

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-522040

(P2018-522040A)

(43) 公表日 平成30年8月9日 (2018. 8. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 B 0 6 5
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z 4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7034 (2006.01)	A 6 1 K 31/7034	4 C 0 8 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-505461 (P2018-505461)	(71) 出願人	506167421
(86) (22) 出願日	平成28年8月2日 (2016. 8. 2)		グリコミメティクス、 インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年3月19日 (2018. 3. 19)		アメリカ合衆国 メリーランド 2085
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/045139		O, ロックビル, メディカル センター ドライブ 9708
(87) 国際公開番号	W02017/023918	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成29年2月9日 (2017. 2. 9)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	62/200, 628	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成27年8月3日 (2015. 8. 3)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	キング, レイチェル ケー.
			アメリカ合衆国 メリーランド 2081
			8, キャビン ジョン, スプリング
			ロード 8009
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増強された再構成能および寿命を有する T 細胞の動員および使用のための方法

(57) 【要約】

本開示は、増強された再構成能および / または長寿命を有する末梢血ナイーブ / メモリー幹細胞 (すなわち (T_N) / T_{SCM} / / T_{CM}) T 細胞の新規供給源を提供する。T 細胞のこの特定のサブセットは、少なくとも 1 つの動員因子を少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤と組み合わせて投与することによって動員され得ることを開示する。一局面において、被験体の末梢血に対して、増強された再構成能および / または長寿命を有する、T_{ナイーブ}T_{CM}T_{SCM}、CD62L^高CCR7⁺、CD8⁺CD62L^高CCR7⁺、CD8⁺CD62L^高、CD44⁻CD8⁺CD62L^高またはCD44⁺CD8⁺CD62L^高およびこれらの組合せのいずれかである T 細胞を動員する方法が提供され、この方法は、上記被験体に、少なくとも 1 つの動員因子を少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤と組み合わせて投与することを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体の末梢血に対して、増強された再構成能および／または長寿命を有する、 T_{H1} - T_{CM} T_{SCM} 、 $CD62L^{高}CCR7^{+}$ 、 $CD8^{+}CD62L^{高}CCR7^{+}$ 、 $CD8^{+}CD62L^{高}$ 、 $CD44^{-}CD8^{+}CD62L^{高}$ または $CD44^{+}CD8^{+}CD62L^{高}$ およびこれらの組合せのいずれかであるT細胞を動員する方法であって、前記被験体に、少なくとも1つの動員因子を少なくとも1つのE-セレクチン阻害剤と組み合わせて投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記少なくとも1つの動員因子がG-CSFである、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記少なくとも1つのE-セレクチン阻害剤がGMI-1271である、請求項1および2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

前記G-CSFが $0.5\mu g/kg/day$ から $50\mu g/kg/day$ の用量で投与される、請求項1、2および3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記T細胞が $CD62L^{高}CCR7^{+}$ 細胞である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

免疫応答の調節を必要とする被験体において免疫応答を調節する方法であって、前記被験体のがん、感染性疾患、自己免疫疾患、GVHDおよび移植から選択される少なくとも1つの状態に罹患しており、前記方法が、前記被験体に、増強された再構成能および／または長寿命を有する、 T_{H1} - T_{CM} T_{SCM} 、 $CD62L^{高}CCR7^{+}$ 、 $CD8^{+}CD62L^{高}$ 、 $CD8^{+}CD62L^{高}CCR7^{+}$ 、 $CD44^{-}CD8^{+}CD62L^{高}$ または $CD44^{+}CD8^{+}CD62L^{高}$ 、およびこれらの組合せのいずれかであるT細胞を投与することを含む、方法。

20

【請求項 7】

少なくとも1つの動員因子がG-CSFである、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも1つのE-セレクチン阻害剤がGMI-1271である、請求項6および7のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記G-CSFが $0.5\mu g/kg/day$ から $50\mu g/kg/day$ の用量で投与される、請求項6、7、および8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記T細胞が $CD62L^{高}CCR7^{+}$ 細胞である、請求項6から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

増強された再構成能および／または長寿命を有するCAR-T細胞を産生する方法であって、前記CAR-T細胞が請求項1から5のいずれか一項に従って産生される、方法。

40

【請求項 12】

少なくとも1つの動員因子がG-CSFである、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも1つのE-セレクチン阻害剤がGMI-1271である、請求項11および12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記G-CSFが $0.5\mu g/kg/day$ から $50\mu g/kg/day$ の用量で投与される、請求項11、12および13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

50

前記 T 細胞が CD 6 2 L^高 C C R 7⁺ 細胞である、請求項 1 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

増強された再構成能および / または長寿命を有する T C R 改変細胞を産生する方法であって、前記 T C R 改変細胞が請求項 1 から 5 のいずれか一項に従って産生される、方法。

【請求項 1 7】

少なくとも 1 つの動員因子が G - C S F である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤が G M I - 1 2 7 1 である、請求項 1 6 および 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 G - C S F が 0 . 5 μ g / k g / 日から 5 0 μ g / k g / 日の用量で投与される、請求項 1 6、1 7 および 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 T 細胞が CD 6 2 L^高 C C R 7⁺ 細胞である、請求項 1 6 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

がん、感染、自己免疫疾患の処置を必要とする被験体においてがん、感染、自己免疫疾患を処置する方法であって、前記被験体に、請求項 1 から 5 および 1 1 から 2 0 のいずれか一項に従って産生される細胞を投与することを含む、方法。

【請求項 2 2】

少なくとも 1 つの動員因子が G - C S F である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤が G M I - 1 2 7 1 である、請求項 2 1 および 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 G - C S F が 0 . 5 μ g / k g / 日から 5 0 μ g / k g / 日の用量で投与される、請求項 2 1、2 2 および 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記 T 細胞が CD 6 2 L^高 C C R 7⁺ 細胞である、請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 から 5 および 1 1 から 2 0 のいずれか一項に従って産生される細胞を培養することを含む、分化した T 細胞を産生する方法。

【請求項 2 7】

T 細胞の集団を含む組成物であって、前記 T 細胞が請求項 1 から 5 および 1 1 から 2 0 のいずれか一項に従って産生される、組成物。

【請求項 2 8】

CD 4 4、CD 6 2 L、CD 4 5 R O、C C R 7、CD 4 5 R A、CD 6 2 L、CD 2 7、CD 2 8、I L - 7 R、CD 9 5、I L - 2 R、C X C R 3 および L F A - 1 に対する抗体から選択される少なくとも 1 つの抗体をさらに含む、請求項 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

人工細胞増殖培地をさらに含む、請求項 2 7 および 2 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

増強された再構成能および / または増強された寿命を有する T 細胞集団の動員および採取のための新規方法、この T 細胞集団を含む組成物、ならびに感染、自己免疫疾患、およ

10

20

30

40

50

び／またはがんを含むがこれらに限定されない多数の疾患の処置におけるこのT細胞集団の使用方法が開示される。

【背景技術】

【0002】

Tリンパ球またはT細胞は、感染およびがんを含む種々のトリガーに対する身体の免疫応答の重要な構成成分である。Santoni, F. R. (2015年)、The immune system as a self-centered network of lymphocytes、Immunol Lett. 2015年8月; 166巻(2号): 109~16頁、doi: 10.1016/j.imlet.2015.06.002.、Epub 2015年6月16日。T細胞養子移入(自己または同種のい
 10
 ずれか)およびおそらく内在性T細胞の動員は、感染、がんおよび他の免疫関連障害の処置のための複数の戦略の内の2つである。最近の総説については、hemeli, M. ら(2015年)、New cell sources for T cell engineering and adoptive immunotherapy、Cell Stem Cell. 2015年4月2日; 16巻(4号): 357~66頁、doi: 10.1016/j.stem.2015.03.011; Maus MVら、Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. Annu Rev Immunol (2014年) 32巻: 189~225頁、10.1146/annurev-immunol-032713-120136; Bu
 20
 tler MOら(2011年)、Establishment of antitumor memory in humans using in vitro-educated CD8+ T cells. Sci Transl Med 3巻(80号): 80ra34. 10.1126/scitranslmed.3002207; de Aquinoら(2015年)、Challenges and future perspectives of T cell immunotherapy in cancer. Immunol Lett. 2015年8月; 166巻(2号): 117~133頁、doi: 10.1016/j.imlet.2015.05.018.、Epub 2015年6月19日を参照されたい。

【0003】

養子移入免疫治療では、T細胞は、その天然の形態または遺伝子改変された形態で患者に注入することができ、それによりT細胞はその治療活性にとって重要な1つまたは複数の外来性分子を発現する。この分子は、例えば、天然のT細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)であり得る。CAR-T細胞療法はがん臨床において成功していると報告されている。総説については、例えば、Jena, B. ら(2014年)、Driving CAR-Based T-Cell Therapy to Success、Curr Hematol Malign Rep. 2014年3月; 9巻(1号): 50~56頁; June, C. H.、Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. J. Clin. Invest. 117巻、1466~1476頁(2007年); Morgan, R. A. ら、Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science 314巻、126~129頁(2006年); Pule, M. A. ら、Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. Nat. Med. 14巻、1264~1270頁(2008年); および下記のCAR-Tセクションに引用する参考文献を参照されたい。
 30
 40

【0004】

T細胞は、他にB細胞、好中球および他の血液系構成成分を含む、造血幹細胞(HSC

10

20

30

40

50

）分化の産物の1つである。造血幹細胞およびその細胞分化産物の動員は、ある特定の増殖因子またはサイトカインの投与を介して促進され得る。Saraceniら(2015年)、Mobilized peripheral blood grafts include more than hematopoietic stem cells: the immunological perspective、Bone Marrow Transplant. 2015年7月; 50巻(7号): 886~91頁、doi: 10.1038/bmt.2014.330.、Epub 2015年2月9日。例えば、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は、化学療法によって誘導される好中球減少症を有する患者において好中球の産生を促進し、移植のためにHSCを動員するために長く使用されてきた。Deotareら、2015年、G-CSF-primed bone marrow as a source of stem cells for allografting: revisiting the concept. Bone Marrow Transplant. 2015年4月27日、doi: 10.1038/bmt.2015.80. [Epub印刷前]およびBendall LJら(2014年)、G-CSF From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent.: Cytokine Growth Factor Rev. 2014年8月; 25巻(4号): 355~67頁、doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.011.、Epub 2014年7月23日。

10

20

30

40

50

【0005】

ヒト好中球およびマウス好中球は、CD62Lとしても公知のL-セレクチンの様々なグリコフォームを発現することが報告されている。Zoellner O.ら、L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin、J Cell Biol. 1997年2月10日; 136巻(3号): 707~16頁。さらに、ヒトおよびマウスT細胞の両方のある特定の集団はCD62L陽性(CD62L⁺)である。L-セレクチンは、E-セレクチンに結合する炭水化物を含有する。Grabner N.ら、1990年、T cells bind to cytokine-activated endothelial cells via a novel, inducible sialoglycoprotein and endothelial leukocyte adhesion molecule-1、J Immunol. 1990年8月1日; 145巻(3号): 819~30頁。E-セレクチンは、骨髄血管内皮細胞によって発現され、そこでHSC増殖を駆動させる。Winkler IJら、2012年、Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance、Nat Med. 2012年11月; 18巻(11号): 1651~7頁、doi: 10.1038/nm.2969.、Epub 2012年10月21日。小さな合成E-セレクチンアンタゴニスト(GMI-1070)の一過性投与は、HSC自己再生を促進する。同書。その後、G-CSFによるHSCの動員の際に別のE-セレクチンアンタゴニスト(GMI-1271)によってE-セレクチンを阻害することにより、およそ25倍の再構成能を有するHSCが動員されることが報告されている。Mobilisation of Reconstituting HSC Is Boosted By Synergy Between G-CSF and E-Selectin Antagonist GMI-1271. Conference: 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology Location: San Francisco, CA Date: 2014年12月6日~9日、BLOOD、124巻、21号、2014年12月6日発行。

【0006】

T細胞媒介療法の有用性についての可能性のある制限は、T細胞それ自体の欠乏であり

、特に、患者の免疫系が異物として拒絶せず、移植片対宿主病を生じず、有効な処置をもたらすのに十分な時間持続することである。例えば、Nayar S.ら(2015年)、Extending the lifespan and efficacies of immune cells used in adoptive transfer for cancer immunotherapies - A review, Oncoimmunology. 2015年3月19日; 4巻(4号): e1002720、eCollection 2015年に考察されている。さらに、がん患者および他の多くの障害を有する者では、TSCM/CM/ナイーブ細胞集団が疲弊している(exhausted)場合がある。このことは、自己移植後に未改変、TCR改変、またはCAR-T細胞として長期間存続し、機能する十分な数の細胞を回収することを困難にする可能性がある。したがって、これらの要求のうちの1つまたは複数を満たす新たなT細胞供給源に対する満たされていないニーズがあり得る。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Zoellner O.ら、J Cell Biol. 1997年2月10日; 136巻(3号): 707~16頁

【非特許文献2】Grabner N.ら、J Immunol. 1990年8月1日; 145巻(3号): 819~30頁

【発明の概要】

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、増強された再構成能および/または長寿命を有する末梢血ナイーブ/メモリー幹細胞(すなわち(T_N / T_{SCM} / T_{CM}))T細胞の新規供給源を提供する。T細胞のこの特定のサブセットは、G-CSFをE-セレクチン阻害剤と組み合わせて投与することによって動員され得ることを開示する。他の動員因子を使用することもできる(例えば、VLA-4遮断と併せたCXCR4遮断)。

