来性核酸を導入する方法は、本明細書に例証され、当該技術分野において周知である。

40

50

【0081】

本明細書で使用される場合、それに反して明確に示されない限り、「1つの(a)」及び「1つの(a n)」という不定冠詞は、「少なくとも1つの」を意味することが理解されるべきである。

【実施例】

【0082】

例証

方法

【0083】

マウス抗ヒトCD3ハイブリドーマからの、scFvのクローニング

10

【0084】

抗ヒトCD3モノクローナル抗体を分泌するPLU4ハイブリドーマ細胞(IgG2aアイソタイプ、Creative Diagnostics, Shirley, NY)を、IMDMプラスGlutamax培地(Life Technologies, Carlsbad, CA)中で、20%のウシ胎仔血清(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)及び抗生物質とともに培養した。TRIZol試薬(Life Technologies)を使用して全RNAを抽出し、M-MLV逆転写酵素(Promega, Madison, WI)及びオリゴチミジン₁₅プライマー(Promega)によってcDNAを合成した。IgG Library Primer Set Mouse Biogenomics(US Biological, Salem, MA)を使用して、重鎖(VH)及び軽鎖(VL)の可変領域を增幅させ、PCR生成物を配列決定用TOPO TAクローニングキット(Life Technologies)中へとクローニングした。重複伸長PCRによるスプライシングを使用して、(Gly₄Ser)₄をコードする可動性リンカー配列によって、VH及びVL遺伝子をscFvへと組み立てた。健康なドナーのヒト活性化T細胞由来するcDNAを使用するPCRによって、CD8のシグナルペプチドドメインをサブクローニングし、VL断片の5'末端に接続した。センスプライマー: 5' - ATATATGAATTCTGGCTTCCACCATGGCCTTACCAAGTGACC - 3' (配列番号2) 及び逆方向プライマー: 5' - CAGATCTCTTCAGAAATAAGTTTGTTCGGCTGAGGAGACTGTGAGAG - 3' (配列番号3) を使用するPCRによって、My cタグ(EQKLI S E E D L、配列番号1)をVHのC終端に添加した。My cタグの後、センスプライマー: 5' - ATATATGAATTCTGGCTTCCACCATGGCCTTACCAAGTGACC - 3' (配列番号5) 及び逆方向プライマー: 5' - TATATACTCGAGTTAACACTCGTCCTTCAGATCTTCAGAAATAAG - 3' (配列番号6) によって、KDEL(配列番号4)コード配列もまた作製した。CD8シグナルペプチド、ヒトCD3に対するscFv、My cタグ、及びKDEL(配列番号4)配列からなる合成された遺伝子を、MSCV-IRES-GFPベクターのEcoRI部位及びXhoI部位へとサブクローニングした。図2に列挙されるように、myc-KDELが他の配列によって置換される構築物もまた、作製した。

30

【0085】

マウスオルニチン脱炭酸酵素のアミノ酸422～461に対応する「PEST」の配列-SHGFPPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINV(配列番号7)モチーフを、GenBank(受入番号NM_013614.2)から得た。GenScript(Piscataway, NJ)によってコドン最適化及び遺伝子合成を行い、PCRによってVHの3'末端へとサブクローニングした。構築物を、MSCV-IRES-GFPベクターのEcoRI部位及びXhoI部位へとサブクローニングした。

【0086】

ヒトCD7に対するscFvのクローニング

40

50

【0087】

マウス TH 69 (抗CD7) 抗体に由来する配列 scFvを、文献 (Peipp et al., Cancer Res 2002 (62) : 2848 - 2855) から得た。コドン最適化後、CD8シグナルペプチド、ヒトCD7に対するscFv、Myctag、及びKDEL (配列番号4) 配列からなる合成された遺伝子を、MSCV - IRES - GFPベクターのEcoRI部位及びXhoI部位へとサブクローニングした。図2に列挙されるように、myc - KDELが他の配列によって置換される構築物もまた、作製した。

【0088】

ヒトベータ-2ミクログロブリン (hB2MG) に対するscFvのクローニング

【0089】

マウスBBM.1 (抗hB2MG) IgG2b抗体に由来する配列scFvを、文献 (Groverder, E. A. et al., Kidney Int. 2004; 65 (1) : 310 - 322) から得た。コドン最適化後、CD8シグナルペプチド、ヒトB2MGに対するscFv、Myctag、及びKDEL (配列番号4) 配列からなる合成された遺伝子を、MSCV - IRES - GFPベクターのEcoRI部位及びXhoI部位へとサブクローニングした。

10

【0090】

ヒトKIR2DL1及びKIR2DL2 / DL3に対するscFvのクローニング

【0091】

ヒトモノクローナル抗体I-7F9 (抗KIR2DL1、KIR2DL2、及びKIR2DL3) のアミノ酸配列は、Moretta et al. らによる公開国際特許出願第WO2006003179A2号に由来した。コドン最適化後、可変軽 (VL) 領域及び可変重 (VH) 領域をリンカー配列で接続することによって、scFvの配列を設計した。CD8シグナルペプチド、ヒトKIRに対するscFv (KIR2DL1、KIR2DL2、及びKIR2DL3) 、CD8ヒンジ及び膜貫通ドメイン、ならびにKKMP配列からなる合成された遺伝子を、MSCV - IRES - GFPベクターのEcoRI部位及びXhoI部位へとサブクローニングした。図2に列挙されるように、KKMPが他の配列によって置換される構築物もまた、作製した。

20

【0092】

ヒトNKG2Aに対するscFvのクローニング

30

【0093】

マウス抗体Z199 (抗NKG2A) の配列は、Speeらによる公開特許 (EP2247619A1) に由来した。コドン最適化後、可変軽 (VL) 領域及び可変重 (VH) 領域をリンカー配列で接続することによって、scFvの配列を設計した。CD8シグナルペプチド、ヒトNKG2Aに対するscFv、CD8ヒンジ及び膜貫通、ならびにKKMP配列からなる合成された遺伝子を、MSCV - IRES - GFPベクターのEcoRI部位及びXhoI部位へとサブクローニングした。図2に列挙されるように、KKMPが他の配列によって置換される構築物もまた、作製した。本明細書で作製されるscFvsの配列情報を、表1に示す。図2に描寫される様々な構成要素の配列情報を、表2に示す。

40

【0094】

抗CD19 - 4 - 1BB - CD3 CAR

【0095】

このCARを、以前に説明されるように作製した (Imai, C. et al., Leukemia. 2004; 18: 676 - 684、Imai, C. et al., Blood. 2005; 106: 376 - 383)。

