

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6420776号
(P6420776)

(45) 発行日 平成30年11月7日 (2018. 11. 7)

(24) 登録日 平成30年10月19日 (2018. 10. 19)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)	C 1 2 N 5/0783
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006. 01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 15/86 (2006. 01)	C 1 2 N 15/86 Z
請求項の数 15 (全 61 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2015-561624 (P2015-561624)	(73) 特許権者	391058060
(86) (22) 出願日	平成26年3月5日 (2014. 3. 5)		ベイラー カレッジ オブ メディシン
(65) 公表番号	特表2016-514956 (P2016-514956A)		BAYLOR COLLEGE OF M
(43) 公表日	平成28年5月26日 (2016. 5. 26)		EDICINE
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/020919		アメリカ合衆国, テキサス 77030,
(87) 国際公開番号	W02014/138306		ヒューストン, ワン ベイラー プラザ
(87) 国際公開日	平成26年9月12日 (2014. 9. 12)		(番地なし)
審査請求日	平成29年2月22日 (2017. 2. 22)	(73) 特許権者	508027464
(31) 優先権主張番号	61/941, 729		セルジーン コーポレーション
(32) 優先日	平成26年2月19日 (2014. 2. 19)		CELGENE CORPORATION
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国07901 ニュージャージー
(31) 優先権主張番号	61/928, 383		ー州サミット、モリス・アベニュー86番
(32) 優先日	平成26年1月16日 (2014. 1. 16)	(74) 代理人	110000729
(33) 優先権主張国	米国 (US)		特許業務法人 ユニ阿斯国際特許事務所
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 免疫療法のためのエンゲージャー細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T細胞、NK細胞、NK T細胞、およびCAR T細胞からなる群より選ばれる細胞であって、1種または複数の細胞表面分子に結合する活性化ドメインと、EphA2および/またはCD19に結合する抗原認識ドメインを含む、二部分分子をコードするポリヌクレオチドベクターを含み、前記二部分分子は前記細胞から分泌可能である、細胞。

【請求項 2】

前記抗原認識ドメインが、EphA2に結合する抗原認識ドメインである、請求項1に記載の細胞。

【請求項 3】

前記活性化ドメイン、抗原認識ドメイン、または両方のドメインが、一本鎖可変領域断片 (scFV) 抗体部分を含む、請求項1または2に記載の細胞。

【請求項 4】

前記活性化ドメインが、CD3、CD16、CD27、CD28、CD40、CD134、およびCD137からなる群から選択される分子を認識するscFVである、請求項1または2に記載の細胞。

【請求項 5】

前記ベクターが、非ウイルスベクターまたはウイルスベクターである、請求項1または2に記載の細胞。

【請求項 6】

10

20

前記ウイルスベクターが、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項5に記載の細胞。

【請求項7】

前記ベクターが、腫瘍溶解ベクターである、請求項1または2に記載の細胞。

【請求項8】

1種または複数の請求項1または2に記載の細胞の治療有効量を含み、がんを有する個体に対して送達するための、医薬組成物。

【請求項9】

前記がんが、E p h A 2陽性またはC D 1 9陽性である、請求項8に記載の医薬組成物。

10

【請求項10】

前記ベクターが、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項11】

前記個体に、追加のがん療法が提供される、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記追加のがん療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、ホルモン療法、免疫療法、またはこれらの組合せである、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項13】

T細胞、NK細胞、NK T細胞およびC A R T細胞からなる群より選ばれる細胞に導入するために用いられるポリヌクレオチドベクターであって、1種または複数の細胞表面分子に結合する活性化ドメインと、E p h A 2またはC D 1 9に結合する抗原認識ドメインとを含む二部分分子をコードし、前記細胞が前記二成分分子を発現する場合に、E p h A 2またはC D 1 9を発現する腫瘍細胞を殺す能力があることを特徴とする、ポリヌクレオチドベクター。

20

【請求項14】

前記ベクターが、非ウイルスベクターまたはウイルスベクターである、請求項13に記載のベクター。

【請求項15】

前記ウイルスベクターが、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項13に記載のベクター。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2013年3月5日出願の米国特許仮出願第61/772,803号、2013年3月9日出願の米国特許仮出願第61/775,524号、2014年1月16日出願の米国特許仮出願第61/928,383号、および2014年2月19日出願の米国特許仮出願第61/941,729号に基づく優先権を主張する。これらの出願はすべて、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0002】

40

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記述

本発明は、N C I / N I H助成金第P 5 0 C A 1 2 6 7 5 2号による政府資金提供を受けて行われた。アメリカ合衆国政府は、本発明について一定の権利を有する。

【0003】

本発明の分野は、少なくとも、免疫学、細胞生物学、分子生物学、および腫瘍学などの医学を含む。

【背景技術】

【0004】

抗原特異的なT細胞を用いた免疫療法は、前臨床モデルおよび第I / II相臨床研究での固形腫瘍および血液悪性腫瘍の処置において有望性を示している。キメラ抗原受容体 (

50

CAR)または遺伝子操作されたT細胞受容体(TCR)を用いてT細胞を改変することによって、抗原特異的なT細胞の迅速な生成が可能となる。しかし、CARを発現するT細胞も遺伝子操作されたTCRを発現するT細胞も、常在免疫細胞の膨大な蓄えを、抗腫瘍作用を制限する腫瘍にリダイレクトしない。この制限を克服するため、免疫細胞に腫瘍細胞に対する特異性を与えるだけでなく、免疫細胞が常在免疫細胞を腫瘍部位にリダイレクトするのを可能にする新規のアプローチを本明細書に記載する。本開示の主題は、がん免疫療法分野に適用があるのみならず、治療目的で免疫系を操作するあらゆる他の疾患にも適用がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0005】

第1の態様では、本明細書において、エンゲージャーを含む、またはエンゲージャーから本質的になる、またはエンゲージャーからなる組成物であって、前記エンゲージャーが、免疫細胞表面または遺伝子操作された免疫細胞の表面にある活性化分子に結合する活性化ドメイン、および標的細胞抗原、例えば、腫瘍細胞またはがん細胞の表面に発現した抗原に結合する抗原認識ドメインとを含む分子である、組成物を提供する。がん細胞は、固形腫瘍でも血液悪性腫瘍でもよい。

【0006】

エンゲージャー細胞は、エンゲージャー分子を分泌する能力を有する細胞であり(図1)、本発明のある特定の態様では、療法を個体にもたらす細胞を個体に提供する。これらの細胞(限定されるものではないが、T細胞、NK細胞、NKT細胞、CAR T細胞、間葉系幹細胞(MSC)、神経幹細胞、造血幹細胞、または場合によってはこれらの混合物が含まれる)は、免疫細胞を活性化するエンゲージャーを分泌する。

20

【0007】

ある特定の実施形態では、活性化ドメインが免疫細胞上の活性化分子に結合し、抗原認識ドメインが標的細胞抗原に結合すると、免疫細胞によって標的細胞が殺滅される。エンゲージャーは、二部分構成でもよいし(例えば、場合によってリンカーによって連結されていてもよい、活性化ドメインと抗原認識ドメインとを含むもの)、三部分または多部分構成でもよい(例えば、1つまたは複数の活性化ドメインおよび/もしくは抗原認識ドメインまたは他のドメインを含む)。

30

【0008】

ある特定の実施形態では、エンゲージャーは、タンパク質、例えば、遺伝子操作されたタンパク質である。特定の実施形態では、エンゲージャーの活性化ドメインが、抗体またはその抗原結合性断片もしくは部分、例えば一本鎖可変領域断片(scFv)であるか、またはこれを含む。他の特定の実施形態では、抗原認識ドメインが、抗体もしくはその抗原結合性断片もしくは部分、例えばモノクローナル抗体もしくはscFvであるか、これを含むか、または抗原認識ドメインが、リガンド、ペプチド、可溶性T細胞受容体、もしくはこれらの組合せを含みうる(図2)。ある特定の実施形態では、活性化ドメインおよび抗原認識ドメインが、リンカー、例えば、ペプチドリinkerによって連結されている。

【0009】

40

エンゲージャー分子の活性化ドメインは、免疫細胞に活性化をもたらすことができる。当業者は、免疫細胞が様々な活性化受容体を有することを認識している。例えば、CD3は、T細胞上の活性化受容体であるが、CD16、NKGD2、またはNKP30は、NK細胞上の活性化受容体であり、そして、CD3またはインバリアントTCRは、NKT細胞上の活性化受容体である。したがって、T細胞を活性化するエンゲージャー分子は、NK細胞を活性化するエンゲージャー分子とは異なる活性化ドメインを有しうる(図2)。特定の実施形態、例えば、免疫細胞がT細胞である実施形態では、活性化分子が、CD3、例えば、CD3ガンマ、CD3デルタ、もしくはCD3イプシロン;またはCD27、CD28、CD40、CD134、CD137、およびCD278のうちの1つまたは複数である。他の特定の実施形態、例えば、免疫細胞がNK細胞である実施形態では、活

50

性化分子がCD16、NKGD、またはNKp30であり、免疫細胞がNK細胞である実施形態では、活性化分子がCD3またはインバリアントTCRであり、免疫細胞がNK細胞である実施形態では、活性化分子がインバリアントTCRまたはCD1dである。

【0010】

活性化は、正または負のシグナルをもたらす。「正のシグナル」の活性化ドメインの例としては、1) CD3ならびにCD28、CD134、およびCD137など、共刺激分子のリガンドまたは受容体に特異的な(を活性化する)scFv; 2) CD80、CD70、CD134L(OX40L)、CD137L(41BBL)など、共刺激分子由来のドメイン; 3) IL-2、IL-7、およびIL-15などのサイトカイン; 4) CCL1、CCL2、CCL16、CCL17、CCL22、CXCL8、またはRANTESなどのケモカインが挙げられる。「負のシグナル」の活性化ドメインの例としては、1) PD-L1など、抑制分子由来のドメイン; 2) CTLA4およびPD-1などの抑制分子に特異的なscFv、ならびに2) TGFβおよびIL-10などの抑制性サイトカインが挙げられる。特定の実施形態では、活性化ドメインがscFvである。

【0011】

ある特定の他の実施形態では、エンゲージャーが、1つまたは複数のアクセサリドメイン、例えば、1つもしくは複数のサイトカイン、共刺激性ドメイン、T細胞活性化の負の調節分子を抑制するドメイン、またはこれらの組合せをさらに含む。特定の実施形態では、サイトカインがIL-15、IL-2、および/または、IL-7である。他の特定の
20
実施形態では、共刺激性ドメインがCD27、CD80、CD86、CD134、またはCD137である。他の特定の実施形態では、T細胞活性化の負の調節分子を抑制するドメインが、PD-1、PD-L1、CTLA4、またはB7-H4である。

【0012】

本明細書に記載のエンゲージャーのいずれについても、それぞれのドメインは、N末端からC末端に向けて任意の順序でよく、これには、例えば、抗原認識ドメインのN末端側に活性化ドメインを有する順序、抗原認識ドメインのC末端側に活性化ドメインを有する順序などが含まれる。ある特定の実施形態では、T細胞が、活性化ドメインのN末端側に抗原認識ドメインを有するエンゲージャー分子を分泌するように改変されている。特定の
30
実施形態では、エンゲージャー分子の2つ以上のドメインが、リンカーによって分離されている。リンカーはいかなる適した長さでもよく、そのようなパラメータは、当技術分野で慣行的に最適化されている。例えば、リンカーは、第1のドメインおよび第2のドメインがそれぞれ相互に独立してそれらの差次的な結合特異性を保持できることを保証するのに十分な長さおよび配列のものでよい。

【0013】

ある特定の実施形態では、抗原認識ドメインが結合する抗原が腫瘍関連抗原(TAA)または腫瘍特異抗原(TSA)である。ある特定の実施形態では、エンゲージャーの抗原認識ドメインが、TAAまたはTSAに特異的なscFvである。特定の実施形態では、TAAまたはTSAが、がん細胞上に発現される。一実施形態では、TAAまたはTSAが血液がん細胞上に発現される。別の実施形態では、TAAまたはTSAが固形腫瘍細胞
40
上に発現される。より特定の実施形態では、固形腫瘍が、膠芽腫、非小細胞肺癌、非小細胞肺癌以外の肺癌、乳がん、前立腺がん、膵がん、肝がん、結腸がん、胃がん、脾臓のがん、皮膚がん、膠芽腫以外の脳腫瘍、腎がん、甲状腺がんなどである。より特定の実施形態では、TAAまたはTSAが、個体の腫瘍細胞によって発現される。特定の実施形態では、TAAまたはTSAが、以下の1つまたは複数であり、例えば、エンゲージャー上のscFvが以下の1つまたは複数に特異的である: 5T4、8H9、アルファ_vβ₆、インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2(HER2)を含めたEGFRファミリー、EGFRvIII、E
50

GP2、EGP40、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、FBP、胎児AchR、FRアルファ、GD2、GD3、グリピカン-3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、IL-11Rアルファ、IL-13Rアルファ2、ラムダ、Lewis-Y、カップ、KDR、MCSP、メソセリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSC1、PSCA、PSMA、ROR1、SP17、サバイビン、TAG72、TEM、癌胎児性抗原、HMW-MAA、およびVEGFR2。

【0014】

エンゲージャー分子の特定の細胞認識ドメインは、特定の抗原を発現する対応する腫瘍を認識するように仕立てることができる。抗原は、悪性がん細胞、または腫瘍成長を支えるいわゆる腫瘍間質のいずれかによって産生される。場合によっては、scFvが、EphA2、CD19、CD123、LeY、B7H3、HER2、またはEGFR(EGFRVIIIを含める)に特異的である。抗原の例を表1に記載する。

【表 1】

表 1:標的化可能な抗原の例

抗原
5T4
$\alpha_v\beta_6$ インテグリン
B7-H3
B7-H6
CD19
CD20
CD22
CD30
CD33
CD44, CD44v6, CD44v7/8
CD70
CD123
CEA
CSPG4
ErbB2(HER2)を含む EGFR ファミリー
EGFRvIII
EGP2
EGP40
EpCAM
EphA2
FAP
胎児 AchR
FR α
GD2
GD3
グリピカン-3(GPC3)
HLA-A1+MAGE1
HLA-A2+MAGE1
HLA-A3+MAGE1
HLA-A1+NY-ESO-1
HLA-A2+NY-ESO-1
HLA-A3+NY-ESO-1
IL-11R α
IL-13R α 2
ラムダ
ルイス-Y
カッパ
メソセリン
Muc1
Muc16
NCAM
NKG2D リガンド
NY-ESO-1
PRAME
PSCA
PSMA
ROR1
TAG72
TEMs
VEGFR2

10

20

30

40

表 1 に記載の抗原の例に加えて、抗原認識ドメインは、他の抗原、例えば、PD-L1 およびCTLA4 など、腫瘍微小環境内のがん細胞または細胞上に発現された抑制分子を標的にすることができる。PD-L1 特異的な抗原認識ドメインおよびCD3 特異的なT細胞活性化ドメインを含むエンゲージャー分子は、抑制シグナルを正の(CD3 活性化)シグナルに変換することによって、腫瘍によって媒介される免疫抑制作用を克服することになる。他の例は、フィブロネクチンもしくはテネシンの癌胎児性バリエーションなど、腫瘍の細胞外マトリックスまたは腫瘍の壊死性領域内に存在する抗原である。

【0016】

別の態様では、エンゲージャー分子、例えば、本明細書に記載の任意のエンゲージャー分子をコードするポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。ポリヌクレオチドは、ベクター内に含まれるか、ベクターを含むことができる。適したベクターならばいかなるタイプのものも利用できるが、特定の実施形態では、ベクターが、非ウイルスベクター(例えば、プラスミド、ミニサークルDNAベクター、スリーピングビューティー(sleeping beauty)プラスミド、PiggyBacプラスミドなど)またはウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、腫瘍溶解ベクターなど)である。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドを含有する細胞内でエンゲージャー分子を安定的に発現する。別の特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドを含有する細胞内でエンゲージャー分子を一過性に発現する。別の特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドを含有する細胞内における、エンゲージャー分子の誘導可能な発現を可能にする。別の特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドを含有する細胞内における、エンゲージャー分子の発現の誘導可能な抑制を可能にする。本明細書に示す実施形態のいずれでも、ポリヌクレオチドは、細胞により分泌可能な形態でエンゲージャーをコードすることが好ましい。ポリヌクレオチドは、活性化ドメインおよび抗原認識ドメインを含む融合分子をコードし、特定の実施形態では、各ドメインがscFvである。活性化ドメインは、抗原認識ドメインに比べて、ポリペプチドのN末端側に配置されてもよいし、抗原認識ドメインに比べて、ポリペプチドのC末端側に配置されてもよい。

【0017】

別の態様では、1つまたは複数のエンゲージャー、例えば、本明細書に記載のエンゲージャー分子のいずれかを発現するように遺伝的に操作された細胞(例えば、「エンゲージャー細胞」と呼ばれる)が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、遺伝的に操作された細胞が、例えば、Tリンパ球(T細胞)、CAR-T細胞、ナチュラルキラー(NK)T細胞、またはNK細胞である。ある特定の他の実施形態では、遺伝的に操作された細胞が、非免疫細胞、例えば、間葉系幹細胞(MSC)、神経幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、胚幹細胞である。ある特定の実施形態では、エンゲージャー細胞は、エンゲージャー細胞の周りの環境、例えば培養培地(エンゲージャー細胞がin vitroで培養される場合)中またはエンゲージャー細胞が投与された個体内にエンゲージャーを分泌する。ある特定の実施形態では、レンチウイルスベクターを利用することができるが、場合によっては、形質導入効率がさらに高いレトロウイルスベクターを利用することができる。レトロウイルスベクターの1例は、5'から3'方向にCD19scFv-CD3scFvを含む。別のレトロウイルスベクターの例は、5'から3'方向にEphA2(4H5)-CD3scFvを含み、場合によって、蛍光または選択可能マーカー、例えばmOrangeをコードするヌクレオチド配列が後に続くIRESが後に続く。

【0018】

ある特定の実施形態では、1つの細胞が、複数(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11以上)のタイプのエンゲージャー分子を分泌する。細胞は、同一ではないエンゲージャー分子を発現する同一ではないポリヌクレオチドを有するように改変されていてもよい。例えば、1つの細胞が、エンゲージャー分子をコードする1つの

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチドを含み、かつ、他のエンゲージャー分子をコードする他の1つまたは複数のポリヌクレオチドも含む。特定の実施形態では、細胞は、表1に記載の抗原の1つを標的にするエンゲージャー分子をコードする第1のポリヌクレオチドと、表1に記載の別の抗原を標的にするエンゲージャー分子をコードする第2のポリヌクレオチドとを有する。エンゲージャーは、免疫細胞がT細胞、NK細胞、またはこれらの両方を活性化できるように、様々な抗原認識ドメインに加えて、様々な活性化ドメインも含有することができる。したがって、本開示の実施形態は、例えば、NK細胞および/またはT細胞を活性化することができるエンゲージャー分子を分泌するT細胞ならびにNK細胞および/またはT細胞を活性化するNK細胞を提供する。

【0019】

特定の実施形態では、本発明のエンゲージャー細胞がCAR、遺伝子操作されたTCR、または他のいかなる遺伝的改変もさらに含まないが、ある特定の実施形態では、エンゲージャーT細胞は、その機能を強化することができる、表1に記載の抗原を標的にするものを含めたCAR、遺伝子操作されたTCR、または他の任意の遺伝的改変をさらに含む。一実施形態では、CARまたは遺伝子操作されたTCRを発現するT細胞が1種または複数のエンゲージャー分子を含む。特定の実施形態では、CARまたはTCRの抗原結合ドメインおよびエンゲージャー分子の抗原認識ドメインが、同じ標的抗原を認識または結合する。ある特定の実施形態では、CARの抗原結合ドメインおよびエンゲージャー分子の抗原認識ドメインが、同じ標的細胞上に発現された異なった標的抗原を認識または結合する。特定の実施形態では、1つの細胞が、エンゲージャー分子を発現する1つのポリヌクレオチドを含み、かつ、CD80、CD70、CD134L(OX40L)、およびCD137L(41BBL)を含めた共刺激分子を発現する1つまたは複数のポリヌクレオチドも含む。特定の実施形態では、細胞は、CD19を標的にするエンゲージャー分子をコードする第1のポリヌクレオチドと、CD80および41BBLをコードする第2のポリヌクレオチドとを有する(図22)。

【0020】

特定の実施形態では、天然免疫細胞の表面または遺伝子操作された免疫細胞の表面上にある標的に結合する活性化ドメインを有し、かつ標的細胞によって産生される1つまたは複数の分子に結合する認識ドメインも有するものを含めた、エンゲージャー分子および/またはエンゲージャー分子を分泌する1つまたは複数の細胞を含む医薬組成物がある。エンゲージャー分子またはそれらを分泌する細胞の有効量が、それを必要とする個体に与えられる。

【0021】

別の態様では、腫瘍細胞を有する個体を処置する方法であって、エンゲージャー分子の治療有効量を個体に投与するステップを含み、エンゲージャー分子が、腫瘍細胞上にある抗原に結合する抗原認識ドメインを含む、方法が本明細書において提供される。関連した態様では、腫瘍細胞を有する個体を処置する方法であって、1種または複数のエンゲージャー分子を分泌するエンゲージャー細胞の治療有効量を個体に投与するステップを含み、前記エンゲージャー分子が、腫瘍細胞上にある抗原に結合する抗原認識ドメインを含む、方法が本明細書において提供される。特定の実施形態では、前記投与が、個体内の腫瘍の成長の測定可能な低減をもたらす。別の特定の実施形態では、前記投与が、個体内の腫瘍のサイズの測定可能な低減をもたらす。様々な実施形態で、腫瘍のサイズまたは成長速度が、例えば、直接的イメージング(例えば、CTスキャン、MRI、PETスキャンなど)、蛍光イメージング、組織生検、および/または関係のある生理的マーカー(例えば、前立腺がん用のPSAレベル; 絨毛癌用のHCGレベルなど)の評価によって決定可能でありうる。本発明の特定の実施形態では、個体は、高レベルの、予後不良に相関する抗原、例えばEpH2を有する。いくつかの実施形態では、個体に、外科手術、放射線照射、化学療法、ホルモン療法、免疫療法、またはこれらの組合せなど、追加のがん療法が提供される。

【0022】

特定の実施形態では、組成物を分泌する細胞であって、前記組成物が、天然免疫細胞の表面または遺伝子操作された免疫細胞の表面上にある標的に結合する活性化ドメインと標的細胞によって産生される１種または複数の分子に結合する抗原認識ドメインとを含む、細胞がある。少なくともいくつかの場合には、リンカーが活性化ドメインおよび抗原認識ドメインに結合している。活性化ドメインは、抗体またはリガンドを含みうる。特定の実施形態では、免疫細胞がＴ細胞であり、抗体がＣＤ３を認識するが、免疫細胞はＮＫ細胞であってもよく、抗体はＣＤ１６、ＮＫＧ２Ｄ、またはＮＫｐ３０を認識する。特定の実施形態では、抗体が一本鎖可変領域断片（ｓｃＦｖ）抗体である。特定の実施形態では、抗原認識ドメインが、標的細胞によって産生される抗原を認識する抗体であり、いくつかの場合には、抗体がｓｃＦｖ断片である。

10

【００２３】

特定の実施形態では、抗原認識ドメインが、リガンド、ペプチド、または可溶性ＴＣＲであるか、表１の抗原を認識する。

【００２４】

本開示の組成物の特定の例としては、例えば、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、または配列番号９の配列が挙げられる。

【００２５】

本開示のいくつかの組成物は、以下：サイトカイン、共刺激ドメイン、Ｔ細胞活性化の負の調節分子を抑制するためのドメインのうちの１つまたは複数を含む。特定の実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１５である。特定の態様では、共刺激ドメインは、ＣＤ８０、ＣＤ１３７、またはこれら両方である。特定の態様では、Ｔ細胞活性化の負の調節分子を抑制するためのドメインは、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ４、またはＢ７－Ｈ４を含む。本開示のいくつかの組成物は、検出可能なマーカーを含む。

20

【００２６】

一実施形態では、がんを有する個体を処置する方法であって、１種または複数の本開示の細胞の治療有効量を個体に送達するステップを含む方法がある。特定の実施形態では、組成物が細胞によって分泌されて、組成物が細胞に結合し、これを活性化する。ある特定の態様では、組成物が細胞によって分泌され、組成物が、個体内の天然免疫細胞に結合し、これを活性化する。特定の実施形態では、組成物を発現することができる細胞がＴ細胞であり、活性化ドメインが、ＣＤ３を認識する抗体を含む。他の態様では、組成物を発現することができる細胞がＮＫ細胞であり、活性化ドメインが、ＣＤ１６、ＮＫＧ２Ｄ、またはＮＫｐ３０を認識する抗体を含む。一態様では、がんが、ＥｐｈＡ２陽性、ＣＤ１９陽性、ＣＤ１２３陽性、ＬｅＹ陽性、Ｂ７Ｈ３陽性、ＨＥＲ２陽性、またはＥＧＦＲ（ＥＧＦＲｖＩＩＩを含む）陽性である。

