

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6865160号  
(P6865160)

(45) 発行日 令和3年4月28日(2021.4.28)

(24) 登録日 令和3年4月7日(2021.4.7)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 N 5/0783 (2010.01)** C 1 2 N 5/0783  
**A 6 1 K 35/17 (2015.01)** A 6 1 K 35/17 Z

請求項の数 39 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2017-512293 (P2017-512293)	(73) 特許権者	398076227
(86) (22) 出願日	平成27年9月4日 (2015.9.4)		ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ
(65) 公表番号	特表2017-527286 (P2017-527286A)		イー
(43) 公表日	平成29年9月21日 (2017.9.21)		アメリカ合衆国、メリーランド州 212
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/048536		18、ボルチモア、ノース・チャールズ・
(87) 国際公開番号	W02016/037054		ストリート 3400
(87) 国際公開日	平成28年3月10日 (2016.3.10)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成30年8月29日 (2018.8.29)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	62/045,782	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成26年9月4日 (2014.9.4)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	62/186,040	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成27年6月29日 (2015.6.29)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 正常酸素条件と交互になった低酸素条件における骨髄浸潤リンパ球の活性化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ex vivoにおいて低酸素条件で活性化され正常酸素条件で増幅された骨髄浸潤リンパ球の集団を含む組成物を作製する方法であって、

低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球の前記集団の60～100%は、CD3を発現し、

前記集団の少なくとも21%は、4-1BBを発現し、前記方法が、

(a) 低酸素環境において、骨髄試料を培養して、活性化された骨髄浸潤リンパ球を産生するステップ；および、

(b) 正常酸素環境において、前記活性化された骨髄浸潤リンパ球を培養して、前記組成物を産生するステップを含む、方法。

【請求項2】

低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球の前記集団の70～100%が、CD3を発現する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球の前記集団が、CD4を発現する、請求項1から2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項4】

低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球の前記集団が、CD8を発現する、請求項

1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球の前記集団の 25% ~ 100% は、4 - 1 BB を発現する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ ( a ) において、前記骨髄試料が、1% ~ 3% の酸素の低酸素環境において、抗 CD 3 抗体および抗 CD 28 抗体と共に培養され、活性化された骨髄浸潤リンパ球を産生し；および、

ステップ ( b ) において、前記活性化された骨髄浸潤リンパ球が、正常酸素環境において、IL - 2 の存在下で培養され、前記組成物を産生する、  
請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 7】

治療用活性化骨髄浸潤リンパ球を含む、被験体のがんを処置するための組成物を作製するための方法であって、前記方法は、以下：

( a ) 1% ~ 3% の酸素の低酸素環境において、がんを有する被験体から得られる骨髄試料を抗 CD 3 抗体および抗 CD 28 抗体と共に培養して、低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を産生するステップ；および、

( b ) 正常酸素環境において、IL - 2 の存在下で、前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を培養して、前記治療用活性化骨髄浸潤リンパ球を産生するステップを含む、方法。

20

【請求項 8】

前記方法が、前記骨髄試料を前記低酸素環境で 24 時間培養するステップをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記方法は、前記低酸素環境において 2 ~ 5 日間培養される、請求項 7 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記低酸素環境が、1% ~ 2% の酸素である、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法は、前記正常酸素環境において 2 ~ 12 日間、前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を培養することをさらに含む、請求項 7 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記方法は、前記正常酸素環境において 6 日間、前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を培養することをさらに含む、請求項 7 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記方法は、前記正常酸素環境において 9 日間、前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を培養することをさらに含む、請求項 7 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記抗 CD 3 抗体および前記抗 CD 28 抗体が、ビーズに結合されている、請求項 7 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記がんは、血液がんである、請求項 7 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記がんは、固形腫瘍である、請求項 7 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記がんは、肺がんまたは乳がんである、請求項 7 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

50

法。

【請求項 18】

前記がんは、多発性骨髄腫である、請求項 7 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

治療用活性化骨髄浸潤リンパ球を調製するための方法であって、

(a) 1% ~ 3% の酸素の低酸素環境において、骨髄試料を抗 CD 3 抗体および抗 CD 28 抗体と共に培養して、低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を産生するステップ；および、

(b) 正常酸素環境において、IL - 2 の存在下で、前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を培養して、前記治療用活性化骨髄浸潤リンパ球を産生するステップを含む、方法。

10

【請求項 20】

前記骨髄試料が、前記低酸素環境において 24 時間培養される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記骨髄試料が、前記低酸素環境において 2 日間培養される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記骨髄試料が、前記低酸素環境において 3 日間培養される、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記骨髄試料が、前記低酸素環境において 2 ~ 5 日間培養される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記低酸素環境が、1 ~ 2% の酸素である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球は、前記正常酸素環境において、2 ~ 12 日間培養される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 26】

前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球は、前記正常酸素環境において、6 日間培養される、請求項 19 に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球は、前記正常酸素環境において、9 日間培養される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗 CD 3 抗体および前記抗 CD 28 抗体が、ビーズに結合される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 29】

治療用活性化骨髄浸潤リンパ球を調製するための方法であって、

(a) 1% ~ 2% の酸素の低酸素環境において、がんを有する被験体から得られた骨髄試料を抗 CD 3 / 抗 CD 28 ビーズと共に 2 ~ 5 日間培養して、低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を産生するステップ；および、

(b) 21% の酸素の正常酸素環境において、IL - 2 の存在下で、前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を 2 ~ 12 日間培養して、前記治療用活性化骨髄浸潤リンパ球を産生するステップ

40

を含む、方法。

【請求項 30】

前記骨髄は、前記低酸素環境において、3 日間培養される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球は、前記正常酸素環境において 6 日間

50

培養される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球は、前記正常酸素環境において 9 日間培養される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

治療用活性化骨髄浸潤リンパ球を含む、被験体におけるがんを処置するための組成物を作製する方法であって、前記方法は、以下：

(a) 1% ~ 2% の酸素の低酸素環境において、がんを有する前記被験体から得られた骨髄試料を抗 CD3 / 抗 CD28 ビーズと共に 2 ~ 5 日間培養して、低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を産生するステップ；および、

(b) 21% の酸素の正常酸素環境において、IL-2 の存在下で、前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球を 2 ~ 12 日間培養して、前記治療用活性化骨髄浸潤リンパ球を産生するステップ

を含む、方法。

【請求項 34】

前記骨髄は、前記低酸素環境において 3 日間培養される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球は、前記正常酸素環境において 6 日間培養される、請求項 33 から 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記低酸素条件で活性化された骨髄浸潤リンパ球は、前記正常酸素環境において 9 日間培養される、請求項 33 から 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記がんは、血液がんである、請求項 33 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記がんが、肺がんまたは乳がんである、請求項 33 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記がんが、多発性骨髄腫である、請求項 33 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

この出願は、2014年9月4日に提出された米国仮特許出願第62/045,782号および2015年6月29日に提出された米国仮特許出願第62/186,040号（これらの各々は、それらの全体が参考として本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

骨髄破壊的化学療法は、長期治癒のエビデンスは極めて少ないにもかかわらず多発性骨髄腫を含む多くの血液悪性疾患に対して受け入れられている療法である。しかしながら、骨髄破壊的療法はまた、免疫ベースの療法を追加するための理想的な基盤をもたらす。特に、高用量化学療法の結果として生じるリンパ球減少は、恒常的リンパ球増加を促進し、免疫寛容を生じる抗原提示細胞（APC）を排除し、養子T細胞療法に対しより好適な環境をもたらすサイトカイン放出を誘発する。免疫系が高用量化学療法の臨床的な利益に寄与する可能性があるという間接的なエビデンスは、結果として自家幹細胞移植を受けている骨髄腫、リンパ腫および急性骨髄性白血病の患者の臨床転帰が改善される早期のリンパ系回復により示された。さらに、骨髄腫の転帰のこうした改善は、アフエレーシス産物から注入された自家リンパ球の用量と直接相関した。まとめると、これらのデータは、抗腫瘍免疫が測定可能な臨床的利益を有する可能性があるという仮説を裏付け、現在利用可能

10

20

30

40

50

な療法の効果を増すためにそのような免疫をどのように利用するかという問題を提起した。

#### 【0003】

養子T細胞療法(ACIT)により測定可能な疾患を根絶する能力には、T細胞が、適切に活性化され、十分な数で存在し、相当な抗腫瘍活性を有し、腫瘍部位に向かい、遭遇時に腫瘍を有効に死滅させ、長い期間持続することが必要とされる。抗CD3およびCD28が結合した常磁性ビーズを含む任意の技術によるT細胞の刺激は、アネルギー(寛容)状態を有効に反転し、活性化T細胞をもたらす、その数を著しく増幅することができる。ビーズに結合した抗CD3およびCD28は直接的で確固とした*in vitro*におけるT細胞の増幅をもたらすが、このアプローチの主な制約は、腫瘍特異的T細胞を濃縮することなく全T細胞レパトリーを非特異的に刺激することである。ACITの腫瘍特異性を増加させるための方策の1つは、より大きな内因性の腫瘍特異性を有するT細胞集団を使用することである。そのように濃縮することが転移性黒色腫由来の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を使用したACITのかなりの抗腫瘍活性の理由である。しかしながら、TILは転移性黒色腫の患者の一部にしか存在せず、そのうち、採取可能な腫瘍を有する患者の60~70%でしかTILの調製がうまくできず、このことがそのようなアプローチの一般的適用性を制限する。骨髄は多発性骨髄腫などの多くの血液悪性疾患の腫瘍微小環境であるため、骨髄浸潤リンパ球(MIL)を、こうした特定のがんに対する腫瘍特異的T細胞療法をもたらすために利用することができよう。TILとは対照的に、MILはすべての患者にあり、単純なベッドサイド手技により得られ、すべての患者において速やかに増幅させることができる。

