

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6682438号
(P6682438)

(45) 発行日 令和2年4月15日 (2020.4.15)

(24) 登録日 令和2年3月27日 (2020.3.27)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/17 Z

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

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 5/071

C O 7 K 14/705 (2006.01)

C O 7 K 14/705 Z N A

請求項の数 14 (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願2016-545917 (P2016-545917)
 (86) (22) 出願日 平成27年1月8日 (2015.1.8)
 (65) 公表番号 特表2017-503810 (P2017-503810A)
 (43) 公表日 平成29年2月2日 (2017.2.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2015/050033
 (87) 国際公開番号 W02015/104711
 (87) 国際公開日 平成27年7月16日 (2015.7.16)
 審査請求日 平成30年1月5日 (2018.1.5)
 (31) 優先権主張番号 61/925, 265
 (32) 優先日 平成26年1月9日 (2014.1.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 500545311
 ハダシット メディカル リサーチ サー
 ビシーズ アンド ディベロップメント
 リミテッド
 Hadasit Medical Res
 earch Services and
 Development Ltd.
 イスラエル国 エルサレム ピー. オー.
 ボックス 12000 ハダサー アイ
 ン ケレム メディカル センター エル
 サレム バイオパーク
 Jerusalem BioPark, H
 adassah Ein Kerem M
 edical Center, P. O.
 Box 12000 Jerusale
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療のための改善された細胞組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする対象において癌を処置するための医薬の調製における、T細胞含有集団の使用であって、

前記T細胞含有集団は、前記対象から、または前記対象と実質的に組織適合性があるドナーから、取得されて、有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインと共にエキスピボでインキュベートされたものである、
 使用。

【請求項 2】

前記インキュベーションが、T細胞受容体(TCR)刺激およびフィーダー細胞の存在
 下で、外因性IL-2を添加せずに実施され、

前記T細胞含有細胞集団が、CD8⁺T細胞を含む、
 請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

前記NTB-Aエクトドメインが、ヒトNTB-Aエクトドメインである、請求項1に
 記載の使用。

【請求項 4】

前記対象が、実質的なNTB-A表面発現の欠如を特徴とする腫瘍に冒されている、請
 求項1に記載の使用。

【請求項 5】

10

20

前記対象が、C D 1 3 7の表面発現を特徴とする腫瘍に冒されている、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 6】

前記対象が、血球減少症の対象もしくは血球減少症を発症するリスクのある対象である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 7】

前記対象が、有効量の単離された N T B - A エクトドメインを投与されている、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 8】

I L - 2 が、前記対象に体外から投与されていない、請求項 1 に記載の使用。

10

【請求項 9】

T 細胞を有効量の単離された N T B - A エクトドメインと接触させることを含む、T 細胞死を低減または阻害する方法であって、前記接触がインビトロで実施される、方法。

【請求項 10】

C D 8 ⁺ T 細胞含有細胞集団を有効量の単離された N T B - A エクトドメインと共にエクスピボでインキュベートすることを含み、前記細胞集団に T 細胞受容体 (T C R) 刺激を提供することをさらに含む、養子移入免疫療法に適合した細胞組成物を調製するための方法であって、

前記 T 細胞含有細胞集団が、外因性 I L - 2 の添加を伴うことなく T C R 刺激およびフィーダー細胞の存在下で、前記単離された N T B - A エクトドメインと共にインキュベートされる、方法。

20

【請求項 11】

前記単離された N T B - A エクトドメインとのインキュベーションが、制御性 T 細胞活性を最小限に抑えながら細胞傷害性 T 細胞活性を増大させるように実施される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 N T B - A エクトドメインとのインキュベーションが、T 細胞上の C D 1 3 7 発現をアップレギュレートするように実施される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 N T B - A エクトドメインとのインキュベーションが、T 細胞数を少なくとも 1 0 0 倍増加させるように実施されるか、または

前記インキュベーションが、外因性 C D 1 3 7 リガンドの存在下で実施される、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 14】

それを必要とする対象において癌を処置するための医薬の調製における、請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法により調製された細胞組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

発明の分野

本発明は、免疫療法の分野を対象とする。具体的には本発明は、癌および他の病理の処置において有用な、エクスピボおよびインビボでの改善された T 細胞モジュレーションを提供する組成物および方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーメンバー 6 (s i g n a l i n g l y m p h o c y t e a c t i v a t i o n m o l e c u l e f a m i l y m e m b e r 6) (S L A M F 6)、C D 3 5 2、L y - 1 0 8、S F 2 0 0 0 および K A L I と

50

しても公知のNK-T-B抗原(NTB-A)は、免疫細胞受容体のSLAMファミリーに属するI型膜貫通タンパク質である。SLAMファミリータンパク質は、IgスーパーファミリーのCD2サブグループの一種である。NTB-Aはナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞およびB細胞上で発現され、受容体複合体にSLAM結合タンパク質(SAP)およびさらなるアダプタータンパク質を動員することにより媒介されるホモタイプ相互作用を示す。

【0003】

NTB-Aは2つの細胞外免疫グロブリン(Ig)様ドメインおよび3つの細胞質チロシン依存性シグナル伝達モチーフを含み、このモチーフのうちの1つは従来の免疫受容体チロシン依存性抑制モチーフに含まれる。ヒトT細胞上のNTB-Aのエンゲージメントは、CD28共刺激経路を代替でき、Th1表現型への偏倚を誘導する。しかし、NTB-A(Ly-108)ノックアウトマウスからのCD4陽性T細胞はIL-4産生における障害を示し、Th2偏倚におけるNTB-Aの役割が示唆される。この矛盾の理由は、完全には解明されていない。ヒトNK細胞上でのNTB-Aの活性化は、細胞傷害性および増殖に加えて、IFN- およびTNF- 産生も刺激する。

【0004】

Valdez et al, 2004年は、NTB-Aがホモタイプ相互作用によりT細胞を活性化し、Th1の特性を特異的に増強することを教示している。NTB-Aの最初の226アミノ酸をネズミIgG1のFc部分に融合することにより生成されるNTB-A-Fc融合タンパク質は、Th1型サイトカインにより一般に誘導されるB細胞アイソタイプスイッチングを阻害することが見出され、Th1依存性自己免疫疾患(EAEモデル)を阻害した。したがって報告されたNTB-A融合タンパク質は、Valdezらにより報告された実験系においてNTB-Aアンタゴニストとして作用することが見出された。

【0005】

Valdezらへの米国特許出願公開第2009/017014号は、PRO20080ポリペプチド(NTB-Aのアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する)、その細胞外部分、そのホモログ、アゴニスト、およびアンタゴニストを対象としており、それらは免疫疾患の推定上のモジュレーターであると示唆されている。'014号特許公開は、癌処置のための免疫アジュバント療法においてそこに開示される特定の免疫刺激性化合物の使用を示唆している。

【0006】

Uzana et al., 2012年は、特異的抗体による抗原提示細胞(APC)上でのNTB-A遮断がCD8+リンパ球からのサイトカイン分泌を阻害したことを開示している。この特許公開は、抗癌免疫療法を改善するための潜在的ターゲットとしてこの分子を示唆するが、CD28などの他の共刺激受容体をアゴニスト抗体で標的化する類似のアプローチが臨床試験において致命的転帰で終了したため、このアプローチに関連する実験的探求が是認されるべきであると言われている。

【0007】

NTB-Aは特定の造血組織系腫瘍上で発現されるため、この抗原を異常に発現する腫瘍に対して抗腫瘍免疫応答を誘導するように、この分子に由来するペプチドエピトープを用いるワクチン接種が提案された。例えば、PCT公開第2006/037421号には、抗腫瘍免疫応答を誘発するためのワクチン組成物中で用いられ得る、ヒト腫瘍細胞株のHLAクラスII分子由来の338のペプチド配列が開示されている。これらの配列の中の一つは、SLAMF6の103~118位に対応する16アミノ酸のペプチドである。加えて、これらのエピトープを抗体またはその免疫毒素コンジュゲートでターゲットイングすることが示唆された。例えば、米国特許出願公開第2011171204号には、抗NTB-A抗体およびその抗原結合フラグメントと、それらを使用してNTB-Aを結合し、NTB-Aの発現を特徴とする血液癌などの疾患を処置する方法が開示されている。NTB-Aに対するさらなる抗体が、例えばKrover et al., 2007に記

10

20

30

40

50

載されている。これらの抗体は、NTB-A発現リンパ球への細胞傷害性効果を発揮し、T細胞増殖またはサイトカイン分泌への影響を有さなかった。

【0008】

EP2083088号には、とりわけSLAMF6からなる群から選択される遺伝子の発現生成物のレベルをモジュレートすることを含む、患者における癌を処置する方法が開示されており、癌は、黒色腫、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌からなる群から選択される。この特許公開には、この方法が上記遺伝子の過剰発現を特徴とする患者を処置するのに有用であることが開示されている。

【0009】

WO03/008449号は、NTB-Aポリペプチド、それをコードする核酸分子およびその使用に関する。この公報はまた、NTB-Aの活性をインビトロ、エクスピボまたはインビボで調節することによりNK細胞活性を調節する方法、およびNTB-Aもしくはその断片、またはそれをコードする核酸、または上記ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞を用いて活性化化合物をスクリーニングする方法にも関する。さらに開示されるのは、対象における免疫機能を調節するための医薬の調製におけるNTB-Aポリペプチドの活性を調節する化合物の使用である。

【0010】

X連鎖リンパ増殖性疾患(XLP)は、エプスタイン・バー・ウイルス(EBV)感染の際にリンパ球数を極端に、通常は致死的に増加させる希少な先天性免疫不全である。XLPは通常、染色体Xq24-25上のSH2D1A遺伝子における突然変異により起こる、XLP1とも称されるSLAM結合タンパク質(SAP)の欠損により生じる。したがって、NTB-Aは、EBV感染B細胞を殺傷するNK細胞の不能に寄与するとして、この病理において関連づけられている。

【0011】

Snow et al. (2009年、2010年)は、健常なドナーおよびXLP患者から得られたT細胞の再刺激誘導細胞死(restimulation-induced cell death)(RICD)の調節における、NTB-Aおよびその下流のエフェクターSAPの役割を検討した。この特許公開は、正常ドナーのT細胞において、NTB-AがTCRによるアポトーシスに積極的に関与し、それに必要であることを報告している。これに反してXLP患者では、NTB-AがXLP T細胞におけるRICD抵抗性に寄与することが見出されており、この現象が逆行する。

【0012】

インターロイキン-2は、培養におけるリンパ球の重要な増殖因子である。これが存在しない場合、活性化T細胞は維持されず、活性化誘導細胞死に供される。したがって、IL-2は、癌、自己免疫疾患、および他の免疫を介した病理のための様々な細胞組成物、ワクチンおよび免疫療法の調製において、実験目的および臨床適用の両方のために、細胞培養で広範に利用されている。

【0013】

IL-2は、インビボでの治療薬としても用いられる。例えば、IL-2は、腎臓癌の処置に関して米国食品医薬品局(FDA)により認可されており、患者に及ぼすその顕著な治療効果は、多くの臨床試験で報告されている。黒色腫患者での臨床試験では、IL-2は多くの個体の生存率を増加させ、それは化学療法薬で通常得られる平均生存率よりも高かった。

【0014】

しかし、IL-2の使用が制御性T細胞の出現を増加させて、最終的に阻害作用を発揮し得ることが、繰り返し示されている。この問題は、インビボでの患者の全身処置、およびエクスピボでの養子細胞療法でのリンパ球生成の両方の臨床関連でT細胞を用いる場合に、特に関連する。IL-2の十分な代用物質は、まだ見出されていない。

【0015】

10

20

30

40

50

加えて、インビボで外因性IL-2および他の外因性サイトカインを使用する際の主要な難題は、それらの高い毒性である。副作用、特に心臓の症状および機能不全、敗血症性ショックおよび発熱が、少なからぬ規模である。これは、有害作用の治療または制御のために集中治療を必要とし、処置の中止に至る場合もある。

【0016】

癌の管理のための治療モダリティの改善には、依然としてアンメットメディカルニーズがある。加えて、培養におけるT細胞の増大(propagation)および活性化を促進するため、そして改善された細胞ワクチン組成物を提供するためのさらなる手段が、求められている。したがって、現在利用されている処置の欠点を回避する、より安全でより効果的な治療が、望まれている。

【発明の概要】

【0017】

発明の概要

本発明は、免疫療法の分野を対象とする。具体的には本発明は、エクスビボおよびインビボでの改善されたT細胞モジュレーションのため、そして癌および他の病理の処置のための組成物および方法を提供する。より具体的には、本発明の実施形態は、癌患者の処置のため、そして罹患し易い患者において血球減少症を予防および処置するための、可溶性NTB-Aポリペプチドまたはそのアゴニストの使用を対象とする。高い抗腫瘍効果を有する有利な併用療法が、本明細書でさらに提供される。本発明の追加的实施形態によれば、NTB-Aポリペプチドまたはアゴニストがエクスビボ細胞培養で用いられ、改善されたT細胞組成物を提供する。

【0018】

本発明は、一部には、ヒトNTB-Aの細胞外ドメイン(NTB-Aエクトドメイン)に対応する、体外から添加されたポリペプチドがT細胞のアポトーシス細胞死を防御し得るという驚くべき発見に基づいている。予想外に、NTB-AエクトドメインはCD8⁺T細胞を細胞死から救出し、電離放射線照射およびIL-2枯渇後にそれらの活力を回復させた。本発明は、一部には、先天性黒色腫細胞と共培養した場合に、NTB-Aエクトドメインにより活性化されたT細胞クローンが改善された細胞傷害性、インターフェロン-(IFN-)産生の増加、および表面CD137(4-1BB)発現の増加を示す、という予測に反した発見にさらに基づいている。したがって、強い共刺激受容体であるCD137とNTB-Aが相乗作用して、黒色腫細胞によるT細胞活性化を3倍に増加させた。加えて、驚くべきことに、NTB-Aエクトドメインは、T細胞培養に補充されると、従来のT細胞増殖因子であるIL-2を用いて達成される場合よりも優れた活性および生存性を与えて抗腫瘍リンパ球の成長および増殖に好都合に働くことも、実証された。本発明は、ヒト黒色腫移植のマウスモデルにおいて、腫瘍発生のインビボ阻害に予想外に効果的であることをさらに実証する。

【0019】

したがって、本発明の第一の態様によれば、T細胞含有細胞集団をエクスビボで有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと共にインキュベートするステップを含む、細胞組成物を調製するための改善された方法が提供される。特定の実施形態によれば、この方法は、細胞集団にT細胞受容体(TCR)刺激を提供することをさらに含む。

【0020】

特定の有利な実施形態によれば、本明細書に記載されるように調製された細胞組成物は、免疫療法に用いられ得る。したがって別の態様において、それを必要とする対象における癌を処置する方法であって、

i) 対象から、または対象と実質的に組織適合性があるドナーからT細胞含有集団を得ること、

ii) このT細胞含有細胞集団をエクスビボで有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと共にインキュベートすること、および

10

20

30

40

50

i i i) 得られたT細胞含有細胞集団を上記対象に投与し、それにより上記対象における癌を処置すること、
を含む、方法が提供される。

【0021】

一実施形態において、本発明の方法で用いられるポリペプチドは、ヒトNTB-Aエクトドメインを含む。別の実施形態において、このポリペプチドは、本質的にヒトNTB-Aエクトドメインからなる。別の実施形態において、このポリペプチドは、ヒトNTB-Aエクトドメインからなる。別の実施形態において、上記ポリペプチドは、エピトープタグ（例えば、ポリヒスチジンタグ）および/または血清半減期延長物質（例えば、PEGまたは免疫グロブリン（Ig）融合パートナー）をさらに含む。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

10

【0022】

別の実施形態において、NTB-Aアゴニストの使用が、本発明の方法において企図される。本明細書で称されるアゴニストは、標的細胞上の標的受容体（例えば、NTB-A）に特異的に結合する物質（例えば、抗体、ポリペプチドまたは小分子）であり、その結合が、受容体とその先天のリガンドとの結合を介して発揮される生物学的効果を実質的に模倣する生物学的効果（例えば、ホモタイプNTB-A相互作用）を発揮する。したがって別の実施形態において、このアゴニストは、NTB-Aエクトドメイン、例えばヒトNTB-Aエクトドメインに特異的な抗体であり得る。

【0023】

20

それらの機能上の能力を損なうことなく抗原（例えば腫瘍）特異的T細胞を増殖させる能力は、日和見感染または癌の患者の養子移入免疫療法の成功にとって不可欠である。移入に適した抗原特異的T細胞は、比較的少数で血液または組織部位から採取できるのみである。結果としてそれらは通常、移入の前に特異的または非特異的に増殖される。しかしそのようなエキスピボ操作は、潜在的に、注入後のT細胞ホーミング、増殖および生存を損なう可能性がある。

【0024】

CD4⁺細胞は抗CD3/CD28刺激に非常に良好に応答するが、CD8⁺細胞は、あまり大規模に増殖せず、アポトーシスの割合が高い。増殖を刺激するための一般に用いられる別のアプローチは、Fc受容体を担うアクセサリ細胞（フィーダー細胞）の存在下でT細胞を可溶性抗CD3抗体と共にインキュベートする、「急速増殖法（Rapid Expansion Protocol）」（REP）と称されるアプローチである。この手法でT細胞に「提示された」抗体は、可溶性抗CD3単独、または可塑性表面に固定された抗CD3よりも効果的な増殖シグナルを発生する。癌の処置において、養子細胞療法は、患者の腫瘍内に見出されるT細胞（腫瘍浸潤リンパ球、TILと呼ばれる）を回収することを典型的に含み、これは高濃度のIL-2、抗CD3およびアロ反応性フィーダー細胞を用いてエキスピボで増殖するように促進される。これらのT細胞は、その後、IL-2の体外からの投与とともに患者に戻され、抗癌活性をさらに強化する。しかし、患者への再注入のための自己TIL養子細胞療法生成物の作製は技術的に困難で、IL-2およびフィーダー細胞の使用により、望ましくない可変性を生じる。本発明は、別の実施形態において、養子細胞療法のためのそのようなTIL組成物を生成するための改善された方法を提供する。

