

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-345852

(P2006-345852A)

(43) 公開日 平成18年12月28日(2006.12.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B065
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C087
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4H045
A61K 35/14 (2006.01)	A61K 35/14 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 24 O L 外国語出願 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-304670 (P2005-304670)	(71) 出願人 503081933
(22) 出願日 平成17年10月19日 (2005.10.19)	バイレクシス コーポレイション
(31) 優先権主張番号 60/691, 631	アメリカ合衆国 メリーランド 2087
(32) 優先日 平成17年6月16日 (2005.6.16)	7, ガイザースバーグ, ペリー パー
(33) 優先権主張国 米国 (US)	クウェイ 200, スイート 1エイ
特許法第30条第1項適用申請有り 掲載年月日:平成	(74) 代理人 100099759
17年4月20日 掲載アドレス: http://www.celltherapy.org/	弁理士 青木 篤
	(74) 代理人 100077517
	弁理士 石田 敬
	(74) 代理人 100087871
	弁理士 福本 積
	(74) 代理人 100087413
	弁理士 古賀 哲次
	(74) 代理人 100134784
	弁理士 中村 和美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体複合体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】造血細胞の表面分子と結合し、その活性化又は拡張をもたらす溶解性リガンド複合体を提供する。

【解決手段】造血細胞の活性化及び/又は拡張に、場合によりその形質導入と組み合わせ、用いることができ、少なくとも2種の細胞表面分子、例えば一つは、細胞-細胞接着に役割を果たす分子であり、一つは細胞を活性化もしくは刺激したり又はしなかったりして、リガンドへの結合後に成長及び/又は増殖を促進する分子、と結合するリガンド複合体を提供する。2種の造血細胞刺激分子と結合するリガンド複合体もまた提供される。造血細胞に対するベクターを標的とするために当該複合体の使用を更に提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

同一の標的造血細胞上で第一細胞表面分子及び第二細胞表面分子とそれぞれ結合する第一リガンド及び第二リガンドを含む溶解性複合体。

【請求項 2】

前記第一リガンド及び第二リガンドの各々が、第一細胞表面分子及び第二細胞表面分子とそれぞれ結合する抗体又はその断片である、請求項 1 記載の複合体。

【請求項 3】

前記標的細胞が T 細胞である、請求項 1 又は 2 記載の複合体。

【請求項 4】

前記第一リガンドが CD 28 と結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の複合体。

10

【請求項 5】

前記第二リガンドが、B 7 - H 1 (P D - L 1 と称される) ; B 7 - H 2 ; B 7 - H 3 (B 7 R P - 2 と称される) ; B 7 - H 4 ; C D 2 ; C D 3 ; C D 1 1 a ; C D 2 6 ; C D 2 7 ; C D 3 0 L ; C D 3 2 ; C D 3 8 ; C D 4 0 L (C D 1 5 4 と称される) ; C D 4 5 ; C D 4 9 ; C D 5 0 (I C A M - 3 と称される) ; C D 5 4 (I C A M - 1 と称される) ; C D 5 8 (L F A と称される) ; C D 7 0 ; C D 8 0 (B 7 . 1 と称される) ; C D 8 6 (B 7 . 2 と称される) ; C D 1 0 0 ; C D 1 2 2 ; C D 1 3 7 L (4 - 1 B B リガンドとも称される) ; C D 1 5 3 ; C T L A - 4 ; I C O S ; O X 4 0 L (C D 1 3 4 と称される) ; P D - 1 ; P D - L 2 (B 7 - D C と称される) ; S L A M (C D 1 5 0 と称される) ; T I M - 1 ; T I M - 2 ; T I M - 3 ; T I M - 4 ; 又は 2 B 4 (C D 2 4 4 と称される) から選ばれるリガンドと結合する、請求項 4 記載の複合体。

20

【請求項 6】

前記第一リガンド及び第二リガンドが、共有結合的に連結される又は双方を結合する 1 以上の抗体によって連結される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の複合体。

【請求項 7】

前記 1 以上の抗体が二重特異的抗体であって、その各々が前記第一リガンド及び第二リガンドと結合する、請求項 6 記載の複合体。

【請求項 8】

前記第一細胞表面分子及び第二細胞表面分子の少なくとも 1 つが膜貫通型分子である、請求項 1 記載の複合体。

30

【請求項 9】

前記第一細胞表面分子及び第二細胞表面分子が独立に、B 7 - H 1 (P D - L 1 と称される) ; B 7 - H 2 ; B 7 - H 3 (B 7 R P - 2 と称される) ; B 7 - H 4 ; C D 2 ; C D 3 又は C D 3 / T C R 複合体 ; C D 1 1 a ; C D 2 6 ; C D 2 7 ; C D 2 8 ; C D 3 0 L ; C D 3 2 ; C D 3 8 ; C D 4 0 L (C D 1 5 4 と称される) ; C D 4 5 ; C D 4 9 ; C D 5 0 (I C A M - 3 と称される) ; C D 5 4 (I C A M - 1 と称される) ; C D 5 8 (L F A と称される) ; C D 7 0 ; C D 8 0 (B 7 . 1 と称される) ; C D 8 6 (B 7 . 2 と称される) ; C D 1 0 0 ; C D 1 2 2 ; C D 1 3 7 L (4 - 1 B B リガンドとも称される) ; C D 1 5 3 ; C T L A - 4 ; I C O S ; O X 4 0 L (C D 1 3 4 と称される) ; P D - 1 ; P D - L 2 (B 7 - D C と称される) ; S L A M (C D 1 5 0 と称される) ; T I M - 1 ; T I M - 2 ; T I M - 3 ; T I M - 4 ; 又は 2 B 4 (C D 2 4 4 と称される) から選ばれる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の複合体。

40

【請求項 10】

造血細胞を請求項 1 記載の複合体に接触させることを含む、造血細胞の活性化方法。

【請求項 11】

前記細胞が T 細胞である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記接触が *in vitro* 又は *ex vivo* である、請求項 10 又は 11 記載の方法

50

。

【請求項 1 3】

造血細胞が請求項 1 記載の複合体と接触される前、接触される間又は接触された後に、核酸分子を前記細胞に導入することを含む、造血細胞の形質導入方法。

【請求項 1 4】

前記細胞が T 細胞である、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記導入が *in vitro* 又は *ex vivo* である、請求項 1 3 又は 1 4 記載の方法

。

【請求項 1 6】

前記核酸分子がウイルスベクターである、請求項 1 3 記載の方法。

10

【請求項 1 7】

標的造血細胞を、エンベロープベクターと請求項 1 記載の複合体との結合に接触させて、ベクター - 複合体結合を形成することを含む、当該エンベロープベクターを標的細胞に導く方法であって、

前記複合体が、前記ベクターのエンベロープ中の細胞表面分子と結合する第一リガンド、及び前記標的細胞の細胞表面分子と結合する第二リガンドを含む、前記方法。

【請求項 1 8】

標的造血細胞を、ベクター粒子と請求項 1 記載の複合体との結合に接触させて、ベクター粒子 - 複合体結合を形成することを含む、当該ベクター粒子を当該標的細胞に導く方法であって、

20

前記複合体が、前記粒子と結合する第一リガンド、及び前記標的細胞の細胞表面分子と結合する第二リガンドを含む、前記方法。

【請求項 1 9】

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターから選ばれ、場合によりトリ細網内皮症ウイルス（アヒル感染性貧血ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ツビーハウス（*Twiehaus*）株細網内皮症ウイルス、C 型レトロウイルス、細網内皮症ウイルスハンガリー - 2（*REV-H-2*））、及びネコ白血病ウイルス（*FELV*）、ヒト免疫不全ウイルス（*HIV-1* 及び *HIV-2*）、ネコ免疫不全ウイルス（*FIV*）、ネコ免疫不全ウイルス（*SIV*）、マエディノビスナウイルス、ヤギ関節炎 / 脳炎ウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス（*EIAV*）、及びウシ免疫不全ウイルス（*BIV*）；トリ C 型レトロウイルス、例えばトリ白血球増加症ウイルス（*ALV*）；*HTLV-BLV* レトロウイルス、例えばウシ白血球増加症ウイルス（*BLV*）、ヒト T 細胞リンパ球ウイルス（*HTLV*）、及びサル T 細胞リンパ球ウイルス；哺乳動物 B 型レトロウイルス、例えばマウス乳癌ウイルス（*MMTV*）；哺乳動物 C 型レトロウイルス、例えばネズミ白血球ウイルス（*MLV*）、ネコ肉腫ウイルス（*FESV*）、ネズミ肉腫ウイルス、テナガザル（*Gibbonape*）白血球ウイルス、ギニアピッグ C 型ウイルス、ブタ C 型ウイルス、ふさふさした毛のモンキー肉腫ウイルス、及び毒ヘビレトロウイルス；スプマウイルス（泡沫状ウイルス群）、例えばヒトスプマウイルス（*HSRV*）、ネコシンシチウム形成ウイルス（*FESFV*）、ヒト泡沫状ウイルス、サル泡沫状ウイルス、及びウシシンシチウムウイルス；並びに D 型レトロウイルス、例えばヤセザルウイルス（*MPMV*）、リスザルレトロウイルス、及びランゲールモンキーウイルスから得られる、請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 項記載の方法。

30

40

【請求項 2 0】

前記ウイルスベクターがシュードタイプである、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

前記細胞が T 細胞である、請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 記載の複合体との接触後に細胞単離又は拡張を含む、医薬の製造における細胞の *ex vivo* 拡張方法。