10

20

#### 【0004】

血液悪性疾患では、骨髄は、疾患の部位であるだけでなく、固有の微小環境でもある。固形腫瘍でも、MIL中でメモリー細胞またはエフェクター-メモリーT細胞が濃縮され得るというエビデンスがある。骨髄内の免疫成分は、初期の乳癌のホストの腫瘍特異的T細胞ならびにワクチン刺激T細胞の両方に関する抗原経験T細胞の貯蔵部である。骨髄では、メモリーCD4細胞はIL-7発現間質細胞との相互作用により維持され、CD8細胞は抗原発現の持続性および有効な抗原提示により維持される。したがって、この状況において増加したMILの腫瘍特異性は、抗原の源としての腫瘍の存在による可能性が高く、それらの持続性は間質要素、サイトカインならびにこの環境において有効な抗原提示が可能な抗原提示細胞との特有の免疫相互作用により維持される。

30

#### 【0005】

*ex vivo*で活性化されたMILは、養子T細胞療法に必須のいくつかの特性を有する。活性化時に、これらは、末梢血リンパ球の対応するものと比較して顕著な腫瘍特異性を示し、成熟した多発性骨髄腫プラズマ細胞ならびにそれらのクローン原性前駆細胞の両方に存在する広い範囲の抗原を標的とし、多発性骨髄腫プラズマ細胞を有効に死滅させる。TILと同様に、MILは末梢リンパ球よりも高い内因性のポリクローナル抗原特異性を有する。TILとは対照的に、MILはすべての患者にあり、より多くの免疫応答微小環境から得られる。したがって、MILは、骨髄が関わる血液悪性疾患のためのACITに対する新規で有望な腫瘍特異的アプローチとなる。

40

#### 【発明の概要】

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

一部の態様では、本発明は、骨髄浸潤リンパ球(「MIL」)を含む組成物に関する。組成物は、CD3を発現するMILの集団を含んでもよい。例えば、組成物中の細胞の少なくとも約40%は、CD3を発現するMILの集団由来のMILであってもよい。例えば、組成物は、MILを含んでもよく、フローサイトメトリーゲートによって決定される場合に細胞の40%がCD3を発現してもよい。よって、組成物中の細胞の少なくとも約40%は、CD3を発現するMILの集団由来であろう。組成物は、インターフェロンガンマ(「IFN $\gamma$ 」)を発現するMILの集団を含んでもよい。例えば、組成物中の細胞

50

の少なくとも約2%は、IFNを発現するMILの集団由来のMILであってもよい。組成物は、CXCR4を発現するMILの集団を含んでもよい。例えば、組成物中の細胞の少なくとも約98%は、CXCR4を発現するMILの集団由来のMILであってもよい。組成物は、CD4を発現するMILの集団を含んでもよい。組成物は、CD8を発現するMILの集団を含んでもよい。組成物は、4-1BBを発現するMILの集団を含んでもよい。例えば、組成物中の細胞の少なくとも約21%は、4-1BBを発現するMILの集団由来のMILであってもよい。

【0007】

一部の態様では、本発明は、骨髄浸潤リンパ球(「MIL」)を活性化するための方法であって、21%未満の酸素を含む環境においてMILをインキュベートするステップを含む方法に関する。

10

【0008】

一部の態様では、本発明は、被験体のがんを処置するための方法に関する。本方法は、被験体にMILを含む組成物を投与するステップを含んでもよい。一部の実施形態では、本方法は、被験体から骨髄浸潤リンパ球(「MIL」)を取り出すステップおよび21%未満の酸素を含む環境においてMILをインキュベートし、それにより活性化MILを生じさせるステップを含む。

本発明は、例えば、以下を提供する。

(項目1)

骨髄浸潤リンパ球(「MIL」)を含む組成物であって、

20

前記組成物は、CD3を発現するMILの集団を含み、

前記組成物中の細胞の少なくとも約40%は、CD3を発現するMILの前記集団由来のMILである、組成物。

(項目2)

前記組成物は、インターフェロンガンマ(「IFN」)を発現するMILの集団を含み、

前記組成物中の細胞の少なくとも約2%は、IFNを発現するMILの前記集団由来のMILである、項目1に記載の組成物。

(項目3)

CD3を発現するMILの前記集団は、インターフェロンガンマ(「IFN」)を発現する複数のMILを含み、

30

前記組成物中の細胞の少なくとも約2%は、IFNを発現する前記複数のMIL由来のMILである、項目1に記載の組成物。

(項目4)

前記組成物は、CXCR4を発現するMILの集団を含み、

前記組成物中の細胞の少なくとも約98%は、CXCR4を発現するMILの前記集団由来のMILである、先行する項目のいずれか一項に記載の組成物。

(項目5)

CD4を発現するMILの集団を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の組成物。

(項目6)

CD4を発現するMILの前記集団は、CXCR4を発現する複数のMILを含み、

40

前記組成物中の細胞の少なくとも約98%は、CXCR4を発現する前記複数のMIL由来のMILである、項目5に記載の組成物。

(項目7)

CD4を発現するMILの前記集団は、4-1BBを発現する複数のMILを含み、

前記組成物中の細胞の少なくとも約21%は、4-1BBを発現する前記複数のMIL由来のMILである、項目5または6に記載の組成物。

(項目8)

CD8を発現するMILの集団を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の組成物。

(項目9)

50

C D 8 を発現する M I L の前記集団は、C X C R 4 を発現する複数の M I L を含み、  
前記組成物中の細胞の少なくとも約 9 8 % は、C X C R 4 を発現する前記複数の M I L  
由来の M I L である、項目 8 に記載の組成物。

(項目 1 0)

C D 8 を発現する M I L の前記集団は、4 - 1 B B を発現する複数の M I L を含み、  
前記組成物中の細胞の少なくとも約 2 1 % は、4 - 1 B B を発現する前記複数の M I L  
由来の M I L である、項目 8 または 9 に記載の組成物。

(項目 1 1)

前記組成物は、4 - 1 B B を発現する M I L の集団を含み、  
前記組成物中の細胞の少なくとも約 2 1 % は、4 - 1 B B を発現する M I L の前記集団  
由来の M I L である、項目 1 ~ 6、8 および 9 のいずれか一項に記載の組成物。

10

(項目 1 2)

先行する項目のいずれか一項に記載の組成物を生成するための方法であって、2 1 % 未  
満の酸素を含む環境において M I L をインキュベートするステップを含む、方法。

(項目 1 3)

骨髄浸潤リンパ球 (「M I L」) を活性化するための方法であって、2 1 % 未満の酸素  
を含む環境において M I L をインキュベートするステップを含む、方法。

(項目 1 4)

被験体のがんを処置するための方法であって、  
前記被験体から骨髄浸潤リンパ球 (「M I L」) を取り出すステップ、  
2 1 % 未満の酸素を含む環境において前記 M I L をインキュベートし、それにより活性  
化 M I L を生じさせるステップ、および  
前記活性化 M I L を前記被験体に投与するステップ  
を含む、方法。

20

(項目 1 5)

約 1 % の酸素から約 7 % の酸素を含む環境において M I L をインキュベートするステッ  
プを含む、項目 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記 M I L は、2 1 % 未満の酸素を含む環境において少なくとも約 2 4 時間インキュベ  
ートされる、項目 1 2 から 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 1 7)

前記 M I L は、2 1 % 未満の酸素を含む環境において約 1 日間から約 2 0 日間インキュ  
ベートされる、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記 M I L は、2 1 % 未満の酸素を含む環境において約 3 日間から約 1 4 日間インキュ  
ベートされる、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記 M I L を、約 2 1 % の酸素を含む環境においてインキュベートするステップをさら  
に含む、項目 1 2 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 0)

前記 M I L は、約 2 1 % の酸素を含む環境において約 4 日間インキュベートされる、項  
目 1 9 に記載の方法。

40

(項目 2 1)

被験体のがんを処置するための方法であって、前記被験体に項目 1 から 1 1 のいずれか  
一項に記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

(項目 2 2)

骨髄浸潤リンパ球 (M I L) を調製するための方法であって、  
M I L を *i n v i t r o* で低酸素条件下において第 1 の期間にわたり増殖させるステ  
ップ、および

低酸素増殖に続いて前記 M I L を正常酸素条件下において第 2 の期間にわたり増殖させ

50

るステップを含む、方法。

(項目 2 3 )

前記低酸素条件は、2 1 % 未満の酸素である、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4 )

前記低酸素条件は、約 1 % の酸素から約 7 % の酸素である、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5 )

前記低酸素条件は、約 1 % から約 3 % の酸素である、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6 )

前記低酸素条件は、約 2 % の酸素である、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7 )

前記第 1 の期間は、約 1 日間から約 2 0 日間である、項目 2 2 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 8 )

前記第 1 の期間は、約 3 日間から約 1 4 日間である、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9 )

前記第 1 の期間は、約 3 日間である、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0 )

前記正常酸素条件は、約 2 1 % の酸素である、項目 2 2 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1 )

前記第 2 の期間は、約 3 から約 7 日間である、項目 2 2 から 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2 )

前記第 2 の期間は、約 4 日間である、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3 )