30

40

【0025】

別の実施形態において、この集団は、CD8⁺（細胞傷害性）T細胞（CTL）を含む。別の実施形態において、T細胞は、CD8⁺T細胞である。別の実施形態において、この細胞は、遺伝子操作または組換えされている（例えば、悪性細胞の根絶において所望の抗原特異性または任意の他の望ましい形質を発揮するため）。別の実施形態において、NTB-Aエクトドメインポリペプチドまたはアゴニストとのインキュベーションは、活性化マーカーおよび/またはT細胞活性化に関連するサイトカイン（例えば、IFN- γ などのTc1活性化マーカー）を誘導またはアップレギュレートするのに十分な量および条

50

件で実施される。有利には、NTB-Aエクトドメインポリペプチドまたはアゴニストとのこのインキュベーションは、T細胞上のCD137発現をアップレギュレートするように実施される。別の実施形態において、このインキュベーションは、T細胞受容体(TCR)刺激の存在下で実施される。別の実施形態において、TCR刺激は、抗原非特異的(例えば、結合により受容体を活性化させるCD3に特異的な抗体、例えばOKT3を用いて実施される)または抗原特異的(適切な抗原提示細胞および抗原を用いる)であり得る。別の実施形態において、インキュベーションは、フィーダー細胞(例えば、同種の正常ドナーの末梢血単核細胞である、PBMC)の存在下で実施される。特定の有利な実施形態によれば、養子細胞療法のためのTIL組成物は、放射線照射されたPBMC(増殖不能)を用いて調製される。別の実施形態において、このインキュベーションは、外因性IL-2を添加せずに実施される。別の実施形態において、このインキュベーションは、300~6000IU/mlの範囲の外因性IL-2を添加して実施される。別の実施形態において、インキュベーションは、外因性CD137リガンドまたはそのアゴニストの存在下で実施される。別の実施形態において、このインキュベーションは、TCR刺激およびフィーダー細胞の存在下で、かつ外因性IL-2を添加せずに実施される。

【0026】

別の態様において、本発明の方法により調製された細胞組成物が提供される。別の実施形態において、この細胞組成物は、それを必要とするレシピエント対象への養子移入に適している。したがってこの組成物は、養子移入免疫療法に有効な量、例えば $10^6 \sim 10^{12}$ 個の細胞のT細胞含有集団を含み得る。

【0027】

別の態様において、それを必要とする対象における癌を処置する方法であって、本発明の細胞組成物をこの対象に投与し、それにより上記対象における癌を処置することを含む、方法が提供される。本発明の方法の特定の好ましい実施形態によれば、この細胞組成物は、この対象と組織適合性がある(例えば、自家細胞またはMHCII適合の同種細胞)。

【0028】

別の態様において、この方法は、治療有効量のNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを対象に投与することをさらに含む。特定の理論または作用機序に結びつけられることを望むものではないが、レシピエント対象への養子移入後の細胞のインビボ生存は、幾つかの実施形態において、補足的NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと共同的な(同時または連続での)投与により増強され得る。

【0029】

別の態様において、それを必要とする対象における癌を処置する方法であって、治療有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを対象に投与し、それにより上記対象における癌を処置することを含む、方法が提供される。

【0030】

別の実施形態において、本発明の方法により処置される対象は、実質的なNTB-A表面発現の欠如を特徴とする腫瘍に冒されている。別の実施形態において、腫瘍は、固体腫瘍である。別の実施形態において、対象は、CD137の表面発現を特徴とする腫瘍に冒されている。別の実施形態において、上記対象は、実質的なNTB-A表面発現の欠如を特徴とする腫瘍、またはCD137の表面発現を特徴とする腫瘍に冒されている。別の実施形態において、上記対象は、実質的なNTB-A表面発現の欠如を特徴とする腫瘍、固形腫瘍およびCD137の表面発現を特徴とする腫瘍からなる群から選択される腫瘍に冒されている。別の実施形態において、癌は、黒色腫、尿管癌、婦人科癌、頭頸部癌、原発性脳腫瘍、膀胱癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸癌および他の腸管癌、骨悪性腫瘍、結合および軟組織腫瘍、ならびに皮膚癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、癌は、黒色腫である。

【0031】

別の実施形態において、対象は、血球減少症対象、または血球減少症を発症する(例え

10

20

30

40

50

ば、放射線照射または化学療法により) リスクのある対象である。別の実施形態において、対象は、リンパ球減少症に冒されているか、またはそれを発症するリスクがある。別の実施形態において、対象は、X連鎖リンパ増殖性疾患(XLP)に冒されていない。

【0032】

本発明のポリペプチドは、より安全でより効果的なT細胞活性化をもたらすことに関して、IL-2よりも予想外に優れていることが実証された。したがってIL-2の使用を実質的に減少させることができ、本発明のポリペプチドで完全に置き換えることさえ可能である。したがって別の実施形態において、本発明の方法は、外因性IL-2を添加せずに実行される(インピボおよび/またはエクスピボで)。したがって別の実施形態において、IL-2は、上記対象に体外から投与されない。別の実施形態において、IL-2の使用は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%および好ましくは少なくとも90%減少され得る。

10

【0033】

別の実施形態において、本発明のNTB-Aポリペプチドまたはそのアゴニストの投与または添加は、CD137リガンドポリペプチドまたはそのアゴニスト(抗CD137抗体など)の投与と併せて(同時にまたは連続して)有利に実施され得る。市販の、または臨床試験下にあるそのような抗CD137抗体の非限定的例としては、例えばBristol Myers Squibb(BMS; ニュージャージー州プリンストン所在)カタログ番号663513の、例えば10~20ng/mlで使用され得る、完全ヒト化IgG4モノクローナル抗体、およびR&D Systems カタログ番号AF838の、例えば20~40ng/mlで使用され得る、ポリクローナルヤギ抗4-1BB抗体が挙げられる。

20

【0034】

別の実施形態において、本発明のNTB-Aポリペプチドまたはそのアゴニストの投与または添加は、免疫細胞機能への修飾効果を示す他のシグナル伝達受容体標的化試薬の投与と併せて(同時にまたは連続して)実施され得る。そのような試薬の例としては、例えばCTLA-4、PD-1またはPD-L1に対するアンタゴニストまたは阻害剤(抗体など)が挙げられる。

【0035】

本発明のポリペプチドは、T細胞をストレス性細胞死から救済して、放射線照射またはIL-2枯渇後の生存を促進することが予想外に実証された。これは、再刺激誘導アポトーシスのインビトロモデルにおいてNTB-Aのアポトーシス促進的役割を示唆するSnowらの教示を考慮すれば、特に驚くべきことである。

30

【0036】

したがって別の態様において、本発明は、T細胞を有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと接触させることを含む、T細胞死を低減または阻害する方法を対象とする。

【0037】

別の実施形態において、接触は、インビトロ(例えば、エクスピボ)で実施される。別の実施形態において、接触は、インピボで実施される。別の実施形態において、この方法は、血球減少症に罹患している対象またはそれを発症するリスクのある対象において、T細胞死を低減または阻害するために用いられ得る。

40

【0038】

別の態様において、それを必要とする対象における血球減少症を処置または予防する方法であって、治療有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを対象に投与し、それにより上記対象における血球減少症を処置または予防することを含む、方法が提供される。

【0039】

幾つかの実施形態において、血球減少症は、放射線照射または化学療法に関連する。例えば血球減少症は、高用量化学療法に関連する血球減少症、従来の腫瘍療法に関連する血

50

球減少症、薬物による血球減少症、毒素による血球減少症および放射線による血球減少症であり得る。他の実施形態によれば、血球減少症は、NTB-A経路での損傷に関連しない後天性または先天性免疫不全に関連し得る。したがってXLP患者は、これらの実施形態から明白に除外される。例えば血球減少症は、ステロイド性であり得、感染性疾患（肝炎、ウイルス性疾患）により誘発もしくは増悪され得、または自己免疫誘発性（例えば、全身エリテマトーデスによる）であり得る。特定の実施形態において、この方法は、リンパ球減少症の処置または予防に用いられる。

【0040】

別の態様において、1)単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと、2)CD137リガンドまたはそのアゴニストを含むポリペプチドと、場合により3)医薬的に許容し得る担体と、の治療的組み合わせを含む医薬組成物が提供される。

10

【0041】

別の実施形態において、組み合わせは、ヒトNTB-Aエクトドメインを含む。別の実施形態において、組み合わせは、ヒトCD137リガンドを含む。別の実施形態において、アゴニストは、抗体（例えば、NTB-A特異的またはCD137特異的）である。

【0042】

他の態様によれば、本発明は、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含むポリペプチドと、本発明の方法においてこのポリペプチドを使用するための使用説明書と、を含むキットを対象とする。

【0043】

本発明の他の目的、特色および利点は、以下の説明および図面から明白となろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】seSLAMF6（SLAMF6の可溶性エクトドメイン）が、腫瘍浸潤リンパ球上のSLAMF6に結合する。seSLAMF6は、腫瘍浸潤リンパ球への抗SLAMF6抗体の結合を完全に阻害し（A）、これらの表面受容体への抗CD8および抗2B4抗体の結合を阻害しない（B）。

【図2A】可溶性エクトドメイン（seSLAMF6）によるSLAMF6エンゲージメントが、活性化されたヒト（図2A）およびマウス（図2B）抗黒色腫T細胞の生存を改善する。（図2C）seSLAMF6によるSLAMF6エンゲージメントが、REP手順のエンドポイント後7日目のヒトTIL7でのREP後生存率を増進した。

30

【図2B】可溶性エクトドメイン（seSLAMF6）によるSLAMF6エンゲージメントが、活性化されたヒト（図2A）およびマウス（図2B）抗黒色腫T細胞の生存を改善する。（図2C）seSLAMF6によるSLAMF6エンゲージメントが、REP手順のエンドポイント後7日目のヒトTIL7でのREP後生存率を増進した。

【図2C】可溶性エクトドメイン（seSLAMF6）によるSLAMF6エンゲージメントが、活性化されたヒト（図2A）およびマウス（図2B）抗黒色腫T細胞の生存を改善する。（図2C）seSLAMF6によるSLAMF6エンゲージメントが、REP手順のエンドポイント後7日目のヒトTIL7でのREP後生存率を増進した。

【図3A】可溶性エクトドメイン（seSLAMF6）によるSLAMF6エンゲージメントが、活性化されたヒトおよびマウス抗黒色腫T細胞の機能を改善する。（図3A）seSLAMF6によるSLAMF6エンゲージメントが、マウス脾臓細胞によるIFN産生を改善し；（図3B，C）急速な増殖の間のseSLAMF6によるSLAMF6エンゲージメント（B）およびヒトTILの3日間活性化（C）が、CD107a表出により評価される細胞傷害性を改善し；（図3D）seSLAMF6によるSLAMF6エンゲージメントが、ヒトCD8⁺T細胞による黒色腫細胞殺傷を増進する。

40

【図3B】可溶性エクトドメイン（seSLAMF6）によるSLAMF6エンゲージメントが、活性化されたヒトおよびマウス抗黒色腫T細胞の機能を改善する。（図3A）seSLAMF6によるSLAMF6エンゲージメントが、マウス脾臓細胞によるIFN産生を改善し；（図3B，C）急速な増殖の間のseSLAMF6によるSLAMF6エ

50

ンゲージメント (B) およびヒト T I L の 3 日間活性化 (C) が、C D 1 0 7 a 表出により評価される細胞傷害性を改善し；(図 3 D) s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメントが、ヒト C D 8 T 細胞による黒色腫細胞殺傷を増進する。

【図 3 C】可溶性エクトドメイン (s e S L A M F 6) による S L A M F 6 エンゲージメントが、活性化されたヒトおよびマウス抗黒色腫 T 細胞の機能を改善する。(図 3 A) s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメントが、マウス脾臓細胞による I F N 産生を改善し；(図 3 B, C) 急速な増殖の間の s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメント (B) およびヒト T I L の 3 日間活性化 (C) が、C D 1 0 7 a 表出により評価される細胞傷害性を改善し；(図 3 D) s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメントが、ヒト C D 8 T 細胞による黒色腫細胞殺傷を増進する。

10

【図 3 D】可溶性エクトドメイン (s e S L A M F 6) による S L A M F 6 エンゲージメントが、活性化されたヒトおよびマウス抗黒色腫 T 細胞の機能を改善する。(図 3 A) s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメントが、マウス脾臓細胞による I F N 産生を改善し；(図 3 B, C) 急速な増殖の間の s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメント (B) およびヒト T I L の 3 日間活性化 (C) が、C D 1 0 7 a 表出により評価される細胞傷害性を改善し；(図 3 D) s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメントが、ヒト C D 8 T 細胞による黒色腫細胞殺傷を増進する。

【図 4】s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメントが、s e S L A M F 6 を補充した急速増殖手順 (R E P) を受けたヒト T I L 上での活性化マーカー G I T R、P D - 1、4 - 1 B B (C D 1 3 7) および S L A M F 4 (2 B 4) の発現をアップレギュレートする。

20

【図 5】s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメントが、T I L を I L - 2 と同じ効率で増殖する。

【図 6】R E P の際の s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメントが、より高い割合の黒色腫特異的 C D 8 T 細胞を生成する。

【図 7】s e S L A M F 6 により増殖された抗黒色腫 T I L が、標準の I L - 2 プロトコルにより増殖される T I L と同じ効率でインビボでの黒色腫成長を阻害する。

【発明を実施するための形態】

【0045】

発明の詳細な説明

30

本発明は、免疫療法の分野を対象とする。詳細には本発明は、エクスビボおよびインビボでの改善された T 細胞モジュレーションのための、そして癌および他の病理の処置のための、組成物および方法を提供する。より詳細には、本発明の実施形態は、癌患者の処置のための、そして罹患し易い患者において血球減少症を予防および処置するための、可溶性 N T B - A ポリペプチドまたはそのアゴニストの使用を対象とする。高い抗腫瘍効果を有する有利な併用療法が、本明細書でさらに提供される。本発明のさらなる実施形態によれば、N T B - A ポリペプチドまたはアゴニストがエクスビボ細胞培養で用いられ、改善されたリンパ球調製物を提供する。

【0046】

幾つかの実施形態において、本発明の組成物および方法は、T 細胞含有細胞集団を治療有効量の単離された (例えば、組換え生成された) N T B - A エクトドメインまたはそのアゴニストと共にエクスビボでインキュベートするステップを利用する。別の実施形態において、本発明の方法は、治療有効量の単離された (例えば、組換え生成された) N T B - A エクトドメインまたはそのアゴニストを、それを必要とする対象に投与することを含むステップを利用する。

40

【0047】

別の実施形態において、本発明は、それを必要とする対象における癌を処置する方法であって、

i) 対象から、または上記対象と実質的に組織適合性があるドナーから、T 細胞含有集団を得ること、

50

i i) この T 細胞含有細胞集団を有効量の単離された N T B - A エクトドメインまたはそのアゴニストと共にエキスピボでインキュベートすること、および

i i i) 得られた T 細胞含有細胞集団を上記対象に投与し、それにより上記対象における癌を処置すること、を含む、方法に関する。

【 0 0 4 8 】

別の実施形態によれば、本発明は、それを必要とする対象における癌を処置する方法であって、治療有効量の単離された N T B - A エクトドメインまたはそのアゴニストを対象に投与することを含み、上記対象が、実質的な N T B - A 表面発現の欠如を特徴とする腫瘍、固形腫瘍および C D 1 3 7 の表面発現を特徴とする腫瘍からなる群から選択される腫瘍に冒されている、方法に関する。

【 0 0 4 9 】

さらなる実施形態によれば、本発明は、有効量の単離された N T B - A エクトドメインまたはそのアゴニストと T 細胞を接触させることを含む、T 細胞を低減または阻害する方法に関する。

【 0 0 5 0 】

さらなる実施形態によれば、本発明は、それを必要とする対象における血球減少症を処置または予防する方法であって、治療有効量の単離された N T B - A エクトドメインまたはそのアゴニストを対象に投与し、それにより上記対象における血球減少症を処置または予防することを含む、方法に関する。

【 0 0 5 1 】

さらなる実施形態によれば、本発明は、T 細胞含有細胞集団を有効量の単離された N T B - A エクトドメインまたはそのアゴニストと共にエキスピボでインキュベートすることを含み、この細胞集団に T 細胞受容体 (T C R) 刺激を提供することをさらに含む、細胞組成物を調製するための改善された方法に関する。

【 0 0 5 2 】

さらなる実施形態において、本発明は、1) 単離された N T B - A エクトドメインまたはそのアゴニストと、2) C D 1 3 7 リガンドまたはそのアゴニストを含むポリペプチドと、場合により 3) 医薬的に許容し得る担体と、の治療的組み合わせを含む医薬組成物に関する。

【 0 0 5 3 】

これらの方法および組成物の特定の特別な実施形態は、本明細書の以下に詳述される。

【 0 0 5 4 】

N T B - A エクトドメインまたはそのアゴニスト

用語「N T B - A」(または「S L A M F 6」)は、以下の構造的および機能的特性を有するポリペプチドを指す：1) 当該技術分野で認識される(例えば、天然由来の)哺乳動物 N T B - A ポリペプチド(全長または成熟形態)に対応するアミノ酸配列；2) 内因性 N T B - A 分子を発現する細胞表面と特異的に結合する能力(ホモタイプ結合)；および 3) 本明細書に記載されるアゴニスト N T B - A 活性を発揮する能力。

【 0 0 5 5 】

一般に N T B - A は、N' から C' の順に以下のドメインで構成される：

I . N 末端シグナルペプチド；

I I . 2 つの保存された免疫グロブリン (I g) 様モチーフ：N' I g 様 V 型ドメイン (I g V ；主に中性であるが極性の前表面を含む二層のシート構造を有する) および C' I g 様 C 2 型ドメイン (I g C 2 ；全体的な鎖トポロジーおよび複数のジスルフィド結合を特徴とする)、を含む細胞外部分 (エクトドメイン) ；

I I I . らせん形膜貫通ドメイン；ならびに

I V . S L A M 結合タンパク質 (S A P) の S H 2 ドメインと、それに関するユーイング肉腫関連転写産物とのドッキング部位である免疫受容体チロシン依存性スイッチモチーフ (I T M S) を含む、トポロジカル (細胞質) ドメイン。I T S M モチーフは、活性