【0096】

表1. scFv配列情報

【表1-1】

| 標的 | VHアミノ酸 | VLアミノ酸 | VH cDNA | VL cDNA |
|-----|--|--|---|--|
| CD3 | EVQLQQSG AELARPG SVKMSCKA SGYTFTRY TMHWVVKQ RPGQGLEW IGYINPSRG YTNYNQKF DKATLTT DKSSSTAY MQLSSLTS EDSAVYYC ARYYDDH YCLDYWG QGTTLTVS SA (配列番号12) | QIVLTQSPAIM SASPGEKVTM TCSASSSVY MNWYQQKSG TSPKRWYDTS KLASGVPAHF RGSGSGTSYSL TISGMEEADEA ATYYCQQWSS NPFTFGSGTKL EINR (配列番号13) TTACTAATTACA ATCAGAAGTTCAAG GACAAGGCCACATT GACTACAGACAAAT CCTCCAGCACAGCC TACATGCAACTGAG CAGCCTGACATCTG AGGACTCTGCAGTC TATTACTGTGCAAG ATATTATGATGATC ATTACTGCCTTGAC TACTGGGCCAAGG CACCACTCTCACAG | GAGGTCCAGCTGCA GCAGTCTGGGGCTG AACTGGCAAGACCT GGGGCCTCAGTGAA GATGTCTGCAAGG CTTCTGGCTACACC TTTACTAGGTACAC GATGCACTGGGTA AACAGAGGCCGTGG ACAGGGTCTGGAAT GGATTGGATACATT AATCCTAGCCGTGG TTATACTAATTACA ATCAGAAGTTCAAG GACAAGGCCACATT GACTACAGACAAAT CCTCCAGCACAGCC TACATGCAACTGAG CAGCCTGACATCTG AGGACTCTGCAGTC TATTACTGTGCAAG ATATTATGATGATC ATTACTGCCTTGAC TACTGGGCCAAGG CACCACTCTCACAG | CAAATTGTTCTCAC CCAGTCTCCAGCAA TCATGTCTGCATCT CCAGGGGAGAAGG TCACCATGACCTGC AGTGCCAGCTCAAG TGTAAGTTACATGA ACTGGTACCGACAG AAGTCAGGCACCTC CCCCAAAAGATGG ATTATGACACATC CAAACCTGGCTTCTG GAGTCCCTGCTCAC TTCAGGGCAGTGG GTCTGGACCTCTT ACTCTCTCACAAATC AGCGGCATGGAGG CTGAAGATGCTGCC ACTTATTACTGCCA GCAGTGAGTAGTA ACCCATTACGTT GGCTCGGGGACAA AGTTGGAAATAAAC CGG (配列番号15) |

10

20

【表 1 - 2】

| 標的 | VHアミノ酸 | VLアミノ酸 | VH c DNA | VL c DNA |
|---------------|---|---|--|---|
| | | | TCTCCTCAGCC (配列番号14) | |
| CD7 (TH69) | EVQLVESG GGLVKPGG SLKLSCAA SGLTFSSYA MSWVRQTP EKRLEWVA SISSGGFTY YPDSVKGR FTISRDNR NILYLQMS SLRSEDTA MYYCARD EVRGYLDV WGAGTTVT VSS (配列番号16) | AAVKDIQMTQ TTSSLSASLGD RVTISCSASQG ISNYLNWYQQ KPDGTVKLLIY YTSSLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEPE DIATYYCQQY SKLPYTFGGG TKLEIKR (配列番号17) | GAGGTGCAGCTGGT CGAATCTGGAGGA GGACTGGTGAAGCC AGGAGGATCTCTGA AACTGAGTTGTGCC GCTTCAGGCCTGAC CTTCTCAAGCTACG CCATGAGCTGGGTG CGACAGACACCTGA GAAGCGGCTGGAA TGGGTGCGCTAGCAT CTCCTCTGGCGGGT TCACATACTATCCA GACTCCGTGAAAGG CAGATTTACTATCT CTCGGGATAACGCA AGAAAATATTCTGTA CCTGCAGATGAGTT CACTGAGGAGCGA GGACACCGCAATGT ACTATTGTGCCAGG GACGAAGTGCAGC GCTATCTGGATGTC TGGGGAGCTGGCAC TACCGTCACCGTCT CCAGC (配列番号18) | GCCGCATACAAGG ATATTCAAGATGACT CAGACCACAAGCTC CCTGAGCGCCTCCC TGGGAGACCGAGT GACAATCTTTGCA GTGCATCACAGGGA ATTAGCAACTACCT GAATTGGTATCAGC AGAAGCCAGATGG CACTGTGAAACTGC TGATCTACTATACC TCTAGTCTGCACAG TGGGGTCCCCTCAC GATTCAAGCGGATCC GGCTCTGGGACAGA CTACAGCCTGACTA TCTCCAACCTGGAG CCCGAAGATATTGC CACCTACTATTGCC AGCAGTACTCCAAG CTGCCTTATACCTT TGGCGGGGAACA AAGCTGGAGATTAA AAGG (配列番号19) |

10

20

【表1-3】

| 標的 | VHアミノ酸 | VLアミノ酸 | VH cDNA | VL cDNA |
|---------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|
| CD7 (3a1f) | QVQLQESG | DIELTQSPATL | CAGGTCCAGCTGCA | GACATCGAGCTGAC |
| | AELVKPGA | SVTPGDSVSL | GGAGTCAGGGCA | ACAGTCTCCAGCCA |
| | SVKLSCKA | CRASQSIISNNL | GAAGCTGGTAAACC | CTCTGAGCGTGACC |
| | SGYTFTSY | HWYQQKSHE | CGGAGCCAGTGTCA | CCTGGCGATTCTGT |
| | WMHWVKQ | PRLLIKSASQSI | AACTGTCTGTAAAG | CAGTCTGTATGTA |
| | RPGQGLEW | SGIPSRSFSGSGS | GCCAGCGGTATAAC | GAGCTAGGCCAGTCC |
| | IGKINPSNG | GTDFTLSINSV | TTTCACCAGCTACT | ATCTCTAACAAATCT |
| | RTNYNEKF | ETEDFGMYFC | GGATGCACTGGGTG | GCACTGGTACCGAC |
| | KSKATLTV | QQSNSPWYTF | AAACAGAGGCCAG | AGAAATCACATGA |
| | DKSSSTAY | GGGTKLEIKR | GACAGGGCCTGG | AAGCCCTCGGCTGC |
| | MQLSLTS | (配列番号2) | GTGGATCGGCAAG | TGATTAAGAGTGCT |
| | EDSAVYYC | 1) | ATTAACCCAGCAA | TCACAGAGCATCTC |
| | ARGGVYY | | TGGGCGCACCAACT | CGGGATTCCAAGCA |
| | DLYYYALD | | ACAACGAAAAGTTT | GATTCTCTGGCAGT |
| | YWGQGTT | | AAATCCAAGGCTAC | GGGTCAAGAACCG |
| | VTVSS(配列番号20) | | ACTGACTGTGGACA | ACTTTACACTGTCC |
| | | | AGAGCTCCTCTACC | ATTAACTCTGTGGA |
| | | | GCATACATGCAGCT | GACCGAAGATTTCG |
| | | | GAGTTCACTGACAT | GCATGTATTTTGC |
| | | | CTGAAGATAGTGCC | CAGCAGAGCAATT |
| | | | GTGTACTATTGCC | CTGGCCTTACACAT |
| | | | CAGAGGCGGGGTCT | TCGGAGGCGGGACT |
| | | | ACTATGACCTGTAC | AAACTGGAGATTAA |
| | | | TATTACGCACTGGA | GAGG(配列番号23) |
| | | | TTATTGGGGGCAGG | |
| | | | GAACACACAGTGACT | |
| | | | GTCAGCTCC(配列番号22) | |