前記第 1 の期間および前記第 2 の期間は、約 3 日間から約 2 4 日間である、項目 2 2 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4 )

前記第 1 の期間および前記第 2 の期間は、約 3 から約 1 0 日間である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5 )

骨髓浸潤リンパ球 ( M I L ) 製剤であって、項目 2 2 から 3 4 のいずれか一項に記載の方法によって調製される M I L を含む、製剤。

(項目 3 6 )

低酸素条件下、in vitro において増殖させた治療上有効な骨髓浸潤リンパ球 ( M I L ) 製剤。

(項目 3 7 )

患者のがんを処置する方法であって、前記患者に項目 3 5 または 3 6 に記載の製剤を投与するステップを含む、方法。

(項目 3 8 )

患者のがんを処置する方法であって、  
骨髓浸潤リンパ球 ( M I L ) を前記患者から取り出すステップ、  
前記 M I L を低酸素条件下において増殖させるステップ、  
前記 M I L を正常酸素条件下において増殖させるステップ、および  
前記 M I L を前記患者に投与するステップ  
を含む、方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図 1】図 1 は、インターロイキン 2 を含む培地 ( + I L 2 ) またはインターロイキン 2 を含まない培地 ( I L 2 なし ) 中、正常酸素条件下または低酸素条件下のいずれかにおい

10

20

30

40

50

て増幅させたM I Lに関するフローサイトメトリーの結果を示す。インターロイキン2を含む培地中、正常酸素条件下において増殖させたゲーティングされた細胞の35.09%はC D 3に関して陽性であった。インターロイキン2のない培地中、正常酸素条件下において増殖させたゲーティングされた細胞の30.98%はC D 3に関して陽性であった。インターロイキン2を含む培地中、低酸素条件下において増殖させたゲーティングされた細胞の89.01%はC D 3に関して陽性であった。インターロイキン2のない培地中、低酸素条件下において増殖させたゲーティングされた細胞の89.96%はC D 3に関して陽性であった。

【0010】

【図2】図2は、正常酸素条件下または低酸素条件下において増殖させた末梢血リンパ球(P B L)およびM I LのC D 3<sup>+</sup>細胞の増幅を示すチャートである。低酸素条件は、C D 3<sup>+</sup> P B Lの増幅を低下させたが、C D 3<sup>+</sup> M I Lの増幅を増加させた。

10

【0011】

【図3】図3は、正常酸素環境または低酸素環境のいずれかにおけるインキュベーションのさまざまな期間の後のC D 3<sup>+</sup> M I Lの増幅を比較するグラフである。低酸素環境におけるインキュベーションの7日後に正常酸素と比較して大幅な増幅が観察され、インキュベーションの11日目にC D 3<sup>+</sup>増幅はピークに達した。

【0012】

【図4】図4は、10日間(D 10)または12日間(D 12)のいずれかで増幅させた細胞について、骨髄腫細胞株(U 2 6 6 / H 9 2 9)または対照細胞株(S W 7 8 0)のいずれかに関する低酸素条件下または正常酸素条件下において増幅したM I Lの腫瘍特異性を示すグラフである。低酸素細胞は、2%の酸素を含む環境において3日間、増殖させ、続いて正常酸素環境(21%の酸素)において増幅させた。10日目に、低C F S Eであり、腫瘍抗原に反応してインターフェロンガンマ(I F N )を産生していた総T細胞のパーセントによって求める場合、低酸素条件下において増幅させたM I Lの25.1%と比較すると、正常酸素条件下において増幅させた細胞の4%が腫瘍特異的であった。

20

【0013】

【図5】図5は、さまざまな条件下において増幅させたM I Lの腫瘍特異性に関する、C D 3およびI N F に対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。増幅の7日後、低酸素条件下において増殖させたM I Lの18.26%がC D 3およびインターフェロンガンマとともに陽性であった。対照的に、正常酸素条件下において増殖させたM I Lの1.72%のみがC D 3およびインターフェロンガンマとともに陽性であった。

30

【0014】

【図6】図6は、さまざまな条件下において増殖させたM I Lを与えられた被験体におけるものを含む、自家移植後のリンパ球の*i n v i v o*における増幅を示すグラフである。x軸は移植後の日数に対応し、y軸は被験体の1マイクロリットル当たりの平均リンパ球絶対数に対応する。グラフは、低酸素条件下において増殖させたM I Lがヒト被験体中で、正常酸素条件下においてのみ増殖させたM I Lよりも増幅し続けることを示唆している。

【0015】

40

【図7】図7は、さまざまな酸素条件下において増幅させたM I Lに関する、C X C R 4およびC D 4またはC D 8のいずれかに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。正常酸素条件下において増幅させた全M I L集団の28.38%がC X C R 4陽性およびC D 4陽性の両方であり、平均蛍光強度が3.9であった。低酸素条件下において増幅させたM I Lの68.91%がC X C R 4陽性およびC D 4陽性の両方であり、平均蛍光強度が5.4であった。正常酸素条件下において増幅させたM I Lの8.02%がC X C R 4陽性およびC D 8陽性の両方であり、平均蛍光強度が4.6であった。低酸素条件下において増幅させたM I Lの11.08%がC X C R 4陽性およびC D 8陽性の両方であった。これらの結果は、低酸素がC X C R 4を発現する細胞の数ならびに細胞当たりの発現の程度(M F I)をともに増加させ、このことがこれらの細胞が注入時に骨

50

髓に移動する可能性を増加させることを示唆している。

【0016】

【図8A】図8は、パネル(A)、(B)および(C)とラベルした3つのパネルからなる。パネルAは、細胞増幅前の末梢血リンパ球(PBL)およびMILに関する、CD4、CD8および4-1BBに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。パネルBは、正常酸素条件下における増幅後のPBLおよびMILに関する、CD4、CD8および4-1BBに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。示されるとおり、PBLにおける4-1BB発現は、CD8 PBLが11.34%から0.34%に低下し、MIL CD8が15.1%から7.54%の低下を示した。パネルCは、低酸素条件下における増幅後のPBLおよびMILに関する、CD4、CD8および4-1BBに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。低酸素条件下における増幅後にPBLは4-1BBをダウンレギュレートした(CD8 PBL: ベースラインの11.34%から0%へ)一方で、低酸素条件下における増幅後にMILは4-1BBをアップレギュレートした(CD8 MIL: ベースラインの15.1%から21.79%へ)。

10

【図8B】図8は、パネル(A)、(B)および(C)とラベルした3つのパネルからなる。パネルAは、細胞増幅前の末梢血リンパ球(PBL)およびMILに関する、CD4、CD8および4-1BBに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。パネルBは、正常酸素条件下における増幅後のPBLおよびMILに関する、CD4、CD8および4-1BBに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。示されるとおり、PBLにおける4-1BB発現は、CD8 PBLが11.34%から0.34%に低下し、MIL CD8が15.1%から7.54%の低下を示した。パネルCは、低酸素条件下における増幅後のPBLおよびMILに関する、CD4、CD8および4-1BBに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。低酸素条件下における増幅後にPBLは4-1BBをダウンレギュレートした(CD8 PBL: ベースラインの11.34%から0%へ)一方で、低酸素条件下における増幅後にMILは4-1BBをアップレギュレートした(CD8 MIL: ベースラインの15.1%から21.79%へ)。

20

【図8C】図8は、パネル(A)、(B)および(C)とラベルした3つのパネルからなる。パネルAは、細胞増幅前の末梢血リンパ球(PBL)およびMILに関する、CD4、CD8および4-1BBに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。パネルBは、正常酸素条件下における増幅後のPBLおよびMILに関する、CD4、CD8および4-1BBに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。示されるとおり、PBLにおける4-1BB発現は、CD8 PBLが11.34%から0.34%に低下し、MIL CD8が15.1%から7.54%の低下を示した。パネルCは、低酸素条件下における増幅後のPBLおよびMILに関する、CD4、CD8および4-1BBに対するゲートを利用したフローサイトメトリーの結果を示す。低酸素条件下における増幅後にPBLは4-1BBをダウンレギュレートした(CD8 PBL: ベースラインの11.34%から0%へ)一方で、低酸素条件下における増幅後にMILは4-1BBをアップレギュレートした(CD8 MIL: ベースラインの15.1%から21.79%へ)。

30

40

【0017】

【図9】図9は、低酸素条件下におけるMILの増殖が、正常酸素条件下のみにおける増殖と比較してCD3<sup>+</sup>細胞の数を増加させることを示すグラフである。

【0018】

【図10】図10は、低酸素条件下におけるMILの増幅が、低酸素条件下におけるPBLの増幅または正常酸素条件下におけるMILの増幅のいずれかよりもCD4<sup>+</sup>/4-1BB<sup>+</sup>細胞のパーセンテージが高くなることを示すフローサイトメトリーの結果を示す。

【0019】

【図11】図11は、*ex vivo*におけるMILの増幅を示すグラフである。低酸素

50

条件下において増幅させたM I Lは、正常酸素条件下においてのみ増幅させたM I Lと比較してより量が多くなった。

【発明を実施するための形態】

【0020】

養子T細胞療法を用いて達成する主な目標は、最も多くの腫瘍特異的T細胞を増殖させる能力であり、それらの細胞はその後再注入されるとまた*in vivo*において増幅し、長い期間持続することになる。一部の態様では、本発明は、骨髄浸潤リンパ球（「M I L」）の固有の特性を活用するT細胞増幅に対する新規のアプローチに関する。特に、M I Lは、末梢リンパ球（P B L）とは著しく異なる。例えば、M I Lは、より容易に増幅され、P B Lよりも大きな程度に活性化マーカーをアップレギュレートし、より偏ったVレパートリーを維持し、骨髄へ移動し、最も重要なことに、著しく高い腫瘍特異性を有する。M I L抗骨髄腫免疫は、臨床反応と直接関連するが、*in vivo*におけるT細胞増幅または持続的な臨床反応は、これまで注入後には観察されなかった。