実施形態1において、本開示は、被験体の末梢血に、増強された再構成能および/または長寿命を有する、 $T_{ナイーブ}T_{CM}T_{SCM}$ 、 $CD62L^{高}CCR7^{+}$ 、 $CD8^{+}CD62L^{高}CCR7^{+}$ 、 $CD8^{+}CD62L^{高}$ 、 $CD44^{-}CD8^{+}CD62L^{高}$ または $CD44^{+}CD8^{+}CD62L^{高}$ およびこれらの組合せのいずれかであるT細胞を動員する方法であって、前記被験体に、少なくとも1つの動員因子を少なくとも1つのE-セレクチン阻害剤と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。

30

【0009】

実施形態2において、本開示は、前記少なくとも1つの動員因子がG-CSFである、実施形態1に従う方法を提供する。

【0010】

実施形態3において、本開示は、前記少なくとも1つのE-セレクチン阻害剤がGMI-1271である、実施形態1および2のいずれかに従う方法を提供する。

【0011】

40

実施形態4において、本開示は、G-CSFが $0.5\mu g/kg/日$ から $50\mu g/kg/日$ の用量で投与される、実施形態1、2および3のいずれかに従う方法を提供する。

【0012】

実施形態5において、本開示は、前記細胞が $CD62L^{高}CCR7^{+}$ 細胞である、実施形態1から4のいずれかに従う方法を提供する。

【0013】

実施形態6において、本開示は、それを必要とする被験体において免疫応答を調節する方法であって、前記被験体のがん、感染性疾患、自己免疫疾患、GVHDおよび移植から選択される少なくとも1つの状態に罹患しており、前記方法が、実施形態1から6のいずれかに従う細胞を投与することを含む方法を提供する。

50

【 0 0 1 4 】

実施形態 7 において、本開示は、少なくとも 1 つの動員因子が G - C S F である、請求項 6 に記載の方法。

【 0 0 1 5 】

実施形態 8 において、本開示は、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤が G M I - 1 2 7 1 である、実施形態 6 および 7 のいずれかに従う方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

実施形態 9 において、本開示は、G - C S F が $0.5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ から $50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ の用量で投与される、実施形態 6 から 8 のいずれかに従う方法を提供する。

【 0 0 1 7 】

実施形態 10 において、本開示は、前記細胞が C D 6 2 L^高 C C R 7⁺ 細胞である、実施形態 6 から 9 のいずれかに従う方法を提供する。

【 0 0 1 8 】

実施形態 11 において、本開示は、増強された再構成能および / または長寿命を有する C A R - T 細胞を産生する方法であって、前記 C A R - T 細胞が実施形態 1 から 5 のいずれかに従って産生される、方法を提供する。

【 0 0 1 9 】

実施形態 12 において、本開示は、前記少なくとも 1 つの動員因子が G - C S F である、実施形態 11 に従う方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

実施形態 13 において、本開示は、前記少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤が G M I - 1 2 7 1 である、実施形態 11 および 12 のいずれかに従う方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

実施形態 14 において、本開示は、G - C S F が $0.5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ から $50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ の用量で投与される、実施形態の 11 ~ 13 のいずれかに従う方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

実施形態 15 において、本開示は、前記細胞が C D 6 2 L^高 C C R 7⁺ 細胞である、実施形態 11 ~ 14 のいずれかに従う方法を提供する。

【 0 0 2 3 】

実施形態 16 において、本開示は、増強された再構成能および / または長寿命を有する T C R 改変細胞を産生する方法であって、前記 T C R 改変細胞が実施形態 1 から 5 のいずれかに従って産生される、方法を提供する。

【 0 0 2 4 】

実施形態 17 において、本開示は、前記少なくとも 1 つの動員因子が G - C S F である、実施形態 16 に従う方法を提供する。

【 0 0 2 5 】

実施形態 18 において、本開示は、前記少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤が G M I - 1 2 7 1 である、実施形態 1 に従う方法を提供する。

【 0 0 2 6 】

実施形態 19 において、本開示は、G - C S F が $0.5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ から $50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ の用量で投与される、実施形態 11 ~ 13 のいずれかに従う方法を提供する。

【 0 0 2 7 】

実施形態 20 において、本開示は、前記細胞が C D 6 2 L^高 C C R 7⁺ 細胞である、実施形態 16 ~ 19 のいずれかに従う方法を提供する。

【 0 0 2 8 】

実施形態 21 において、本開示は、それを必要とする被験体においてがん、感染、または自己免疫疾患を処置する方法であって、前記被験体に、実施形態 1 から 5 および 11 から 20 のいずれかに従って産生される細胞を投与することを含む、方法を提供する。

【 0 0 2 9 】

実施形態 22 において、本開示は、前記少なくとも 1 つの動員因子が G - C S F である

10

20

30

40

50

、実施形態 2 1 に従う方法を提供する。

【0030】

実施形態 2 3 において、本開示は、前記少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤が G M I - 1 2 7 1 である、実施形態 2 1 および 2 2 のいずれかに従う方法を提供する。

【0031】

実施形態 2 4 において、本開示は、G - C S F が $0.5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ から $50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ の用量で投与される、実施形態 2 1 ~ 2 3 のいずれかに従う方法を提供する。

【0032】

実施形態 2 5 において、本開示は、前記細胞が C D 6 2 L^高 C C R 7⁺ 細胞である、実施形態 2 1 ~ 2 4 のいずれかに従う方法を提供する。

【0033】

【0034】

実施形態 2 6 において、本開示は、実施形態 1 から 5 および 1 1 から 2 0 のいずれかに従って産生される細胞を培養することを含む、分化した T 細胞を産生する方法を提供する。

【0035】

【0036】

実施形態 2 7 において、本開示は、T 細胞の集団を含む組成物であって、前記 T 細胞が実施形態 1 から 5 および 1 1 から 2 0 のいずれかに従って産生される、組成物を提供する。

【0037】

実施形態 2 8 において、本開示は、C D 4 4、C D 6 2 L、C D 4 5 R O、C C R 7、C D 4 5 R A、C D 6 2 L、C D 2 7、C D 2 8、I L - 7 R、C D 9 5、I L - 2 R、C X C R 3 および L F A - 1 に対する抗体から選択される少なくとも 1 つの抗体をさらに含む、実施形態 2 7 に従う組成物を提供する。

【0038】

実施形態 2 9 において、本開示は、人工細胞増殖培地をさらに含む、実施形態 2 7 および 2 8 のいずれかに従う組成物を提供する。

【0039】

当業者は、下に記載の図面が例示的目的のためだけであることを理解する。図面は、本教示の範囲をいかなる方法によっても限定する意図はない。

【0040】

本特許または出願書類は、カラーで出力された少なくとも 1 つの図面を含有する。カラー図面を含む本特許または特許出願公開の複製物は、申請および必要経費の支払いに応じて米国特許商標局により提供される。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図 1】図 1 は、E - セレクチン阻害剤 G M I - 1 2 7 1 の存在下での T 細胞のサブセットの G - C S F 媒介動員についての実験概要を示す図である。

【0042】

【図 2】図 2 は、6 群（未処置群も同様に含む）それぞれでの血液 $1 \mu\text{L}$ あたりの合計白血球 $\times 10^3$ を示す図である。G M I 1 2 7 1 の投与 2 4 時間での顕著な増加に注目されたい（G - C S F 単独 3 日に対して約 1.5 倍）。

【0043】

【図 3】図 3 は、血液 $1 \mu\text{L}$ あたりの合計 T 細胞を示す図である（C D 4 + および C D 8 + 組合せ）。G M I 1 2 7 1 同時投与で変化なし。

【0044】

【図 4】図 4 A は、血液 $1 \mu\text{L}$ あたりの C D 4 + T 細胞を示す図であり（変化なし）；図 4 B は、血液 $1 \mu\text{L}$ あたりの C D 4 4 + C D 6 2 h i C D 4 + T 細胞を示す図である（G C S F 投与により減少したと考えられる；G M I - 1 2 7 1 同時投与は血液中のそれら

10

20

30

40

50

の数を強化しないと考えられる)。

【0045】

【図5】図5Aは、血液1uLあたりのCD8+T細胞を示す図であり(変化なし)；図5Bは、血液1uLあたりのCD44+CD62hi CD8+T細胞を示す図である(GMI-1271同時投与24時間により顕著に増加した)。

【0046】

【図6】図6Aは、血液中のCD4+CD62LHi細胞を示す図であり；図6Bは、血液中のCD8+CD62L高を示す図である。

【0047】

【図7-1】図7は、例示的細胞表面マーカーおよび細胞集団を示す図である。

10

【図7-2】図7は、例示的細胞表面マーカーおよび細胞集団を示す図である。

【図7-3】図7は、例示的細胞表面マーカーおよび細胞集団を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0048】

他に具体的に定義する場合を除いて、本明細書で使用するすべての技術的および科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。他に述べる場合を除いて本明細書において用いられるまたは検討される技術は、当業者に周知の標準的方法である。本開示の実行は、他に示す場合を除いて、当技術分野内の技能の範囲内である、免疫学、組織培養、分子生物学、化学、生化学および組換えDNA技術の従来技術を用いる。材料、方法および例は、単なる例示であり、限定ではない。以下は、例示の方法によって示され、本開示の範囲を限定することは意図されない。

20

【0049】

本明細書に記載する開示の多数の改変および他の実施形態は、前述の記載および関連する図面において示される教示の利益を有する、これらの開示が関連する技術分野の当業者に想定される。したがって開示が、開示される具体的な実施形態に限定されず、改変および他の実施形態が添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されることは理解される。具体的な用語が本明細書において用いられているが、それらは包括的および記述的な意味だけで使用され、限定の目的で使用されない。

【0050】

単位、接頭語および記号は、それらのSI承認形式で記され得る。

30

【0051】

下に定義の用語は、全体として明細書を参照することによってさらに完全に定義される。

【0052】

本明細書において使用される用語は、当業者により十分に理解され则认为られるが、本文書に含まれる定義は、ここで開示する主題の説明を促進するために記載される。

【0053】

長年にわたる特許法の慣例に従って、特許請求の範囲を含む本出願において使用される場合に用語「a」、「an」および「the」は、「1つまたは複数の」を指す。したがって、例えば、「細胞(a cell)」を参照することは、1つの細胞または複数の細胞を含む。

40

【0054】

本明細書において使用される用語「約」は、値または大きさの量、重量、時間、体積、濃度または百分率を参照する場合、指定の量から一部の実施形態では±20%、一部の実施形態では±10%、一部の実施形態では±5%、一部の実施形態では±1%、一部の実施形態では±0.5%、一部の実施形態では±0.1%の変動を包含することを意味し、そのような変動は開示の方法を実施するために好適である。

【0055】

本開示を通じて種々の実施形態は、範囲の形式で表される場合がある。数値の範囲は範囲を定義する数を含む。範囲の形式での記載は、利便性および簡潔さのためであり、

50

本開示の範囲の柔軟性のない限定として見なされるべきではないことは理解されるべきである。したがって範囲の記載は、すべての可能な部分的範囲および範囲内の個々の数値を具体的に開示しているとは見なされるべきである。例えば1から6などの範囲の記載は、1から3、1から4、1から5、2から4、2から6、3から6などの部分的範囲ならびに範囲内の個々の数値、例えば1、2、2.7、3.8、4、5.1、5.3および6を具体的に開示しているとは見なされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0056】

本明細書において使用される用語「含む (comprising)」または「含む (comprises)」は、組成物、方法およびそのそれぞれの構成成分 (複数可) を参照して使用され、必須であるか否かにかかわらず指定していない要素を含むことができる。

10

【0057】

本明細書において使用される用語「から本質的になる」は、所与の実施形態に必要な要素を指す。用語は、本開示のその実施形態の基本的および新規または機能的特徴 (複数可) に実質的に影響を与えない要素の存在を追加的に容認する。

【0058】

用語「からなる」は、実施形態の記載に列挙されていないいかなる要素も含まない、本明細書に記載の組成物、方法およびそのそれぞれの構成成分を指す。

【0059】

「造血幹細胞 (HSC)」は、すべての血液細胞を再生できる始原細胞である。発生の際に造血部位は、胎児肝臓から、成人期を通じて造血部位であり続ける骨髓に移動する。HSCは、多系列造血性分化能を有し、自己再生活性を維持している細胞である。「自己再生」は、分裂し、親細胞と同一の (例えば、自己再生) 特徴を有する少なくとも1つの娘細胞を生成する細胞の能力を指す。第2の娘細胞は、特定の分化経路に拘束し得る。例えば自己再生造血幹細胞は、分裂し、1個の娘幹細胞および骨髓性またはリンパ系経路での分化に拘束された別の娘細胞を形成する。拘束された前駆細胞は、典型的には自己再生能力を失っており、細胞分裂でさらに分化した (すなわち、限定された) 表現型を提示する2個の娘細胞を産生する。造血幹細胞は、骨髓または臍帯血移植を受けた個体において長期多系列造血 (例えば「長期生着 (long-term engraftment)」) を再生する能力を有する。造血幹細胞が、多能性幹細胞、多分化能幹細胞 (例えばリンパ系幹細胞)、および/または特定の造血性系列に拘束された幹細胞を含むことは当技術分野において周知である。特定の造血性系列に拘束された幹細胞は、T細胞系列、B細胞系列、樹状細胞系列、ランゲルハンス細胞系列および/またはリンパ組織特異的マクロファージ細胞系列であってよい。追加的にHSCは、長期HSC (LT-HSC) および短期HSC (ST-HSC) も指す。長期幹細胞は、典型的には移植後の多系列生着への長期 (3カ月を超える) 寄与を含む。短期幹細胞は、典型的には3カ月より短く持続する、および/または多系列ではないものである。LT-HSCおよびST-HSCは、例えばそれらの細胞表面マーカー発現に基づいて識別される。LT-HSCはCD34-、SCA-1+、Thy1.1+/lo、C-kit+、Un-、CD135-、Slamf1/CD150+であり、一方ST-HSCはCD34+、SCA-1+、Thy1.1+/lo、C-kit+、lin-、CD135-、Slamf1/CD150+、Mac-1 (CD11b) lo (「lo」は低発現を指す) である。追加的にST-HSCは、あまり静止状態ではなく (すなわち、より活動性)、LT-HSCよりも増殖性である。LT-HSCが無制限の自己再生を有する (すなわち、それらは成人期を通じて生存する) 一方でST-HSCは限定された自己再生を有する (すなわち、それらは限定された期間だけ生存する)。