10

20

30

40

50

化および阻害性結合パートナーに対する重複した特異性を有するコンセンサス配列 T x Y x x V / I / L を担う。

【 0 0 5 6 】

例えば、ヒト N T B - A (例えば、アクセション番号 Q 9 6 D U 3、アイソフォーム 1) において、シグナルペプチドは 1 ~ 2 1 位に位置することが同定され、エクストドメインは 2 2 ~ 2 2 6 位に位置することが同定され (ここで I g V は 3 5 ~ 1 2 0 位に位置し、I g C 2 は 1 3 2 ~ 2 0 9 位に位置した)、膜貫通ドメインは 2 2 7 ~ 2 4 7 位に位置し、細胞質 (細胞内) ドメインは 2 4 8 ~ 3 3 1 位に位置した。

【 0 0 5 7 】

本明細書で互換的に用いられる用語「N T B - A エクストドメイン」、「s N T B - A」および「s e S L A M F 6」は、少なくとも I g V および I g C 2 ドメインを含む N T B - A の細胞外表面露出部分を指す。典型的には、そして有利には、本発明の方法および組成物で用いられる N T B - A エクストドメインは、本明細書に記載された他の N T B - A ドメイン、例えばシグナルペプチド、膜貫通ドメインおよびトポロジカルドメインを実質的に排除する。そのような有利な N T B - A エクストドメインポリペプチドは、本明細書では「単離された N T B - A エクストドメイン」と称される。単離された N T B - A エクストドメインは、典型的におよび都合よく合成で、例えば本明細書に記載されるように組換え法で生成される。言い換えれば、単離された N T B - A エクストドメインポリペプチドは、残留する N T B - A 配列 (例えば、1 ~ 1 0、好ましくは 5 以下のアミノ酸) を含み得るが、それらは、インタクト N T B - A ポリペプチド内にある場合に機能する任意のさらなる N T B - A 構造を欠く。

【 0 0 5 8 】

特にシグナルペプチドが、有利に排除される。先行するシグナルペプチドを含む N T B - A の細胞外ドメインを含むポリペプチドが N T B - A アンタゴニスト活性により特徴づけられると報告する、V a l d e z らによる以前の開示 (V a l d e z e t a l . , 2 0 0 4) に反して、本開示は、シグナルペプチドまたはさらなる配列を欠く単離された N T B - A エクストドメインが強力な N T B - A アゴニスト活性と、本明細書に記載されるように予想外の治療上有利な特性と、を示すことを実証する。

【 0 0 5 9 】

本明細書に詳述される通り、N T B - A ホモタイプ型エンゲージメントがシグナル伝達カスケードを開始し、そこで S A P 結合が誘導または増加され、F y n および L c k が動員される。これらの事象が、緊密な免疫シナプスの生成および特異的 T 細胞活性化に寄与し、精密な溶解性分解のための m T O C 形成を方向づける。N T B - A エクストドメインによる N T B - A のエンゲージメントは、活性化誘導細胞死 (A I C D) および電離放射線照射から抗腫瘍 T 細胞を救済し、インターフェロンガンマ (I F N -) 産生を改善し、表面 C D 1 3 7 (4 - 1 B B) 発現を増強し、T 細胞アポトーシスを逆行させ、そして T 細胞による腫瘍細胞死滅を増進することが、本明細書に記載される。これらの活性を測定するための方法の非限定的例が、本明細書の以下の実施例に提示されている。したがって本明細書で用いられる「N T B - A アゴニスト活性」は、本明細書に記載される、ネイティブ N T B - A の生物学的活性を発揮する能力を指す。

【 0 0 6 0 】

したがって本明細書で用いられる語句「N T B - A エクストドメインまたはそのアゴニスト」は、細胞表面で発現される内因性 N T B - A 分子と特異的に結合して (ホモタイプ型結合)、本明細書に記載されるように N T B - A ホモタイプ型エンゲージメントに特徴的なシグナル伝達経路を誘導し、それにより N T B - A アゴニスト活性を発揮する、本明細書に記載される分子を指す。幾つかの実施形態において、N T B - A エクストドメインまたはそのアゴニストは、内因性 N T B - A の活性の少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % を保持する。別の実施形態において、上記 N T B - A エクストドメインまたはそのアゴニストは、増強されたアゴニスト活性、例えばネイティブ N T B - A の 1 1 0 %、1 2 0 %、1 3 0 %、1 4 0 % または 1 5 0 %

を發揮する。特定の他の実施形態において、NTB-Aエクトドメインアゴニストは、ネイティブNTB-Aの増強された生物活性、例えばネイティブNTB-Aエクトドメインにより發揮される活性の最大200%を發揮し得る。別の実施形態において、NTB-Aエクトドメインアゴニストは、エピトープタグ（例えばポリヒスチジンタグ）および/または血漿半減期延長部分をさらに含む。例えばsNTB-Aポリペプチドは、免疫グロブリンまたはその一部に融合またはコンジュゲートされ得る。他の半減期延長物質としては、生物学的に適したポリマーまたはコポリマー、例えばポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールなどのポリアルキレングリコール化合物が挙げられる。別の適切なポリアルキレングリコール化合物としては、以下のタイプの荷電または中性ポリマー：デキストラン、ポリリシン、コロミン酸または他の炭水化物系ポリマー、アミノ酸のポリマー、およびビオチン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0061】

本発明による半減期延長部分の他の例としては、エチレングリコールのコポリマー、プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（例えば、ポリリシン）、デキストラン、n-ビニルピロリドン、ポリn-ビニルピロリドン、プロピレングリコールホモポリマー、プロピレンオキシドポリマー、エチレンオキシドポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、直鎖状もしくは分枝状グリコシル化鎖、ポリアセタール、長鎖脂肪酸、長鎖疎水性脂肪族基、免疫グロブリン軽鎖および重鎖、免疫グロブリンFcドメインもしくはその一部（例えば米国特許第6,660,843号参照）、FcのCH₂ドメイン、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA））；（米国特許第6,926,898号および米国特許出願公開第2005/0054051号；米国特許第6,887,470号参照）、トランスサイレチン（TTR；例えば米国特許出願公開第2003/0195154 A1号；同第2003/0191056 A1号参照）、またはチロキシン結合グロブリン（TBG）が挙げられる。

20

【0062】

本明細書に記載される通り、NTB-Aアゴニスト活性が実質的に維持されるように、得られるポリペプチドまたはコンジュゲートが選択されることが、理解されなければならない。

30

【0063】

別の実施形態において、NTB-Aエクトドメインアゴニストは、抗体である。本明細書で用いられる用語「抗体」または「複数の抗体」は、好ましくはモノクローナル抗体またはその断片である抗体を指し、非限定的にヒト免疫グロブリン定常領域を有する全長抗体、モノクローナルIgG、一本鎖抗体、ヒト化モノクローナル抗体、F(ab')₂断片、F(ab)断片、Fv断片、標識抗体、固定抗体および異種化合物とコンジュゲートした抗体を含む。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。一実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。別の実施形態において、抗体は、ポリクローナル抗体である。別の実施形態において、抗体は、ヒト化抗体である。

40

【0064】

モノクローナルおよびポリクローナル抗体を作製する方法は、当該技術分野で周知である。抗体は、複数の公知の方法のいずれか1つにより作製でき、抗体分子のインビボ生成の誘導、免疫グロブリンライブラリーのスクリーニング、または培養された連続細胞株によるモノクローナル抗体分子の産生を利用できる。これらには、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびエプスタイン・バー・ウイルス（EBV）ハイブリドーマ技術が挙げられるが、これらに限定されない。インビボで抗体を生成させる従来の方法の他に、当該技術分野で周知の方法により、ファージディスプレイ技術を利用して、抗体をインビトロで作製できる（例えば、Current Protocols in Immunology, Colligan et al (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), Chapter 1

50

7, Section 17.1)。

【0065】

抗原（例えば、NTB-Aエクトドメイン）または免疫原性複合体（例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）などのタンパク質キャリアにコンジュゲートされたNTB-Aエクトドメインエピトープ）を、マウス、ウサギなどの適切な哺乳動物対象に注射できる。適切なプロトコルは、血清中での抗体産生を増幅するように設計されたスケジュールに従って、アジュバントの存在下で免疫原を反復注射することを含む。免疫血清の力価は、当該技術分野で周知の免疫アッセイ手順を利用して即座に測定できる。本明細書に記載されるように、得られた抗血清は直接使用でき（例えば希釈された血清または精製されたポリクローナル抗体として）、またはモノクローナル抗体が得られる。

10

【0066】

モノクローナル抗体（mAb）は、特異的抗原に対する抗体の実質的に均質な集団である。mAbは、当業者に公知の方法により得ることができる。例えば米国特許第4,376,110号；Ausubel et al（"Current Protocols in Molecular Biology," Volumes I-III, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland, 1994）を参照されたい。

【0067】

抗体断片は、当該技術分野で周知の方法を利用して得ることができる（例えば、Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York参照）。例えば本発明による抗体断片は、抗体のタンパク質分解性加水分解により、またはその断片をコードするDNAの大腸菌もしくは哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞培養物または他のタンパク質発現系）内での発現により、調製できる。

20

【0068】

Fvは、対合される重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインで構成される。この会合は、非共有結合性であり得る。あるいは本明細書の先に記載された通り、可変ドメインは、分子間ジスルフィド結合により一本鎖Fvを生成するようにつながれていてもよく、またはそのような鎖が、グルタルアルデヒドなどの化学物質により架橋されていてもよい。

30

【0069】

好ましくはFvは、一本鎖Fvである。一本鎖Fvは、ペプチドリッカーをコードするオリゴヌクレオチドにより連結される重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することにより調製される。この構造遺伝子は、発現ベクターに挿入され、続いて大腸菌などの宿主細胞に導入される。組換え宿主細胞は、2つの可変ドメインを架橋するリンカーペプチドを含む一本のポリペプチド鎖を合成する。一本鎖Fvを生成するための十分なガイダンスは、当該技術分野の文献に示されている。

【0070】

用語「ヒト抗体」は、当該技術分野で公知のヒト生殖系免疫グロブリン配列に実質的に対応する可変および定常領域を有する抗体を包含する。本発明の実施形態で用いられるヒト抗体は、例えばCDR、特にCDR3において、ヒト生殖系免疫グロブリン配列によりコードされていないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発により、またはインビボでの体細胞突然変異により導入された突然変異）を含み得る。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーまたは他の周知方法（例えば、米国特許第5,545,807号）など、当該技術分野で公知の様々なさらなる技術を利用して生成することもできる。

40

【0071】

キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、例えばネズミmAb由来の可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有する分子である。実質的にヒト抗体

50

(アクセプター抗体と呼ばれる)からの可変領域フレームワーク残基と、実質的にマウス抗体(ドナー抗体と呼ばれる)からの相補性決定領域と、を有する抗体は、ヒト化抗体とも呼ばれる。キメラ抗体は、適用の際に免疫原性を低減するため、そして生成収率を上昇させるために主として用いられ、例えばネズミmAbがハイブリドーマからのより高い収率を有するがヒトにおける免疫原性がより高い場合には、ヒト/ネズミキメラmAbが用いられる。キメラ抗体およびその生成方法は、当該技術分野で公知である(例えば、PCT特許出願WO 86/01533号、WO 97/02671号およびWO 90/07861号、ならびに米国特許第5,693,762号、同第5,693,761号、および同第5,225,539号)。加えて、CDRグラフティングを実施して、親和性または特異性などの抗体分子の特定の性質を変化させてもよい。CDRグラフティングの非限定的例は、米国特許第5,225,539号に開示されている。

10

【0072】

ヒトの治療のために、好ましくはヒト化抗体が用いられることは、理解されよう。非ヒト(例えば、ネズミ)抗体のヒト化形態は、非ヒト抗体に由来する部分(好ましくは最小の部分)を有する遺伝子操作されたキメラ抗体または抗体断片である。ヒト化抗体は、ヒト抗体(レシピエント抗体)のCDRが所望の機能性を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基で置換された抗体を包含する。幾つかの例において、ヒト抗体のFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基により置換される。ヒト化抗体は、レシピエント抗体内にも、または導入されるCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。一般にヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインのうちの実質的に全てを含み、CDRの全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のそれに対応し、フレームワーク領域の全てまたは実質的に全てが関連のヒトコンセンサス配列のそれに対応する。ヒト化抗体は、場合により、典型的にはヒト抗体に由来する、Fc領域などの抗体定常領域の少なくとも一部も含む。

20

【0073】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当該技術分野で周知である。一般にヒト化抗体は、非ヒトである供給源からヒト化抗体に導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、導入残基(imported residue)と称され、典型的には導入される可変ドメインから得られる。ヒト化は、ヒトCDRを対応するげっ歯類CDRと置換することにより、当該技術分野で公知の通り実施され得る(例えば、米国特許第4,816,567号参照)。したがってヒト化抗体はキメラ抗体であり、インタクトヒト可変ドメインよりも実質的に少ない配列が非ヒト種からの対応する配列により置換されている。

30

【0074】

抗体が得られた後、抗体は、例えば酵素免疫測定法(ELISA)により、活性についてテストされ得る。

【0075】

様々な実施形態において、本発明の抗体は、抗sNTB-A抗体、即ちNTB-Aエクストドメインに特異的に結合するAbである。用語「特異的結合」または「特異的に結合する」は、生理学的条件下で相対的に安定な複合体を形成する2つの分子を指す。特異的結合は、高い親和性と低~中度の能力(capacity)を特徴としており、低い親和性と中~高度の能力を通常は有する非特異的結合と区別される。典型的には結合は、結合定数KAが 10^6 M^{-1} よりも高い場合に特異的と見なされる。必要に応じて、結合条件を変化させることにより、特異的結合に実質的に影響を及ぼすことなく、非特異的結合を低減できる。抗体の濃度、溶液のイオン強度、温度、結合が可能な時間、ブロッキング剤(例えば、血清アルブミン、ミルクカゼイン)の濃度などの適切な結合条件を、日常的技術を利用して当業者により最適化できる。本明細書で用いられる用語「特異的に結合する」は、抗原への抗体の結合が無関係の分子の存在により拮抗阻害されないことをさらに示すことができる。簡便には、抗原、例えばNTB-Aエクストドメインを特異的に結合する抗体の能力の検出は、特異的な抗原-抗体複合体形成を定量することにより(例えば、EL

40

50

ISAにより)実施され得る。

【0076】

別の実施形態において、NTB-Aエクトドメインアゴニストは、小分子である。「小分子」は、約500ダルトン未満の分子量を有すると、本明細書で定義される。そのような化合物は、合成有機または無機化合物、ペプチドなどを包含し得る。所望の活性について化合物をスクリーニングする方法、および所望の構造と相互作用する分子を合理的に設計する方法は、当該技術分野で公知である。

【0077】

合成および組換え法

本発明のポリペプチドおよびペプチド(例えば、NTB-Aエクトドメインポリペプチドおよび誘導体)を、当該技術分野で公知の任意の組換えまたは合成方法を用いて単離または合成できる。例えばペプチドまたはポリペプチド断片を、非限定的に固相(Bocまたはf-Mocの化学作用)および溶液相合成法などの方法により合成できる。例えばペプチドを、Merrifield(1963, J Am Chem Soc 85, 2149)の固相ペプチド合成法により合成できる。あるいはペプチドを、当該技術分野で周知の標準的溶液法(例えば、Bodanszky, 1984参照)を利用して、またはペプチド合成に関して当該技術分野で公知の任意の他の方法により、合成できる。

【0078】

ポリペプチドおよびペプチドは、組換え技術により簡便に生成され得る。タンパク質およびペプチドを設計、発現および精製するための組換え法は、当該技術分野で公知である(例えば、Sambrook et al., 1989, 1992, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York参照)。核酸分子は、DNA、RNA、またはDNAもしくはRNAのいずれかの誘導体を包含し得る。ポリペプチドまたはペプチドをコードする単離された核酸配列は、天然供給源から、遺伝子全体(即ち、完全な遺伝子)またはその一部のいずれかとして得ることができる。核酸分子は、組換えDNA技術(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、クローニング)または化学合成を利用して生成することもできる。核酸配列は、非限定的に、そのような修飾が機能的ペプチドをコードする核酸分子の能力を実質的に妨害しないような手法で、ヌクレオチドが挿入、欠失、置換、および/または反転されている、天然の対立遺伝子変異型および修飾核酸配列をはじめとする天然核酸配列およびその相同体を包含する。ポリペプチドまたはオリゴペプチド配列は、タンパク質の遺伝子コードから推定できるが、いわゆる「ウォブル則」により与えられるようなコドンの第三の位置における従来の塩基対合への例外を許容することに加えて、コードの縮退が考慮されなければならない。幾分かヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、同様の、または同一のタンパク質をもたらす得る。組換え生成法を利用して、例えば大腸菌または酵母などの微生物の、選択された宿主細胞が、ポリペプチドまたはポリペプチド類似体をコードする特異的DNA配列を含むハイブリッドウイルスまたはプラスミドDNAベクターで形質転換され、このポリペプチドは、DNA配列の転写および翻訳により宿主内で合成される。

【0079】

様々な実施形態において、配列は、受容体の対応する配列から直接得ることができ(配列が受容体の配列の一部と同一になり得るように)、または特定の誘導体化および置換を含んでよい。したがって幾つかの実施形態において、これらの配列の塩および機能的誘導体の使用が、本明細書に詳述される通り、各生物学的機能を保持する限り企図される。したがって本発明は、非天然アミノ酸誘導体または非タンパク質側鎖を含むペプチド相同体を包含する。カルボキシアミドとして、還元された末端アルコールとして、または任意の医薬的に許容し得る塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩もしくはカルシウム塩などを含む金属塩として、または有機塩基の塩として、または硫酸、塩酸もしくはリン酸を含む鉱酸の塩として、または有機酸、例えば酢酸もしくはマレイン酸の塩として、末端カルボキシ酸を有する本発明のペプチド相同体を、用いることができる。一般にペプ

10

20

30

40

50

チドの任意の医薬的に許容し得る塩を、その生物活性が維持される限り用いることができる。

【0080】

本明細書に記載されたアミノ酸残基は、「L」異性体形態であることが好ましい。しかしペプチドが所望の機能的性質を実質的に保持する限り、「D」異性体形態の残基を任意のL-アミノ酸残基と置換できる。