10

【0021】

約1%の酸素から約7%の酸素または約1%の酸素から約3%の酸素、例えば、2%の酸素（低酸素条件）など21%未満の酸素のO<sub>2</sub>レベルにおいてM I Lを培養することにより、正常酸素条件下においてのみ培養する場合と比較して全般的な細胞の増幅ならびに腫瘍細胞を認識するその能力の両方が増す。このように、一部の実施形態では、本発明は、以下の1つまたは複数を含む治療的使用のためのM I Lの調製のための方法に関する。患者から骨髄が採取されてもよい。採取された骨髄は、例えば、腫瘍特異的なM I Lを作り出すために凍結されてもよく、またはすぐに使用されてもよい。骨髄が凍結される場合、それは好ましくはインキュベーションの前に解凍される。骨髄は、M I Lを精製するために当業者に公知の方法により処理されてもよい。M I Lは例えば、抗CD3/CD28ビーズなどのビーズを用いて活性化することができる。溶液中のビーズ対細胞の比は変化してもよく、一部の好適な実施形態では、比は3対1である。同様に、M I Lは、例えば、抗CD3/CD28ビーズの非存在下、1つまたは複数の抗体、抗原および/またはサイトカインの存在下において増幅させてもよい。例えば、M I Lに添加されるビーズ、抗体、抗原および/またはサイトカインの量を調整するために、採取された骨髄の細胞数が決定されてもよい。一部の実施形態では、M I Lは、特に、細胞を回収するよう設計されたビーズを使用して捕捉される。

20

30

【0022】

採取されたM I Lは、優先的には低酸素環境において、例えば、第1の期間、増殖させる。一部の実施形態では、M I Lは組織培養バッグ中、2%のA B血清および200 UのI L 2を補充したX - V I V O（商標）15培地に入れられてもよい。他の培養条件および要素は、当業者によって認識されるとおりに使用することができることが予想される。M I Lは、約1%から約7%の酸素（低酸素、低酸素条件）、好ましくは、約2%の酸素などの約1%から約3%の酸素の環境において約3から約10日間、例えば、4日間などの約3から約20日間（すなわち、第1の期間）増殖させてもよい。低酸素環境は、例えば、細胞が増殖させる容器に亜酸化窒素を加えることによって作り出すことができる。一部の実施形態では、低酸素環境は、低圧チャンバーを利用することによって作り出してもよい。低酸素増殖後に、M I Lは、正常酸素環境、例えば、21%の酸素において増殖させてもよい。一部の好適な実施形態では、M I Lは、正常酸素条件下においてさらに約3から約7日間（すなわち、第2の期間）増殖させる（例えば、約3から約10日間の増殖などの合計約3から約27日間の増殖）。増殖させた細胞は、その後、患者（例えば、患者もしくは同種異系のレシピエントのいずれか）に投与されてもよく、または将来的な使用のために保存されてもよい。

40

【0023】

患者の骨髄から採取され、本明細書に記載の方法に従って、すなわち、低酸素条件下において第1の期間、続いて正常酸素条件下において第2の期間、処理されたM I Lは、予想外にも同じ手順に供された末梢血リンパ球（P B L）よりも良好に働く。下に示すとお

50

りM I Lの増強された能力としては、*in vitro*および*in vivo*の両方における著しい増幅、4 - 1 B Bなどの生物学的マーカーの発現の向上および腫瘍特異性の増加が挙げられる。

【0024】

当業者は、本発明の手順が、骨髄腫、肺癌および乳癌を含む多くの異なる種類のがんを処置するために利用することができることを認識するであろう。骨髄はセントラルメモリー細胞の貯蔵部であるため、あらゆる種類のがんからの腫瘍特異的T細胞が患者の骨髄で見つかった。本明細書中で開示されるとおり、低酸素培養条件は、増幅ならびに腫瘍特異性の両方を増加させるため、このアプローチは、広い範囲のがん患者からのM I Lを増殖させるために使用することができる。一部の好適な実施形態では、患者のM I Lが、採取され、低酸素条件において第1の期間、例えば、約1日間から約20日間増幅させた後、正常酸素条件において第2の期間、例えば、約3日から約7日間増幅させる。細胞は、その後、処置のために患者に提供されてもよく、または将来的な使用のために保存されてもよい。

10

【0025】

一部の態様では、本発明は、低酸素環境におけるM I Lの増幅が、注入後に*in vivo*におけるT細胞増幅を可能にするという発見に関する。特に、M I Lを2% O<sub>2</sub> (低酸素)において3日間、続いて21% O<sub>2</sub> (正常酸素)に切り替えて増殖させた結果、腫瘍特異性がほぼ10倍高くなった(図4)。まとめると、これらのデータは、そのような増殖条件が、同じ供給源から得た腫瘍特異的M I Lの絶対数を、正常酸素条件下においてのみ増殖させたM I Lと比較して増加させることができることを示唆している。

20

【0026】

すべての実験は、患者のサンプルからのM I L産物を使用して実施した。図3に示されるとおり、低酸素条件における完全な規模の臨床的M I L産物の増幅は、劇的にT細胞数を増加させた。正常酸素条件を用いた場合、7日を過ぎてM I Lを増幅させるのが困難であったことに留意すべきである。この実験では、7日目の増幅は、低酸素での119倍に対して正常酸素では36.3倍であった。さらに、低酸素条件下において増殖させた細胞は、12日目まで増幅し続け、11日目に総計220倍の増幅に達した。

【0027】

さらに良好な増幅およびさらに高い腫瘍特異性を得ることに加えて、T細胞の生存を最大にするために増殖条件を最適化した。4 - 1 B Bの発現が、多くのこれらの特性の重要なレギュレーターであることが示された。これは、T細胞増幅を制御し、アポトーシスを低減し、CD8細胞の細胞傷害活性を増大し、生存を向上させることができる。まとめると、活性化M I L上の4 - 1 B B発現は、生存および腫瘍特異性を高める重要なレギュレーターである可能性がある。したがって、M I L上の4 - 1 B B発現を調べ、さまざまな条件において増殖させたP B Lのものと比較した。図8に示したとおり、ベースラインの4 - 1 B Bの発現は、M I LでP B Lでよりも高かった(18.2%対8.1%)。興味深いことに、正常酸素におけるT細胞増幅は、両集団でその発現を低下させた(M I L 10.7%、P B L 2.8%)一方、低酸素における増幅は、4 - 1 B B発現をM I Lで著しく増加させ(43.4%)、P B Lでその発現を完全に阻害した(0%)。これらのデータは、P B LとM I Lの間の顕著な差をさらにまた強調し、4 - 1 B Bのアップレギュレーションが、単に低酸素増殖条件だけでなくさらなる要因に依存することをさらに示す。

30

40

【0028】

これらの培養条件は臨床試験に採用され、低酸素増殖条件は、全体のT細胞増幅を平均7.9E9から1.8E10に増加させた。さらに、低酸素増殖条件はまた、*in vivo*におけるT細胞増幅も観察することができた(図6は、すべての患者に関する60日目までの総リンパ球数を示す)。

【0029】

一部の態様では、本発明は、骨髄浸潤リンパ球(「M I L」)を含む組成物に関する。

50

M I L は、活性化 M I L であってもよい。

【 0 0 3 0 】

好適な実施形態では、組成物は、C D 3 を発現する M I L の集団を含み、すなわち、C D 3 を発現する M I L の集団の各細胞が、例えば、フローサイトメトリーによって検出される場合に、C D 3 を発現する骨髄浸潤リンパ球である。例えば、組成物中の細胞の少なくとも約 4 0 %、例えば、組成物中の細胞の少なくとも約 4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 % またはさらに少なくとも約 8 9 % は、C D 3 を発現する M I L の集団由来の M I L であってもよい。好適な一実施形態では、組成物中の細胞の少なくとも約 8 0 % は、C D 3 を発現する M I L の集団由来の M I L であってもよい。一部の実施形態では、組成物中の細胞の約 4 0 % から約 1 0 0 %、例えば、組成物中の細胞の約 4 5 % から約 1 0 0 %、約 5 0 % から約 1 0 0 %、約 5 5 % から約 1 0 0 %、約 6 0 % から約 1 0 0 %、約 6 5 % から約 1 0 0 %、約 7 0 % から約 1 0 0 %、約 7 5 % から約 1 0 0 %、約 8 0 % から約 1 0 0 %、約 8 5 % から約 1 0 0 %、約 8 6 % から約 1 0 0 %、約 8 7 % から約 1 0 0 %、約 8 8 % から約 1 0 0 % またはさらに約 8 9 % から約 1 0 0 % は、C D 3 を発現する M I L の集団由来の M I L であってもよい。一部の実施形態では、組成物は、例えば、フローサイトメトリーによって検出される場合に、C D 3 を発現しない M I L の集団または低レベル、すなわち、C D 3 を発現する M I L の集団由来の M I L の発現レベルと比較して低レベルの C D 3 を発現する M I L の集団のいずれかを含む。