20

30

40

【0060】

本明細書において使用される「薬学的に許容される担体」は、G-CSFもしくはE-セレクトイン阻害剤または他の治療剤と組み合わせた場合に、その活性を維持し、被験体の免疫系と非反応性である任意の材料を含む。例は、これだけに限らないが、リン酸緩衝生理食塩溶液、水、油/水エマルジョンなどのエマルジョンおよび種々の種類の湿潤剤を含

50

む。他の担体は、滅菌溶液、コーティングされた錠剤およびカプセルを含む錠剤も含む。典型的にはそのような担体は、デンプン、乳、糖、ある特定の種類のクレイ、ゼラチン、ステアリン酸もしくはその塩、ステアリン酸マグネシウムもしくはカルシウム、タルク、植物性脂肪もしくは油、ガム、グリコールまたは他の公知の賦形剤などの賦形剤を含有する。そのような担体は、香料および着色添加物または他の成分も含む場合がある。そのような担体を含む組成物は、周知の従来方法によって製剤化される。

【0061】

用語「患者」、「被験体」、「個体」などは、本明細書において互換的に使用され、*in vitro*または*in situ*であるかにかかわらず本明細書に記載の方法に適した任意の動物またはその細胞を指す。ある特定の非限定的実施形態では、患者、被験体または個体はヒトである。

10

【0062】

用語「治療」は、疾患を抑制すること（その発症を遅らせるまたは停止すること）、疾患の症状または副作用からの軽減を提供すること（待期療法を含む）および疾患を軽減すること（疾患の退縮を生じること）を含む疾患または状態の「処置すること（*treating*）」または「処置（*treatment*）」を指す。対照的に予防的処置は、疾患の素因を有し得るが、まだ疾患の症状を経験していないまたは呈していない被験体において疾患または状態が生じることの予防することを指す。

【0063】

本開示の主題の方法がここに記載される。

20

【0064】

G - C S F および E - セレクチン阻害剤の存在下での増強された再構成能および / または長寿命を有する T 細胞の動員および採取

一実施形態では、増強された再構成能および / または長寿命を有するヒト末梢血ナイーブ / メモリー幹細胞（すなわち（ $T_N / T_{SCM} / T_{CM}$ ）T細胞は、G - C S F（または別の動員因子）を被験体に少なくとも1つのE - セレクチン阻害剤の存在下で投与することによって動員され得る。これらの細胞は、採取されると、例えば免疫治療における使用のためにそのまま使用されてもよく、またはTCR改変もしくはCAR - T細胞に遺伝子改変されてもよい。一実施形態では、増強された再構成能および / または長寿命を有する末梢血ナイーブ / メモリー幹細胞（すなわち $T_N / T_{SCM} / T_{CM}$ ）T細胞は、CD 62 L 高 / + C C R 7 + である。一部の実施形態では、目的のT細胞は、CD 8 + CD 6 2 L 高のT細胞である。一実施形態では、目的のT細胞は、ナイーブT細胞に特徴的なCD 4 5 R O - 、C C R 7 + 、C D 4 5 R A + 、C D 6 2 L + 、C D 2 7 + 、C D 2 8 + およびI L - 7 R + T細胞コンパートメント内で見出すことができ、多量のCD 9 5 、I L - 2 R 、C X C R 3 およびL F A - 1を発現している。本セクションまたは他所の本開示のすべての実施形態では、目的の細胞は、少なくとも1つのE - セレクチン阻害剤の存在下でG - C S F（または別の動員因子）によって動員される。V L A - 4 遮断とC X C R 4 アンタゴニスト（例えば、プレリキサホル、モゾビル）を含むがこれらに限定されない他の動員因子も使用され得る。それらの使用は下にさらに記載される。

30

【0065】

G - C S F は、好中球顆粒球前駆細胞および成熟好中球の生存、増殖、分化および機能を刺激する糖タンパク質である。生存している生物では、G - C S F に関する3つの主な生物学的機能がある。すなわち：1．好中球の分化、増殖および成熟を駆動するための好中球前駆体細胞および骨髄性幹細胞への作用；2．免疫応答への参加のための成熟好中球への作用；ならびに3．造血機能を実施するための幹細胞因子、F l t - 3 リガンドおよびG M - C S F などの他の造血性増殖因子との協同作用である。臨床使用での組換えヒトG - C S F の少なくとも2つの形態は、好中球顆粒球形成の強力な刺激因子であり、一部の好中球減少症状態での感染合併症の予防における有効性が実証された。それらは、骨髄抑制処置からの好中球回復を加速するために使用され得る。ヒト形態のG - C S F は、1986年に日本および米国のグループによってクローニングされた（例えば、N a g a t

40

50

ら、Nature 319 巻：415～418 頁、1986 年を参照されたい)。天然ヒト糖タンパク質は、一方は 175 および他方は 178 アミノ酸の 2 つの形態で存在する。より豊富でより活性な 175 アミノ酸形態が組換え DNA 技術による医薬品の開発において使用されている。

【0066】

任意の G - C S F が本明細書に開示の方法において使用でき、それによりいくつかの実施形態が想定される。現在、市販で入手できる治療用に使用される rh G - C S F に 2 つの主な分類がある。第 1 の分類は、分子量 19 k D で 175 アミノ酸を含み、そのアミノ末端はメチオニンである、E . c o l i によって発現される組換えタンパク質（フィルグラスチム）；174 アミノ酸およびグリコシル化による修飾を含む哺乳動物細胞 CHO によって産生される組換えタンパク質を含む。rh G - C S F のこの分類は、短時間作用性であり、現在公知の臨床使用のために毎日または毎週の複数回の注射が典型的には必要である。第 2 の分類は、そのタンパク質分子の N 末端にペグ化（20 k D - P E G）修飾を有するフィルグラスチムを含む。修飾ペグフィルグラスチムの分子量は、2 倍であり、腎臓排出速度を低減し、フィルグラスチムの半減期を 3 . 5 時間から 15 ～ 80 時間に増加させ、臨床使用を促進する。両方の分類で使用される rh G - C S F は、G - C S F 単量体であるが、G - C S F 二量体も当技術分野において記載されている。他の商業的に入手できる組換えヒト G - C S F も存在し（例えばニューボジェンおよびニューラスト（Neulasta））、そして他は開発中である。Bonig ら、2015 年。例えば：Biosimilar granulocyte - colony - stimulating factor for healthy donor stem cell mobilization：need we be afraid？Transfusion . 2015 年 2 月；55 巻（2 号）：430～9 頁、doi：10.1111/trf.12770 .、Epub 2014 年 6 月 26 日；Martino M. ら、2014 年、Long - active granulocyte colony - stimulating factor for peripheral blood hematopoietic progenitor cell mobilization、Expert Opin Biol Ther . 2014 年 6 月；14 巻（6 号）：757～72 頁、doi：10.1517/14712598.2014.895809 .、Epub 2014 年 3 月 5 日；および Hoggatt ら（2014 年）、New G - C S F agonists for neutropenia therapy、Expert Opin Investig Drugs . 2014 年 1 月；23 巻（1 号）：21～35 頁、doi：10.1517/13543784.2013.838558 .、Epub 2013 年 9 月 27 日を参照されたい。

【0067】

G - C S F は、静脈内にまたは任意の他の好適な方法によって投与されてよい。当業者は、投与の最良の経路を決定できる。G - C S F は、患者に、例えば経口、皮下注射により、血液への注入により投与されてよく、または標的組織部位へ直接送達されてよい。G - C S F は、単一用量、ボラス、複数回注射または持続注入によって送達されてよい。例えば G - C S F は、血流、骨髄または身体の任意の位置に注射、注入または他の方法で投与されてよい。

【0068】

G - C S F は、1 つまたは複数の用量および / または処置レジメンで投与されてよい。一実施形態では、G - C S F は、1 日あたり 5 μ g / k g から 5 μ g / k g の範囲の量で投与される。一実施形態では、G - C S F は、1 日あたり 0 . 5 μ g / k g から 5 μ g / k g の間の用量で投与される。1 つまたは複数の処置周期は、例えば合計 3 周期反復される場合があるが、任意の数の周期が検討されてよい。1 日あたりの処置周期の数および用量あたりの量は、各周期の際に変更されてよい。例えば投与される製剤に応じて、投与される G - C S F の用量は、1 日 1 回フィルグラスチム（Filgrastim）（flg）約 300 μ g から約 960 μ g、または 1 日 1 回約 5 μ g / k g から約 32 μ g / k g

の範囲であってよい。一実施形態では、合計用量の20から50%部分は処置の開始時にボラスとして与えられ、残りの部分は処置期間にわたって持続的に投与される。前述の範囲は、例示であり、他の要因のなかでも、患者のサイズ、年齢および健康、投与の経路、患者が摂取している他の薬物療法の数および濃度、患者の状態の重症度、組成物への患者の耐容性に応じて変更されてよい。例えば、70kgのヒトのための用量は、2ml注射での480μgであってよく、適切な用量であり得る。最適なG-CSFスケジュールは、本開示の目的により当業者によって選択され得る。

【0069】

HSCの動員のために利用されているおよび/または利用され得、かつ本明細書に開示のT細胞を動員するために使用され得る、他の非G-CSF「動員因子」としては、CXCR4アンタゴニスト、VLA-4阻害剤とADAM3100(CXCR4阻害剤)との組合せが挙げられる。一実施形態では、動員因子は、SCF、Flt3リガンド、IL-3、IL-6およびIL-11から選択されてよく、造血を維持できる始原の、多能性前駆細胞を再生する。別の実施形態では、シクロホスファミドはG-CSFと組み合わせられてよい。

10

【0070】

本開示によれば、1つまたは複数のE-セレクトイン阻害剤は、G-CSFと組み合わせで投与される。両方の薬剤の組合せ使用は好適に重複し、それにより一方の薬剤の治療効果(すなわち、使用後に患者への測定可能な利益が観察される期間)は、第2の薬剤の治療効果の期間と少なくとも一部の点で同時である。2種類の薬剤は、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞の所望の効果を達成するように一緒に作用する。これら2種類の薬剤は、一緒にまたは逐次的に投与されてよい。本明細書において使用される「一緒に」は、2種類の薬剤が同時に投与されることを意味するように使用される。それらは、同じ組成物中または別々の組成物中で投与され得る。「一緒に」とは対照的に本明細書で「逐次的に」は、一方の薬剤と他方とが投与される間の間隙が重要であること、すなわち最初に投与される薬剤は、第2の薬剤が投与されるときにもはや血流中に治療量で存在しない可能性があることを意味するように使用される。どちらが最初または後で投与されてもよい。

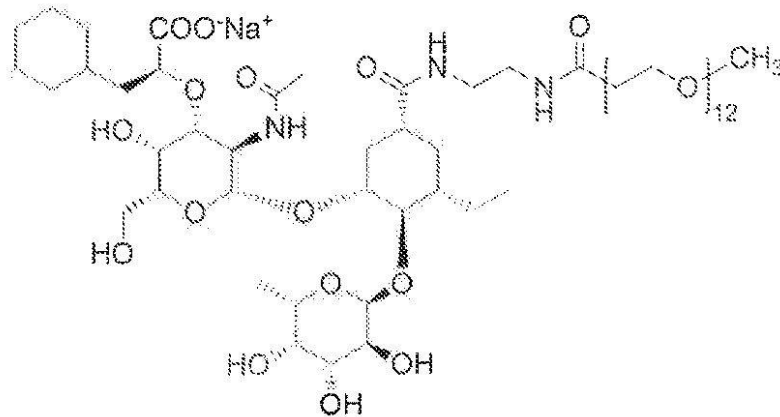
20

【0071】

E-セレクトイン(CD62E)は、活性化された内皮細胞で発現され、血管傷害部位への白血球リクルートメントにおいて重要な役割を演じる細胞接着分子である。GMI-1271はE-セレクトインのシアリル-Lex炭水化物結合ドメインの生理活性コンホメーションを模倣するように設計されており、特異的E-セレクトイン阻害剤である。Myersら、2014年、E-Selectin Inhibitor GMI-1271 Works in Combination with Low-Molecular Weight Heparin to Decrease Venous Thrombosis and Bleeding Risk in a Mouse Model、Blood:124巻(21号)、593~593頁。一実施形態では、少なくとも1つのE-セレクトイン阻害剤は、次の構造:

30

【化 1】



10

によって表される化合物 G M I - 1 2 7 1 すなわちナトリウム (1 R , 3 R , 4 R , 5 S) - 3 - ({ 2 - N - アセチルアミノ - 2 - デオキシ - 3 - O - [(1 S) - 1 - カルボキシラート - 2 - シクロヘキシルエチル] - D - ガラクトピラノシル } オキシ) - 4 - ({ 6 - デオキシ - L - ガラクトピラシル } オキシ) - 5 - エチル - シクロヘキサン - 1 - イル - (3 8 - オキソ - 2 , 5 , 8 , 1 1 , 1 4 , 1 7 , 2 0 , 2 3 , 2 6 , 2 9 , 3 2 , 3 5 - ドデカオキサ - 3 9 - アザヘンテトラコンタン - 4 1 - イル) カルボキシアミドである