50

【請求項 2 3】

前記細胞が遺伝子的に改変されている、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

前記細胞がレトロウイルスベクターで改変されている、請求項 2 3 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、造血細胞例えば T 細胞の活性化、形質導入及び / 又は拡張に関する。本発明は、かかる細胞の表面分子に結合し、場合によりそれらの形質導入と組み合わせることでそれらの活性化又は拡張をもたらす、リガンドの溶解性複合体の使用を提供する。本発明には、少なくとも 2 つの細胞表面分子、例えば細胞 - 細胞接着に役割を果たす分子、及び細胞を活性化又は刺激したりあるいはしなかったりしてリガンドに結合後に成長及び / 又は増殖を促進する分子、と結合するリガンドの複合体が含まれる。2 種の造血細胞刺激分子と結合するリガンドの複合体も使用することができる。本発明は、リガンドの溶解性複合体を用いて造血細胞を活性する方法を更に提供する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

T 細胞の *in vitro* における成長及び増殖方法は、多数の異なった方法に基づいている。中には、T 細胞は、付属細胞及び外因性成長因子、例えば IL - 2 の使用によって維持されている。付属細胞の使用によって提供される 1 つの厄介な問題は、付属細胞としてかなり短命である MHC - 適合性抗原提示細胞 (APC) の要求である。そのため、APC は、T 細胞培養物に連続的に補充される。

20

【0003】

他には、リガンド、例えば抗 - CD 3 抗体は、成長因子様 IL - 2 と共に使用され、CD + 3 T 細胞小集団の T 細胞増殖を刺激する。この方法の 1 種は、米国特許第 6, 352, 694 号明細書に記載されている。そこでは、抗 - CD 3 抗体及び抗 - CD 28 抗体が固体表面に固定された後 T 細胞と接触される。

【0004】

本明細書で引用の文書は、それらのいずれかが適切な先行技術であることを認めることを意図するものではない。出願日についての全ての文書又は文書の内容についての全ての表現は、出願人に入手可能な情報に基づいており、これらの文書の出願日又は内容の正確性について何らかの承認を構成するものではない。

30

【発明の開示】

【0005】

発明の概要

本発明は、造血細胞の細胞表面分子へのリガンドの結合に基づいて、造血細胞、例えば T 細胞の活性化、形質導入及び / 又は拡張を提供する。リガンドは、同一細胞上に少なくとも 2 種の異なる細胞表面分子を結合することができる複合体の形態である。そういうわけで、複合体は少なくとも「二重特異的」である。いくつかの実施態様では、リガンドは細胞表面分子と結合する抗体又はその断片である。本発明の複合体は、固体支持体に着される又は固定化されるのとは反対に溶解性である。

40

【0006】

従って、第一の局面では、本発明は、本明細書に記載したように細胞表面結合リガンドを含む複合体及び組成物を提供する。いくつかの実施態様では、本発明の複合体は少なくとも 2 つのリガンドからなる。すなわち、第一は、細胞 - 細胞接着に役割を果たす細胞表面分子に結合し、及び第二は、複合体のリガンド (複数) に結合後に細胞を活性化又は刺激して成長及び / 又は増殖させる細胞表面分子に結合する。その他の実施態様では、2 種の細胞刺激分子に結合するリガンドの複合体も使用することができる。細胞の活性化又は

50

刺激は1つの事象に次いで鎮静状態の細胞周期移行として見られる。これは、例えば、細胞の大きさの増大及び/又は細胞表面マーカー発現パターンの変更によって特徴付けられる。

【0007】

リガンドに加えて、本発明の複合体は、リガンドに付着又は結合して複合体の一部としてリガンドを維持する、1以上のリンカー分子を含んでもよい。リンカー分子は、任意の好適な化学的構成要素でもよく、特に限定されないが、リガンドに結合する1以上の抗体が挙げられる。リガンドが抗体である実施態様では、リンカー分子は、リガンドである「一次」抗体の不変領域に結合する「二次」抗体と考えられる。その他の実施態様では、リンカー分子は、リガンドである抗体に結合するプロテインA又はプロテインG誘導体でもよい。

10

【0008】

抗体は、付属細胞又は1以上の細胞結合リガンドを含む固体表面の代わりに、細胞を活性化又は拡張するために使用することができる。複合体はまた、外因性成長因子、例えばサイトカイン類のための要求を減じるために使用することができる。加えて、及び抗原(例えばT細胞及びB細胞)を認識する細胞の場合には、複合体は刺激因子として抗原の不存在下で細胞と共に使用することができる。これは、本来ポリクローナルである処理細胞集団の拡張に可能にする。処理T細胞の場合には、処理集団細胞中のT細胞受容体(TCR) Vレパートリーの送達によって明らかにすることができる。

【0009】

20

従って、本発明の追加の局面では、複合体は細胞を活性化及び/又は誘導して増殖させるために使用され、その結果、集団の総細胞数が増加する。その他の局面では、複合体は細胞を刺激して成長させるために使用され、その結果、細胞の大きさ、体積及び/又は容量が増大する。従って、本発明はリガンドの溶解性複合体を用いて細胞を活性化する方法を更に提供する。かかる活性化は、細胞を誘導して増殖又は拡張すること、場合により核酸、例えばウイルスベクターによる細胞の遺伝子的改変との組み合わせを含む。

【0010】

場合により、及びT細胞の場合には、増殖誘導は、抗体-CD3抗体との接触を介してT細胞を活性化すること、及び抗-CD28抗体でT細胞表面上の付属分子を刺激することによって仲介することができる。この2種の抗体は、それらを含む複合体中にリガンドとして提供される。

30

【0011】

発明の実施形態の詳細な説明

本発明は、標的造血(hemopoietic)(又は造血(hematopoietic))細胞の細胞表面分子と結合する溶解性複合体の使用に基づく。造血細胞は、血中又はその他のin vivoの場所、例えば特に限定されないが骨髄、で見出される細胞である。本発明の実施に使用するための標的造血細胞は、白血球、例えばリンパ球(T細胞及びB細胞)、単球及び顆粒球(好酸球、好塩基球及び好中球)、及び赤血球を含む。本明細書に開示のほとんどでは、T細胞は、本発明の実施において造血細胞の非限定的例として使用される。その他の造血細胞は、必要に応じて当業者の知識に基づいてなされる細胞種の具体的変更と共に、同様な形式で使用される。

40

【0012】

本明細書で使用する「細胞表面分子」とは、細胞、例えば造血細胞表面上に提示された分子を言う。分子は、単一分子でも又は多数の分子の複合体でもよい。当該用語は、本来膜貫通型である部分を含む蛋白様分子、及び細胞表面と会合する分子、例えば制限無く膜貫通型分子と相互作用することによって会合する分子を含む。分子は、非限定的例として、例えばグリコシル化、ホスホリル化又はアシル化によって修飾されるポリペプチドでもよい。分子のその他の非限定的例は、細胞表面マーカーを含む。いくつかの実施態様では、例えばT細胞に関しては、1つのリガンドは細胞の抗原特異的細胞表面分子(例えばリガンドとして抗-CD3)と結合してもよいし、その他のリガンドは細胞の非-抗原特異

50

的細胞表面分子（例えばリガンドとして抗 - C D 2 8 ）と結合してもよい。

【 0 0 1 3 】

標的としてT細胞を用いる実施態様では、リガンドはT細胞表面にも見られる任意の分子と結合してもよい。細胞表面分子の非限定的例は、B 7 - H 1（P D - L 1とも称される）；B 7 - H 2；B 7 - H 3（B 7 R P - 2とも称される）；B 7 - H 4；C D 2；C D 3又はC D 3 / T C R 複合体；C D 1 1 a；C D 2 6；C D 2 7；C D 3 0 L；C D 3 2；C D 3 8；C D 4 0 L（C D 1 5 4とも称される）；C D 4 5；C D 4 9；C D 5 0（I C A M - 3とも称される）；C D 5 4（I C A M - 1とも称される）；C D 5 8（L F A - 3とも称される）；C D 7 0；C D 8 0；（B 7 . 1とも称される）；C D 8 6（B 7 . 2とも称される）；C D 1 0 0；C D 1 2 2；C D 1 3 7 L（4 - 1 B B リガンドとも称される）；C D 1 5 3；C T L A - 4（C D 1 5 2とも称される）；I C O S；O X 4 0 L（C D 1 3 4とも称される）；P D - 1；P D - L 2（B 7 - D Cとも称される）；S L A M（C D 1 5 0とも称される）；T I M - 1；T I M - 2；T I M - 3；T I M - 4；及び2 B 4（C D 2 4 4とも称される）を含む。本発明は、これらの分子の各々と結合するリガンドとの複合体を用いて実施することができる。言い方を変えれば、本発明の複合体は、上掲の分子から選ばれる細胞表面分子と結合するリガンドを含み、リガンドの組み合わせ及び本発明の複合体によって結合された細胞表面分子の組み合わせについて制限はない。同一の細胞表面分子と結合する1リガンド（例えば抗体）より多いリガンドの組み合わせも、本発明の複合体において使用することができる。リガンドの複合体が同一の細胞表面分子と結合する場合、リガンドは同一でも又は異なってもよい。従って、非限定的例として、複合体がC D 2 8と結合する2種のリガンドを含む場合、リガンドはC D 2 8と結合する2種の同一のモノクローナル抗体でもよく又はいずれもC D 2 8と結合する2種の異なったモノクローナル抗体でもよい。

10

20

【 0 0 1 4 】

非限定的例としてC D 2 8に拘る場合、C D 2 8分子と結合又は架橋することができるモノクローナル抗体又はその断片、又はC D 2 8の天然リガンド（例えばB 7ファミリー様B 7 - 1（C D 8 0）及びB 7 - 2（C D 8 6）のタンパク質）は、本発明の実施に用いることができる。いくつかの実施態様では、複合体はC D 2 8と結合する第一リガンドを含む。第二リガンドは、別の細胞表面分子、例えば上の段落で挙げた分子、と結合してもよい。1つの非限定的例では、第二リガンドがC D 3 / T C R 複合体及び/又はT細胞のC D 2分子に結合する。第一リガンドがC D 2 8に結合する場合、本発明の実施態様は、C D 3又はC D 3 / T C R 複合体と結合する第二リガンドを含む複合体を含む。複合体中の第一及び第二リガンドの各々は、第一細胞表面分子及び第二細胞表面分子と各々結合する抗体又はその断片を含んでもよい。かかる複体の非限定的例は、第一及び第二リガンドとして働く抗体を結合する2種のリンカー抗体によって連結される、第一及び第二リガンドとして働く2種の抗体を含有する、四量体の抗体複合体（T A C）を含む。リンカー抗体は、通常、抗体の不変領域に結合し、当該不変領域が異なったアイソタイプから成る場合には、各アイソタイプに対して1つの結合領域を有する二重特異的抗体も使用することができる。