10

【 0 0 3 1 】

一部の実施形態では、組成物は、インターフェロンガンマ (「 I F N 」) を発現する M I L の集団を含み、すなわち、I F N を発現する M I L の集団の各細胞が、例えば、フローサイトメトリーによって検出される場合に、I F N を発現する骨髄浸潤リンパ球である。例えば、組成物中の細胞の少なくとも約 2 %、例えば、組成物中の細胞の少なくとも約 2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 % またはさらに少なくとも約 1 8 % は、I F N を発現する M I L の集団由来の M I L であってもよい。一部の実施形態では、組成物中の細胞の約 2 % から約 1 0 0 %、例えば、組成物中の細胞の約 2 % から約 1 0 0 %、約 3 % から約 1 0 0 %、約 4 % から約 1 0 0 %、約 5 % から約 1 0 0 %、約 6 % から約 1 0 0 %、約 7 % から約 1 0 0 %、約 8 % から約 1 0 0 %、約 9 % から約 1 0 0 %、約 1 0 % から約 1 0 0 %、約 1 1 % から約 1 0 0 %、約 1 2 % から約 1 0 0 %、約 1 3 % から約 1 0 0 %、約 1 4 % から約 1 0 0 %、約 1 5 % から約 1 0 0 %、約 1 6 % から約 1 0 0 %、約 1 7 % から約 1 0 0 % またはさらに約 1 8 % から約 1 0 0 % は、I F N を発現する M I L の集団由来の M I L であってもよい。一部の実施形態では、組成物は、例えば、フローサイトメトリーによって検出される場合に、I F N を発現しない M I L の集団または低レベル、すなわち、I F N を発現する M I L の集団由来の M I L の発現レベルと比較して低レベルの I F N を発現する M I L の集団のいずれかを含む。

20

30

【 0 0 3 2 】

一部の実施形態では、組成物は、C X C R 4 を発現する M I L の集団を含み、すなわち、C X C R 4 を発現する M I L の集団の各細胞が、例えば、フローサイトメトリーによって検出される場合に、C X C R 4 を発現する骨髄浸潤リンパ球である。例えば、組成物中の細胞の少なくとも約 9 8 %、例えば、組成物中の細胞の少なくとも約 9 8 . 1 %、9 8 . 2 %、9 8 . 3 %、9 8 . 4 %、9 8 . 5 %、9 8 . 6 %、9 8 . 7 %、9 8 . 8 %、9 8 . 9 %、9 9 . 0 %、9 9 . 1 %、9 9 . 2 %、9 9 . 3 %、9 9 . 4 %、9 9 . 5 %、9 9 . 6 % またはさらに少なくとも約 9 9 . 7 % は、C X C R 4 を発現する M I L の集団由来の M I L であってもよい。一部の実施形態では、組成物中の細胞の約 9 8 % から約 1 0 0 %、例えば、組成物中の細胞の少なくとも約 9 8 . 1 % から約 1 0 0 %、約 9 8 . 2 % から約 1 0 0 %、約 9 8 . 3 % から約 1 0 0 %、約 9 8 . 4 % から約 1 0 0 %、約 9 8 . 5 % から約 1 0 0 %、約 9 8 . 6 % から約 1 0 0 %、約 9 8 . 7 % から約 1 0 0 %、約 9 8 . 8 % から約 1 0 0 %、約 9 8 . 9 % から約 1 0 0 %、約 9 9 . 0 % から約 1 0 0 %

40

50

0%、約99.1%から約100%、約99.2%から約100%、約99.3%から約100%、約99.4%から約100%、約99.5%から約100%、約99.6%から約100%またはさらに約99.7%から約100%は、CXCR4を発現するMILの集団由来のMILであってもよい。一部の実施形態では、組成物は、例えば、フローサイトメトリーによって検出される場合に、CXCR4を発現しないMILの集団または低レベル、すなわち、CXCR4を発現するMILの集団由来のMILの発現レベルと比較して低レベルのCXCR4を発現するMILの集団のいずれかを含む。

【0033】

一部の実施形態では、組成物は、CD4を発現するMILの集団を含む。CD4を発現するMILの集団は、CXCR4を発現する複数のMILを含んでもよい。

10

【0034】

CD4を発現するMILの集団は、4-1BBを発現する複数のMILを含んでもよい。例えば、組成物中の細胞の少なくとも約21%、例えば、組成物中の細胞の少なくとも約22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%またはさらに少なくとも約43%は、4-1BBを発現する複数のMIL由来のMILであってもよい。一部の実施形態では、組成物中の細胞の約21%から約100%、例えば、組成物中の細胞の約22%から約100%、約23%から約100%、約24%から約100%、約25%から約100%、約26%から約100%、約27%から約100%、約28%から約100%、約29%から約100%、約30%から約100%、約31%から約100%、約32%から約100%、約33%から約100%、約34%から約100%、約35%から約100%、約36%から約100%、約37%から約100%、約38%から約100%、約39%から約100%、約40%から約100%、約41%から約100%、約42%から約100%またはさらに約43%から約100%は、4-1BBを発現する複数のMIL由来のMILであってもよい。

20

【0035】

組成物は、CD8を発現するMILの集団を含んでもよい。CD8を発現するMILの集団は、CXCR4を発現する複数のMILを含んでもよい。

【0036】

CD8を発現するMILの集団は、4-1BBを発現する複数のMILを含んでもよい。例えば、組成物中の細胞の少なくとも約21%、例えば、組成物中の細胞の少なくとも約8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%またはさらに少なくとも約21%は、4-1BBを発現する複数のMIL由来のMILであってもよい。一部の実施形態では、組成物中の細胞の約2%から約100%、例えば、組成物中の細胞の約8%から約100%、約9%から約100%、約10%から約100%、約11%から約100%、約12%から約100%、約13%から約100%、約14%から約100%、約15%から約100%、約16%から約100%、約17%から約100%、約18%から約100%、約19%から約100%、約20%から約100%またはさらに約21%から約100%は、4-1BBを発現する複数のMIL由来のMILであってもよい。

30

40

【0037】

一部の実施形態では、組成物は、4-1BBを発現するMILの集団を含む。例えば、組成物中の細胞の少なくとも約21%、例えば、組成物中の細胞の少なくとも約22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%またはさらに少なくとも約43%は、4-1BBを発現するMILの集団由来のMILであってもよい。一部の実施形態では、組成物中の細胞の約21%から約100%、例えば、組成物中の細胞の約22%から約100%、約23%から約100%、約24%から約100%、約25%から約100%、約26%から約100%、約27%から約100%、約28%から約100%、約29%から約100%、約30%から約100%、約31%か

50

ら約100%、約32%から約100%、約33%から約100%、約34%から約100%、約35%から約100%、約36%から約100%、約37%から約100%、約38%から約100%、約39%から約100%、約40%から約100%、約41%から約100%、約42%から約100%またはさらに約43%から約100%は、4-1BBを発現するMILの集団由来のMILであってもよい。一部の実施形態では、組成物は、例えば、フローサイトメトリーによって検出される場合に、4-1BBを発現しないMILの集団または低レベル、すなわち、4-1BBを発現するMILの集団由来のMILの発現レベルと比較して低レベルの4-1BBを発現するMILの集団のいずれかを含む。

#### 【0038】

一部の態様では、本発明は、被験体のがんを予防または処置するための方法であって、被験体に本明細書に記載される組成物のいずれか1つを投与することを含む方法に関する。好適な実施形態では、本方法は、被験体に治療有効量の本明細書に記載される組成物のいずれか1つを投与することを含む。好適な実施形態では、本方法は、被験体に治療有効量のMIL、例えば、本明細書に記載される活性化MILを投与することを含む。被験体は、新生物、例えば、がんを有し得る。例えば、被験体は、多発性骨髄腫を有し得る。被験体は、ヒト被験体であってもよい。

#### 【0039】

一部の態様では、本発明は、本明細書に記載される組成物を生成するための方法であって、低酸素環境においてMILをインキュベートすることを含む方法に関する。一部の態様では、本発明は、骨髄浸潤リンパ球(「MIL」)を活性化するための方法であって、低酸素環境においてMILをインキュベートすることを含む方法に関する。

#### 【0040】

一部の態様では、本発明は、被験体のがんを処置するための方法に関する。本方法は、被験体から骨髄浸潤リンパ球(「MIL」)を取り出すこと、低酸素環境においてMILをインキュベートすることにより、活性化MILを生じさせることおよび活性化MILを被験体に投与することを含んでもよい。

#### 【0041】

低酸素環境は、約21%未満の酸素、例えば、約20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%未満または約3%未満の酸素を含んでもよい。例えば、低酸素環境は、約0%の酸素から約20%の酸素、例えば、約0%の酸素から約19%の酸素、約0%の酸素から約18%の酸素、約0%の酸素から約17%の酸素、約0%の酸素から約16%の酸素、約0%の酸素から約15%の酸素、約0%の酸素から約14%の酸素、約0%の酸素から約13%の酸素、約0%の酸素から約12%の酸素、約0%の酸素から約11%の酸素、約0%の酸素から約10%の酸素、約0%の酸素から約9%の酸素、約0%の酸素から約8%の酸素、約0%の酸素から約7%の酸素、約0%の酸素から約6%の酸素、約0%の酸素から約5%の酸素、約0%の酸素から約4%の酸素または約0%の酸素から約3%の酸素を含んでもよい。好適な実施形態では、低酸素環境は、約1%から約7%の酸素を含む。低酸素環境は、約20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%または約0%の酸素を含んでもよい。好適な実施形態では、低酸素環境は、約7%、6%、5%、4%、3%、2%または1%の酸素を含む。