30

【００２７】

本発明の実施形態では、ポリペプチドを分泌する細胞を含む組成物であって、前記ポリペプチドが、免疫細胞表面上にある標的に結合する活性化ドメインと、標的細胞によって産生されるか、標的細胞上に提示されている１種または複数の分子に結合する抗原認識ドメインを含む、組成物がある。特定の実施形態では、リンカーが活性化ドメインおよび抗原認識ドメインに結合している。特定の実施形態では、免疫細胞が天然免疫細胞である。ある特定の実施形態では、免疫細胞が、遺伝子操作された免疫細胞である。特定の実施形態では、活性化ドメインが抗体、リガンド、受容体、またはペプチドを含む。特定の実施形態では、免疫細胞がＴ細胞であり、抗体がＣＤ３を認識する。いくつかの実施形態では、免疫細胞がＮＫ細胞であり、抗体がＣＤ１６、ＮＫＧ２Ｄ、またはＮＫｐ３０を認識する。ある特定の実施形態では、抗体が一本鎖可変領域断片（ｓｃＦｖ）抗体である。特定の実施形態では、抗原認識ドメインが、標的細胞によって産生される抗原を認識する抗体である。いくつかの実施形態では、抗体がｓｃＦｖ抗体である。特定の実施形態では、抗原認識ドメインが、リガンド、ペプチド、または可溶性ＴＣＲである。特定の実施形態では、抗原認識ドメインが表１の抗原を認識する。特定の実施形態では、ポリペプチドが、

40

50

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 9 の配列を含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチドが、以下：サイトカイン、共刺激ドメイン、または T 細胞活性化の負の調節分子を抑制するためのドメインのうちの 1 つまたは複数をさらに含む。特定の実施形態では、サイトカインが、IL - 15、IL - 12、IL - 2、または IL - 7 である。特定の実施形態では、共刺激ドメインが、CD 80、CD 134、CD 137、またはこれらの組合せである。ある特定の実施形態では、T 細胞活性化の負の調節分子を抑制するためのドメインが、PD - 1、PD - L1、CTLA 4、または B7 - H4 を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドが、検出可能なマーカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドが細胞のゲノムに組み込まれる。特定の実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現が、1 つまたは複数の腫瘍関連因子の制御下にある。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の腫瘍関連因子がケモカインまたはサイトカインである。ケモカインは、CCL 2、CCL 3、CCL 5、CCL 16、CXCL 8、CXCL 10、XCL 1、XCL 2、または CX3CL 1 を含めた、CC、CXC、C、および CX3C ケモカインからなる群から選択されるファミリーのケモカインでありうる。サイトカインは、IL 2、IL 4、IL 5、IL 7、IL 10、IL 12、IL 15、および IL 17 からなる群から選択されうる。特定の実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現が、組織特異的な調節配列の制御下にある。いくつかの実施形態では、組織特異的な調節配列が、低酸素特異的な調節配列である。ある特定の実施形態では、低酸素特異的な調節配列が、低酸素応答エレメント (HRE) または酸素依存性分解ドメイン (ODDD) である。いくつかの態様では、HRE が 5' - RCGTG - 3' (配列番号 10) を含む。

【0028】

一実施形態では、がんを有する個体を処置する方法であって、本開示の組成物の治療有効量を個体に送達するステップを含む方法がある。特定の実施形態では、ポリペプチドが細胞によって分泌され、組成物が、細胞に結合し、これを活性化し、少なくともいくつかの場合では、ポリペプチドが細胞によって分泌され、ポリペプチドが、個体内の天然免疫細胞に結合し、これを活性化する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドを発現することができる細胞が T 細胞である。ある特定の実施形態では、活性化ドメインが、CD 3 を認識する抗体を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドを発現することができる細胞が NK 細胞である。特定の実施形態では、活性化ドメインが、CD 16、NKGD、または NKp 30 を認識する抗体を含む。ある特定の実施形態では、がんが、EphA2 陽性、CD 19 陽性、CD 123 陽性、LeY 陽性、B7H3 陽性、HER2 陽性、または EGFR 陽性であり、EGFRvIII 陽性でありうる。

【0029】

後述の「発明を実施するための形態」をよりよく理解するために、上記で本発明の特徴および技術的な利点についてある程度広く概説した。本発明の請求の範囲の主題を形成する本発明のさらなる特徴および利点を、以下に記載する。当業者ならば、本開示の概念および具体的な実施形態は、本発明の同じ目的を実行するように他の構造を改変または設計するための基礎として容易に利用できることを理解するであろう。当業者ならば、そのような同等な構造は、添付の請求の範囲に記載される本発明の趣旨および範囲から逸脱しないことも認識するであろう。その構成および操作の方法の両方に関する、本発明の特色と考えられる新規な特徴は、さらなる目的および利点と併せて、添付の図面を参照して考慮した場合、以下の記述から、さらによく理解されるものと予想される。しかし、図面のそれぞれは、例示と説明のみを目的として提供されたものであって、本発明の限定を規定しないことが明示的に理解されるものと予想される。

【0030】

本発明をよりいっそう理解するために、添付の図面と併せて考慮される以下の記述をここで参照する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】エンゲージャー細胞の実施形態の概念を示す図である。

【0032】

【図2】T細胞およびNK細胞エンゲージャーの実施形態の概念を示す図である。

【0033】

【図3】エンゲージャーT細胞の例を示す図である。

【0034】

【図4】EphA2-ENG T細胞の生成を示す図である。(A)レトロウイルスベクターのスキーム(IRES:内部リボソーム進入部位;mO:mOrange)。(B)形質導入T細胞およびNT T細胞のmOrangeについてのFACS分析。(C)形質導入T細胞およびNT T細胞のEphA2エンゲージャーについてのqRT-PCR。

【0035】

【図5A】EphA2特異的エンゲージャー分子が、T細胞の細胞表面に結合し、T細胞によって分泌されることの実証を示す図である。(A)EphA2-ENGおよびc末端6xHis-Mycタグを有するEphA2-ENG(EphA2-HM)をコードするレトロウイルスベクターのスキーム。EphA2-HMは、終止コドンの前に6xHis-Mycタグを挿入することによって生成された。EphA2-ENGおよびEphA2-HM-ENG T細胞は、レトロウイルスの形質導入によって生成され、形質導入後、73%(EphA2-ENG)または57%(EphA2-HM-ENG)のT細胞が、FACS分析でmOrange陽性であった(データは示されていない)。

【図5B】(B)NT、EphA2-ENG、およびEphA2-HM T細胞をエフェクターとして、EphA2陽性U373細胞を標的細胞として用いる細胞傷害性アッセイ。EphA2-ENG T細胞とEphA2-HM-ENG T細胞の間には、有意な相違がなかった。これは、タグがエンゲージャー分子の機能を妨げないことを示す。

【図5C】(C)EphA2-ENGおよびEphA2-HM-ENG T細胞のFACS分析は、mOrange陽性細胞およびmOrange陰性細胞についてゲーティングした(白抜きの曲線:アイソタイプ、塗り潰しの曲線:アルファmyc-APC(Abcam、Cambridge、MA)。EphA2-ENG T細胞は、細胞表面の染色を示さなかった。EphA2-ENG-HM T細胞をアルファmyc-APCで染色した。形質導入(mOrange+)および形質導入されていないT細胞(mOrange-)は陽性であった。これは、形質導入T細胞が、形質導入されていないT細胞に結合するエンゲージャー分子を分泌することを示す。

【図5D】(D)NT、EphA2-ENGまたはEphA2-HM-ENG T細胞からの培地をHis Mag Sepharose excel(GE Healthcare)と共にインキュベートした。ビーズを洗浄し、結合画分を製造業者の指示に従って溶出した。溶出画分をSDS-PAGEによって分離し、アルファMyc(Abcam)でプロットングし、続いてHRPコンジュゲートヤギマウスIgG抗体(Santa Cruz Biotechnology)でプロットングした。*:非特異的なバンド。

【0036】

【図6】EphA2-ENG T細胞が、サイトカインを分泌し、増殖し、抗原特異的に標的細胞を殺滅することの実証を示す図である。(A)EphA2-ENG、CD19-ENG、およびNT T細胞を、10:1の比率でEphA2陽性(U373、A549、K562-EphA2)または陰性(K562)腫瘍細胞と共培養した。24時間後に、ELISAによってIFNガンマおよびIL2産生量を測定した(n=4)。(B)EphA2-ENG、CD19-ENG、およびNT T細胞を10:1の比率でEphA2陽性(U373、A549)腫瘍細胞と共培養した。7日後に、トリパンブルー染色によって生存T細胞を計数した(n=4)。(C)EphA2-ENG、CD19-ENG

10

20

30

40

50

、およびNT T細胞をエフェクターとして、EphA2陽性(U373、A549、K562-EphA2)および陰性(K562)腫瘍細胞を標的として用いて細胞傷害性アッセイを行った(平均±SD; n=4)。

【0037】

【図7A】CD19特異的なエンゲージャー分子を分泌するT細胞の生成の実証を示す図である。(A)レトロウイルスベクターのスキーム。

【図7B】(B)形質導入T細胞およびNT T細胞のmOrangeについてのFACS分析。

【図7C】(C)細胞傷害性アッセイでは、E:T比2.5:1において、形質導入されていない(NT)T細胞とは対照的に、CD19-ENG T細胞のみがCD19+細胞株(Daudi、Raji、BV173)を殺滅した(n=4; p<0.05)。

【図7D】(D)CD19+標的との共培養アッセイにおいて、CD19-ENG T細胞のみが有意なレベルのIFN-γを分泌した(n=3; BV173、Daudi、RajiについてCD19-ENG対EphA2-ENG T細胞: p<0.05)。一貫したIL-2産生は、CD19+標的に特異的であり、標的細胞上におけるCD80およびCD86の発現によって影響を受けた(n=3; DaudiおよびRajiについてCD19-ENG対EphA2-ENG T細胞: p<0.05; BV173についてCD19-ENG対EphA2-ENG T細胞: p=有意で無い)。

【0038】

【図8A】CD123特異的なT細胞エンゲージャーを分泌するT細胞が抗原特異的にCD123陽性腫瘍細胞を認識することの実証を示す図である。(A)CD123特異的なエンゲージャーをコードするレトロウイルスベクターのスキームおよび形質導入T細胞のFACS分析。

【図8B】(B)CD123陽性AML細胞(THP-1およびKG1a)ならびに陰性(Jurkat)および陽性対照(Jurkat-CD123)のFACS分析。

【図8C】(C)CD19特異的、CD123(292)特異的、またはCD123(716)特異的なエフェクターの、CD123陽性標的細胞(KG1a、Jurkat-CD123)およびCD123陰性標的細胞(Jurkat)との共培養アッセイ。24時間後にIFN-γを測定した。

【図8D】(D)CD19特異的、CD123(292)特異的、またはCD123(716)特異的なエフェクターとCD123陽性標的細胞(KG1a)を用いる細胞傷害性アッセイ。

【0039】

【図9】LeY特異的なT細胞エンゲージャーを分泌するT細胞が、抗原特異的にLeY陽性腫瘍細胞を殺滅することの実証を示す図である。LeY-ENG T細胞およびCD19-ENG T細胞をエフェクターとして、K562(CD19-、LeY+)およびKG1a(CD19-、LeY+)を標的細胞として用いて、標準的な細胞傷害性アッセイを行った。

【0040】

【図10】B7H3特異的なT細胞エンゲージャーを分泌するT細胞がB7H3陽性腫瘍細胞を抗原特異的に認識することの実証を示す図である。(A)B7H3-ENG T細胞またはCD19-ENG T細胞の、B7H3陽性(U373、LM7、CHLA255)およびB7H3陰性(HTB119)腫瘍細胞との共培養アッセイ。24時間後にIFN-γを測定した。(B)B7H3-ENG T細胞またはCD19-ENG T細胞の、U373、LM7、CHLA255との共培養アッセイ。生存腫瘍細胞は、クリスタルバイオレット染色によって可視化した。

【0041】

【図11】HER2特異的T細胞エンゲージャーを分泌するT細胞がHER2陽性腫瘍細胞を抗原特異的に認識することの実証を示す図である。HER2-ENG T細胞および形質導入されていない(NT)T細胞をHER2陽性(U373)およびHER2陰性(

10

20

30

40

50

M D A) 腫瘍細胞と共培養した。24時間後にI F Nガンマを測定した。

【0042】

【図12】E G F Rコンフォメーションエピトープ806に特異的なT細胞エンゲージャーを分泌するT細胞がE G F R陽性腫瘍細胞を抗原特異的に認識することの実証を示す図である。806 - E N G T細胞およびC D 19 - E N G T細胞を、U 3 7 3 (E G F R低レベル陽性)、A 4 3 1 (増幅されたE G F R遺伝子)、K 5 6 2 (E G F R陰性)、およびE G F R v I I Iを発現するように遺伝的に改変されたK 5 6 2 (K 5 6 2 - E G F R v I I I) と共にインキュベートした。24時間後にI F Nガンマを測定した。

【0043】

【図13】E p h A 2 特異的N K細胞エンゲージャーを分泌するT細胞がN K細胞を抗原特異的に活性化することの実証を示す図である。(A) E p h A 2 特異的N K細胞エンゲージャーをコードするレトロウイルスベクターのスキーム。(B) I L 1 3 Rアルファ2またはE p h A 2 コーティングされたプレート上におけるN K細胞、C D 1 6 . E p h A 2 - E N G T細胞、またはC D 1 6 . E p h A 2 - E N G T細胞とN K細胞の共培養アッセイ。C D 1 6 . E p h A 2 - E N G T細胞とN K細胞の共培養のみがE p h A 2の存在下で高レベルのI F N gを産生した。これは、N K細胞の抗原特異的な活性化を実証するものである。

【0044】

【図14】E p h A 2 - E N G T細胞がバイスタンダー (b y s t a n d e r) T細胞を腫瘍細胞にリダイレクトすることの実証を示す図である。(A) A 5 4 9細胞を、N T T細胞およびN T T細胞またはE p h A 2 - E N G T細胞の培地の存在下または非存在下で共培養した。24時間後にE L I S AによってI F N - ガンマの産生量を測定した。(平均±S D ; n = 4)。(B) 共培養トランスウェルアッセイのスキーム。(C) N T T細胞およびU 3 7 3細胞をボトムウェルに、E p h A 2 - E N G T細胞をインサートウェルにプレーティングした。プレーティングされたE p h A 2 - E N G T細胞の数は $10^3 \sim 10^6$ の範囲であった。インサートウェル内のC D 1 9 - E N G T細胞およびN T T細胞無しのボトムウェルを対照として用いた。48時間後に、生存U 3 7 3細胞をクリスタルバイオレット染色によって可視化した。代表的な1回の実験の結果を示す。(D) E p h A 2 - E N GおよびE p h A 2 - C A R T細胞の抗腫瘍活性を比較するために、漸増パーセントの形質導入E p h A 2 - E N GまたはE p h A 2 - C A R T細胞を含有する 1×10^5 個のT細胞と共にU 3 7 3細胞をインキュベートした。48時間後に生存腫瘍細胞をM T Sアッセイによって測定した (n = 4 ; 各ドナーについて三連のアッセイ ; p < 0 . 00001)。

【0045】

【図15】C D 1 9 - E N G T細胞がバイスタンダーT細胞を腫瘍細胞にリダイレクトすることの実証を示す図である。形質導入されていない (N T)、E p h A 2 - E N G、またはC D 1 9 - E N G T細胞をインサートウェルにプレーティングし、ホタルルシフェラーゼ (f f L u c) - B V 1 7 3またはf f L u c - B V 1 7 3およびN T T細胞をボトムウェルにプレーティングした。48時間後にl u c - アッセイによって腫瘍細胞の存在を測定した。C D 1 9 - E N G T細胞のみがN T T細胞を腫瘍細胞にリダイレクトした (n = 3 ; P < 0 . 05)。

【0046】

【図16】E p h A 2 - E N G T細胞の抗原特異的な活性化は、それらが有する、バイスタンダーT細胞を腫瘍細胞にリダイレクトする能力を高めることの実証を示す図である。(A、B) E p h A 2 (活性化) またはH E R 2 (非活性化) タンパク質コーティングされたプレートでN T T細胞およびE p h A 2 - E N G T細胞を培養した。P B S処理されたプレートを対照として用いた。(A) 72時間後にq R T - P C RによってE p h A 2 - E N Gの発現量を測定した (平均 + S D ; n = 3)。(B) 24時間後にE L I S AによってI F Nガンマの産生量を測定した (平均 + S D ; n = 3)。(C) U 3 7 3 . e G F P . f f L u cまたはB V 1 7 3 . f f L u c細胞をN T T細胞、トランス

10

20

30

40

50

ウェル分離された漸増数の活性化または非活性化 E p h A 2 - E N G T 細胞と共に共培養した。48 時間後にルシフェラーゼアッセイによって生存腫瘍細胞について決定した ($n = 3$; 各ドナーについて二連のアッセイ ; 活性化対非活性化 T 細胞 : U 3 7 3 について : $p < 0 . 0 0 0 0 1$; B V 1 7 3 について : $p = 0 . 1 2$)

【 0 0 4 7 】

【図 17】 *i n v i v o* における E p h A 2 - E N G T 細胞およびバースタンダー T 細胞の抗原依存的な拡張の実証を示す図である。(A) A 5 4 9 担がんマウスまたは非担がんマウスに、 5×10^6 個の e G F P . f f L u c 発現 E p h A 2 - E N G および 5×10^6 個の N T T 細胞の混合物の *i . v .* 注射、ならびに 1 用量の I L 2 (1 , 5 0 0 単位) の *i . p .* 投与を行った。連続生物発光イメージングを行って T 細胞の追跡を行った (平均 \pm S D を示す ; 1 群当たり $n = 5$; * $p < 0 . 0 5$ 、* * $p < 0 . 0 1$ 、* * * $p < 0 . 0 0 5$)。(B) A 5 4 9 担がんマウスに、 5×10^6 個の E p h A 2 - E N G および e G F P . f f L u c を発現する 5×10^6 個の N T 細胞、または 5×10^6 個の C D 1 9 - E N G および e G F P . f f L u c を発現する 5×10^6 個の N T 細胞の混合物の *i . v .* 注射、ならびに 1 用量の I L 2 (1 , 5 0 0 単位) の *i . p .* 投与を行った。連続生物発光イメージングを行って T 細胞の追跡を行った。

10

【 0 0 4 8 】

【図 18】 E p h A 2 - E N G および C D 1 9 - E N G T 細胞が試験された動物モデルの実験スキームの概略図である。

【 0 0 4 9 】

20

【図 19】 E p h A 2 - E N G T 細胞が有効な抗腫瘍活性 *i n v i v o* を有することの実証を示す図である。(A ~ C) U 3 7 3 神経膠腫 S C I D 異種移植モデルにおける E p h A 2 - E N G T 細胞の抗腫瘍活性。 1×10^5 個の U 3 7 3 . e G F P . f f L u c 細胞の頭蓋内注射の 7 日後に、 2×10^6 個の E p h A 2 - E N G ($n = 8$) または C D 1 9 - E N G ($n = 5$) T 細胞を同じ部位に頭蓋内注射した。未処置の動物を対照 ($n = 5$) として用いた。腫瘍成長を生物発光イメージングによって追跡した。(A) 代表的な動物の画像、(B) 各マウスについての定量的生物発光イメージングの経時的結果 (放射輝度 = 光子 / 秒 / cm^2 / s r)、(C) カプラン・マイヤー生存曲線。(D ~ F) A 5 4 9 肺腫瘍 S C I D 異種移植モデルにおける E p h A 2 - E N G T 細胞の抗腫瘍活性。 2.5×10^6 個の A 5 4 9 . e G F P . f f L u c 細胞を *i . v .* 注射した 7、14、および 21 日後に、マウスに 1×10^7 個の E p h A 2 - E N G T 細胞 ($n = 5$) または C D 1 9 - E N G T 細胞 ($n = 4$) の *i . v .* 投与および I L 2 (1 5 0 0 単位) の *i . p .* 投与を行った。未処置の動物を対照 ($n = 5$) として用いた。腫瘍成長を生物発光イメージングによって追跡した。(D) 代表的な動物の画像、(E) 各マウスについての定量的な生物発光イメージング結果、(F) カプラン・マイヤー生存曲線。

30

【 0 0 5 0 】

【図 20】 C D 1 9 - E N G T 細胞が白血病異種移植モデルにおいて有効な抗腫瘍活性を有することの実証を示す図である。0 日目に B V 1 7 3 . f f L u c 細胞を *i . v .* 注射し、7、14、21 日目に、マウスに 1×10^7 個の E p h A 2 - E N G T 細胞 ($n = 5$) または C D 1 9 - E N G T 細胞 ($n = 5$) の *i . v .* 投与および I L 2 の *i . p .* 投与を行った。未処置の動物を対照 ($n = 5$) として用いた。(A) 代表的な画像、(B) 定量的生物発光。

40

【 0 0 5 1 】

【図 21】 C D 1 9 - E N G T 細胞がリンパ腫異種移植モデルにおいて有効な抗腫瘍活性を有することの実証を示す図である。0 日目に D a u d i . f f L u c 細胞を *i . v .* 注射し、3、6、9 日目に 1×10^7 個の C D 1 9 - E N G T 細胞 ($n = 5$) または形質導入されていない (N T) T 細胞 ($n = 5$) をマウスに *i . v .* 投与した。(A) 代表的な画像、(B) 定量的生物発光。

【 0 0 5 2 】

【図 22】 C D 1 9 特異的なエンゲージャー分子、共刺激分子 C D 8 0、および 4 - 1 B

50

BLを発現するT細胞が、共培養アッセイでIL-2を定常的に産生することの実証を示す図である。(A)使用したレトロウイルスベクターおよびCD19-ENG/共刺激T細胞のスキーム。(B)CD19-ENG T細胞およびCD19-ENG/共刺激T細胞上のCD80および4-1BBLの発現、 $n=4$ 。(C)CD19-ENG/共刺激T細胞をBV173(CD80-/CD86-)で刺激した後におけるIL-2の定常的産生、 $n=2$ 。無関係のエンゲージャー分子を発現する共刺激T細胞(EpHA2-ENG/共刺激T細胞)を用いた場合、IL-2産生は観察されなかった。これは、抗原特異的なIL-2分泌を確認するものである。

【0053】

【図23】EpHA2-ENGおよびIL15をコードするレトロウイルスベクターで遺伝的に改変されたT細胞が、活性化後に、IFN γ およびIL2を発現するだけでなく、IL15のレベルも増大させることの実証を示す図である。NT T細胞、CD19-ENG T細胞、EpHA2-ENG T細胞、またはEpHA2-ENG/IL15 T細胞を、EpHA2陽性/CD19陰性細胞(U373、A549、K562-EpHA2)、EpHA2陰性/CD19陰性細胞(K562)、またはEpHA2陰性/CD19陽性の細胞(BV173)と共培養した。24時間後に、IFN γ (A)、IL2(B)、およびIL15(B)産生をELISA($n=4$)によって測定した。

【0054】

【図24】EpHA2-ENGおよびIL15をコードするレトロウイルスベクターで遺伝的に改変されたT細胞が、EpHA2-ENGによる改変のみのT細胞より大きな増殖能力を有することの実証を示す図である。NT T細胞、CD19-ENG、EpHA2-ENG、およびEpHA2/IL15 T細胞を、EpHA2陽性(U373、A549)の腫瘍細胞(B、C)と10:1の比率で、または培地(A)と共培養した。7日後に、生存T細胞数をトリパンブルー染色で計数した(U373:EpHA2-ENG対EpHA2-ENG/IL15 $p=0.01$; A549:EpHA2-ENG対EpHA2-ENG/IL15 $p=0.008$; $n=4$)。

【発明を実施するための形態】

【0055】

本明細書で使用する場合、単語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、請求項を含めて、本明細書で単語「含む(comprising)」と共に使用される場合、「1つまたは複数」を意味する。本発明の一部の実施形態は、1種または複数の要素、方法ステップ、および/または本発明の方法からなるか、本質的になるものでありうる。本明細書に記載のいずれの方法または組成物も、本明細書に記載の任意の他の方法または組成物に関して実行できることが企図されている。

【0056】

本明細書で使用する場合、「エンゲージャー」または「エンゲージャー分子」という用語は、免疫細胞を活性化する細胞から分泌される分子を指す。特定の実施形態では、エンゲージャーは、そのエンゲージャー内に存在するドメインに応じた特定の免疫細胞を活性化する。限定されるものではないが、エンゲージャーを分泌する細胞の説明に役立つ例としては、T細胞、NK細胞、NKT細胞、CAR T細胞、間葉系幹細胞(MSC)、神経幹細胞、造血幹細胞、または場合によってはこれらの混合物が挙げられる。

【0057】

本明細書で使用する場合、「抗原認識ドメイン」という用語は、抗原を認識するエンゲージャー分子の一部を指す。特定の実施形態では、抗原は、いかなる性質のものでもよく、タンパク質、炭化水素、および/または合成分子が含まれるが、これらに限定されない。

【0058】

本明細書で使用する場合、「活性化ドメイン」という用語は、免疫細胞と相互作用し、正または負の免疫調節シグナルを誘導する、エンゲージャー分子の一部を指す。正の免疫調節シグナルの説明に役立つ例としては、細胞増殖、サイトカイン分泌、または細胞溶解

10

20

30

40

50

活性を誘導するシグナルが挙げられる。負の免疫調節シグナルの説明に役立つ例としては、細胞増殖を抑制するシグナル、免疫抑制因子の分泌を抑制するシグナル、または細胞死を誘導するシグナルが挙げられる。

【0059】

本明細書で使用する場合、「天然免疫細胞」という用語は、免疫系に天然に存在する免疫細胞を指す。説明に役立つ例としては、T細胞、NK細胞、NKT細胞、B細胞、および樹状細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0060】

本明細書で使用する場合、「遺伝子操作された免疫細胞」という用語は、遺伝的に改変された免疫細胞を指す。

【0061】

本明細書で使用する場合、「共刺激ドメイン」または「共刺激シグナル伝達ドメイン」という用語は、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインを指す。特定の態様では、この用語は、活性化ドメインと共に追加のシグナルを免疫細胞にもたらすドメインを指す。共刺激分子は、抗原に結合した際にTリンパ球の有効な活性化および機能に必要な第2のシグナルをもたらす、抗原受容体またはFc受容体以外の細胞表面分子である。そのような共刺激分子の説明に役立つ例としては、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、CD30、CD40、ICOS(CD278)、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、CD70、CD80、CD86、およびCD83が挙げられる。