30

【 0 0 1 5 】

その他の実施態様では、第一及び第二リガンドとして働く抗体又はその抗原結合断片は、1以上のリンカー分子によって、共有結合的に又は非共有結合的に結合することができる。かかるリンカー分子の非限定的例は、ビオチン化抗体、例えばFc領域にビオチン部分を有する抗体と結合するために使用することができる、アビジン又はストレプトアビジンを含む。追加の実施態様では、四量体の抗体複合体は、複体の混合物として用いることができる。これは、複体の混合物中に1種より多い複体の使用を含む。混合物全体の複合体は2種より多い異なったリガンドと接触することができる。非限定的例として、所与の混合物は、標的が第一及び第二リガンドと結合する第一四量体抗体混合物、及び標的が第三及び第四リガンドと結合する第二四量体抗体混合物を含むことができる。

40

【 0 0 1 6 】

50

別の局面では、本発明は、造血細胞、例えばT細胞を活性化する方法、及び当該細胞と本発明の複合体とを接触させることを含む方法を提供する。当該方法は、当該細胞を活性化して増殖又は拡張するために使用することができる。活性化はまた、当該細胞を誘導して、1以上の遺伝子産物又は細胞因子の生成を増加させることができる。あるいは、造血細胞を刺激して成長させる方法は、同様に当該細胞と本明細書に記載の複合体とを接触させることによって提供される。接触は、*in vitro*で、又は造血細胞（例えばT細胞）を使って達成することができる。造血細胞は、*ex vivo*で、例えばヒトもしくは動物対象の末梢血から得られる又は末梢血単核細胞（PBM C）画分の一部として得られる細胞である。あるいは、接触は、*in vivo*で、例えばヒト又は動物対象に複合体を投与することによってもよい。

10

【0017】

本発明は、ヒト又は動物対象への導入に好適な複合体の発見に一部基づく。複合体が内因性細胞と結合し及び当該細胞を活性化する場合に、ヒト又は動物対象へのそれらの導入の結果については予測できなかった。このことは、複合体が直接投与されるのか、又は*ex vivo*で処理された細胞と接触後に細胞会合形態にあるのか、とは無関係であった。処理細胞の*ex vivo*（又は*in vitro*）での培養、又は培地の洗浄もしくは交換による複合体の除去が、ヒト又は動物対象への導入に好適な複合体によって処理された細胞を提供するために充分であるか否かについても、予測できなかった。

【0018】

本発明の追加の実施形態は、複合体がベクターと組み合わせて使用されてベクターの形質導入効率を向上させることを含む。図1は、この実施態様を例証する非限定的模式図を示す。ベクターは、VSV-G（水疱性口内炎ウイルスG）エンベロープタンパク質を有するレンチウイルスベクターをシュードタイプ化する293HEK（ヒト胚腎）によって製造されることが示されている。パッケージベクターは、CD3/TCRと結合する抗体及びCD28と結合する抗体を含むTACの存在下で、CD4+ T細胞を形質導入するために用いられる。TACは、ベクターで形質導入中にT細胞の活性化、刺激及び/又は成長をもたらす。

20

【0019】

従って、本発明の1つの非限定的例は、抗-CD3/抗-CD28 TACの使用を含むT細胞刺激を提供する。起源がいずれもネズミの抗-ヒトCD3及び抗-ヒトCD28抗体の場合には、ラット抗-マウスIgG1抗体（及びその他の抗-マウス抗体、例えば特に限定されないがヤギ、ヒツジ、ウマ、ウサギ、ヒト、サル、ハムスター又はブタ由来抗体）がTACを形成するためにマウス抗体と共に使用することができる。細胞はTACの存在下及び非存在下で培養され、eGFP-発現レンチウイルスベクターで形質導入され、以下の実施例に記載のように試験された。本発明は、非限定的代替物としてヒト化された抗-マウス抗体を使用して実施することもできる。

30

【0020】

本発明が培養で実施される場合、細胞は、成長因子、例えば特に限定されないがIL-2又はIL-7及びIL-15の組み合わせ、の存在下で使用することができる。追加の実施態様では、その他のT細胞特異的サイトカイン又はケモカインが用いられる。非限定的例は、IL-4、MIP1アルファ（マクロファージ炎症性タンパク質1-アルファ）、MIP1ベータ（マクロファージ炎症性タンパク質1-ベータ）及びRANTES（活性化標準T細胞発現分泌調節）を含む。

40

【0021】

上記TACの使用は、T細胞に複数の予想外の結果を提供するためにも観察された。この結果は、1)より高い生存可能性、及び2)固体表面に付着された同一抗体で処理された細胞中よりもTAC処理細胞中の抗原による刺激に対して高いサイトカイン応答、を含む。本発明の追加の利点は、活性化細胞の著しい拡張；当該拡張細胞中でのT細胞多様性（例えばクローン多様性）の維持；及び90%を越える形質導入効率、を含む。

【0022】

50

細胞とベクター又はその他の核酸との同時接触の例証に加えて、当該細胞が本発明の複合体と接触される場合には、本発明は造血細胞のその他の形質導入方法を提供する。かかる方法は、当該細胞が本発明の複合体と接触される前後に、核酸分子を当該細胞に導入することを含む。本発明の形質導入方法は、好ましくは、例えばヒト又は動物対象の末梢血から得られた、又は末梢血単核細胞（P B M C）画分の一部として得られたT細胞と共に *in vitro* 又は *ex vivo* で実行される。当然のことながら、かかる細胞は *ex vivo* 処理後に対象に戻される。あるいは、接触は、*in vivo* で、例えば、本発明の複合体と組み合わせてベクター又はその他の核酸のヒト又は動物対象への投与によってでもよい。

【0023】

本発明はCD4 + T細胞の文脈で優先的に記載されてきたが、その他の造血細胞（又はT細胞）集団に関連して使用することもできる。1つの非限定的例として、本発明の方法は、T細胞の異なった集団を拡張するために使用することができる。CD4 + 細胞を越える非限定的例は、CD28 +、CD8 + T細胞及びCD3 + T細胞を含む。その他の非限定的例は、本明細書に記載の細胞表面分子のいずれかを発現する細胞を含む。本発明は、抗原特異的細胞の拡張にも採用することができる。得られた細胞は、多数の臨床及び研究用途、例えば特に限定されないが感染症、感染性疾患、遺伝性疾患及び癌の治療において使用することができる。いくつかの実施態様では、本発明は、抗原反応性に関してポリクローナル性であるが、ある細胞表面マーカーについて同質でも異質でもないT細胞を産生することができる。

【0024】

種々の方法は、造血細胞例えばT細胞を形質導入するために使用することができる。本発明のいくつかの実施態様では、細胞はベクター又はプラスミドで形質導入される。用語「ベクター」又は「プラスミド」は、異なった細胞又は遺伝的環境間での核酸配列を輸送することができる核酸分子を言う。異なった細胞環境は、同一生物の異なった細胞種を含み、一方、異なった遺伝的環境は、異なった生物の細胞又は異なった遺伝的材料及び/又はゲノムを有するその他の細胞状態を含む。本発明の非限定的ベクターは、自律複製可能なベクター及び本明細書の核酸配列の発現（又は「ペイロード」）を含む。ベクターは、際芒種に特異的な因子に応答する方法で発現を誘導することもできる。非限定的例は、*in vitro* での外因性調節因子又は *in vivo* での薬物誘導ベクターの組織的送達

【0025】

形質導入に使用されるベクターの種類は、任意のウイルスに基づくベクターである。レトロウイルス由来のベクター、例えばトリ細網内皮症ウイルス（アヒル感染性貧血ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ツビーハウス（T w i e h a u s）株細網内皮症ウイルス、C型レトロウイルス、細網内皮症ウイルスハンガリー - 2（R E V - H - 2））、及びネコ白血病ウイルス（F e L V）は、具体的な非限定的例である。レトロウイルスゲノムはベクターとして使用するために改変されてきた（Cone及びMulligan, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 6349-6353, (1984)）。本発明のベクターとして使用することができるレトロウイルスの非限定的例は、レンチウイルス、例えばヒト免疫不全ウイルス（H I V - 1及びH I V - 2）、ネコ免疫不全ウイルス（F I V）、ネコ免疫不全ウイルス（S I V）、マエディ/ビスナウイルス、ヤギ関節炎/脳炎ウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス（E I A V）、及びウシ免疫不全ウイルス（B I V）；トリC型レトロウイルス、例えばトリ白血球増加症ウイルス（A L V）；H T L V - B L Vレトロウイルス、例えばウシ白血病ウイルス（B L V）、ヒトT細胞リンパ球ウイルス（H T L V）、及びサルT細胞リンパ球ウイルス；哺乳動物B型レトロウイルス、例えばマウス乳癌ウイルス（M M T V）；哺乳動物C型レトロウイルス、例えばネズミ白血病ウイルス（M L V）、ネコ肉腫ウイルス

10

20

30

40

50

(F e S V)、ネズミ肉腫ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ギニアピッグC型ウイルス、ブタC型ウイルス、ふさふさした毛のモンキー肉腫ウイルス、及び毒ヘビレトロウイルス；スプマウイルス（泡沫状ウイルス群）、例えばヒトスプマウイルス（ H S R V ）
、ネコシンシチウム形成ウイルス（ F e S F V ）、ヒト泡沫状ウイルス、サル泡沫状ウイルス、及びウシシンシチウムウイルス；並びにD型レトロウイルス、例えばヤセザルウイルス（ M P M V ）、リスザルレトロウイルス、及びラングールモンキーウイルスを含む。

【 0 0 2 6 】

レンチウイルス及びレトロウイルスベクターは、その天然型エンベロープタンパク質を用いてパッケージすることができ、又は異種エンベロープタンパク質で包摂されるように修飾することができる。エンベロープタンパク質の例は、特に限定されないが、両種性
エンベロープ、エコトロピック・エンベロープ又はゼノトロピック・エンベロープを含み、及び両種及びエコトロピック部分を含むエンベロープでもよい。あるいは、envタン
パク質は、修飾された合成又はキメラenvコンストラクトでもよく、又は非レトロウイルス例えば水疱性口内炎ウイルス及びHVJウイルスから得てもよい。具体的非限定的例
は、M o l o n e y ねずみ白血病ウイルス（ M M L V ）、ラウス肉腫ウイルス、バキュロウイルスのエンベロープ、J a a s g s i e k t e 羊レトロウイルス（ J S R V ）エンベ
ロープタンパク質、及びネコ内因性ウイルスR D 1 1 4 のエンベロープ；テナガザル（ G i b b o n a p e ）白血病ウイルス（ G A L V ）エンベロープ；ヒヒ内因性ウイルス（
B a E V ）エンベロープ；サル肉腫関連ウイルス（ S S A V ）エンベロープ；両種性ねず
ミ肉腫ウイルス（ M L V - A ）エンベロープ；ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ；トリ
白血病ウイルスエンベロープ；内因性ゼノトロピックNZBウイルスエンベロープ；及び
例えばHVJウイルスエンベロープに限定されないパラミクソウイルスファミリー エン
ベロープをふくむ。

10

20

30

【 0 0 2 7 】

本発明のベクターは、標的細胞へのベクターの送達後の細胞及び/又は標的細胞のパッ
ケーシングで発現される、「ペイロード」をコードする遺伝子材料を含んでもよい。ベク
ターが粒子にパッケージされる事実はまた、「ペイロード」、又は「ペイロード」をコー
ドする遺伝子材料の発現で産生される生物学的産物を、標的細胞への送達のためのパッ
ケーシング粒子に取り込ませることができる。本発明の1「ペイロード」は、ベクターゲノムに
よってコードされる治療剤である。当然のことながら、ポリペプチド又は核酸（例えばR
N A ）である「ペイロード」はまた、パッケージ細胞中に発現し、標的細胞中での発現に
加えて又はその代わりにパッケージ粒子中に物理的に存在することができる。いくつかの
実施態様では、「ペイロード」は、使用パッケージ細胞に対して有毒でないか又は最低限
の毒性がある。

【 0 0 2 8 】

治療剤をコードする遺伝子材料の非限定的例は、ポリヌクレオチドをコードする腫瘍壊
死因子（ T N F ）遺伝子、例えば T N F - ；インターフェロン、例えばインターフェロ
ン - 、インターフェロン - 及びインターフェロン - をコードする遺伝子；インター
ロイキン、例えば I L - 1、 I L - 1 及びインターロイキン 2 ~ 1 4 をコードする遺伝
子； G M - C S F をコードする遺伝子；アデノシンデアミナーゼ又は A D A をコードする
遺伝子；細胞成長因子、例えばリンパ球の成長因子であるリンフォカインをコードする遺
伝子；抗体をコードする遺伝子；アポトーシスをコードする遺伝子又は細胞死促進遺伝子
、例えば腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド（ T R A I L ）；血管形成阻害産物
をコードする遺伝子；表皮成長因子（ E G F ）及びケラチノサイト成長因子（ K G F ）を
コードする遺伝子；溶解性 C D 4 をコードする遺伝子；第 V I I I 因子；第 I X 因子；チ
トクローム b ；グルコセレブロシダーゼ； T 細胞受容体； L D L 受容体、 A p o E、 A p
o C、 A p o A I 及びコレステロール輸送及び代謝に関連するその他の遺伝子；アルファ
- 1 抗トリプシン（ 1 A T ）遺伝子；インシュリン遺伝子；ヒポキサンチンホスホリボ
シルトランスフェラーゼ遺伝子； C F T R 遺伝子；陽性細胞選抜を可能にする遺伝子、例
えばメチルグアニトランスフェラーゼ変異体（ M G M T ）；陰性選抜マーカー又は「自

40

50

殺」遺伝子、例えばウイルスチミジンキナーゼ遺伝子、例えば単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子、サイトメガロウイルスチミジンキナーゼ遺伝子及び水痘・帯状ヘルペス・ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子；抗体の抗原結合ドメインのFc受容体、ウイルス複製を阻害するアンチセンス配列、例えばB型肝炎又は非A非B型肝炎の複製を阻害するアンチセンス配列；アンチセンスc - my bオリゴヌクレオチド；及び、抗酸化剤をコードする遺伝子、例えば特に限定されないがマンガン・スーパーオキシドジスムターゼ(Mn - SOD)、カタラーゼ、銅 - 亜鉛 - スーパーオキシドジスムターゼ(CuZn - SOD)、細胞外スーパーオキシドジスムターゼ(EC - SOD)、及びグルタチオンレダクターゼ；多剤耐性(MDR)遺伝子；リボザイムをコードするポリヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド；例えばsiRNA(短鎖干渉RNA)、アプタマー及び/又はデコイRNAの使用によるRNAi(RNA干渉)誘導のためのマイクロRNA類及びヘアピンRNA類をコードするポリヌクレオチド；アンジオテンシン変換酵素、血管平滑筋カルシウムチャンネル又はアドレナリン作用性受容体の競争的阻害剤として働く分泌ペプチドをコードする遺伝子；亜鉛フィンガーヌクレアーゼをコードする遺伝子；及び中枢神経内のアミロイド班を抑える酵素をコードする遺伝子を含む。

10

【0029】

以下のものをコードする遺伝子材料も使用できる：組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)；尿プラスミノゲン活性化因子(ウロキナーゼ)；ヒルジン；フェニルアラニンヒドロキシラーゼ遺伝子；硝酸シンターゼ(内皮性及びニューロン性)；血管作用ペプチド；血管由来ペプチド及び抗 - 血管由来ペプチド；ドーパミン遺伝子；ジストロフィン遺伝子； α -グロブリン遺伝子； β -グロブリン遺伝子；HbA遺伝子；プロト癌遺伝子例えばras、src及びbcl遺伝子；癌抑制遺伝子、例えばp53及びRb；LDL受容体；乳癌、卵巣癌、胃癌及び子宮癌の治療のためのヘレグリン - タンパク質遺伝子；T細胞抗原受容体の鎖内含有エピトープに特異的な及びモノクローナル抗体。しかしながら、本発明の範囲が任意の特定の治療剤に限定されないことが理解できよう。

20

【0030】

本発明のいくつかの実施態様では、ペイロードは血友病の治療に有効な凝固因子(たとえば第VII因子又は第IX因子)をコードする遺伝子でもよく、又は当該遺伝子は別の治療効果を有する1以上の産物をコードすることができる。好適な遺伝子の例は、サイトカイン、例えばTNF、インターロイキン類(インターロイキン1~12)、インターフェロン類(、及び γ -インターフェロン)、T細胞受容体タンパク質及び抗体結合Fc受容体をコードする遺伝子を含む。

30

【0031】

本発明のベクターは、様々な疾患、例えば特に限定されないが、感染性疾患、例えばHIV(ヒト免疫不全ウイルス)、HCV(C型肝炎ウイルス)及びヘルペス感染症等のウイルス感染症；遺伝子型疾患、例えば癌、アデノシン・デアミナーゼ欠乏症、鎌状赤血球貧血、サラセミア、肝炎、糖尿病、 α -抗トリプシン欠乏症、アルツハイマー症又はパーキンソン病等の脳疾患；及び、成長疾患及び心臓疾患等のその他の疾患、例えばコレステロールが代謝される方法での変更及び免疫系の欠陥によって起こる疾患、の治療に有用である。

40

【0032】

その他の実施態様では、本発明のベクターは、陰性選抜マーカー、例えばウイルスチミジンキナーゼ遺伝子及び更に具体的には単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子を含んでもよい。かかるベクターは、*in vivo*又は*ex vivo*でヒト患者の癌細胞(特に腫瘍細胞)に投与することができる。次いで、ベクターは腫瘍細胞を形質導入する。ベクターが腫瘍細胞を形質導入した後、患者は、相互作用剤、例えばガンシクロビル又はアシクロビルを与えられる。相互作用剤は、陰性選抜マーカーを含むベクターで形質導入された全ての複製細胞(すなわち癌又は腫瘍細胞)を死滅するために陰性選抜マーカーによって発現されるタンパク質と相互作用する。あるいは、ベクターは、腫瘍に特異的な因子例えばTRAILリガンドを誘導する細胞表面促進死又はアポトーシスをコ

50

ードする遺伝子発現のために、前駆細胞又は任意の起源の幹細胞を形質導入するために用いることができる。かかる前駆細胞又は幹細胞は腫瘍部位に不法使用することができ、そのため腫瘍を促進死遺伝子と接触させて治療効果を仲介する。

【0033】

本発明のベクターは、「デコイ分子」として公知の分子をコードすることもできる。かかる「デコイ」は、ウイルス複製又はウイルス会合に必要なウイルスタンパク質の結合要素、例えばTARでもよい。ベクターは、アンチセンス分子及び特定の核酸分子に対するリボザイム、例えばウイルス複製又は感染を可能にするように発現されている分子、を発現することもできる。

【0034】

本発明は、対象例えばヒトにおける造血細胞、例えばCD4+ T細胞の*in vivo* 拡張にも適用することができる。本発明の複合体の投与は、一般的に、*in vivo* でT細胞を活性化又は刺激するためにタンパク質療法形態である。これは、HIV感染又はその他の免疫不全個体の場合に有利に使用することができる。あるいは、対象由来のT細胞は、*in vitro* 又は*ex vivo* で本発明の方法によって処理した後、個体に戻すことができる。

【0035】

追加の実施態様では、本発明の方法は、混合細胞集団又は異種細胞集団内で細胞の小集団を選択的に拡げるために使用することができる。非限定的例は、リンパ球の混合集団におけるCD4+又はCD8+細胞の拡張を含む。拡張されるべき細胞は、場合により、抗原に対するその特異性に基づいて、例えば抗原による刺激で選択することもできる。その他の実施態様では、本発明の方法は、Th1又はTh2細胞が活性化され、形質導入され、及び/又は拡張されるように、当該細胞にその使用を向けることができる。その他の実施態様では、細胞は、記憶表現型又は天然表現型を有する細胞；末梢又は中心細胞；又は、Th1又はTh2に限定されない単なるTh細胞でもよい。

【0036】

本発明の抗体及びそれを含む組成物

本発明は、本明細書に記載の複合体及び方法に使用するための抗体組成物を提供する。抗体組成物は、造血細胞例えばT細胞上で2種の異なった細胞表面分子（又は抗体から見た抗原）に結合する少なくとも2種の抗体を含む。用語「少なくとも2種の抗体」とは、（起源を同じにする抗原に結合する少なくとも1種の抗体分子に対して）少なくとも2種の抗体を含む抗体組成物を言う。非限定的例として、CD3抗原に結合する抗体は抗体の1種と考えられる。

【0037】

いくつかの実施態様では、2種の抗体（1）及び（2）は、直接結合して二機能性抗体を形成することができる。化学的結合は、二機能性抗体を形成するために用いることができる。非限定的例は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸エステル(SPD P)を用いる1つの抗体と別の抗体との化学的結合である。

【0038】

あるいは、2種の抗体（1）及び（2）は直接結合するか、又はTACは本明細書に記載のようにして形成することができる。非限定的例は、抗体（1）に特異的な可変領域及び抗体（2）に特異的な可変領域を含む二重特異性抗体の使用を含む。非限定的例は、異なる抗体（1）及び（2）の不変領域に結合する可変領域を有する二重特異性抗体を含む。ハイブリッドハイブリドーマは二重特異性抗体を生成するために用いることができる。当業者に公知の具体的方法として、Staerz及びBevan (1986, PNAS (USA) 83: 1453)、及びStaerz及びBevan (1986, Immunology Today, 7: 241)を参照されたい。化学的手段は二重特異的抗体を構築するために使用することもできる；Staerzら(1986, Nature, 314: 628)及びPerezら(1985, Nature, 316: 354)を参照されたい。

【0039】

その他の化学結合系手段は、E-アミノ基又はヒンジ領域チオール基を有するホモ-及

10

20

30

40

50

びヘテロ双機能性試薬を用いる結合を含む。非限定的ホモ双機能性試薬、例えば5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)又はDN TBは、2つのFab間のジスルフィド結合を形成する。あるいは、O-フェニレンジマレイミド(O-PDM)は、2つのFab間のチオエーテル結合を形成するために使用することができる。ヘテロ双機能性試薬、例えばSPDPは、分類又はアイソタイプに関係なく、抗体及びFab断片の露呈アミノ基と結合する。

【0040】

二重特異的抗体を産生するその他の手段は、組換え免疫グロブリンの発現を含む。組換えDNA系技術は、抗体断片をコードするDNA配列を、組換えタンパク質を発現するために用いられる核酸コンストラクトに一体化するために用いられる。あるいは、二重特異的抗体は、2つの単鎖Fv(scFv)断片のリンカー介在結合によって単一共有構造として形成することができる。

【0041】

二重特異的抗体は、体細胞ハイブリダイゼーションによって形成することもできる。すなわち、2種の樹立ハイブリドーマの融合が四量体(quadr oma)を生成し;又はヒト又は動物由来(及び第二抗原と結合する)のリンパ球を有する1種の樹立ハイブリドーマの融合が三量体(tri oma)を生成する。

【0042】

抗体(1)及び(2)の非直接的結合は、互いに直接的には共有結合されない抗体を言う。その代わりに、それらの抗体は、リンカー分子、例えば両者を結合する免疫グロブリンを介して結合される。2種のかかる免疫グロブリンが使用される場合、TACは結果物である。かかるTACは、同一の第一動物種由来の第一モノクローナル抗体(1)及び第二モノクローナル抗体(2)を混合することによって調製することができる。その後、抗体(1)及び(2)は、第一動物種々の由来の抗体のFc部分と結合する第二動物種の抗体(場合によりモノクローナル)の等モル(又は約等モル)量と接触する。あるいは、断片が第一動物種々の由来の抗体のFc部分と結合する場合に、抗体(1)及び(2)は、第二動物種の抗体(場合によりモノクローナル)のF(ab')₂断片の等モル(又は約等モル)量と反応する。TACの追加の記載及びそれらの調製方法については、米国特許第4,868,109号明細書を参照されたい。

【0043】

本明細書で用いるように、抗体はモノクローナル抗体でも又はポリクローナル抗体でもよい。本発明はまた、抗体断片(例えばFab及びF(ab')₂)、キメラ抗体及びTACの形成において二機能性又は二重特異的抗体の使用を考慮する。抗体(又はその抗原結合断片)が非無作為的に、例えば(天然に又は人的介入によって)存在するその他の分子が表面分子と結合しないような十分な解離定数で、結合する場合、抗体は細胞表面分子(又は抗原)と結合し又は当該分子に対して反応性であると考えられる。結合特異性は、2種の異なった抗原を区別できるような細胞表面分子及び無関係な抗原を区別して結合する、抗体の能力に基づいて決定することができる。このことは、個々の抗原に固有のエピトープと結合する抗体で容易に理解できる。「特異性」抗体は、その他のエピトープに比べて特定のエピトープと特異的に結合する。

【0044】

抗体断片は、当業者に公知の方法によって製造され、当該断片は細胞表面分子との結合で選別される。非限定的例として、F(ab')₂断片は、ペプシン消化、場合により条件を緩和してFab'断片を製造することによって作ることができる。

【0045】

キメラ抗体は、異種由来の変領域及び不変領域を組み合わせた抗体分子である。この用語は、非ヒト動物変領域(例えばマウス、ラット又はその他の種由来)がヒト不変領域と組み合わされたヒト化抗体を含む。ヒト化抗体を含むTACは、本発明のin vivo法で用いられ、ヒト対象での受容を向上させる。

【0046】

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様では、モノクローナル抗体 (M A b) は本発明の実施で用いられる。本明細書に記載の細胞表面分子と結合する M A b は、当該分野で公知の方法の使用によって容易に調製することができる。1つの非限定的例は、ハイブリドーマ及び当業者に公知のその他の技術の使用である。ハイブリドーマ細胞は、細胞表面分子と特異的に反応する抗体の発現で選別される。M A b s は使用前に単離してもよい。

【0047】

E x v i v o 細胞処理のための T A C

本発明は、e x v i v o 細胞拡張の文脈、例えば非限定的例として医薬の調製に適用することができる。従来、処理に利用できる細胞数を議論し、治療転帰を向上させるために、身体から取り出され、かつ身体外で複数回拡張された自系 (自身) のリンパ球を用いて多数の臨床試験が行われてきた。細胞拡張は、e x v i v o での細胞の刺激方法の効率により制限される。例えば、サイトカイン又は抗原提示細胞 (A P C) を用いる T 細胞の活性化を経る拡張は成功しているが、その拡張の程度は限られたものである。T 細胞上の同起源の A P C 受容体に結合しかつ架橋する固定化抗体でもよい人工 A P C を用いる別法があるが、これは歴史的に高レベルの拡張を示した。

10

【0048】

本発明は、効率的細胞拡張の代替を提供する。加えて、この方法を用いる拡張は、より高い生存可能性、拡張細胞の免疫能の維持及び T 細胞多様性を含む数々の予期しない利益を有し、同時に更に細胞の拡張及び形質導入を可能にする。本発明によって拡張された細胞産物を用いる場合に、かかる利益は、臨床での成功を増大させるために適用できる。本発明の潜在的出願は、非限定的例として癌又は H I V の養子免疫療法を含む。

20

【0049】

非限定的例として、e x v i v o 細胞拡張のための本発明の使用は、以下のステップを含んでもよい：(例えば血漿交換による)患者からの細胞単離、場合により続いて細胞部分集合の精製；当該細胞を本発明の T A C 複合体と接触させて、活性化及び拡張を誘導すること、場合により(例えばベクターによる形質導入による)細胞の遺伝子的改変が付随する；拡張可能な期間中、複合体の存在下で当該細胞を培養すること；及び、当該細胞を採取して凍結するか、又は当該細胞を直ちに使用すること。

【0050】

本発明のこれらの局面は、医薬調製のための e x v i v o 細胞拡張の方法、すなわち細胞単離及び本発明の複合体を用いる拡張を含む方法として纏めることができる。別の言い方をすれば、本発明は、医薬調製における e x v i v o 細胞拡張方法であって、本発明の複合体との接触後の細胞単離及び拡張を含む方法を提供する。かかる方法では、細胞は本明細書に記載のようにして遺伝子的に、例えば非限定的例としてレトロウイルスベクターに使用によって改変することができる。

30

【0051】

ベクターの T A C 介在ターゲティング

本発明はまた、特定の造血細胞種にベクターを標的とするために T A C の使用を提供する。当該分野では周知であるが、混合細胞集団中の細胞を標的とするために、ウイルスベクター及び本明細書に記載のベクターを含む任意のベクター種の直接又は特異的ターゲティングが重要な挑戦である。例えばウイルスベクターを用いて、工学用の細胞 - 特異的エンベロープをウイルスベクターに変えることに、長い間、焦点が集中してきた。このようにして、ウイルス粒子のエンベロープは所望の細胞種 (複数) を標的にする。しかしながら、この分野での進歩は緩やかであり、i n v i t r o でのターゲティングが成功したとしても、作り出されたベクターは、臨床的適用のための精製能力を喪失することがしばしばある。精製が成功しないという傷害は、多くのエンベロープタンパク質の生来の不安定性に起因するものである。当該タンパク質は、臨床的適用のための精製中に、ある程度、奪われ又は変性される。結果的に、ウイルスベクター力価及びベクター粒子の利用性を喪失することになる。

40

【0052】

50

本発明は、エンベロープ技術に代わるものとして用いることができる。非限定的例として、TACはベクタープロデューサー細胞の膜表面に存在するタンパク質、対象の標的細胞上に存在し当該細胞に特異的なタンパク質と連結する方法で用いられる。従って、TACは、ウイルスベクター（プロデューサー細胞の膜表面タンパク質）と結合し、標的細胞種に特異的なベクター-TAC複合体を形成することができる。TAC及びウイルスベクターの結合は、次のベクター製造、例えば本発明のいくつかの実施態様での使用又は注射時に、ベクターの安定性を向上させ又は不変を維持するように、実行される。In vitroでの適用については、好ましい実施態様はTACでのヒト抗体の使用であろう。その結果、標的ベクターの免疫原性が最小限増加する。

【0053】

従って、本発明は、標的造血細胞にエンベロープベクターを方向付ける方法を更に提供する。当該方法は、標的細胞を、エンベロープベクター及びリガンド複合体の結合体と接触させることを含んでもよい。当該リガンドは、本明細書に記載の細胞表面分子と結合し、ベクター-複合体結合を形成する。複合体は、当該ベクターのエンベロープ内の細胞表面分子と結合する第一リガンド、及び標的細胞の細胞表面分子と結合する第二リガンドを含む。当業者に公知のエンベロープベクター又は包接されるベクターはいずれも、当該方法の実施に使用することができる。あるいは、当該方法は、ベクター粒子及び複合体の結合の使用であって、ベクター粒子が包接されておらず、当該複合体が当該粒子と結合する第一リガンド及び標的細胞の細胞表面分子を結合する第二リガンドを含む、当該使用を含む。ベクター粒子は、例えばカプシドによって包摂されているベクターである。当業者であれば理解できようが、第一リガンドは露呈分子又はベクター粒子のエピトープと結合する。

【0054】

本発明のキット実施態様

本発明はまた、本発明の複合体を含む組成物及びキットを提供する。かかるキットは、場合により、本発明の方法におけるキットの使用又はキットの適合性に関連する識別表示、ラベル又は教示を更に含む。かかるキットは容器を含んでいてもよく、容器の各々は、当該方法において利用される、1以上の様々な薬剤及び/又は試薬（場合により濃縮形態で）、例えば必要とされる又所望の細胞生育培地及び成長因子、を含む。1組の教示又は試薬識別剤も典型的には含まれよう。例えば、キットは、抗-CD28抗体に結合された抗-CD3抗体との溶解性複合体の組成物を含むことができる。組成物は貯蔵を目的として凍結乾燥することができる。

【0055】

これまで一般的に本発明を記載してきたが、同一ものが、例証方法として提供されるが特に断らなければ本発明を限定する意図ではない以下の実施例を参考として容易に理解されるであろう。

【実施例】

【0056】

実施例1：手法

末梢血単核細胞（PBMCs）をフィコール（Ficoll）（商標）密度勾配分離によって血漿交換産物から単離した。PBMCsはマックス（MACS）（登録商標）カラムを用いてCD4+を豊富にした。細胞は後の使用のために冷凍した。

【0057】

冷凍CD4+ T細胞を解凍し、以下のように培養した。細胞をX-Vivo 15培地で培養し、次いで四量体の抗体複合体（TAC）で処理した。

【0058】

当該TACは、1種のマウス抗-ヒトCD3及び1種のマウス抗-ヒトCD28に結合された2種の抗-マウスIgG1抗体から成っていた。TACは、2種の抗-CD3、2種の抗-CD28及び1種の抗-CD3と、2種のラット抗-マウス抗体に結合された1種の抗-CD28抗体との各々の複合体を含む混合物である。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

細胞は T A C で予備インキュベートした後、 V R X 4 9 4 ベクターで形質導入した。

【 0 0 6 0 】

V R X 4 9 4 ベクターは、 e G F P 発現レンチウイルスベクターである。異なった形質導入は以下に要約することができる：

- ・モック形質導入 - ベクターなし (N V)
- ・培養の最初の 2 日間に M O I 4 0 で形質導入 (2 0 D 0 、 2 0 D 1)
- ・培養の初日に M O I 4 0 で形質導入 (4 0 D 0)
- ・培養の 2 日目に M O I 4 0 で形質導入 (4 0 D 1)

【 0 0 6 1 】

7 日目に、細胞をカウントし、大きさを測り、 F A C S (蛍光活性化細胞選別装置) を用いて e G F P (形質導入マーカー) 、 C D 2 5 及び C D 6 9 発現 (T 細胞活性化マーカー) を解析した。

【 0 0 6 2 】

実行した様々な分析は下記に要約される：

- ・細胞拡張レベル及びサイズを 2 1 日間測定した
- ・細胞形質導入レベル (e G F P) を 7 日目に分析した
 - ・ F A C S 分析
 - ・定量的 P C R 分析 (T a q m a n)
- ・細胞活性化マーカー (C D 2 5 又は C D 6 9) 発現を 7 日目に分析した
- ・ T C R V マーカー発現を 1 4 日目に測定した
- ・細胞内サイトカイン染色を 1 4 日目に行った
- ・細胞生存可能性を 1 4 日目に F A C S で測定した

【 0 0 6 3 】

実施例 2 : 結果

細胞拡張に与える T A C 効果を測定し、その結果を図 2 に示した。 2 1 日目に拡張レベルは約 1 0 0 倍になった。

【 0 0 6 4 】

細胞サイズに与える T A C 効果を測定し、その結果を図 3 に示した。

【 0 0 6 5 】

F A C S 分析を用い、 T A C 処理細胞中の e G F P 、 C D 2 5 及び C D 2 9 の発現を検出した。その結果を図 4 に示す。データは、 T A C 処理細胞が C D 2 5 及び C D 6 9 マーカーの高発現を示した、ことを示す。 T A C 処理細胞を約 9 2 % に到達しそうなレベルで形質導入した。

【 0 0 6 6 】

ベクターによる形質導入の確認は、定量的 P C R 分析 (T a q m a n) で行った。その結果を図 5 に示す。

【 0 0 6 7 】

T A C で処理されかつ 2 週間の期間拡張された細胞上での数々の T C R V ファミリーの発現範囲及びレベルを測定する実験を行った。これらのデータを図 6 に示す。チャートから明らかなように、拡張細胞上で発現した T C R V ファミリーの範囲が T A C なしで観察された表現型と相違しなかった。

【 0 0 6 8 】

生細胞の死細胞に対する割合を T A C 処理後にプロットした。その結果を図 7 に示す。 T A C 処理細胞は、対照試料に比べて 5 倍少ない死細胞を有していた。特定の理論に拘束されるものではなく、本発明の理解を高めるために提供されるものでもないが、これらの結果の可能性のある原因は、過剰刺激がアポトーシスを誘導するようなその他の方法と比べて、 T A C は細胞を過剰に刺激しないことである。

【 0 0 6 9 】

図 8 は、細胞が 6 時間、 (サイトカイン産生を刺激するために) 超抗原 S E B で刺激さ

10

20

30

40

50

れた後に細部内サイトカイン染色 (I C S) が生じたことを示す。非 - S E B 刺激 T A C 活性化細胞は、サイトカイン産生の低基本 (又は自発的) レベルを有していたが、S E B 刺激後に高レベルを達成しなかった。

【 0 0 7 0 】

歴史的には、H I V 感染個体から単離された細胞の効率的な形質導入及び拡張は、健全個体から単離された細胞での形質導入及び拡張とは、更に異なる。H I V 感染患者から単離された細胞が T A C によって効率的に形質導入され拡張されたか否かを測定するため、4 人の H I V 感染個体の血漿交換産物から単離された細胞を実施例 1 に記載のように評価した。ベクターの生物活性が、*i n v i t r o* で H I V 複製の周知の代理マーカーである、培養上清中の H I V カプシドタンパク質 (p 2 4) の産生を測定することによっても得られるので、細胞を形質導入するために用いるベクターは、H I V に対してアンチセンスを発現するベクターであった。図 9 及び 1 0 は、パーセント G F P 陽性及びコピー数を測定することにより、これらの細胞の形質導入効率を示す。図 1 1 及び 1 2 は、効率的な細胞活性化 (サイズで示す) 及び拡張を示す。最後に、図 1 3 は、形質導入及び非形質導入細胞による内因性 H I V 阻害を示す。時間経過を患者 6 3 について示す。

10

【 0 0 7 1 】

結論：

しかしながら、上記の結果は、T A C 処理は細胞死を引き起こす点で、T 細胞の温和な刺激である、ことを示すものである。当該処理は、T C R V レパートリーに関する拡張細胞集団を歪曲しない。従って、全般的に見れば、細胞はおそらく健全であり、例えば *e x v i v o* 療法の一部として用いられる場合に、首尾よく対象に導入される。

20

【 0 0 7 2 】

重要なことは、H I V 患者から単離された細胞データは、抗 - H I V 治療能力を落とすことなく、T A C が継続して当該集団に効率的な形質導入及び拡張ができることを示している。このことは、H I V 治療薬の調製のための *e x v i v o* 細胞拡張のためのこの方法の実現可能性、及びその他のヒト疾患医薬、例えば癌医薬のためのこの方法の実現可能性を証明するものである。