#### 【0042】

低酸素環境においてMILをインキュベートすることは、例えば、組織培養培地において少なくとも約1時間、例えば、少なくとも約12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、60時間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間またはさらに少なくとも約14日間、MILをインキュベートすることを含んでもよい。インキュベートすることは、約1時間から約30日間、例えば、約1日間から約20日間、約1日間から約14日間

10

20

30

40

50

または約1日間から約12日間、M I Lをインキュベートすることを含んでもよい。一部の好適な実施形態では、低酸素環境においてM I Lをインキュベートすることは、低酸素環境においてM I Lを約2日間から約5日間インキュベートすることを含む。本方法は、低酸素環境においてM I Lを約1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間または14日間インキュベートすることを含んでもよい。一部の好適な実施形態では、本方法は、低酸素環境においてM I Lを約3日間インキュベートすることを含む。

【0043】

好適な実施形態では、本方法は、例えば、低酸素環境においてM I Lをインキュベートした後に正常酸素環境においてM I Lをインキュベートすることをさらに含む。

10

【0044】

正常酸素環境は、少なくとも約21%の酸素を含んでもよい。正常酸素環境は、約5%の酸素から約30%の酸素、例えば、約10%の酸素から約30%の酸素、約15%の酸素から約25%の酸素、約18%の酸素から約24%の酸素、約19%の酸素から約23%の酸素または約20%の酸素から約22%の酸素を含んでもよい。一部の実施形態では、正常酸素環境は約21%の酸素を含む。

【0045】

正常酸素環境においてM I Lをインキュベートすることは、例えば、組織培養培地において少なくとも約1時間、例えば、少なくとも約12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、60時間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間またはさらに少なくとも約14日間、M I Lをインキュベートすることを含んでもよい。インキュベートすることは、約1時間から約30日間、例えば、約1日間から約20日間、約1日間から約14日間、約1日間から約12日間または約2日間から約12日間、M I Lをインキュベートすることを含んでもよい。

20

【実施例】

【0046】

(実施例1. 低酸素環境および正常酸素環境におけるT細胞の活性化および増幅)

フローサイトメトリーを使用して骨髄(BM)T細胞数を求める。抗CD3/抗CD28ビーズを所定の比率(ビーズ:CD3細胞)で所定の濃度の組換え型ヒトサイトカインを含む培地に添加する。細胞をプレート、フラスコまたはバッグに播く。低酸素チャンバーまたは細胞培養バッグのいずれかに95%窒素および5%CO<sub>2</sub>ガス混合物を3分間フラッシュすることによって低酸素条件を達成する。その後、容器をこのガス混合物で30秒間満たす。これにより容器中が2%またはそれ未満のO<sub>2</sub>ガスに達する。細胞を37°Cで3日間またはそれ超にわたり培養し、低酸素空気を放出し、正常酸素(21%大気酸素)レベルに替える。

30

【0047】

(実施例2. 細胞型の表現型決定)

所望の決定のために蛍光色素コンジュゲート抗体で細胞を染色する。蛍光色素に直接コンジュゲートしたCD3、CD4、CD8、CXCR4、41BB、CD27、CD28、CTLA-4、PD-1、CD45RO、CD62L、CD95、IFN $\gamma$ 、IL17、生/死色素(live/dead dye)および/または目的の他の抗体を適切なアイソタイプ対照とともに使用する。簡単に言えば、プレートまたはチューブ中の1 $\times$ 10<sup>6</sup>またはそれ未満の細胞をFACSバッファー(1 $\times$ HBS/2%FBS/0.5%EDTA/0.5%NaAzide)または類似の洗浄バッファーにより遠心分離機において回転させることによって洗浄する。洗浄バッファーを除去し、抗体およびアイソタイプ対照を所定の濃度で添加する。細胞を7~30分の間、室温または4°Cで染色する。細胞を2回洗浄バッファーで洗浄し、最小限の洗浄バッファーに再懸濁する。その後、細胞を利用されている蛍光色素に対して適切に補償および準備されたフローサイトメーターに流す。各サンプルに対して10,000またはそれ超の数の事象を収集する。FACS解析

40

50

ソフトウェアを利用してデータを解析する。バックグラウンド除去のために蛍光色素標識細胞をアイソタイプ対照と比較する。データを%陽性 - %バックグラウンドとしてグラフ化する。

#### 【0048】

(実施例3. 増幅倍率 (fold expansion) の決定)

増幅の開始時に骨髄細胞を数える。フローサイトメトリーを利用してCD3+細胞のパーセンテージを求める。CD3+MILの総数を、細胞の総数にCD3のパーセンテージ=培養物中のCD3+MILの総数を掛けることによって求める。培養の最終日に細胞を回収し、計数する(手作業および自動セルカウンターの間方)。CD3+のパーセンテージを求める。培養の最終日のCD3+細胞の総数を、総細胞数にCD+のパーセンテージ=回収されたCD3+MILの総数を掛けることによって求める。総増幅倍率=培養の最終日に回収されたCD3+MILの総数÷培養の初日のCD3+MILの総数。

10

#### 【0049】

(実施例4. 腫瘍特異性)

製造業者のプロトコールに従ってMILをCFSEまたは類似の細胞膜組み込み色素 (cell membrane integration dye) で標識する。培地単独、陰性対照(関連のないタンパク質もしくはライセート)により、または目的のタンパク質もしくはライセートにより自家BMをパルスする。その後、CFSE標識細胞をパルスした自家BMとともに2~7日間共培養する。組織培養プレートまたはフラスコから細胞を回収した後、細胞外をCD3によりおよび細胞内をIFN $\gamma$ により染色する。CFSEが低く(分裂した細胞)、IFN $\gamma$ を産生しているCD3+細胞に対するゲーティングによって腫瘍特異性の解析を決定する。

20

#### 【0050】

(実施例5. 低酸素環境および正常酸素環境におけるT細胞の活性化および増幅)

MILを2%O<sub>2</sub>(低酸素)において3日間増殖させ、続いて21%O<sub>2</sub>(正常酸素)に切り替えてIL-2の存在下または非存在下においてさらに5日間、増殖させた。図9に示されるとおり、低酸素に続いて正常酸素において増殖させると、正常酸素条件においてのみ増殖させたMILと比較して増幅がほぼ10倍増加した。図4に示されるとおり、腫瘍特異性も著しく向上した。10日目に、低酸素条件において増殖させたMILの25.1%とは対照的に正常酸素条件の低CFSE細胞の4%が腫瘍特異的であった。まとめると、これらのデータは、これらの増殖条件が活性化時に腫瘍特異的なものの絶対数を増加させることができることを示唆している。

30

#### 【0051】

先行する段落の実験を小サンプルに対して行った。最初の臨床試験の患者からのMIL産物もこの方法を使用して増幅させた。図3に示されるとおり、これらの条件におけるMILの増幅は、劇的にT細胞数を増加させた。正常酸素条件における増殖は、7日を超えるとほとんどMILを増幅できなかった。この実験では、低酸素条件の119倍とは対照的に、7日目の増幅倍率は、正常酸素条件において36.3倍であった。さらに、細胞は、12日目まで増幅し続け、死に始める前の11日目に総計220倍の増幅に達した。

#### 【0052】

4-1BBの発現が、多くのこれらの特性の重要なレギュレーターであることが示された。これは、T細胞増幅を制御し、アポトーシスを低減し、CD8細胞の細胞傷害活性を増大し、生存を高めることができる。さらに、HIF1は、抗原に駆動されたT細胞の生存を制御する。4-1BBを発現するベクターを用いたキメラ抗原受容体(CAR)改変T細胞は、*in vivo*における著しい増幅を示した。まとめると、活性化MIL上の4-1BB発現は、生存および腫瘍特異性を増加させる重要なレギュレーターである可能性がある。本明細書中で開示される方法の際だった利点の1つは、4-1BB発現を向上させるためにMILを改変する必要がないことである。この利点は、MILまたはPBLを正常酸素条件または低酸素条件のいずれかにおいて増殖させた図10に示されている。MILにおける4-1BBのベースライン発現を評価し、PBLと比較した。示される

40

50

とおり、4 - 1 B B 発現は、P B L よりも M I L において高かった（18.2% 対 8.1%）。興味深いことに、正常酸素における T 細胞増幅は、両集団ともにその発現が低下した（M I L 10.7%、P B L 2.8%）一方で、低酸素における増幅は、4 - 1 B B 発現を M I L で著しく増加させ（43.4%）、P B L でその発現を完全に阻害した（0%）。これらのデータは、P B L と M I L の間の顕著な差をさらにまた強調し、4 - 1 B B のアップレギュレーションが単に低酸素増殖条件だけでなくさらなる要因に依存することをさらに示す。さらに重要なことに、4 - 1 B B の予想外のアップレギュレーションは、本発明の方法が、低酸素的に増殖させた M I L を使用した患者の処置において顕著な差をもたらすことを示す。同様の結果が C D 8 細胞によっても観察された（図 8）。

【0053】

図 11 は、臨床処置のための投薬の結果を示す。J 0770 では、M I L を静置培養で正常酸素条件において増殖させた。J 0997 では、M I L を波動（W A V E）中、正常酸素条件において増殖させた。J 1343 では、M I L を低酸素条件において3日間、増殖させ、続いて正常酸素条件において増殖させた。図 6 では、自家幹細胞移植後の3つの実験に関するリンパ球絶対数をグラフ化している。J 1343 は無作為試験であり、その患者は移植後に注入された低酸素 M I L を受容したか、または M I L を注入されなかったかのいずれかであった。