【0062】

I. エンゲージャー分子

特定の実施形態では、少なくとも抗原認識ドメインおよび活性化ドメインを含み、場合によってサイトカイン、共刺激性ドメイン、および/またはT細胞活性化の負の調節分子を抑制するためのドメインを含むエンゲージャー分子によって、細胞が遺伝的に改変されている(免疫細胞を含める)。エンゲージャー分子の抗原認識ドメインは、標的細胞内および/または標的細胞上に存在し、標的細胞によって分泌される1種または複数の分子に結合する。特定の態様では、標的細胞ががん細胞であり、これには、少なくとも固形腫瘍細胞が含まれる。エンゲージャー分子が標的分子に結合したら、それらは活性化ドメインによって認識される分子を発現する細胞を活性化することができる。エンゲージャー分子は、エンゲージャー分子で遺伝的に改変された細胞を活性化することも、無改変の細胞を活性化することもできる。所望の効果に応じて、活性化は、正または負のシグナルをもたらすことができる。正のシグナルの例としては、細胞増殖、サイトカイン分泌、または細胞溶解活性を誘導するシグナルが挙げられる。負のシグナルの例としては、T細胞増殖を抑制するシグナル、免疫抑制因子の分泌を抑制するシグナル、または細胞死を誘導するシグナルが挙げられる。

【0063】

特定の態様では、エンゲージャー分子を分泌する免疫細胞が、常在(特定の個体において天然に内在する)免疫細胞をがん細胞にリダイレクトすることができる。

【0064】

本開示の実施形態は、エンゲージャー分子を個体自体に送達するだけ(改変免疫細胞によって産生されること無しに)ではなく、エンゲージャー分子を分泌する改変免疫細胞を、それを必要とする個体(特定のがんを含めた、がんを有することが既知である、またはがんを有すると考えられる個体)に送達することも提供する。本開示では、個体に、エンゲージャー分子の産生を可能にする改変免疫細胞を投与する。特定の実施形態では、細胞は、免疫活性化サイトカインを産生し、抗原特異的に増殖し、しかるべき標的細胞を殺滅し、バースタンダー免疫細胞(少なくともT細胞またはNK細胞が含まれる)をがん細胞にリダイレクトし、活性化した際にエンゲージャー分子を分泌し、かつ/またはがんに対して局所領域のもしくは全身的に有効である。図3は、エンゲージャー分子を分泌する改変T細胞またはNK細胞の例を示す。特定のT細胞またはNK細胞が、同じがん細胞特異

10

20

30

40

50

抗原を標的にすることができるエンゲージャーを産生してもよいが、NK細胞はCD3を発現しないので、T細胞またはNK細胞に対する活性化ドメインは異ならなければならない。NK細胞に対する活性化ドメインの例としては、例として、少なくともCD16、NKGD、またはNKp30が挙げられる。

【0065】

様々な実施形態において、方法および組成物は、二重特異性一本鎖抗体コンストラクト、または、抗体由来の断片の代わりに、抗原認識ドメインであるリガンド、ペプチド、もしくは可溶性TCRおよび/もしくは免疫細胞活性化ドメインであるリガンドを含む二重特異性コンストラクトを含む組成物に関する(図3)。二重特異性一本鎖抗体コンストラクトは、少なくとも2つのドメインを含む、からなる、または本質的になり、それによって、前記少なくとも2つのドメインの1つが表1に記載の腫瘍抗原(例えば、EphA2、CD19、CD123、LeY、B7H3、HER2、およびEGFR(EGFRvIIなど))に特異的に結合し、第2のドメインは、例えば、T細胞上のCD3など、免疫細胞表面タンパク質に結合することの特徴とする。加えて、エンゲージャー分子は、3つ以上のドメインを含んでいてもよい。実施形態には、本開示の組成物を生成するためのプロセス、がんの予防、処置、または改善のための方法、およびがんまたは少なくとも1つのその症状の予防、処置、または改善における二重特異性エンゲージャー分子コンストラクトの使用がさらに包含される。

【0066】

いくつかの実施形態では、エンゲージャー組成物が、二重特異性一本鎖抗体コンストラクトに加えて、第3のドメイン(場合によって、さらに多くのドメインを付加してもよい)を含み、これは、三部分エンゲージャーと呼ぶことができる。第3のドメインまたはさらなるドメインは、サイトカイン、共刺激性ドメイン、および/またはT細胞活性化の負の調節分子を抑制するためのドメインの提供などによって、組成物または方法の活性を強化するものでありうる。実施形態には、三部分エンゲージャーを生成するためのプロセス、がんの予防、処置、または改善のための方法、およびがんの予防、処置、または改善における三部分エンゲージャーの使用がさらに包含される。

【0067】

特定の実施形態では、エンゲージャー分子は、EphA2に結合する抗原認識ドメインを含む。EphA2は、EPH受容体A2(エフリンA型受容体2、EPHA2、ARCC2、CTPA、CTPP1、またはECK)とも呼ばれることがあり、ヒトでは、タンパク質チロシンキナーゼファミリーのエフリン受容体サブファミリーに属するEPHA2遺伝子によってコードされているタンパク質である。このサブファミリーに属する受容体は、一般に、1つのキナーゼドメインと、1つのCysリッチドメインおよび2つのフィブロネクチンIII型リピートを含む細胞外領域とを含む。本開示の抗体の実施形態は、これらのドメインのいずれを標的にするものでもよい。エフリン受容体は、それらのそれぞれの細胞外ドメイン配列の類似性ならびにエフリンAおよびエフリンBリガンドと結合する親和性の結果、2つのグループに分けられ、EphA2は、エフリンAリガンドに結合するタンパク質をコードする。ヒトEphA2核酸配列の一例は、GenBank(登録商標)受託番号NM_004431にあり、ヒトEphA2ポリペプチド配列の一例は、GenBank(登録商標)受託番号NP_004422にある。これらの配列の両方を本明細書に全体として組み込む。

【0068】

特定の実施形態では、エンゲージャー分子が、CD19に結合する抗原認識ドメインを含む。CD19は、CD19分子、CD19抗原、分化抗原CD19、Bリンパ球表面抗原B4、CVID3と呼ばれることがある。遺伝子座、ヌクレオチド配列、およびアミノ酸配列に関する情報は、HGNC:1633、Entrez Gene:930、Ensembl:ENSG00000177455、UniProtKB:P15391で見出すことができる。CD19は細胞表面分子をコードし、これは、抗原受容体に依存する刺激の閾値を低減するために、Bリンパ球の抗原受容体と集合する。ヒトCD19分子の一

10

20

30

40

50

例は、GenBank（登録商標）受託番号NM__001178098にあり、ヒトCD19ポリペプチドの一例は、GenBank（登録商標）受託番号NP__001171569にある。これらの配列の両方を本明細書に全体として組み込む。

【0069】

エンゲージャー細胞は、当技術分野における任意の適した方法で生成できる。特定の実施形態では、エンゲージャーT細胞は、T細胞のウイルス性形質導入によって生成されるが、いくつかの実施形態では、少なくとも特定の場合に、NK細胞および他の細胞（場合によって、CAR T細胞、NKT細胞、MSC、神経幹細胞、造血幹細胞）のウイルス性形質導入も有用である。形質導入されたT細胞の内因性天然TCRは、非特異的であるか、腫瘍抗原またはウイルス抗原など、抗原に特異的である。

10

【0070】

A．抗原認識ドメイン

本開示のエンゲージャー組成物は、エンゲージャーを発現するT細胞および対応するエンゲージャー分子が、抗原を発現する、対象とする特定の細胞を標的にするか、分泌可能な抗原を標的にするのを可能にする抗原認識ドメインを含む。特定の態様では、いかなる細胞が抗原を含んでもよいが、特定の態様では、抗原が、固形腫瘍細胞を含めたがん細胞上に提示される。がん細胞抗原は、いかなる種類のものでよいが、特定の態様では、がん細胞に特異的であり、かつ特定のタイプのがん細胞に特異的でありうる。例えば、EphA2が利用される実施形態では、がん細胞は、乳がん細胞でも、肺がん細胞でも、前立腺がん細胞でも、膠芽腫細胞でもよい。細胞は、細菌細胞などの病原性細胞でもよい。

20

【0071】

あらゆるがん抗原が、エンゲージャーを発現するT細胞またはそれに対応するエンゲージャー分子の標的になる可能性がある。特定の実施形態では、抗原が、表1に記載の抗原である。特定の実施形態では、エンゲージャー分子が複数の抗原認識ドメインを含む。

【0072】

特定のがん抗原を標的にする場合、抗原は、抗体の任意の適したscFvまたは抗原結合断片を用いて標的にすることができる。エンゲージャー分子を構築するのに使用された特定のscFvの例を表2に記載する。それぞれのエンゲージャー分子を発現するT細胞の機能性について確認した。これについては、実施例2に詳細に記載されている。

【表2】

30

表2:エンゲージャー分子の構築に使用された scFV

標的	MAb
CD19	FMC63
CD123	26292
CD123	32716
LeY	Hu3S193
EphA2	4H5
B7H3	8H9
HER2	FRP5
EGFRvIIIを含めた EGFR	806

40

【0073】

他の潜在的な抗原については、表1に記載されており、かつ/または本明細書中の他の箇所でも論じられている。

【0074】

B．活性化ドメイン

本開示のエンゲージャー組成物は、エンゲージャー分子を発現する免疫細胞および/または他の免疫細胞が、エンゲージャーおよび標的細胞に結合するのを可能にする活性化ドメインを含む。活性化ドメインは、特定の態様では、抗体またはその抗原結合性断片であ

50

る。活性化ドメインの説明に役立つ例としては、抗体もしくはその抗原結合性断片、リガンド、ペプチド、可溶性T細胞受容体、またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0075】

エンゲージャーが結合する免疫細胞は、無改変の天然に内在する（レシピエント個体に内在する）免疫細胞でも、遺伝的に改変された免疫細胞でもよい。エンゲージャーは、活性化ドメイン（T細胞の場合におけるCD3モノクローナル抗体など）を介して標的免疫細胞に結合し、それによって標的免疫細胞を活性化する。エンゲージャーで容易に標的にすることができる他の活性化分子には、CD27、CD28、CD134、CD137などの共刺激分子が含まれる。例えば、EphA2特異的抗原認識ドメインおよびCD3特異的な活性化ドメインを有する1つのエンゲージャー分子と、HER2特異的抗原認識ドメインとおよびCD28特異的な活性化ドメインを有するもう1つのエンゲージャーとを発現するように、T細胞を遺伝子操作することができる。これらのエンゲージャーT細胞は、両方の抗原が発現されている腫瘍部位でのみ完全に活性化されることになる。エンゲージャーがNK細胞を標的にする場合には、活性化ドメインは、CD16を認識する抗体（NM3E2抗体など）またはNKG2D（ULBP2）もしくはNKp30（B7H6）に特異的なリガンドを認識する抗体を含みうる。特定の実施形態では、活性化ドメインがリガンド、受容体、ペプチドなどを含む。

【0076】

C. オプションの追加ドメイン

特定の実施形態では、エンゲージャーは、エンゲージャーの活性を強化し、かつ/またはエンゲージャー分子を発現する免疫細胞の活性を強化する追加ドメインを含む。追加ドメインは、いかなる種類のものでよいが、特定の実施形態では、追加ドメインは、1つもしくは複数の抗原認識ドメインまたは1つもしくは複数の活性化ドメインを含む。追加ドメインは、サイトカイン、共刺激ドメイン、またはT細胞活性化の負の調節分子を抑制する実体を含みうる。いくつかの実施形態では、エンゲージャー分子で用いられる追加ドメインが1つだけだが、他の実施形態では、同じタイプのもの複数および異なるタイプのもの複数を含めた、複数を用いることができる。

【0077】

追加ドメインは、追加の抗原を標的にすることによって、免疫逃避を相殺できるだろう。例えば、エンゲージャー分子は、血液悪性腫瘍用にCD19およびCD22を標的にするように設計することも、固形腫瘍用にEphA2およびHER2を標的にするように設計することもできよう。追加ドメインは、共刺激をもたらすものでもよい。例えば、腫瘍抗原（表1を参照）を標的とし、T細胞活性化用のCD3特異的なscFvと、共刺激をもたらす41BBLの細胞外ドメインとを含有するようにエンゲージャー分子を設計することもあり得る。追加ドメインは、免疫細胞を誘引するものでもよい。例えば、腫瘍部位への免疫細胞の移動を増強するのに、ケモカインRANTESをコードする追加ドメインを用いることもあり得る。追加ドメインは、サイトカインなどの免疫細胞成長因子を提供するのに用いることもできよう。例えば、IL-2またはIL15のようなサイトカインをコードする追加ドメインを、免疫細胞の増殖および拡張を強化するのに用いることもあり得る。追加ドメインは、エンゲージャー分子の物理的特性を変えるのに用いることもできよう。例えば、CH2-CH3ドメインまたはロイシンジッパーをコードする追加ドメインは、エンゲージャー分子の二量体化または三量体化を促進し、機能の強化をもたらすこともあり得る。

【0078】

特定の実施形態では、追加ドメインは、任意のサイトカインをコードする。特定の態様では、サイトカインが、IL-2、IL-7、および/またはIL-15であってもよく、いくつかの態様では、エンゲージャーが、サイトカインをコードする複数の追加ドメインを含む。

【0079】

特定の実施形態では、エンゲージャーは、本明細書中の他の箇所に記載されているように共刺激ドメインを含む。しかし、特定の実施形態では、共刺激ドメインが、CD80、CD137などを含む。

【0080】

特定の態様では、エンゲージャー分子が、T細胞活性化の負の調節分子を抑制するドメインを含む。特定の態様では、このドメインは、例えば、PD-L1またはCTLA4である。

【0081】

D．可溶性T細胞受容体ドメイン

いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインが抗体であることの代わりに、エンゲージャーが、抗体ではなく、がん細胞を認識することができる異なる種類のドメインを含む。一態様では、エンゲージャーがリガンド受容体結合対の1つのメンバーを含み、同族のメンバーががん細胞で発現される。ある特定の態様では、エンゲージャーが、抗体の代わりなどで、可溶性T細胞受容体(TCR)ドメインを含む。図2は、T細胞活性化ドメインが可溶性TCRと連結されている実施形態の例を示す。

【0082】

E．特定のエンゲージャー分子の例

以下に、エンゲージャー分子の特定の例を示す。一般に、scFvは、リンカーペプチドによって接続されたVHおよびVLドメインを含有している。例えば、配列番号1は、下記の式を含むCD19-CD3T細胞エンゲージャーである。

【0083】

1．CD19-CD3T細胞エンゲージャー

リーダー-VL FMC63-(G4S1)3-VH FMC63-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

【0084】

配列番号1は以下の通りである。配列中、第1の下線部は、リーダーであり、その後の下線部は、上記の式による各scFvの間にあるリンカー配列である。

【0085】

MDWIWRILFLVGAATGAHSDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSR
FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLELKRGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLQQSGPGLVA
PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNLSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDAIY
YCAKHHYYGGSYAMDYWGQGTITVSSYVTVSSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWWKQRP
GQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTITLVSSGG
GGSGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSG
TSYSLTISMEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

【0086】

2．IL3Ra-CD3T細胞エンゲージャー

リーダー-VH26292-(G4S1)3-VL26292-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

【0087】

配列番号2は以下の通りである。配列中、第1の下線部は、リーダーであり、その後の下線部は、上記の式による各scFvの間にあるリンカー配列である。

【0088】

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYN
QKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTITLVSSGGGGSGGGSGGGGSDVQITQSPSYL
AASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYCQQH
NKYPYTFGGGKLEIKSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWWKQRPQGLEWIGYINPSRGYT
NYNQFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTITLVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQL
TQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAAT
YYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

3 . I L 3 R a - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H 3 2 7 1 6 - (G 4 S 1) 3 - V L 3 2 7 1 6 - S G 4 S - V H O K T 3
- (G 4 S 1) 3 - V L O K T 3

【 0 0 9 0 】

配列番号 3 は以下の通りである。配列中、第 1 の下線部は、リーダーであり、その後の下線部は、上記の式による各 s c F v の間にあるリンカー配列である：

【 0 0 9 1 】

MDWIWRILFLVGAATGAHSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNVWKQAPGKSFKWMGWINTYTGESTYS
ADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNEEDTATYFCARSGGYDPMYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSP
ASLAVSLGQRATISCRASESDNYGNTFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVA
TYYCQQSNEDPPTFGAGTKLELKSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYI
NPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGG
GGSDIQLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTIS
SSMEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

10

【 0 0 9 2 】

4 . L e Y - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H H u 3 S 1 9 3 - (G 4 S 1) 3 - V L H u 3 S 1 9 3 - S G 4 S - V H
O K T 3 - (G 4 S 1) 3 - V L O K T 3

【 0 0 9 3 】

配列番号 4 は以下の通りである。配列中、第 1 の下線部は、リーダーであり、その後の下線部は、上記の式による各 s c F v の間にあるリンカー配列である。

20

【 0 0 9 4 】

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSTSGFTFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAYMSNVGAITDYP
DTVKGRTFISRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGTRDGSWFAYWGQGTPTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCRSSQRIVHSNGNTYLEWYQQTPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSQLQPED
IATYYCFQGSHPFTFGQGTQLQITSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIG
YINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGG
GGGSDIQLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTIS
SMEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

30

【 0 0 9 5 】

5 . E p h A 2 - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H 4 H 5 - (G 4 S 1) 3 - V L 4 H 5 - S G 4 S - V H O K T 3 - (G 4
S 1) 3 - V L O K T 3

【 0 0 9 6 】

配列番号 5 は以下の通りである。配列中、第 1 の下線部は、リーダーであり、その後の下線部は、上記の式による各 s c F v の間にあるリンカー配列である：

【 0 0 9 7 】

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGQALEWMGTISSGGTYTYP
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREAIPTYWGRGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLS
ASVGDRVTITCKASQDINNYLSWYQQKPGQAPRLIYRANRLVDGVPDRFSGSGYGTDFTLTINNI ESEDAAYYFCLKYD
VFPTFGQGTKEIKSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTN
YNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLT
QSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAATY
YCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

40

【 0 0 9 8 】

6 . B 7 H 3 - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H 8 H 9 - (G 4 S 1) 3 - V L 8 H 9 - S G 4 S - V H O K T 3 - (G 4
S 1) 3 - V L O K T 3

【 0 0 9 9 】

50

配列番号 6 は以下の通りである。配列中、第 1 の下線部は、リーダーであり、その後の下線部は、上記の式による各 s c F v の間にあるリンカー配列である。

【 0 1 0 0 】

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVKLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYN
EKFKGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTATWFAYWQGQTTTVTVSSDGGGSGGGSGGGSGDIELTQSP
TTLSTVTPGDRVSLSCRASQSIDYLHWYQQKSHEPRLLIKYASQISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYC
QNGHSFPLTFGAGTKLELKQAASGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYIN
PSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGSGGG
GSDIQLTQSPAIMASPGKEVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSSYSLTSSME
AEDAATYYCQWSSNPLTFGAGTKLELKS

10

【 0 1 0 1 】

7 . H E R 2 - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H F R P 5 - (G 4 S 1) 3 - V L F R P 5 - G 4 S - V H O K T 3 - (G
4 S 1) 3 - V L O K T 3

【 0 1 0 2 】

配列番号 7 は以下の通りである。配列中、第 1 の下線部は、リーダーであり、その後の下線部は、上記の式による各 s c F v の間にあるリンカー配列である。

【 0 1 0 3 】

mdwiwrilflvgaatgahsevqlqqsgpelkkpgetvkisckasgypftnygmwvkwqapggglkwmgwintstgestfa
ddfkgrfdslsantaylqinnlksedmatyfcawevyhgypvwygqgttvtvssgggsgggsgggsgdiqltqs
hkflstsvgdrvsitckasqdvynawwyqqkpgqspkllisassrytgvpstrftgsgspdfthtissvqaedlavyf
cqghfrtpftfgsgtkleikalggggsdikelqqsgaelarpgasvkmcktsygtftrytmhwvkqrpqglewigyinp
srgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltseedsavyyccaryyddhyclidywgqgttltvssgggsgggsgggsg
sdiqltqspaimaspgkevmtcrasssvsymnwqqksgtspkrwiydtskvasgvprrfsgsgsgtsysltissmea
edaatyyccqwssnpltfagagtklelks

20

【 0 1 0 4 】

8 . E G F R - C D 3 T 細胞エンゲージャー

リーダー - V H 8 0 6 - (G 4 S 1) 3 - V L 8 0 6 - S G 4 S - V H O K T 3 - (G 4
S 1) 3 - V L O K T 3

【 0 1 0 5 】

配列番号 8 は以下の通りである。配列中、第 1 の下線部は、リーダーであり、その後の下線部は、上記の式による各 s c F v の間にあるリンカー配列である。

【 0 1 0 6 】

MDWIWRILFLVGAATGAHSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYN
PSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRFPYWGQGLTVTVSAGGGSGGGSGGGSGDI LMTQSPSS
MSVSLGDTVSI TCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTLNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSELEDFADYYCVQ
YAQFPWTFGGGKLEIKRSGgggsdikelqqsgaelarpgasvkmcktsygtftrytmhwvkqrpqglewigyinp
srgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltseedsavyyccaryyddhyclidywgqgttltvssgggsgggsgggsg
sdiqltqspaimaspgkevmtcrasssvsymnwqqksgtspkrwiydtskvasgvprrfsgsgsgtsysltissmea
edaatyyccqwssnpltfagagtklelks

40

【 0 1 0 7 】

9 . C D 1 6 - E p h A 2 N K 細胞エンゲージャー

リーダー - V H N M 3 E 2 - (G 4 S 1) 3 - V L N M 3 E 2 - S G 4 S - V H 4 H 5 -
(G 4 S 1) 3 - V L 4 H 5

【 0 1 0 8 】

配列番号 9 は以下の通りである。配列中、第 1 の下線部は、リーダーであり、その後の下線部は、上記の式による各 s c F v の間にあるリンカー配列である。

【 0 1 0 9 】

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDYGMSSWVRQAPGKLEWVSGINWNGGSTGYA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLFLFDYWGQGLTVTVSRGGGSGGGSGGGSGGGSSSEL

50

TQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLVITYGKNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEAD
 YYCNSRDSGSHVVFVGGGKTLTVGSGGGGSQVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGQALEWMGT
 ISSGGTYTYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREAIPTYWGRGTLVTSSGGGSGGGGSGGGGSD
 IQLTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINNYLSWYQQKPGQAPRLIYRANRLVDGVPDRFSGSGYGTDFTLTINNIIESE
 DAAYYFCLKYDVPFPTFGQGTKVEIK

【 0 1 1 0 】

F . エンゲージャー - 一般概念

「二重特異性一本鎖抗体コンストラクト」という用語は、2つの抗体由来結合ドメインを含むコンストラクトに関する。結合ドメインの1つは、標的抗原、例えば、E p h A 2 またはC D 1 9 と特異的に結合するか、相互作用することができる抗体、抗体断片またはその誘導体の可変領域（またはその部分）を含みうる。第2の結合ドメインは、活性化分子、例えばヒトC D 3 抗原と特異的に結合するか、相互作用することができる抗体、抗体断片またはその誘導体の可変領域（またはその部分）を含みうる。特定の実施形態では、可変領域の一部が、少なくともC D R 1、C D R 2、またはC D R 3 領域など、少なくとも1つのC D R（「相補性決定領域」）を含む。一本鎖抗体コンストラクト内の2つのドメイン/領域は、好ましくは共有結合によって、一本鎖として相互に接続されている。

【 0 1 1 1 】

s c F v は、一般に、リンカーペプチドによって接続されたV H およびV L ドメインを含有する。分泌可能なエンゲージャーは、細胞からの（分泌を可能にする）シグナルペプチドと、それに続く、リンカーペプチド（L x、L y、L z）によって接続された2つまたは3つ以上のs c F v とで構成されている。リンカーは、第1のドメインおよび第2のドメインのそれぞれが、相互に独立して、それらの差次的な結合特異性を保持できることを確実にするのに十分な長さおよび配列のものである。二重特異性s c F v は、以下のような様々なフォーマットに配置されたものでありうる。V H アルファ - L x - V L アルファ - L y - V H ベータ - L z - V L ベータ、V L アルファ - L x - V H アルファ - L y - V H ベータ - L z - V L ベータ、V L アルファ - L x - V H アルファ - L y - V L ベータ - L z - V H ベータ、V H アルファ - L x - V L アルファ - L y - V L ベータ - L z - V H ベータ、V H アルファ - L x - V L ベータ - L y - V H ベータ - L z - V L アルファ、V H ベータ - L x - V L アルファ - L y - V H アルファ - L z - V L ベータ、V L アルファ - L x - V H ベータ - L y - V L ベータ - L z - V H アルファ、V L ベータ - L x - V H アルファ - L y - V L アルファ - L z - V H ベータ。

【 0 1 1 2 】

特定の実施形態では、本開示の組成物で利用される「二重特異性一本鎖抗体コンストラクト」は、二重特異性一本鎖F v（s c F v）を含む。二重特異性一本鎖分子の説明に役立つ例は、当業界で公知であり、W O 9 9 / 5 4 4 4 0 ; M a c k、J . I m m u n o l . (1 9 9 7)、1 5 8、3 9 6 5 ~ 3 9 7 0 ; M a c k、P N A S (1 9 9 5)、9 2、7 0 2 1 ~ 7 0 2 5 ; K u f e r、C a n c e r I m m u n o l . I m m u n o t h e r . (1 9 9 7)、4 5、1 9 3 ~ 1 9 7 ; L o f f l e r、B l o o d (2 0 0 0)、9 5、6、2 0 9 8 ~ 2 1 0 3 ; およびB r u h l、J . I m m u n o l . (2 0 0 1)、1 6 6、2 4 2 0 ~ 2 4 2 6 に記載されている。