10

20

【表1-4】

| 標的 | VHアミノ酸 | VLアミノ酸 | VH c DNA | VL c DNA |
|------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CD45 | QVQLVESG | DIVLTQSPASL | CAGGTGCAGCTGGT | GACATTGTGCTGAC |
| | GGLVQPGG | AVSLGQRATIS | CGAGTCTGGAGGA | CCAGTCCCCTGCTT |
| | SLKLSCAA | CRASKSVSTSG | GGACTGGTGCAGCC | CACTGGCAGTGAGC |
| | SGFDFSRY | YSYLHWYQQ | TGAGGAAGTCTGA | CTGGGACAGAGGG |
| | WMSWVRQ | KPGQPPKLLIY | AGCTGTATGTGCA | CAACCATCAGCTGC |
| | APGKGLEW | LASNLESGVP | GCCAGCGGGTTCGA | CGAGCCTCTAAGAG |
| | IGEINPTST | ARFSGSGSGT | CTTTCTCGATACT | TGCTCTAACAAAGCG |
| | INFPTSLKD | DFTLNIPVVEE | GGATGAGTTGGGTG | GATACTCCCTATCTG |
| | KVFISRDN | EDAATYYCQH | CGGCAGGCACCAAG | CACTGGTACAGCA |
| | AKNTLYLQ | SRELPFTFGSG | GAAAAGGACTGGA | GAAGCCAGGACAG |
| | MSKVRSED | TKLEIK (配列番号25) | ATGGATCGCGAG | CCACCTAAACTGCT |
| | TALYYCAR | | ATTAAACCCAACTAG | GATCTATCTGGCTT |
| | GNYYRYG | | CTCCACCATCAATT | CCAACCTGGAATCT |
| | DAMDYWG | | TCACACCCAGCCTG | GGAGTGCCTGCACG |
| | QGTSTVTS | | AAGGACAAAGTGT | CTTCTCCGGATCTG |
| | (配列番号24) | | TATTTCAGAGATA | GAAGTGGAACCGA |
| | | | ACGCCAAGAATACT | CTTTACACTGAATA |
| | | | CTGTATCTGCAGAT | TTCACCCAGTCGAG |
| | | | GTCCAAGTCAGGT | GAAGAGGATGCCG |
| | | | CTGAAGATAACGCC | CTACCTACTATTGC |
| | | | CTGTACTATTGTGC | CAGCACAGCCGGG |
| | | | TCGGGGCAACTACT | AGCTGCCCTCACA |
| | | | ATAGATACGGGGA | TTTGGCAGCGGGAC |
| | | | CGCTATGGATTATT | TAAGCTGGAGATCA |
| | | | GGGGGCAGGGAAC | AG (配列番号27) |
| | | | TAGCGTGACCGTGA | |
| | | | GT (配列番号26) | |
| B2MG | EVQLQQSG | DIQMTQSPAS | GAGGTGCAGCTGCA | GATATTAGATGAC |
| | AELVKPGA | QSASLGESVTI | GCAGAGCGGAGCA | CCAGTCCCCTGCAT |
| | SVKLSCTPS | TCLASQTIGT | GAACCTGGTAAACCC | CACAGAGCGCTCC |
| | GFNVKDTY | WLAWYQQKP | TGGAGCCAGCGTCA | CTGGGGAGTCAGT |
| | IHWVKQRP | GKSPQLLIYAA | AGCTGTCTGTACT | GACCATCACATGCC |
| | KQGLEWIG | TSLADGVPSRF | CCATCTGGCTTCAA | TGGCTAGCCAGACA |
| | RIDPSDGDI | SGSGSGTKFSL | CGTGAAGGACACAT | ATTGGCACTGGCT |

10

20

30

【表1-5】

| 標的 | VHアミノ酸 | VLアミノ酸 | VH cDNA | VL cDNA | |
|-------|--|---|---|--|----------------|
| | KYDPKFQG KATITADTS SNTVSLQLS SLTSEDTA VYYCARW FGDYGAM NYWGQGT SVTVSS (配列番号28) | KIRTLQAEDFV SYYCQQQLYSK PYTFGGTTLK EIKRAD (配列番号29) ATTGACCCATCCGA CGCGATATCAAGT ATGATCCCAAATT CAGGGGAAGGCTA CTATTACCGCAGAT ACCAGCTCAACAC AGTAGTCTGCAGC TGTCTAGTCTGACT AGCGAAGACACCG CCGTCTACTATTGT GCTAGATGGTTGG CGATTACGGGCCA TGAATTATTGGGGG CAGGGAACAGCG TCACCGTGTCCAGC (配列番号30) | ACATTCACTGGGTC AAGCAGCGGCCCA AACAGGGACTGGA GTGGATCGGCAGA ATTGACCCATCCGA CGCGATATCAAGT ATGATCCCAAATT CAGGGGAAGGCTA CTATTACCGCAGAT ACCAGCTCAACAC AGTAGTCTGCAGC TGTCTAGTCTGACT AGCGAAGACACCG CCGTCTACTATTGT GCTAGATGGTTGG CGATTACGGGCCA TGAATTATTGGGGG CAGGGAACAGCG TCACCGTGTCCAGC (配列番号31) | GGCATGGTACCA AGAAGCCGGCAA ATCCCCTCAGCTGC TGATCTATGCAGCT ACCTCTCTGGCAGA CGGAGTGCCAGTA GGTTCTCTGGGAGT GGATCAGGCACCA AGTCTCTCTGAAA ATTCGCACACTGCA GGCTGAGGATTTCG TCTCCTACTATTGC CAGCAGCTGTACTC TAAACCTTATACAT TTGGCGGGGAACT AAGCTGAAATCA AACGAGCAGAC (配列番号31) | |
| NKG2A | EVQLVESG GGLVKPGG SLKLSCAA SGFTFSSY MSWVRQSP EKRLEWVA EISGGSYT YYPDTVTG RFTISRDNA KNTLYLEIS SLRSEDTA MYYCTRH GDYPRFFD VWGAGTT | QIVLTQSPALM SASPGEKVTM TCSASSSVSYI YWYQQKPRSS PKPWIYLTSLN ASGVPARFSGS GSGTSYSLTIS SMEAEDAATY YCQQWQSGNPY TFGGGTKLEIK R (配列番号33) | GAGGTGCAGCTGGT GGAGAGCGGAGGA GGACTGGTGAAGCC AGGAGGAAGCTG AAGCTGTCTGTGC CGCCTCTGGCTTC CATTTCCTCTTATG CAATGAGCTGGGTG CGGCAGTCCCCAGA GAAGAGACTGGAG TGGGTGGCAGAGAT CAGCTCCGGAGGAT CCTACACCTACTAT CCTGACACAGTGAC | CAGATTGTCCCTGAC CCAGTCTCCAGCCC TGATGAGCGCCTCC CCTGGCGAGAAGGT GACAATGACCTGCT CTGCCAGCTCCTCT GTGAGCTACATCTA TTGGTACCCAGCAGA AGCCTCGGAGCTCC CCAAAGCCCTGGAT CTATCTGACATCCA ACCTGGCCTCTGGC GTGCCAGCCAGATT CTCTGGCAGCGGCT | 10 20 30 |