【 0 0 7 3 】

特許、特許出願及び刊行物を含む本明細書に引用された全ての文献は、以前に具体的に援用されたか否かにかかわらず、参考文献として本明細書にその全体が援用されている。

30

【 0 0 7 4 】

これまで本発明を十分に記載してきたが、本発明の意図及び範囲から逸脱することなく、及び過度の実験をすることなく、同一ものが幅広い範囲の均等パラメーター、濃度及び条件の範囲内で実行できることを、当業者であれば理解するだろう。

【 0 0 7 5 】

本発明をその具体的実施態様との関連で記載してきたが、更なる修飾が可能であることは理解できるだろう。本出願は、一般的に、本発明の原則に従い、及び本発明が追求している技術内の公知の又は慣習的实施内であって、かつ本明細書で先に記載の必須の特徴に適用できる本開示から逸脱するものを含む、本発明の任意の変更、使用又は適用を保護することを意図している。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 6 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明の実施を考慮した実施態様を示すスキームである。

【 図 2 】 図 2 は、四量体抗体複合体 (T A C) 処理後の細胞拡張レベルを示す。凡例：N V、ベクターなし；2 0 D 0 / 2 0 D 1、0 日目及び 1 日目に M O I 2 0 を添加；4 0 D 0、0 日目に M O I 4 0 を添加；4 0 D 1、1 日目に M O I 4 0 を添加。

【 図 3 】 図 3 は、T A C 処理後の細胞サイズの測定を示す。凡例：N V、ベクターなし；2 0 D 0 / 2 0 D 1、0 日目及び 1 日目に M O I 2 0 を添加；4 0 D 0、0 日目に M O I 4 0 を添加；4 0 D 1、1 日目に M O I 4 0 を添加。

【 図 4 】 図 4 は、T A C 処理細胞中の e G F P、プラス C D 2 5 及び C D 6 9 発現を利用

50

する形質導入レベルを示す。凡例：NV、ベクターなし；20D0 / 20D1、0日目及び1日目にMOI 20を添加；40D0、0日目にMOI 40を添加；40D1、1日目にMOI 40を添加。

【図5】図5は、ベクターの形質導入効率を検出するためのQPCR分析の結果を示す。凡例：NV、ベクターなし；20D0 / 20D1、0日目及び1日目にMOI 20を添加；40D0、0日目にMOI 40を添加；40D1、1日目にMOI 40を添加。

【図6】図6は、TAC処理細胞中のTCRVレポーターの分析結果を示す。凡例：CV C、対照ベクター、CD3溶解性；NV C、ベクターなし、CD3溶解性；CV T、対照ベクター、TAC；NV T、ベクターなし、T a c。

【図7】図7は、TAC処理後の細胞生存可能性の結果を示す。凡例：CV C、対照ベクター、CD3溶解性；NV C、ベクターなし、CD3溶解性；CV T、対照ベクター、TAC；NV T、ベクターなし、T a c。

【図8】図8は、TAC処理されかつ超抗原スタフィロコッカス・エンテロトキシン (SEB) で刺激された細胞中のサイトカイン産生の分析結果を示す。凡例：CV C、対照ベクター、CD3溶解性；NV C、ベクターなし、CD3溶解性；CV T、対照ベクター、TAC；NV T、ベクターなし、T a c。

【図9】図9は、TACで活性化されかつ拡張されたT細胞の培養物中の7日目のGFP発現割合で測定した、ベクター形質導入効率を示す。T細胞は、以下のウイルスペイロード (v1) 及びCD4カウントを有する4人のHIV患者のパネルから単離された：001-058-Z、v1 = 75コピー/ml、CD4 = 1200細胞/μl；001-059-G、v1 = 45、176コピー/ml、CD4 = 290細胞/μl；001-062-J、v1 = 301コピー/ml、CD4 = 720細胞/μl；及び001-063-K、v1 = 10、132コピー/ml、CD4 = 610細胞/μl。

【図10】図10は、上記の図9の凡例に記載の4人のHIV患者のパネル由来の、TACで活性化されかつ拡張されたT細胞中のベクターのコピー数/細胞によって測定した、ベクター形質導入効率を示す。

【図11】図11は、上記の図9の凡例に記載の4HIV患者のパネル由来の、TACで活性化されかつ拡張されたT細胞の活性化を示す。細胞はCoulter Z2カウンタを用いて細胞サイズを測定した。対照に匹敵する非形質導入 (ベクターなし又はNV) 示す。

【図12】図12は、上記の図9の凡例に記載の4HIV患者のパネル由来のT細胞の拡張プロフィールを示す。対照に匹敵する非形質導入 (ベクターなし又はNV) も示す。

【図13】図13は、上記の図9の凡例に記載の4HIV患者のパネルにおける抗-HIVベクターの生物活性を説明する。p24の産生に対するベクター効果、HIV複製の代理マーカーを示す。合致非形質導入 (ベクターなし又はNV) 対照は、各患者について示す。患者63の培養物中のp24値は、実施例として時間的経過全体について示す。