【 0 1 1 3 】

特定の実施形態では、本開示の分子フォーマットの一例として、抗体由来の領域が1つのV H 領域および1つのV L 領域を含むポリペプチドコンストラクトを提供する。特定の実施形態では、s c F v フォーマットにおける、リンカードメインによって相互に連結されているV H ドメインおよびV L ドメインの分子内の方向性が、記載された二重特異性一本鎖コンストラクトにとって決定的ではない。二重特異性一本鎖コンストラクトの特定の実施形態では、両方の可能な配置（V H ドメイン - リンカードメイン - V L ドメイン、V L ドメイン - リンカードメイン - V H ドメイン）のs c F v が企図されている。

【 0 1 1 4 】

特定の実施形態では、エンゲージャーコンストラクトは、追加ドメインも含むことがで

き、例えば、抗原結合ドメインは、複数の抗原を標的にすることを可能にする複数の抗原認識結合ドメインを含有することができ、活性化ドメインは、細胞を活性化する複数のドメインを含有することができる。

【0115】

いくつかの実施形態において、本開示に従って使用される「一本鎖」という用語は、二重特異性一本鎖コンストラクトの第1および第2のドメインが共有結合によって、好ましくは、1つの核酸分子によってコード可能な共線形性アミノ酸配列の形態で連結されることを意味する。

【0116】

本開示との関係で使用される場合、「と結合/相互作用する」という用語は、少なくとも2つの「抗原相互作用部位」の互いとの結合/相互作用を意味する。「抗原相互作用部位」という用語は、本開示によれば、特定の抗原または抗原の特定の群と特異的相互作用する能力を示すポリペプチドのモチーフを意味する。結合/相互作用は、「特異的な認識」を意味するとも理解されている。「特異的に認識する」という用語は、本開示によれば、抗体分子が、本明細書に定義される標的分子それぞれの少なくとも2個のアミノ酸と特異的に相互作用および/または結合することができることを意味する。この用語は、抗体分子の特異性、すなわち、本明細書に定義されるヒト標的分子の特定の領域を相互に区別する抗体分子の能力に関する。抗原相互作用部位がその特異抗原と特異的に相互作用すると、例えば、抗原のコンフォメーション変化、抗原のオリゴマー形成などの誘導により、シグナルの開始を引き起こすことができる。さらに、結合は、「鍵と鍵穴の原則」の特異性によって例示することができる。したがって、抗原相互作用部位のアミノ酸配列における特定のモチーフと抗原は、それらの一次、二次、または三次構造の結果、そしていくつかの実施形態では、前記構造の二次修飾の結果、互いに結合する。抗原相互作用部位がその特異抗原と特異的に相互作用すると、この部位が抗原と単純に結合する結果となることもある。

【0117】

本開示に従って用いられる「特異的相互作用」という用語は、二重特異性一本鎖コンストラクトが、類似の構造の(ポリ)ペプチドと交差反応しない、または本質的に交差反応しないことを意味する。検査中の二重特異性一本鎖コンストラクトのパネルの交差反応性は、例えば、二重特異性一本鎖コンストラクトのパネルの、対象とする(ポリ)ペプチドおよびいくつかの幾分(構造的および/または機能的に)密接に関係する(ポリ)ペプチドへの結合を通常の条件(例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988、およびUsing Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999を参照)で評価することによって試験することができる。対象とする(ポリ)ペプチド/タンパク質と結合するが、他の(ポリ)ペプチドのいずれとも結合しない、または本質的に結合しない抗体のみが、対象とする(ポリ)ペプチド/タンパク質に特異的であるとされる。抗原相互作用部位の、特異抗原との特異的相互作用の例は、受容体に対するリガンドの特異性を含む。この定義は、特に、リガンドがその特異的な受容体に結合する際の、シグナルを誘導する相互作用を含む。対応するリガンドの例は、その特異的なサイトカイン受容体と相互作用/結合するサイトカインを含む。前記定義に特に含まれる、前記相互作用の別の例は、抗原決定基(エピトープ)の、抗体の抗原結合部位との相互作用である。

【0118】

「と結合/相互作用する」という用語は、ヒト標的分子またはその部分の2つの領域からなるコンフォメーションエピトープ、構造エピトープ、または不連続エピトープに関係することもある。本開示の関係では、コンフォメーションエピトープは、ポリペプチドが天然タンパク質に折り畳まれる際にその分子の表面で一緒になる、一次配列中で分離されている2つ以上の個別のアミノ酸配列によって定義される(Seela(1969)、Sc

10

20

30

40

50

ience 166、1365およびLayer(1990)、Cell 61、553~6)。

【0119】

特定の実施形態では、本開示のコンストラクトが、本明細書中の以下に開示される、本明細書に記載のヒトCD3複合体またはその部分の2つの領域から構成され、かつ/またはこれを含むコンフォメーションまたは構造エピトープと特異的に結合/相互作用すると想定されている。

【0120】

したがって、特異性は、当業界で公知の方法ならびに本明細書に開示および記載されている方法によって、実験的に決定することができる。そのような方法には、ウエスタンブロット、ELISA、RIA、ECL、IRMA、EIA試験およびペプチドスキャンが含まれるが、これらに限定されない。

【0121】

「抗体断片またはその誘導体」という用語は、一本鎖抗体またはその断片、合成抗体、ラクダIgなどの抗体断片、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'2断片、F(ab)'3断片、Fv、一本鎖Fv抗体('scFv)、bis-scFv、(scFv)2、ミニボディ、ダイアボディ、トライアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質('dsFv)、および単ドメイン抗体(sdAb、ナノボディ)など、またはこれらのうちのいずれかの化学的に改変された誘導体に関する。本開示に従って利用される抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖は、当業界で公知の従来の技法を用いて、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換、付加、組み換え、および/または当業界で公知の任意の他の改変(例えば、グリコシル化またはリン酸化などの翻訳後化学修飾)を単独でまたは組み合わせて用いることによって、さらに改変することができる。免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の基礎となっているDNA配列にそのような改変を導入するための方法は、当業者に周知である。例えば、Sambrookら(1989)を参照のこと。

【0122】

「抗体断片またはその誘導体」という用語は、特に、少なくとも1つのCDRを含む(ポリ)ペプチドコンストラクトに関する。

【0123】

記載された抗体分子の断片または誘導体は、上記抗体分子の部分であり、かつ/または化学的/生化学的もしくは分子生物学的方法によって改変されている(ポリ)ペプチドを意味する。対応する方法は、当業界で公知であり、とりわけ実験マニュアル(Sambrookら; Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版1989年および第3版2001年; ASM Press、Gerhardtら、Methods for General and Molecular Bacteriology、1994年; Lefkovits; Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques、Academic Press、1997年; Golemis; Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press、2002年を参照)に記載されている。

【0124】

本明細書に記載の二重特異性一本鎖コンストラクトに含まれる可変ドメインは、追加のリンカー配列によって接続されていてもよい。「ペプチドリンカー」という用語は、本開示に従って、それによって、規定のコンストラクトの第1のドメインのアミノ酸配列と第2のドメインのアミノ酸配列が互いと連結されるアミノ酸配列を意味する。そのようなペプチドリンカーの必須な技術的特徴は、前記ペプチドリンカーがいかなる重合活性も含まないということである。二次構造を促進しないことを含む、ペプチドリンカーの特色は、

10

20

30

40

50

当業界で公知であり、例えば、Dall'Aquilaら(Biochem.(1998) 37、9266~9273)、Cheadleら(Mol Immunol(1992) 29、21~30)、ならびにRaagおよびWhitlow(FASEB(1995) 9(1)、73~80)に記載されている。想定されている5アミノ酸未満を有するペプチドリンカーは、4、3、2、または1つのアミノ酸を含むことができる。「ペプチドリンカー」の関係において特に好ましい「1つ」のアミノ酸はGlyである。したがって、ペプチドリンカーは、1つまたは複数のGly残基からなるものでもよい。さらに、また、いかなる二次構造も促進しないペプチドリンカーが好ましい。ドメイン相互の連結は、例えば、遺伝的な操作によって得ることができる。融合され、かつ動作可能に連結された二重特異性一本鎖コンストラクトを調製し、かつ哺乳動物細胞または細菌でそれらを発現するための方法は、当業界で周知である(例えば、WO99/54440、Ausubel、Current Protocols in Molecular Biology、Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N.Y.1989および1994またはSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、2001)。

10

【0125】

本明細書中上記または下記の二重特異性一本鎖抗体コンストラクトは、ヒト化抗体コンストラクトでも、脱免疫化抗体コンストラクトでもよい。(ポリ)ペプチド、特に、抗体コンストラクトのヒト化および/または脱免疫化のための方法は、当業者に公知である。

20

【0126】

本開示の医薬組成物の一実施形態では、ヒトCD3特異的ドメインのV_H領域およびV_L領域が、X35-3、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、MT301、SMC2、WT31、およびF101.01からなる群から選択されるCD3特異抗体に由来するものである。これらのCD3特異抗体は、当業界で周知であり、とりわけ、Tunncliffe(1989)、Int.Immunol.1、546~550に記載されている。特定の実施形態では、V_HおよびV_L領域は、ヒトCD3イプシロン鎖またはヒトCD3ゼータ鎖を特異的に認識できる抗体/抗体誘導体などに由来するものである。

30

【0127】

II. エンゲージャーをコードするポリヌクレオチド

本開示は、上記に定義した二重特異性一本鎖抗体コンストラクトをコードする核酸配列を含む組成物および当該核酸配列を有する細胞も包含する。核酸分子は、特定の態様では組換え体核酸分子であり、合成でもよい。核酸分子は、DNA、RNA、およびPNA(ペプチド核酸)を含んでもよく、これらのハイブリッドでもよい。

【0128】

本開示の組成物に含まれる核酸分子に、1つまたは複数の調節配列を付加してもよいことは当業者には明らかである。例えば、本開示のポリヌクレオチドの発現誘導を可能にするプロモーター、転写エンハンサー、および/または配列を利用してもよい。適した誘導可能な系は、例えば、GossenおよびBujard(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89(1992)、5547~5551)ならびにGossenら(Trends Biotech.12(1994)、58~62)などに記載されているテトラサイクリンで調節される遺伝子発現またはCrook(1989)、EMBO J. 8、513~519などに記載されているデキサメサゾンで誘導可能な遺伝子発現系である。

40

【0129】

50

さらに、さらなる目的のために、核酸分子は、例えば、チオエステル結合および/またはヌクレオチド類似体を含有してもよいことが想定されている。この改変は、細胞内のエンドおよび/またはエクソヌクレアーゼに対して核酸分子を安定化するのに有用でありうる。核酸分子は、細胞における前記核酸分子の転写を可能にする、キメラ遺伝子を含む適切なベクターによって転写することができる。この点で、そのようなポリヌクレオチドを、「遺伝子ターゲティング」または「遺伝子療法」アプローチに用いることができることも理解されたい。別の実施形態では、核酸分子が標識される。核酸を検出するための方法、例えば、サザンブロッティングおよびノーザンブロッティング、PCR、またはプライマー伸長は、当業界で周知である。この実施形態は、遺伝子療法アプローチ中に、上記の核酸分子の導入が成功したことを確かめるスクリーニング法に有用でありうる。

10

【0130】

核酸分子は、上述の核酸分子のいずれかを単独で、または組合せて含む組換え産生されたキメラ核酸分子でもよい。特定の態様では、核酸分子がベクターの一部である。

【0131】

したがって、本開示は、本開示に記載の核酸分子を含むベクターを含む組成物にも関する。

【0132】

多くの適したベクターが、分子生物学の当業者に公知である。ベクターは、所望の機能に応じて選択され、それには、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、および遺伝的操作に通常用いられる他のベクターが含まれる。当業者に周知の方法を用いて、様々なプラスミドおよびベクターを構築することができる。例えば、Sambrookら(1989)およびAusubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) (1994)に記載の技法を参照のこと。代わりに、本開示のポリヌクレオチドおよびベクターを、細胞を標的にする送達のためのリポソームに再構成することもできる。クローニングベクターは、個々の配列のDNAを単離するのに用いることができる。特定のポリペプチドの発現が必要な場合、適切な配列を発現ベクターに導入することができる。典型的なクローニングベクターには、pBluescript SK、pGEM、pUC9、pBR322、およびpGBT9が含まれる。典型的な発現ベクターには、pTRE、pC

20

30

【0133】

特定の実施形態では、本明細書に定義されている二重特異性一本鎖抗体コンストラクトをコードする核酸配列に動作可能に連結した調節配列である核酸配列を含むベクターがある。そのような調節配列(制御エレメント)は、当業者に公知であり、これには、プロモーター、スプライシングカセット、翻訳開始コドン、ベクターに挿入配列を導入するための翻訳および挿入部位を含めることができる。特定の実施形態では、核酸分子が、真核または原核細胞での発現を可能にする前記発現制御配列に動作可能に連結される。

【0134】

ベクターが、本明細書に定義されている二重特異性一本鎖抗体コンストラクトをコードする核酸分子を含む発現ベクターであることが想定されている。特定の態様では、ベクターが、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターである。レンチウイルスベクターは、例えば、Clontech(Mountain View, CA)またはGeneCopoeia(Rockville, MD)などから購入できる。

40

【0135】

「調節配列」という用語は、それらが連結されているコード配列の発現を実施するのに必要なDNA配列を指す。そのような制御配列の性質は、宿主生物によって異なる。原核生物では、一般に、制御配列に、プロモーター、リポソーム結合部位、およびターミネーターが含まれる。真核生物では、一般に、制御配列に、プロモーターおよびターミネーターならびに、場合によって、エンハンサー、トランス活性化因子、または転写因子が含ま

50

れる。「制御配列」という用語は、最小限でも、その存在が発現に必要なすべての構成要素を含み、さらなる有利な構成要素も含んでよいことが企図されている。

【0136】

「動作可能に連結」という用語は、そのように記載された前記構成要素の関係が、それらに意図されているようにそれらが機能するのを可能にするようになっている並置を指す。コード配列に「動作可能に連結されている」制御配列は、コード配列の発現が、制御配列と適合した条件下で起こるようにライゲートされる。制御配列がプロモーターである場合には、二本鎖核酸の使用が好ましいことが当業者には明らかである。

【0137】

したがって、ある特定の実施形態では、記載されたベクターが発現ベクターである。「発現ベクター」は、選択された宿主を形質転換するのに用いることができ、選択された宿主におけるコード配列の発現を起こすコンストラクトである。発現ベクターは、例えば、クローニングベクター、バイナリーベクターまたは組み込みベクターでありうる。発現は、翻訳可能なmRNAへの核酸分子の転写を含むことが好ましい。原核生物および/または真核細胞内での発現を確実にする調節エレメントは、当業者に周知である。真核細胞の場合、調節エレメントは、通常、転写の開始を確実にするプロモーターを含み、場合によって、転写の終結および転写産物の安定化を確実にするポリAシグナルも含む。原核宿主細胞における発現を可能にするのに用いることができる調節エレメントには、例えば、E. coliのP_L、lac、trp、またはtacプロモーターが含まれ、真核宿主細胞における発現を可能にする調節エレメントの例は、酵母のAOX1もしくはGAL1プロモーター、またはCMV、SV40、RSVプロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、CMVエンハンサー、SV40エンハンサー、または哺乳類もしくは他の動物細胞におけるグロビンイントロンである。

【0138】

転写の開始の原因となるエレメントの他に、そのような調節エレメントは、当該ポリヌクレオチドの下流に、SV40ポリA部位またはtkポリA部位など、転写終結シグナルを含むことができる。さらに、使用される発現系に応じて、ポリペプチドを細胞区画へと方向付けるか、それを培地中に分泌することができるリーダー配列を、記載された核酸配列のコード配列に付加することができ、そのようなリーダー配列は、当業界で周知である。リーダー配列は、翻訳、開始、および終止配列と適切な相で組み立てられ、リーダー配列は、翻訳されたタンパク質またはその部分を、細胞膜周辺腔または細胞外の培地中に分泌するように方向付けることができることが好ましい。場合によって、異種配列は、所望の特色、例えば、発現された組換え産物の安定化または簡便な精製を与えるN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。上記参照。この関係において、Okayama-Berg cDNA発現ベクターpcDV1 (Pharmacia)、pEF-Neo、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen)、pEF-DHFR、およびpEF-ADA (Raumr, Cancer Immunol Immunother (2001), 50(3), 141~150) またはpSPORT1 (GIBCO BRL) などの適した発現ベクターが当業界で公知である。

【0139】

いくつかの実施形態では、発現制御配列は、真核細胞宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトできるベクターにおける真核細胞プロモーター系であるが、原核細胞宿主の制御配列を用いることもできる。ベクターが適切な宿主に組み入れられたら、宿主は、当該ヌクレオチド配列の高レベル発現に適した条件下に維持され、必要に応じてその後本開示のポリペプチドの収集および精製を行うことができる。

【0140】

追加の調節エレメントには、転写および翻訳のエンハンサーを含めることができる。本開示の上記ベクターは、選択可能および/または採点可能なマーカーを含むと有利である。形質転換細胞の選択に有用な選択マーカー遺伝子は、当業者に周知であり、例えば、メ

10

20

30

40

50

トトレキサートに対する耐性を与える *dhfr* (Reiss, Plant Physiol. (Life-Sci. Adv.), 13 (1994), 143~149)、アミノグルコシドネオマイシン、カナマイシン、およびパロマイシンに対する耐性を与える *npt* (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987~995)、およびハイグロマイシンに対する耐性を与える *hygro* (Marsh, Gene 32 (1984), 481~485) の選択に基づく代謝拮抗物質耐性を含む。他の選択可能な遺伝子も記載されている、すなわち、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用できるようにする *trpB*、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用できるようにする *hisD* (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047)、細胞がマンノースを利用できるようにするマンノース6リン酸イソメラーゼ (WO94/20627)、およびオルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤、2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン、DFMO に対する耐性を与える *ODC* (オルニチンデカルボキシラーゼ) (McConlogue, 1987, Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory 編) またはプラスタジジンS に対する耐性を与える *Aspergillus terreus* 由来のデアミナーゼ (Tamura, BioSci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336~2338) である。

【0141】

有用な採点可能マーカーも、当業者に公知であり、市販されている。有利には、前記マーカーが、ルシフェラーゼをコードする遺伝子 (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59~72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121)、緑色蛍光タンパク質 (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44~47)、またはベータ-グルクロニダーゼ (Jefferson, EMBO J. 6 (1987), 3901~3907) である。この実施形態は、特に、記載されたベクターを含有する細胞、組織、および生物の簡便かつ迅速なスクリーニングに有用である。

【0142】

上述の通り、記載された核酸分子を、単独で、またはベクターの一部として、細胞内で使用して、コードされたポリペプチドを細胞内で発現することができる。上記の二重特異性一本鎖抗体コンストラクトのいずれか1つをコードするDNA配列を含有する核酸分子またはベクターが細胞内に導入され、次いで、それが、対象とするポリペプチドを産生する。記載された核酸分子およびベクターは、細胞内への直接導入用、またはリポソームもしくはウイルスベクター (例えば、アデノウイルス、レトロウイルス) 介した導入用に設計することができる。ある特定の実施形態では、当該細胞が、例えば、T細胞、CAR T細胞、NK細胞、NKT細胞、MSC、神経幹細胞、または造血幹細胞である。

【0143】

上記に従って、本開示は、本明細書に定義されている二重特異性一本鎖抗体コンストラクトのポリペプチド配列をコードする核酸分子を含む、遺伝的操作に通常に使用されるベクター、とりわけプラスミド、コスミド、ウイルス、およびバクテリオファージを得る方法に関する。前記ベクターは、発現ベクターおよび/または遺伝子移入もしくは標的化ベクターであることが好ましい。記載されたポリヌクレオチドまたはベクターを標的細胞集団に送達するために、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシパピローマウイルスなどのウイルスに由来する発現ベクターを使用することができる。当業者に周知の方法を用いて、組換えベクターを構築することができる。例えば、Sambrookら (上記引用文)、Ausubel (1989, 上記引用文) または他の標準的な教本に記載の技法を参照のこと。代わりに、記載された核酸分子およびベクターを、細胞を標的にする送達のためにリポソームに再構成することもできる。本開示の核酸分子を含有するベクターは、周知の方法によって宿主細胞内に導入することができる。そのような方法は、細胞宿主のタイプに応じて異なる。例えば、原核細

胞には、塩化カルシウムトランスフェクションが一般的に利用され、一方、他の細胞宿主には、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが用いることができる。上記の Sambrook を参照。

【0144】

III. ベクターの概説

本開示のエンゲージャー分子は、発現ベクターから発現させることができる。そのような発現ベクターを生成する組換え技法は、当業界で周知である。

【0145】

「ベクター」という用語は、細胞に導入するために核酸配列をその中に挿入でき、細胞内で複製可能である担体核酸分子を指すのに用いられる。核酸配列は、「外因性」であってもよく、これは、その配列が、ベクターがその中に導入される細胞にとって外来のものであること、またはその配列が細胞内の配列に相同であるが、宿主細胞核酸中において、その配列が通常は存在しない位置にあることを意味する。ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス）、および人工染色体（例えば、YAC）が含まれる。当業者ならば、標準的な組換え技法でベクターを構築するのに十分な装備を備えている（例えば、Maniatisら、1988、および Ausubelら、1994を参照。両文献を参照により本明細書に組み込む）。

【0146】

「発現ベクター」という用語は、転写可能なRNAをコードする核酸を含む、任意のタイプの遺伝子コンストラクトを指す。場合によっては、その後、RNA分子がタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。その他の場合、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの生成においては、これらの配列は翻訳されない。発現ベクターは、様々な「制御配列」を含有することができる。「制御配列」は、特定の宿主細胞における、動作可能に連結されたコード配列の転写、場合によって翻訳に必要な核酸配列を指す。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能を果たす、下に記載される核酸配列を含有することもできる。

【0147】

A. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、転写の開始および速度がそこで制御される核酸配列領域である制御配列である。「プロモーター」は、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子など、調節タンパク質および調節分子が、核酸配列の特異的な転写を開始するために結合しうる遺伝的要素を含有しうる。「動作可能に配置された」、「動作可能に連結された」、「制御下」、および「転写制御下」という句は、プロモーターが、核酸配列との関係において、その配列の転写開始および/または発現を制御するのに正しい機能的な位置および/または方向で存在することを意味する。

【0148】

プロモーターは、一般に、RNA合成の開始部位の位置を決めるのに機能する配列を含む。この最もよく知られている例がTATAボックスであるが、例えば、哺乳動物の末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターおよびSV40後期遺伝子のプロモーターなど、プロモーターの中にはTATAボックスをもたないものもあり、開始部位自体を覆う異なるエレメントが、開始箇所を定めるのを助ける。さらに別のプロモーターエレメントが、転写開始の頻度を調節する。典型的な場合、これらは開始部位の30~110bp上流の領域に位置している。ただし、開始部位の下流に機能エレメントを含有していることが示されているプロモーターもいくつもある。コード配列をプロモーターの「制御下」に置くには、転写リーディングフレームの転写開始部位の5'末端を、選択されたプロモーターの「下流」（すなわち、3'側）に配置する。「上流」のプロモーターが、DNAの転写を刺激し、コードされたRNAの発現を促進する。

【0149】

プロモーターエレメント間の間隔は、しばしば柔軟であり、そのため、エレメントが反転するか、お互いと比較して動いた場合でも、プロモーター機能が保存される。tkプロ

10

20

30

40

50

モーターでは、活性を低下させずに、プロモーターエレメント間の間隔を50bpまで広げることができる。プロモーターに応じて、個々のエレメントは、転写を活性化するために協力して機能することも、独立して機能することもできるようである。プロモーターは、「エンハンサー」と共に用いても、そうでなくともよい。「エンハンサー」は、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用の調節配列を指す。

【0150】

プロモーターは、コーディングセグメントおよび/またはエキソンの上流に位置する5プライム非コード配列を単離することによって得ることのできる、核酸配列に天然に随伴しているものでもよい。そのようなプロモーターを「内因性」と呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、核酸配列に天然に随伴し、その配列の下流または上流のいずれかに位置するものでもよい。代わりに、コーディング核酸セグメントを、組換え体または異種のプロモーターの制御下に置くことによって、ある種の利点が得られるであろう。組換え体または異種のプロモーターとは、その天然の環境にある核酸配列には通常は随伴していないプロモーターを指す。組換え体または異種のエンハンサーも、その天然の環境にある核酸配列には通常は随伴していないエンハンサーを指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および任意の他のウイルスまたは原核もしくは真核細胞から単離されるプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在」しない、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメントおよび/または発現を改変する変異を含有するプロモーターまたはエンハンサーが含まれる。例えば、組換えDNAの構築で最も一般的に用いられるプロモーターには、ベータラクタマゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトース、およびトリプトファン（trp）プロモーター系が含まれる。プロモーターおよびエンハンサー核酸配列の合成による生成に加えて、本明細書に開示されている組成物に関して、PCR（商標）を含めた組換えクローニングおよび/または核酸増幅技術を用いて、配列を生成することができる（それぞれが参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,683,202号および第5,928,906号を参照）。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などの非核オルガネラ内の配列の転写および/または発現を指示する制御配列も利用することが企図されている。