【表 1 - 6】

| 標的 | VHアミノ酸 | VLアミノ酸 | VH c DNA | VL c DNA | |
|-----------------------|---|---|--|--|----|
| | VTVSS(配列番号32) | | CGGCCGGTTCACAA TCTCTAGAGATAAC GCCAAGAATACCCCT GTATCTGGAGATCT CTAGCCTGAGATCC GAGGATAACGCCAT GTACTATTGCACCA GOCACGGCGACTAC CCACGCTTCTTGA CGTGTGGGGAGCA GGAACCACAGTGA CCGTGTCCTCT(配列番号34) | CGGGCACATCTTAC AGCCTGACCATCTC TAGCATGGAGGCCG AGGACGCCGCCACC TACTATTGCCAGCA GTGGTCCGGCAATC CATATACATTGGC GGCGGCACCAAGCT GGAGATCAAGAGG (配列番号35) | 10 |
| KIR2D L1 及 び2/3 | QVQLVQSG AEVKPGS SVKVSCKA SGGTSFY AISWVRQA PGQGLEW MGGFPIFG AANYAQKF QGRVTITA DESTSTAY MELSSLR DDTAVYYC ARIPIGSYY YDYDMDV WGQGTTVT VSS(配列番号36) | EIVLTQSPVTL SLSPGERATLS CRASQSVSSYL AWYQQKPGQ APRLLIYDASN RATGIPARFSG SGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVY YCQQRSNWM YTFGQQGKLEI KRT(配列番号37) | CAGGTCCAGCTGGT GCAGTCTGGAGCTG AAAGTGAAGAACCC AGGGAGCTCGTCA AGGTGTATGCCAA GCAAGCGCGGGGA CTTTCTCCTTTATG CAATCTTGGGTG AGACAGGCCACCTG GACAGGGACTGGA GTGGATGGGAGGCT TCATCCCAATTTC GGAGCCGCTAACTA TGCCCAGAAGTTCC AGGCAGGGTGAC CATCACAGCTGATG AGTCTACTAGTACC GCATACATGGAAC GTCTAGTCTGAGGA GCGACGATACCGCC GTGTACTATTGTGC | GAGATCGTGTGAC CCAGTCTCCTGTCA CACTGAGTCTGTCA CCAGGGAACGGG CTACACTGTCTTGC AGAGCAAGCCAGT CCGTGAGCTCCTAC CTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCAGGC CAGGCTCCCAGGCT GCTGATCTACGATG CAAGCAACAGGGC CACTGGGATTCCCG CCCGCTCTCTGGC AGTGGGTCAAGGAA CCGACTTTACTCTG ACCATTCTAGTCT GGAGCCTGAAGATT TCGCCGTGTACTAT TGCCAGCAGCGATC CAATTGGATGTATA | 20 |

30

【表 1 - 7】

| 標的 | VHアミノ酸 | VLアミノ酸 | VH c DNA | VL c DNA |
|----|--------|--------|--|---|
| | | | TCGCATTCCATCAG GCAGCTACTATTAC GACTATGATATGGA CGTGTGGGGCCAGG GGACCCACAGTCACC GTGAGCAGC(配列番号38) | CTTTGGCCAGGGG ACCAAGCTGGAGAT CAAACGGACA(配列番号39) |

40

【0097】

表2. 図2に描写される構成要素の配列情報

【表 2 - 1】

| 標的 | CD 8 S P ア ミノ酸 | VH- V L リ ンカ- アミノ 酸 | CD 8 ヒン ジ及びTM アミノ酸 | CD 8 S P c DNA | VH-V L リンカ- c DNA | CD 8 ヒンジ及 びTM c DN A |
|-----|---|---|--|--|--|---|
| CD3 | MALP VTAL LLPL ALLL HAAR P (配 列番号 4 0) | GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 4 1) VLLLSLVIT LY (配列番 号 4 2) | KPTTPAPR PPTPAPIA SQPLSLRPE ACRPAAGG AVHTRGLD FACDIYIW APLAGTCG CACGCCGC CAGGCCG (配列番 号 4 4) | ATGGCCTT ACCAGTGA CCGCCTTG CTCCTGCC GCTGGCCT TGCTGCTC CACGCCGC TCCGGTG GTGGTGG ATCC (配 列番号 5 1) | GGTGGTG GTGGTT TGGTGGT GGTGGTT CTGGCGG CGGCCGG TCCCTGCGCCC AGAGGCGTGCC GGCCAGCGCG GGGGGCGCAGT GCACACGAGG GGGCTGGACTT CGCCTGTGATA TCTACATCTGG GCGCCCTTGGC CGGGACTTTGTG GGGTCCCTCTC CTGTCACTGGT | AAGCCCACAC GACGCCAGCGC CGCGACCACCA ACACCGGGGCC CACCATCGCGT CGCAGCCCCTG TCCCCTGCGCCC AGAGGCGTGCC GGCCAGCGCG GGGGGCGCAGT GCACACGAGG GGGCTGGACTT CGCCTGTGATA TCTACATCTGG GCGCCCTTGGC CGGGACTTTGTG GGGTCCCTCTC CTGTCACTGGT |

10

【表 2 - 2】

| 標的 | CD 8 S P ア ミノ酸 | VH- V L リ ンカ- アミノ 酸 | CD 8 ヒン ジ及びTM アミノ酸 | CD 8 S P c DNA | VH-V L リンカ- c DNA | CD 8 ヒンジ及 びTM c DN A |
|-------------------|---|--|--|---|---|--|
| | | | | | | TATCACCCCTT AC (配列番号 5 7) |
| CD7 (TH6 9) | MALP VTAL LLPL ALLL HAAR P (配 列番号 4 0) | GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 4 1) AGTCGVLL LSLVITLY (配列番号 5 0) | TTTPAPRPP TPAPTIASQ PLSLRPEAC RPAAGGAV HTRGLDFA CDIYIWAPL AGTCGVLL AAGACCT (配列番号 4 5) | ATGGCTCT GCCTGTGA CCGCACTG CTGCTGCC CCTGGCTC GATCCGG TGCTGCTG CACGCCGC GGATCTG GAGGAG GAGGAA GT (配列番 号 5 2) | GGAGGA GGAGGA AGCGGAG GAGGAG GATCCGG AGGCAGG GGATCTG GAGGAG GAGGAA GAGGAA GT (配列番 号 5 2) | ACCACTACACC TGCACCAAGGC CTCCACACCC GCTCCCACTAT CGCTTCCCAGC CACTGTCCCTG AGGCCCGAGGC CTGCAGGCCAG CAGCTGGCGGA GCCGTGCATAC TAGGGGGCTGG ACTTCGCTTGC GACATCTACAT CTGGGCCCCAC TGGCAGGGACA TGCGGAGTCCT GCTGCTGTCCC TGGTCATCACA CTTTAC (配列番 号 5 8) |
| CD7 (3a1f) | MALP VTAL LLPL ALLL HAAR P (配 列番号 3) | GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 4 3) RPAAGGAV HTRGLDFA CDIYIWAPL | TTTPAPRPP TPAPTIASQ PLSLRPEAC RPAAGGAV CTGCTGCC TCTGGCTC TGCTGCTG | ATGGCTCT GCCCGTCA CCGCTCTG CTGCTGCC AGGAGGC TCTGGGG GAGGCGG | GGAGGA GGAGGAT CCGGCGG AGGAGGC TCTGGGG TGCTAGTCAGC CACTGTCACTG | ACTACCACACC AGCTCCAAGAC CACCTACCCCT GCACCAACAAAT |

30

40

50

【表2-3】

| 標的 | CD8 S Pア ミノ酸 | VH- VLリ ンカ- アミノ 酸 | CD8ヒン ジ及びTM アミノ酸 | CD8 S P c DNA | VH-VL リンカ-c DNA | CD8ヒンジ及 びTM c DN A |
|----------|--|---|--|--|---|--|
| | 列番号 40) | | AGTCGVLL LSLVITLY (配列番号 50) | CACGCTGC TCGACCA (配列番号 46) | GAGT (配 列番号5 3) | AGACCAGAAG CATGTAGGCCT GCAGCTGGAGG AGCTGTGCACA CCAGAGGCCTG GACTTTGCCTG CGATATCTACA TTTGGGCTCCT CTGGCAGGAAC CTGTGGCGTGC TGCTGCTGTCT CTGGTCATCAC ACTTTAC (配列 番号59) |
| CD4 5 | MALP VTAL LLPL ALLL HAAR P (配 列番号 40) | GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号4 1) LY (配列番 号42) | KPTTPAPR PPTPAPTIA SQPLSLRPE ACRPAAGG AVHTRGLD FACDIYIW APLAGTCG VLLLSLVIT TCGACCT (配列番号 47) | ATGGCTCT GCCCGTGA CCGCTCTG CTGCTGCC TCTGGCTC TGCTGCTG CATGCTGC GAGGAG GAGGAG GATCAGG AGGCAGGG GGAAGCG GCGGGGG AGGCTCC (配列番号 54) | GGAGGA GGAGGA AGTGGAG GAGGAG GATCAGG AGGCAGGG GGAAGCG GCGGGGG AGGCTCC (配列番号 54) | AAGCCCACAC GACGCCAGCGC CGCGACCACCA ACACCGGGGCC CACCATCGCGT CGCAGCCCTG TCCCTCGGCC AGAGGCGTGCC GGCCAGCGGCC GGGGGCGCAGT GCACACGAGG GGGCTGGACTT CGCCTGTGATA TCTACATCTGG GCGCCCTTGGC CGGGACTTGTG GGGTCTTCTC |

10

20

30

【表2-4】

| 標的 | CD8 S Pア ミノ酸 | VH- VLリ ンカー アミノ 酸 | CD8ヒン ジ及びTM アミノ酸 | CD8 S P c DNA | VH-VL リンカー c DNA | CD8ヒンジ及 びTM c DN A |
|-----------|--|---|--|--|--|---|
| | | | | | | CTGTCACTGGT TATCACCCCTT AC (配列番号 5 7) |
| B2M G | MALP VTAL LLPL ALLL HAAR P (配 列番号 40) | GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 4 1) | KPTTPAPR PPTPAPTIA SQPLSLRPE ACRPAAGG AVHTRGLD FACDIYIW APLAGTCG VLLSLVIT LY (配列番 号 42) | ATGGCCCT GCCGTCA CCGCCCTG CTGCTGCC CCTGGCTC TGCTGCTG CACGCCGC AAGACCC (配列番号 48) | GGAGGA GGAGGA AGTGGAG GAGGAG GGTCAGG AGGCAGG GGAAGCG GCGGGGG AGAGACCC AGGATCC (配列番号 55) | AAGCCCAC GACGCCAGCG CGCGACCA ACACCGGCC CACCATCG CGCAGCCC TCCCTGCG GGCCAGCG GGGGCGCAG GCACAC GGGCTGG CGCCTGT TCTACATCT GCGCCCT CGGGACTT GGGTCC CTGTC TATCAC AC (配列番号 5 7) |
| NKG 2A | MALP VTAL LLPL ALLL HAAR (配列 番号 4 0) | GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 4 1) | KPTTPAPR PPTPAPTIA SQPLSLRPE ACRPAAGG AVHTRGLD TCTGGCTC | ATGGCTCT GCCGTGA CCGCCCTG CTGCTGCC TCTGGCTC AGCGCG | GGAGGA GGAGGAT CTGGAGG AGGAGGC TACCATCG CAA | AAGCCAAC AACCCCTGC CAAGGCCAC ACACCAGC TCAA |