【0081】

化学的誘導体は、側鎖または官能基の反応により化学的に誘導体化された1つまたは複数の残基を有し得る。そのような誘導体化された分子としては、例えば遊離アミノ酸基を誘導体化して、アミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基を形成するそれらの分子が挙げられる。遊離カルボキシル基を誘導体化して、塩、メチルおよびエチルエステル、または他のタイプのエステルもしくはヒドラジドを形成できる。遊離ヒドロキシル基を誘導体化して、O-アシルまたはO-アルキル誘導体を形成できる。ヒスチジンのイミダゾール窒素を誘導体化して、N-イム-ベンジルヒスチジンを形成できる。化学的誘導体としてまた、20の標準的アミノ酸残基の1つまたは複数の天然由来アミノ酸誘導体を含むそれらのペプチドが包含される。例えば、4-ヒドロキシプロリンでプロリンを置換でき；5-ヒドロキシリシンでリシンを置換でき；3-メチルヒスチジンでヒスチジンを置換でき；ホモセリンでセリンを置換でき；オルニチンでリシンを置換できる。

【0082】

加えて、誘導体は、非限定的に末端NH₂アシル化、アセチル化、またはチオグリコール酸アミド化をはじめとする化学修飾により、そして例えばアンモニア、メチルアミンなどでの末端カルボキシルアミド化により、本発明のポリペプチドまたはペプチドの天然配列と異なっている。

【0083】

別の態様において、本発明の方法は、対象から得られた細胞集団において、NTB-Aエクトドメインを含む単離されたポリペプチドを発現させることにより実行できる（例えば、対象からT細胞を単離すること、単離されたNTB-Aエクトドメインを発現可能なベクターを導入すること、およびポリペプチドを対象内で分泌させて対象のT細胞と接触させ得るように、細胞を対象に再導入することによる）。したがって例えば、T細胞死を低減または阻害する方法は、T細胞をNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストの治療有効量と接触させることにより実行でき、上記NTB-Aエクトドメインは遺伝子療法によりインビボで生成される。

【0084】

所望の遺伝子産物を送達および発現するために用いられる発現構築物またはベクターの調製は、当該技術分野で公知である。そのような構築物は、当該技術分野で公知の通り、調節配列または選択マーカーを典型的に含む。核酸構築物（本明細書では「発現ベクター」とも称される）は、このベクターを原核生物、真核生物、または場合によりその両方（例えば、シャトルベクター）の中での複製および取込みに適するようにするさらなる配列を含み得る。加えて、典型的なクローニングベクターは、転写および翻訳開始配列、転写および翻訳ターミネーター、ならびにポリアダニル化シグナルも含んでよい。

【0085】

哺乳動物発現ベクターの例としては、Invitrogenから入手されるpcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、およびpNMT81；Promegaから入手されるpCI；Stratageneから入手されるpMbac、pPbac、pBK-RSVおよびpBK-CMV；Clontechから入手されるpTRES、およびそれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。これらは、本明細書で記載される実施形態において有用な構築物のためのベクター

バックボーンとして働き得る。

【0086】

組換えウイルスベクターは、水平感染および標的特異性などの利点を提供するため、本発明の遺伝子のインビボ発現に有用である。水平感染は、例えばレトロウイルスのライフサイクルに固有であり、1つの感染細胞が多くの子孫ビリオンを産生してそれが出芽し隣接する細胞に感染する過程である。その結果、そのほとんどが元のウイルス粒子に初めは感染していなかった細胞の大きな領域が、急速に感染する。これは、感染因子が娘子孫を通してのみ拡散する垂直感染とは対照的である。水平に拡散できないウイルスベクターを作製することもできる。この特徴は、特異的遺伝子を局在化した若干数の標的細胞にのみ導入することが所望の目的である場合に、有用であり得る。

10

【0087】

エクスピボ増殖および細胞調製

したがって、本発明の第一の態様によれば、T細胞含有細胞集団を、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含む単離された（例えば、組換え生成された）ポリペプチドの治療有効量と共にインキュベートするステップを含む、細胞組成物を調製するための改善された方法が提供される。典型的には方法は、本明細書に詳述される通り、T細胞含有細胞集団を有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと共にエクスピボでインキュベートするステップを含む。

【0088】

Tリンパ球（T細胞）は、免疫応答に関与する様々な異なる細胞型の1つである。T細胞の活性は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子に関連してT細胞に提示される抗原により調節される。その後、T細胞受容体（TCR）は、MHC-抗原複合体に結合する。抗原がMHCに複合体化すると、MHC-抗原複合体が、T細胞上の特異的TCRにより結合され、それによりそのT細胞の活性を改変する。抗原提示細胞によるTリンパ球の適正な活性化は、TCRの刺激だけでなく、その共受容体の共同かつ調和的なエンゲージメントも必要とする。

20

【0089】

Tヘルパー細胞（TH細胞）は、形質細胞および記憶B細胞へのB細胞の成熟、ならびに細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化を含む、免疫学的過程において他の白血球細胞を支援する。これらの細胞は、表面でCD4糖タンパク質を発現するため、CD4⁺ T細胞としても公知である。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞（APC）の表面で発現されるMHCクラスII分子によりペプチド抗原を提示されると、活性化されるようになる。それらは、活性化されると、急速に分裂して、活性免疫応答を調節または支援する、サイトカインと呼ばれる小タンパク質を分泌する。

30

【0090】

細胞傷害性T細胞（TC細胞、またはCTL）はウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、移植片拒絶にも関与する。これらの細胞は、それらの表面でCD8糖タンパク質を発現するため、CD8⁺ T細胞としても公知である。これらの細胞は、全ての有核細胞の表面に存在するMHCクラスI分子と会合した抗原に結合することにより、それらの標的を認識する。

40

【0091】

制御性T細胞（Treg細胞）は、正式にはサプレッサーT細胞として公知であり、免疫寛容の維持に不可欠である。それらの主要な役割は、免疫反応の終了に向かってT細胞を介した免疫を停止させること、および胸腺において負の選択の過程を回避する自己反応性T細胞を抑制することである。

【0092】

TCRは内在性膜タンパク質の複合体であり、特異的MHC提示抗原認識による刺激およびクロノタイプ特異的 / ヘテロダイマーによる結合が転写の活性化ならびにそれに続く増幅およびエフェクター機能（CD8⁺ T細胞における細胞傷害活性およびCD4⁺ T細胞におけるサイトカイン分泌など）をもたらす。この活性化は、タンパク質リン酸化

50

、イノシトールリン酸の放出および細胞内カルシウムレベルの上昇などの下流シグナル伝達経路に細胞外リガンド事象を結びつける、以下に詳述される受容体複合体の他のサブユニットを含む。

【0093】

C D 3 、 、 および サブユニットの細胞内部分は、I T A M (免疫受容体チロシン依存性活性化モチーフ)と称される配列モチーフのコピーを含有する。I T A Mは、タンパク質チロシンキナーゼの基質として、そしてリン酸化後に、さらに他のキナーゼのS H 2ドメインの結合部位として働き得る。活性化T細胞受容体へのプロテインキナーゼの動員の調節および機序は、キナーゼのS y kファミリー(Z A P - 7 0)およびS r cファミリー(L c k)の両方の要素を含む。

10

【0094】

先の詳述されたT C R刺激は、抗原特異的または抗原非特異的(ポリクローナル)であり得る。適切な抗原特異的T C R活性化物質としては、典型的には抗原提示細胞(A P C)の文脈にある、M H C分子に結合した抗原が挙げられる。ポリクローナルT C R活性化物質は、特異的抗原の非存在下で、特異的T C Rエンゲージメントに関連したシグナル伝達および転写活性化経路を開始できる。適切なポリクローナルT細胞活性化物質としては、T細胞受容体/C D 3複合体、例えば本明細書に記載されるサブユニットを結合および架橋する抗体が挙げられる。T細胞受容体を架橋する例示的抗体としては、H I T 3 a、U C H T 1およびO K T 3モノクローナル抗体が挙げられる。刺激は、先に述べられた機能的効果を誘導するよう当該技術分野で公知の量および条件で提供される。T C R刺激のための様々な非限定的例(抗原特異的およびポリクローナルの両方)が、本明細書の以下の実施例に示されている。

20

【0095】

別の実施形態において、集団は、C D 8⁺T細胞を含む。別の実施形態において、T細胞は、C D 8⁺T細胞である。別の実施形態において、細胞は、遺伝子操作または組換えされている(例えば、所望の抗原特異性を発揮するために)。例えば別の実施形態において、細胞は、癌細胞または病原(例えば、ウイルス)に対抗してそれらを誘導しなおすために予め設計されたT C Rを発現するように遺伝子操作されたリンパ球(例えば、C T Lなどの精製T細胞)である。非限定的例によれば、T細胞は、多くの固形腫瘍、例えば滑膜肉腫で発現される抗原N Y - E S O - 1に対抗して誘導されるT C Rを発現するように操作されている。別の実施形態において、細胞は、癌細胞または病原に対抗してそれらを誘導しなおすためにキメラ抗原受容体(C A R)を発現するように遺伝子操作された末梢血単核細胞である。例えば限定ではないが、C D 1 9を標的とするC A R - T細胞を、急性リンパ芽急性白血病などのB細胞悪性腫瘍の処置に用いることができる。別の実施形態において、細胞は、生物学的機能を増強する遺伝子を発現するように遺伝子操作された末梢血単核細胞である。例えば非限定的に、そのような遺伝子は、膜結合サイトカインおよびサイトカイン受容体(例えば、I L - 2およびI L - 2 R)を包含し得る。主要関連抗原g p 1 0 0_{2 5 - 3 3}または4 - 1 B B Lなどの共刺激分子に対して誘導されるT C Rを発現する、遺伝子修飾された細胞の使用に関する特定の追加的な非限定的例が、以下の実施例に記載される。

30

40

【0096】

別の実施形態において、集団は、C D 4⁺T細胞を含む。別の実施形態において、集団は、骨髄細胞を含む。別の実施形態において、集団は、C D 8⁺T細胞とC D 4⁺T細胞と骨髄細胞との組み合わせを含む。

【0097】

別の実施形態において、N T B - Aエクトドメインポリペプチドまたはアゴニストとのインキュベーションは、T細胞活性化に関連する活性化マーカーおよび/またはサイトカイン(例えば、I F N - などのT c 1活性化マーカー)を誘導またはアップレギュレートするのに十分な量および条件で実施される。有利には、N T B - Aエクトドメインポリペプチドまたはアゴニストとのインキュベーションは、T細胞上でのC D 1 3 7発現をア

50

ップレギュレートするように実施される。そのような例示的な有利な条件を、以下に明記する。

【0098】

したがって特定の有利な実施形態によれば、インキュベーションは、T細胞受容体(TCR)刺激の存在下で実施される。別の実施形態において、TCR刺激は、抗原非特異的(例えば、結合により受容体を活性化するCD3に特異的な抗体、例えばOKT3を用いて実施される)または抗原特異的(適切な抗原提示細胞および抗原を用いる)であり得る。

【0099】

癌の処置の状況では、抗原特異的刺激は、典型的には腫瘍関連抗原への刺激を利用する。用語「腫瘍関連抗原」(TAA)は、腫瘍または腫瘍細胞(複数可)に関連する(によって運搬される、発現される、生成される、分泌されるなど)任意のタンパク質、ペプチド、または抗原を指す。腫瘍関連抗原は、(ほぼ)排他的に腫瘍または腫瘍細胞(複数可)に関連し得るが、健常な正常細胞には関連し得ず、または健常で正常な組織もしくは細胞に比較して腫瘍組織もしくは腫瘍細胞(複数可)中で過剰発現され得る(例えば、2倍、5倍、10倍、50倍、100倍、1000倍またはそれを超える)。より詳細にはTAAは、腫瘍細胞のMHC決定基により提示される(処理された形態で)ことが可能な抗原である。つまり腫瘍関連抗原は、MHC分子を発現する腫瘍または腫瘍細胞のみと会合する可能性がある。周知のTAAの非限定的例は、MART-1、gp100₂₀₉₋₂₁₇、gp100₁₅₄₋₁₆₃、CSPG4、NY-ESO、MAGE-A1、チロシナーゼである。

【0100】

特定のさらなる有利な実施形態によれば、インキュベーションは、フィーダー細胞(例えば)の存在下で実施される。

【0101】

用語「フィーダー細胞」は、第二のタイプの細胞が保持および増殖され得る環境を提供するために、第二のタイプの細胞と共培養される第一のタイプの細胞を一般に指す。フィーダー細胞は、それらが支持している細胞と異なる種のものであり得る。本発明の目的では、この用語は、Fc受容体を担うアクセサリ細胞を具体的に指し、それらは典型的には増大されるT細胞含有集団とアロ反応性である。言い換えれば、フィーダー細胞は、増大されるT細胞含有集団と組織適合性がある必要はなく、特定の有利な実施形態において、2つの集団は典型的にはHLA不適合である。本発明の実施形態で用いられるフィーダー細胞の典型的な例は、同種の正常ドナーの末梢血単核細胞、PBMCである。典型的そして有利には、そのようなフィーダー細胞の使用は、抗原非特異的TCR刺激と共同的に、例えば本明細書に詳述されるように、抗原非特異的刺激抗体と共にインキュベートすることにより、実施される。

【0102】

さらなる有利な実施形態によれば、養子細胞療法のTIL組成物が、放射線照射されたPBMC(増殖が不可能な)を用いて調製される。例えばPBMCは、簡便には細胞を6000RADに暴露することで放射線により減弱され得る。別の実施形態において、養子細胞療法のTIL組成物は、抗原特異的刺激を提供するために、抗原提示細胞および抗原を担う不活性粒子を含む人工抗原提示物質を用いて調製される。

【0103】

本発明のポリペプチドは、より安全でより効果的なT細胞活性化を生成する上で、IL-2よりも予想外に優れていることが実証された。したがってIL-2の使用を、実質的に減少させることができ、さらに本発明のポリペプチドに完全に置き換えることさえできる。したがって別の実施形態において、インキュベーションは、外因性IL-2を添加せずに有利に実施される。特定の理論または作用機序に結びつけられることを望むものではないが、本発明の実施形態は、エフェクターT細胞活性(例えば、CTL活性)が増大され、一方で制御性T細胞活性が最小限である、そのような改善された細胞組成物を対象と

10

20

30

40

50

する。

【0104】

別の実施形態において、インキュベーションは、 $300 \sim 6000 \text{ IU/ml}$ の範囲内の外因性IL-2を添加して実施される。別の実施形態において、インキュベーションは、外因性CD137リガンドまたはそのアゴニストの存在下で実施される。

【0105】

本明細書で用いられる用語「内因性」は、その分子が生物体または組織または細胞内で産生または合成されたことを意味する。用語「外因性」は、この抗原または増強分子が細胞または組織の外部から導入されたことを意味する。

【0106】

例えば非限定的に、TIL組成物は、 $1 \text{ ng/ml} \sim 1 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $10 \sim 100 \text{ ng/ml}$ の抗CD3抗体（例えば、 30 ng/ml のOKT3抗体）、および $1 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $10 \sim 50 \text{ ng/ml}$ のNTB-Aエクトドメインポリペプチドの存在下で、 $200:1 \sim 1:300$ 、例えば $1:200 \sim 1:100$ のTIL（または本明細書に記載されるようなT細胞）対PBMC比でTILをPBMCとインキュベートすることにより得られる。インキュベーションは、 $3 \sim 15$ 日間、好ましくは $8 \sim 12$ 日間、実施され得る。細胞組成物を生成するための追加の方法およびプロトコルは、本明細書の実施例の節に例示される。

【0107】

特定のプロトコルによれば、患者の腫瘍から得られたTILは、先に記載されたREP増殖のステップの前にエキスポで培養できる。例えばTILは、抗CD3抗体およびフィーダー細胞の添加の前に、IL-2（例えば、 $300 \sim 6,000 \text{ IU/ml}$ ）の存在下で最大28日まで予備培養できる。様々な実施形態によれば、本発明のNTB-Aエクトドメインポリペプチドが、この予備培養ステップで、例えば $10 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ でさらに補充され（IL-2を含む、または含まず）、T細胞応答がモニタリングされる。

【0108】

幾つかの実施形態において、得られたTIL組成物は、 $10^8 \sim 10^{12}$ で、または別の実施形態では $10^6 \sim 10^{12}$ 細胞/患者で、例えば $10^{10} \sim 10^6$ 細胞/患者で、それを必要とする対象に投与できる。

【0109】

様々な実施形態において、本発明の方法は、T細胞増大および増殖を提供する。特別な実施形態において、NTB-Aエクトドメインまたはアゴニストとのインキュベーションは、T細胞数を少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍または少なくとも100倍、増加させるように実施される。特定の実施形態によれば、例えば改善されたREPプロトコルが用いられる場合、NTB-Aエクトドメインまたはアゴニストとのインキュベーションは、少なくとも200倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、少なくとも2000倍、少なくとも5000倍、少なくとも7000倍または少なくとも10,000倍増加したT細胞数を典型的にもたらす。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【0110】

別の態様において、本発明の方法により調製された細胞組成物が提供される。別の実施形態において、細胞組成物は、それを必要とするレシピエント対象への養子移入に適している。他に断りがなければ、本明細書で用いられる用語「養子移入」は、予め感作された免疫学的物質（例えば、細胞または血清）がレシピエントに移入される受動免疫療法の一形態を指す。

【0111】

語句「養子移入免疫療法」、「養子細胞療法」および「養子細胞免疫療法」は本明細書において互換的に用いられ、本発明の細胞組成物などのエフェクター免疫拮抗細胞を、それを必要とする対象に投与（養子移入）して、癌または感染性疾患の発症または症状を軽減または改善する、治療または防御レジメンまたはモダリティーを表す。