【0151】

当然ながら、発現用に選択されたオルガネラ、細胞型、組織、器官、または生物内でDNAセグメントの発現を効率的に指示するプロモーターおよび/またはエンハンサーを利用することが重要となる。分子生物学の当業者ならば、タンパク質発現用のプロモーター、エンハンサー、および細胞型の組合せの使用について一般的に知っている（例えば、参照により本明細書に組み込まれるSambrookら、1989参照）。利用するプロモーターは、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指示するのに適切な条件下で構成的なもの、組織特異的なもの、誘導可能なもの、ならびに/または、組換えタンパク質および/もしくはペプチドの大規模生成に有利なものなど、有用なものでありうる。プロモーターは、異種のもので、内因性のものでよい。

【0152】

さらに、発現を駆動させるために、あらゆるプロモーター/エンハンサーの組合せを使用することもできる。T3、T7、またはSP6の細胞質発現系の使用も、別の可能な実施形態である。真核細胞は、送達複合体の一部として、または追加の遺伝子発現コンストラクトとして適切な細菌ポリメラーゼが与えられれば、ある種の細菌プロモーターからの細胞質転写をサポートすることができる。

【0153】

組織特異的なプロモーターまたはエレメントの素性およびそれらの活性を特徴付けるアッセイは、当業者に周知である。

【0154】

特定の実施形態では、分泌可能なエンゲージャー分子ポリペプチドの発現が調整される。特定の実施形態では、1つまたは複数の調節配列が、エンゲージャーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を空間的および/または時間的に指示するが、発現は様

10

20

30

40

50

々な方法で調整することができる。場合によっては、発現は、エンゲージャーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増強するように調整され、それに対応して、免疫細胞内またはそれから分泌されるエンゲージャーポリペプチドのレベルが増大する。場合によっては、発現は、エンゲージャー分子をコードするポリヌクレオチドの発現を低減するように調整され、それに対応して、免疫細胞内またはそれから分泌されるエンゲージャーポリペプチドのレベルが低減する。発現の低減が望まれうる状況には、例えば正常組織において、エンゲージャーが望ましくないまたはもはや望ましくない状況が含まれる。発現の調整は、それを調節する特定の調節配列または因子が存在しないときの発現のレベルと比較することができる。

【0155】

ある特定の実施形態では、エンゲージャーポリペプチドの発現が、対応する調節配列が1つまたは複数の因子に曝露された際に調整される。特定の実施形態では、腫瘍関連因子に曝露された際に、発現が調整される。腫瘍関連因子の説明に役立つ例としては、低酸素組織に存在する因子が挙げられる。いくつかの実施形態では、当該因子が、サイトカインおよび/またはケモカインである。例えば、低酸素は、HIF-1アルファの発現を誘導する。HIF-1アルファは、低酸素応答エレメント(HRE)の制御下にあるエンゲージャー発現を誘導することができるであろう転写因子である。低酸素は、酸素依存性分解ドメイン(ODD)を含有するエンゲージャー分子を安定化させることもできるであろう。腫瘍細胞によって生成され、エンゲージャー遺伝子発現を調節することができるであろう物質の別の例は、乳酸である。コード配列の効率的な翻訳には、特異的な開始シグナルも必要でありうる。これらのシグナルには、ATG開始コドンまたは隣接の配列が含まれる。ATG開始コドンを含めた、外因性の翻訳制御シグナルの提供が必要でありうる。当業者ならば、この決定および必要なシグナルの提供を容易に行うことができるだろう。

【0156】

ある特定の実施形態では、内部リボソーム進入部位(IRES)エレメントを用いて、多重遺伝子または多シストロン性メッセージが生成され、これらを、実施形態で用いることができる。

【0157】

ある特定の実施形態では2A配列を用いて、多重遺伝子メッセージが生成され、これらを実施形態で用いることができる。

【0158】

ベクターは、多重クローニング部位(MCS)を含むことができる。MCSは、複数の制限酵素部位を含有する核酸領域である。これらの制限酵素部位はいずれも、ベクターを消化する標準的な組換え技術と共に用いることができる。「制限酵素消化」は、核酸分子内の特定の位置のみで機能する酵素を用いて核酸分子を触媒により切断することを指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。そのような酵素の使用は、当業者によって広く理解されている。しばしば、ベクターは、外因性の配列をベクターにライゲートすることが可能となるように、MCS内で切断する制限酵素を用いて線形化または断片化される。「ライゲーション」は、相互に連続していても、いなくてもよい2つの核酸断片間でリン酸ジエステル結合を形成するプロセスを指す。制限酵素およびライゲーション反応を用いる技法は、組換え技術の当業者に周知である。

【0159】

スプライシング部位、終結シグナル、複製起点、および選択マーカースも利用することができる。

【0160】

B. プラスミドベクター

ある特定の実施形態では、プラスミドベクターが、宿主細胞を形質転換するための使用に企図されている。一般に、宿主細胞と適合性の種に由来するレプリコンおよび制御配列を含有するプラスミドベクターがこれらの宿主と共に使用される。通常、ベクターは、複製部位と、形質転換細胞における表現型選択を提供できるマーキング配列とを有する。非

10

20

30

40

50

限定的な例では、*E. coli* は、しばしば、*E. coli* 種由来のプラスミドである pBR322 の誘導体を用いて形質転換される。pBR322 は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含っており、したがって、形質転換細胞を同定するための簡単な手段を提供する。pBR プラスミドまたは他の微生物プラスミドもしくはファージは、例えば、微生物がそれ自体のタンパク質の発現に用いることができるプロモーターも含有しているか、含有するように改変されていなければならない。

【0161】

加えて、宿主微生物と適合性であるレプリコンおよび制御配列を含有するファージベクターを、これらの宿主と共に形質転換ベクターとして用いることができる。例えば、組換えファージベクターを作製する際に、例えば、*E. coli* LE392 などの宿主細胞を形質転換するのに使用できるラムダファージ GEMTM11 を利用することができる。

10

【0162】

さらなる有用なプラスミドベクターには、pINベクター (Inouye ら、1985) および pGEXベクターが含まれる。pGEXベクターは、後の精製および分離または切断のために、グルタチオン S 転スフェラーゼ (GST) 可溶性融合タンパク質を生成するのに使用される。他の適した融合タンパク質は、ベータガラクトシダーゼやユビキチンなどとの融合タンパク質である。

【0163】

発現ベクターを含む細菌宿主細胞、例えば、*E. coli* は、いくつかの適した培地のいずれか、例えば、LB 中で培養される。当業者には理解されるように、ある種のベクターにおける組換えタンパク質の発現は、宿主細胞を、ある種のプロモーターに特異的な薬剤と接触させることによって、例えば、IPTG を培地に添加するか、インキュベーション温度をより高温に切り換えることによって、誘導することができる。細菌をさらなる期間、通常は 2 ~ 24 時間培養した後、遠心分離によって細胞を収集し、洗浄して、残りの培地を除去する。

20

【0164】

C. ウイルスベクター

ある種のウイルスは、細胞を感染させるか、受容体媒介のエンドサイトーシスを介して細胞に進入し、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定的かつ効率的に発現する能力を有するので、そのようなウイルスは、外来の核酸を細胞 (例えば、哺乳動物細胞) 内に導入する魅力的な候補となっている。本開示の構成要素は、開示の 1 つまたは複数の CAR をコードするウイルスベクターでありうる。本開示の核酸を送達するのに使用できるウイルスベクターの非限定な例を以下に記載する。

30

【0165】

i. アデノウイルスベクター

核酸の送達のための特定の方法は、アデノウイルス発現ベクターを使用するものである。アデノウイルスベクターは、ゲノム DNA に組み込まれる能力が低いことが知られているが、この特徴は、これらのベクターによってもたらされる遺伝子移入の効率が高いことで相殺される。「アデノウイルス発現ベクター」には、(a) コンストラクトのパッケージングをサポートし、(b) 最終的に、その中にクローニングされた組織または細胞特異的なコンストラクトを発現するのに十分なアデノウイルス配列を含有するコンストラクトが含まれると企図されている。アデノウイルス (36 kb の直鎖状二本鎖 DNA ウイルス) の遺伝学的構成に関する知識により、アデノウイルス DNA の大きな領域を 7 kb までの外来配列で置換することが可能である (Grunhaus および Horwitz、1992)。

40

【0166】

ii. AAV ベクター

核酸は、アデノウイルス支援のトランスフェクションを用いて細胞内に導入できる。アデノウイルスを組み合わせた系を用いた細胞系でトランスフェクション効率の増大が報告されている (Kelleher および Vos、1994; Cotten ら、1992; C

50

urriel、1994)。アデノ随伴ウイルス(AAV)は、組み込まれる頻度が高く、かつ非分裂性の細胞を感染させることができ、それにより遺伝子を哺乳動物細胞に、例えば組織培養中(Muzyczka、1992)または*in vivo*で、送達するのに有用となっているので、本開示の細胞で使用するのに魅力的なベクター系である。AAVは、感染の宿主域が広い(Tratschinら、1984; Laughlinら、1986; Lebkowskiら、1988; McLaughlinら、1988)。rAAVベクターの生成および使用に関する詳細は、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,139,941号および第4,797,368号に記載されている。

【0167】

iii. レトロウイルスベクター

10

レトロウイルスは、それらの遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、多量の外来遺伝物質を輸送し、広い範囲の種および細胞型を感染させ、特別な細胞株でパッケージングされる能力を有するため、送達ベクターとして有用である(Miller、1992。)

【0168】

例示のレトロウイルスベクターは、5'から3'方向に、CD3特異的なscFvに連結されたEphA2特異的なscFv(4H5)と、それに続く、配列内リボソーム進入部位(IRES)によって分離されたmOrange(mO)とを含む(図4)。

【0169】

レトロウイルスベクターを構築するために、複製欠損であるウイルスを生成する特定のウイルス配列の箇所に核酸(例えば、所望の配列をコードするもの)をウイルスゲノムに挿入する。ピリオンを生成するために、gag、pol、およびenv遺伝子を含むLTRおよびパッケージング構成要素が無いパッケージング細胞株を構築する(Mannら、1983)。レトロウイルスLTRおよびパッケージング配列と共に、cDNAを含有する組換えプラスミドが、特別な細胞株に導入される(例えば、リン酸カルシウム沈殿によって)と、パッケージング配列によって、組換えプラスミドのRNA転写産物をウイルス粒子にパッケージングすることが可能になり、その後、ウイルス粒子が培養培地中に分泌される(NicolasおよびRubenstein、1988; Temin、1986; Mannら、1983)。次いで、組換え体レトロウイルスを含有する培地を収集し、場合によっては濃縮し、遺伝子移入に用いる。レトロウイルスベクターは、多様な細胞型を感染させることができる。しかし、組み込みおよび安定した発現には、宿主細胞の分裂が必要である(Paskindら、1975)。

20

30

【0170】

レンチウイルスは、複雑なレトロウイルスであり、共通のレトロウイルス遺伝子であるgag、pol、およびenvに加えて、調節または構造的な機能を有する他の遺伝子も含有している。レンチウイルスベクターは、当業界で周知である(例えば、Naldiniら、1996; Zuffereyら、1997; Blomerら、1997年; 米国特許第6,013,516号および第5,994,136号を参照)。レンチウイルスのいくつかの例としては、ヒト免疫不全ウイルス:HIV-1、HIV-2、およびサル免疫不全ウイルス:SIVが挙げられる。レンチウイルスベクターは、HIV病原性遺伝子を多重弱毒化することによって生成された。例えば、遺伝子env、vif、vpr、vpu、およびnefが欠失しており、それにより、ベクターが生物学的に安全になっている。

40

【0171】

組換え体レンチウイルスベクターは、非分裂性細胞を感染させることができ、*in vivo*および*ex vivo*の遺伝子移入ならびに核酸配列の発現の両方に用いることができる。例えば、適した宿主細胞が、パッケージング機能、すなわち、gag、pol、env、rev、およびtatを有する2つ以上のベクターでトランスフェクトされる、非分裂性細胞を感染させることができる組換え体レンチウイルスが、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,994,136号に記載されている。エンペロープタンパク質を、特定の細胞型の受容体へとターゲティングする抗体または特定のリガンドと連結

50

することによって、組換え体ウイルスをターゲティングすることができる。対象とする配列（調節領域を含む）を、特定の標的細胞上にある受容体のリガンドをコードする別の遺伝子と共にウイルスベクターに挿入することによって、例えば、ベクターが標的的特異的となる。

【0172】

特定の実施形態では、レトロウイルスが、最終的には細胞株から生成された組換え体レトロウイルスによって感染させ、形質転換することができる宿主細胞の範囲を決定するエンベロープ（env）タンパク質を含む。本発明で利用することができるレトロウイルス由来のenv遺伝子の説明に役立つ例としては、VSV-G、MLVエンベロープ、10A1エンベロープ、BAEV、FeLV-B、RD114、SSAV、エボラ、センダイ、FPV（家禽ペストウイルス）、gp41、およびgp120ならびにインフルエンザウイルスエンベロープが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0173】

一実施形態では、本発明は、VSV-G糖タンパク質でシュードタイプ化したレトロウイルスを提供する。

【0174】

2. 他のウイルスベクター

他のウイルスベクターも、本開示におけるワクチンコンストラクトとして利用できる。ワクシニアウイルス（Ridgeway、1988；BaichwalおよびSugden、1986；Couparら、1988）、シンドビスウイルス、サイトメガロウイルス、および単純ヘルペスウイルスなどのウイルス由来のベクターを利用することができる。これらは、様々な哺乳動物細胞用に魅力的な特徴をいくつかもっている（Friedmann、1989；Ridgeway、1988；BaichwalおよびSugden、1986；Couparら、1988；Horwichら、1990）。

20

【0175】

D. 改変ウイルスを用いる送達

送達する核酸を、特異的な結合リガンドを発現するように遺伝子操作された感染性のウイルス中に収容することができる。したがって、ウイルス粒子は、標的細胞の同族受容体に特異的に結合し、内容物を細胞に送達することになる。ウイルスエンベロープにラクトース残基を化学的に付加することによるレトロウイルスの化学修飾に基づいて、レトロウイルスベクターの特異的なターゲティングを可能にするように設計された新規なアプローチが開発された。この修飾は、シアロ糖タンパク質受容体を介した肝細胞の特異的な感染を可能にすることができる。

30

【0176】

レトロウイルスエンベロープタンパク質および特定の細胞受容体に対するビオチン化抗体が用いられる、組換え体レトロウイルスをターゲティングする別のアプローチが設計された。抗体は、ストレプトアビジンを用いることにより、ビオチン構成要素を介して結合させた（Rouxら、1989）。Rouxらは、主要組織適合複合体クラスIおよびクラスII抗原に対する抗体を用いて、それらの表面抗原を有する様々なヒト細胞の、エコトロピックウイルスによる感染をin vitroで実証した（Rouxら、1989）。

40

【0177】

E. ベクター送達と細胞形質転換

細胞をトランスフェクトまたは形質転換するための核酸送達のための適した方法は、当業者に公知である。そのような方法には、DNAのex vivoでのトランスフェクションや注入などによる直接的送達が含まれるが、これらに限定されない。当業界で公知の技法の適用によって、細胞を安定的にまたは一過性に形質転換することができる。

【0178】

F. Ex vivo形質転換

ex vivoセッティングで生物から取り出された真核細胞および組織にトランスフ

50

エクトするための方法は、当業者に公知である。したがって、T細胞または組織を取り出し、本開示の核酸を用いて *ex vivo* でトランスフェクトできることが企図されている。特定の態様では、移植細胞または組織が生物内に入れられる。好ましい様相では、核酸が移植細胞内で発現される。

【0179】

IV. エンゲージャーを含む宿主細胞

本開示の医薬組成物が、本明細書中上記に定義されたベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を含むことがさらに想定されている。宿主細胞は、上記のベクターの少なくとも1つまたは上記の核酸分子の少なくとも1つを宿主細胞内に導入することによって生成できる。少なくとも1つのベクターまたは少なくとも1つの核酸分子が宿主内に存在することが、上記の特異的な一本鎖抗体コンストラクトをコードする遺伝子の発現を媒介しうる。

【0180】

宿主細胞内に導入された、記載された核酸分子またはベクターは、宿主のゲノムに組み込まれても、染色体外に維持されてもよい。

【0181】

宿主細胞は、いかなる原核細胞でも真核細胞でもよいが、特定の実施形態では、真核細胞である。特定の実施形態では、宿主細胞が、細菌細胞、昆虫細胞、真菌細胞、植物細胞、または動物細胞である。記載された宿主が哺乳動物細胞、より好ましくはヒト細胞またはヒト細胞株でもよいことが特に想定されている。特に好ましい宿主細胞は、免疫細胞、CHO細胞、COS細胞、SP2/0またはNS/0のようなミエローマ細胞株を含む。

【0182】

本開示の医薬組成物は、細胞増殖または細胞刺激に有用な活性化シグナルを免疫エフェクター細胞に伝えることのできるタンパク質化合物も含むことができる。特定の実施形態では、タンパク質化合物は、上記に定義されている二重特異性一本鎖抗体コンストラクトの追加ドメインではなく、本開示の医薬組成物の少なくとも1つの追加構成要素であると理解される。

【0183】

本開示に鑑みて、「活性化シグナルを免疫エフェクター細胞に伝えるタンパク質化合物」は、例えば、T細胞のさらなる活性化シグナル（例えば、さらなる共刺激分子：B7-ファミリーの分子、OX40L、4-1BBL）、またはさらなるサイトカイン：インターロイキン（例えば、IL-2、IL-7、またはIL-15）またはNKG-2Dエンゲージング化合物である。タンパク質化合物の好ましいフォーマットは、さらなる二重特異性抗体およびその断片または誘導体、例えば二重特異性s.c.F.vを含む。タンパク質化合物は、T細胞受容体に特異的なs.c.F.v断片またはスーパー抗原を含むことができるが、これらに限定されない。スーパー抗原は、MHCに依存せずに、ある特定のサブファミリーのT細胞受容体可変領域に直接的に結合し、それによって、T細胞の一次活性化シグナルを媒介する。タンパク質化合物は、T細胞ではない免疫エフェクター細胞にも活性化シグナルを伝えることができる。T細胞ではない免疫エフェクター細胞の例としては、とりわけ、NK細胞、またはNKT細胞が挙げられる。

【0184】

一実施形態は、本開示の組成物を生成するプロセスであって、本明細書中上記に定義された宿主細胞を、コンストラクトの発現を可能にする条件下で培養するステップと、生成された二重特異性一本鎖抗体コンストラクトを培養から回収するステップとを含むプロセスに関する。しかし、特定の実施形態では、当該細胞または複数の細胞を個体に提供する。

【0185】

エンゲージャー分子の発現を可能にする、発現コンストラクトを有する細胞を培養するための条件も、所望によりコンストラクトを精製/回収するための手順も当業界で公知である。

【0186】

一実施形態では、宿主細胞が、遺伝子操作されたTCR受容体またはCARを含むT細胞である。天然存在のT細胞受容体は、2つのサブユニット、アルファサブユニットおよびベータサブユニットを含み、両サブユニットは、それぞれが、各T細胞ゲノムで組換えイベントによって生成される特有のタンパク質である。TCRのライブラリーを、特定の標的抗原に対するそれらの選択性についてスクリーニングすることができる。「遺伝子操作されたTCR」は、選択され、クローニングされ、かつ/またはその後養子免疫療法に用いられるT細胞集団に導入される、標的抗原に対して高いアビディティおよび反応性を有する天然のTCRを指す。遺伝子操作されたTCRとは対照的に、CARは、MHCに依存せずに標的抗原に結合するように遺伝子操作されている。特定の実施形態では、CARは、限定されるものではないが、抗体またはその抗原結合断片、膜貫通ドメイン、1つまたは複数の細胞内共刺激性シグナル伝達ドメイン、および一次シグナル伝達ドメインを含めた細胞外結合ドメインを含む。

10

【0187】

様々な実施形態において、T細胞は、このT細胞によって発現されるCARまたは遺伝子操作されたTCRと同じ標的抗原を認識するエンゲージャー分子をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、CARまたは遺伝子操作されたTCRを発現するT細胞は、CARまたは遺伝子操作されたTCRによって認識される標的抗原とは異なるが、同じ標的細胞上に発現される標的抗原を認識するエンゲージャー分子をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。

20

【0188】

V. 医薬組成物

本開示によると、「医薬組成物」という用語は、個体に投与するための組成物に関する。好ましい実施形態では、医薬組成物は、非経口、経皮、腔内、関節内、くも膜下腔内、もしくは静脈内投与またはがんへの直接注入用の組成物を含む。前記医薬組成物は、注入または注射で個体に投与されることが特に想定されている。適した組成物の投与は、様々な方法によって、例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、局所、または皮内投与によって行うことができる。

【0189】

本開示の医薬組成物は、薬学的に許容できる担体をさらに含むことができる。適した薬学的担体の例は、当業界で周知であり、これには、リン酸緩衝食塩水溶液、水、油/水型乳剤などの乳剤、様々なタイプの湿潤剤、無菌溶液などが含まれる。そのような担体を含む組成物は、周知の従来の方法によって製剤化することができる。これらの医薬組成物は、適した用量で対象に投与することができる。

30

【0190】

投与レジメンは、主治医および臨床的因子によって決定されることになる。医学分野で周知の通り、任意の一患者の投薬量は、多くの因子に依存し、これには、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間および経路、一般健康状態、ならびに同時に投与される他の薬物が含まれる。投与のための好ましい投薬量は、1日当たり、体重1キログラム当たり、 $0.24\mu\text{g}$ から 48mg 、好ましくは $0.24\mu\text{g}$ から 24mg 、より好ましくは $0.24\mu\text{g}$ から 2.4mg 、さらに好ましくは $0.24\mu\text{g}$ から 1.2mg 、最も好ましくは $0.24\mu\text{g}$ から 240mg 単位の範囲でありうる。特に好ましい投薬量は、本明細書中下記に示されている。進行は、定期評価でモニターすることができる。投薬量は変動することになるが、DNAの静脈内投与に好ましい投薬量は、DNA分子約 $10^6 \sim 10^{12}$ コピーである。

40

【0191】

本開示の組成物は、局部に投与しても、全身投与してもよい。投与は、一般に非経口、例えば、静脈内となる。DNAは、標的部位に直接的に、例えば、内部もしくは外部の標的部位への微粒子銃送達または動脈内の部位へのカテーテルによって、投与してもよい。好ましい実施形態では、医薬組成物は、皮下に、さらに好ましい実施形態では、静脈内に

50

投与される。非経口投与用の製剤には、無菌水溶液、非水性溶液、懸濁液、および乳剤が含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、食塩水および緩衝化培地を含めた、水、アルコール／水性溶液、乳剤、または懸濁液が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウム乳酸リンゲル液、または不揮発性油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流体、栄養補充剤、電解質補充剤（リンゲルブドウ糖ベースのものなど）などが含まれる。例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、不活性ガスなど、保存剤および他の添加剤も含まれる。加えて、本開示の医薬組成物は、好ましくはヒト由来の、例えば、血清アルブミンまたは免疫グロブリンなど、タンパク質担体を含んでもよい。本開示の医薬組成物は、タンパク質二重特異性一本鎖抗体コンストラクト、これをコードする核酸分子またはベクター（本開示に記載のもの）に加えて、医薬組成物の意図された使用に応じて、さらなる生物学的に活性な薬剤を含みうることが想定されている。

10

【0192】

本明細書に記載の組成物は、いずれもキットに含めることができる。非限定的な例において、組換え発現ベクターを保持する、細胞療法で使用するための１種または複数の細胞および／または細胞療法で使用するための１種または複数の細胞を生成するための試薬をキットに含めることができる。キットの構成要素は、適した容器手段で提供される。

【0193】

キットのいくつかの構成要素は、水性媒体に入れるか、凍結乾燥形態でパッケージングすることができる。キットの容器手段には、通常、少なくとも１つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または他の容器手段が含まれることになり、その中に、構成要素を入れる、好ましくは、適切にアリコートに分けることができる。キット内に複数の構成要素がある場合、キットは、通常、第２、第３、または他の追加の容器を含有することになり、その中に追加の構成要素を個別に入れることができる。しかし、構成要素の様々な組合せを１つのバイアルに含めることもできる。キットは、典型的には、販売用に構成要素をしっかりと封じ込めるための手段も含むことになる。そのような容器には、その中に所望のバイアルが保持される射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器が含まれることになる。

20

【0194】

キットの構成要素を１種および／または２種以上の液体溶液中で提供する場合、液体溶液は水溶液であり、無菌水溶液が特に有用である。場合によっては、容器手段が、それ自体、シリンジ、ピペット、および／または装置などの他のものであってもよく、そこから、製剤を身体の感染領域に適用すること、動物に注射すること、ならびに／またはキットの他の構成要素にさえ適用し、かつ／もしくはこれと混合することができる。

30

【0195】

しかし、キットの構成要素は、乾燥粉末として提供することができる。試薬および／または構成要素を乾燥粉末として提供する場合、この粉末を、適した溶媒の添加によって再構成することができる。溶媒を別の容器手段に入れて提供できることが企図されている。キットは、無菌の薬学的に許容できるバッファーおよび／または他の希釈剤を含有するための第２の容器手段を含むことができる。

40

【0196】

特定の実施形態では、細胞療法に用いられる細胞をキットに入れて提供し、場合によっては、細胞がキットの本質的に唯一の構成要素となる。キットは、所望の細胞を作るための試薬および材料を含むことができる。特定の実施形態では、試薬および材料には、所望の配列を増幅するためのプライマー、ヌクレオチド、適したバッファー、バッファー試薬、塩などが含まれ、場合によっては、試薬には、本明細書に記載のエンゲージャー分子をコードするベクターおよび／もしくはDNAならびに／またはそのための調節エレメントが含まれる。