【0054】

図 11 に示されるとおり、本方法の増殖条件は、全体の T 細胞増幅を平均  $7.9 \times 10^9$  から  $1.8 \times 10^{10}$  に増加させた。さらに、これは図 6 に示されるとおり初めて *in vivo* における T 細胞増幅を示し、これは患者の処置における方法の有効性に直接関係する。グラフに第 1 のセットの患者に関する 60 日目までの総リンパ球数を示す。

【0055】

均等物

当業者は、慣用的な実験を使用するだけで、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態の多くの均等物を認識する、または確認することができるだろう。そのような均等物は、添付の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

10

20

【 図 1 】

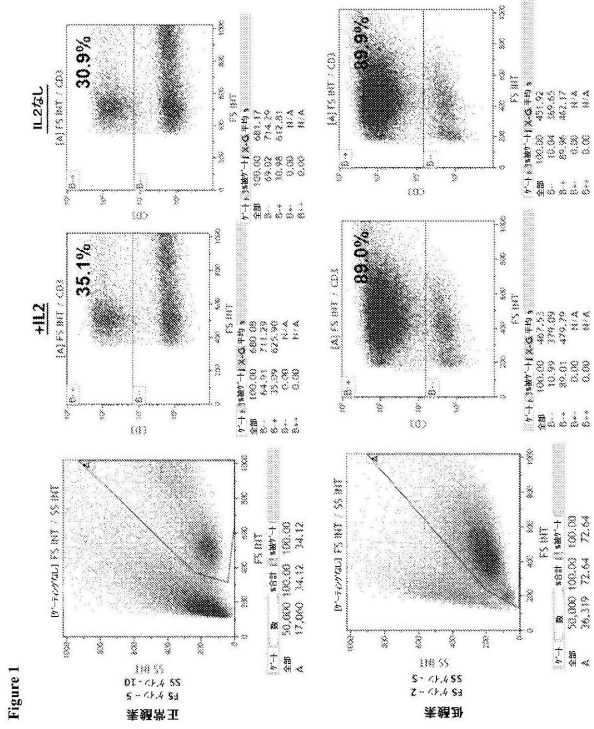


Figure 1

【 図 3 】

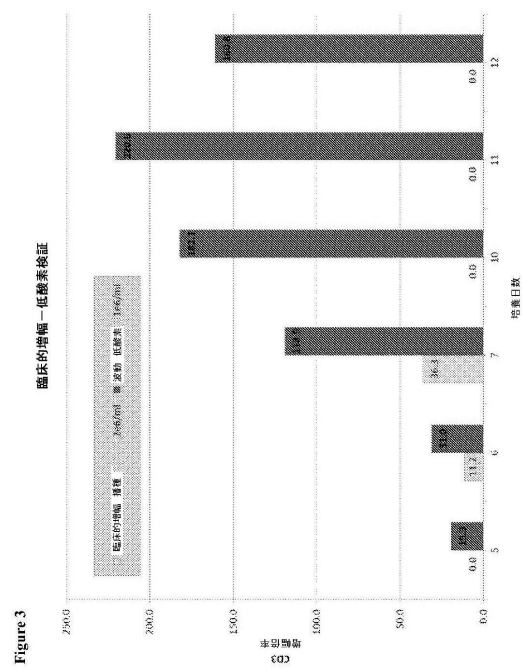


Figure 3

【 図 2 】

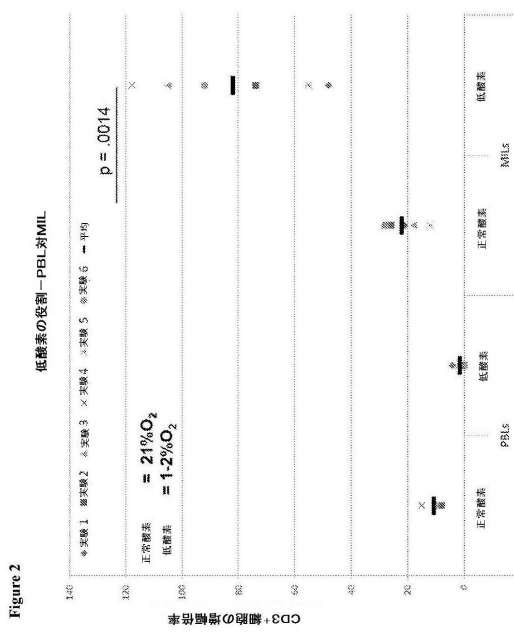


Figure 2

【 図 4 】

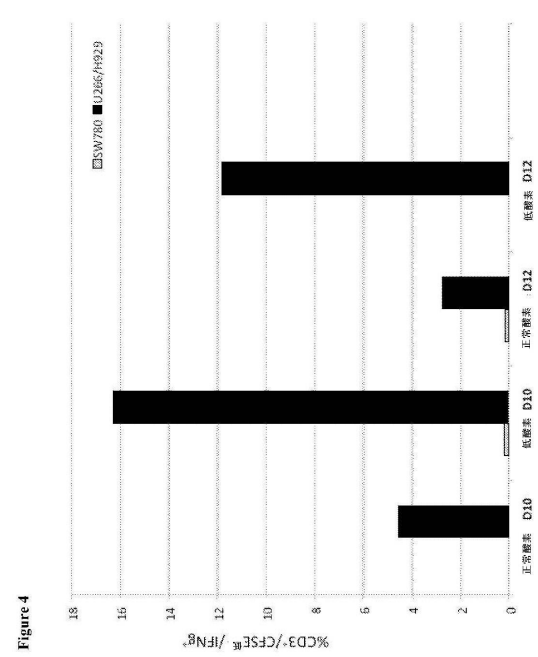


Figure 4

【 図 5 】

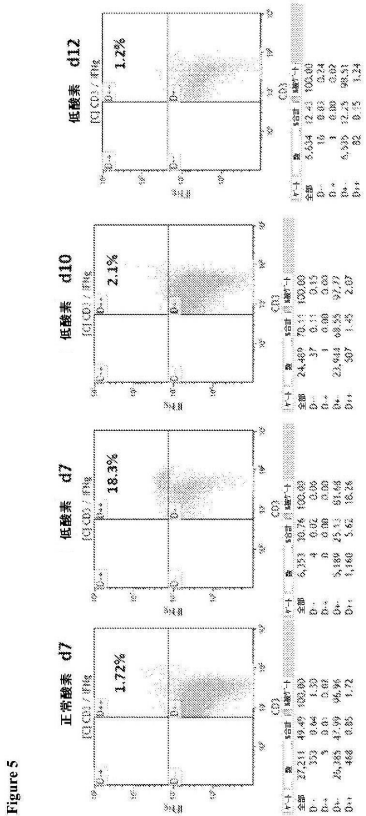


Figure 5

【 図 7 】

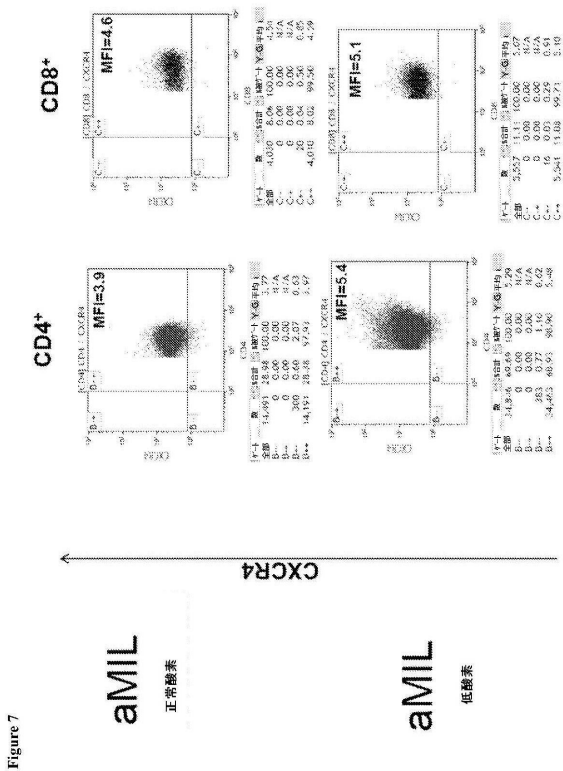


Figure 7

【 図 6 】

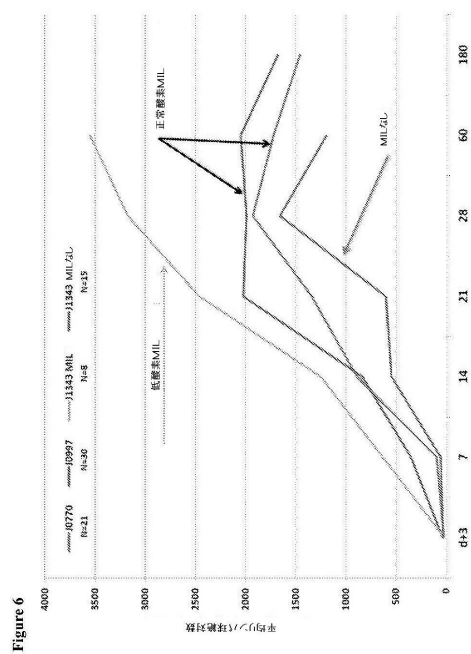


Figure 6

【 図 8 A 】

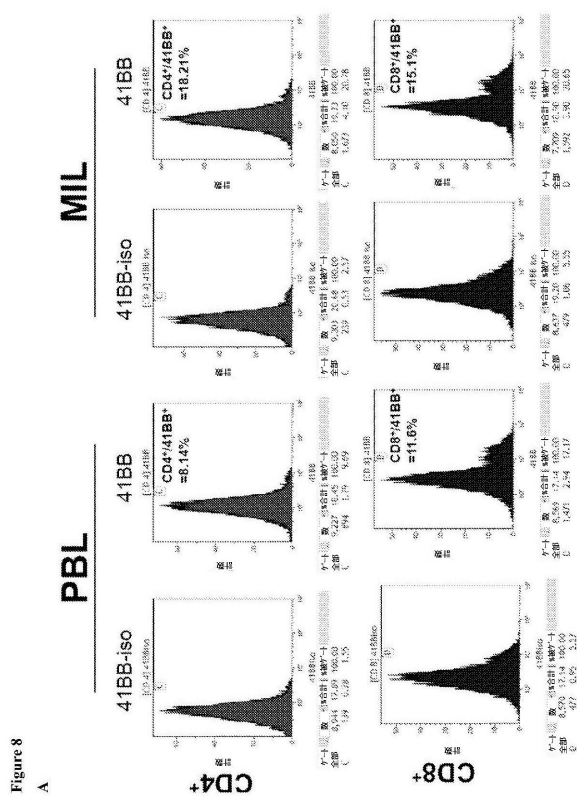
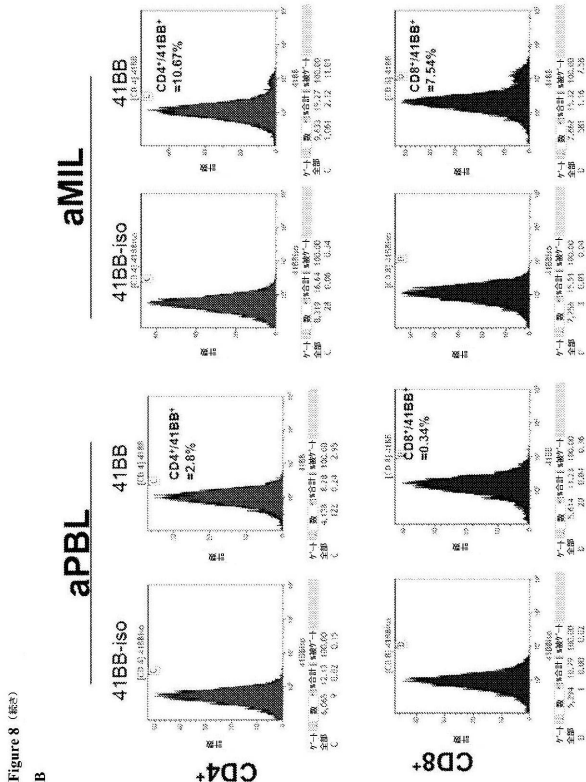