20

【 0 0 7 2 】

【 0 0 7 3 】

他の実施形態では、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤は、G M I - 1 2 7 1、G M I - 1 0 7 0、G M I - 1 3 5 9 および他の糖模倣物 (g l y c o m i m e t i c) から選択される。

【 0 0 7 4 】

任意の他の E - セレクチン阻害剤 (複数可) は、本明細書に開示の方法において使用されてよい。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤は、シアリルルイス^x (s L e^x) または s L e^x 模倣物から選択される。E - セレクチン阻害剤は、E - セレクチンの他の小分子糖模倣物アンタゴニスト、E - セレクチンに方向付けられた抗体、E - セレクチンへのアプタマー、E - セレクチンに方向付けられたペプチドおよびペプチド模倣物からも選択されてよい。

30

【 0 0 7 5 】

G - C S F と同様に、1 つまたは複数の E - セレクチン阻害剤は、静脈内にまたは任意の他の好適な方法によって投与されてよい。当業者は、投与の最良の経路を決定できる。少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤は、患者に、例えば経口、皮下注射により、血液への注入により投与されてよく、または標的組織部位へ直接送達されてよい。少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤 (複数可) は、単一用量、ボース、複数回注射または持続注入によって送達されてよい。例えば少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤は、血流、骨髄または身体の任意の位置に注射、注入または他の方法で投与されてよい。

40

【 0 0 7 6 】

少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤は、同じまたは異なっていてよい 1 つまたは複数の用量および処置レジメンで投与されてよい。一実施形態では、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤は、1 日 1 回約 1 m g / k g から約 5 0 m g / k g の範囲の量で投与される。別の実施形態では、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤は、1 日 1 回約 1 m g / k g から約 5 m g / k g の範囲の量で投与される。別の実施形態では、投薬量は、約 1 μ g / k g、2 5 μ g / k g、5 0 μ g / k g、7 5 μ g / k g、1 0 0 μ g / k g、1 2 5 μ g / k g、1 5 0 μ g / k g、1 7 5 μ g / k g、2 0 0 μ g / k g、2 2 5 μ g / k g、2 5 0 μ g / k g、2 7 5 μ g / k g、3 0 0 μ g / k g、3 2 5 μ g / k g、3 5 0 μ g / k g、3 7 5 μ g / k g、4 0 0 μ g / k g、4 2 5 μ g / k g、4 5 0 μ

50

g / k g、475 μ g / k g、500 μ g / k g、525 μ g / k g、550 μ g / k g、575 μ g / k g、600 μ g / k g、625 μ g / k g、650 μ g / k g、675 μ g / k g、700 μ g / k g、725 μ g / k g、750 μ g / k g、775 μ g / k g、800 μ g / k g、825 μ g / k g、850 μ g / k g、875 μ g / k g、900 μ g / k g、925 μ g / k g、950 μ g / k g、975 μ g / k g、1mg / k g、2mg / k g、3mg / k g、4mg / k g、5mg / k g、6mg / k g、7mg / k g、8mg / k g、9mg / k gまたは10mg / k gを含むが、これらに限定されない任意の投薬量であり得る。他の実施形態では、これらの量および範囲のいずれかで1日1回を超えて、1日おきに、2日毎になどで投与される。さらなる処置周期の1回は、合計3周期反復されてよいが、任意の数の周期が検討される。1日あたりの処置の数および用量あたりの量は、各周期の際に変更されてよい。

10

【0077】

一実施形態では、少なくとも1つのE - セレクチン阻害剤はGMI - 1271である。一実施形態では、0から3日目のG - CSF、1日あたり10 μ g / Kgの投与と共に、GMI - 1271は2日目および3日目に0.5mg / k gから50mg / k gの量で投与される。一実施形態では、本開示のT細胞は、4～6日のGCSF投与後に動員される。この動員は、血液採取前4日から12時間にわたりGMI - 1271が同時投与される場合に強化され得る。

【0078】

E - セレクチン阻害剤の存在または非存在でのG - CSFへの応答におけるT細胞動員は、任意の公知方法によってアッセイされ得る。血液および血漿試料は、ベースラインでおよびこれらの薬剤での処置のさまざまな段階でサンプリングされてよい。

20

【0079】

CAR - T細胞の産生について下に記載の本明細書に開示の増強された再構成能および/または長寿命を有する末梢血ナイーブ/メモリー幹細胞(すなわちT_N/T_{SCM}/T_{CM})T細胞の拡大増殖(expansion)および遺伝子改変の前に、本明細書に開示のT細胞の供給源は被験体から得られる。例えば少なくとも1つのE - セレクチン阻害剤の存在下でG - CSFによる動員の後に得られた本明細書に開示のT細胞は、末梢血液単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染の部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織および腫瘍を含む多数の供給源から得られ得る。本開示のある特定の実施形態では、T細胞は、フィコール分離などの当業者に公知の多数の技術を使用して被験体から回収された血液単位から得られ得る。当業者は、選択の複数のラウンドが、本開示の内容でも使用され得ることを認識する。

30

【0080】

一実施形態では、個体の循環血液由来の細胞は、アフエーシスによって得られる。アフエーシス産生物は、典型的にはT細胞を含むリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球および血小板を含有する。一実施形態では、アフエーシスによって回収された細胞は、血漿画分を除去するため、および続く処理ステップに適切な緩衝液または培地に細胞を置くために洗浄されてよい。本開示の一実施形態では細胞は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄される。代替的实施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠いており、マグネシウムを欠いていてよくまたは二価カチオンのすべてではなくとも多くを欠いていてよい。別の実施形態では、血液単核細胞(BMNC)は、密度勾配遠心分離などの任意の方法によって単離されてよい。T細胞は、BMNCから分離されてよく、次いでさらに例えば磁気ビーズなどの周知方法を使用するポジティブおよびネガティブ選択によってさまざまなT細胞集団に分離されてよく、または特異的抗体を有する固相への親和性によってもしくは標識化細胞のFACSによって単離されてよい。採取後細胞は、例えば、Ca²⁺不含有、Mg²⁺不含有PBS、PlasmaLyte Aまたは緩衝液を含むもしくは含まない他の生理食塩溶液などの種々の生体適合性緩衝液中に再懸濁されてよい。代替的にアフエーシス試料の望ましくない構成成分は、除去されてよく、細胞は培養培地に直接再懸濁される。

40

50

【0081】

別の実施形態では、T細胞は、赤血球を溶解し、例えばPERCOLLグラジエントを通じた遠心分離によってまたは向流遠心分離エルトリエーションによって単球を枯渇させることによって末梢血リンパ球から単離される。CD62L⁺、CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺およびCD45RO⁺T細胞などのT細胞の特定の亜集団は、ポジティブまたはネガティブ選択技術によってさらに単離され得る。例えば一実施形態では、T細胞は、DYNABEADS M-450 CD3/CD28 Tなどの抗CD3/抗CD28（すなわち、3×28）コンジュゲートビーズとの、所望のT細胞のポジティブ選択のために十分な時間にわたるインキュベーションによって単離される。別の実施形態では、T細胞は、抗CD62Lビーズおよび抗CD8ビーズとのインキュベーションによって単離される。一実施形態では、時間は、約30分間である。さらなる実施形態では、時間は、30分間から36時間またはそれより長くおよびその間のすべての整数値の範囲である。さらなる実施形態では、時間は、少なくとも1、2、3、4、5または6時間である。さらに別の実施形態では、時間は、10から24時間である。

10

【0082】

ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブに選択された細胞に特有の表面マーカーに方向付けられた抗体の組合せで達成され得る。1つの方法は、ネガティブ磁気免疫付着または、ネガティブに選択された細胞に存在する細胞表面マーカーに方向付けられたモノクローナル抗体のカクテルを使用するフローサイトメトリーを介した細胞選別および/または選択である。例えばネガティブ選択によってCD8⁺細胞について濃縮するために、典型的にはモノクローナル抗体カクテルは、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DRおよびCD4に対する抗体を含む。ある特定の実施形態では、典型的にはCD8⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺およびFoxP3⁺を発現する制御性T細胞について濃縮またはポジティブに選択することが望ましい場合がある。代替的にある特定の実施形態では、T制御性細胞は、抗CD25コンジュゲートビーズまたは他の類似の選択方法によって枯渇される。

20

【0083】

これらの方法を実施することによって、本開示の1つまたは複数のT細胞集団は、単離され得る。本明細書において使用される用語として「細胞集団」は、大部分の細胞が同じ細胞型であるまたは同じ特徴を有する細胞の集団を包含する。細胞集団の一部として単一の細胞を分類するための好都合な1つの方法は、単一の細胞上で所与の細胞集団の細胞表面マーカーのレベルを決定することである。用語「細胞表面マーカー」および「細胞外細胞マーカー」は、本明細書において互換的に使用される。例えばT細胞は、CD62L、CCR7、CD4⁺またはCD8⁺マーカーの存在もしくは非存在または相対的存在量に基づいて同定および分類され得る；それにより、1つの細胞集団はCD4⁺T細胞、またはTヘルパー細胞である可能性がある。そのようなマーカーおよび分類は、当技術分野において周知であり、分類の任意の好適な方法は使用され得る（例えば、Appay, V.ら、Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues、Cytometry A. 2008年11月；73巻（11号）：975～83頁、doi: 10.1002/cyto.a.20643、総説および/またはDe Rosaら、11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity、Nat Med. 2001年2月；7巻（2号）：245～8頁；米国特許公開第2015/0118247号、Gattinoni, L.ら、2013年、Moving T memory stem cells to the clinic、Blood 121巻（4号）：567～568頁；Gattinoni Lら、Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory

30

40

50

stem cells. Nat Med. 2009年7月; 15巻(7号): 808~13頁、doi: 10.1038/nm.1982.、Epub 2009年6月14日およびRestifo Big bang theory of stem-like T cells confirmed Blood. 2014年7月24日; 124巻(4号): 476~7頁、doi: 10.1182/blood-2014-06-578989中の唯一の図に記載の詳細な方法を参照されたい)。

【0084】

一部の追加的な例示的細胞表面マーカーおよび細胞集団は、図7に示されている。細胞集団は、別の細胞集団の亜集団であってもよい。例えばTヘルパー細胞集団は、T細胞系列集団の亜集団であり、Tヘルパーエフェクター集団はTヘルパー集団の亜集団である。別の細胞集団の亜集団である細胞集団の他の例は、図7に示されている。

10

【0085】

T細胞が単離され、さまざまな亜集団に選別された後、本開示の方法のための目的の集団は、定量でき、所望により採取され得る。これらの採取された細胞の一実施形態では、増強された再構成能および/または長寿命を有する末梢血ナイブ/メモリー幹細胞(すなわち T_N / T_{SCM} / T_{CM}) T細胞は、 $CD62L^{高/+}$ $CCR7^{+}$ である。一部の実施形態では、目的のT細胞は、 $CD8^{+}$ $CD62L^{高}$ T細胞である。一実施形態では、目的のT細胞は、ナイブT細胞に特徴的な $CD45RO^{-}$ 、 $CCR7^{+}$ 、 $CD45RA^{+}$ 、 $CD62L^{+}$ 、 $CD27^{+}$ 、 $CD28^{+}$ および $IL-7R^{+}$ T細胞コンパートメント内で見出すことができ、多量の $CD95$ 、 $IL-2R$ 、 $CXCR3$ および $LFA-1$ を発現している。実施形態の一部では目的のT細胞は、Appay, V.ら、Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues、Cytometry A. 2008年11月; 73巻(11号): 975~83頁、doi: 10.1002/cyto.a.20643.総説および/またはDe Rosaら、11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity、Nat Med. 2001年2月; 7巻(2号): 245~8頁に記載のマーカーおよび方法に基づいて選択される。

20

30

【0086】

目的のT細胞の動員は、本明細書に開示の組合せ処置を投与することが、末梢血において所望の細胞の集団の増加をもたらす場合に、生じたと見なされる。動員は、組み合わせ処置の後の約1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、26時間、28時間または30時間で生じることができ、血液における $CD8^{+}$ $CD62L^{高}$ T細胞を含む目的のT細胞の蓄積は、投与の後の約1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、26時間、28時間、30時間、40時間、50時間、60時間、65時間、66時間、67時間、68時間、69時間、70時間、71時間、72時間、73時間、74時間、75時間、76時間、77時間、78時間、79時間、80時間、81時間、82時間、83時間、84時間、85時間、86時間、87時間、88時間、89時間、90時間、91時間、92時間、93時間、94時間、95時間、96時間、97時間、98時間、99時間、100時間、101時間、102時間、103時間、104時間、105時間、106時間、107時間、108時間、109時間および/または110時間でピークとなり得る。

40

【0087】

目的の細胞は、少なくとも1つのE-セレクチン阻害剤の存在下でG-CSFまたは別の動員因子によって動員される。一実施形態では、増強された再構成能および/または長寿命を有する末梢血ナイブ/メモリー幹細胞(すなわち T_N / T_{SCM} / T_{CM}) T細胞