【0197】

50

特定の実施形態では、キット内に、個体から1つまたは複数の試料を抽出するのに適した1つまたは複数の装置がある。この装置は、シリンジ、メスなどであってもよい。

【0198】

場合によっては、キットが、細胞療法実施形態に加えて、例えば、化学療法、ホルモン療法、および/または免疫療法など、第2のがん療法も含む。キットは、個体用に特定のがんに適合させ、個体用のそれぞれの第2のがん療法を含むようにできる。

【0199】

VI. エンゲージャーおよびエンゲージャーを含む宿主T細胞の治療的使用

様々な実施形態において、本明細書に企図されている二重特異性一本鎖抗体コンストラクト、核酸配列、ベクター、宿主細胞、および/またはこれを含む医薬組成物は、腫瘍性疾患など、がん疾患の予防、処置、または改善に用いられる。特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、例えば固形腫瘍を有するがんを含めた、がんを予防、改善、および/または処置するのに特に有用でありうる。

10

【0200】

本明細書で使用される場合、「処置」または「処置すること」は、疾患または病的状態の症状または病態への有益または望ましいいかなる作用も含み、処置されている疾患または状態（例えば、がん）の1種または複数の測定可能マーカーにおける最小限の低減さえ含む。処置は、場合によって、疾患もしくは状態の症状の軽減もしくは改善または疾患もしくは状態の進行の遅延を伴うことがある。「処置」は、必ずしも、疾患もしくは状態またはそれに伴う症状の完全な根絶または治癒を示すわけではない。

20

【0201】

本明細書で使用される場合、「予防する」および「予防される」、「予防すること」などの類似の語は、疾患または状態、例えば、がんの発生または再発を予防する、阻害する、またはその可能性を低減するためのアプローチを示す。この語は、疾患もしくは状態の発症もしくは再発を遅らせること、または疾患もしくは状態の症状の発症もしくは再発を遅らせることも指す。本明細書で使用される場合、「予防」および類似の語は、疾患または状態の発症または再発の前に、疾患または状態の強度、影響、症状、および/または負荷を軽減させることも含む。

【0202】

特定の実施形態では、本発明は、標準的なベクターおよび/または遺伝子送達系を用いて、単独で、または任意の組合せで、かつ少なくともいくつかの態様では、薬学的に許容できる担体または賦形剤と共に、投与することができる細胞、二重特異性一本鎖抗体コンストラクト、核酸分子、およびベクターを部分的に企図している。ある特定の実施形態では、投与に続いて、前記核酸分子またはベクターを、対象のゲノムに安定的に組み込むことができる。

30

【0203】

特定の実施形態では、ある種の細胞または組織に特異的なウイルスベクターを用いることができ、このベクターが前記細胞内で持続する。適した薬学的に担体および賦形剤は、当業界で周知である。本開示に従って調製された組成物を、上記同定された疾患の予防もしくは処置またはこれを遅らせるのに用いることができる。

40

【0204】

さらに、本開示は、腫瘍性疾患の予防、処置、または改善のための方法であって、本明細書に企図されており、かつ/または本明細書に企図されているプロセスによって生成されたエンゲージャー分子、核酸配列、ベクターを有する細胞の有効量を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0205】

例示のEphA2エンゲージャー細胞の組成物の投与に関して考えられる適応症は、乳腺、前立腺、肺、および結腸がん、または乳がん、結腸がん、前立腺がん、頭頸部がん、皮膚がんなどの上皮がん/癌、尿生殖器がん、例えば、卵巣がん、子宮体がん、子宮がん、および腎がん、肺がん、胃がん、小腸のがん、肝がん、膵がん、胆嚢がん、胆管のがん

50

、食道がん、唾液腺のがん、ならびに甲状腺のがんを含めた、腫瘍性疾患を含めたがん疾患である。特定の態様では、がんが、例えば、E p h A 2 陽性である。C D 1 9 エンゲージャー細胞の組成物の投与に関する例示的な適応症は、C D 1 9 を発現するいかなる悪性腫瘍も含めたがん疾患である。これらには、一般的に、B 細胞系列に由来するすべての血液悪性腫瘍が含まれる。加えて、異常に C D 1 9 を発現する悪性腫瘍も含まれる。本開示の組成物の投与は、例えば、微小残存病変、初期がん、進行がん、および / または転移がんおよび / または不応性がんを含めたすべてのステージおよびタイプのがんに有用である。

【 0 2 0 6 】

本開示は、他の化合物、例えば、二重特異性抗体コンストラクト、標的に向けられる毒素、または免疫細胞を介して作用する他の化合物との共投与プロトコールをさらに包含する。本発明の化合物の共投与のための臨床レジメンは、他方の構成要素を投与すると同時に、その前に、またはその後に行う共投与を包含しうる。特定の組合せ療法には、化学療法、放射線照射、外科手術、ホルモン療法、または他のタイプの免疫療法が含まれる。

【 0 2 0 7 】

実施形態は、上記に定義されている二重特異性一本鎖抗体コンストラクト、上記に定義されている核酸配列、上記に定義されているベクター、および / または上記に定義されている宿主を含むキットに関する。本開示のキットは、本明細書中上記に記載されている医薬組成物を単独で、または医療処置もしくは介入を必要とする個体に投与されるさらなる医薬と組み合わせて含むことも企図されている。

【 0 2 0 8 】

V I I . 併用療法

ある特定の実施形態では、臨床態様のための本開示の方法が、抗がん剤など、過増殖疾患の処置に有効な他の薬剤と併用される。例えば、「抗がん」剤は、がん細胞を殺滅する、がん細胞のアポトーシスを誘導する、がん細胞の成長速度を低減させる、転移の発生率または数を低減させる、腫瘍の大きさを低減させる、腫瘍成長を抑制する、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給を低減させる、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答を促進する、がんの進行を防止もしくは抑制する、またはがんを有する対象の寿命を延長することによって、対象体内のがんに負の影響を与えることができる。より一般的には、これらの他の組成物は、細胞を殺滅するか、その増殖を抑制するのに有効な総量で提供することになる。このプロセスは、がん細胞を、発現コンストラクトおよび薬剤または複数の因子と同時に接触させることを含みうる。これは、細胞を、両方の薬剤を含む 1 つの組成物または薬理学的製剤と接触させることによって、または細胞を、一方の組成物が発現コンストラクトを含み、他方が第 2 の薬剤を含む 2 つの異なる組成物もしくは製剤と同時に接触させることによって達成できる。

【 0 2 0 9 】

例えば、化学療法および放射線療法薬剤に対する腫瘍細胞の耐性は、臨床腫瘍学における重大な問題となっている。現在のがん研究の 1 つの目標は、化学療法および放射線療法の有効性を、それを他の療法と併用することによって改善する方法を見出すことである。本開示の関係では、T 細胞療法が、化学療法、放射線療法、または免疫療法介入およびアポトーシス促進性または細胞周期調節性薬剤と共に同様に使用できることが企図されている。

【 0 2 1 0 】

代わりに、本発明の療法は、他方の薬剤処置と数分間から何週間かの間隔を置いて、その前にまたはその後に行うことができる。他方の薬剤と本開示が個体に別々に適用される実施形態では、一般に、各送達時の間で有意な期間が期限切れにならないことを確実にして、それにより、薬剤療法および本発明の療法が細胞に対してなお有利な併用効果を及ぼすことができるようにすることになる。そのような場合、細胞を、両方の様式と、相互に約 1 2 ~ 2 4 時間の内、より好ましくは、相互に約 6 ~ 1 2 時間の内に接触させることができることが企図されている。しかし、状況によっては、処置の期間をかなり延長し、そ

れぞれの投与の間で数日（２、３、４、５、６、または７）から数週間（１、２、３、４、５、６、７、または８）が経過することが望ましい可能性がある。

【０２１１】

次のような様々な組合せを利用することができる。ここで、本開示は「Ａ」であり、例えば、放射線療法または化学療法など、第２の薬剤は「Ｂ」である。

【０２１２】

A / B / A B / A / B B / B / A A / A / B A / B / B
B B / A / A A / B / B / B B / A / B / B

【０２１３】

B / B / B / A B / B / A / B A / A / B / B
A / B / A / B A / B / B / A B / B / A / A

10

【０２１４】

B / A / B / A B / A / A / B A / A / A / B
B / A / A / A A / B / A / A A / A / B / A

【０２１５】

必要に応じて処置サイクルを反復することが予期されている。様々な標準的療法および外科的介入を本発明の細胞療法と組み合わせて適用することも企図されている。

【０２１６】

A．化学療法

がん療法には、化学的処置および放射線照射ベースの処置の両方ならびに／または非免疫ベースの標的化療法との様々な併用療法も含まれる。併用化学療法には、アルキル化剤、代謝拮抗薬、植物アルカロイド、抗生物質、ホルモン剤、およびその他の抗がん剤を含めた全クラスの化学療法剤が含まれる。特定の薬剤には、例えば、アブラキサン、アルトレタミン、ドセタキセル、ハーセプチン、メトトレキサート、ノバントロン、ゾラデックス、シスプラチン（ＣＤＤＰ）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロランブシル、ブスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、プレオマイシン、プリカマイシン、マイトマイシン、エトポシド（ＶＰ１６）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合物質、タキソール、ゲムシタビン、フルダラビン、ナベルピン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチナ、５－フルオロウラシル、ピンクリスチン、およびビンブラスチン、または以上の任意の類似体もしくは派生変異体、ならびにこれらの組合せが含まれる。

20

30

【０２１７】

特定の実施形態では、個体のための化学療法が、本開示と共に、例えば、実施形態の投与の前、間、および／または後に利用される。

【０２１８】

B．放射線療法

ＤＮＡ損傷を引き起こし、かつ広く利用されている他の因子には、ガンマ線、Ｘ線および／または腫瘍細胞への放射性同位元素の指向的送達として一般に知られているものが含まれる。マイクロ波およびＵＶ照射などの他の形態のＤＮＡ損傷因子も企図されている。これらの因子すべてが、ＤＮＡ、ＤＮＡの前駆体、ＤＮＡの複製および修復、ならびに染色体の集合および維持に広範な損傷をもたらす可能性がきわめて高い。Ｘ線の線量範囲は、長期間（３～４週間）にわたる場合の５０～２００レントゲンの１日線量から、２００～６０００レントゲンの単回線量までである。放射性同位元素の投与量範囲は、広範に様々であってもよく、同位元素の半減期、照射される放射線の強度およびタイプ、ならびに新生細胞による取り込みによって左右される。

40

【０２１９】

細胞に用いられる場合、「接触」および「曝露」という用語は、本明細書では、治療用コンストラクトおよび化学療法剤または放射線療法剤を標的細胞に送達するか、標的細胞の直近に置くプロセスを述べるのに使用される。細胞の殺滅または分裂停止を行うため、

50

細胞を殺滅するか、細胞が分裂するのを妨げるのに有効な総量で両薬剤を細胞に送達する。

【0220】

C．免疫ベースではない標的化療法

がん療法には、免疫ベースではない標的化療法との様々な併用療法も含まれる。これらには、例えば、WNT、p53、および/または、RBSIGNAL伝達経路などのシグナル伝達経路を抑制する薬剤が含まれる。他の例としては、チロシンキナーゼ、BRAF、STAT3、もしくはc-metを抑制する薬剤、遺伝子発現を調節する薬剤、細胞死を誘導する薬剤、または血管形成を遮断する薬剤が含まれる。特定の薬剤の例としては、メシル酸イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、ボスチニブ、ラパチニブ、ゲフィニチブ、エルロチニブ、テムシロリムス、エベロリムス、ベムラフェニブ、クリゾチニブ、ポリノスタット、ロミデプシン、ベキサロテン、アリトリオニン、トレチノイン、ボルテゾミブ、カーフィルゾミブ、プララトレキサート、ソラフェニブ、スニチニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブ、またはカボザンチニブが挙げられる。

10

【0221】

D．免疫療法

免疫療法薬は、一般に、免疫エフェクター細胞および分子の使用に依存して、がん細胞を標的にし、破壊する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面のなんらかのマーカーに特異的な抗体でありうる。抗体だけで、治療のエフェクターとして働いても、T細胞殺滅を実際に行うのに他の細胞を動員してもよい。抗体は、薬物または毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）とコンジュゲートさせてもよく、ターゲティング剤として働く。代わりに、エフェクターは、直接的または間接的に腫瘍細胞標的と相互作用する表面分子を有するリンパ球でもよい。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が含まれる。

20

【0222】

したがって、本明細書に記載の本発明の療法ではない免疫療法を、本開示のT細胞療法との併用療法の一部として用いることもあり得る。併用療法の一般的なアプローチについて以下に論じる。一般に、腫瘍細胞には、標的にすることができる、すなわち、大部分の他の細胞には存在しないなんらかのマーカーがあるはずである。多くの腫瘍マーカーが存在しており、これらのいずれも、本開示の関係において、ターゲティングに適したものでありうる。一般的な腫瘍マーカーには、癌胎児性抗原、前立腺特異抗原、尿中腫瘍関連抗原、胎児性抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMGF、シリアルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、erbB、およびp155などが含まれる。

30

【0223】

E．遺伝子

さらに別の実施形態では、第2の処置が、治療用ポリヌクレオチドが本開示の臨床実施形態の前もしくは後、またはそれと同時に投与される遺伝子療法である。細胞増殖の誘導因子、細胞増殖の抑制因子、またはプログラム細胞死の調節因子を含めた様々な発現産物が、本開示に包含される。

40

【0224】

F．外科手術

がんを有するヒトの60%が、予防、診断、病期分類、根治、および緩和のための手術を含めたなんらかのタイプの手術を行うことになる。根治手術は、本開示の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、および/または代替療法など、他の療法とともに施用されうるがん治療である。

【0225】

根治手術には、がん組織の全体または一部を物理的に摘出、切除、および/または破壊する切除術が含まれる。腫瘍切除術は、少なくとも腫瘍の一部の物理的な摘出を指す。腫瘍切除術に加えて、外科手術による処置には、レーザー外科療法、低温外科手術、電気外

50

科手術、および顕微鏡下手術（モース手術）が含まれる。本開示は、表在がん、前がん病変、または付帯的な量の正常組織の摘出とともに使用できることがさらに企図されている。

【0226】

がん細胞、組織、または腫瘍の全部または一部の切除に際し、体内に空洞が形成される。さらなる抗がん療法の灌流、直接注射、または当該領域への局所適用によって、処置を達成させてもよい。そのような処置は、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日毎に、または1週、2週、3週、4週、および5週毎に、または1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、もしくは12カ月毎に、反復することができる。これらの処置は、投薬量が可変的な

10

【0227】

G. 他の薬剤

処置の治療有効性を向上させるために、本開示と組み合わせて、他の薬剤を用いてもよいことが企図されている。これらの追加薬剤には、免疫調節剤、細胞表面受容体およびギャップ結合の上方制御に作用する薬剤、細胞分裂停止および分化薬剤、細胞接着の阻害剤、またはアポトーシス誘導因子に対する過増殖細胞の感受性を増強する薬剤が含まれる。免疫調節剤には、腫瘍壊死因子；インターフェロナルファ、ベータ、およびガンマ；IL-2および他のサイトカイン；F42Kおよび他のサイトカイン類似体；MIP-1、MIP-1ベータ、MCP-1、RANTES、および他のケモカインが含まれる。Fa
s/Fasリガンド、DR4もしくはDR5/TRAILなど、細胞表面受容体またはそのリガンドの上方制御は、過増殖細胞に対するオートクリンまたはパラクリン作用を確立することによって、本開示のアポトーシス誘導能を強化するであろうことがさらに企図されている。ギャップ結合の数を増加させることにより細胞間シグナル伝達が増強されると、近傍の過増殖細胞集団に対する抗過増殖作用を増強するであろう。他の実施形態では、処置の抗過増殖有効性を向上させるために、本開示と組み合わせて、細胞分裂停止または分化薬剤を用いることができる。細胞接着の阻害剤は、本開示の有効性を向上させることが企図されている。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ（FAK）阻害剤およびロバスタチンである。処置の有効性を向上させるために、抗体c225など、アポトーシスに対する過増殖細胞の感受性を増強する他の薬剤を、本開示と組み合わせて使用できるであ

20

30

【実施例】

【0228】

本開示の好ましい実施形態をより完全に説明するために、下記の実施例を示す。しかしこれらは、いかなる意味においても本開示の広い範囲を限定するものと解釈されないものとする。

【0229】

VIII. 実施例1：エンゲージャー細胞の生成

本発明者らは、細胞（例えば、限定されるものではないが、T細胞、NK、またはNKT細胞）をエンゲージャーと名付けられた分泌可能な分子で遺伝的に改変することによって、新規のクラスの細胞を開発した。エンゲージャーは、抗原認識ドメインおよび活性化ドメインを含む。抗原認識ドメインおよび活性化ドメインは、1種または複数の分子と結合でき、例えば、1) scFv、2) ペプチド、および/または、3) 天然リガンドを含む。抗原認識ドメインは、標的細胞内および/または標的細胞上に存在するか、または標的細胞によって分泌される分子と結合する。活性化ドメインは、細胞の細胞表面に発現された分子または細胞によって分泌された分子を認識する。活性化ドメインの例としては、CD3、CD16、CD28、CD40、CD134、またはCD137と結合するドメインが挙げられる。エンゲージャー細胞の作用様式の例が、図1および3にまとめられている。

40

【0230】

50

例として、E p h A 2、C D 1 9、C D 1 2 3、L e Y、B 7 H 3、H E R 2、または E G F R に特異的な抗原認識ドメインと、C D 3 または C D 1 6 に特異的な活性化ドメインを含むエンゲージャーを、レトロウイルスベクターを用いて分泌する例示の T 細胞を本明細書に示す (E p h A 2 T 細胞エンゲージャー (図 6)、C D 1 9 T 細胞エンゲージャー (図 7)、C D 1 2 3 T 細胞エンゲージャー (図 8)、L e Y T 細胞エンゲージャー (図 9)、B 7 H 3 T 細胞エンゲージャー (図 10)、H E R 2 T 細胞エンゲージャー (図 11)、または E G F R T 細胞エンゲージャー (図 12)、および E p h A 2 N K 細胞エンゲージャー (図 13))。

【0231】

I X . 実施例 2 : エンゲージャー T 細胞は抗原依存的に標的細胞を認識する

10

特定の実施形態では、本発明者らは、2つの s c F V を含む分泌可能な二重特異性 T 細胞エンゲージャーの、T 細胞における発現を利用する、抗原に特異的な T 細胞を与えるための代替戦略を提供する。一方の s c F V は、C D 3 に特異的であり、他方の s c F V は、選択された抗原に特異的である。本発明者らは、1) C D 3 および腫瘍抗原 E p h A 2 を認識する二重特異性 T 細胞エンゲージャー、2) C D 3 および腫瘍抗原 C D 1 9 を認識する二重特異性 T 細胞エンゲージャー、3) C D 3 および腫瘍抗原 C D 1 2 3 を認識する二重特異性 T 細胞エンゲージャー、4) C D 3 および腫瘍抗原 L e Y を認識する二重特異性 T 細胞エンゲージャー、5) C D 3 および腫瘍抗原 B 7 H 3 を認識する二重特異性 T 細胞エンゲージャー、6) C D 3 および腫瘍抗原 H E R 2 を認識する二重特異性 T 細胞エンゲージャー、ならびに 7) C D 3 および腫瘍抗原 E G F R を認識する二重特異性 T 細胞エンゲージャーを構築した。エンゲージャー T 細胞は、例示の方法である、T 細胞のウイルス形質導入によって生成した。エンゲージャー分子は容易に検出することができないので、E p h A 2 特異的エンゲージャー分子は、6 x H i s - m y c タグを付けて生成した (E p h A 2 - H M E N G ; 図 5 A)。標準的な E p h A 2 - E N G および E p h A 2 - H M E N G を発現する T 細胞は、E p h A 2 陽性標的細胞を殺滅した。これは、E p h A 2 - H M E N G が機能することを実証している (図 5 B)。m y c 抗体および 6 x H i s 抗体を用いて、E p h A 2 - H M E N G 分子が、T 細胞の細胞表面に結合すること (図 5 C) および培地中に分泌される (図 5 D) ことを実証した。この実施形態の一部は、第 3 のドメインをエンゲージャー分子に付加して、その機能を強化することができることである。ここで、「認識タグ」が付加されている。これは、エンゲージャー分子をさら

20

30

【0232】

E p h A 2 - E N G T 細胞は、E p h A 2 陽性腫瘍細胞を認識する。C D 3 / E p h A 2 T 細胞エンゲージャーを発現する T 細胞 (E p h A 2 - E N G - T 細胞) は、E p h A 2 陽性がん細胞認識する (図 6 A)。E p h A 2 - E N G - T 細胞を、E p h A 2 陽性 (U 3 7 3、A 5 4 9) および E p h A 2 陰性 (K 5 6 2) の腫瘍細胞と共培養した。24 時間後に、分析のため、培地を収集した。炎症誘発性サイトカイン I F N ガンマの産生によって判断すると、E p h A 2 - E N G - T 細胞は、K 5 6 2 とは対照的に、U 3 7 3 および A 5 4 9 を認識した。E p h A 2 を発現するように遺伝的に改変された K 5 6 2 細胞は、I F N ガンマ産生を誘導した。これは、I F N ガンマの産生を誘導するには、E p h A 2 が標的細胞によって発現されていなければならないことを強調する。形質導入されていない (N T) T 細胞およびこれらの腫瘍細胞上に発現されない抗原 (C D 1 9) を認識するエンゲージャーを分泌する T 細胞は、I F N ガンマを産生しない。N T T 細胞および C D 1 9 特異的な T 細胞とは対照的に、E p h A 2 - E N G - T 細胞は、E p h A 2 陽性腫瘍細胞の存在下でも増殖した。4 種の例示のドナーの結果を示す (図 6 B)。

40

【0233】

C D 1 9 - E N G - T 細胞は、C D 1 9 陽性腫瘍細胞を殺滅する (図 7)。C D 1 9 エンゲージャー T 細胞を、レトロウイルス形質導入によって生成された。F A C S 分析で判断すると、約 50 % の T 細胞が形質導入された (図 7 A、B)。クロム放出アッセイ (図 7 C) ならびに I F N - ガンマおよび I L - 2 の分泌 (図 7 D) によって判断すると、C

50

D 1 9 陰性 K 5 6 2 細胞とは対照的に、C D 1 9 - E N G T 細胞は、C D 1 9 陽性標的細胞を認識した。いずれの標的も、形質導入されていない (N T) T 細胞または無関係な抗原に特異的なエンゲージャーを分泌する T 細胞 (E p h A 2 - E N G T 細胞) によって認識されなかった。

【 0 2 3 4 】

C D 1 2 3 - E N G T 細胞は C D 1 2 3 陽性腫瘍細胞を殺滅する (図 8)。それぞれ C D 1 2 3 分子上の異なるエピトープに結合する C D 1 2 3 特異 M A b 2 6 2 9 2 (2 9 2) および 3 2 7 1 6 (7 1 6) に由来する C D 1 2 3 特異的なエンゲージャー分子をコードする 2 つのレトロウイルスベクターが生成された (図 8 A)。C D 1 2 3 (2 9 2) および C D 1 2 3 (7 1 6) 特異的な T 細胞を、レトロウイルス形質導入によって生成した。F A C S 分析で判断すると、8 0 % 超の T 細胞が遺伝的に改変された (図 8 A)。I F N ガンマ分泌によって判断すると、共培養アッセイにおいて、C D 1 2 3 (2 9 2) および C D 1 2 3 (7 1 6) に特異的な E N G T 細胞は、C D 1 2 3 陽性標的細胞、K G 1 a および C D 1 2 3 を発現するように遺伝的に改変された J u r k a t T 細胞 (J u r k a t - C D 1 2 3) を認識した (図 8 B、C)。対照的に、C D 1 2 3 陰性の親 J u r k a t T 細胞は、I F N ガンマ分泌を誘導せず、無関係の抗原 (C D 1 9) に特異的な E N G T 細胞は、試験されたどの標的細胞にも、反応してサイトカインを放出することがなかった (図 8 C)。C D 1 9 特異的な E N G T 細胞とは対照的に、C D 1 2 3 (2 9 2) および C D 1 2 3 (7 1 6) に特異的な E N G T 細胞は、標準的な細胞傷害性アッセイにおいて、K G 1 a 細胞を殺滅した。これは、抗原の特異性を確認するものである (図 8 D)。

【 0 2 3 5 】

L e Y - E N G T 細胞は L e Y 陽性腫瘍細胞を殺滅する (図 9)。L e Y - E N G T 細胞が L e Y 陽性標的細胞を殺滅することを実証するために、本発明者らは、エフェクターとしての L e Y - E N G T 細胞および C D 1 9 - E N G T 細胞と、K 5 6 2 (C D 1 9 -、L e Y -) および K G 1 a (C D 1 9 -、L e Y +) 標的細胞とを用いて、標準的な細胞傷害性アッセイを行った。L e Y 陽性標的細胞のみが、L e Y - E N G T 細胞によって殺滅された。対照的に、C D 1 9 - E N G T 細胞は、いかなる細胞溶解活性も有しなかった。