10

20

30

40

50

【0112】

細胞組成物は、T細胞含有集団を有効量で含み得る。例えば養子移入免疫療法に効果的な量は、抗腫瘍応答などの有益な免疫応答を誘導または増強するのに十分な量、例えば $10^6 \sim 10^{12}$ 個の細胞である。特にヒト対象用の、インビボ投与に適した細胞調製物は、医薬的に許容し得る賦形剤または希釈剤を含み得るが、そのような調製物は、病原物質、毒素、化膿素ならびに医薬的に許容し得ると認識されていない任意の他の生物学および非生物学的物質による混入が十分に回避されていることが理解されなければならない。例えば非限定的に、養子移入免疫療法用のT細胞は、滅菌生理食塩水を2%ヒトアルブミン、および場合によりIL-2（例えば、 300 IU/ml ）と共に含有する、注射に適した緩衝液中に簡便に懸濁され得る。

10

【0113】

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

【0114】

用語「組織適合性」は、異なる個体間の組織の類似性を指す。組織適合性のレベルは、患者およびドナーがどれほど良好に適合するかを表す。主要組織適合性決定因子は、ヒト白血球抗原（HLA）である。HLAの型付けが、潜在的ドナーと潜在的レシピエントとの間で実施され、2つのHLAがどれ程密接に適合するかを決定する。本明細書で用いられる用語「組織適合性」は、HLA抗原の6つ全て（2つのA抗原、2つのB抗原および2つのDR抗原）がドナーとレシピエント間で同一である実施形態を指す。

20

【0115】

しかし他の実施形態において、ドナーとレシピエントが完全に適合を有さなくとも、2つ以上の抗原で、例えば6つのうちの5つの抗原で「不適合」である、または他の実施形態で、6つのうちの4つもしくは6つのうちの3つで不適合である、ドナーおよびレシピエントが、本発明の特定の実施形態により包含され得る。本明細書で用いられる用語「実質的に組織適合性がある」は、HLA抗原の6つのうち5つがドナーとレシピエント間で同一である実施形態を指す。

【0116】

したがって幾つかの実施形態によれば、本発明は、

i) それを必要とする対象から（または対象と組織適合性がある、もしくは実質的に組織適合性があるドナーから）T細胞含有集団を得ること、

30

ii) T細胞含有細胞集団を有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと共にエキスピボでインキュベートすること、および

iii) 得られたT細胞含有細胞集団を上記対象に投与すること、を含む方法に関する。

【0117】

他の実施形態によれば、本発明は、それを必要とする対象における癌を処置する方法であって、

i) 対象から（または対象と組織適合性があるドナーから）T細胞含有集団を得ること、

40

ii) T細胞含有細胞集団を有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと共にエキスピボでインキュベートすること（例えば、それによりT細胞上のCD137発現をアップレギュレートするように）、および

iii) 得られたT細胞含有細胞集団を上記対象に投与し（例えば、それにより抗腫瘍免疫応答を誘導または増強するように）、それにより上記対象における癌を処置すること、を含む、方法に関する。

【0118】

他の実施形態によれば、本発明は、それを必要とする対象におけるT細胞を介した病理を処置する方法であって、

50

i) 対象から（または対象と組織適合性があるドナーから）T細胞含有集団を得ること、

ii) T細胞含有細胞集団を有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと共にエキスピボでインキュベートすること（例えば、それによりT細胞上でのCD137発現をアップレギュレートするように）、および

iii) 得られたT細胞含有細胞集団を上記対象に投与し、それにより上記対象における癌を処置すること、を含む、方法に関する。

【0119】

様々な有益な実施形態によれば、ステップii)は、抗原刺激の存在下で、そして/または本明細書に記載される方法およびプロトコルに従って実施される。

【0120】

医薬組成物、キットおよび治療的組み合わせ

他の実施形態において、本発明の方法で用いられるNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストは、場合により医薬的に許容し得る担体、賦形剤または希釈剤をさらに含む、医薬組成物の形態で提供される。

【0121】

上記組成物は、非限定的に溶液、懸濁液、使用前に適切なビヒクルまたは希釈剤で再構成される凍結乾燥粉末、カプセル、錠剤、徐放性配合剤などをはじめとする、患者への投与に適した任意の医薬形態であり得る。組成物は、好ましくは精製された形態の、治療有効量の本発明の薬剤、および医薬賦形剤を含み得る。本明細書で用いられる「医薬賦形剤」は、医薬投与に適合性がある、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤など、ならびにそれらの組み合わせを包含する。本明細書では以後、互換的に用いられ得る語句「治療上許容し得る担体」および「医薬的に供し得る担体」は、生物体への著しい刺激を誘発せず、投与された化合物の生物活性および特性を抑制しない担体または希釈剤を指す。化合物は、補助的、追加的、または増強された治療的機能を提供する他の活性化合物も含有し得る。別の実施形態において、組成物は、本質的にNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと、1種または複数の医薬的賦形剤からなる。別の実施形態において、組成物は、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと、1種または複数の医薬賦形剤からなる。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【0122】

本発明の医薬組成物は、当該技術分野で周知の工程により、例えば従来の混合、溶解、造粒、研磨、粉碎、糖剤作製（*dragagee-making*）、研和、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥工程により、製造され得る。本発明の医薬組成物は、その意図される投与経路と適合性があるように配合される。投与を果たすための方法は、当業者に公知である。組成物を配合するための適切な賦形剤および様式の例は、E. W. Martinによる「*Remington's Pharmaceutical Science*」の最新版に記載される。

【0123】

本発明による医薬組成物（例えば、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含有する）は、典型的には注射または輸液に適した液体配合剤である。医薬組成物の投与の例としては、経口摂取、吸入、静脈内および連続輸液、腹腔内、筋肉内、体腔内、皮下、皮膚、または経皮投与が挙げられる。特定の特別な実施形態によれば、組成物は、病巣内（例えば、腫瘍内）投与に適している。別の実施形態において、組成物は、静脈内投与に適している。

【0124】

例えば、生理食塩液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液を、特に注射溶液用の、液体担体として用いることができる。適切な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂

10

20

30

40

50

粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。

【0125】

静脈内投与に用いられる溶液または懸濁液としては、典型的には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL (商標) (BASF、ニュージャージー州パーシッパニー所在)、エタノール、またはポリオールが挙げられる。全ての例において、組成物は、無菌でありかつ容易な注射針通過性 (syringeability) が得られるような流動体でなければならない。適切な流動性は、レシチンまたは界面活性剤を使用して得ることができる。組成物はまた、製造および貯蔵の条件下で安定していなければならない。微生物の予防は、抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成され得る。多くの場合において、等張剤 (糖)、ポリアルコール (マンニトールおよびソルビトール) または塩化ナトリウムが、組成物中に含有されてよい。組成物の持続吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを添加することにより達成され得る。必要に応じて、組成物は、注射部位の痛みを緩和するリグノカインなどの局所麻酔剤を含んでもよい。一般的に成分は、別々に、または単位投与剤型と一緒に混合して、例えば活性剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密閉容器中の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給される。組成物が輸液により投与される場合は、それを滅菌医薬等級水または生理食塩水を含む輸液ボトルを用いて分配できる。組成物が注射により投与される場合は、成分が投与前に混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供できる。

10

【0126】

経口組成物は、不活性希釈剤または摂食可能な担体を含む。組成物は、ゼラチンに封入するか錠剤に打錠できる。経口的治療の目的では、活性剤は、賦形剤と共に取り込まれ、錠剤、トローチまたはカプセル剤に入れられ得る。薬学的に適合性がある結合剤またはアジュバント物質が、組成物に含まれ得る。錠剤、トローチ、およびカプセル剤は、場合により、微結晶性セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチンなどの結合剤；スターチもしくはラクトースなどの賦形剤；アルギン酸、Primogel、もしくはコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；コロイド性二酸化ケイ素などの滑剤；または甘味剤；または香味剤を含有してよい。

20

【0127】

組成物はまた、経粘膜または経皮経路により投与され得る。例えばFc部分を含む抗体は、腸、口、または肺の粘膜を通過する (Fc受容体を介して) ことが可能であってもよい。経粘膜投与は、ロゼンジ、鼻腔スプレー、吸入器、または坐剤の使用を通して実現され得る。経皮投与もまた、当該技術分野で公知の軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームを含む組成物の使用により実現され得る。経粘膜または経皮投与の場合、透過されるバリアに適した浸透剤が用いられる。吸入による投与の場合、抗体が、噴射剤 (例えば、液体または気体) またはネブライザーを含む加圧式容器またはディスペンサーからエアロゾルスプレー中で送達される。組成物は、坐剤として、従来の結合剤およびトリグリセリドなどの担体と共に配合され得る。

30

【0128】

皮内または皮下適用に使用される溶液または懸濁液としては、典型的には以下の成分の少なくとも1種が挙げられる：水、生理食塩液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などの緩衝剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張化剤。pHは、酸または塩基を用いて調整され得る。そのような調製剤は、アンプル、ディスポーザブルシリンジ、または反復投与バイアルに封入され得る。

40

【0129】

特定の実施形態において、ポリペプチド活性剤 (例えば、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニスト) は、身体からの急速な排出に対しポリペプチドを防御するように担

50

体と共に調製される。生分解性ポリマー（例えば、エチレンビニル酢酸塩、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が多くの場合に用いられる。そのような配合剤の調製方法は、当業者に公知である。リポソーム懸濁液もまた、医薬的に許容し得る担体として用いることができる。リポソームは、当該技術分野で公知の確立された方法に従って調製され得る（例えば、米国特許第4,522,811号）。別の特別な実施形態において、PEG部分または糖脂質を含むリポソームを有利に用いて血漿滞留を増進し、かつ/または肝臓取込みを減少させることができる。

【0130】

幾つかの実施形態において、より大きなリポソーム（例えば、300nm以上）が用いられ、それは優先的に脾臓による取込みおよびクリアランスを媒介し、低減した肝臓クリアランスを有する。別の実施形態において、より小さなリポソーム（例えば、40nm以下）が用いられ、それは肝臓の取込みおよびクリアランスを優先的に媒介する。さらに別の実施形態において、40～300nmのリポソームが用いられ、それは血漿滞留を増進し得る。他の実施形態において、リポソームは、PEGなどのポリマーをさらに含み得る（例えば、Litzinger et al., Biochim Biophys Acta, 1994 Feb 23; 1190(1): 99-107 参照）。米国特許出願公開第2011160642号には、肝臓および脾臓での蓄積が減少したペグ化リポソーム配合剤が開示されている。細網内皮系による取込みを回避し、より長時間循環するように配合された様々なリポソームが、米国特許第6,284,267号に記載されている。

【0131】

加えて、本発明のNTB-Aエクトドメインまたはアゴニストを、異種ポリペプチド、薬物、放射線核種、または毒素などの様々なエフェクター分子と共に投与できる。したがって幾つかの実施形態において、NTB-Aエクトドメインまたはアゴニストは、癌の処置、例えば放射線照射または化学療法と併せて（同時または連続で）投与され得る。

【0132】

連続および間欠静脈内投与を、埋込み型または体外ポンプ（例えば、INFUSAIDポンプ）を用いて実現することもできる。そのようなポンプの使用および必要なパラメータに対する投与プロトコルの調整は、十分に当業者の能力内である。

【0133】

別の実施形態において、本発明のNTB-Aポリペプチドまたはアゴニストの投与または添加は、CD137リガンド（例えば、ヒトCD137リガンドまたはその細胞外部分）またはそのアゴニスト（CD137のその同族リガンドでの活性化に関連する生物学的機能を誘導する、抗CD137抗体など）の投与と併せて（同時にまたは連続で）実施され得る。市販の、または臨床試験下にあるそのような抗CD137抗体の非限定的例としては、例えばBristol Myers Squibb (BMS; ニュージャージー州プリンストン所在) カタログ番号663513の、例えば10～20ng/mlで使用され得る完全ヒト化IgG4モノクローナル抗体、およびR&D Systems カタログ番号AF838の、例えば20～40ng/mlで使用され得るポリクローナルヤギ抗4-1BB抗体が挙げられる。ヒトCD137のアミノ酸配列は、アクセション番号Q07011に見出され得る。例えば全長ヒトCD137は、以下のアミノ酸配列を有し得る：MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LD GKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLT LRF SVVKR GRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEEE GGCEL (SEQ ID NO: 4)。ヒトCD137リガンドのアミノ酸配列は、アクセション番号NP_003802.1に見出され得る。例えばヒトCD137リガンド（細胞外部分）は、以下のアミノ酸配列を有し得る：MREGPELSPD DPAGLLDLRQ GMFAQLVAQN VLLIDGPLSW YSDPGLAGVS LTGGLSYKED TKELVVAKAG VYYVFFQLEL RRVVAGEGSG SVSLALHLQP LRSAAGAAAL ALTVDLPPAS SEARNSAFGF QGRLLHLSAG QRLG VHLHTE ARARHAWQLT QGATVLGLFR VTPEIPAGLP SPRSE (SEQ ID NO: 5)。

【0134】

別の態様において、1)NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと、2)CD137リガンドまたはそのアゴニストを含む単離されたポリペプチドと、場合により3)医薬的に許容し得る担体と、の治療的組み合わせが提供される。別の実施形態において、組み合わせは、ヒトNTB-Aエクトドメインを含む。別の実施形態において、組み合わせは、ヒトCD137リガンドを含む。別の実施形態において、アゴニストは、抗体（例えば、NTB-A特異的またはCD137特異的）である。

【0135】

別の実施形態において、本発明のNTB-Aポリペプチドまたはアゴニストの投与または添加は、他の免疫モジュレータ、例えば免疫細胞機能への修飾作用を示すシグナル伝達受容体ターゲティング試薬の投与と併せて（同時にまたは連続で）実施され得る。そのような試薬の例としては、例えばCTLA-4、PD-1またはPD-L1のアンタゴニストまたは阻害剤（抗体など）が挙げられる。市販の、または臨床試験下にある抗体の非限定的例としては、CTLAブロック抗体（1~3mg/kgで臨床における使用が認可されたYERVOY（商標）（BMS））、PD-1ブロック抗体（KEYTRUDA（商標）（Merck）、0.5~2mg/kg；OPDIVO（商標）（BMS）、1~3mg/kg）、およびPD-L1ターゲティング抗体（ROCHE、臨床試験中）が挙げられる。

10

【0136】

別の態様において、1)NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと、2)免疫モジュレータと、場合により3)医薬的に許容し得る担体と、を含む治療的組み合わせが提供される。

20

【0137】

別の実施形態において、組み合わせは、ヒトNTB-Aエクトドメインを含む。別の実施形態において、組み合わせは、CTLA-4、PD-1またはPD-L1のアンタゴニストまたは阻害剤を含む。別の実施形態において、アゴニストは、抗体（例えば、NTB-A特異的、CTLA-4特異的、PD-1特異的またはPD-L1特異的）である。

【0138】

他の態様によれば、本発明は、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含むポリペプチドと、本発明の方法においてこのポリペプチドを使用するための使用説明書と、を含むキットを対象とする。

30

【0139】

別の実施形態において、組成物は、追加の抗原をさらに含むワクチンの形態で投与されない。別の実施形態において、組成物は、ワクチン処置に適合させた治療レジメンにより投与されない。ワクチンおよびワクチン処置プロトコルは、当該技術分野で周知である。ワクチンは、所望の免疫応答が誘発される1つまたは複数の抗原（例えば、弱毒化癌細胞または腫瘍関連抗原）を典型的に含有し、多くの場合、免疫応答を増幅または増強するのに用いられる追加のアジュバント（例えば、ミョウバンまたは鉱物油）を含む。

【0140】

例えば非限定的に、本発明のNTB-A含有ポリペプチドまたはアゴニストの適切な用量範囲は、7~90日の投与間隔で投与される0.1mg/kg~20mg/kgであり得る。処置は、処置する医師により維持または調整されて、臨床利益を維持し全体的処置計画の規定毒性を回避できる。

40

【0141】

対象および治療的使用

本発明の特定の実施形態によれば、それを必要とする対象における癌を処置する際に使用するための、T細胞含有細胞集団を治療有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストと共にエキスピボでインキュベートするステップを含む方法により調製された細胞組成物が提供される。

【0142】

50

本発明の特定の別の実施形態によれば、それを必要とする対象における癌を処置するために使用するのための、治療有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含む医薬組成物が提供される。

【0143】

本発明の特定の追加の実施形態によれば、T細胞死を低減または阻害するために使用するのための、治療有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含む医薬組成物が提供される。

【0144】

本発明の特定のさらなる実施形態によれば、それを必要とする対象における血球減少症を処置または予防するために使用するのための、治療有効量の単離されたNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含む医薬組成物が提供される。

10

【0145】

様々な実施形態において、組成物およびその使用は、本明細書に詳述されている。

【0146】

別の態様において、それを必要とする対象における癌を処置する方法であって、本発明の細胞組成物を対象に投与し、それにより上記対象における癌を処置することを含む、方法が提供される。別の実施形態によれば、本発明の細胞組成物は、様々な他のT細胞依存性病理および状態、即ち有益なT細胞応答により軽減され得る状態の処置に用いられ得る。例えば非限定的に、様々な腫瘍および感染（例えば、ウイルス）は、CTLエピトープなどの特徴的なT細胞エピトープにより明示される。本発明の方法によるこれらのエピトープを対象とするT細胞の特異的活性化および増大は、そのような状態を処置するのに有益であり得る。

20

【0147】

本発明の組成物は、増殖性障害、詳細には悪性障害の処置のための様々な実施形態において意図される。本発明を説明するために本明細書で用いられる「増殖性障害」、「癌」、「腫瘍」および「悪性腫瘍」は全て、組織または臓器の過形成に等しく関連する。組織がリンパ系または免疫系の一部である場合、悪性腫瘍細胞は循環細胞の非固形腫瘍を包含し得る。他の組織または臓器の悪性腫瘍は、固形腫瘍を生成し得る。一般に本発明の組成物および方法は、非固形および固形腫瘍の処置に用いられ得る。用語「癌」または「癌細胞」は、正常な組織または組織細胞と識別される特徴を有する、新生物内に見出される組織または細胞を示すために本明細書で用いられる。

30

【0148】

本発明の方法の特定の好ましい実施形態によれば、細胞組成物は、対象と組織適合性がある（例えば、自家細胞またはMHCII適合の同種細胞）。

【0149】

別の態様において、それを必要とする対象における癌を処置する方法であって、治療有効量のNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを対象に投与し、それにより上記対象における癌を処置することを含む、方法が提供される。