50

胞は、 $CD62L^{高} / + CCR7^{+}$ である。一部の実施形態では、目的のT細胞は、 $CD8^{+} CD62L^{高}$ T細胞である。一実施形態では、目的のT細胞は、ナイーブT細胞に特徴的な $CD45RO^{-}$ 、 $CCR7^{+}$ 、 $CD45RA^{+}$ 、 $CD62L^{+}$ 、 $CD27^{+}$ 、 $CD28^{+}$ および $IL-7R^{+}$ T細胞コンパートメント内で見出すことができ、多量の $CD95$ 、 $IL-2R$ 、 $CXCR3$ および $LF A-1$ を発現している。一実施形態では、少なくとも後者は、文献において増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するとして報告されている。Gattinoni, L.ら、A human memory T cell subset with stem cell-like properties、Nat Med. 2011年9月18日; 17巻(10号): 1290~7頁; Stembergerら(2014年)、Lowest numbers of primary CD8(+) T cells can reconstitute protective immunity upon adoptive immunotherapy、Blood. 2014年7月24日; 124巻(4号): 628~37頁、doi: 10.1182/blood-2013-12-547349、Epub 2014年5月22日およびGraefら(2014年)、Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells、Immunity. 2014年7月17日; 41巻(1号): 116~26頁、doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.018。少なくとも1つの方法によりT細胞が増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有する場合、細胞は本開示の範囲内である。T細胞の増強された再構成能は、当業者に公知の種々の方法のいずれかによってアッセイされ得る。一実施形態では、T細胞の増強された再構成能は、恒常性シグナルでのそれらの自己再生能力およびT細胞受容体活性化後のそれらの多分化能を評価することによってアッセイされる。一実施形態では、このアッセイは、Gattinoni、2011年、上記に記載のとおり行われる。一実施形態では、再構成能は、マウスへの移植後に、当技術分野において公知の方法によって測定される。

【0088】

T細胞の有効な寿命は、当業者に公知の種々の方法のいずれかによってアッセイされ得る。一実施形態では、T細胞の増強された寿命は、 T_{CM} および T_{EM} 細胞と比較してそれらの長期複製および生存能力を評価することによってアッセイされる。一実施形態では、このアッセイはGattinoni、2011年、上記に記載のとおり行われる。別の実施形態では、それらがCAR-T細胞に転換された後のT細胞の増強された寿命が、養子移入されたCAR-T細胞としてのそれらの抗腫瘍有効性をアッセイすることによってアッセイされる。一実施形態では、このアッセイはGattinoni、2011年、上記に記載のとおり行われる。一実施形態では、細胞は、それらがin vivoで少なくとも10年間0.1% PMBCを超えて長期持続できる場合に増強された寿命を有する。一実施形態では(例えばマウスでは)、これは移植後12週間である(=寿命の20%)。

【0089】

T細胞を維持するまたは培養する方法は、当技術分野において周知である。一実施形態では、目的の細胞は、Gattinoni、2011年、上記に記載のとおり培養される。

【0090】

G-CSFおよびE-セレクチン阻害剤の存在下での血液への動員によって得られた、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞による免疫応答の調節

種々の刺激または障害に対する被験体の免疫応答は、被験体にG-CSFを少なくとも1つのE-セレクチン阻害剤の存在下で投与することによって動員される、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞によって調節され得る。別の実施

形態では、種々の刺激または障害に対する被験体の免疫応答は、被験体に別のT細胞動員因子を（G-CSFの代わりにまたは一緒に）少なくとも1つのE-セレクトリン阻害剤の存在下で投与することによって動員される、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞によって調節され得る。一部の実施形態では、T細胞動員因子は、VLA-4遮断との選択されたCXCR4遮断であってもよい。一実施形態では、細胞動員は、末梢血における所望のT細胞の数の増加を指す。

【0091】

本明細書に開示の方法によって動員され得るT細胞（目的のT細胞）の一実施形態では、増強された再構成能および/または長寿命を有する末梢血ナイブ/メモリー幹細胞（すなわち（T_N）/T_{SCM}）T細胞は、CD62L^高/+CCR7⁺である。一部の実施形態では、目的のT細胞は、CD8⁺CD62L^高T細胞である。一実施形態では、目的のT細胞は、ナイブT細胞に特徴的なCD45RO⁻、CCR7⁺、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺およびIL-7R⁺T細胞コンパートメント内で見出すことができ、多量のCD95、IL-2R、CXCR3およびLFA-1を発現している。一実施形態では、本明細書に開示のT細胞および/または動員方法は、それを必要とする被験体において、がん、炎症、感染、自己免疫性障害、移植片拒絶の予防および/または移植から選択される少なくとも1つの状態の処置において使用され得る。

【0092】

処置される少なくとも1つのがんは、脳、乳房、膵臓、肝臓、腎臓、肺、脾臓、胆嚢、肛門、精巣、卵巣、子宮頸部（cervical）、皮膚、骨、血液、および/または結腸がんを含むがんから選択され得、その処置が、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞の増加から利益を受ける。これらの状況では利益は、破壊のために標的がん細胞に特異的に適合されるようにさらに改変された本開示のT細胞の能力に由来してよい。

【0093】

感染は、ウイルス感染、細菌感染および他の公知の感染から選択されてよい。これらの状況では利益は、例えばウイルス性抗原に結合する受容体の使用による、破壊のために標的感染細胞に特異的に適合されるようにさらに改変された本開示のT細胞の能力に由来してよい。

【0094】

本明細書において使用される用語「自己免疫疾患」は、自己免疫性応答から生じる障害として定義される。自己免疫疾患は、自己抗原への不適切で過剰な応答の結果である。一実施形態では、自己免疫疾患の例は、これだけに限らないが特に、アジソン病、円形脱毛症（alopecia areata）、強直性脊椎炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、糖尿病（I型）、ジストロフィー型表皮水疱症、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、血管炎、白斑、粘液水腫、悪性貧血および潰瘍性大腸炎を含む。一実施形態では、本開示は、患者での化学療法および/または免疫治療が患者において顕著な免疫抑制を生じる任意の自己免疫疾患を処置することを提供する。これらの状況では利益は、免疫を再構成するT細胞の能力に由来する。

【0095】

一実施形態では、方法は、被験体に、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞の有効量を投与することを含み、T細胞はG-CSFおよび少なくとも1つのE-セレクトリン阻害剤による動員によって得られたものである。

【0096】

本明細書において使用される「有効量」は、治療的および予防的利益から選択される少なくとも1つの利益を提供する量を意味する。

【0097】

10

20

30

40

50

用語「治療有効量」は、研究者、獣医、医師および他の臨床医によって求められる組織、系または被験体での生物学的または医学的応答を誘発する対象化合物の量を指す。用語「治療有効量」は、投与された場合に処置される障害または疾患の1つまたは複数の徴候または症状の発症を予防する、またはある程度緩和するために十分である化合物の量を含む。治療有効量は、化合物、疾患およびその重症度ならびに処置される被験体の年齢、体重などに応じて変化する。例えばがんの場合、治療効果は、がん細胞を死滅させること、がん細胞のアポトーシスを誘導すること、がん細胞の増殖速度を低減すること、転移の発生率もしくは数を低減すること、腫瘍サイズを低減すること、腫瘍増殖を抑制すること、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給を低減すること、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答を促進すること、がんの進行を予防することもしくは抑制すること、またはがんを有する被験体の寿命を増大させることでありよい。

10

【0098】

別の実施形態では、処置は、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞の*in vivo*動員（投与に続く単離は含まない）からなり、T細胞は、G-CSFおよびE-セレクチン阻害剤による動員によって得られたものである。方法は、がん、感染、自己免疫性障害、移植片対宿主病もしくは移植の処置を受ける前の患者または、細胞が後にレシピエントに移植される可能性があるドナーに投与されてよい。

【0099】

一部の実施形態では、用語「処置」は、疾患の進行の減速、中断、停止、逆転または止めることを意味し、疾患のすべての徴候および症状の完全な消失が必ずしも必要ではない。さらに処置された患者の100%において処置が有効性を示す必要はなく、むしろ用語「処置」は、統計的に有意な割合の患者が、症状および臨床徴候が少なくとも改善を示すように有効に処置され得ることを意味することが意図される。当業者は、種々の統計的方法（例えば信頼区間、それらのp値の決定、スチューデントt検定、マン・ホイットニー検定など）を使用して割合が統計的に有意であるかどうかを容易に確立できる。信頼区間は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の信頼度を有する。p値は、0.1、0.05、0.01、0.005または0.0001である。

20

【0100】

一実施形態では、T細胞は、先に開示されたとおりに動員される。動員されるとT細胞は、回収または採取されてよく、次いでそれを必要とする同じ被験体（自己移植）に戻してまたは別の被験体（同種間移植）に移植される。本明細書において使用される用語「自己」は、後に再導入される個体と同じ個体由来の任意の材料を指す。「同種」は、同じ種の異なる動物（例えばヒト）由来の移植片を指す。

30

【0101】

別の実施形態では、処置は、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞の*in vivo*動員（投与に続く単離は含まない）からなり、T細胞は、G-CSFおよびE-セレクチン阻害剤による動員によって得られたものである。

【0102】

G-CSFおよびE-セレクチン阻害剤の存在下での動員によって得られた、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞を用いた、CAR-T細胞の産生

40

一実施形態では、例えば、G-CSFを被験体に少なくとも1つのE-セレクチン阻害剤の存在下で投与することによって動員された、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞は、免疫治療または養子T細胞移入/移植においてそのまま使用されてもよい。一実施形態では、増強された再構成能および/または長寿命を有する末梢血ナイーブ/メモリー幹細胞（すなわちT_N/T_{SCM}/T_{CM}）T細胞は、CD62L^高CCR7⁺である。一部の実施形態では、目的のT細胞は、CD8⁺CD62L^高T細胞である。一部の実施形態では、目的のT細胞は、CD8⁺CD62L^高CCR7⁺T細胞である。一実施形態では、目的のT細胞は、ナイーブ細胞に特徴的なCD45RO

50

、 $CCR7^+$ 、 $CD45RA^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ および $IL-7R^+$ T細胞コンパートメント内で見出すことができ、多量の $CD95$ 、 $IL-2R$ 、 $CXCR3$ および $LF A-1$ を発現している。

【0103】

追加的に別の実施形態では、例えば、 $G-CSF$ を被験体に E -セレクトイン阻害剤の存在下で投与することによって動員された、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するこれらの同じT細胞は、 CAR -T細胞の産生のために使用されてよい。 CAR は、内在性T細胞受容体と類似する様式でT細胞活性化を引き起こすことができる一方で、今日までのこの技術の臨床適用への主な障害は CAR -T細胞の限定的な *in vivo* 拡大増殖および注入後の細胞の急速な消失である。したがって本明細書に開示のT細胞は、有益で、持続的であること、ならびに/またはがん、感染、炎症、および/もしくは自己免疫疾患の長期の有効な処置を提供することが期待される。

10

【0104】

回収後に、前段落で開示のT細胞、例えば $CD62L^{高} / CCR7^+$ は、キメラ抗原受容体 (CAR) と称されるそれらの表面上の特殊な受容体を産生するように遺伝子操作される。 CAR は、T細胞が、例えば腫瘍細胞上の、特定のタンパク質 (抗原) を認識できるようにするタンパク質である。次いでこれらの操作された CAR -T細胞は、それらの数が数十億になるまで実験室で増殖される。次いで CAR -T細胞の拡大増殖された集団は、患者に注入される。がんの処置では、注入後、T細胞は患者の身体で増加し、それらの操作された受容体からの誘導で、その表面に抗原を保持しているがん細胞を認識し、死滅させる。別の実施形態では、炎症を生じる望まれないT細胞応答の「機能の喪失」をもたらすように天然に存在する制御性T細胞 ($nTreg$) 中に CAR を移植でき、それにより進行中の自己免疫性障害を好転させる。例えば、Dotti, G. (2014年)、The Other Face of Chimeric Antigen Receptors, Molecular Therapy (2014年); 22巻、5号、899~900頁、doi: 10.1038/mt.2014.58を参照されたい。

20

【0105】

CAR -T細胞の遺伝子操作は、当技術分野において十分記載されており、当業者に日常的に利用可能な任意の分子生物学的技術によって実施され得る。例えば米国特許公開第20150118202号を参照されたい。一実施形態では、本明細書に開示の CAR は、他に抗原結合成分と称される標的特異的結合要素を含む。例えば米国特許第8,975,071号を参照されたい。成分の選択は、標的細胞の表面を定義するリガンドの種類および数に依存する。例えば抗原結合ドメインは特定の疾患状態に関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択されてよい。それにより、本明細書に開示の CAR 中の抗原成分ドメインに対するリガンドとして作用できる細胞表面マーカーの例は、ウイルス性、細菌性および寄生生物感染、自己免疫疾患ならびに/またはがん細胞に関連するものを含む。

30

【0106】

一実施形態では、 CAR -T細胞は、がん患者への移植後に種々のがんを処置するために使用され得る。それらは、進行急性リンパ芽球性白血病 (ALL) およびリンパ腫を含む種々のがんの処置に有望であることが示されている。

40

【0107】

CAR -T細胞製造および送達は、次のステップ: (1) 白血球アフェレーシス: 患者のT細胞が末梢血から採取されるアフェレーシス; (2) T細胞活性化: T細胞は、人工樹状細胞 (DC) として働く Ab コーティングビーズを使用して活性化される; (3) 形質導入またはトランスフェクション: T細胞は、抗遺伝子標的キメラ抗原受容体をコードする構築物で *ex vivo* で遺伝子的に形質導入されるかまたはトランスフェクトされる; (4) 拡大増殖: 遺伝子改変細胞は、さらに *ex vivo* 拡大増殖を受ける; (5) 化学療法: 患者は、T細胞注入の前に調製的リンパ枯渇レジメンを受ける; (6) 注入: 遺伝子操作されたT細胞は患者に注入される、を含み得る。Levine, B. L.

50

、Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells、Cancer Gene Therapy (2015年) 22巻、79～84頁; doi: 10.1038/cgt.2015.5; 2015年2月13日にオンラインで発表。本開示は、ステップ(1)において採取される細胞の品質を改善する。

【0108】

CAR-T細胞産生のためにT細胞を採取し、CAR-T細胞を使用する方法は、当業者に十分理解されており、種々の学術論文に記載および要約され使用されている。それらは、本開示の特異的なT細胞サブセットの選択および採取を導くために変更されてよい。例えば、Themelirら(2015年); Sharpeら(2015年)、Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges、Disease Models and Mechanisms、8巻(4号) 337～350頁; Riddellら、2013年、Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells - Clinical Translation in Stem Cell Transplantation and Beyond、Biol Blood Marrow Transplant. 2013年1月; 19巻(10号): S2～S5; Kershawら(2014年)、Clinical application of genetically modified T cells in cancer therapy、Clinical & Translational Immunology (2014年) 3巻、e16; doi: 10.1038/cti.2014.7; Brentjens RJ、Davila ML、Riviere Iら、CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2013年; 5巻: 177ra38; Grupp SA、Kalos M、Barrett Dら、Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. N Engl J Med. 2013年; 368巻: 1509～1518頁; Lee DW、Shah NN、Stetler-Stevenson Mら、Anti-CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cells produce complete responses with acceptable toxicity but without chronic B-cell aplasia in children with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL) even after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) [抄録]、Blood. 2013年; 122巻: 抄録68; Davila ML、Riviere I、Wang Xら、Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2014年; 6巻: 224ra25; Park JH、Riviere I、Wang Xら、CD19-targeted 19-28z CAR modified autologous T cells induce high rates of complete remission and durable responses in adult patients with relapsed, refractory B-cell ALL [抄録]、Blood. 2014年; 124巻: 抄録382およびLevine, B.L.、Performance-enhancing drugs: design and

10

20

30

40

50

production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells, Cancer Gene Therapy (2015年) 22巻、79～84頁; doi: 10.1038/cgt.2015.5; 2015年2月13日にオンラインで発表、を参照されたい。

【0109】

一実施形態では、CAR-T細胞は、リン酸緩衝生理食塩水で拡大増殖、洗浄および濃縮され、5% Albumex 20を補充した滅菌生理食塩水100mlに製剤化した。CAR-T細胞は、当業者によって決定される適切な細胞用量で投与され得る。一実施形態では、CAR-T細胞は、生細胞 1×10^8 個の最小値で投与される。再注入または移植されるT細胞の最大数は、当業者によって行われる臨床試験の際に典型的には決定される。

10

【0110】

任意のキメラ抗原受容体(CAR)は、本明細書に開示の細胞と共に使用され得る。一実施形態では、CARは、さまざまなタンパク質由来のいくつかのドメインから構成されるキメラ構築物である、すなわち：(1)Abから通常取られる抗原認識ドメイン、(2)CD3 T細胞共受容体シグナル伝達ドメイン、および(3)抗原提示の際にT細胞活性化のために必要な共刺激ドメイン。Levine、2015年。任意の腫瘍抗原、T特異的抗原/腫瘍関連抗原は、標的化され得る。腫瘍抗原は、免疫応答、特にT細胞媒介免疫応答を誘発する、腫瘍細胞によって産生されるタンパク質である。例えば、Vigneron N. (2015年)、Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy, Biomed Res Int. 2015; 2015年; 948501頁、doi: 10.1155/2015/948501、Epub 2015年6月16日を参照されたい。本明細書で開示の抗原結合成分の選択は、処置されるがんの具体的な種類に依存する。腫瘍抗原は、当技術分野において周知であり、例えば神経腫腫関連抗原、癌胎児性抗原(CEA)、ベータ-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン(AFP)、レクチン反応性AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写物酵素、RU1、RU2(AS)、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ、前立腺特異抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン(prostein)、PSMA、Her2/neu、サバイピンおよびテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インスリン増殖因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受容体およびメソテリンを含む。本開示で参照する腫瘍抗原の種類は、腫瘍特異抗原(TSA)または腫瘍関連抗原(TAA)であってもよい。TSAは、腫瘍細胞に特有であり、身体その他の細胞には生じない。TAA関連抗原は、腫瘍細胞に特有ではなく、代わりに抗原への免疫学的寛容の状態を誘導できない条件下で正常細胞でも発現される。腫瘍上での抗原の発現は、免疫系が抗原に応答できるような条件下で生じ得る。TAAは、免疫系が未成熟であり、応答できない胎児発生の際に正常細胞で発現される抗原であってよく、または正常細胞で非常に低いレベルで通常存在するが、腫瘍細胞上でさらに高いレベルで発現される抗原であってよい。

20

30

40

【0111】

TSAまたはTAA抗原の非限定的例は、次の：MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel17)、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2などの分化抗原、およびMAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15などの腫瘍特異的多系列抗原；CEAなどの過発現胚性抗原；p53、Ras、HER-2/neuなどの過発現癌遺伝子および変異腫瘍抑制遺伝子；染色体転座から生じる特有の腫瘍抗原；BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RARなど；ならびにエプスタイン・バーウイルス抗原EBVAならびにヒトパピローマウイルス(HPV)抗原E6およびE7などのウイルス性抗原を含む。他の大きな、タンパク質に基づく抗原は、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MA

50

GE - 6、RAGE、NY - ESO、p185erbB2、p180erbB - 3、c - met、nm - 23H1、PSA、TAG - 72、CA19 - 9、CA72 - 4、CAM17.1、NuMa、K - ras、ベータカテニン、CDK4、Mum - 1、p15、p16、43 - 9F、5T4、791Tgp72、アルファフェトプロテイン、ベータHCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15 - 3\CA27.29\BCAA、CA195、CA242、CA - 50、CAM43、CD68\P1、CO - 029、FGF - 5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp - 175、M344、MA - 50、MG7 - Ag、MOV18、NB/70K、NY - CO - 1、RCAS1、SDCCAG16、TA - 90\Mac - 2結合タンパク質\シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLPおよびTPSを含む。

10

【0112】

一実施形態では、CAR中の抗原結合ドメインは、CD19に結合する。一実施形態では、腫瘍抗原は、血液学的悪性疾患に関連している。別の実施形態では、腫瘍抗原は、固形腫瘍に関連している。さらに別の実施形態では、腫瘍抗原は、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c - Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD - 2、NY - ESO - 1 TCR、MAGE A3 TCRおよびこれらの任意の組合せからなる群より選択される。一実施形態では、腫瘍抗原は、悪性腫瘍に関連する1つまたは複数の抗原性がんエピトープを含む。悪性腫瘍は、免疫攻撃のための標的抗原として働く場合がある多数のタンパク質を発現する。一実施形態では、これらの分子は、これだけに限らないがメラノーマ中のMART - 1、チロシナーゼおよびGP100ならびに前立腺がん中の前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)および前立腺特異抗原(PSA)などの組織特異抗原を含む。他の実施形態では、他の標的分子は、癌遺伝子HER - 2/Neu/Erbb - 2などの形質転換関連分子の群に属する。標的抗原のさらに別の群は、癌胎児性抗原(CEA)などの腫瘍胎児性抗原である。B細胞リンパ腫では腫瘍特異的イディオタイプ免疫グロブリンは、個々の腫瘍に特有の真の腫瘍特異的免疫グロブリン抗原を構成する。CD19、CD20およびCD37などのB細胞分化抗原は、B細胞リンパ腫中の標的抗原に関する他の実施形態である。一部のこれらの抗原(CEA、HER - 2、CD19、CD20、イディオタイプ)は、モノクローナル抗体での受動的免疫治療のための標的として成功裏に使用されている。

20

【0113】

一実施形態では、CAR中の共刺激シグナル伝達領域は、CD27、CD28、4 - 1BB、OX40、CD30、CD40、PD - 1、ICOS、リンパ球機能関連抗原 - 1(LFA - 1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7 - H3、CD83に特異的に結合するリガンドおよびこれらの任意の組合せからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む。一実施形態では、CAR中の抗原結合ドメインは、抗体またはその抗原結合断片である。一実施形態では、抗原結合断片は、FabまたはscFvである。

30

【0114】

一実施形態では、CAR - T細胞は、ヒトにおいて投与後少なくとも3カ月持続する。別の実施形態では、CAR - T細胞の持続集団は、ヒトにおいて投与後少なくとも4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、12カ月、2年または3年持続する。一実施形態では、本明細書に開示のCAR - T細胞は、in vivoで複製可能であり、持続性抗腫瘍効果をもたらすことができる血液または骨髄における長期持続を生じる。本明細書において使用される用語「抗腫瘍効果」は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞の数の減少、転移の数の減少、平均余命の増大またはがん性状態に関連する種々の生理学的症状の好転によって明らかになり得る生物学的効果を指す。一実施形態では、CAR - T細胞後代は、メモリーT細胞を含み得る。

40

【0115】

G - CSFおよびE - セレクチン阻害剤の存在下での動員によって得られた、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞を用いた、遺伝子改変T細胞

50

受容体を保有するT細胞(TCR細胞)の産生

一実施形態では、例えば、G-CSFを被験体に少なくとも1つのE-セレクトイン阻害剤の存在下で投与することによって動員された、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するT細胞は、ある特定のT細胞受容体を発現するように改変された後に、そのまま免疫治療または養子T細胞移入/移植に使用され得る。一実施形態では、増強された再構成能および/または長寿命を有する末梢血ナイーブ/メモリー幹細胞(すなわち(T_N/T_{SCM}/T_{CM})T細胞は、CD62L^高/+CCR7⁺である。一部の実施形態では、目的のT細胞は、CD8⁺CD62L^高T細胞である。一部の実施形態では、目的のT細胞は、CD8⁺CD62L^高CCR7⁺T細胞である。一実施形態では、目的のT細胞は、ナイーブT細胞に特徴的なCD45RO⁺、CCR7⁺、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺およびIL-7R⁺T細胞コンパートメント内で見出すことができ、多量のCD95、IL-2R、CXCR3およびLFA-1を発現している。

【0116】

追加的に別の実施形態では、増強された再構成能および/または長期の有効な寿命を有するこれらの同じT細胞は、例えば、G-CSFを被験体にE-セレクトイン阻害剤の存在下で投与することによって動員される。

【0117】

TCR改変細胞の産生のために開示の細胞は、当業者に公知の任意の方法を使用して遺伝子改変され得る。例えばTCR保有構築物は、ウイルス形質導入(レトロウイルス、レンチウイルス)または電気穿孔法を介して細胞に導入され得る。これらの手順の例は、文献に見出すことができ、Bertollettiら(2015年)、T cell receptor-therapy in HBV-related hepatocellular carcinoma, *Oncoimmunology*, 2015年3月19日; 4巻(6号): e1008354、eCollection 2015年、Qasim Wら(2015年)、Immunotherapy of HCC metastases with autologous T cell receptor redirected T cells, targeting HBsAg in a liver transplant patient, *J Hepatol*, 2015年2月; 62巻(2号): 486~91頁、doi: 10.1016/j.jhep.2014.10.001、Epub 2014年10月13日およびLevineら(2013年)、Adoptive transfer of gene-modified T-cells engineered to express high-affinity tcr's for cancer-testis antigens NY-ESO-1 or lag-1, in multiple myeloma (MM) patients post autologous hematopoietic stem cell transplant (ASCT), *Cytotherapy*, 15巻、4号、増補、S13頁を含む。TCR媒介改変とCAR-T細胞産生との間の差異は当技術分野において記載されている、例えばQasimら(2014年)、Progress and prospects for engineered T cell therapies, *Br J Haematol*, 2014年9月; 166巻(6号): 818~29頁、doi: 10.1111/bjh.12981、Epub 2014年6月17日およびKershawら(2014年)、Clinical application of genetically modified T cells in cancer therapy, *Clin Transl Immunology*, 2014年5月16日; 3巻(5号): e16、doi: 10.1038/cti.2014.7、eCollection 2014年。

【0118】

この手法において標的として使用され得る抗原の例は、上のCAR-T関連セクションにおいて見出すことができる。この分類での例は、幅広いがんでの発現を伴ってメラニン

10

20

30

40

50

細胞分化抗原 M A R T - 1 および g p 1 0 0 ならびに M A G E 抗原および N Y - E S O - 1 を含む。

【 0 1 1 9 】

G - C S F および E - セレクチン阻害剤の存在下での動員によって得られた、増強された再構成能および / または長期の有効な寿命を有する T 細胞を用いた、分化した T 細胞の産生

一実施形態では、増強された再構成能および / または長期の有効な寿命を有するとして本明細書に記載され、G - C S F を被験体に E - セレクチン阻害剤の存在下で投与することによって動員された T 細胞は、他の T 細胞集団の産生のために使用され得る。C i e r i ら (2 0 1 3 年) 、 I L - 7 a n d I L - 1 5 i n s t r u c t t h e g e n e r a t i o n o f h u m a n m e m o r y s t e m T c e l l s f r o m n a i v e p r e c u r s o r s 、 P u b M e d C o m m o n s 、 B l o o d . 2 0 1 3 年 1 月 2 4 日 ; 1 2 1 巻 (4 号) : 5 7 3 ~ 8 4 頁、d o i : 1 0 . 1 1 8 2 / b l o o d - 2 0 1 2 - 0 5 - 4 3 1 7 1 8 . 、 E p u b 2 0 1 2 年 1 1 月 1 5 日の論評および G a t t i n o n i ら (2 0 1 3 年) 、 M o v i n g T m e m o r y s t e m c e l l s t o t h e c l i n i c 、 B l o o d . 2 0 1 3 年 1 月 2 4 日 ; 1 2 1 巻 (4 号) : 5 6 7 ~ 8 頁、d o i : 1 0 . 1 1 8 2 / b l o o d - 2 0 1 2 - 1 1 - 4 6 8 6 6 0 ; G a t t i n o n i , L . ら (2 0 1 1 年) 、 A h u m a n m e m o r y T c e l l s u b s e t w i t h s t e m c e l l - l i k e p r o p e r t i e s 、 N a t M e d . 2 0 1 1 年 9 月 1 8 日 ; 1 7 巻 (1 0 号) : 1 2 9 0 ~ 7 頁、d o i : 1 0 . 1 0 3 8 / n m . 2 4 4 6 による論評を参照されたい。