10

20

30

【表 2 - 5】

| 標的 | CD 8 S Pア ミノ酸 | VH- V Lリ ンカ- アミノ 酸 | CD 8ヒン ジ及びTM アミノ酸 | CD 8 P c DNA | VH-V L リンカ-c DNA | CD 8ヒンジ及 びTM c DN A |
|--------------------------|---|---|---|--|--|--|
| | P (配 列番号 4 0) | 番号 4 1) | FACDIYIW APLAGTCG VLLSLVIT LY (配列番 号 4 2) | TGCTGCTG CACGCTGC CCGCCCA (配列番号 4 9) | GCGGCGG CTCCGGC GGCGGCG GCTCT (配 列番号 5 6) | GCCAGCCACTG TCCCTGAGGCC AGAGGCATGTA GGCCTGCAGCA GGAGGCGCCGT GCACACACGCG GCCTGACTTT GCCTGCGATAT CTACATCTGGG CACCACTGGCA GGAACCTGTGG CGTCTGCTGC TGAGCCTGGTG ATTACCCTGTAA T (配列番号 6 0) |
| KIR2 DL1 及び 2/3 | MALP VTAL LLPL ALLL HAAR P (配 列番号 4 0) | GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS KPTTPAPR PPTPAPTIA SQPLSLRPE ACRPAAGG (配列 番号 4 1) FACDIYIW APLAGTCG VLLSLVIT LY (配列番 号 4 2) | ATGGCCTT ACCAGTGA CCGCCTTG CTCCTGCC AVHTRGLD GCTGGCCT CTGGCGG TACDIYIW CACGCCGC CAGGCCG (配列番号 4 4) | GGTGGTG GTGGTTC TGGTGGT GGTGGTT GCTGGCCT CTGGCGG TCCGGTG TGCTGCTC CACGCCGC CAGGCCG (配列番号 4 4) | GGTGGTG GTGGTTC TGGTGGT GGTGGTT GCTGGCCT CTGGCGG TCCGGTG TGCTGCTC CACGCCGC CAGGCCG (配列番号 4 4) | AAGCCCACAC GACGCCAGCGC CGCGACCACCA ACACCGCGCC CACCATCGCGT CGCAGCCCCCTG TCCCTGCGCCCC AGAGGCGTGGC GGCCAGCGCG GGGGGCGCAGT GCACACGAGG GGGCTGGACTT CGCCTGTGATA TCTACATCTGG GCGCCCTTGGC CGGGACTTGTG |

10

20

30

【表 2 - 6】

| 標的 | CD 8 S Pア ミノ酸 | V H – V Lリ ンカ ー アミノ 酸 | CD 8ヒン ジ及びTM アミノ酸 | CD 8 S P c DNA | V H – V L リンカ – c DNA | CD 8ヒンジ及 びTM c DN A |
|----|---------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------|---|
| | | | | | | GGGTCCCTCTC CTGTCACTGGT TATCACCCTTT AC (配列番号 5 7) |

40

[0 0 9 8]

遺伝子形質導入、細胞増殖、フローサイトメトリー分析、及び機能研究

〔 0 0 9 9 〕

これらを、以前に説明されるように実行した (Kudo, K et al., Cancer Res. 2014; 74 (1): 93-103)。

[0 1 0 0]

結果

【 0 1 0 1 】

S C F V 構築物の作製

50

【0102】

この技術の概略を、図1に説明する。我々が作製した抑制構築物の概略図を、図2に示す。scFv部分は、抗体生成ハイブリドーマ細胞株の、または対応する公開された配列の、可変軽(VL)及び可変重(VH)免疫グロブリン鎖領域をコードするcDNAのクローニングに由来し得る。VL及びVHは、完全scFvを作製するための標準的技術に従って、短ペプチド配列(「リンク」)によって連結される。発現されるために、scFvはN終端でシグナルペプチドに連結され、予備実験において確認されるように、シグナルペプチドはscFvが発現されるために必要とされる。scFvプラスシグナルペプチドを含有するタンパク質は一般に、細胞環境へと放出される。例えば、予備実験(示さず)において、ジャーカットT細胞中に発現される抗CD3 scFvプラスシグナルペプチドが、細胞の培養上清中に検出された。scFvを特定の区画に配向し、その分泌を防止することによって、他の細胞に対する可能性のある作用が防止される。それを小胞体(ER)に配向するために、KDEL(配列番号4)モチーフ(ER中にタンパク質を保持)を利用して(Strebe N. et al., J Immunol Method 2009; 341(1-2): 30-40)。標的化されるタンパク質の分解を促進するために、我々は、それをプロテアソーム標的化PESTモチーフに連結させた(Joshi, S. N. et al., Mabs. 2012; 4(6): 686-693)。scFvはまた、それを、膜貫通ドメイン及びCD8のヒンジまたは別の膜貫通タンパク質に連結することによって、細胞膜に配向されてもよい。

【0103】

抗CD19-BB-CARを発現するTリンパ球中のT細胞受容体の下方制御

【0104】

提案された計画が、CARを発現し、1つ以上のマーカを欠如する免疫細胞の作製に適用され得るかどうかを決定するために、抗CD19CAR T細胞中でT細胞受容体(TCR)発現を下方制御した。

【0105】

細胞膜上に発現するために、CD3/TCR複合体は、その全ての構成要素(TCR、TCR、CD3、CD3、CD3、CD3)の組み立てを必要とする。1つの構成要素の欠如は、CD3/TCR発現、及びしたがって抗原認識を防止する。予備研究において、抗CD3ハイブリドーマ(Creative Diagnostics, Shirley, NYから購入)のscFvをクローニングし、KDEL(配列番号4)、PEST、CD8膜貫通ドメイン、または図2に示される他のものを含有する構築物を作製した。

【0106】

緑色蛍光タンパク質(GFP)を含有するマウス幹細胞ウイルス(MSCV)レトロウイルスベクターを使用して、CD3/TCR+ジャーカット細胞株中で、本明細書に開示される構築物を形質導入した。形質導入後のGFP+細胞のパーセンテージは、全ての実験において90%超であった。図3Aは、フローサイトメトリーによって測定される、GFP+細胞間の抗CD3抗体での染色の結果を示す。CD3の抗体染色は、列挙される構築物で形質導入した細胞中、様々な程度まで減少した。ヒト末梢血Tリンパ球によって、類似するCD3の下方制御を得た(図3B)。図3Cは、GFPのみを含有するベクターで形質導入した細胞と比較した、異なる遺伝子構築物での形質導入後の、GFP陽性ジャーカット細胞中のCD3発現の説明的なフローサイトメトリー・ドットプロットを示す。CD3の下方制御は、ジャーカット細胞の増殖、または試験された全ての他の細胞マーカ(CD2、CD4、CD8、CD45、CD25、CD69を含む)の発現には影響を与えたなかった。CD3発現の抑制は、3ヶ月超残留した。CD3陰性細胞の更なる濃縮は、抗CD3磁性ビーズ(Dynal, Life Technologies, Carlsbad, CA)でのCD3+T細胞枯渇によって達成することができる。

【0107】

ジャーカット細胞またはヒト末梢血Tリンパ球の抗TCR抗体での染色は、CD3

10

20

30

40

50

発現の下方制御が、T C R 発現の下方制御と関連していることを示した（図4）。
【0108】

次に、抗CD3scFv-my c KDELが抗CD19-4-1BB-CD3 CARと同時に発現され得るかどうかを決定した。図5に示されるように、これは、抗CD19CARを発現する一方でCD3発現を欠如するT細胞をもたらした。これらの細胞上では、T C Rもまた不在であった（図示せず）。