【0150】

別の態様において、それを必要とする対象におけるT細胞依存性病理を処置する方法であって、治療有効量のNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを対象に投与し、それにより上記対象におけるT細胞依存性病理を処置することを含む、方法が提供される。

40

【0151】

「有効量」または「治療有効量」は、本発明の方法において有益な結果を発揮するのに十分な量を指す。より具体的には、治療有効量は、処置される対象の障害（例えば、癌）の症状を予防、軽減、もしくは改善するのに、または処置される対象の生存を延長するのに効果的な有効成分（例えば、NTB-Aエクトドメインまたはエフェクター細胞）の量を意味する。インビトロ細胞培養法に関連して、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストの有効量は、非限定的に、T細胞増殖、活性化マーカー（例えば、CD137）

50

のアップレギュレーションおよび活性化により誘導されたT細胞死の減少を含む、アゴニストNTB-A活性を発揮するのに十分な量である。

【0152】

治療有効量の決定は、特に本明細書で提供された詳細な開示に照らせば、十分に当業者の能力内である。本発明の方法で用いられる任意の調製物について、投与量または治療有効量は、最初にインビトロおよび細胞培養アッセイから推定され得る。例えば用量は、所望の濃度または力価を実現するために動物モデルで配合され得る。そのような情報を利用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定できる。

【0153】

本明細書に記載される有効成分の毒性および治療有効性は、インビトロ、細胞培養または実験動物において標準医薬手順により決定できる。これらのインビトロおよび細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータを、ヒトの使用のための投与量範囲を配合するのに用いることができる。投与量は、用いられる投与剤型、および利用される投与経路に応じて変動し得る。厳密な配合、投与経路、および投与量は、個々の医師が患者の状態を考慮して選択できる（例えば、Fingl, E. et al. (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Ch. 1, p. 1. 参照）。

【0154】

別の実施形態において、本発明の方法により処置される対象は、実質的なNTB-A表面発現の欠如を特徴とする腫瘍に冒されている。別の実施形態において、腫瘍は、NTB-A過剰発現を特徴としない。別の実施形態において、腫瘍は、固形腫瘍である。別の実施形態において、対象は、CD137の表面発現を特徴とする腫瘍に冒されている。別の実施形態において、癌は、黒色腫、尿管癌、婦人科癌、頭頸部癌、原発性脳腫瘍、膀胱癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸癌および他の腸管癌、骨悪性腫瘍、結合および軟組織腫瘍、ならびに皮膚癌からなる群から選択される。別の実施形態において、癌は、黒色腫、膀胱癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮頸癌および結腸癌からなる群から選択される。別の実施形態において、癌は、膀胱癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮頸癌および結腸癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、癌は、黒色腫である。別の特別な実施形態において、癌は、黒色腫以外である。別の特別な実施形態において、癌は、造血系腫瘍以外である。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【0155】

受容体およびポリペプチドマーカの表面発現に関して用いられる用語「実質的な」および「実質的に」は、免疫アッセイなどの従来の方法により検出可能な量での発現を表す。特定の実施形態において、実質的なNTB-A表面発現の欠如を特徴とする腫瘍は、腫瘍細胞の表面で検出されるNTB-Aの量が、リンパ球などの、内因性に発現するNTB-Aに特徴的な量の10%を超えない、好ましくは5%未満、より好ましくは1%未満、最も好ましくは0.5%未満である腫瘍を意味する。

【0156】

別の実施形態において、対象は、養子免疫療法、例えば本発明のT細胞含有組成物をさらに受けた、または現在受けている。

【0157】

別の実施形態において、対象は、血球減少症（例えば、放射線照射または化学療法による）の対象、または血球減少症を発症するリスクがある対象である。別の実施形態において、対象は、リンパ球減少症に冒されているか、またはリンパ球減少症を発症するリスクがある。別の実施形態において、対象は、活動性の感染性疾患、または急性もしくは病的炎症に冒されていない。別の実施形態において、対象は、X連鎖リンパ増殖性疾患（XLP）に冒されていない。別の実施形態において、対象は、自己免疫疾患に冒されていない。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【0158】

本発明のポリペプチドは、より安全で効果的なT細胞活性化をもたらすことに関して、IL-2よりも予想外に優れていることが実証された。したがってIL-2の使用を、実質的に減少させることができ、本発明のポリペプチドに完全に交換することさえ可能である。したがって別の実施形態において、本発明の方法は、外因性IL-2を添加せずに実行される（インビボおよび/またはエクスピボで）。別の実施形態において、IL-2の使用は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%および好ましくは少なくとも90%減少され得る。

【0159】

例えば、IL-2（Proleukin（登録商標））は現在、癌の免疫療法に適応され、例えば600,000国際単位/kg（0.037mg/kg）用量で15分間の静脈内輸液を8時間ごとに最大14回投与され；インビトロでのT細胞増殖用の標準用量は、例えば6000U/mlである。本発明の実施形態によれば、減少されたIL-2レベルを、本明細書に詳述されるように用いることができる。例えば非限定的には、以下の実施例は、6000U/mlから300U/mlへの、即ち標準用量の20%への、細胞培養で用いられるIL-2の良好な減少を実証している。特定の特別な実施形態において、本発明の方法を、1000U/ml以下のIL-2を用いて、または他の実施形態において800、600、400、300もしくは200U/ml以下の外から添加されるIL-2をインビトロで用いて、利用できる。

【0160】

別の態様において、本発明は、T細胞を、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含む単離されたポリペプチドの治療有効量と接触させることを含む、T細胞死を低減または阻害する方法を提供する。

【0161】

別の実施形態において、接触は、インビトロ（例えば、エクスピボ）で実施される。別の実施形態において、接触は、インビボで実施される。別の実施形態において、方法は、血球減少症に罹患した対象またはそれを発症するリスクのある対象において、T細胞死を低減または阻害するために用いられ得る。別の実施形態において、方法は、それを必要とするレシipient対象へのT細胞の投与後に、T細胞死を低減または阻害するために用いられる。

【0162】

別の実施形態において、対象は、血球減少症（例えば、放射線照射または化学療法による）の対象、または血球減少症を発症するリスクのある対象である。別の実施形態において、対象は、リンパ球減少症に冒されているか、またはリンパ球減少症を発症するリスクがある。別の実施形態において、対象は、活動性の感染性疾患、または急性もしくは病的炎症に冒されていない。別の実施形態において、対象は、X連鎖リンパ増殖性疾患（XLP）に冒されていない。

【0163】

別の態様において、それを必要とする対象における血球減少症を処置または予防する方法であって、治療有効量のNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを対象に投与し、それにより上記対象における血球減少症を処置または予防することを含む、方法が提供される。

【0164】

本明細書で用いられる用語「血球減少症」は、循環血中の細胞要素の減少を指す。血球減少症は様々な原因で生じる可能性があり、血中の細胞数の全般的減少、および白血球減少症における白血球の減少などの、特定の細胞型の特異的減少の両方を包含する。白血球減少症は、循環する白血球細胞（WBC）数の4000個/μL未満への減少である。それは通常、循環する好中球数の減少を特徴とするが、リンパ球数、単球数、好酸球数、または好塩基球数の減少も寄与し得る。したがって免疫機能は、一般に大きく低下する。好中球減少症は、血中好中球数の減少である。重度の好中球減少症は通常、500個/μL未満の絶対好中球数により定義される。それは、単球減少症およびリンパ球減少症を伴う

場合には、より重篤である。リンパ球の総数が成人で1000個/μL未満であるリンパ球減少症は、リンパ球数が全WBC数の20～40%を占めるに過ぎないため、全WBC数に必ずしも反映されない。

【0165】

幾つかの実施形態において、血球減少症は、放射線照射または化学療法に関連する。例えば血球減少症は、高用量化学療法に関連する血球減少症、従来の腫瘍療法に関連する血球減少症、薬物による血球減少症、毒素による血球減少症および放射線による血球減少症であり得る。他の実施形態によれば、血球減少症は、NTB-A経路の損傷に関連しない後天性または先天性免疫不全に関連し得る。したがってXLP患者は、これらの実施形態から明白に除外される。例えば血球減少症はステロイド誘導性であり得、感染性疾患（肝炎、ウイルス性疾患）により誘発もしくは増悪され得、または自己免疫誘導性（例えば、全身エリテマトーデスによる）であり得る。特定の実施形態において、方法は、リンパ球減少症の処置または予防に用いられる。

10

【0166】

特定の別の実施形態において、血球減少症の期間が、減少され得る。例えば血球減少症の期間は、処置開始から12日未満、好ましくは10日未満、より好ましくは8日未満および最も好ましくは7日未満に減少され得る。別の実施形態において、血球減少症の期間は、処置開始から5日未満、4日未満、3日未満、2日未満または1日未満に減少され得る。別の実施形態において、方法は、感染の発生を減少させるのに、そして癌患者における化学療法または放射線療法後の生存率を上昇させるのに有用である。

20

【0167】

追加の実施形態

本発明の特定の例示的実施形態を、以下に記載する。

1. T細胞含有細胞集団をNTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含む単離されたポリペプチドの治療有効量と共にエクスピボでインキュベートするステップを含む、細胞組成物を調製する方法。

2. ポリペプチドまたはアゴニストとのインキュベーションが、T細胞上のCD137発現をアップレギュレートするように実施される、条項1に記載の方法。

3. 集団が、CD8⁺T細胞を含む、条項1～2に記載の方法。

4. インキュベーションが、T細胞受容体(TCR)刺激の存在下で実施される、条項1～3に記載の方法。

30

5. インキュベーションが、フィーダー細胞の存在下で実施される、条項1～4に記載の方法。

6. インキュベーションが、外因性IL-2を添加せずに実施される、条項1～5に記載の方法

7. インキュベーションが、外因性CD137リガンドまたはそのアゴニストの存在下で実施される、条項1～6に記載の方法。

8. 組成物が、細胞ワクチンである、条項1～7に記載の方法。

9. 組成物が、T細胞ワクチンである、条項8に記載の方法。

10. 条項1～9のいずれか1つに記載の方法により調製される細胞組成物。

40

11. それを必要とする対象における癌を処置する薬剤の調製のための、条項10に記載の細胞組成物の使用。

12. 細胞組成物が、上記対象と組織適合性がある、条項11に記載の使用。

13. それを必要とする対象における癌を処置するための薬剤の調製のための、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含む単離されたポリペプチドの治療有効量の使用。

14. 上記ポリペプチドが、ヒトNTB-Aエクトドメインを含む、上記条項のいずれか1つに記載の使用。

15. アゴニストが、NTB-Aエクトドメインに特異的な抗体である、上記条項のいずれか1つに記載の使用。

50

16．アゴニストが、ヒトNTB-Aエクトドメインに特異的な抗体である、条項15に記載の使用。

17．上記対象が、実質的なNTB-A表面発現の欠如を特徴とする腫瘍に冒されている、条項11～13のいずれか1つに記載の使用。

18．上記腫瘍が、固形腫瘍である、条項17に記載の使用。

19．上記対象が、CD137の表面発現を特徴とする腫瘍に冒されている、条項11～13のいずれか1つに記載の使用。

20．上記対象が、血球減少症の対象、または血球減少症を発症するリスクのある対象である、条項11～13のいずれか1つに記載の使用。

21．上記対象が、リンパ球減少症に冒されている、またはリンパ球減少症を発症するリスクがある、条項11～13のいずれか1つに記載の使用。 10

22．上記対象が、活動性の感染性疾患、または急性炎症もしくは病的炎症に冒されていない、条項11～13のいずれか1つに記載の使用。

23．上記対象が、X連鎖リンパ増殖性疾患(XLP)に冒されていない、条項11～13のいずれか1つに記載の使用。

24．外因性IL-2が、上記対象に投与されない、条項11～13のいずれか1つに記載の使用。

25．上記対象にCD137リガンドまたはそのアゴニストを投与することをさらに含む、条項11～13のいずれか1つに記載の使用。

26．T細胞死を低減または阻害するための薬剤の調製のための、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含む単離されたポリペプチドの治療有効量の使用。 20

27．接触が、インビトロで実施される、条項26に記載の使用。

28．接触が、インビボで実施される、条項26に記載の使用。

29．血球減少症に罹患した対象または血球減少症を発症するリスクのある対象において、T細胞死を低減または阻害するための、条項26に記載の使用。

30．それを必要とする対象に投与することを含む、対象における血球減少症を処置または予防するための薬剤の調製のための、NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含むポリペプチドの治療有効量の使用。

31．血球減少症が、放射線照射または化学療法に関連する、条項30に記載の使用。

32．リンパ球減少症の処置または予防のための、条項30に記載の使用。 30

33．上記対象が、活動性の感染性疾患、または急性もしくは病的炎症に冒されていない、条項30に記載の使用。

34．上記対象が、X連鎖リンパ増殖性疾患(XLP)に冒されていない、条項30に記載の使用。

35．上記対象が、癌に冒されていない、条項30に記載の使用。

36．上記ポリペプチドが、ヒトNTB-Aエクトドメインを含む、条項26～35のいずれか1つに記載の使用。

37．アゴニストが、ヒトNTB-Aエクトドメインに特異的な抗体である、条項26～35のいずれか1つに記載の使用。

38．1) NTB-Aエクトドメインまたはそのアゴニストを含むポリペプチドと、2) CD137リガンドまたはそのアゴニストを含むポリペプチドと、場合により3) 医薬的に許容し得る担体と、を含む治療的組み合わせ。 40

39．ヒトNTB-Aエクトドメインを含む、条項38に記載の組み合わせ。

40．ヒト137リガンドを含む、条項38に記載の組み合わせ。

41．アゴニストが、抗体である、条項38に記載の組み合わせ。

【0168】

以下の実施例は、本発明の幾つかの実施形態をより完全に例示するために提示されている。しかしそれらは、広範囲の本発明を限定するものと解釈すべきではない。

【0169】

実施例

実施例 1 . ヒト N T B - A エクトドメイン

以下に示されるアミノ酸配列を有するヒト N T B - A は、以下の通りアクセション番号 Q 9 6 D U 3 に対応する：

MLWLFQSLLF VFCFGPGNVV SQSSLTPLMV NGILGESVTL PLEFPAGEKV NFITWLFNET SLAFIVPHET KSP
EIHVTNP KQGKRLNFTQ SYSLQLSNLK MEDTGSYRAQ ISTKTSAKLS SYTLRILRQL RNIQVTNHSQ LFNQMT
CE LH LTCSVEDADD NVSFRWEALG NTLSSQPNLT VSWDPRISSSE QDYTCIAENA VSNLSFSVSA QKLCEDVKI
Q YTDTKMILFM VSGICIVFGF IILLLLVLRLK RRDLSLSLSTQ RTQGPAESAR NLEYVSVSPT NNTVYASVTH S
NRETEIWTP RENDTITIYS TINHSKESKP TFSRATALDN VV (S E Q I D N O : 1) 。

【 0 1 7 0 】

このタンパク質のエクトドメインは、22 ~ 226 位に位置すると同定されている。したがって N T B - A エクトドメインは、先のヒト配列の 22 ~ 226 位に、または当該技術分野で公知の N T B - A 配列内の対応する位置に対応するアミノ酸配列を有し得る。別の実施形態において、当業者によりその構造的および機能的均等物として認識されるその変異体、相同体および誘導体の使用が、企図される（例えば、保存的アミノ酸置換）。加えて、いずれかの末端でのアミノ酸（例えば、1 ~ 5 アミノ酸または 5 % までのアミノ酸）の伸長および/または切り詰めが、許容され得る。特定の有利な実施形態によれば、アミノ酸 1 ~ 21 が排除される。特定の別の有利な実施形態によれば、アミノ酸 1 ~ 27 が排除される。

【 0 1 7 1 】

例えば非限定的に、N T B - A エクトドメインは、S E Q I D N O : 1 の 22 ~ 226 位を含み得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、本質的に S E Q I D N O : 1 の 22 ~ 226 位からなり得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、S E Q I D N O : 1 の 22 ~ 226 位からなり得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、S E Q I D N O : 1 の 22 ~ 225 位を含み得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、本質的に S E Q I D N O : 1 の 22 ~ 225 位からなり得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、S E Q I D N O : 1 の 22 ~ 225 位からなり得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、S E Q I D N O : 1 の 28 ~ 225 位を含み得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、本質的に S E Q I D N O : 1 の 28 ~ 225 位からなり得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、S E Q I D N O : 1 の 28 ~ 225 位からなり得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、S E Q I D N O : 1 の 28 ~ 226 位を含み得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、本質的に S E Q I D N O : 1 の 28 ~ 226 位からなり得る。別の実施形態において、N T B - A エクトドメインは、S E Q I D N O : 1 の 28 ~ 226 位からなり得る。特定の特別な実施形態によれば、上記 N T B - A エクトドメインは、ポリヒスチジンタグなどのエピトープタグをさらに含む。各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【 0 1 7 2 】

以下の実施例に記載される実験では、Novoprotein から購入した組換えヒト N T B - A (カタログ番号 C 3 8 7) を用いた。このタンパク質の配列は、幾つかの実施形態において、C 末端でポリヒスチジンタグと融合された、ヒト N T B - A の細胞外ドメインに対応する (S E Q I D N O : 2 に示されたアクセション番号 Q 9 6 D U 3 の G l u 2 2 ~ M e t 2 2 6 の位置) 。他に断りがなければ、実施例および図の全体において、「s e S L A M F 6 」および「s N T B - A 」は、この組換え融合タンパク質を指す。

【 0 1 7 3 】

以下に示される特定の他の実施例で用いられる配列は、C 末端でポリヒスチジンタグと融合されたアクセション番号 Q 9 6 D U 3 の L e u 2 8 ~ L y s 2 2 5 の位置に対応する (S E Q I D N O : 3 、以下の通り：LMVNGILGES VTLPLEFPAG EKVNFITWLF NETSLAFIV P HETKSPEIHV TNPQKGKRLN FTQSYSLQLS NLKMEDTGSY RAQISTKTS KLSSYTLRIL RQLRNIQVTN H SQLFQNMTC ELHLTCSVED ADDNVSFRWE ALGNTLSSQP NLTVSWDPRI SSEQDYTCIA ENAVSNLSFS VSAQ