【 0 2 3 6 】

B 7 H 3 - E N G T 細胞は B 7 H 3 陽性腫瘍細胞を認識して、殺滅する (図 1 0)。B 7 H 3 - E N G T 細胞が B 7 H 3 陽性腫瘍細胞を特異的に認識するかどうか決定するために、本発明者らは、B 7 H 3 - E N G T 細胞の、B 7 H 3 陽性 (U 3 7 3、L M 7、C H L A 2 5 5) および B 7 H 3 陰性 (H T B 1 1 9) の腫瘍細胞との共培養アッセイを行った。試験されたすべての腫瘍細胞が C D 1 9 を発現しなかったため、C D 1 9 - E N G T 細胞を対照として用いた。B 7 H 3 陽性標的 T 細胞のみが、B 7 H 3 - E N G T 細胞の I F N ガンマ産生を誘導した (図 1 0 A)。これは、B 7 H 3 - E N G T 細胞の抗原特異的な活性化を実証している。B 7 H 3 - E N G T 細胞の細胞溶解活性を決定するために、U 3 7 3、L M 7、C H L A 2 5 5 を、B 7 H 3 - E N G T 細胞または C D 1 9 - E N G T 細胞と共にインキュベートした。クリスタルバイオレット染色によって判断すると、B 7 H 3 - E N G T 細胞は、すべての腫瘍細胞を殺滅したが、C D 1 9 - E N G T 細胞の存在下では殺滅が観察されなかった (図 1 0 B)。

【 0 2 3 7 】

H E R 2 - E N G T 細胞は H E R 2 陽性腫瘍細胞を認識する。 (図 1 1)。H E R 2 - E N G T 細胞が、抗原依存的に H E R 2 陽性標的細胞を認識することを実証するために、本発明者らは、H E R 2 - E N G T 細胞または形質導入されていない (N T) T 細胞を、H E R 2 陽性 (U 3 7 3) および H E R 2 陰性 (M D A) の腫瘍細胞と共培養した。2 4 時間後に I F N ガンマを測定した。U 3 7 3 は I F N ガンマ産生を誘導したが、M D A はしなかった。これは、H E R 2 陽性腫瘍細胞の抗原特異的な認識を実証する。N T T 細胞の存在下では、いずれの標的によっても、I F N ガンマ産生が観察されなかった

。

【0238】

806-ENG T細胞はEGFR陽性腫瘍細胞を認識する(図12)。EGFRが遺伝子増幅されているか、EGFRvIIIを発現する細胞におけるコンフォメーションEGFREpitope806を、806-ENG T細胞が認識することを実証するために、本発明者らは、U373(EGFR低レベル陽性)、A431(増幅されたEGFR遺伝子)、K562(EGFR陰性)、およびEGFRvIIIを発現するように遺伝的に改変されたK562(K562-EGFRvIII)との共培養アッセイを行った。A431およびK562-EGFRvIIIの存在下で、有意なIFNガンマ産生が観察された。対照的に、いずれの標的(すべてCD19陰性)も、CD19-ENG T細胞のIFNガンマ産生を誘導しなかった。

10

【0239】

EphA2特異的NK細胞エンゲージャーを分泌するT細胞は抗原特異的にNK細胞を活性化する(図13)。EphA2特異的scFvに連結されたCD16特異的なscFvからなるNK細胞エンゲージャーをコードするレトロウイルスベクターでT細胞に形質導入した(図13A。)形質導入されたT細胞(CD16.EphA2-ENG T細胞)を、自系NK細胞の非存在下または存在下で、IL13Rアルファ2またはEphA2コーティングされたプレート上でインキュベートした。24時間後にIFNガンマ産生を測定した。CD16.EphA2-ENG T細胞/NK細胞共培養は、EphA2の存在下では、高レベルのIFNガンマを産生したが、IL13Rアルファ2の存在下では産生しなかった。加えて、CD16.EphA2-ENG T細胞またはNK細胞は、単独ではIFNガンマを産生しなかった。これは、CD16.EphA2-ENG T細胞がNK細胞を特異的にEphA2にリダイレクトすることができることを示している(図13B)。

20

【0240】

X. 実施例3:エンゲージャーT細胞はバースタンダーT細胞を標的細胞にリダイレクトする-in vitro研究

EphA2-ENG-T細胞の上清は、形質導入されていないT細胞を、腫瘍細胞を認識するように「武装させる」(図14A)。EphA2-ENG-T細胞から培地を収集し、形質導入されていないT細胞および腫瘍細胞と混ぜた。形質導入されていないT細胞は、U373曝露後にIFNガンマを産生した。これはT細胞活性化を示す。対照的に、形質導入されていないT細胞から採取された培地と混ぜた場合、形質導入されていないT細胞はIFNガンマを産生しなかった。したがって、EphA2-ENG-T細胞は、T細胞エンゲージャーを分泌して、バースタンダーT細胞を「武装させる」。4種の例示のドナーの結果を示す。

30

【0241】

EphA2-ENG-T細胞は、形質導入されていないT細胞を、腫瘍細胞を認識するように「武装させる」(図14B、C)。EphA2-ENG-T細胞を、共培養アッセイのトランスウェル内にプレーティングし、腫瘍細胞および形質導入されていないT細胞をボトム(プレートウェル)内にプレーティングした。クリスタルバイオレット染色によって、生存腫瘍細胞を測定した。腫瘍細胞の殺滅は、形質導入されていないT細胞の存在に依存した。これは、EphA2-ENG T細胞が能動的にエンゲージャーを分泌することを実証している。CD19-ENG T細胞は、抗腫瘍作用を有しなかった。これは、再度、アプローチの特異性を強調する。EphA2-ENG T細胞とEphA2-CAR T細胞の直接比較(図14D)。エンゲージャーと同じEphA2特異的scFvを含有する第2世代のCARを発現するT細胞(EphA2-CAR T細胞)の活性を比較した。T細胞に含まれる形質導入EphA2-ENG T細胞またはEphA2-CAR T細胞の百分率を増大させながら、U373細胞を 1×10^5 個のT細胞と共にインキュベートした。48時間後に生存腫瘍細胞をMTSアッセイによって測定した。99%超の腫瘍細胞殺滅を達成するのに、EphA2エンゲージャーを発現するT細胞が約1

40

50

0%あればよいのみだった。同じ抗腫瘍活性は、約75%のT細胞がEphA2-CARを発現したときにのみ観察された($p < 0.00001$)。

【0242】

CD19-ENG-T細胞は、形質導入されていないT細胞を、腫瘍細胞を認識するように「武装させる」(図15)。EphA2-ENG-T細胞を、共培養アッセイのトランスウェル内にプレーティングし、ルシフェラーゼを発現するBV173腫瘍細胞および形質導入されていないT細胞をボトム(プレートウェル)にプレーティングした。ルシフェラーゼアッセイによって生存腫瘍細胞を測定した。腫瘍細胞の殺滅は、形質導入されていないT細胞の存在に依存した。これは、CD19-ENG-T細胞が能動的にエンゲージャーを分泌することを実証している。EphA2-ENG-T細胞は、抗腫瘍作用を有しなかった。これは、再度、アプローチの特異性を強調する。

10

【0243】

EphA2-ENG-T細胞は、活性化されると、より多くのエンゲージャーを分泌する(図16)。EphA2-ENG-T細胞を、EphA2タンパク質または対照(HER2)タンパク質で活性化した。活性化されたEphA2-ENG-T細胞は、IFNガンマ(図16A)およびより多くのエンゲージャー分子(図16B)を分泌した。活性化されたエンゲージャーT細胞および活性化されていないエンゲージャーT細胞の抗腫瘍活性を、ルシフェラーゼを発現するEphA2陽性U373細胞とのトランスウェル共培養アッセイで評価した。EphA2で活性化されたEphA2-ENG-T細胞は、対照より約10倍強力なEphA2-ENG-T細胞であった。これは、T細胞活性化によって、より多くのエンゲージャーが分泌されることを実証する(図16C)。活性化されたEphA2-ENG-T細胞の、EphA2陰性腫瘍細胞(BV173)に対する殺滅には、増大が観察されなかった。これは、特異性を確認する(図16D)。

20

【0244】

XI. 実施例4: エンゲージャーT細胞はバースタンダーT細胞を標的細胞にリダイレクトする-in vivo研究

EphA2エンゲージャーは、形質導入T細胞およびバースタンダーT細胞の拡張をin vivoで誘導する(図17)。EphA2-ENG-T細胞がin vivoで拡張することを実証するために、ヒトA549肺がんSCID異種移植モデルを用いた。担がんマウス($n = 5$)または対照($n = 5$)マウスに、 5×10^6 個のeGFP-ffLucを発現するEphA2-ENG-T細胞と 5×10^6 個の無改変T細胞の混合物を静脈内(i.v.)注射し、1用量のIL2を腹腔内(i.p.)投与した。EphA2-ENG-T細胞は、担がんマウス体内で拡張したが、腫瘍の非存在下では拡張が観察されなかった(図17B)。EphA2-ENG-T細胞がバースタンダーT細胞の拡張をin vivoで誘導することを実証するために、担がんマウスに、 5×10^6 個のEphA2-ENG-T細胞と 5×10^6 個のeGFP-ffLucを発現するT細胞($n = 5$)または 5×10^6 個のCD19-ENG-T細胞と 5×10^6 個のeGFP-ffLucを発現するT細胞($n = 5$)の混合物をi.v.注射した。生物発光イメージングによって判断すると、EphA2-ENG-T細胞と同時注射された場合のみ、eGFP-ffLucを発現するT細胞が拡張した(図17B)。これらの結果は、EphA2エンゲージャーが、形質導入T細胞およびバースタンダーT細胞の拡張をin vivoで抗原依存的に誘導したことを示す。

30

40

【0245】

XII. 実施例5: エンゲージャーT細胞はin vivoで強力な抗腫瘍活性を有する。

エンゲージャーT細胞のin vivo抗腫瘍活性を4種の動物モデルで評価した。実験のあらましが図18にまとめられている。

【0246】

EphA2-ENG-T細胞は、神経膠腫モデルにおける強力な抗腫瘍活性を有する(図19A、C)。ヒト神経膠腫モデルおよび肺がんSCID異種移植モデルにおけるEph

50

A 2 - E N G T細胞の抗腫瘍活性を評価した。 1×10^5 個の U 3 7 3 . e G F P . f f L u c 細胞を頭蓋内注射した7日後に、 2×10^6 個の E p h A 2 - E N G T細胞 ($n = 8$) または C D 1 9 - E N G T細胞 ($n = 5$) を、マウスの腫瘍部位に定位的に注射した。未処置の動物を対照 ($n = 5$) として用いた。連続生物発光イメージングを用いて、腫瘍成長を追跡した (図 1 9 A、B)。E p h A 2 - E N G T細胞で処置されたマウスは、腫瘍シグナルが2ログ以上低減していた。この結果、8匹中5匹のマウスが長期無再発生存を得た ($p < 0.0005$) (図 1 9 C)。

【 0 2 4 7 】

E p h A 2 - E N G T細胞は、全身性肺がんモデルにおける強力な抗腫瘍活性を有する (図 1 9 D、F)。A 5 4 9 . e G F P . f f L u c 転移肺がんモデルにおける E p h A 2 - E N G T細胞の抗腫瘍有効性を評価した。0日目に 2.5×10^6 個の A 5 4 9 . e G F P . f f L u c 細胞を i . v . 注射し、7、14、21日目にマウスに 1×10^7 個の E p h A 2 - E N G T細胞 ($n = 5$) または C D 1 9 - E N G T細胞 ($n = 4$) を i . v . 投与し、1用量の I L 2 を i . p . 投与した。未処置の動物を対照 ($n = 5$) として用いた。E p h A 2 - E N G T細胞で処置されたマウスのみが、最初のT細胞投与の5日後という早期に腫瘍シグナルを有意に低減させ ($p < 0.005$) (図 1 9 D、E)、C D 1 9 - エンゲージャーT細胞で処置されたマウスおよび未処置マウスと比較して、生存に有利となった ($p < 0.005$) (図 1 9 F)。

【 0 2 4 8 】

C D 1 9 - E N G T細胞は強力な抗腫瘍白血病モデルを有する (図 2 0 A、B)。B V 1 7 3 . f f L u c N S G 白血病モデルにおける C D 1 9 - E N G T細胞の抗腫瘍活性を決定した。0日目に B V 1 7 3 . f f L u c 細胞を i . v . 注射し、7、14、21日目に、マウスに 1×10^7 個の C D 1 9 - E N G T細胞 ($n = 5$) または C D 1 9 - E N G T細胞 ($n = 5$) の i . v . 投与および I L 2 の i . p . 投与を行った。未処置の動物を対照 ($n = 5$) として用いた。C D 1 9 - E N G T細胞で処置されたマウスのみが、腫瘍シグナルを有意に低減した ($p < 0.005$)。E p h A 2 - E N G T細胞を投与されたマウスとは対照的に、C D 1 9 - E N G T細胞で処置されたすべてのマウスが疾患から回復した。

【 0 2 4 9 】

C D 1 9 - E N G T細胞は、強力な抗腫瘍リンパ腫モデルを有する (図 2 1 A、B)。0日目に D a u d i . f f L u c 細胞を i . v . 注射し、3、6、9日目にマウスに 1×10^7 個の C D 1 9 - E N G T細胞 ($n = 5$) または形質導入されていない (N T) T細胞 ($n = 5$) を i . v . 投与した。N T - T細胞で処置されたマウスでは、腫瘍が指数関数的に成長したが、C D 1 9 - E N G T細胞で処置されたマウスでは、成長が観察されなかった。

【 0 2 5 0 】

X I I I . 実施例 6 : T細胞の細胞表面上の共刺激分子または I L 1 5 を発現することによって、エンゲージャーT細胞の機能を強化することができる。

共刺激分子を共発現する C D 1 9 - E N G T細胞の生成 (図 2 2)。共刺激は、T細胞表面上に共刺激分子を発現することによって提供することができる。T細胞が活性化されたら、それら是对応するリガンドを発現し、持続的なT細胞活性化がもたらされる。I R E S によって分離された 4 1 B B L および C D 8 0 をコードするレトロウイルスベクター (図 2 2 A) を生成した。エンゲージャー分子すなわち C D 8 0 と 4 1 B B L とをコードするレトロウイルスベクターでT細胞に「二重」形質導入すると、エンゲージャー分子をコードするレトロウイルスで形質導入されただけのT細胞とは対照的に、T細胞の細胞表面上に C D 8 0 および 4 1 B B L が発現される結果となる (図 2 2 B)。共刺激分子を発現しない標的細胞の存在下では、定常的な I L 2 産生があった (図 2 2 B)。これは、T細胞に追加の遺伝的改変を導入して、その機能を強化することが可能であることを強調する。

【 0 2 5 1 】

E p h A 2 - E N G および I L 1 5 を発現する T 細胞の生成 (図 2 3 および 2 4) 。 エンゲージャー分子または I L 1 5 をコードするレトロウイルスベクターで T 細胞に「二重」形質導入することによって、E p h A 2 - E N G / I L 1 5 T 細胞を生成した。E p h A 2 陽性腫瘍細胞による刺激後、E p h A 2 - E N G / I L 1 5 T 細胞は、I F N ガンマ、I L 2 、および I L 1 5 を産生した (図 2 3) 。E p h A 2 - E N G を発現するのみの T 細胞と比較して、E p h A 2 - E N G / I L 1 5 T 細胞刺激の増殖が増強された (図 2 4) 。これは、共刺激分子をコードする遺伝子以外に、追加の遺伝子を T 細胞に導入して、その機能を強化することが可能であることを強調する。

【 0 2 5 2 】

X I V . 実施例 7 : ある特定の実施形態の概要

10

本明細書には、二重特異性 T 細胞エンゲージャーを分泌する新規のクラスの T 細胞の開発および特性分析が記載されており、抗原特異的なエンゲージャーを分泌する T 細胞が、抗原陽性細胞を効果的に標的にすることが示されている。これらのエンゲージャー T 細胞は、免疫刺激性サイトカインを産生し、抗原特異的に増殖し、抗原陽性の標的と共培養されると、腫瘍細胞溶解を誘導し、バースタンダー T 細胞を抗原陽性腫瘍細胞にリダイレクトし、強力な *i n v i v o* 抗腫瘍活性を有する。

【 0 2 5 3 】

C A R または遺伝子操作された T C R による T 細胞の遺伝的改変は、抗原特異的な T 細胞を迅速に生成する魅力的な戦略である。しかし、C A R も、遺伝子操作された T C R T 細胞も、バースタンダー T 細胞をがん細胞にリダイレクトすることができると示されてはいない。いくつかの研究者グループが、常在 T 細胞を腫瘍細胞にリダイレクトするために、二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E) 、二重親和性再ターゲティング抗体 (D A R T) 、およびダイアボディを含めた二重特異性抗体を開発している。これらのうち、C D 1 9 特異的な B i T E であるブリナツモマブが、血液悪性腫瘍を有する患者に関する第 I 相および II 相臨床試験において有望な結果を示している。しかし、B i T E は、持続注入で投与しなければならず、これには、全身毒性が伴いうる。加えて、通常の M A b のように、B i T E は、注入されたら、能動的な生体分布も、自己増幅もない。加えて、それらは組織平面を貫通しない。これによって、固形腫瘍を有するヒトにおける、B i T E の活性が今のところでは限定されていることの原因が説明されるかもしれない。

20

【 0 2 5 4 】

30

エンゲージャー分子を分泌する T 細胞は、注入後にも持続し拡張することができ、腫瘍部位へと能動的に移動し、活性化されると導入遺伝子発現を増強するので、二重特異性 M A b のもつ多くの限定を克服することができる。実際、エンゲージャー T 細胞は *i n v i v o* で拡張し、これは、エンゲージャー分子を持続注入する必要性を取り除く。エンゲージャー細胞は、活性化されたら、エンゲージャー分子の産生を増強し、これによって、バースタンダー T 細胞を腫瘍細胞にリダイレクトする能力が強化される結果となった。特定の実施形態では、T 細胞のこれらの好ましい特色により、毒性となる可能性のある全身曝露を最小限にしながら、腫瘍部位におけるエンゲージャー分子の濃度が高くなる。

【 0 2 5 5 】

i n v i v o において、エンゲージャー T 細胞は、4 種の動物モデルにおける強力な抗腫瘍活性を有した。これは、エンゲージャー T 細胞の治療可能性が大きいことを実証している。

40

【 0 2 5 6 】

結論として、エンゲージャー T 細胞は、抗原依存的にバースタンダー T 細胞を腫瘍細胞にリダイレクトする独特の能力を有する新規クラスの抗原特異的な T 細胞を提供する。エンゲージャー T 細胞は、局所領域性および全身性の異種移植モデルにおいて、定着腫瘍の退縮を誘導した。したがって、エンゲージャー T 細胞は、がんのための現在の免疫療法を改善するのに有用である。

【 0 2 5 7 】

X V . 実施例 8 : 材料と方法

50

この実施例は、EphA2に関する特定の例示の実施形態を記載する。当業者は、そのような実施例が他の実施形態へと外挿可能であり、当業者の通常の技術の範囲内であることを認識している。

【0258】

A. 腫瘍細胞株

肺がん細胞株A549、白血病細胞株K562、および膠芽腫株U373は、ATCC（アメリカ培養細胞系統保存機関）から購入した。白血病細胞株BV173は、ライプニッツ研究所（Leibniz Institute）DSMZ（ドイツ微生物細胞培養コレクション、Braunschweig, Germany）から購入した。ヒトEphA2を発現するK562細胞（K562-EphA2）と、ffLucを発現するU373、A549、およびBV173細胞の生成については前に記載されている。

10

【0259】

B. EphA2特異的およびCD19特異的なENGをコードするレトロウイルスベクターの構築

免疫グロブリン重鎖リーダーペプチド、EphA2特異的scFv 4H5、短いセリン-グリシンリンカー、およびOKT3由来のCD3特異的なscFvを含有するEphA2特異的エンゲージャーの構築については、他の箇所に記載されている。EphA2特異的エンゲージャーをpSFG-IRE5-mOrangeにサブクローニングした。免疫グロブリン重鎖リーダーペプチド、CD19特異的なscFv（FMC63）、短いセリン-グリシンリンカー、およびOKT3由来のCD3特異的なscFvを含有するCD19特異的エンゲージャーは、Invitrogen（Carlsbad, CA）によって合成され、これをpSFG-IRE5-mOrangeにサブクローニングした。RD114シュードタイプ化されたレトロウイルス粒子を生成した。

20

【0260】

C. ENG T細胞の生成

ENG発現またはCAR発現T細胞については、前に記載されている通りに生成した。採血の前に、健常ドナーから、ベイラー医科大学（Baylor College of Medicine）施設内倫理委員会によって承認されたプロトコルに従ってインフォームドコンセントを得た。PBMCは、OKT3およびCD28抗体でコーティングされた非組織培養処理の24ウェルプレート上で刺激した。2日目にヒトIL2（Prol 30 leukin, Chiron）を培養物に添加し、3日目に、RetroNectin（Clontech）コーティングされたプレート上、IL2の存在下において、レトロウイルス粒子でT細胞に形質導入した。その後、IL2の存在下でT細胞を拡張させた。NT T細胞は、でOKT3/CD28で活性化し、IL2存在下で平行して拡張させた。

【0261】

D. フローサイトメトリー

mOrangeの発現は、FACS分析によって検出した。T細胞上でのCARの表面発現は、CH2CH3 Cy5抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories）を用いて分析した。免疫表現型検査には、細胞を、CD3-PerCP、CD4-FITC、およびCD8-FITCモノクローナル抗体（BD Biosciences）で染色した。アイソタイプ対照は、免疫グロブリンG1-フルオレセインイソチオシアネート（IgG-FITC、BD Biosciences）、IgG1-ペリジニククロフィルタンパク質（IgG1-PerCP、BD Biosciences）、アイソタイプCy5（Jackson ImmunoResearch Laboratories）であった。各試料について、Cell Questソフトウェア（BD Biosciences）を用いて、FACSCalibur装置（BD Biosciences）によって20,000個の細胞を分析した。

40

【0262】

E. T細胞のex vivo機能分析

EphA2-ENG、CD19-ENG、およびNT T細胞を腫瘍細胞と共に10：

50

1の比率でプレーティングした。共培養の24時間後におけるIFNガンマおよびIL2の産生を、製造業者(R&D Systems)の指示に従ってELISAを用いて測定した。標準的なクロム(^{51}Cr)放出アッセイを、前に記載されている通りに行った。

【0263】

F. トランスウェルアッセイ

U373、U373.eGFP.ffLuc、またはBV173.ffLuc細胞を24ウェルプレートのボトムウェルにプレーティングした。24時間後にNTT細胞をボトムウェルに添加し、EphA2-ENGまたはCD19-ENG T細胞をトランスウェルインサートウェル(直径6.5mm、孔径0.4 μm 、ポリカーボネート、Corning Inc.)に添加した。48時間後に、U373用のクリスタルバイオレット染色またはU373.eGFP.ffLucもしくはBV173.ffLuc細胞用のルシフェラーゼアッセイによって生存腫瘍細胞を検出した。

10

【0264】

G. MTSアッセイ

U373細胞を1ウェルあたり 1×10^4 細胞の密度で96ウェルプレートにプレーティングした。24時間後に、T細胞をプレートに添加した。48時間の共培養の後に、付着していないT細胞を取り除き、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(MTS)アッセイ(Cell Titer 96 aqueous one solution cell proliferation assay、Promega)によって生存細胞を検出した。

20

【0265】

H. 定量的リアルタイムPCR

RNAは、RNeasyミニキット(Qiagen)を用いてT細胞から抽出した。EphA2-ENG mRNA発現の相対定量は、SYBR Green試薬(Qiagen)を用いて行った。

【0266】

I. 動物モデル

すべての動物実験は、ベイラー医科大学の動物実験委員会(Institutional Animal Care and Use Committee)で承認されたプロトコールに従って行った。実験は、小さな修正を加えて、前に記載されている通りに行った。

30

【0267】

頭蓋内モデル：8~12週齢の雄性ICR-SCIDマウスをTaconicから購入した(IcrTac:ICR-Prkdcscid; Fox Chase C.B-17 SCID ICR; Taconic)。簡潔には、U373.eGFP.ffLuc細胞($2.0 \mu\text{l}$ 中に 1×10^5 個)を、右尾状核の中心に相当する、ブレグマから深さ3mmに、5分間にわたり注射した。腫瘍細胞注射の7日後に、同じ腫瘍座標への、同じドナーから得た $2 \mu\text{l}$ 中 2×10^6 個のNTまたはENG T細胞による処置を動物に施した。ルシフェラーゼを発現する腫瘍細胞から放射された光子を、Living Imageソフトウェア(Caliper Life Sciences)を用いて定量した。一定の対象領域(ROI)を腫瘍領域の上方に設定し、シグナル強度を総光子/秒/ cm^2 /ステラジアン($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$)として測定した。動物のイメージングを最初は2日毎に、その後は1週間に1回行った。2回にわたって腫瘍輝度が $> 1 \times 10^9$ となったとき、またはマウスが、ベイラー医科大学比較医学センター(the Center for Comparative Medicine at Baylor College of Medicine)による安楽死判定規準(神経障害、体重減、苦悩の徴候)を満たしたときにマウスを安楽死させた。

40

【0268】

全身A549腫瘍モデル(抗腫瘍活性)：8~12週齢の雄性SCID Beigeマ

50

ウスをCharles Riverから購入した(CB17.Cg-Prkdcscid Lystbg/Crl; Fox Chase SCIDR Beigeマウス; Charles River Laboratories International, Inc.)。0日目にPBS中の 2.5×10^6 個のA549.eGFP.ffLuc細胞をi.v.注射した。腫瘍細胞注射の7、14、および21日後に、 1×10^7 個のCD19-ENG T細胞またはEphA2-ENG T細胞によるi.v.処置をマウスに施した。T細胞注射の日に、すべての動物に1用量のIL2(1,500U)をi.p.投与した。未処置の動物を対照として用いた。動物のイメージングを上述の通り行った。マウスは、バイラー医科大学比較医学センターによる安楽死判定規準を満たしたときに安楽死させた。