【0109】

CARが、下方制御されたCD3/T C Rを有するジャーカット細胞中でシグナリングすることができるかどうかを評価するために、活性化マーカCD69及びCD25の発現を試験し、CD19+白血病細胞株OP-1とともに共培養したジャーカット細胞中でのCD107a発現によって、溶解性顆粒のエキソサイトーシスを測定した。図6に示されるように、抗CD3scFv-my c KDEL構築物によるCD3/T C Rの下方制御は、抗CD19-4-1BB-CD3 CARがジャーカット細胞を活性化する能力を減少させなかった。CARシグナリングに対するCD3/T C R削除の影響を更に探索するために、CARを発現するCD3陰性Tリンパ球が、そのライゲーションによって刺激され得るかどうかを決定した。図7に示されるように、抗CD19CARを発現するTリンパ球をCD19+白血病細胞とともに共培養すると、CD3が下方制御されたか否かに関わらず、T細胞増殖がもたらされ、これは、CD3/T C R下方制御がCAR増殖刺激を減少させなかったことを示した。

【0110】

したがって、抗CD3scFv-my c KDEL構築物を使用して、CARによって駆動されるT細胞活性化、脱顆粒、及び増殖に影響を与えることなく、CAR-T細胞中でCD3/T C Rを効果的に下方制御され得る。

【0111】

CD7の下方制御

【0112】

CD3/T C R発現の調節に成功した計画を、他の表面分子に適用することができるかどうかを決定した。この目的のため、CD7発現を調節した。scFv配列は、Peippら（Cancer Res 2002 (62) : 2848-2855）によって公開されるものに由来し、これを、図2に説明されるCD8シグナルペプチド及びmy c-KDEL配列に連結した。MSCVレトロウイルスベクターを使用して、フィコエリトリシン（BD Bioscience）に共役した抗CD7抗体によって検出される、CD7の高発現を有する末梢血リンパ球中で、抗CD7-my c KDEL構築物を形質導入した。図8に示されるように、この構築物で形質導入したTリンパ球中のCD7は、実質的に抑止された。

【0113】

HLA-クラスIの下方制御

【0114】

その後、この計画を適用して、別の表面分子HLAクラスIを下方制御した。

【0115】

HLAクラスIは、多形鎖、及び2-ミクログロブリンと呼ばれる非多形鎖からなる。後者のサブユニットのノックダウンは、HLA（マウスにおいてはMHC）クラスI発現の抑止をもたらす（Koller, B H et al., Science. 1990; 248 (4960) : 1227-1230）。2-ミクログロブリンと反応するscFvを使用して、免疫細胞中のHLAクラスIの発現を抑制した。

【0116】

scFv配列は、Groverら（Kidney Int. 2004; 65 (1) : 310-322）によって公開されるものに由来し、これを、図2に説明されるCD8シグナルペプチド及びmy c KDEL配列に連結した。MSCVレトロウイルスベクターを使用して、フィコエリトリシン（BD Pharmingen）に共役した抗HLA

10

20

30

40

50

- A B C 抗体によって検出される、 H L A クラス I の高発現を有するジャーカット細胞中で、抗 2 M - myc K D E L 構築物を形質導入した。図 9 に示されるように、この構築物で形質導入したジャーカット細胞は、 H L A - A B C 発現の実質的な下方制御を有した。細胞は、それらの形態及び増殖能力を維持した。

【 0 1 1 7 】

N K 細胞中の抑制性受容体の下方制御

【 0 1 1 8 】

上に説明される計画が、他の免疫細胞中で発現される表面分子にもまた適用されるかどうかを決定するために、抑制性受容体 K I R 2 D L 1 、 K I R 2 D L 2 / D L 3 、及び N K G 2 A の機能の下方制御を N K 細胞中で試験した。

10

【 0 1 1 9 】

K I R 受容体を下方制御するために、 K I R 2 D L 1 及び K I R 2 D L 2 / D L 3 と反応する s c F v を使用して、 N K 細胞中でのそれらの発現を抑制した。 s c F v 配列は、 Moretta ら (特許 WO 2 0 0 6 / 0 0 3 1 7 9 A 2) によって公開されるものに由来し、これを、図 2 に説明される C D 8 シグナルペプチド及び E R 保持配列に連結した。 M S C V レトロウイルスベクターを使用して、ヒト末梢血から増殖させ、 K I R 2 D L 1 発現について選択した N K 細胞中で、この構築物を形質導入した。これらの細胞は、アロフィコシアニン (R & D S y s t e m s) に共役した抗 K I R 2 D L 1 抗体によって検出される、高い K I R 2 D L 1 発現、及びフィコエリトリン (B D B i o s c i e n c e) に共役した抗 K I R 2 D L 2 / D L 3 抗体によって検出される、高い K I R 2 D L 2 / D L 3 発現もまた有した。図 1 0 は、標的化される K I R の実質的な下方制御とともに、 s c F v - リンカー (2 0) A E K E D L 及び s c F v - E E K K M P によって得られた結果を示す。

20

【 0 1 2 0 】

N K G 2 A を下方制御するために、 N K G 2 A と反応する s c F v を使用して、 N K 細胞中でのその発現を抑制した。 S p e e らによる公開欧洲特許出願第 E P 2 2 4 7 6 1 9 A 1 号に由来した s c F v 配列を、図 2 に説明される C D 8 シグナルペプチド及び E R 保持配列に連結した。 M S C V レトロウイルスベクターを使用して、フィコエリトリン (B e c k m a n C o u l t e r) に共役した抗 N K G 2 A 抗体によって検出される、高い N K G 2 A 発現を有するヒト末梢血から増殖させた N K 細胞中で、この構築物を形質導入した。図 1 1 は、 s c F v - E E K K M P によって得られた N K G 2 A の実質的な下方制御を示す。

30

【 0 1 2 1 】

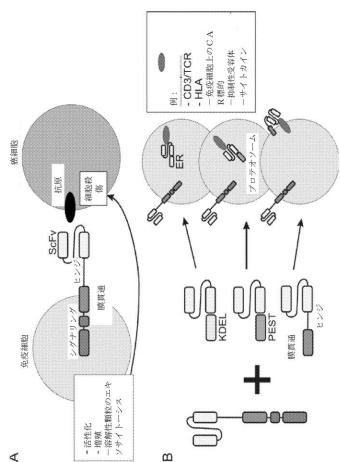
本明細書に引用される全ての特許、公開出願、及び参考文献の教示は、それらの全体が参照によって組み込まれる。