KLCEDV KIQYTDTKVD HHHHHH)。

【0174】

実施例2. seSLAMF6の特異的結合

seSLAMF6の、そのホモタイプ受容体への結合を実証するために、ヒト腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を、増加濃度のseSLAMF6またはウシ血清アルブミン(BSA、無関係のタンパク質対照)と共にインキュベートした。これらの実験では、FACS緩衝液100µl中の200,000TIL(209)を、各FACS試験管に添加した。0~30µg/mlの範囲で様々なsNTB-A(seSLAMF6)またはBSA濃度を各試験管に添加して、4で45分間インキュベートした。試料を1回洗浄し、PEコンジュゲート抗seSLAMF6抗体(クローンNT-7、Biolegend)またはアイソタイプ対照10µlを、各試験管に添加した(図1A)。追加の陰性対照として、試料をCD8および2B4受容体に関しても染色した(図1B)。4で45分間のインキュベーション後に、細胞を洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。図1A~Bで見られるように、seSLAMF6は、腫瘍浸潤リンパ球への抗SLAMF-6抗体の結合を完全に阻害し(A)、これらの表面受容体への抗CD8および抗2B4抗体の結合を阻害しなかった。これらの実験の結果は、seSLAMF6の活性がSLAMF6へのその結合により媒介されることを明確に実証している。

10

【0175】

実施例3. seSLAMF6によるSLAMF6エンゲージメントは活性化抗黒色腫T細胞の生存率を改善する

20

ヒトTIL(209)を、同族黒色腫細胞(624mel)と3日間共培養し(1:4の比で; IL-2 6,000 IU/mlを含む完全培地中; 37、5%CO₂)、その後、IL-2(6000 IU/ml)を含有する完全培地(CM)中で7日間増殖させた。増殖後に、IL-2(6000 IU/ml)をさらに補充するか、または除去し、細胞をseSLAMF6(SEQ ID NO: 3、10µg/ml)もしくはBSA(10µg/ml; 「対照」)のいずれかで処置するか、または未処置のままにした。細胞をヨウ化プロピジウム(PI)(細胞死のマーカー)およびアネキシン-V(アポトーシスのマーカー)で標識して、フローサイトメトリーにより分析した。図2Aは、seSLAMF6の添加により細胞死およびアポトーシスの比率が23%から4%に減少したことを示している。seSLAMF6の効果は、IL-2と同一であり、SLAMF6エンゲージメントがIL-2と置き換わり、活性化誘導細胞死(AICD)を予防し得ることを示している。

30

【0176】

異なる実験において、624melに対して反応性があるヒトTIL(209)を、腫瘍と72時間共培養した。次の7日培養の間に、IL-2 6,000 IU/ml(IL-2⁺)を補充した。その後、IL-2を培地から除去し、細胞を3回洗浄して、すべての残留IL-2を除去し、seSLAMF6(ポリヒスチジンタグを含むSEQ ID NO: 2)を含み、または含まずに成長させて、無関係のタンパク質対照と比較した。言い換えれば、細胞から4日間IL-2を枯渇させた場合は、ストレスの間だけseSLAMF6が細胞培養物中に存在した。アポトーシスおよび細胞死を、フローサイトメトリーにより評価した。結果を以下の表1に要約する(値は、全集団からのアネキシン⁺PI⁺細胞の割合%を表す)。結果は、seSLAMF6エクドメインの添加がIL-2の非存在を完全に補填したことを示した。この実験をTIL209では3回、そしてTIL431では1回(2名のヒトドナーからのTIL)繰り返し実施したが、非常に類似した結果を得た。

40

【表 1】

	未処置	B S A	s e S L A M F 6
I L - 2 ⁺	1 1 %	1 5 %	1 4 %
I L - 2 枯渴	3 4 %	4 2 %	9 %

表 1 - s e S L A M F 6 は I L - 2 枯渴後の T 細胞生存性を回復させる: I L - 2 を補充された (I L - 2 ⁺) またはこのサイトカインを枯渴させた黒色腫活性化 T I L のフローサイトメトリー分析 (値は、全集団からのアネキシン⁺ P I ⁺細胞の割合%を表す)。

【 0 1 7 7 】

別の実験において、P m e l - 1 マウス脾臓細胞 (黒色腫抗原 g p 1 0 0 _{2 5 - 3 3} に対するトランスジェニック T C R を発現する) を、I L - 2 (3 0 0 I U / m l) を補充した C M 中の 1 μ g / m l 同族ペプチド (g p 1 0 0 _{2 5 - 3 3}) で刺激した。5 日後に、細胞を洗浄し、I L - 2 0、3 0 0、3 0 0 0 I U / m l または s e S L A M F 6 (S E Q I D N O : 3) (5 0 μ g / m l) と共に C M 中で最大 9 6 時間インキュベートした。細胞を異なる時点で回収し、ヨウ化プロピジウム (P I) およびアネキシン - V で標識した。細胞死をフローサイトメトリーにより決定し、生存細胞の比率を測定した (全集団からの P I / アネキシン - V 陰性細胞の割合)。結果を図 2 B に示す。図で見られるように、s e S L A M F 6 は、A I C D を予防する上で I L - 2 の最大濃度 (3 0 0 0 I U / m l) と同程度に効率的であった。

【 0 1 7 8 】

R E P は、養子細胞移入による免疫療法のための腫瘍同族リンパ球の必要数を達成するための日常の手順である。実施例全体において「R E P」または「急速な増殖」が言及される場合、これは、特に 3 0 n g / m l の O K T 3 抗体およびフィーダー細胞としての放射線照射された P B M C の存在下で、T I L : P B M C 比 1 : 2 0 0 ~ 1 : 1 0 0 での 1 2 ~ 1 4 日間インキュベートステップの存在を表している。

【 0 1 7 9 】

さらなる実験において、ヒトバルク T I L 集団 (2 0 9) を、I L - 2 (3 , 0 0 0 I U / m l) または s e S L A M F 6 (S E Q I D N O : 3) (5 0 μ g / m l) のいずれかを補充した C M を利用して R E P により増殖させた。R E P の終了時に、細胞を洗浄し、以下の条件下でインキュベートした: I L - 2 不含 (未処置)、I L - 2 含有 (3 0 0 I U / m l)、または s e S L A M F 6 含有 (5 0 μ g / m l)。細胞を 2、3 および 7 日目に回収し、ヨウ化プロピジウム (P I) およびアネキシン - V で標識して、細胞死をフローサイトメトリーにより測定した。結果を図 2 C に示す。図で見られるように、R E P - I L - 2 により増殖された細胞への s e S L A M F 6 の添加 (左図) は、7 日目の細胞死の比率を、C M 中での 7 1 % および I L - 2 中での 4 5 % に比較して、1 1 % に低減した。同様に、R E P - s e S L A M F 6 により増殖された細胞への s e S L A M F 6 の添加 (右図) は、7 日目の細胞死の比率を、C M 中での 7 8 % および I L - 2 中での 5 2 % に比較して、1 1 % に低減した。

【 0 1 8 0 】

実施例 4 . s e S L A M F 6 による S L A M F 6 エンゲージメントは活性化抗黒色腫 T 細胞の機能を改善する

I F N 生成:

P m e l - 1 マウス脾臓細胞を、I L - 2 (3 0 I U / m l) を補充した C M 中の 1 μ g / m l 同族ペプチド (g p 1 0 0 _{2 5 - 3 3}) で活性化した。5 日後に、細胞を 3 群に分割し、それぞれを以下の細胞ターゲットの 1 つと 6 時間共培養した: 1 . オボアルブミンで安定にトランスフェクトされた抗原提示細胞である E L 4 - O V A (陰性対照); 2 . B 1 6 - H 2 D b 黒色腫 (M H C クラス I 発現が増強された g p 1 0 0 _{2 5 - 3 3} 含有黒色腫細胞); または 3 . g p 1 0 0 _{2 5 - 3 3} ペプチドをパルスされた抗原提示細胞である、g p 1 0 0 を負荷された E L 4 (陽性対照)。各群を 3 つのサブグループ: s e S

L A M F 6 (s N T B A、S E Q I D N O : 3、50 μ g / m l) での処置、B S A (50 μ g / m l) での処置、および未処置細胞、にさらに分割した。

【0181】

6時間共培養した後、各群の細胞を回収し、抗C D 8 / 抗I F N 細胞内染色で標識して、フローサイトメトリーの取得および分析に供した。結果を図3 Aに示す(示されたデータは、3つの独立した実験の要約である)。図で見られるように、s e S L A M F 6 (S E Q I D N O : 3) は、T細胞クローンによるI F N の特異的産生を増強し、活性化P m e l - 1マウス脾臓細胞と標的細胞(同族黒色腫またはペプチドパルスA P C) との共培養物へのs e S L A M F 6 の添加は、I F N を産生する細胞の割合を有意に増加させた(それぞれ $p < 0.0001$ および $p < 0.0002$)。

10

【0182】

異なる実験において、s e S L A M F 6 (C ' H i s タグを有するS E Q I D N O : 2) の存在下でのT I L とそれらの同族腫瘍細胞株とのインキュベーションは、I F N の産生を増加させた。A 2 陰性の非同族8 8 8 m e l を、陰性対照とした。共溶媒物へのs e S L A M F 6 の添加は、I F N の分泌を、ベースラインよりも27% ~ 133%増加させた。黒色腫認識の非存在下では、バックグランド活性は検出されなかった。

【0183】

R E P 後のI F N 産生

さらなる実験において、s e S L A M F 6 (ポリヒスチジンタグが添加されたS E Q I D N O : 2) での12日間急速増殖(R E P)手順後のバルクT I L によるI F N 産生を評価した。I L - 2 補充(6000 I U / m l) の標準的手順を、S L A M F 6 (50 μ g / m l) の可溶性エクストドメインの排他的供給と比較した。

20

【0184】

R E P 後に、T細胞を同族黒色腫株(624 m e l および526 m e l) と一晚(o / n)共培養して、I F N 分泌を測定した。結果を以下の表2に要約する。結果は、s e S L A M F 6 により増殖されたC D 8 + T細胞が、2つの同族黒色腫(526 m e l および624 m e l) とのo / nインキュベーション後に著しく高レベルのI F N を産生したことを示した。

【表2】

30

	624mel	526mel
未処置	~500	~200
IL-2 300 IU	~600	~700
IL-2 6000 IU	~900	~900
SeSLAMF6	~4800	~3300

表2 - s e S L A M F 6 を補充した増殖手順を受けたリンパ球は優れたI F N γ 分泌を付与された(値はI F N γ のp g / m l を表す)。

【0185】

C D 1 0 7 a 発現(溶解性脱顆粒(lytic degranulation)):

40

ヒトT I L (209)を3群に分割し、それぞれを以下の条件の1つの下で急速増殖させた: I L - 2 を含まない完全培地、I L - 2 (3,000 I U / m l) 含有またはs e S L A M F 6 (S E Q I D N O : 3) 50 μ g / m l 含有の完全培地。増殖後に、細胞を回収して洗浄した。その後、各群を3つのサブグループにさらに分割し、2つは以下の同族黒色腫細胞ターゲット: 526 m e l または624 m e l、のうちの一方と1.5時間共培養し、1つはH L A 不適合の888 m e l と共培養して、バックグランド活性を評価した。

【0186】

共培養後に、細胞を抗C D 8 および抗C D 1 0 7 a で染色した。C D 1 0 7 a (L A M P - 1) は、リソゾーム膜タンパク質である。その表面発現を、ここでは溶解性脱顆粒の

50

マーカーとして評価した。結果を、526 me1細胞に関して図3Bに示している。図で見られるように、seSLAMF6を用いたREPは、脱顆粒能が約2倍高いヒトTILを生成した。同様の結果が、624 me1細胞で得られた。

【0187】

さらなる実験において、gp100₂₀₉₋₂₁₇ エピトープに対して反応性があるヒトCD8+T細胞クローンを、300 U/ml IL-2、50 µg/ml seSLAMF6 (SEQ ID NO: 3)、またはその両方を補充された完全培地中で、プレートに結合された抗CD3により3日間活性化させた。活性化期間の終了時に、細胞をHLA-A2適合(624 me1、526 me1)または無関係の(888 me1)黒色腫ターゲットと1.5時間共培養した。細胞傷害性顆粒の放出のマーカーであるCD107aのレベルを、フローサイトメトリーにより測定した。結果を図3Cに示す。図で見られるように、seSLAMF6単独またはIL-2と組み合わせたseSLAMF6は、T細胞の脱顆粒能上昇に関して、IL-2単独よりも優れていた。

10

【0188】

細胞の殺傷：

gp100₂₀₉₋₂₁₇ エピトープに対して反応性があるヒトCD8+T細胞クローンを、1 µg/ml OKT3単独(未処置)を含むCM、または300 U/ml IL-2、50 µg/ml seSLAMF6 (SEQ ID NO: 3)、もしくはその両方を補充したCM中で、プレートに結合された抗CD3により5日間活性化させた。活性化期間の終了時に、細胞を、DDAO-SEを標識されたHLA-A2適合(624 me1、526 me1)または無関係の(888 me1)黒色腫ターゲットと1.5時間共培養した。アポトーシスの早期マーカーである細胞内切断カスパーゼ-3のレベルを、フローサイトメトリーにより黒色腫細胞内で測定した。結果を図3Dに示す。図で見られるように、seSLAMF6単独またはIL-2と組み合わせたseSLAMF6は、黒色腫細胞殺傷の改善に関して、IL-2単独よりも優れていた。

20

【0189】

実施例5. seSLAMF6によるSLAMF6エンゲージメントは活性化マーカーの発現をアップレギュレートする

ヒトTILを、以下の条件下で急速に増殖させた：IL-2を含まない完全培地、IL-2(3,000 IU/ml)含有またはseSLAMF6 (SEQ ID NO: 3) 50 µg/ml含有完全培地。増殖後に、細胞を回収して洗浄し、黒色腫ターゲット526 me1および624 me1(同族黒色腫)ならびに888 me1(バックグランド活性を評価するためのHLA不適合)と一晚共培養した。一晚のインキュベーションの後、細胞を回収して、以下の抗体パネル：抗CD8 / 抗GITR / 抗PD-1 / 抗41BB / 抗2B4で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。結果を図4に示す(示されるデータは、526 me1ターゲットと共培養された細胞のものである)。図で見られるように、seSLAMF6 REPが、テストされた活性化誘導マーカーを発現するリンパ球を最大の割合で生成した。

30

【0190】

先と同じ設定の異なる実験において、活性化マーカー4-1BB (CD137)の発現に及ぼす、seSLAMF6 (ポリヒスチジntagを含むSEQ ID NO: 2)を用いる急速増殖の影響を測定した。結果を以下の表3に要約する(値は、全集団からのCD8+4-1BB+細胞の%を表す)。結果は、2つの同族黒色腫(526 me1および624 me1)とのo/nインキュベーションが、IL-2の標準的使用に比較して、REPのためにseSLAMF6を用いる腫瘍への応答において、4-1BB発現細胞数を倍増させたことを示した。

40

【表 3】

	無関係の黒色腫	526mel	624mel
IL-2	1%	9%	8%
seSLAMF6	1%	17%	16%

表 3 - seSLAMF6 を補充した急速増殖手順は、同族黒色腫細胞による活性化が可能なリンパ球の割合を倍増させた：増殖されたリンパ球のフローサイトメトリー分析（値は、全集団からの CD8⁺4-1BB⁺細胞の割合%を表す）。

【0191】

10

実施例 6 . seSLAMF6 による SLAMF6 エンゲージメントを利用して IL-2 と同じ効率で TIL を増殖させることができる

7 つの異なる TIL 集団 (TIL 431 f (3)、TIL 209 new、TIL 412 (11.09.12)、Clone #4 (209) 13.4.14、Bulk 412、Clone #1 (209)、Clone #4 (209) 10.6.14) を、IL-2 (3,000 IU/ml) または seSLAMF6 (SEQ ID NO: 3、10 µg/ml) を用いて完全培地中で REP により増殖させた。増殖後に細胞をカウントして、最終的な細胞数を最初の細胞数と比較した。結果を図 5 に示す（細胞数の増加の倍率として表す）。図で見られるように、seSLAMF6 は、IL-2 と実質的に同じ効率で細胞を増殖させた。

20

【0192】

実施例 7 . REP の間の seSLAMF6 による SLAMF6 エンゲージメントは黒色腫特異的 CD8⁺ T 細胞をより高い割合で生成する

実施例 6 に記載されたバルク TIL 集団を、全 CD8⁺ リンパ球の中の gp100₁₅₄₋₁₆₂ 反応性サブセットの割合についてさらに分析した。REP の後、細胞を回収し、抗 CD8 および gp100₁₅₄₋₁₆₂ 四量体 (Immudex) で標識して、フローサイトメトリーにより分析した。結果を図 6 に示す。図で見られるように、seSLAMF6 は、IL-2 に比較して、gp100₁₅₄₋₁₆₂ 反応性リンパ球をより高い割合で生成した。

【0193】

30

実施例 8 . seSLAMF6 により増殖された抗黒色腫 TIL による黒色腫成長の阻害

ヒト抗 gp100₂₀₉₋₂₁₇ CD8⁺ T 細胞クローンを、300 U/ml IL-2 または 50 µg/ml seSLAMF6 を補充した CM 中で、プレートに結合された抗 CD3 により 5 日間活性化させた。活性化された細胞集団をウィンアッセイで使用し：Athymic Foxn1^{-/-} (ヌード) マウスに 1 × 10⁶ 個 526mel ヒト黒色腫細胞を皮下 (S.C.) 注射した。注射の前に、黒色腫細胞を CM (対照)、IL-2 で生育された抗 gp100 ヒト TIL、または seSLAMF6 で生育された抗 gp100 ヒト TIL と混合した。腫瘍の成長を週に 3 回、20 日間モニタリングした（群あたり n = 5）。結果を図 7 に示す。図で見られるように、seSLAMF6 により増殖された TIL は、追跡調査期間に黒色腫成長を完全に阻害した。類似の結果が、IL-2 増殖 TIL で観察された。