【 0 1 2 0 】

さまざまな C D 8 + T 細胞サブセットがある。ナイーブ、T 幹細胞 (T _{S C M}) および T セントラルメモリー (T _{C M}) 細胞は、循環し、リンパ系組織に移動する一方でエフェクターメモリー T 細胞 (T _{E M}) およびエフェクター T 細胞 (T _{E F F}) は、末梢組織に輸送する能力を有する。C D 8 + T 細胞の分化について多数のモデルがある。J o s h i および K a e c h (2 0 0 8 年) 、 E f f e c t o r C D 8 T c e l l d e v e l o p m e n t : a b a l a n c i n g a c t b e t w e e n m e m o r y c e l l p o t e n t i a l a n d t e r m i n a l d i f f e r e n t i a t i o n . J . I m m u n o l . 1 8 0 巻、1 3 0 9 ~ 1 3 1 5 頁。1 つのモデルは、ナイーブ T 細胞の活性化に続いて、T 細胞の 3 つの主な循環サブセット (T _{S C M} 、 T _{C M} および T _{E M}) を通じた進行性の分化があり、T _{E F F} が最終的に分化した T 細胞を表していることを提案する C D 8 + T 細胞の分化についての直線モデルである。さまざまな T 細胞サブセットを標的化することは、遺伝子改変 T 細胞療法の有効性および持続性を増加できる。したがって、本明細書に開示の細胞から誘導され得る細胞の非限定的例は、T _{C M} 、 T _{E M} 、 T _{E F F} 、 T r e g を含む。T r e g は、T 細胞応答を弱めるように作用できる免疫抑制細胞である。ある特定のヒト自己免疫性、感染性およびアレルギー性疾患は、欠陥のある制御性 T 細胞機能と関連している。T r e g の養子移入は、これらの障害に対して可能性がある処置と考えられている。T r e g の使用に関する参考文献の例として、例えば、B l u e s t o n e ら (2 0 1 5 年) 、 T h e t h e r a p e u t i c p o t e n t i a l o f r e g u l a t o r y T c e l l s f o r t h e t r e a t m e n t o f a u t o i m m u n e d i s e a s e 、 E x p e r t O p i n T h e r T a r g e t s . 2 0 1 5 年 4 月 1 6 日 : 1 ~ 1 3 頁および T a a m s ら (2 0 0 6 年) 、 R e g u l a t o r y T c e l l s i n h u m a n d i s e a s e a n d t h e i r p o t e n t i a l f o r t h e r a p e u t i c m a n i p u l a t i o n 、 I m m u n o l o g y . 2 0 0 6 年 5 月 ; 1 1 8 巻 (1 号) : 1 ~ 9 頁を参照されたい。例えば大腸炎は、結腸における C E A (癌胎児性抗原) などのタンパク質標的に対して反応する患者自身の T 細胞によって生じることから、T r e g はこれらの免疫応答を抑制でき、健康な結腸を回復できる。免疫恒常性の間、T r e

g は自己反応性 $T_{E F F}$ 細胞の作用を均衡させ、それにより末梢性寛容に加わっている。この工程は、 T_{reg} 対 $T_{E F F}$ の数または機能に不均衡がある 1 型糖尿病を含む多数の疾患において調節不全である。

【0121】

組成物

同様に本開示の範囲内であるのは、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤の存在下で G - C S F (または別の動員因子) によって動員される T 細胞を含む組成物である。一実施形態では、これらの組成物は、開示の T 細胞および少なくとも 1 つの抗体を含む。一実施形態では、少なくとも 1 つの抗体は、C D 4 4、C D 6 2 L、C D 4 5 R O、C C R 7、C D 4 5 R A、C D 6 2 L、C D 2 7、C D 2 8、I L - 7 R、C D 9 5、I L - 2 R、C X C R 3 および L F A - 1 に対する抗体から選択される。一実施形態では、組成物は、開示の T 細胞を人工細胞増殖培地中に含む。一実施形態では、この培地は細胞の増殖を許容する。一実施形態では、この培地は細胞分化を許容する。一実施形態では、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤は G M I - 1 2 7 1 であり、少なくとも 1 つの動員因子は G - C S F である。一実施形態では、動員は、C X C R 4 を V L A - 4 と組み合わせて遮断することによって行われる。これらの組成物の一実施形態では増強された再構成能および/または長寿命を有する末梢血ナイーブ/メモリー幹細胞(すなわち($T_N / T_{CM} / T_{SCM}$)) T 細胞は、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤の存在下で G - C S F (または別の動員因子) によって動員される C D 6 2 L^高 C C R 7 + 細胞である。一部の実施形態では、目的の T 細胞は、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤の存在下で G - C S F (または別の動員因子) によって動員される C D 8 + C D 6 2 L^高 T 細胞である。一部の実施形態では、目的の T 細胞は、C D 8 + C D 6 2 L^高 C C R 7 + T 細胞である。一実施形態では、目的の T 細胞は、ナイーブ T 細胞に特徴的な C D 4 5 R O -、C C R 7 +、C D 4 5 R A +、C D 6 2 L +、C D 2 7 +、C D 2 8 + および I L - 7 R + T 細胞コンパートメント内で見出すことができ、多量の C D 9 5、I L - 2 R、C X C R 3 および L F A - 1 を発現しており、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤の存在下で G - C S F (または別の動員因子) によって動員される。

【0122】

一実施形態では、本開示は、改変自己ヒト T 細胞の集団の抗腫瘍有効量を含む医薬組成物であって、T 細胞が、キメラ抗原受容体(C A R)をコードする核酸配列を含み、C A R - T 細胞に操作される T 細胞が、本明細書に開示の方法に従って産生される、医薬組成物を提供する。一実施形態では、C A R - T 細胞が作製された T 細胞は C D 8 + C D 6 2 L^高 T 細胞である。一実施形態では、C A R - T 細胞が作製された T 細胞は、C D 6 2 L^高 / + C C R 7 + である。一部の実施形態では、目的の T 細胞は、C D 8 + C D 6 2 L^高 C C R 7 + T 細胞である。別の実施形態では、目的の T 細胞は、ナイーブ T 細胞に特徴的な C D 4 5 R O -、C C R 7 +、C D 4 5 R A +、C D 6 2 L +、C D 2 7 +、C D 2 8 + および I L - 7 R + T 細胞コンパートメント内で見出すことができ、多量の C D 9 5、I L - 2 R、C X C R 3 および L F A - 1 を発現しており、少なくとも 1 つの E - セレクチン阻害剤の存在下で G - C S F (または別の動員因子) によって動員される。

【0123】

一実施形態では、T 細胞の抗腫瘍有効量は、そのような細胞を必要とするヒトの体重 1 k g あたり細胞 10^4 から 10^9 個である。一実施形態では、T 細胞の抗腫瘍有効量は、そのような細胞を必要とするヒトの体重 1 k g あたり細胞 10^7 から 10^8 個である。一実施形態では、T 細胞の抗腫瘍有効量は、そのような細胞を必要とするヒトの体重 1 k g あたり細胞 10^5 から 10^6 個である。

【実施例】

【0124】

I . C D 8 + C D 6 2 L^{hi} C D 4 4 + 細胞の動員の増大

次の分類を次の実験において使用した。すべての C D 8 + 細胞の中で、 $T_{ナイーブ}$ 集団は C D 6 2 L^{hi} C D 4 4⁻ であり; T_{CM} / S_{CM} 集団は C D 6 2 L^{hi} C D 4 4 + で

あり；TEM集団はCD44 + CD62⁻集団である。TCM / SCMマウス細胞集団の増加が下に観察される（図1から6を参照されたい）。

【0125】

マウスのコホート（C57bl / 6成体10週齢オス）にG-CSF（フィルグラスチム（Filgrastim）、Amgen）を注射1回あたり125ug / kg、1日2回、皮下注射で屠殺前に合計72時間にわたり投与した（非動員対照群#1は、代わりに生理食塩水注射を受けた）。

【0126】

これらのマウスにE-セレクチン模倣物アンタゴニストGMI-1271（注射1回あたり40mg / kg、1日2回腹腔内注射）を、屠殺前の特定の時点で同時投与し、最後のGMI-1271注射を、屠殺の正確に1時間前に常に行った。一般にすべてのマウスに毎日午前9時および午後6時に1群あたりn = 4で注射した。注射群は図1に概要を示し、下に詳述する。

【0127】

マウス群は：群1、非動員対照、群2、G-CSFのみの対照、群3、14時間GMI-1271、群4、24時間GMI-1271、群5、48時間GMI-1271、群6、72時間GMI-1271であった。

【0128】

3日（72時間）後、G-CSF投与マウスを安楽死投与し、心臓穿刺によって回収した血液をヘパリン処理した。全血白血球数を自動血球計数器（Beckman-Coulter KX-21）を使用して計数した。フローサイトメリーのために、Winklerら、Nature Medicine 2012年の方法論に従って赤血球を最初にアンモニウム溶解を使用して溶解し、次いで血液白血球を2%ウシ胎仔血清を含有するリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、過剰なFcBlock（内在性Fc受容体を遮断するためのCD16 / CD32ハイブリドーマ2.4G2上清）の存在下で氷上でインキュベートした。細胞を抗体CD4 - パシフィックブルー、CD8 - peCY7、CD62L - BV605、CD44 - AF700を、上のそれぞれのコンジュゲート化モノクローナル抗体0.5ugを含有する体積100uLあたり白血球およそ5百万個の最終濃度で使用して染色した。すべてのコンジュゲート化抗体はBiolegend、CAから購入した。氷上40分間インキュベーション後、細胞を過剰な抗体を除去するために洗浄した（1mL PBSの添加、370xg、5分間、4℃での遠心分離、上清の除去および2%ウシ胎仔血清を含む100uL PBS中へのペレットの再懸濁による）。細胞のフローサイトメリーを電圧およびゲーティング方針を設定するために未染色血液および単色対照を使用して8色CYAN（Beckman Coulter）で実施した。

【0129】

CD8 + T細胞サブセットをCD62およびCD44染色に基づいて分類した。日常的方法論に従い、CD8 + ナイーブT細胞はCD62hi CD44⁻、CD8 + TCM / SCM細胞はCD62hi CD44⁺二重陽性、およびTEMはCD44⁺およびCD62陰性。

【0130】

次にデータをFlow Joソフトウェアを使用して解析し、エクセルソフトウェアで照合した。図および統計はプリズムソフトウェアを使用するANOVAによった。

【0131】

II. CCR7細胞の動員の増大

方法および材料：

【0132】

1) 検査動物：

1. 種：マウス
2. 系統：Balb / CおよびC57Bl / 6
3. 年齢および性別：7 ~ 9週、メス

10

20

30

40

50

4. 供給源: Harlan Laboratories

5. 合計数: 25

【0133】

2) 検査物質:

検査物質の調製:

【0134】

粉末形態の G-CSF および GM-1271。検査薬剤は生理食塩水で再構成した。600 µg の G-CSF を 6.5 mL の滅菌生理食塩水に溶解し、濃度 92.307 µg/mL を生じた。動物に 1 時点あたり 0.1 mL の用量溶液を投与し、G-CSF についての用量濃度はマウス 1 匹、1 時点あたり 9.23 µg であった。

10

【0135】

70 mg の GM-1271 を 7 mL の滅菌生理食塩水で再構成し、濃度 10 mg/mL を生じた。動物に 1 時点あたり 0.1 mL の用量溶液を投与し、GM-1271 についての用量濃度はマウス 1 匹、1 時点あたり 1 mg であった。

3) 動物処置:

1. 動物の処置は、研究プロトコルに従い、USDA Animal Welfare Act (9 CFR Parts 1, 2 and 3) に概略される規制および Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ILAR publication, NRC, 2011, The National Academies Press) に指定される条件に順守する Noble SOP にも従った。The Noble Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) は、許容可能な標準的動物福祉および人道的ケアの遵守を保証するために完了の前に研究プロトコルを承認した。

20

【表 1】

表 1: 実験設計: 投薬および試料回収スケジュール

群#	N	処置	用量濃度	経路および体積	1日のスケジュール	血液回収および血清調製
1	5	未処置		IP/ 0.1 mL	qdX3	EDTA チューブへの全血回収。赤血球は溶解され、白血球を計数される。
2	5	生理食塩水		IP/ 0.1 mL	qdX3	
3	5	G-CSF	10 µg	IP/0.1 mL	qdX3	
4	5	GI 1271	1 mg	IP/0.1 mL	qdX3	
5	5	G-CSF + GMI-1271	10 µg / 1 mg	IP/0.1 mL	qdX3	

30

40

【0136】

5) 実験手順:

1. 末梢血単核細胞 (PBMC) の調製:

50

P B M Cを精製するために全血中の赤血球 (R B C)をA C K溶解緩衝液 (L i f e T e c h n o l o g i e s、A 1 0 4 9 2 0 1)を使用して溶解した。全血をA C K溶解緩衝液と比 1 : 2 5で混合し、室温、振とう機上で5分間インキュベートした。細胞を350g、7分間遠心分離し、上清を廃棄した。精製P B M Cを2% F B Sを含有するP B S中に懸濁した。細胞計数を実施し、250×gで10分間ペレットにし、Ca²⁺およびMg²⁺ (L i f e T e c h n o l o g i e sカタログ# 1 4 0 2 5 - 0 9 2)に加えて、0.05%ウシ血清アルブミン (B S A)を含有する5ml H B S S中に抗体染色のために細胞2~3×10⁶個/mLで懸濁した。

2. 抗体染色

チューブ (5 mLポリプロピレン丸底チューブ (B D F a l c o nチューブ# 3 5 2 0 6 3、V W Rカタログ# 6 0 8 1 9 - 7 2 8)) 1本あたり細胞100ul (細胞2~3×10⁵個)を加える。表示の量のA l e x a F l u o r 4 8 8 (登録商標)標識抗体を表3に示すとおり加え、直ちに氷上に置く。

チューブを4、1時間置き、次いで冷H B S S / B S A 2 mLを各チューブに加え、細胞250×g、10分間ペレットにする。上清を捨て、細胞ペレットを1 mL冷H B S S / B S A中に懸濁する。細胞を250×g、10分間ペレットにし、上清を捨て、細胞ペレットを250マイクロリットルH B S S / B S A中に懸濁する。250マイクロリットル2%ホルムアルデヒド (P o l y s c i e n c e s , I n c .カタログ# 0 4 0 1 8、10%ultrapure、EMグレード、メタノール不含有)を加える。フローサイトメトリーに進む。

3. フローサイトメトリー

蛍光は、A t t u n e (登録商標) N x T A c c o u s t i c F o c u s i n g C y t o m e t e r (L i f e T e c h n o l o g i e s)に備えられたプリセットレーザーを使用して530nmでの発光を伴う488nmでの青色レーザー励起を介して取得した。2×10⁴の事象を各試料について回収し、A t t u n e (登録商標) N x T C y t o m e t r i c S o f t w a r e v 2 . 1を使用して分析した。結果は、蛍光強度中央値、所与のマーカーについての%細胞陽性としておよび特異的マーカーを発現している1 mLあたりの細胞濃度として記録した。

【表2】

表 3.抗体染色指針

抗体	供給源	量
抗マウス CCR7 クローン 4B12	Biolegend 120110	1 マイクログラム
抗マウス CD62L クローン MEL14	Biolegend 104420	0.25 マイクログラム
抗マウス/ヒト CD44 クローン IM7	Biolgend 103016	1 マイクログラム
抗マウス CD4 クローン GK1.5	Biolegend 100423	0.05 マイクログラム
抗マウス CD8 クローン 53-6.7	Biolegend 100723	0.25 マイクログラム
IgG2bk アイソタイプ対照クローン RTK4530	Biolegend 400625	0.25 マイクログラム
IgG2ak アイソタイプ対照クローン RTK2758	Biolegend 400525	0.25 マイクログラム

【0137】

これらの実験は、B a l b / c (上表) およびB L 6 (下表) マウス系統の両方において行われた。結果は、両方の系統においてG - C S FへのG M I - 1 2 7 1の添加がC C

R 7 + 細胞の動員を増大させることを示している。

【表 3】

群	合計細胞 /mL ($10^6 \pm \text{SD}$)	細胞/mL(10^3)				
		CD4	CD8	CD44	CD62L	CCR7
ナীব	1.42 ± 0.34	2.20	0.67	6.76	1.22	1.99
生理食塩水	1.51 ± 0.13	3.00	0.98	7.64	1.45	2.76
G-CSF	2.67 ± 0.64	3.43	1.32	14.88	1.59	4.00
GMI-1271	1.01 ± 0.46	1.56	0.49	4.76	0.74	1.68
G-CSF + GMI-1271	4.31 ± 2.16	7.07	2.35	21.76	2.33	6.80

10

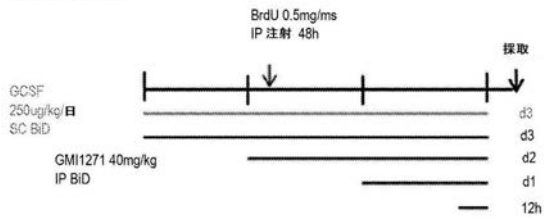
【表 4】

群	合計細胞 /mL ($10^6 \pm \text{SD}$)	細胞/mL(10^3)				
		CD4	CD8	CD44	CD62L	CCR7
ナীব	0.97 ± 0.10	0.37	1.08	1.67	0.10	0.10
生理食塩水	1.47 ± 0.59	0.46	1.91	3.14	0.21	0.21
G-CSF	5.98 ± 2.25	1.10	10.00	12.65	0.09	0.60
GMI-1271	1.89 ± 0.40	0.43	1.74	3.56	0.19	0.23
G-CSF + GMI-1271	5.06 ± 0.78	1.07	3.73	8.18	0.10	2.78

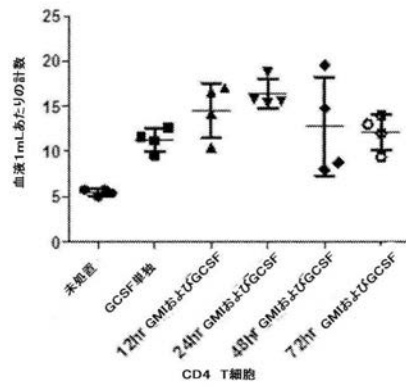
20

【 図 1 】

Figure 1. 実験概要



【 図 2 】

Fig 2. 血液 1 µL あたりの全白血球 ($\times 10^3$)

【 図 4 】

Fig 4A. 血液 1 µL あたりの CD4+T 細胞

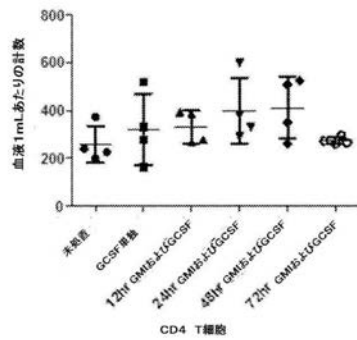
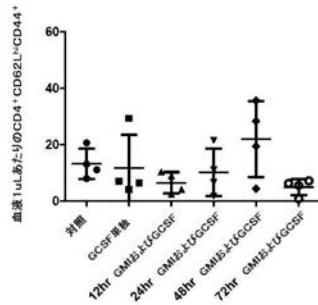
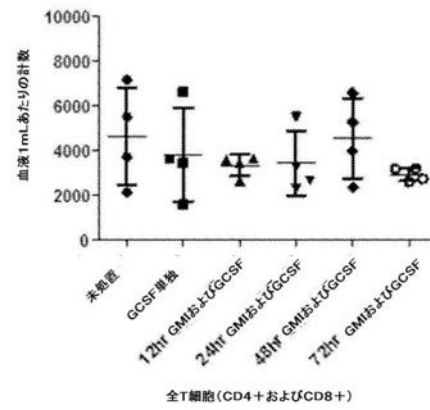


Fig 4B. 血液 1 µL あたりの CD44hi CD62hi CD4+T 細胞



【 図 3 】

Fig 3. 血液 1 µL あたりの全 T 細胞 (CD4+ および CD8+ 組合せ)



【 図 5 】

Fig 5A. 血液 1 µL あたりの CD8+T 細胞

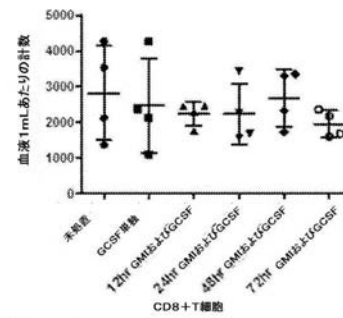
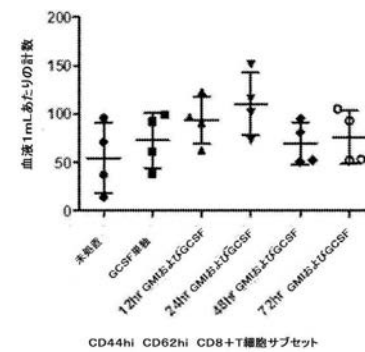


Fig 5B. 血液 1 µL あたりの CD44hi CD62hi CD8+T 細胞



【図 6】

Fig. 6A 血液 1 μ LあたりのCD4+CD62L^{hi}T細胞

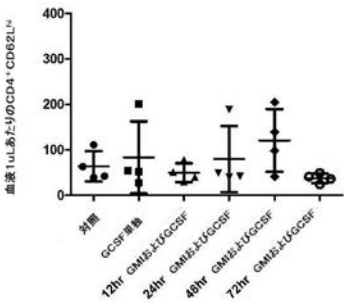
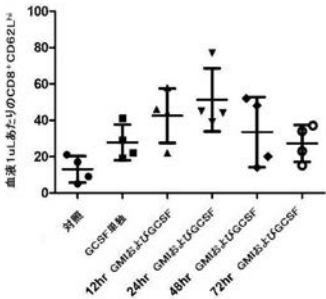


Fig. 6B 血液 1 μ LあたりのCD8+CD62L^{hi}T細胞



【図 7 - 1】

Fig. 7 マーカー

図 7***	
免疫細胞集団細胞表面マーカー	
免疫細胞集団	集団をゲーティングするための 例示的細胞表面マーカー ¹
T細胞系列	
T細胞	CD3+, CD14-
T ヘルパー ²	CD4+
T ヘルパー エフェクター	CD62L 低 (またはCD27)
メモリー	CD45RA 高 CD45RA 低
T ヘルパー セントラル	CD62L 高 (またはCD27)
メモリー	CD45RA 低
T ヘルパー エフェクター	CD62L 低 (またはCD27)
T ヘルパー ナイーブ	CD45RA 高 CD62L 高 (またはCD27)
T細胞系列	
T cyto	CD8+
T cyto エフェクター	CD62L 低 (またはCD27)
メモリー	CD45RA 低
T cyto	CD62L 高 (またはCD27)
セントラル	CD45RA 低
メモリー	CD62L 低 (またはCD27)
T cyto エフェクター	CD45RA 高 CD62L 高
T細胞系列	
ナイーブ	(またはCD27) CD45RA 高
Treg6	CD4+Foxp3 +

【図 7 - 2】

図 7***	
免疫細胞集団細胞表面マーカー	
免疫細胞集団	集団をゲーティングするための 例示的細胞表面マーカー ¹
Treg	CD25+, CD25-
CD25+	
または -	
Treg	Helios+,
Helios	Helios-
非T系列	CD3-
B細胞	
ナイーブ	CD14-,
B細胞	CD20+
CD27+	CD27-
B細胞	CD27+
CD27+	
メモリー	IgD+
B細胞	
NK 細胞	CD19-,
	CD14-,
	CD20-,
	CD56+
CD56 暗	CD56 暗
NK 細胞	
T細胞系列	
CD56 明	CD56 明
NK 細胞	
非T系列	CD3-
単球	
樹状細胞	CD20-,
(DC)	CD14+
	CD20-,
	CD19-,
	CD14-,
T細胞系列	
形質細胞様	HLA-DR+,
	CD123+,

【図 7 - 3】

図 7***	
免疫細胞集団細胞表面マーカー	
免疫細胞集団	集団をゲーティングするための 例示的細胞表面マーカー ¹
DC	CD11c-
(pDC)	
骨髄性	CD123-
DC (mDC)	CD11c+

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/45139
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 35/17, C12N 5/0783 (2016.01) CPC - A61K 35/28, A61K 35/17, C12N 5/0636 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 35/17, C12N 5/0783 (2016.01) CPC - A61K 35/28, A61K 35/17, C12N 5/0636 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar Search terms: T-cell, T cell, T lymphocyte, G-CSF, GCSF, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte-colony stimulating factor, E-selectin, inhibitor, antagonist, mobilize, migrate, CD62L, CCR7, CD8, CD44, naive, central memory, hematopoietic stem cell		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	BERGER et al., Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. J Clin Invest. January 2008, Vol 118, No 1, pp 294-305. Especially abstract; p 294, col 1, para 2	6 ----- 1-3, 7-8
Y	WINKLER et al., Mobilisation of Reconstituting HSC Is Boosted By Synergy Between G-CSF and E-Selectin Antagonist GMI-1271. 2014, Blood Abstracts & Meeting Program, 56th ASH Annual Meeting, Vol 124, No 21, page 317 (pp 1-5) [online]. [Retrieved on 28 September 2016]. Retrieved from the internet <URL: http://www.bloodjournal.org/content/124/21/317 > Especially p 2, para 1; p 2, para 2	1-3, 7-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 September 2016		Date of mailing of the international search report 24 OCT 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/45139

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-5 and 9-29
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

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 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
	C 1 2 N 5/0783	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 マグナニ , ジョン エル .

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 8 , ゲーサーズバーグ , ドウ レーン 1 2 8 1 9

(72)発明者 ウィンクラー , イングリッド ジー .

オーストラリア国 4 1 0 5 クイーンズランド , イェーロングビリー , グリーン ストリート 1 4

F ターム(参考) 4B065 AA90X BA30 BD28 BD29 BD32 BD34 BD35 BD39 CA44
 4C084 AA02 AA20 DA19 NA14 ZB07 ZB08 ZB21 ZB26 ZB35 ZC41
 ZC75
 4C086 AA01 AA02 EA09 MA02 MA04 NA14 ZB07 ZB09 ZB21 ZB26
 ZB35 ZC41 ZC75
 4C087 AA01 AA02 BB43 BB64 MA02 NA14 ZB07 ZB08 ZB21 ZB26
 ZB35 ZC41 ZC75