【 0 1 2 2 】

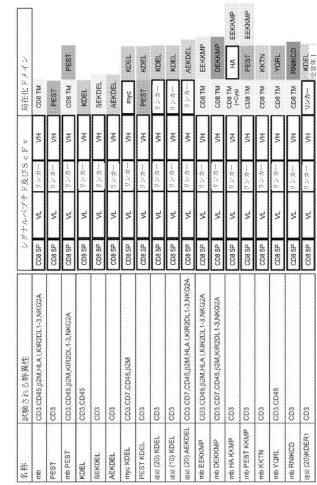
本発明が、その例示的な実施形態を参照しながら具体的に示され、説明されている一方で、その中に、添付の特許請求の範囲によって網羅される本発明の範囲を逸脱することなく、形態及び詳細における様々な変更がなされ得ることが当業者によって理解されるだろう。

40

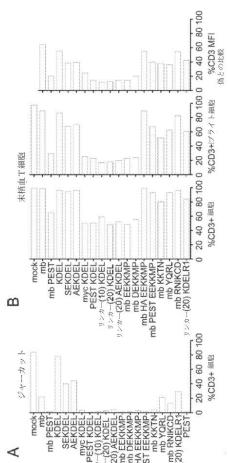
【図1】



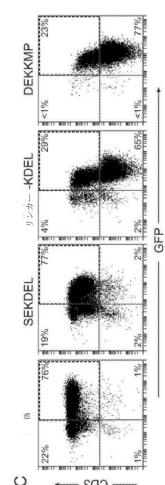
【図2】



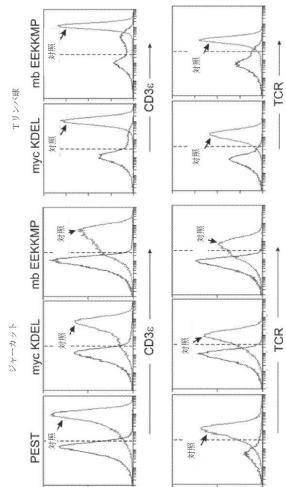
【図3 A - 3 B】



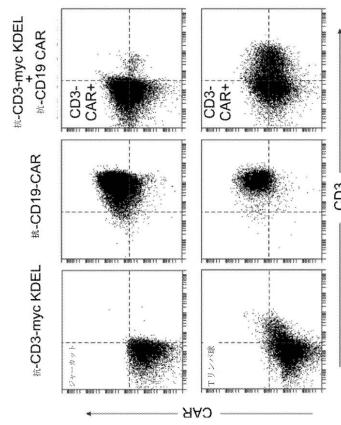
【図3 C】



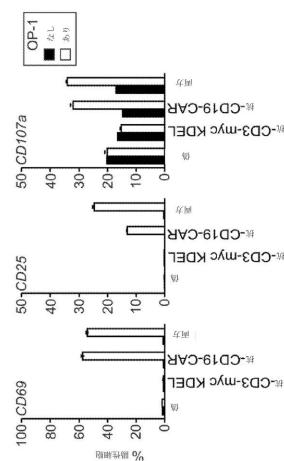
【 図 4 】



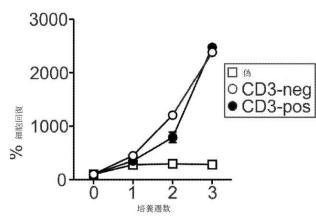
【 四 5 】



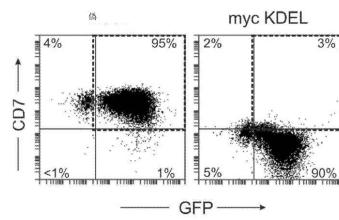
【 四 6 】



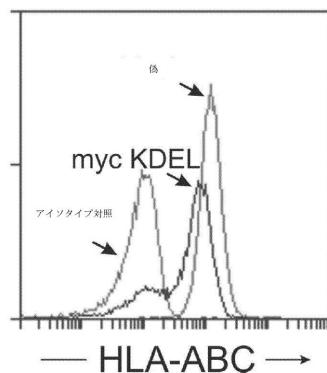
〔 7 〕



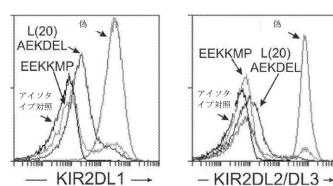
【 図 8 】



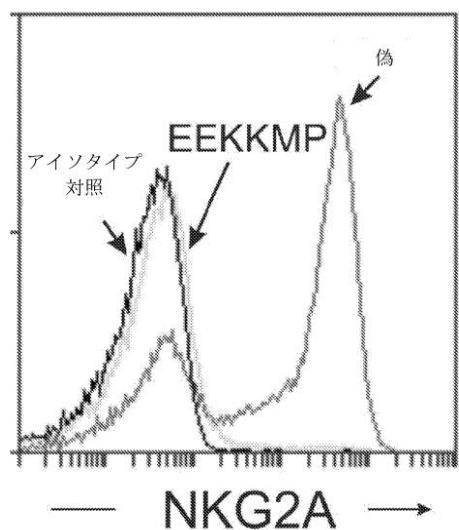
【図9】



(10)



【図 1 1】



【配列表】

0006895380000001.app

フロントページの続き

| | |
|---------------|---------------------------|
| (51)Int.Cl. | F I |
| C 0 7 K 19/00 | (2006.01) C 0 7 K 19/00 |
| A 6 1 K 35/17 | (2015.01) A 6 1 K 35/17 Z |
| A 6 1 K 35/12 | (2015.01) A 6 1 K 35/12 |
| A 6 1 P 35/00 | (2006.01) A 6 1 P 35/00 |

(72)発明者 カンパーナ, ダリオ
 シンガポール共和国, シンガポール 119077, ロウワー ケント リッジ ロード 21,
 デパートメント オブ ピーディアトリクス, ヨン ルー リン スクール オブ メディスン,
 ナショナル ユニバーシティ オブ シンガポール内

(72)発明者 カミヤ, タカヒロ
 シンガポール共和国, シンガポール 119077, ロウワー ケント リッジ ロード 21,
 デパートメント オブ ピーディアトリクス, ヨン ルー リン スクール オブ メディスン,
 ナショナル ユニバーシティ オブ シンガポール内

審査官 小林 薫

(56)参考文献 特表2014-507118 (JP, A)
 米国特許出願公開第2006/0034834 (US, A1)
 國際公開第2016/102965 (WO, A1)
 Nat. Biotechnol., 2013, Vol.31, No.1, p.71-75
 Blood, 2014, Vol.124, No.7, p.1081-1088
 Mol. Ther., 2009, Vol.17, No.8, p.1453-1464
 ウイルス, 2004, Vol.54, No.2, p.153-160
 J. Cell. Mol. Med., 2007, Vol.11, No.1, p.54-70
 Cancer Immunol. Res., 2013, Vol.1, No.1, p.43-53
 BSGT Abstracts, 2012, p.A15 (P023)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
 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 / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
 (S T N)
 P u b M e d