40

【0194】

実施例 9 . seSLAMF6 は T 細胞クローンによる IFN γ 産生において 4-1BB (CD137) ライゲーションと相乗作用する

以下に記載される実験において、4-1BB L を発現するようにトランスフェクトされた、または moctransフェクトされた黒色腫 624mel を、MART-1₂₇₋₃₅ 反応性 T 細胞クローンと共培養した。対照として、MART-1₂₇₋₃₅ 反応性 T 細胞クローンを、無関係の黒色腫 (mel888) と共培養した。T 細胞からの IFN γ の分泌を測定し、結果を以下の表 4 に要約している。表 4 は、黒色腫が 4-1BB L を発現する場合に、この効果 (IFN γ 分泌) が著しく増強されることを実証するデータを表し

50

ている。

【表 4】

TIL 209 (A2/MART1 ₂₇₋₂₅)	CM	BSA	seSLAMF6
mel624/moc	4, 120	3, 160	5, 000
mel624/4-1BBL	8, 600	10, 540	12, 000
mel888	0	0	0

表 4 - CM (完全培地)、BSA (対照として使用されるウシ血清アルブミン) および seSLAMF6 中でのインキュベーション後に、4-1BBL (mel624/4-1BBL) を発現する黒色腫細胞、mocトランスフェクトされた黒色腫 (mel624/moc) および無関係の黒色腫 (mel888) と共培養された MART-1₂₇₋₃₅ 反応性腫瘍浸潤リンパ球の IFN γ 分泌 (値は、IFN γ の pg/ml を表す)。

10

【0195】

実施例 10 . 可溶性エクトドメインによる SLAMF6 エンゲージメントは黒色腫細胞の TCR 特異的認識に応じて CD8⁺ T 細胞上の活性化マーカーを増加させる

以下の表 5 は、SLAMF6 エクトドメインが、TCR 依存的様式で 2 つの黒色腫細胞株と 6、16 および 24 時間共培養し続いて一晚共溶媒した後の、ドナー 3 名からの活性化 CD8⁺ リンパ球上の 4-1BB 発現を増加させることを実証している。

20

【表 5】

黒色腫株	TIL (A2+ MART-1 反応性)	CM (%)	HSA (%)	seSLAMF6 (%)
526 (A2+)	209	53	55	<u>65</u>
	412	29	28	31
	431	17	16	<u>42</u>
	470 (A2-)	7	7	<u>14</u>
624 (A2+)	209	69	66	<u>78</u>
	412	30	37	41
	431	20	29	<u>61</u>
	470 (A2-)	11	9	<u>15</u>
888 (A2-)	209	1.5	1	<u>4</u>
	412	0.4	0.4	0.5
	431	4	3	<u>8</u>

30

表 5 - seSLAMF6 は TIL 上での 4-1BB 発現を有意に増加させる : 黒色腫株とのインキュベーション後の TIL 上での 4-1BB (CD137) 発現のフローサイトメトリー分析 (値は、全 CD8⁺ 細胞からの陽性の割合 % を表す)。

40

【0196】

2 つの HLA - A2 + 黒色腫細胞株 (526 および 624) および 1 つの対照 HLA - A2 - (888) 株を、CM (完全培地)、BSA (対照として用いられるウシ血清アルブミン) および SLAMF6 の可溶性エクトドメイン中で、3 つの A2 + MART-1 反応性 TIL (209、412、431)、または対照 TIL (470) と共にインキュベートした。ほとんどの例で、seSLAMF6 は、TIL 上の 4-1BB の発現を有意に増加させた (下線が引かれた値)。

【0197】

実施例 11 . SLAMF6 の可溶性エクトドメインは放射線照射後の CD8⁺ T 細胞の活

50

性化誘導細胞死を防御する

活性化誘導細胞死に対する防御（T細胞の生存）を測定するために用いられるアッセイを、以下の通り実施した。100万個のTILを、2ml培地（CM）を含む24ウェルプレート中で250,000個の624mel HLA適合黒色腫細胞と3日間共培養することにより活性化した。この時点で全ての黒色腫細胞が死滅し、それゆえTILのみが培養中に残った。活性化相の間には、IL-2を添加しなかった。TILを6000単位/ml IL-2の存在下で7～9日間増殖させた。1～2日ごとに、1mlの培地を新しいCMで交換した。細胞を、集団の増殖に従って12ウェルおよび6ウェルプレートに移した。細胞をPBSで3回洗浄して残留するすべてのIL-2を除去し、ショック（様々な線量の放射線および24時間後の分析）に暴露した。細胞をその後PIおよびアネキシンVで染色して、フローサイトメトリーにより分析した。seSLAMF6を、3つの実験段階（活性化、増殖、ショック）に応じて異なる時点で添加して、T細胞生存へのその全体的影響を評価し、関連する段階を決定した。±IL-2は、ショック相でのIL-2の存在を指す。アポトーシスを測定するために、アネキシンVアポトーシス検出キット（eBioscience 88-8007）を、製造業者の使用説明書に従って使用した。手短に述べると、細胞をPBSおよび結合緩衝液で洗浄した。5μlアネキシンV染色剤+100μl結合緩衝液を各試験管に添加し、暗所において室温で15分間インキュベートした。追加の洗浄後に、5μl PI染色剤+200μl結合緩衝液を各試験管に添加し、4時間以内に細胞をフローサイトメトリーにより分析した。

【0198】

SLAMF6の可溶性エクトドメインはPBM細胞の放射線誘導性細胞死を防御する。これらの実験において、ウェルあたり1ml PBS中の1μg抗CD3（OKT3）および1μg抗CD28で、6ウェルプレートを4で一晩コーティングした。PBSを除去して、ウェルを2ml CMで室温で1時間ブロックした。ウェルごとに、300単位IL-2/mlを含む5ml CM中の 10^7 個のPBM細胞を添加した。細胞を3日間活性化させ、その後、IL-2を2日ごとにさらに7日間添加した。CMを交換して、必要に応じて細胞を分割した。細胞を3回洗浄して残留するIL-2を除去し、低温CM中に懸濁させた。試験管を氷上に静置して、増加線量で放射線照射し、照射後直ちに新しいCMで洗浄した。新しい培地に、10μg/ml seSLAMF6またはBSA（対照）を添加した。24時間後に、細胞をアネキシンV & PIで染色した。2名のヒトドナーからのPBM細胞を評価した。アポトーシスおよび細胞死を、フローサイトメトリーにより評価した。結果を以下の表6に要約する（値は、全集団からのアネキシン⁺PI⁺細胞の%を表す）。結果は、SLAMF6エクトドメインの添加がIL-2と同じ強度で放射線の損傷効果を補填したことを示した。seSLAMF6は、ヒトPBM細胞を、増加線量の放射線により誘発された損傷から防御する。seSLAMF6により発揮された生存作用は、IL-2により発揮された作用と類似している。この実験を2名のヒトドナーからのPBM細胞で再度実施し、非常に類似した結果を得た。

【表6】

	0 rad	200 rad	500 rad	700 rad	1000 rad
未処置	37%	61%	78%	81%	84%
IL-2	27%	28%	40%	44%	50%
seSLAMF6	26%	36%	49%	53%	59%

表6－seSLAMF6は放射線照射後のT細胞生存を回復させる：値は、全集団からのアネキシン⁺PI⁺細胞の%を表す。

【0199】

参考文献

Krover et al., British Journal of Haematology 2007, 137, pp. 307-318.

Snow et al., Immunol Rev. 2010, 236, pp. 68-82.

Snow et al., J. Clin. Invest. 2009, 119, pp. 2976-2989.

Uzana et al., J Immunol 2012, 188, pp. 632-640.

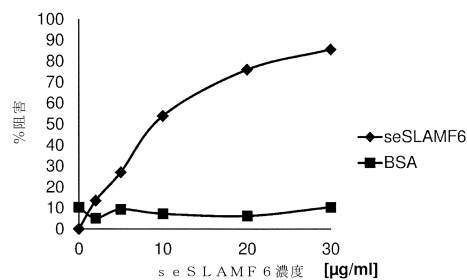
Valdez et al., J Biol Chem 2004, 279(18), pp. 18662-18669.

【0200】

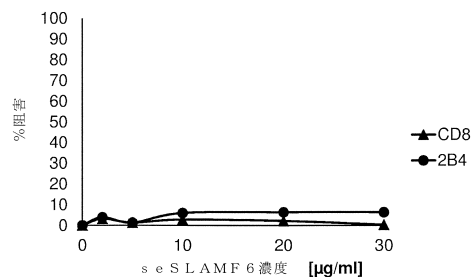
具体的実施形態の前述の記載は、他者が現在の知見を適用することにより、過度の実験を行わずに一般的概念から逸脱することなくそのような具体的実施形態を様々な適用例に向けて即座に改良および／または適合させ得るという、本発明の一般的性質を完全に明らかにしており、それゆえ、そのような適合および改良は、開示された実施形態の均等物の意味および範囲内であると解釈されるものとする。本明細書で用いられる表現法または用語法は、説明を目的としており限定ではない。様々な開示された機能を実施するための手段、材料、およびステップは、本発明から逸脱することなく様々な別の形態をとることができる。

10

【図1】

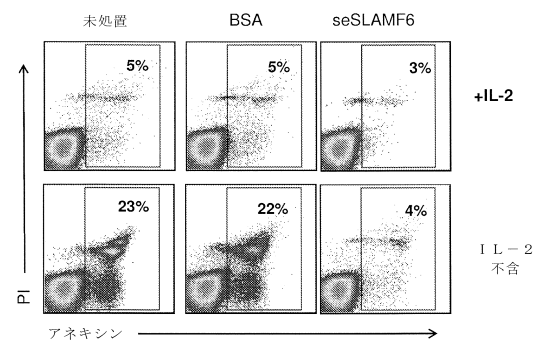


A

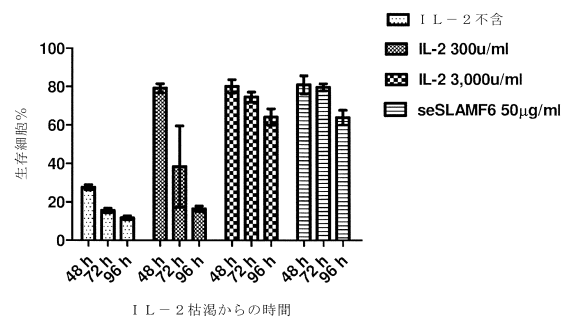


B

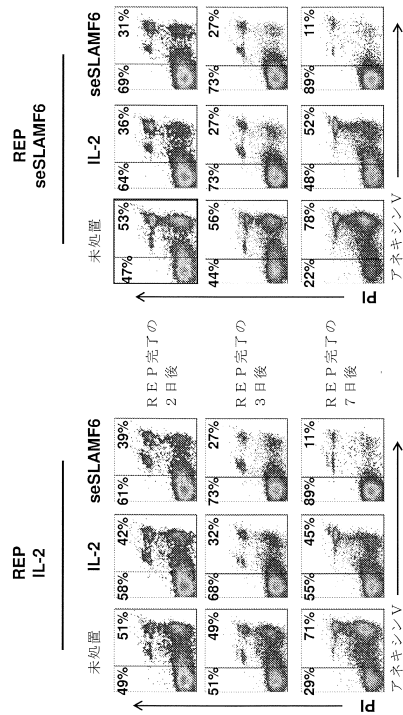
【図2A】



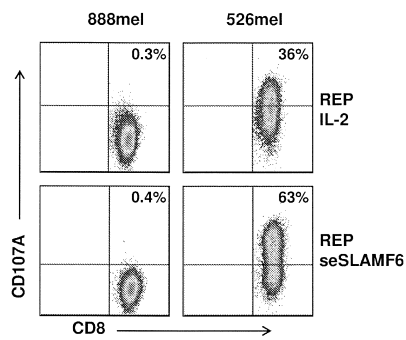
【図2B】



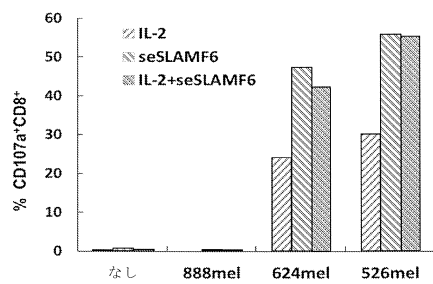
【図 2 C】



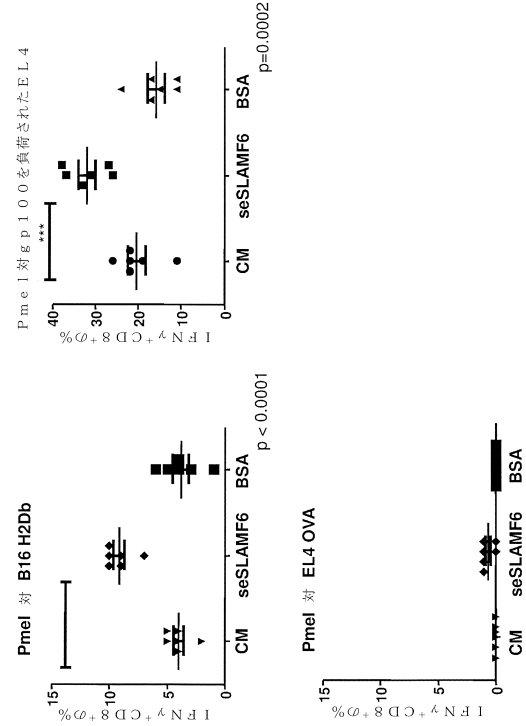
【図 3 B】



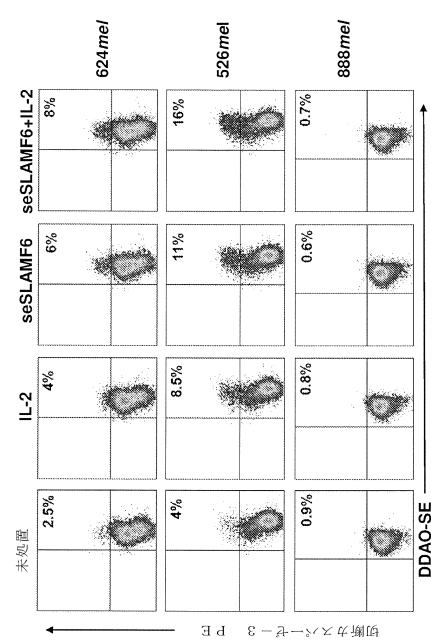
【図 3 C】



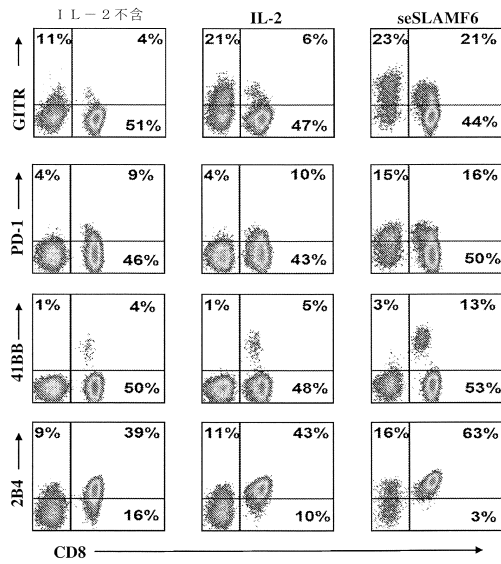
【図 3 A】



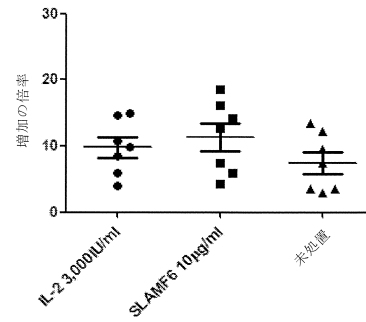
【図 3 D】



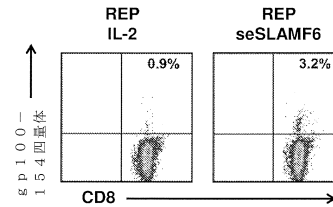
【図 4】



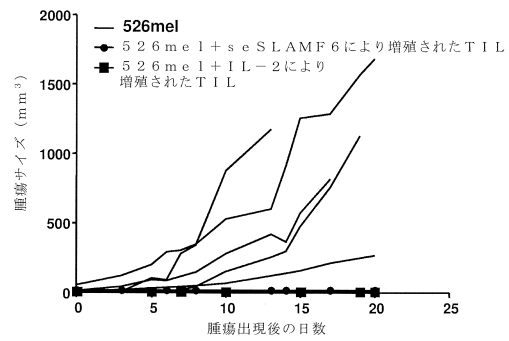
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0006682438000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 500545311

ハダシット メディカル リサーチ サービスーズ アンド ディベロップメント リミテッド
Hadasit Medical Research Services and Development Ltd.

イスラエル国 エルサレム ピー.オー. ボックス 12000 ハダサー アイン ケレム
メディカル センター エルサレム バイオパーク
Jerusalem BioPark, Hadassah Ein Kerem Medical
Center, P.O. Box 12000 Jerusalem, Israel

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ルテンバーグ, アブラハム

イスラエル国, 3437129 ハイファ, 39 イェフェ ノフ ストリート

(72)発明者 ユサナ, ロニー

イスラエル国, 76666 レホヴォット, 11/47 マックス アンド アンプロ シャイン
ストリート

(72)発明者 ロテム, ミシェル

イスラエル国, 71908 ロイト, 17 ハオマリム ブルバード

(72)発明者 マックレンキン, アーサー

イスラエル国, 6094800 ギヴァット プレナー, 151 エシュコル ストリート

(72)発明者 エイセンバーグ, ガリト

イスラエル国, 7175986 モディイン, 10/5 ナハル ハヤーデン ストリート

(72)発明者 ペレッツ - ヤブロンスキー, タマル

イスラエル国, 9675757 エルサレム, 45 クボヴィ ストリート

(72)発明者 フランケンバーグ, ショシャナ

イスラエル国, 9323211 エルサレム, 11 ハガドナ ストリート

(72)発明者 エンゲルスティン, ロニ

イスラエル国, 9640822 エルサレム, 108 ドルチン ストリート

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0017014 (US, A1)

米国特許出願公開第2010/0150886 (US, A1)

Autoimmunity, 2011, Vol.44, No.3, pp.211-218

Blood, 2003, doi:10.1182/blood-2002-11-3586

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 35/768

C07K 1/00 - 19/00

C12N 5/00 - 5/28

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)