10

【0269】

全身A549腫瘍モデル(T細胞の拡張および持続): EphA2-ENG T細胞の拡張および持続を判定するために、0日目に、8~12週齢の雄性SCID Beigeマウスに、PBS中の 2.5×10^6 個のA549細胞をi.v.注射した。腫瘍刺激の7日後に、5匹の担がんマウスおよび5匹の対照に、 5×10^6 個のeGFP.ffLucを発現するEphA2-ENG T細胞と 5×10^6 個のNT T細胞の混合物をi.v.注射した。すべてのマウスに1用量のIL2(1,500U)をi.p.投与し、T細胞の拡張および維持を連続生物発光イメージングによってモニターした。バースタンダーT細胞の拡張および持続を判定するために、0日目に、8~12週齢の雄性SCID Beigeマウスに 2.5×10^6 個のA549細胞をi.v.注射した。腫瘍刺激の7

20

【0270】

J. 統計分析

統計分析には、GraphPad Prism 5ソフトウェア(GraphPad software, Inc.)を用いた。測定データは、平均±標準偏差(SD)で示した。2群間の比較には、両側t検定を用いた。3群以上の比較には、ボンフェローニの事後検定を用いた片道分散分析によって値を分析した。ENG、CAR T細胞、ならびに活性化および非活性化ENG T細胞の抗腫瘍活性の比較には、線形回帰分析を行った。有意水準には、 $p < 0.05$ を用いた。マウス実験は、5匹のマウスを用いて、2という大きな効果量が検出されるように計画した。これにより、第一種過誤が5%である少なくとも80%の検出力が得られた。正式なランダム化は行わなかったが、5匹のマウスは、ケージから無作為に選ばれた。腫瘍細胞注射時間から決定した生存期間は、 Kaplan-Meier法およびログランク検定によって分析した。

30

【0271】

本明細中で言及したすべての特許および刊行物は、本開示が属する技術分野における当業者のレベルを示すものである。すべての特許および刊行物は、個々の刊行物を具体的かつ個別に参照により組み込むと示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

40

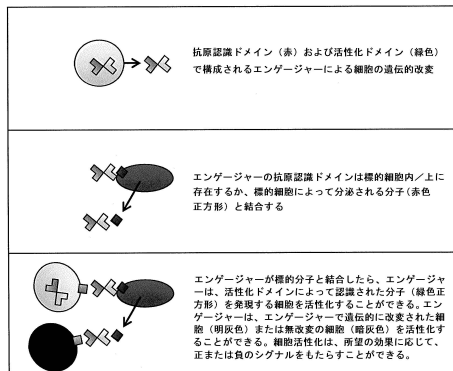
【0272】

本開示およびその利点を詳細に説明したが、添付されている請求の範囲の趣旨および範囲から逸脱せずに、様々な変更、置換、および改変をここに加えることができる。さらに、本出願の範囲は、本明細中に記載されたプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法、およびステップの特定の実施形態に限定されるものではない。当業者ならば、本開示の開示内容から容易に理解するように、本明細書に記載の対応する実施形態と実質的に同じ機能を果たすか、そのような実施形態と実質的に同じ結果をもたらす

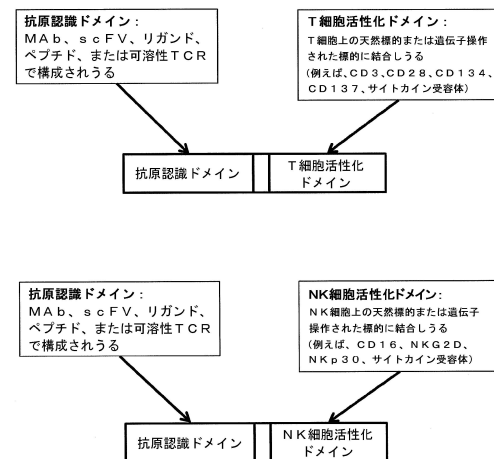
50

、現存する、または後に開発されるプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法、またはステップも、本開示に従って使用できる。したがって、添付されている請求の範囲には、そのようなプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法、またはステップも包含されるものとする。

【図 1】

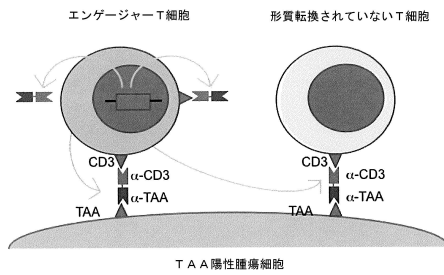


【図 2】

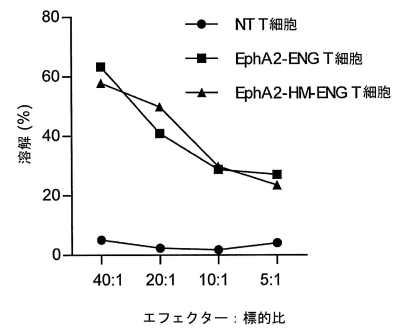


MAb: モノクローナル抗体
scFv: 一本鎖可変領域断片
TCR: T 細胞受容体

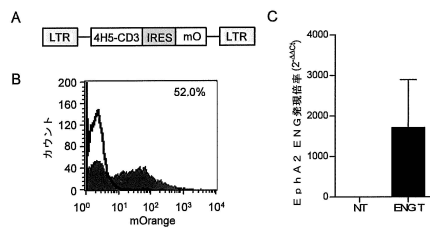
【図 3】



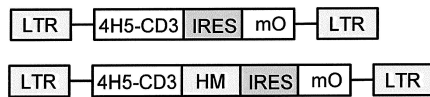
【図 5 B】



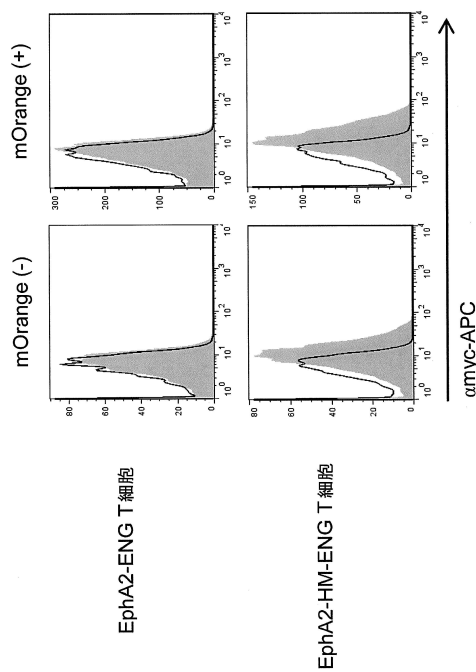
【図 4】



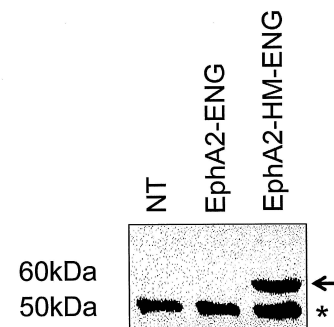
【図 5 A】



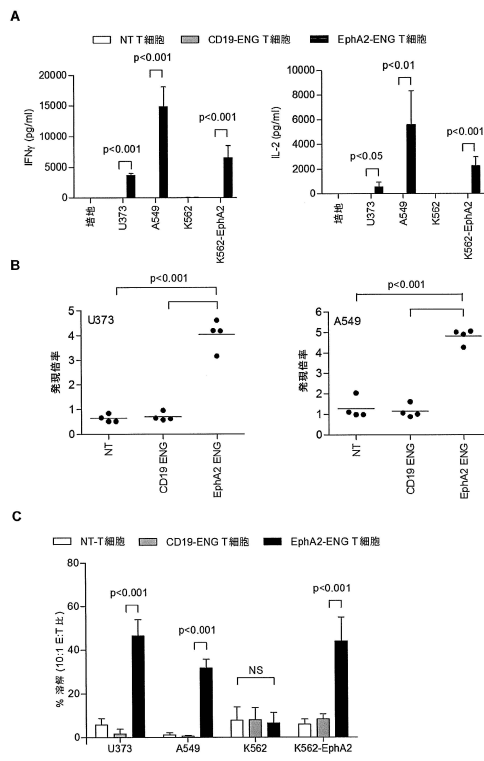
【図 5 C】



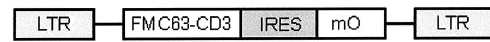
【図 5 D】



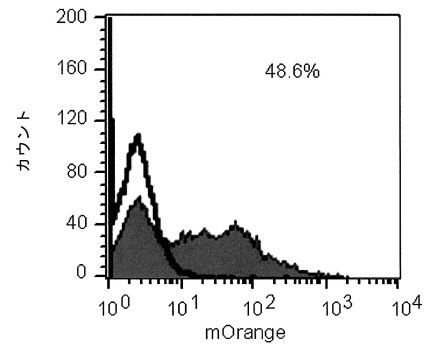
【図 6】



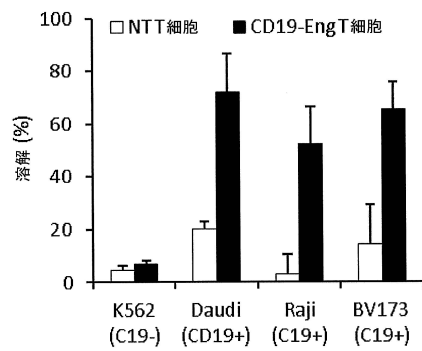
【図 7 A】



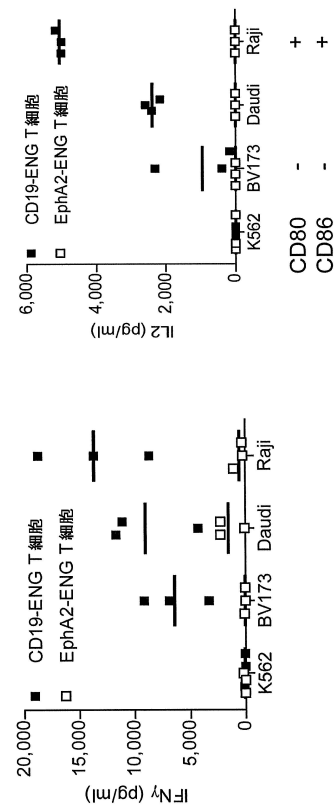
【図 7 B】



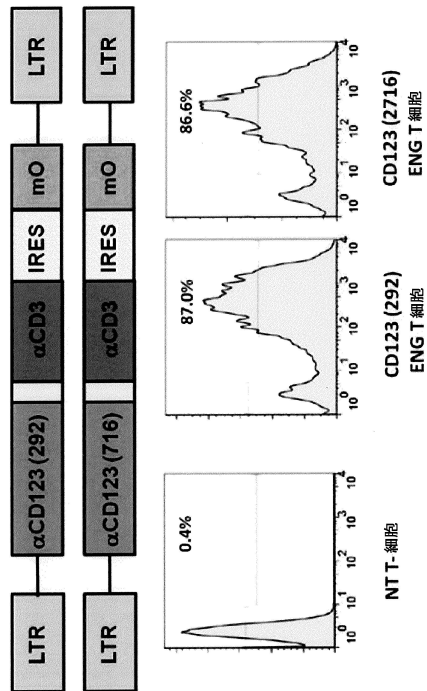
【図 7 C】



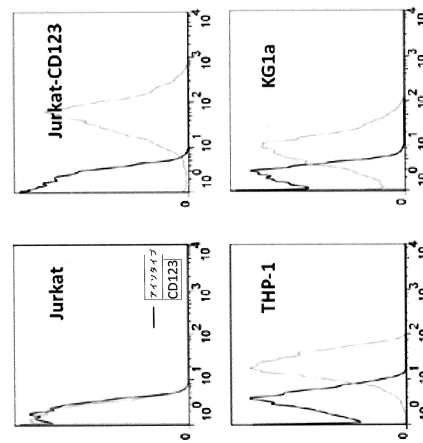
【図 7 D】



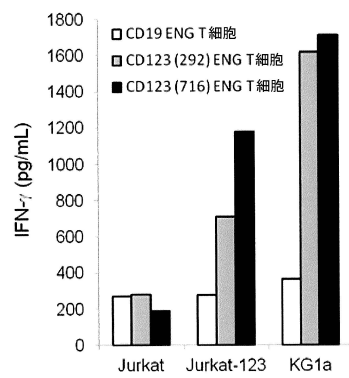
【図 8 A】



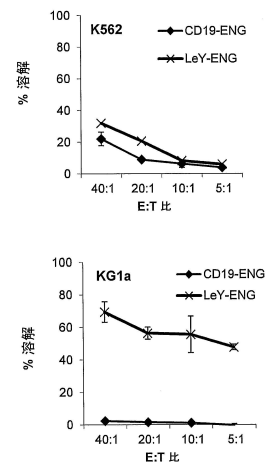
【図 8 B】



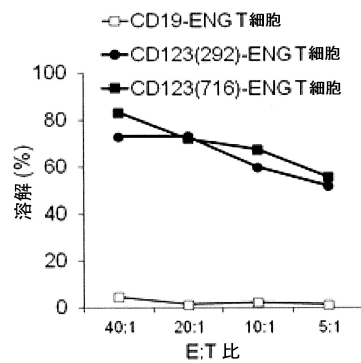
【図 8 C】



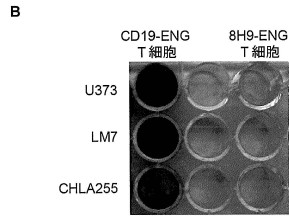
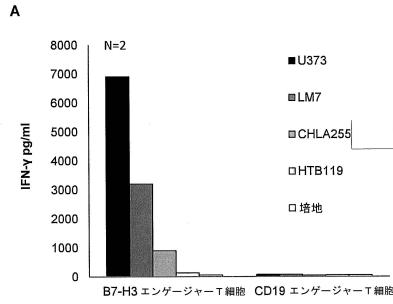
【図 9】



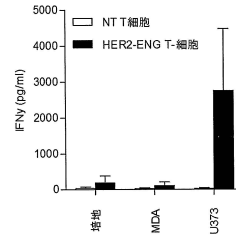
【図 8 D】



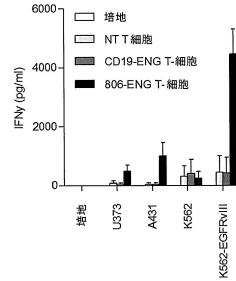
【図 10】



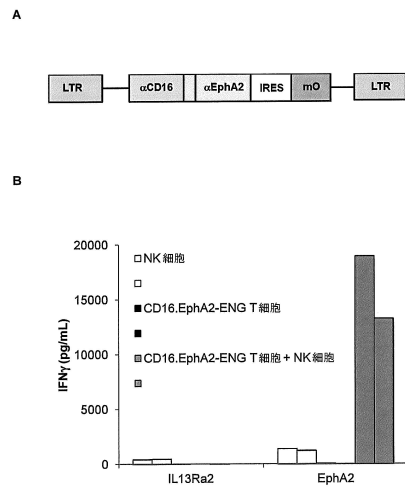
【図 11】



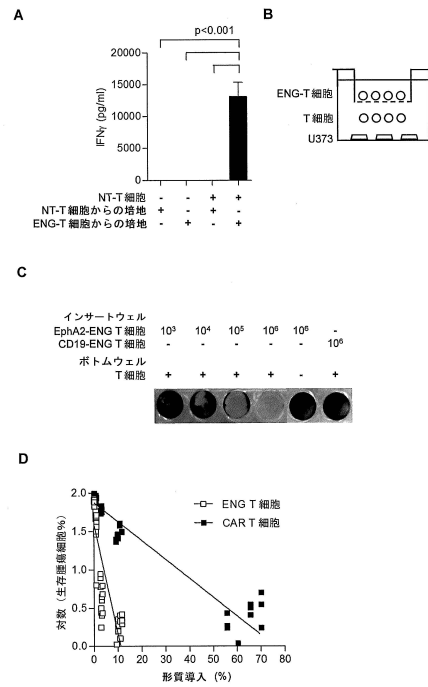
【図 12】



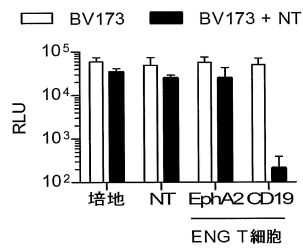
【図 13】



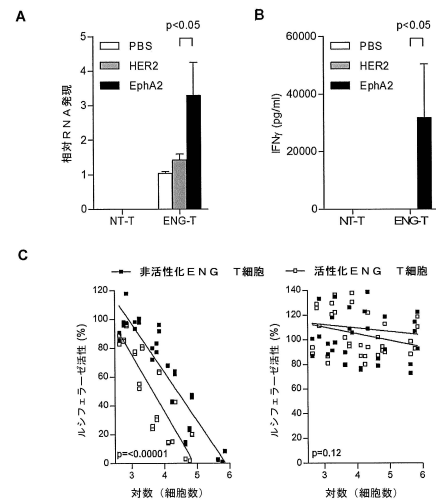
【図 14】



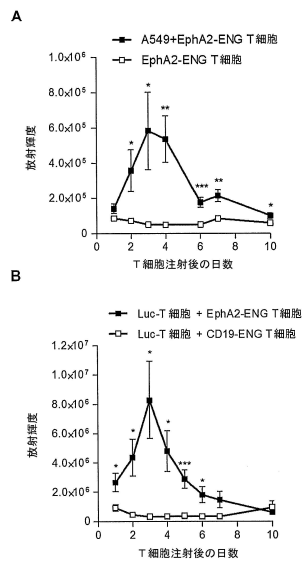
【図 15】



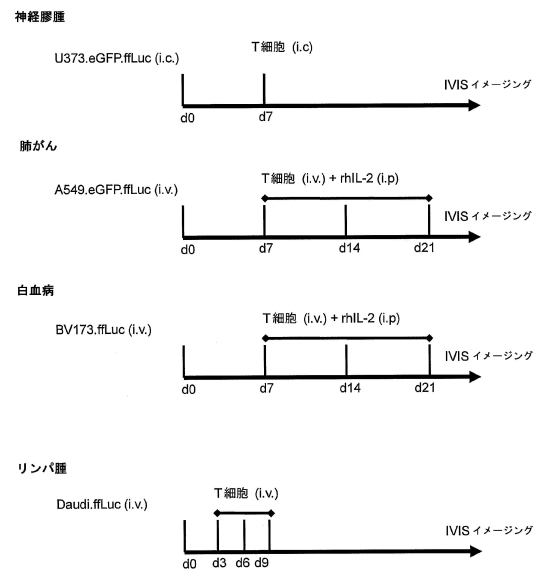
【図 16】



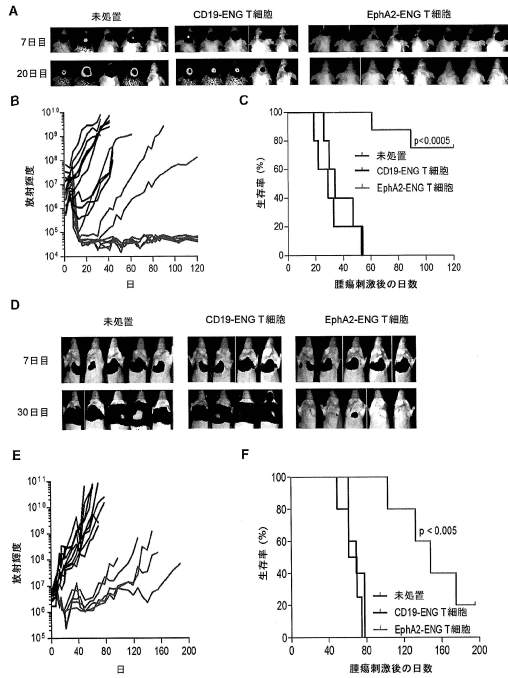
【図 17】



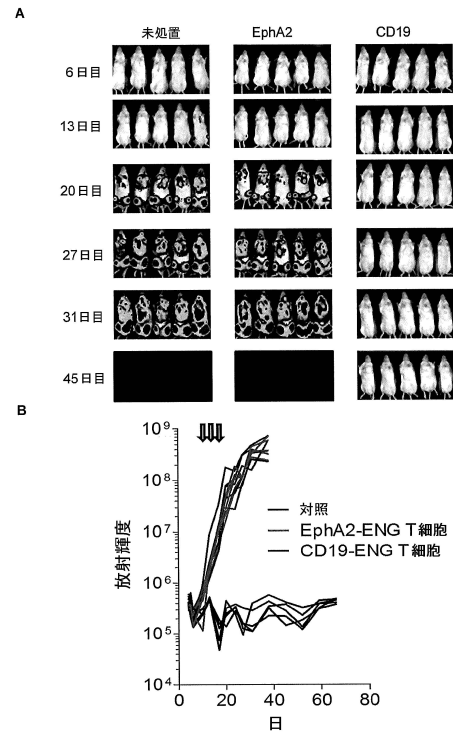
【図 18】



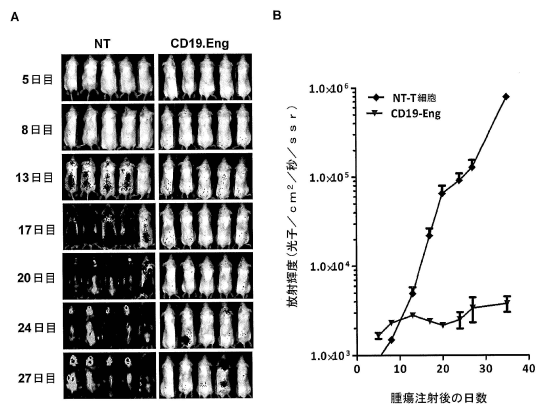
【図 19】



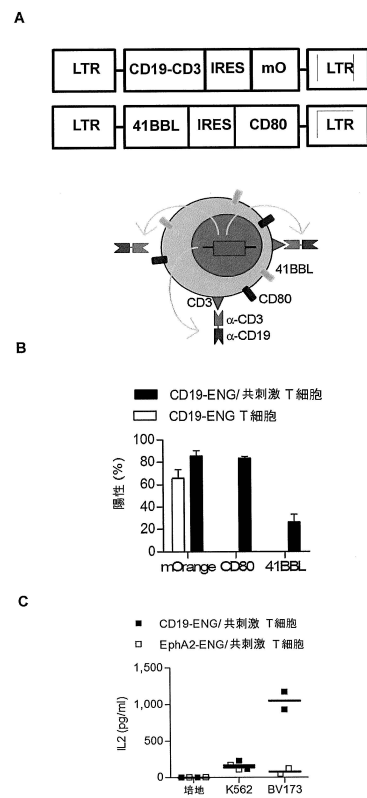
【図 20】



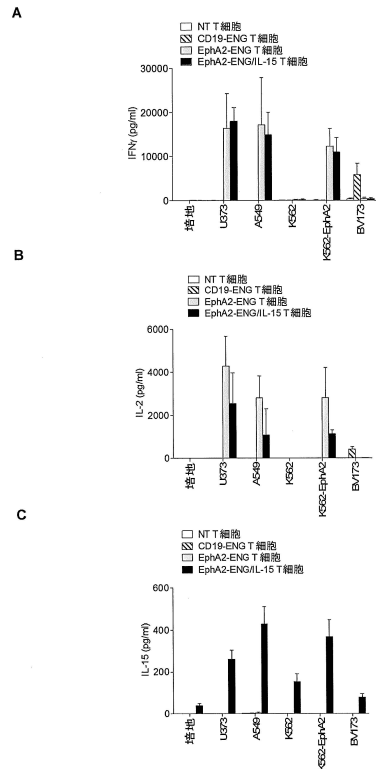
【図 21】



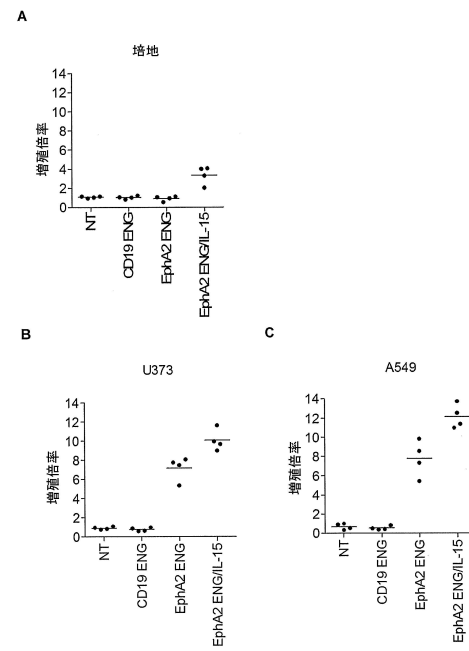
【図 22】



【図 23】



【図 24】



【配列表】

0006420776000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
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
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00

(31)優先権主張番号 61/772,803
 (32)優先日 平成25年3月5日(2013.3.5)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/775,524
 (32)優先日 平成25年3月9日(2013.3.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ゴットシャルク、ステファン、エム・ジー・
 アメリカ合衆国 テキサス州 77030、ヒューストン、1908 カンタベリー
 (72)発明者 ソン、シャオ・トン
 アメリカ合衆国 テキサス州 77584、パーランド、10011 ヒドゥン フォールズ ドライブ
 (72)発明者 イワホリ、コータ
 アメリカ合衆国 テキサス州 77030、ヒューストン、ピーシーエム210-600ディー、
 ワン ベイラー プラザ
 (72)発明者 ベラスケス、ミレヤ、パウリナ
 アメリカ合衆国 テキサス州 77030、ヒューストン、ピーシーエム210-600ディー、
 ワン ベイラー プラザ
 (72)発明者 アボット、スチュワート
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07059、ウォーレン、15 キャセール ドライブ

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特表2015-524255(JP,A)
 国際公開第2012/079000(WO,A1)
 国際公開第2009/091826(WO,A1)
 特表2009-521474(JP,A)
 Cancer Research, 2007年, Vol. 67, No. 8, pp. 3927-3935

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 5/00
 C12N 15/00
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 WPIDS/WPIX(STN)