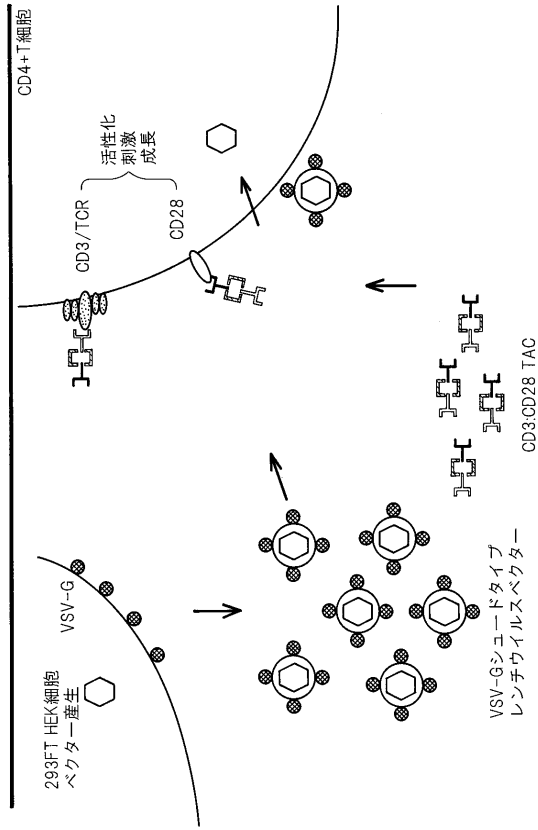
10

20

30

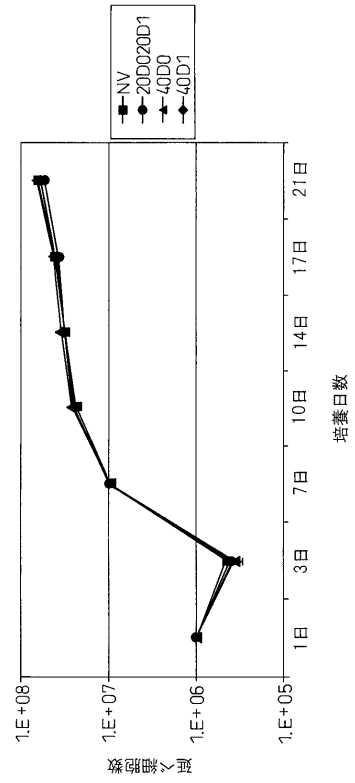
【 図 1 】

図1



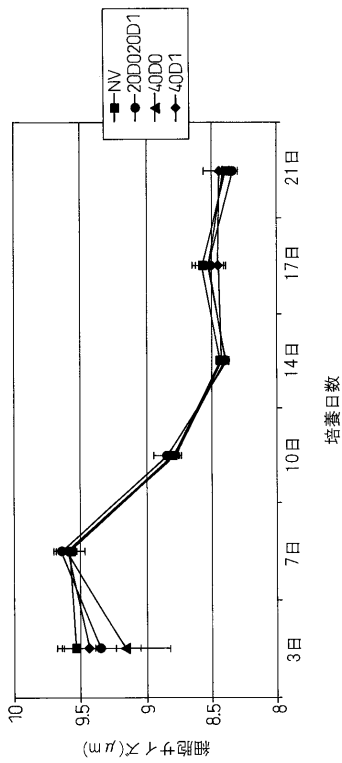
【 図 2 】

図2



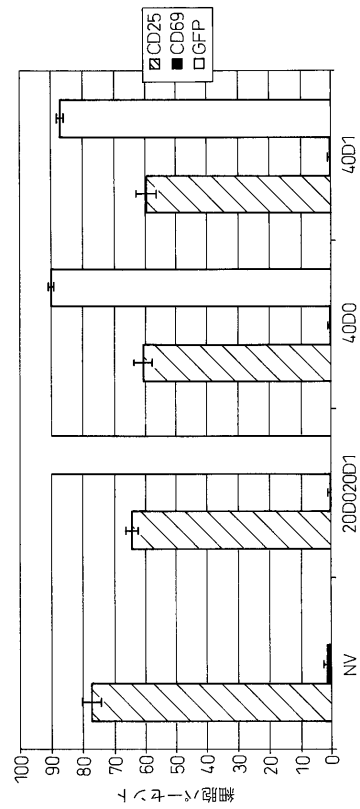
【 図 3 】

図3

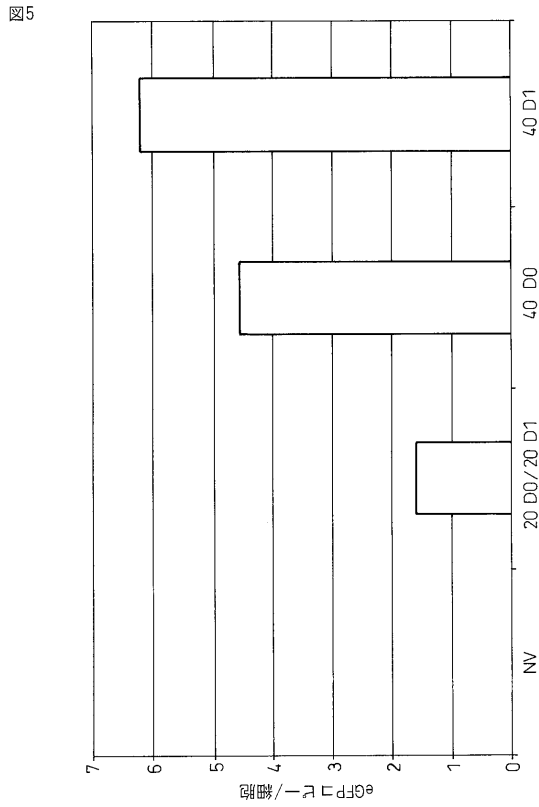


【 図 4 】

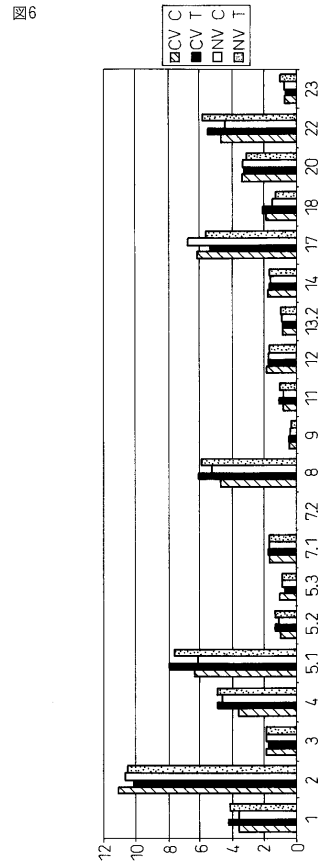
図4



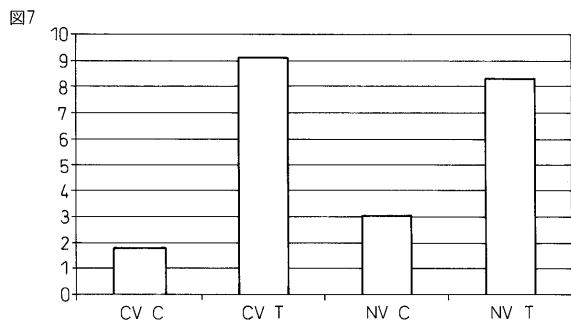
【 図 5 】



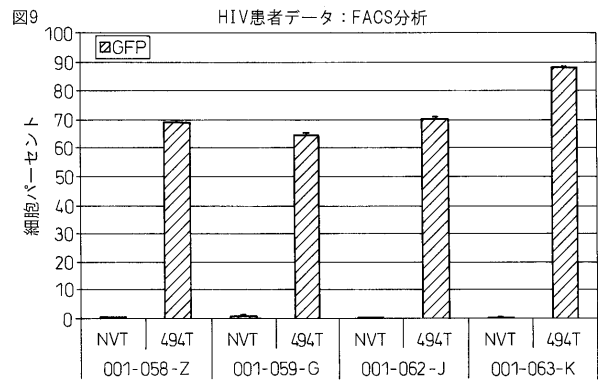
【 図 6 】



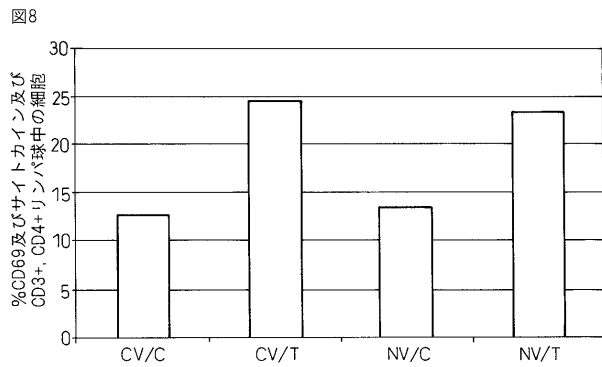
【 図 7 】



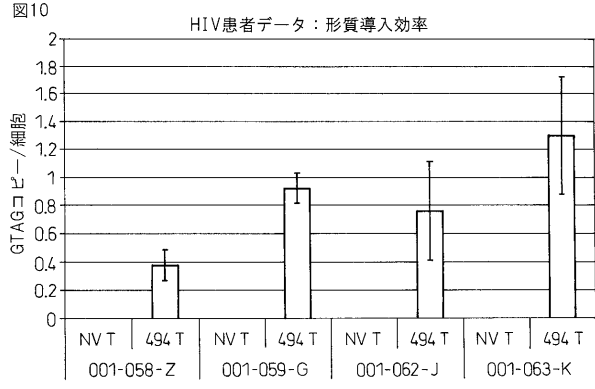
【 図 9 】



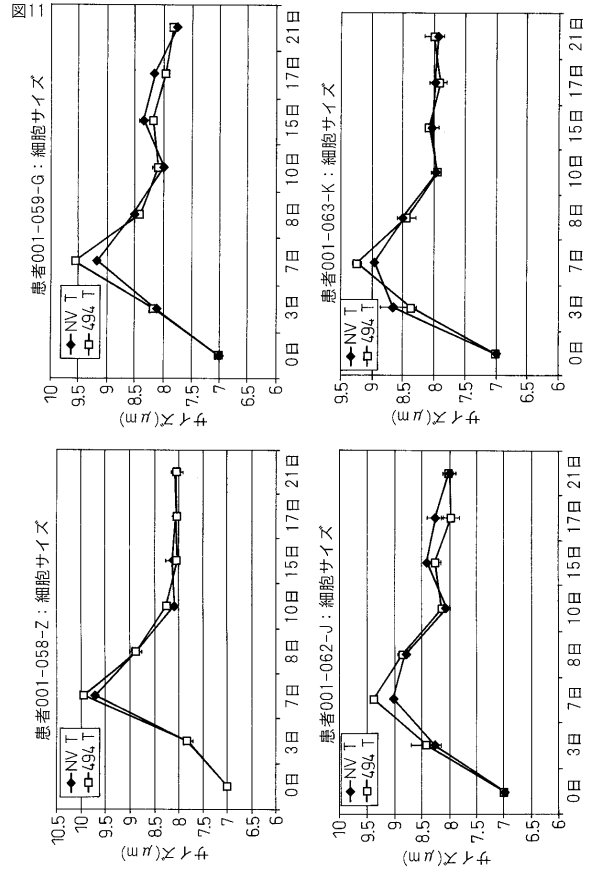
【 図 8 】



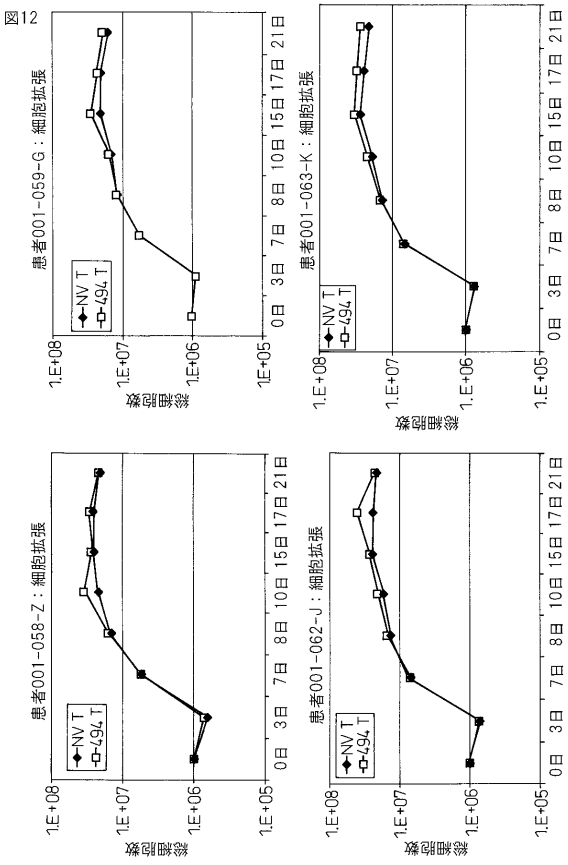
【 図 1 0 】



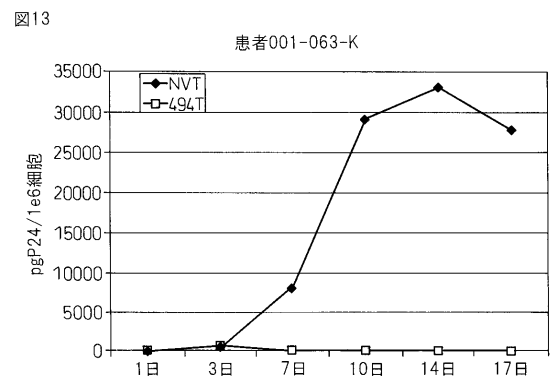
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18	

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ローレント フミュー

アメリカ合衆国, メリーランド 2 0 8 7 6, ジャーマンタウン, ウィートフィールド ドライブ
1 9 2 2 0

(72)発明者 ブライアン パスツキエット

アメリカ合衆国, メリーランド 2 1 7 0 3, フレデリック, プレス コート 6 7 6 3

(72)発明者 フランク レミエル

アメリカ合衆国, メリーランド 2 0 8 7 8, ノース ポトマック, ピーチ リーフ ドライブ
1 5 4 2 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 DA02 EA02 HA11

4B065 AA94X AB01 BA02 BB19 CA24 CA44 CA46

4C087 AA01 AA02 AA03 BB34 BB37 BB64 CA47 NA14 ZA51 ZA55

ZB09 ZB33

4H045 AA11 AA30 BA41 CA42 DA75 EA20 EA50 FA74

【外国語明細書】

2006345852000001.pdf