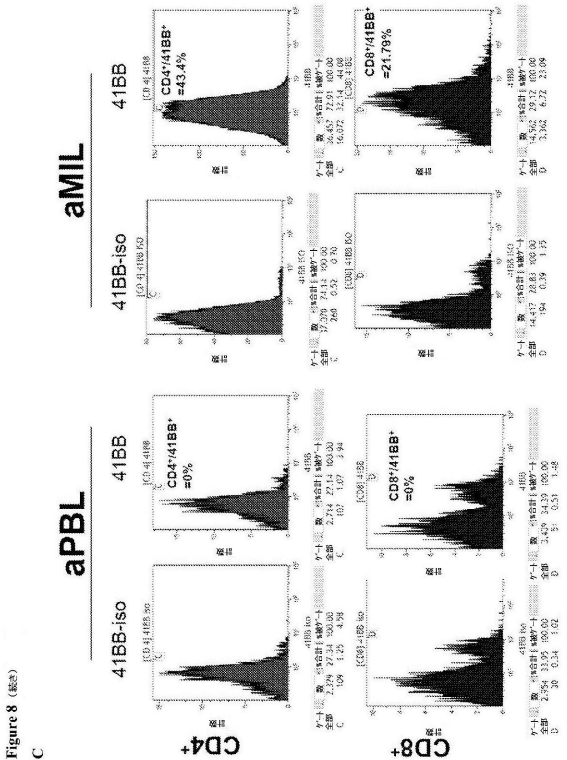
Figure 8

A

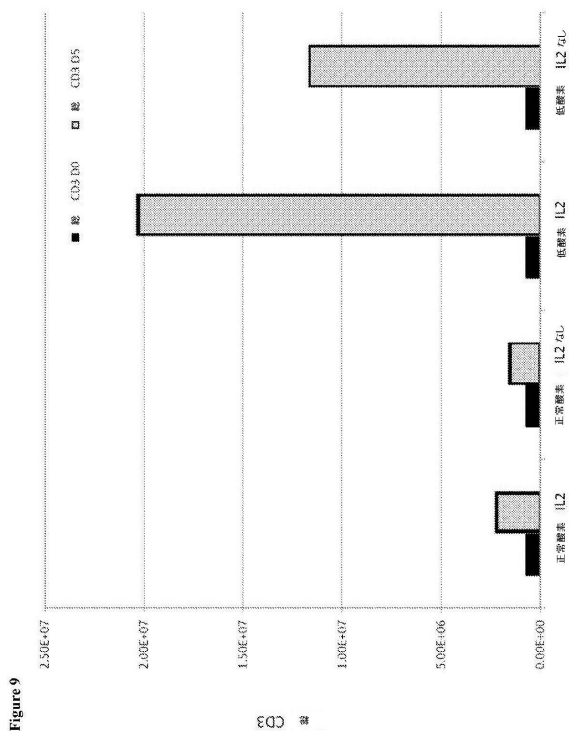
【 図 8 B 】



【 図 8 C 】



【 図 9 】



【 図 10 】

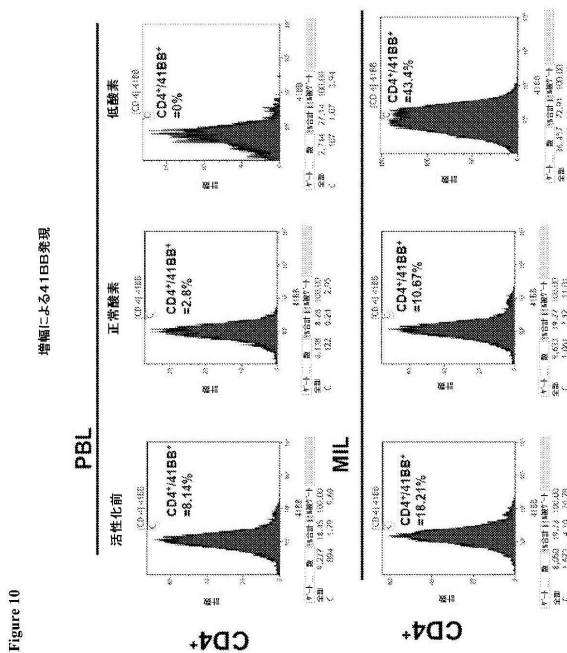
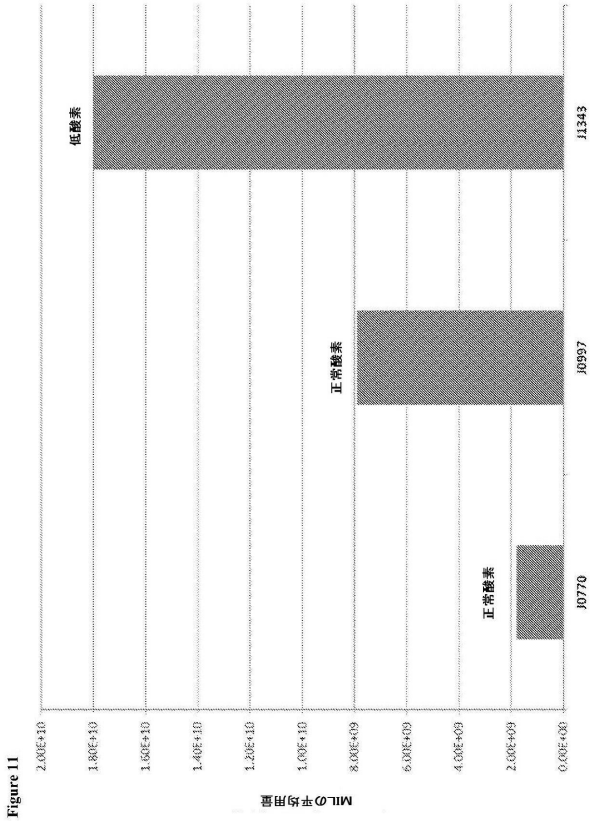


Figure 9

Figure 10

【 1 1 】



## フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ボレロ, イヴァン エム.

アメリカ合衆国 メリーランド 21231, ボルティモア, キングストン ロード 912

(72)発明者 ヌーナン, キンバリー エー.

アメリカ合衆国 メリーランド 21209, ボルティモア, ボニー リッジ ドライブ 6  
607, アpartment 102

審査官 池上 京子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0223146(US, A1)

特開2014-090678(JP, A)

Kimberly Noonan, et al, Activated Marrow-infiltrating Lymphocytes effectively Target p  
lasma cells and their clonogenic precursors, Cancer Research, 2005年, 65(5), pp.20  
26-2034

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 7/08

A61K 35/00 - 35/768

CAPLUS(STN)、MEDLINE(STN)、

EMBASE(STN)、BIOSIS(STN)、

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDream)