

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7653759号  
(P7653759)

(45)発行日 令和7年3月31日(2025.3.31)

(24)登録日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	31/436 (2006.01)	A 6 1 K	31/436
A 6 1 K	35/14 (2015.01)	A 6 1 K	35/14
A 6 1 K	35/26 (2015.01)	A 6 1 K	35/26
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28

F I

請求項の数 18 (全70頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-537803(P2018-537803)  
 (86)(22)出願日 平成29年1月20日(2017.1.20)  
 (65)公表番号 特表2019-502725(P2019-502725  
 A)  
 (43)公表日 平成31年1月31日(2019.1.31)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/014449  
 (87)国際公開番号 WO2017/127755  
 (87)国際公開日 平成29年7月27日(2017.7.27)  
 審査請求日 令和2年1月17日(2020.1.17)  
 審判番号 不服2023-5(P2023-5/J1)  
 審判請求日 令和5年1月4日(2023.1.4)  
 (31)優先権主張番号 62/281,064  
 (32)優先日 平成28年1月20日(2016.1.20)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

最終頁に続く

(73)特許権者 312000284  
 フェイト セラピューティクス, インコ  
 ーポレイテッド  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9  
 2 1 3 1 サン ディエゴ スクリップス  
 サミット ドライブ 1 2 2 7 8  
 (74)代理人 110001656  
 弁理士法人谷川国際特許事務所  
 ローゼン, ジョナサン  
 (72)発明者 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2  
 1 2 1, サン ディエゴ、ジェネラル ア  
 トミクス コート 3 5 3 5、スイート  
 2 0 0 フェイト セラピューティクス,  
 インコ-ボレイテッド内  
 レズナー, ベツィ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 養子免疫療法における免疫細胞調節のための組成物および方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

T 細胞の集団と、2種以上の薬剤を含む組成物であって、該2種以上の薬剤が、  
 (i) ラバマイシン；並びに  
 (ii) d m P G E 2 又はその類似体もしくは誘導体であって、P G E 2、1 6 , 1 6 - ジ  
 メチル P G E 2 p - ( p - アセタミドベンズアミド ) フェニルエステル、1 1 - デオキシ  
 - 1 6 , 1 6 - ジメチル P G E 2 、9 - デオキシ - 9 - メチレン - 1 6 , 1 6 - ジメチル  
 P G E 2 、9 - デオキシ - 9 - メチレン P G E 2 、9 - ケトフルプロステノール、5 - ト  
 ランス P G E 2 、1 7 - フェニル - オメガ - トリノル P G E 2 、P G E 2 セリノールアミド  
 、P G E 2 メチルエステル、1 6 - フェニルテトラノル P G E 2 、1 5 ( S ) - 1 5 - メ  
 チル P G E 2 、1 5 ( R ) - 1 5 - メチル P G E 2 、8 - イソ - 1 5 - ケト P G E 2 、8 -  
 イソ P G E 2 イソプロビルエステル、8 - イソ - 1 6 - シクロヘキシリル - テトラノル P G  
 E 2 、2 0 - ヒドロキシ P G E 2 、2 0 - エチル P G E 2 、1 1 - デオキシ P G E 1 、ノク  
 ロプロスト、スルプロストン、ブタプロスト、1 5 - ケト P G E 2 、及び 1 9 ( R ) ヒド  
 ロキシ P G E 2 からなる群から選択されるもの  
 を含み、

前記2種以上の薬剤は、T細胞と接触すると、改善された治療可能性を有する調節され  
 たT細胞を生じ、

前記T細胞の集団は、(a)キメラ抗原受容体(CAR)をコードする外来核酸を含み、(b)  
 ) C D 4 又は C D 8 を発現するT細胞を含む、

組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の組成物であって、

(a) 前記 2 種以上の薬剤が、

- (i) T 細胞拡大、維持、分化、脱分化、及び / 又は生存率を改善し；
- (ii) T 細胞増殖、細胞毒性、持続性、サイトカイン応答及び分泌、ならびに / 又は細胞リコールを改善し；ならびに / 又は
- (iii) T 細胞に接触すると 1 つもしくは複数の所望される免疫細胞亜集団の数又は割合を増大する、

ことができる薬剤であり、又は、

(b) 前記組成物が 1 つ又は複数の添加剤をさらに含む、

組成物。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の組成物であって、以下の特徴のうち少なくとも一つを有する組成物。

(a) 1 つ又は複数の所望される亜集団の数又は割合の増大が：

- (i) ナイーブ T 細胞、幹細胞メモリー T 細胞、及び / もしくはセントラルメモリー T 細胞；
- (ii) 少なくとも 1 つの遺伝子的に修飾されたモダリティ；及び / 又は
- (iii) 前記 CAR をコードする外来核酸を含む T 細胞；  
の数又は割合の増大を含む。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の組成物であって、以下の特徴のうち少なくとも一つを有する組成物。

(b) 前記 T 細胞集団の T 細胞は、

- (A) ゲノム的に操作され、挿入、欠失、もしくは核酸置換を含む；
- (B) 少なくとも 1 つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む；又は
- (C) T 細胞受容体 (TCR) をコードする外来核酸を含む。

【請求項 5】

請求項 2 に記載の組成物であって、以下の特徴のうち少なくとも一つを有する組成物。

(c) 前記 T 細胞集団の T 細胞は、遺伝子的に修飾されたモダリティを含み、該遺伝子的に修飾されたモダリティが、セーフティスイッチタンパク質、ターゲティングモダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、医薬的に有効なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補；又は前記免疫細胞の生着、輸送、ホーミング、バイアビリティー、自己再生、持続性、免疫応答制御及び調節、ならびに / もしくは生存を促進するタンパク質の少なくとも 1 つを含む。

【請求項 6】

請求項 2 に記載の組成物であって、以下の特徴のうち少なくとも一つを有する組成物。

(d) 前記 T 細胞集団の T 細胞は、遺伝子的に修飾されたモダリティを含み、該少なくとも一つの遺伝子的に修飾されたモダリティが、

(i) 欠失もしくは低減した発現の B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PDI1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITA、RFX5、又はRFXAP、及び染色体 6 p 2 1 領域中の任意の遺伝子；ならびに

(ii) 誘導されたもしくは増大した発現の HLA-E、HLA-G、HACD16、hncD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、Fc受容体、又は二重もしくは多特異性又は普遍的エンゲイジャーとのカップリングのための表面トリガー受容体の 1 つ又は複数を含む。

【請求項 7】

請求項 2 に記載の組成物であって、以下の特徴のうち少なくとも一つを有する組成物。

(e) 前記組成物が、ラパマイシン及び dmpGE2 を含む。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

請求項 2 に記載の組成物であって、以下の特徴のうち少なくとも一つを有する組成物。

(f) 前記一つ又は複数の添加剤が：

(i) ジメチルスルホキシド (DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメトキシエタン (DME)、ジメチルアセトアミド、エタノール及びその組み合わせからなる群から選択される少なくとも 1 つの有機溶媒；

(ii) ペプチド、抗体、抗体フラグメント、サイトカイン、マイトジエン、成長因子、スマート RNA、dsRNA、単核血液細胞、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分もしくは置換因子、対象となる 1 つもしくは複数のポリ核酸を含むベクター、化学療法剤もしくは放射性部分、及び免疫調節薬 (IMiD) の少なくとも一つ；及び / 又は

(iii) IL2、IL15、IL12、IL18 及び IL21 を含む刺激性サイトカインの少なくとも一つ、を含む。

【請求項 9】

ドルソモルフィン、ヘプテリジン酸、1-ピロリジンカルボジチオ酸、2-デオキシグルコース(2-DG)、BIO、TWS119、CHIR99021、チアゾビビン、PD0325901、U0126、PS48、SB431542、6-メルカプトブリン、AC-93253ヨウ化物、チラトリコール、PI-103、フルベストラント、タブシガルジン、SU4312、テルミサルタン、サイクロスボリン A、1,3,5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール、BAY61-3606、ブロトポルフィリンIXナトリウム、HS173、LY294002、ピクチリシブ、5-アザシチジン、フルダラビン、ロスコビチン(S)-異性体、PAC-1、5,7-ジクロロ-8-ヒドロキシキノリン、ニトロフラントイン、5-クロロ-7-ヨード-8-キノリノール、Cas No. 64-73-3、ニフロキサジド、トスフロキサシン塩酸塩、セルトラリン、ジエチレントリアミンペニタ酢酸、塩化エドロホニウム、BIX01294 及びテルフェナジンから成る群より選ばれる 1 つ又は複数の薬剤をさらに含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 10】

T 細胞の集団と、2 種以上の薬剤を含む十分な量の組成物とを生体外で接触させることを含む、T 細胞集団の調節方法であって、前記 2 種以上の薬剤が、

(i) ラバマイシン；及び

(ii) dPG E 2 又はその類似体もしくは誘導体であって、PG E 2、16,16-ジメチルPG E 2 p-(p-アセタミドベンズアミド)フェニルエステル、11-デオキシ-16,16-ジメチルPG E 2、9-デオキシ-9-メチレン-16,16-ジメチルPG E 2、9-デオキシ-9-メチレンPG E 2、9-ケトフルプロステノール、5-トランスPG E 2、17-フェニル-オメガ-トリノルPG E 2、PG E 2セリノールアミド、PG E 2メチルエステル、16-フェニルテトラノルPG E 2、15(S)-15-メチルPG E 2、15(R)-15-メチルPG E 2、8-イソ-15-ケトPG E 2、8-イソPG E 2イソプロピルエステル、8-イソ-16-シクロヘキシル-テトラノルPG E 2、20-ヒドロキシPG E 2、20-エチルPG E 2、11-デオキシPG E i、ノクロプロスト、スルプロストン、ブタプロスト、15-ケトPG E 2、及び 19(R)ヒドロキシPG E 2 からなる群から選択されるもの

を含み、

前記 T 細胞の集団は、(a)キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外来核酸を含み、(b) CD4 又は CD8 を発現する T 細胞を含む、

改善された治療可能性を有する調節された T 細胞集団を得る、方法。

【請求項 11】

1 つ又は複数の所望される亜集団を、前記調節された T 細胞集団から単離することを更に含む、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 つ又は複数の所望される亜集団が、ナイーブ T 細胞、幹細胞メモリー T 細胞、及び / もしくはセントラルメモリー T 細胞を含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

請求項 10 記載の方法であって、前記接触の前の前記 T 細胞集団の T 細胞が、

10

20

30

40

50

- (a) 末梢血、骨髓、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、もしくは腫瘍から単離されるか、又はそれに含まれる；
- (b)
- (i) 健常対象；
  - (ii) 自己免疫疾患、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染症もしくは固形腫瘍を有する対象；
  - (iii) 遺伝子的に修飾された免疫細胞を既に投与された対象；又は
  - (iv) CMV 血清陽性である対象；
- から単離される；
- (c) ゲノム的に操作され、挿入、欠失、もしくは核酸置換を含むか、又は、少なくとも 1 つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む；
- (d) 少なくとも 1 つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む；
- (e) T 細胞受容体 (TCR)、及び / 又はキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外来核酸を含む；
- (f) 幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、又は前駆細胞から試験管内で分化する；及び / 又は、
- (g) 造血系又は非造血系の非多能性細胞から試験管内で分化転換する、方法。

【請求項 14】

請求項 13 記載の方法であって、

- (a) 前記幹細胞が、誘導された多能性幹細胞 (iPSC) 又は胚性幹細胞 (ESC) を含む、
- (b) 前記前駆細胞が、CD34+ 造血性内皮細胞、多能性前駆細胞、T 細胞前駆細胞である；
- (c) 前記幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、又は前駆細胞が、
- (i) ゲノム的に操作され、挿入、欠失、もしくは核酸置換を含む、
  - (ii) 少なくとも 1 つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む、又は
  - (iii) T 細胞受容体 (TCR)、及び / 又はキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外来核酸を含む；
- (d) 前記遺伝子的に修飾されたモダリティが、セーフティスイッチタンパク質、ターゲティングモダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、医薬的に有効なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補；又は前記免疫細胞の生着、輸送、ホーミング、バイアビリティー、自己再生、持続性、免疫応答制御及び調節、ならびに / もしくは生存を促進するタンパク質の少なくとも 1 つを含む；又は

- (e) 前記遺伝子的に修飾されたモダリティが、
- (i) 欠失もしくは低減した発現の B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PDI、LAG3、TIM3、RFXANK、CITA、RFX5、又はRFXAP、及び染色体 6p21 領域中の任意の遺伝子；ならびに
  - (ii) 誘導されたもしくは増大した発現の HLA-E、HLA-G、HACD16、hncD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、Fc受容体、又は二重もしくは多特異性又は普遍的エンゲイジャーとのカップリングのための表面トリガー受容体の 1 つ又は複数を含む、

方法。

【請求項 15】

請求項 10 記載の方法であって、調節された T 細胞の集団が、組成物と接触させられない、調節されていない T 細胞の集団と比較して、

- (a) CD27、CCR7、CD62L、TCF7 及び LEF1 の少なくとも 1 つにおける増大した遺伝子発現；
- (b) 増大した予備呼吸容量 (SRC)；
- (c) 増大したセントラルメモリー T 細胞亜集団；

10

20

30

40

50

(d) 低減したエフェクターT細胞亜集団；  
 (e) 改善された拡大及びバイアビリティー；ならびに  
 (f) 腫瘍クリアランス及び持続性における改善された能力、  
 の少なくとも1つを有する、方法。

【請求項16】

前記組成物が、ドルソモルフィン、ヘプテリジン酸、1-ピロリジンカルボジチオ酸、2-デオキシグルコース(2-DG)、BIO、TWS119、CHIR99021、チアゾビビン、PD0325901、U0126、PS48、SB431542、6-メルカプトブリン、AC-93253ヨウ化物、チラトリコール、PI-103、フルペストラント、タブシガルジン、SU4312、テルミサルタン、サイクロスボリンA、1,3,5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール、BAY61-3606、プロトポルフィリンIXナトリウム、HS173、LY294002、ピクチリシブ、5-アザシチジン、フルダラビン、ロスコビチン(S)-異性体、PAC-1、5,7-ジクロロ-8-ヒドロキシキノリン、ニトロフラントイン、5-クロロ-7-ヨード-8-キノリノール、Cas No. 64-73-3、ニフロキサジド、トスフロキサシン塩酸塩、セルトラリン、ジエチレントリアミンペント酢酸、塩化エドロホニウム、BIX01294及びテルフェナジンから成る群より選ばれる1つ又は複数の薬剤をさらに含む、請求項10記載の方法。

【請求項17】

請求項10～16のいずれか1項に記載の方法により、調節されたT細胞の集団を作製することを含む、治療組成物の製造方法。

【請求項18】

- (a) 前記組成物が、ラパマイシン及びd m P G E 2の組み合わせを含み；並びに/又は  
 (b) 調節されたT細胞集団のT細胞が、調節されていないT細胞と比較して、以下の少なくとも1つを有する、請求項10～16のいずれか1項に記載の方法。  
 (i) CD27、CCR7、CD62L、TCF7及びLEF1の少なくとも1つにおける増大した遺伝子発現；  
 (ii) 増大した予備呼吸容量(SRC)；  
 (iii) 増大したセントラルメモリーT細胞亜集団；  
 (iv) 低減したエフェクターT細胞亜集団；及び  
 (v) 腫瘍クリアランス及び持続性における改善された能力。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2016年1月20日に出願された米国仮出願第62/281,064号、および2016年9月30日に出願された米国仮出願第62/402,883号の優先権を主張し、その開示は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、養子免疫細胞療法の分野と広く関係する。より具体的には、本開示は、養子細胞療法に適した免疫細胞を調節するための小分子の使用と関係する。

【背景技術】

【0003】

養子免疫療法は、癌、腫瘍、または感染症を有する患者への免疫細胞の投与を含み、これにより、投与された免疫細胞が、患者に治療効果をもたらす。一般的に言うと、免疫療法に適した免疫細胞は、B細胞、樹状細胞(DC)、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、NKT(ナチュラルキラーT)細胞、および造血幹細胞または造血前駆細胞を含むが、これらに限定されない。患者において完全かつ永続的な疾患応答を仲介することは、これらの細胞ベースの免疫療法の中心となる目標である。

【0004】

CAR-T細胞、TCR-T細胞、ウイルス特異的T細胞(VST)および腫瘍浸潤T細胞(TIL)を含むが、これらに限定されない、養子T細胞療法の有効性の背景にある

10

20

30

40

50

生物学的機序の我々の理解の進歩は、導入されたT細胞と関連するある種の特性の重要性を明確に示し、宿主、および癌の処置の成功のため克服されることを必要とする腫瘍細胞により引き起こされる阻害バリアの複雑さを明らかにした。T細胞因子の中で、T細胞受容体（T C R）またはキメラ抗原受容体（C A R）の結合活性、増殖および生存能力、腫瘍部位への遊走、ならびに腫瘍内でエフェクター機能を持続する能力は、相関研究において、悪性細胞の根絶の引き金を引くための重大な決定要因であることが示された。しかしながら、別の階層の複雑さに加えて、これらの望ましい特性のいくつかは認識されたが、これらの特性をもたらす経路またはプレーヤーはまだ不明確であり、それが、人の、介入する能力、ならびにそれらの治療上の使用のため所望される量および質を有する細胞を得る能力を制限する。

10

#### 【 0 0 0 5 】

C A R - T 細胞療法を例として使用すると、療法は、C A R - T 能力および持続性、腫瘍への遊走、免疫抑制腫瘍微小環境、腫瘍不均一性、および患者の安全性を含む複数の課題を克服しなければならない。これらの課題を克服するために、複数のアプローチが適用されている。例えば、特異的T細胞サブセットを、治療上の使用のため選択し、C A Rのさらなる操作を使用して、腫瘍ターゲティング、C A R能力、および的中した / 腫瘍を離れた安全性の問題が改善されてもよい。しかしながら、C A R - T 持続性および遊走を含む、C A R - T 治療能力の改善は、解消されるべきままである。T細胞療法の生体内有効性は、プロセスまたは原料に入れるT細胞の開始集団と、利用される生体外拡大および活性化方法の両方に依存性である製造プロセスにより、強く影響され得ることが示されている。投与されたT細胞の分化状態は、生体内持続性および抗腫瘍活性に有意に影響し得ることが示されている。Tヘルパー（C D 4<sup>+</sup> T細胞）ならびに細胞傷害性T細胞（C D 8<sup>+</sup>）、具体的には、C C R 7 および C D 6 2 L マーカーの発現により特徴付けられる、ナイーブ（T n）、幹細胞メモリー（T s c m）ならびにセントラルメモリー（T c m）T細胞は、マウスモデルにおいて（Sommermeyer et al. 2015）、と非ヒト靈長類モデルにおいて（Berger et al. 2008）の両方で優れた抗腫瘍活性を仲介する。

20

#### 【 0 0 0 6 】

製造プロセス中に、治療細胞（または細胞集団）は、典型的には活性化され、拡大される。このプロセスは、一般的に、細胞の分化をもたらし、より分化した状態にある細胞の割合の増大につながり、T細胞の場合、より分化した細胞は、エフェクターメモリーまたはエフェクターT細胞として表現型の上で特徴付けられる。患者に注入されると、これらのより分化した細胞は、より少なく分化した状態にある細胞と比較して、より低い増殖する能力、およびより低い、長期間生存するかまたは持続する集団として持続する能力を有する。したがって、所望される免疫細胞サブセットを維持し、拡大するのに有用な組成物および方法だけでなく、拡大中に細胞分化を低減し、細胞をより少なく分化した細胞に脱分化させ、これにより、様々な養子免疫療法の有効性を改善するために、より高い増殖し、持続する能力を有し、持続する所望される免疫細胞サブセットを得ることも、当該技術分野において、急ぎ必要である。

30

#### 【 0 0 0 7 】

同様の有効性の問題は、N K 細胞ベースの療法において同じく存在する。ナチュラルキラー細胞は、比較的短期間生存するとして特徴付けられ、刺激への二次的曝露に応答して最小の変化を提示し、すなわち、制限された標的メモリー応答を提示する固有の免疫細胞として伝統的に分類された。しかしながら、近年の研究が、自己寛容および持続するN K 細胞活性を含む重要な役割を果たす活性化するN K 細胞受容体と阻害性N K 細胞受容体の両方についての情報を明らかにした。データは、周辺環境に容易に順応し、同じ抗原への二次的曝露に応答するための基本である抗原特異的免疫記憶を編成する、N K 細胞の能力を示した。現在養子N K 細胞またはメモリーN K 細胞と呼ばれる、N K 細胞の亜集団が、幾つかのグループにより同定された。これらの細胞は、より長期間生存すること、および初回曝露後に刺激への増強された応答を有することを含む、C D 8<sup>+</sup> T細胞に類似する多

40

50

くの機能的特徴を有する。これらの特性は、基準のNK細胞と比較して、より有効な細胞療法ストラテジーをもたらし得る。生体内での永続的な抗原特異的認識を仲介する養子/メモリーNK細胞の拡大および維持は、NK細胞ベースの養子免疫療法の改善の鍵となるだろう。

#### 【0008】

さらに、TおよびNK細胞の様に、改善された細胞療法を生じるための調節の標的とされ得る、自然免疫系と養子免疫系の両方において役割を果たすCD1d拘束性T細胞の一種である、より有効なNKT細胞を単離するための改善が成され得ることが考えられる。

#### 【0009】

患者に入れられる細胞の最終的な状態、または具体的には、細胞サブタイプは、製造プロセスにより大部分において規定され得るので、そのプロセスの重要性を誇張し過ぎることはない。細胞培養および拡大中に、所望される分化状態、ならびに/もしくは養子免疫細胞特徴を有する細胞亜集団を優先的に維持または拡大することは、細胞ベースの療法の有効性を増強するのに極めて有益であり得る。したがって、所望されるT、NKまたはNKT細胞サブセットを量と質の両方で増強することができる製造アプローチは、それらの治療有効性の有意な強化をもたらし得る。

10

#### 【0010】

当該技術分野において、改善された治療有効性を有する免疫細胞サブセットが実質的に必要である。しかしながら、治療免疫細胞のある種の望ましい特性が公知である一方、これらの特性を達成するのに関与する経路および/またはプレーヤーは、多くが未知である。本発明の方法および組成物は、免疫細胞療法の分野において、これらの要求に対処し、他の関連する利点をもたらす。

20

#### 【発明の概要】

#### 【0011】

本発明は、免疫細胞の1つもしくは複数の集団または亜集団を、養子免疫療法のそれらの治療可能性を改善するために調節するための組成物および方法を提供する。例えば、より良好な免疫療法結果をもたらすことが予想される以下の性質：遊走、ホーミング、細胞毒性、維持、拡大、持続性、寿命延長、所望される状態の分化の少なくとも1つにおける改善を提示する細胞の亜集団の数もしくは割合を増大させることにより、治療免疫細胞の増殖、持続性、細胞毒性、および/または細胞リコール/メモリーを改善するための単独あるいは組み合わせのいずれかで、1つあるいは複数の化合物を提供することが、本発明の目的である。

30

#### 【0012】

本発明の1つの態様は、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物を提供し、組成物は、表1において挙げられる化合物：ドルソモルフィン；ヘプテリジン酸；1-ピロリジンカルボジチオ酸、アンモニウム塩；2-デオキシグルコース(2-DG)；GSK3阻害剤；Rhodokinase阻害剤；MEK阻害剤；PDK1アゴニスト；TGF阻害剤；6-メルカプトプリン；AC-93253ヨウ化物；チラトリコール；PI-103；フルベストラント；タブシガルジン；SU4312；テルミサルタン；サイクロスボリンA；1,3,5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール；BAY61-3606；プロトポルフィリンIX二ナトリウム；mTOR阻害剤；HS173；LY294002；ピクチリシブ；5-アザシチジン；フルダラビン；ロスコビチン、(S)-異性体；PAC-1、8-キノリノール、5,7-ジクロロ-；ニトロフラントイン；8-キノリノール、5-クロロ-7-ヨード-；2-ナフタセンカルボキサミド，7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-オクタヒ；ニフロキサジド；トスフロキサシン塩酸塩；セルトラリン；ジエチレントリアミンペニタ酢酸、ペニタナトリウム；塩化エドロホニウム；BIX01294；テルフェナジン；およびdmpGE2からなる群から選択される1つまたは複数の薬剤を含む。表1において挙げられる化合物からなる群から選択される1つまたは複数の薬剤は、1つもしくは複数の薬剤を使用した免疫細胞の調節を介して、

40

50

免疫細胞あるいはその1つまたは複数の亜集団の治療可能性を改善する。幾つかの実施形態において、免疫細胞の調節は生体外でである。

【0013】

幾つかの実施形態において、表1において挙げられる化合物の1つまたは複数は、細胞拡大、維持、および/または分化を調節し、これにより、免疫細胞、またはその1つもしくは複数の亜集団の増殖、細胞毒性、サイトカイン応答および分泌、細胞リコール、ならびに/あるいは持続性を改善する。

【0014】

1つの実施形態において、表1において挙げられる化合物の1つまたは複数は、生体外と生体内の両方で、免疫細胞、またはその1つもしくは複数の亜集団の細胞生存率を改善する。

10

【0015】

1つの実施形態において、表1において挙げられる化合物の1つまたは複数は、免疫細胞の1つまたは複数の所望される細胞亜集団の割合を増大する。

【0016】

幾つかの実施形態において、本発明は、T、NKおよびNKT細胞を含むが、これらに限定されない、免疫細胞の集団もしくは亜集団の治療効果を改善するための1つまたは複数の選択された薬剤を本明細書において提供する。幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞免疫細胞は、T細胞、NKT細胞、またはNK細胞を含む。幾つかの実施形態において、処置の対象となる免疫細胞はT細胞を含み、したがって、1つまたは複数の所望される細胞亜集団は、ナイーブT細胞、幹細胞メモリーT細胞、および/またはセントラルメモリーT細胞を含む増大した割合を有する。幾つかの実施形態において、薬剤を使用した処理の対象となる免疫細胞は、NKT細胞を含み、したがって、1つまたは複数の所望される細胞亜集団は、タイプI NKT細胞を含む増大した割合を有する。幾つかの他の実施形態において、薬剤を使用した処理の対象となる免疫細胞は、NK細胞を含み、ここで、1つまたは複数の所望される細胞亜集団は、養子NK細胞を含む増大した割合を有する。

20

【0017】

幾つかの実施形態において、組成物は、表1において挙げられる、化合物、またはその誘導体、類似体もしくは医薬的に許容される塩からなる群から選択される1つあるいは複数の薬物を含む。化合物、またはその誘導体、類似体もしくは医薬的に許容される塩は、表1の化合物のエステル、エーテル、溶媒和物、水和物、立体異性体、およびプロドラッギングをさらに含む。

30

【0018】

幾つかの実施形態において、免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群Iから選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに群II、群III、群IV、および/もしくは群Vから選択される1つまたは複数の薬剤を含む。

【0019】

群Iは、ドルソモルフィン、ヘプテリジン酸、1-ピロリジンカルボジチオ酸、および2-DGを含む。理論に制限されるものではないが、群Iの薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、細胞代謝および栄養素センシングに影響を及ぼす。

40

【0020】

群IIは、GSK3阻害剤、ROCK阻害剤、TGF受容体阻害剤、MEK阻害剤、PDK1アゴニスト、6-メルカプトプリン、AC-93253ヨウ化物、チラトリコール、PI-103、フルベストラント、タブシガルジン、SU4312、U0126、テルミサルタン、サイクロスボリンA、1,3,5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール、BAY61-3606、プロトポルフィリンIXニナトリウム、mTOR阻害剤、TWS119、HS173、LY294002、およびピクチリシブを含む。理論に制限されるものではないが、群IIの薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、様々な機能的経路におけるシグナル伝達に影響を及ぼす。

50

## 【0021】

群IIは、5-アザシチジン、フルダラビン、ロスコビチン、およびPAC-1を含む。理論に制限されるものではないが、群IIの薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、細胞増殖およびアポトーシスに影響を及ぼす。

## 【0022】

群IVは、5,7-ジクロロ-8-キノリノール、2-ナフタセンカルボキサミド、7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-オクタヒ、ニフロキサジド、およびトスフロキサシン塩酸塩を含む。理論に制限されるものではないが、群IVの薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、感染過程に関連する細胞特性に影響を及ぼし得る。

10

## 【0023】

群Vは、セルトラリン、ジエチレントリアミンペニタ酢酸、塩化エドロホニウム、BIX01294、テルフェナジン、およびdmpGE2を含む。理論に制限されるものではないが、群Vの薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、拡大、維持、分化、増殖、生存率、細胞毒性、細胞リコール、および/または持続性に関連する他の細胞特性に一般的に影響を及ぼす。

## 【0024】

幾つかの他の実施形態において、免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群IIから選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに群I、群II、群IV、および/もしくは群Vから選択される1つまたは複数の薬剤を含む。

20

## 【0025】

なお他の実施形態において、免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群IIから選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに群I、群II、群IV、および/もしくは群Vから選択される1つまたは複数の薬剤を含む。

## 【0026】

さらに他の実施形態において、免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群IVから選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに群I、群II、群III、および/もしくは群Vから選択される1つまたは複数の薬剤を含む。

## 【0027】

なお幾つかの他の実施形態において、免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群Vから選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに群I、群II、群III、および/もしくは群IVから選択される1つまたは複数の薬剤を含む。

30

## 【0028】

幾つかの実施形態において、免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、TWS119、HS173、LY294002、ピクチリシブ、および2-DGからなる群から選択される少なくとも1つの薬剤と、表1において挙げられる化合物からなる群から選択される1つまたは複数の追加薬剤の組み合わせを含む。幾つかの特定の実施形態において、組成物は、TWS119、HS173、LY294002、ピクチリシブ、および2-DGからなる群から選択される2つまたはそれ以上の薬剤の相乗的組み合わせを含む。

## 【0029】

幾つかの実施形態において、表1において挙げられる化合物からなる群から選択される1つまたは複数の薬剤を含む組成物は、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメトキシエタン(DME)、ジメチルアセトアミド、エタノールおよびその組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの有機溶媒をさらに含む。

40

## 【0030】

幾つかの実施形態において、組成物は、群IIから選択される少なくとも1つの薬剤を含む。幾つかの実施形態において、組成物は、mTOR阻害剤を含む。幾つかの実施形態において、組成物は、群IIから選択される少なくとも1つの薬剤、および群Vから選択される1つまたは複数の薬剤を含む。1つの実施形態において、組成物は、mTOR阻害

50

剤、および d m P G E 2 、または d m P G E 2 の類似体もしくは誘導体を含む。幾つかの実施形態において、m T O R 阻害剤は、ラパマイシン、ならびにシロリムス、シロリムス誘導体、テムシロリムス、4 0 - O - ( 2 - ヒドロキシ ) エチル - ラパマイシン ( エベロリムス ) 、4 0 - O - ( 3 - ヒドロキシ ) プロピル - ラパマイシン、4 0 - O - [ 2 - ( 2 - ヒドロキシ ) エトキシ ] エチル - ラパマイシン、4 0 - O - テトラゾール - ラパマイシン、もしくは他のO - アルキル化およびO - メチル化ラパマイシン誘導体を含む、その類似体または誘導体から選択される。1 つの実施形態において、d m P G E 2 は、1 6 , 1 6 - ジメチルプロスタグランジン E 2 である。幾つかの他の実施形態において、d m P G E 2 の類似体または誘導体は、P G E 2 、1 6 , 1 6 - ジメチル P G E 2 p - ( p - アセタミドベンズアミド ) フェニルエステル、1 1 - デオキシ - 1 6 , 1 6 - ジメチル P G E 2 、9 - デオキシ - 9 - メチレン - 1 6 , 1 6 - ジメチル P G E 2 、9 - デオキシ - 9 - メチレン P G E 2 、9 - ケトフルプロステノール、5 - トランス P G E 2 、1 7 - フェニル - オメガ - トリノル P G E 2 、P G E 2 セリノールアミド、P G E 2 メチルエステル、1 6 - フェニルテトラノル P G E 2 、1 5 ( S ) - 1 5 - メチル P G E 2 、1 5 ( R ) - 1 5 - メチル P G E 2 、8 - イソ - 1 5 - ケト P G E 2 、8 - イソ P G E 2 イソプロピルエステル、8 - イソ - 1 6 - シクロヘキシル - テトラノル P G E 2 、2 0 - ヒドロキシ P G E 2 、2 0 - エチル P G E 2 、1 1 - デオキシ P G E i 、ノクロプロスト、スルプロストン、ブタプロスト、1 5 - ケト P G E 2 、および 1 9 ( R ) ヒドロキシ P G E 2 からなる群から選択される。1 つの特定の実施形態において、組成物は、ラパマイシンおよびd m P G E 2 を含む。

### 【 0 0 3 1 】

本発明の別の態様は、免疫細胞の集団または亜集団、ならびに表 1 において挙げられる化合物、ならびにその誘導体および類似体からなる群から選択される1 つまたは複数の薬剤を含む組成物を提供する。幾つかの実施形態において、免疫細胞を1 つまたは複数の薬剤と接触させて、かかる接触をしない免疫細胞と比較し、養子細胞療法の免疫細胞の治療可能性が改善される。幾つかの実施形態において、免疫細胞を1 つまたは複数の薬剤と接触させて、同じ処理をしない免疫細胞と比較し、細胞拡大、維持、分化、脱分化、および / または生存率が改善される。さらに幾つかの他の実施形態において、免疫細胞を1 つまたは複数の薬剤と接触させて、同じ処理をしない免疫細胞と比較し、細胞増殖、細胞毒性、持続性、および / またはリコールが改善される。

### 【 0 0 3 2 】

幾つかの実施形態において、1 つまたは複数の薬剤と接触させた免疫細胞は、同じ処理をしない免疫細胞と比較し、増大した数または割合の、免疫細胞の所望される亜集団を有する。幾つかの実施形態において、免疫細胞は、T 、 N K または N K T 細胞を含む。1 つの実施形態において、組成物は T 細胞の集団を含み、したがって、薬剤と接触させた後の免疫細胞の所望される亜集団は、ナイーブ T 細胞、幹細胞メモリー T 細胞、および / またはセントラルメモリー T 細胞を含む。幾つかの実施形態において、組成物は N K T 細胞の集団を含み、したがって、薬剤と接触させた後の免疫細胞の所望される亜集団は、タイプ I N K T 細胞を含む。さらに幾つかの他の実施形態において、免疫細胞は N K 細胞の集団を含み、したがって、薬剤と接触させた後の免疫細胞の所望される亜集団は、養子 N K 細胞を含む。他の実施形態において、養子 N K 細胞は、C D 5 7 + 、ならびに N K G 2 C + 、低 P L Z F 、低 S Y K 、低 F c R 、低 E A T - 2 、低 T I G I T 、低 P D 1 、低 C D 7 、低 C D 1 6 1 、高 L I L R B 1 、高 C D 4 5 R O 、および低 C D 4 5 R A の少なくとも1 つを含む。

### 【 0 0 3 3 】

幾つかの実施形態において、組成物の免疫細胞の集団または亜集団は、対象の末梢血、骨髓、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、もしくは腫瘍から単離されるか、またはそれに含まれる。対象は、健常であってもよく、自己免疫疾患、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染症もしくは固形腫瘍を有していてもよい、または遺伝子的に修飾された免疫細胞を既に投与されていてもよい。幾つかの実施形

10

20

30

40

50

態において、対象は、CMV血清陽性であってもよい。幾つかの他の実施形態において、調節のため単離された免疫細胞は、遺伝子的に修飾される（遺伝子的に操作されるか、または再編成、変異、遺伝子インプリンティングおよび／もしくはエピジェネティック修飾から天然にもたらされる）。幾つかの実施形態において、調節のため単離された免疫細胞は、少なくとも1つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、および／または核酸置換を含む。幾つかの特定の実施形態において、免疫細胞は、T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、および／または過剰発現のCD16もしくはそのバリエントをコードする外来核酸を含む。したがって、遺伝子的に修飾された免疫細胞は、開示される本組成物および方法を使用した生体外での調節のため単離される。幾つかの実施形態において、調節後、対象から単離された、遺伝子的に修飾された免疫細胞は、同じドナーまたは異なる患者に投与されてもよい。

#### 【0034】

さらに別の実施形態において、免疫細胞は、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞から試験管内で分化するか、あるいは造血系または非造血系の非多能性細胞から試験管内で分化転換する。幾つかの実施形態において、組成物の免疫細胞は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、または核酸置換（置換、もしくはインデル）を含む。幾つかの特定の実施形態において、組成物の免疫細胞は、T細胞受容体（TCR）、および／またはキメラ抗原受容体（CAR）をコードする外来核酸を含む。幾つかの実施形態において、対象の組織から単離された免疫細胞は、遺伝子的に操作され、TCRまたはCARを含んでもよい。幾つかの実施形態において、組織または対象から単離された免疫細胞は、CAR-T細胞である。

#### 【0035】

さらに幾つかの他の実施形態において、組成物の免疫細胞は、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞から試験管内で分化する。1つの実施形態において、幹細胞は、誘導された多能性幹細胞（iPSC）または胚性幹細胞（ESC）である。1つの実施形態において、前駆細胞は、CD34+造血性内皮細胞、多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK前駆細胞、またはNKT前駆細胞である。幾つかの実施形態において、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、もしくは核酸置換を含むか、または少なくとも1つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む。1つの特定の実施形態において、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞は、T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、および／または過剰発現のCD16をコードする外来核酸を含む。幾つかの他の実施形態において、組成物の免疫細胞は、造血系または非造血系の非多能性細胞から試験管内で分化転換する。幾つかの実施形態において、調節後の免疫細胞の所望される細胞亜集団は、少なくとも1つの遺伝子的に修飾されたモダリティを有する免疫細胞を含む。幾つかの実施形態において、遺伝子的に修飾されたモダリティは、セーフティスイッチタンパク質、ターゲティングモダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、医薬的に有効なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または免疫細胞の生着、輸送、ホーミング、バイアビリティー、自己再生、持続性、免疫応答制御および調節、ならびに／もしくは生存を促進するタンパク質の少なくとも1つを含む。幾つかの他の実施形態において、遺伝子的に修飾されたモダリティは、（i）欠失もしくは低減した発現のB2M、TAP1、TAP2、タバシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、またはRFXAP、および染色体6p21領域中の任意の遺伝子；ならびに（ii）誘導されたまたは増大した発現のHLA-E、HLA-G、HACD16、hncD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、Fc受容体、あるいは二重もしくは多特異性または普遍的エンゲイジャーとのカップリングのための表面トリガー受容体の1つあるいは複数を含む。

#### 【0036】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、免疫細胞、および表 1 において挙げられる化合物からなる群から選択される 1 つまたは複数の薬剤を含む組成物は、ペプチド、サイトカイン、マイトジエン、成長因子、スマール RNA、d s RNA ( 2 本鎖 RNA ) 、単核血液細胞、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分もしくは置換因子、対象となる 1 つもしくは複数のポリ核酸を含むベクター；抗体、もしくは抗体フラグメント；および化学療法剤、放射性部分、もしくは免疫調節薬 ( I M i D ) からなる群から選択される 1 つまたは複数の追加の添加剤をさらに含む。これらの実施形態の幾つかにおいて、抗体、または抗体フラグメントは、ウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態において、抗体、または抗体フラグメントは、腫瘍抗原に特異的に結合する。幾つかの実施形態において、追加の添加剤は含む。化学療法剤は、細胞毒性抗腫瘍薬、すなわち、腫瘍細胞を優先的に殺傷するか、もしくは迅速に増殖する細胞の細胞サイクルを妨害する化学薬剤、または癌幹細胞を根絶することが見出されている化学薬剤、および腫瘍細胞の成長を妨げるかまたは低減するため 10 に治療上使用される化学薬剤を指す。化学療法剤はまた、抗腫瘍または細胞毒性薬もしくは薬剤としてもときに言及され、当該技術分野において周知である。

#### 【 0 0 3 7 】

1 つの特定の実施形態において、組成物は、免疫細胞の集団または亜集団と、 G S K 3 阻害剤、 T G F 受容体阻害剤、 R O C K 阻害剤、 M E K 阻害剤、 P D K 1 アゴニスト、および m T O R 阻害剤の 1 つまたは複数の混合物を含み、ここで、免疫細胞は、 T 細胞、 N K 細胞または N K T 細胞を含む。1 つの実施形態において、組成物は m T O R 阻害剤を含み、ここで、免疫細胞は T 細胞を含む。1 つの実施形態において、 T 細胞は C A R - T 細胞を含む。幾つかの実施形態において、 m T O R 阻害剤は、ラパマイシン、およびその類似体または誘導体から選択される。 20

#### 【 0 0 3 8 】

幾つかの実施形態において、免疫細胞および表 1 において挙げられる 1 つまたは複数の薬剤を含む組成物は、群 I I から選択される少なくとも 1 つの薬剤、および群 V から選択される 1 つまたは複数の薬剤を含む。1 つの実施形態において、組成物は、 m T O R 阻害剤、および d m P G E 2 、または d m P G E 2 の類似体もしくは誘導体を含む。幾つかの実施形態において、 m T O R 阻害剤は、ラパマイシン、ならびにシロリムス、シロリムス誘導体、テムシロリムス、 4 0 - O - ( 2 - ヒドロキシ ) エチル - ラパマイシン ( エベロリムス ) 、 4 0 - O - ( 3 - ヒドロキシ ) プロピル - ラパマイシン、 4 0 - O - [ 2 - ( 2 - ヒドロキシ ) エトキシ ] エチル - ラパマイシン、 4 0 - O - テトラゾール - ラパマイシン、および他の O - アルキル化もしくは O - メチル化ラパマイシン誘導体を含む、その類似体または誘導体から選択される。1 つの実施形態において、 d m P G E 2 は、 1 6 , 1 6 - ジメチルプロスタグラニン E 2 である。幾つかの他の実施形態において、 d m P G E 2 の類似体または誘導体は、 P G E 2 、 1 6 , 1 6 - ジメチル P G E 2 p - ( p - アセタミドベンズアミド ) フェニルエステル、 1 1 - デオキシ - 1 6 , 1 6 - ジメチル P G E 2 、 9 - デオキシ - 9 - メチレン - 1 6 , 1 6 - ジメチル P G E 2 、 9 - デオキシ - 9 - メチレン P G E 2 、 9 - ケトフルプロステノール、 5 - トランス P G E 2 、 1 7 - フェニル - オメガ - トリノル P G E 2 、 P G E 2 セリノールアミド、 P G E 2 メチルエステル、 1 6 - フェニルテトラノル P G E 2 、 1 5 ( S ) - 1 5 - メチル P G E 2 、 1 5 ( R ) - 1 5 - メチル P G E 2 、 8 - イソ - 1 5 - ケト P G E 2 、 8 - イソ P G E 2 イソプロピルエステル、 8 - イソ - 1 6 - シクロヘキシル - テトラノル P G E 2 、 2 0 - ヒドロキシ P G E 2 、 2 0 - エチル P G E 2 、 1 1 - デオキシ P G E i 、 ノクロプロスト、スルプロストン、ブタプロスト、 1 5 - ケト P G E 2 、および 1 9 ( R ) ヒドロキシ P G E 2 からなる群から選択される。1 つの特定の実施形態において、組成物は、 C A R - T 細胞、ラパマイシンおよび d m P G E 2 を含む。 30

#### 【 0 0 3 9 】

本発明のなお別の態様は、表 1 において挙げられる 1 つもしくは複数の薬剤、またはその誘導体もしくは類似体を含む組成物と接触させたか、あるいは調節された免疫細胞の単離された集団を含む組成物を提供する。幾つかの実施形態において、提供される組成物は 40

、T、NKおよびNKT細胞を含むが、これらに限定されない、免疫細胞の処理された単離された集団または亜集団を有する治療組成物である。治療組成物は、調節薬剤を実質的に含まない緩衝液で洗浄することができる。

【0040】

幾つかの実施形態において、調節された細胞集団は、調節されていない細胞集団と比較し、養子細胞療法の改善された治療可能性を有する免疫細胞を含む。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、1つまたは複数の薬剤による処理をしない免疫細胞と比較し、改善された細胞拡大、維持、分化、脱分化、および/または生存率を有する。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、1つまたは複数の薬剤による処理をしない免疫細胞と比較し、改善された細胞増殖、細胞毒性、サイトカイン応答および分泌、細胞リコール、ならびに持続性を有する。幾つかの他の実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、同じ処理をしない免疫細胞と比較し、増大した数もしくは割合の、免疫細胞の1つまたは複数の所望される亜集団を有する。

10

【0041】

幾つかの実施形態において、表1において挙げられる化合物からなる群から選択される1つまたは複数の薬剤で処理された免疫細胞の単離された集団は、T細胞を含み、したがって、免疫細胞の得られた1つまたは複数の所望される亜集団は、ナイーブT細胞、幹細胞メモリーT細胞、および/またはセントラルメモリーT細胞を含む。幾つかの実施形態において、1つまたは複数の薬剤で処理された免疫細胞の単離された集団は、NKT細胞を含み、したがって、免疫細胞の得られた1つまたは複数の所望される亜集団は、タイプI NKT細胞を含む。さらに幾つかの他の実施形態において、1つまたは複数の薬剤で処理された免疫細胞の単離された集団は、NK細胞を含み、したがって、免疫細胞の1つまたは複数の所望される亜集団は、養子NK細胞を含む。

20

【0042】

提供される組成物の幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、対象の末梢血、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染症の部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、または腫瘍から単離されてもよい。対象は、健常であってもよく、自己免疫疾患、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染症もしくは固形腫瘍を有していてもよいか、または遺伝子的に修飾された免疫細胞を既に投与されていてもよい。幾つかの実施形態において、対象は、CMV血清陽性であってもよい。幾つかの他の実施形態において、調節のため単離された免疫細胞は、遺伝子的に修飾される（遺伝子的に操作されるか、または再編成、変異、遺伝子インプリンティングおよび/もしくはエピジェネティック修飾から天然にもたらされる）。幾つかの実施形態において、調節のため単離された免疫細胞は、少なくとも1つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、および/または核酸置換を含む。幾つかの特定の実施形態において、免疫細胞は、T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、および/または過剰発現のCD16もしくはそのバリエントをコードする外来核酸を含む。したがって、遺伝子的に修飾された免疫細胞は、開示される本組成物および方法を使用した生体外での調節のため単離される。幾つかの実施形態において、調節後、対象から単離された、遺伝子的に修飾された免疫細胞は、同じドナーまたは異なる患者に投与されてもよい。

30

【0043】

提供される組成物の幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞から分化してもよい。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、薬剤での処理に先立ち、または処理中に、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞から分化してもよい。幾つかの実施形態において、幹細胞は、誘導された多能性幹細胞（iPSC）または胚性幹細胞（ESc）である。幾つかの実施形態において、前駆細胞は、CD34<sup>+</sup>造血性内皮細胞、多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK前駆細胞、またはNKT前駆細胞である。幾つかのさらなる実施形態において、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、前駆細胞、

40

50

調節のためもたらされた免疫細胞、または調節された、もたらされた免疫細胞は、ゲノム的に操作され、例えば、挿入、欠失、および／または核酸置換を含む。1つの特定の実施形態において、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞は、T細胞受容体（T C R）、キメラ抗原受容体（C A R）、および／または過剰発現のC D 1 6をコードする外来核酸を含む。

【 0 0 4 4 】

提供される組成物の幾つかの他の実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、造血系または非造血系の非多能性細胞から分化転換してもよい。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、薬剤による処理に先立ち、もしくは処理中に、造血系または非造血系の非多能性細胞から分化転換してもよい。

10

【 0 0 4 5 】

提供される組成物の幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、m T O R阻害剤を含む組成物で調節されたT細胞を含む。提供される組成物の幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、m T O R阻害剤、およびd m P G E 2またはd m P G E 2の類似体もしくは誘導体を含む組成物で調節されたT細胞を含む。幾つかの実施形態において、m T O R阻害剤は、ラパマイシン、ならびにシロリムス、シロリムス誘導体、テムシロリムス、4 0 - O - ( 2 - ヒドロキシ ) エチル - ラパマイシン（エベロリムス）、4 0 - O - ( 3 - ヒドロキシ ) プロピル - ラパマイシン、4 0 - O - [ 2 - ( 2 - ヒドロキシ ) エトキシ ] エチル - ラパマイシン、4 0 - O - テトラゾール - ラパマイシン、および他のO - アルキル化もしくはO - メチル化ラパマイシン誘導体を含む、その類似体および誘導体から選択される。幾つかの実施形態において、d m P G E 2の類似体または誘導体は、P G E 2、1 6 , 1 6 - ジメチルP G E 2 p - ( p - アセタミドベンズアミド ) フェニルエステル、1 1 - デオキシ - 1 6 , 1 6 - ジメチルP G E 2、9 - デオキシ - 9 - メチレン - 1 6 , 1 6 - ジメチルP G E 2、9 - デオキシ - 9 - メチレンP G E 2、9 - ケトフルプロステノール、5 - トランスP G E 2、1 7 - フェニル - オメガ - トリノルP G E 2、P G E 2セリノールアミド、P G E 2メチルエステル、1 6 - フェニルテトラノルP G E 2、1 5 ( S ) - 1 5 - メチルP G E 2、1 5 ( R ) - 1 5 - メチルP G E 2、8 - イソ - 1 5 - ケトP G E 2、8 - イソP G E 2イソプロピルエステル、8 - イソ - 1 6 - シクロヘキシリ - テトラノルP G E 2、2 0 - ヒドロキシP G E 2、2 0 - エチルP G E 2、1 1 - デオキシP G E 1、ノクロプロスト、スルプロストン、ブタプロスト、1 5 - ケトP G E 2、および1 9 ( R ) ヒドロキシP G E 2からなる群から選択される。さらに幾つかの他の実施形態において、組成物は、ラパマイシンおよびd m P G E 2を含む。

20

【 0 0 4 6 】

提供される組成物の幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、T細胞を含む。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、C A R - T細胞を含む。幾つかの実施形態において、調節された免疫細胞は、m T O R阻害剤、および場合によりd m P G E 2またはd m P G E 2の類似体もしくは誘導体を含む組成物で調節されていないT細胞と比較したとき、以下の特性：( 1 ) C D 2 7、C C R 7、C D 6 2 L、T C F 7、L E F 1、B L I M P - 1、A L D O C、およびE N O 2の少なくとも1つにおける増大した遺伝子発現；( 2 ) P D - 1およびT i m - 3の少なくとも1つにおける低下した遺伝子発現；( 3 ) 増大した予備呼吸容量（S R C）；( 4 ) 増大したセントラルメモリーT細胞亜集団；( 5 ) 減少したエフェクターT細胞亜集団；( 6 ) 改善された拡大およびバイアビリティー；ならびに( 7 ) 腫瘍クリアランスおよび持続性における改善された能力の少なくとも1つを有するT細胞を含む。幾つかの実施形態において、上記特性の少なくとも1つを有するT細胞は、C A R - T細胞である。

30

【 0 0 4 7 】

本発明の別の態様は、調節されていないT細胞と比較したとき、特性：( 1 ) C D 2 7、C C R 7、C D 6 2 L、T C F 7、L E F 1、B L I M P - 1、A L D O C、およびE N O 2の少なくとも1つにおける増大した遺伝子発現；( 2 ) P D - 1およびT i m - 3

40

50

の少なくとも 1 つにおける低下した遺伝子発現；(3) 増大した予備呼吸容量 (S R C)；(4) 増大したセントラルメモリー T 細胞亜集団；ならびに(5) 減少したエフェクター T 細胞亜集団の少なくとも 1 つを有する T 細胞の単離された集団を含む組成物を提供する。幾つかの実施形態において、組成物における T 細胞の単離された集団は、C A R - T 細胞を含む。幾つかの実施形態において、組成物における T 細胞の単離された集団は、拡大；バイアビリティー；持続性；および腫瘍クリアランスの少なくとも 1 つにおいて改善された能力を有する。

【 0 0 4 8 】

本発明の別の態様は、免疫細胞の集団を、表 1 において挙げられる化合物、ならびにその誘導体および類似体からなる群から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む、十分量の組成物と、調節されていない免疫細胞と比較し、養子細胞療法の改善された治療可能性を有する調節された免疫細胞の集団を得るのに十分な時間、接触させることを一般的に含む、養子療法のための免疫細胞の集団を調節する方法を提供する。幾つかの実施形態において、養子療法のための調節された免疫細胞は、自家性である。幾つかの実施形態において、養子療法のための調節された免疫細胞は、同種である。

10

【 0 0 4 9 】

方法の幾つかの実施形態において、免疫細胞を 1 つまたは複数の薬剤と接触させることは、表 1 の 1 つもしくは複数の薬剤、およびその誘導体もしくは類似体による処理をしていない免疫細胞と比較し、増殖、細胞毒性、サイトカイン応答、サイトカイン放出、細胞リコール、ならびに / または持続性を改善し；ならびに / あるいは細胞拡大、維持、分化、脱分化、ならびに / または生存率を改善する。方法の幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団を表 1 の 1 つまたは複数の薬剤、およびその誘導体または類似体と接触させることは、同じ 1 つもしくは複数の薬剤による処理をしない免疫細胞と比較し、免疫細胞の 1 つまたは複数の所望される亜集団の数あるいは割合を増大する。

20

【 0 0 5 0 】

幾つかの実施形態において、上記方法は、(b) 表 1 の 1 つもしくは複数の薬剤と接触させた免疫細胞の 1 つまたは複数の所望される亜集団を単離することをさらに含む。

【 0 0 5 1 】

幾つかの実施形態において、上記方法は、工程 (a) の処理された免疫細胞の集団もしくは亜集団、または工程 (b) の免疫細胞の単離された 1 つもしくは複数の所望される亜集団、またはその治療組成物を、細胞療法を必要とする対象に投与することをさらに含む。幾つかの実施形態において、対象は、自己免疫異常、血液系腫瘍、固形腫瘍、または感染症を有する。幾つかの実施形態において、対象は、化学療法もしくは放射線療法で処置されたか、その下にあるか、またはそれで処置されるだろう。

30

【 0 0 5 2 】

幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団は、T 細胞、N K T 細胞、または N K 細胞を含む。方法の 1 つの実施形態において、免疫細胞の集団は T 細胞を含み、処理後の 1 つまたは複数の所望される亜集団は、ナイーブ T 細胞、幹細胞メモリー T 細胞、および / またはセントラルメモリー T 細胞を含む。方法の 1 つの実施形態において、免疫細胞の集団は N K T 細胞を含み、処理後の 1 つまたは複数の所望される亜集団は、タイプ I N K T 細胞を含む。方法の 1 つの実施形態において、免疫細胞の集団は N K 細胞を含み、処理後の 1 つまたは複数の所望される亜集団は、養子 N K 細胞を含む。

40

【 0 0 5 3 】

当該一般的な方法の幾つかの実施形態において、調節のための免疫細胞は、末梢血、骨髓、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、もしくは腫瘍から単離されるか、またはそれに含まれる。幾つかの実施形態において、調節のための免疫細胞は、健常対象；自己免疫疾患、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染症もしくは固形腫瘍を有する対象；遺伝子的に修飾された免疫細胞を既に投与された対象；または C M V 血清陽性である対象から単離される。幾つかの他の実施形態において、調節のための単離された免疫細胞は、遺伝子的に修飾される（遺伝子的に操作されるか、または再

50

編成、変異、遺伝子インプリンティングおよび／もしくはエピジェネティック修飾から天然にもたらされる）。幾つかの実施形態において、調節のための単離された免疫細胞は、少なくとも1つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、および／または核酸置換を含む。幾つかの特定の実施形態において、免疫細胞は、T細胞受容体（T C R）、キメラ抗原受容体（C A R）、および／または過剰発現のC D 1 6もしくはそのバリエントをコードする外来核酸を含む。したがって、ゲノム的に修飾された免疫細胞は、開示される本組成物および方法を使用した生体外での調節のため単離される。幾つかの実施形態において、調節後、対象から単離された、ゲノム的に修飾された免疫細胞は、同じドナーまたは異なる患者に投与されてもよい。

10

#### 【 0 0 5 4 】

幾つかの実施形態において、調節のための免疫細胞は、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞から試験管内で分化する。幾つかの実施形態において、調節のための免疫細胞は、造血系または非造血系の非多能性細胞から試験管内で分化転換する。幾つかの実施形態において、当該幹細胞は、誘導された多能性幹細胞（i P S C）または胚性幹細胞（E S C）を含む。幾つかの実施形態において、当該前駆細胞は、C D 3 4 + 造血性内皮細胞、多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、N K前駆細胞、またはN K T前駆細胞である。さらに幾つかの他の実施形態において、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、もしくは核酸置換を含む、および／または少なくとも1つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む。したがって、それからもたらされた調節された免疫細胞の所望される細胞亜集団は、少なくとも1つの遺伝子的に修飾されたモダリティを有する免疫細胞を含む。

20

#### 【 0 0 5 5 】

幾つかの実施形態において、当該遺伝子的に修飾されたモダリティは、セーフティスイッチタンパク質、ターゲティングモダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、医薬的に有効なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または免疫細胞の生着、輸送、ホーミング、バイアビリティー、自己再生、持続性、免疫応答制御および調節、ならびに／もしくは生存を促進するタンパク質の少なくとも1つを含む。幾つかの他の実施形態において、遺伝子的に修飾されたモダリティは、1つまたは複数の欠失もしくは低減した発現のB 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、P D 1、L A G 3、T I M 3、R F X A N K、C I I T A、R F X 5、あるいはR F X A P、および染色体6 p 2 1領域中の任意の遺伝子を含む。幾つかの他の実施形態において、遺伝子的に修飾されたモダリティは、1つもしくは複数の誘導されたまたは増大した発現のH L A - E、H L A - G、H A C D 1 6、h n C D 1 6、4 1 B B L、C D 3、C D 4、C D 8、C D 4 7、C D 1 1 3、C D 1 3 1、C D 1 3 7、C D 8 0、P D L 1、A 2 A R、F c受容体、あるいは二重もしくは多特異性または普遍的エンゲイジャーとのカップリングのための表面トリガー受容体を含む。

30

#### 【 0 0 5 6 】

免疫細胞を調節する方法の幾つかの実施形態において、当該「十分な時間」または「十分な長さの時間」は、1 6 時間以上、1 4 時間以上、1 2 時間以上、1 0 時間以上、8 時間以上、6 時間以上、4 時間以上、2 時間以上、1 時間以上、0 . 5 時間以上、0 . 1 時間以上、または間の任意の長さの時間以上である。したがって、当該十分な長さの時間は、例えば、1 5 時間以上、1 3 時間以上、1 1 時間以上、9 時間以上、7 時間以上、5 時間以上、3 時間以上、1 時間以上、0 . 5 時間以上、または0 . 1 時間以上である。方法の幾つかの他の実施形態において、当該十分な長さの時間は、2 4 時間以上、3 6 時間以上、4 8 時間以上、6 0 時間以上、7 2 時間以上、または間の任意の長さの時間以上である。したがって、当該十分な長さの時間は、例えば、3 0 時間以上、4 2 時間以上、5 4 時間以上、6 6 時間以上、7 8 時間以上、9 0 時間以上である。

40

#### 【 0 0 5 7 】

当該方法の幾つかの実施形態において、免疫細胞は、調節中および／または後、フィー

50

ダーフリーな環境にある。フィーダーフリーな条件は、フィーダー細胞フリー、およびフィーダー馴化培地フリーを含む。当該方法の幾つかの実施形態において、免疫細胞は、調節中、フィーダー細胞と共に培養される。

#### 【 0 0 5 8 】

幾つかの実施形態において、対象は、養子細胞移植の候補であり得る。幾つかの実施形態において、対象は、骨髓または幹細胞移植の候補であり得る。幾つかの実施形態において、対象は、骨髓または幹細胞移植を既に受けている。幾つかの実施形態において、対象は、骨髓除去もしくは骨髓非破壊的化学療法または放射線療法を受けている。

#### 【 0 0 5 9 】

方法の幾つかの実施形態において、免疫細胞と接触させるための組成物は、mT0R阻害剤を含む。方法の幾つかの実施形態において、免疫細胞と接触させるための組成物は、mT0R阻害剤、およびdmpGE2またはdmPGE2の類似体もしくは誘導体を含む。幾つかの実施形態において、mT0R阻害剤は、ラパマイシン、ならびにシロリムス、シロリムス誘導体、テムシロリムス、40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン(エベロリムス)、40-O-(3-ヒドロキシ)プロピル-ラパマイシン、40-O-[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-テトラゾール-ラパマイシン、および他のO-アルキル化もしくはO-メチル化ラパマイシン誘導体を含む、その類似体および誘導体から選択される。幾つかの実施形態において、dmPGE2の類似体または誘導体は、PGE2、16,16-ジメチルPGE2p-(p-アセタミドベンズアミド)フェニルエステル、11-デオキシ-16,16-ジメチルPGE2、9-デオキシ-9-メチレンPGE2、9-ケトフルプロステノール、5-トランスPGE2、17-フェニル-オメガ-トリノルPGE2、PGE2セリノールアミド、PGE2メチルエステル、16-フェニルテトラノルPGE2、15(S)-15-メチルPGE2、15(R)-15-メチルPGE2、8-イソ-15-ケトPGE2、8-イソPGE2イソプロピルエステル、8-イソ-16-シクロヘキシル-テトラノルPGE2、20-ヒドロキシPGE2、20-エチルPGE2、11-デオキシPGEi、ノクロプロスト、スルプロストン、ブタプロスト、15-ケトPGE2、および19(R)ヒドロキシPGE2からなる群から選択される。さらに幾つかの他の実施形態において、免疫細胞を接触させるための組成物は、ラパマイシンおよびdmPGE2を含む。

#### 【 0 0 6 0 】

提供される方法の幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団は、T細胞を含む。幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団は、CAR-T細胞を含む。幾つかの実施形態において、調節された細胞集団は、mT0R阻害剤、およびdmPGE2またはdmPGE2の類似体もしくは誘導体を含む組成物で調節されていないT細胞と比較したとき、以下の特性：(1)CD27、CCR7、CD62L、TCF7、LEF1、BLIMP-1、ALDOC、およびENO2の少なくとも1つにおける増大した遺伝子発現；(2)PD-1およびTim-3の少なくとも1つにおける低下した遺伝子発現；(3)増大した予備呼吸容量(SRC)；(4)増大したセントラルメモリーT細胞亜集団；(5)減少したエフェクターT細胞亜集団；(6)改善された拡大およびバイアビリティー；ならびに(7)腫瘍クリアランスおよび持続性における改善された能力の少なくとも1つを有するT細胞を含む。幾つかの実施形態において、上記特性の少なくとも1つを有するT細胞は、CAR-T細胞である。

#### 【 0 0 6 1 】

本発明のさらなる態様は、免疫細胞の集団を調節する上記方法のいずれかによる細胞療法のための治療組成物を製造する方法を提供する。

#### 【 0 0 6 2 】

本発明のさらなる態様は、細胞療法のための調節された免疫細胞を含む治療組成物を作製する上記免疫細胞調節方法の使用を提供する。幾つかの実施形態において、調節された免疫細胞は、T、NK/またはNKT細胞を含む。幾つかの実施形態において、調節され

10

20

30

40

50

たNK細胞は、養子NK細胞を含む。本発明の追加の態様は、本明細書において提供される方法により作製される選択的に拡大されたNK細胞を含む調節された免疫細胞の集団を提供する。

【0063】

本発明のまだ別の態様は、本明細書において開示される方法および組成物を使用して得られる調節された細胞、ならびに治療上許容される培地を含む治療組成物を提供する。治療組成物の幾つかの実施形態において、組成物は、ペプチド、サイトカイン、マイトジエン、成長因子、スマールRNA、dsRNA(2本鎖RNA)、単核血液細胞、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分もしくは置換因子、対象となる1つもしくは複数のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤もしくは放射性部分、および免疫調節薬(IMiD)からなる群から選択される1つまたは複数の追加の添加剤をさらに含む。

10

【0064】

治療上十分量の上記当該治療組成物を養子細胞療法を必要とする対象に投与することにより、対象を処置する方法がさらに提供される。幾つかの実施形態において、細胞療法は自家性である。幾つかの他の実施形態において、細胞療法は同種である。幾つかの実施形態において、療法を必要とする対象は、自己免疫異常、血液系腫瘍、固形腫瘍、癌、またはHIV、RSV、EBV、CMV、アデノウイルス、もしくはBKポリオーマウイルスと関連する感染症を有する。幾つかの実施形態において、調節された免疫細胞を使用した対象を処置する方法は、抗体、化学療法処置、または放射性処置と組み合わせて当該治療組成物を投与することにより、実行され、ここで、抗体、化学療法処置、または放射性処置は、治療組成物の投与に先立ち、投与中、または投与後である。

20

【0065】

本発明のさらに別の態様は、細胞療法のための治療組成物を製造するための混合物の使用を提供し、ここで、混合物は、(a)免疫細胞の単離された集団、および(b)mTOR阻害剤、またはmTOR阻害剤と、dmpGE2またはdmpGE2の類似体もしくは誘導体の組み合わせを含む組成物を含む。幾つかの実施形態において、mTOR阻害剤は、ラパマイシン、ならびにその類似体および誘導体から選択される。幾つかの実施形態において、ラパマイシンの類似体および誘導体は、シロリムス、シロリムス誘導体、テムシロリムス、40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン(エベロリムス)、40-O-(3-ヒドロキシ)プロピル-ラパマイシン、40-O-[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-テトラゾール-ラパマイシン、または他のO-アルキル化もしくはO-メチル化ラパマイシン誘導体からなる群から選択される。幾つかの他の実施形態において、dmpGE2の類似体または誘導体は、PGE2、16,16-ジメチルPGE2p-(p-アセタミドベンズアミド)フェニルエステル、11-デオキシ-16,16-ジメチルPGE2、9-デオキシ-9-メチレン-16,16-ジメチルPGE2、9-デオキシ-9-メチレンPGE2、9-ケトフルプロステノール、5-トランスPGE2、17-フェニル-オメガ-トリノルPGE2、PGE2セリノールアミド、PGE2メチルエステル、16-フェニルテトラノルPGE2、15(S)-15-メチルPGE2、15(R)-15-メチルPGE2、8-イソ-15-ケトPGE2、8-イソPGE2イソプロピルエステル、8-イソ-16-シクロヘキシル-テトラノルPGE2、20-ヒドロキシPGE2、20-エチルPGE2、11-デオキシPGEi、ノクロプロスト、スルプロストン、ブタプロスト、15-ケトPGE2、および19(R)ヒドロキシPGE2からなる群から選択される。1つの特定の実施形態において、細胞療法のための治療組成物を製造するための混合物は、ラパマイシンとdmpGE2の組み合わせを含む。

30

【0066】

提供される通り、細胞療法のための治療組成物の製造のための混合物において、mTOR阻害剤とdmpGE2またはdmpGE2の類似体もしくは誘導体の組み合わせを含む組成物は、免疫細胞の単離された集団を調節する能力がある。幾つかの実施形態において、細胞療法のための治療組成物を製造するための混合物は、T細胞の単離された集団を含

40

50

む。幾つかの実施形態において、T細胞は、CAR-T細胞を含む。

【0067】

幾つかの実施形態において、mTOR阻害剤とdmpGE2またはdmpGE2の類似体もしくは誘導体の組み合わせにより調節された後、調節された免疫細胞は、調節されていないT細胞と比較したとき、以下の特性：(1) CD27、CCR7、CD62L、TCF7、LEF1、BLIMP-1、ALDOC、およびENO2の少なくとも1つにおける増大した遺伝子発現；(2) PD-1およびTim-3の少なくとも1つにおける低下した遺伝子発現；(3) 増大した予備呼吸容量(SRC)；(4) 増大したセントラルメモリーT細胞亜集団；(5) 減少したエフェクターT細胞亜集団；(6) 改善された拡大およびバイアビリティー；ならびに(7) 腫瘍クリアランスおよび持続性における改善された能力の少なくとも1つを有するT細胞を含む。

10

【0068】

この使用の様々な目的および利点は、説明および例示の目的で、本発明のある種の実施形態を説明する添付の図面と併せて以下の説明から明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1A】図1は、(A)生存CD8+細胞集団および(B)生存CD4+細胞集団における、CCR7とCD62Lの両方を共発現する細胞のパーセンテージ、ならびにナイープ、幹細胞メモリー、またはセントラルメモリーT細胞の絶対数の相対的測定のz値のグラフ表現である。

20

【図1B】同上。

【0070】

【図2】図2は、研究において使用される様々なCARコンストラクトを示す。

【0071】

【図3】図3は、それぞれ、DMSO(ビヒクル)、ラパマイシン、dmpGE2、およびラパマイシン+dmpGE2の組み合わせ下で処理されたCAR-T細胞上のCD27表面発現を示す。

【0072】

【図4】図4は、ラパマイシン+dmpGE2の組み合わせで処理したCAR-T細胞が、セントラルメモリー表現型を獲得することを示す。A:セントラルメモリー(Tcm)、ナイープ(Tn)、エフェクターメモリー(Tem)およびCD45RA+エフェクターメモリー(Temra)T細胞を含むT細胞サブセット。B:DMSO、ラパマイシン、dmpGE2、およびラパマイシン+dmpGE2の組み合わせ処理後、培養物に存在するT細胞サブセット。C:それぞれの化合物処理下の異なるサブセットを同定するために使用されるフローサイトメトリー解析。

30

【0073】

【図5】図5は、DMSO、ラパマイシン、dmpGE2、およびラパマイシン+dmpGE2の組み合わせ下で処理されたCD8 CAR-T細胞における発現枯渇マーカーPD-1ならびにTim-3を示す。

【0074】

40

【図6】図6は、DMSO、ラパマイシン、dmpGE2、およびラパマイシン+dmpGE2の組み合わせ下で処理された細胞における酸素消費速度(OCR)を示す。

【0075】

【図7A】図7は、異なる化合物処理下のCD8+T細胞のゲノム全体での発現特徴を示す。A:マイクロアレイにおいて含まれるプローブによる、ラパマイシン、dmpGE2、およびラパマイシン+dmpGE2の組み合わせにより誘導されるゲノム全体での転写特性の比較。B:ラパマイシン、dmpGE2、および/またはラパマイシン+dmpGE2の組み合わせ処理下で異なる変化を有する(ビヒクル処理と比較し、2倍もしくはそれ以上、上方制御または下方制御された)遺伝子の数を表すベン図。

【図7B】同上。

50

## 【0076】

【図8】図8は、それぞれ、ラパマイシン、d m P G E 2、およびラパマイシン+d m P G E 2の組み合わせで処理されたT細胞におけるT細胞機能、分化、ならびに代謝に関連する遺伝子の発現レベルの比較を示す。A.メモリー表現型さらに代謝に関連する多くのT細胞遺伝子上での転写の変化。B. T C F 7、L E F 1、B L I M P - 1（またはP R D M 1）の転写の変化。C.異なる処理下のA L D O C、E N OおよびP G K 1遺伝子の転写の変化。

## 【0077】

【図9】図9は、D M S O、ラパマイシン、d m P G E 2、およびラパマイシン+d m P G E 2の組み合わせで処理された処理されたC D 8<sup>+</sup> T細胞におけるメモリー細胞マーカー遺伝子のR T - q P C R 定量を示す。A : C C R 7 m R N A 定量。B : C D 6 2 L m R N A 定量。C : C D 2 7 m R N A 定量。

10

## 【0078】

【図10】図10は、腫瘍細胞の存在下でのC A R - T細胞拡大を評価するための試験管内での連続殺傷アッセイを示し、C A R - T細胞は、D M S O、ラパマイシン、d m P G E 2、およびラパマイシン+d m P G E 2の組み合わせで処理された。A : 各ラウンドの殺傷についてのC A R - T細胞の拡大倍数。B : 3ラウンドの殺傷に渡り処理されたC A R - T細胞のトータルの拡大倍数の比較。

## 【0079】

【図11】図11は、試験管内でのC A R - T細胞の殺傷能力が、3ラウンドの殺傷アッセイにおいて影響されなかったことを示す。A : ラバ（「ラパマイシン」についての略語）、d m P G E 2、またはラバ+d m P G E 2で予め処理されたC A R - T細胞は全て、時間と共に標的細胞を除去した。B : 共培養物における生存細胞のフローサイトメトリー解析は、ビヒクル、ラパマイシン、d m P G E 2、およびラパマイシン+d m P G E 2の組み合わせ下で残る標的細胞がほとんどないことを示す。

20

## 【0080】

【図12】図12は、活性化の1週間後にて、より大規模な培養下のC D 4かつC D 8 T細胞へのラパマイシンおよびd m P G E 2の組み合わせでの添加の効果を示す。A : D M S Oと比べ増大した拡大。B : D M S Oと比べ増大したバイアビリティー。

30

## 【0081】

【図13A】図13は、ラバ+d m P G E 2で処理されたC A R - T細胞の改善された生体内有効性を示す。A : ラバ+d m P G E 2またはP I 3 K阻害剤P I - 1 0 3で処理されたC A R - T細胞が、マウスの大部分から腫瘍を除去することができたが、一方、形質導入されていないT細胞、またはD M S O、U 0 1 2 6もしくはT W S 1 1 9で処理されたC A R - T細胞で処理されたものは、最小の腫瘍制御を示した。B : 二回性腫瘍負荷の21日後にて、ラバ+d m P G E 2で処理されたC A R - Tのマウスの75%、およびP I 1 0 3 C A R - Tで処理されたマウスの60%が、検出可能な腫瘍を有しなかった。

【図13B】同上。

## 【0082】

【図14】図14は、ラバ+d m P G E 2処理が、凍結保存後の生体内腫瘍クリアランスおよびC A R - T細胞の持続性を増大したことを示す。

40

## 【0083】

【図15】図15は、(A)ラバおよび(B)ラバ+d m P G E 2処理下の準最適用量のC A R - T細胞の腫瘍クリアランスおよび持続性を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0084】

本発明は、養子免疫療法の改善された治療可能性を得るために免疫細胞集団または亞集団を調節するための組成物および方法を提供する。本発明はまた、改善された治療可能性を有する調節された免疫細胞を使用する方法を提供する。一般に、改善された治療可能性を有する免疫細胞は、以下の：改善された増殖、持続性、細胞毒性、および/または細胞

50

リコール / メモリーの少なくとも 1 つを提示する。本発明は、免疫細胞の性質に対する改善を介して免疫細胞の治療可能性を改善する方法を提供し、例えば、以下の性質：同じ細胞の遊走、ホーミング、細胞毒性、維持、拡大、持続性、寿命、分化、および / もしくは脱分化の少なくとも 1 つにおいて改善を提示する細胞の亜集団の数または割合における増大が、より良好な免疫療法の結果をもたらすことが予想されるだろう。

【 0 0 8 5 】

定義

【 0 0 8 6 】

本明細書において特に定義されない限り、本出願と関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者により一般に理解される意味を有するだろう。さらに、文脈が特に必要としない限り、単数の用語は複数を含むだろうし、複数の用語は単数を含むだろう。

10

【 0 0 8 7 】

本発明は、本明細書において記載される特定の方法論、プロトコール、および試薬などに制限されず、したがって、変動してもよいことは、理解されなければならない。本明細書において使用される専門用語は、特定の実施形態を記載することのみの目的であり、請求項により単に定義される本発明の範囲を制限することは意図されない。

【 0 0 8 8 】

本明細書において使用される、冠詞「 a 」、「 a n 」、および「 t h e 」は、冠詞の文法上の対象の 1 つまたは、1 つより多くを指す。例示の目的で、T 細胞は、1 つの T 細胞、または 1 つより多くの T 細胞を意味する。

20

【 0 0 8 9 】

本明細書において使用される、用語「 T リンパ球 」および「 T 細胞 」は、互換的に使用され、胸腺において成熟を完了し、身体における特異的な外来抗原の同定、ならびに他の免疫細胞の活性化および不活性化を含む免疫系における様々な役割を有する主要なタイプの白血球を指す。T 細胞は、培養された T 細胞のような任意の T 細胞、例えば、初代 T 細胞、または培養された T 細胞株、例えば、ジャーカット、 S u p T 1 など由来の T 細胞、または哺乳類から得られた T 細胞のような任意の T 細胞であり得る。T 細胞は、 C D 3 + 細胞であり得る。T 細胞は、任意のタイプの T 細胞であり得、 C D 4 + / C D 8 + 二重陽性 T 細胞、 C D 4 + ヘルパー T 細胞（例えば、 T h 1 および T h 2 細胞）、 C D 8 + T 細胞（例えば、細胞傷害性 T 細胞）、末梢血单核細胞（ P B M C ）、末梢血白血球（ P B L ）、腫瘍浸潤リンパ球（ T I L ）、メモリー T 細胞、ナイーブ T 細胞、制御性 T 細胞、ガンマーデルタ T 細胞（ γ T 細胞）などを含むが、これらに限定されない、任意の発生ステージのものであり得る。追加のタイプのヘルパー T 細胞は、 T h 3 、 T h 1 7 、 T h 9 、または T f h 細胞のような細胞を含む。追加のタイプのメモリー T 細胞は、セントラルメモリー T 細胞（ T c m 細胞）、エフェクターメモリー T 細胞（ T e m 細胞および T E M R A 細胞）のような細胞を含む。T 細胞はまた、 T 細胞受容体（ T C R ）またはキメラ抗原受容体（ C A R ）を発現するよう修飾された T 細胞のような、遺伝子的に操作された T 細胞を指すことができる。T 細胞はまた、幹細胞または前駆細胞から分化することができる。

30

【 0 0 9 0 】

本明細書において使用される、用語「ナイーブ T 細胞」または T n は、活性化された、またはメモリー T 細胞と異なり、末梢内でそれらの同族抗原と遭遇していない、成熟 T 細胞を指す。ナイーブ T 細胞は、 L - セレクチン（ C D 6 2 L ）の表面発現；活性化マーカー C D 2 5 、 C D 4 4 または C D 6 9 の不在；およびメモリー C D 4 5 R O アイソフォームの不在により一般に特徴付けられる。それらはまた、サブユニット I L - 7 受容体 - 、 C D 1 2 7 、および共通の鎖、 C D 1 3 2 からなる、機能的 I L - 7 受容体を発現する。ナイーブ状態において、 T 細胞は、恒常的生存機序のため共通のガンマーチェーン I L - 7 および I L - 1 5 を必要とする、静止状態であり、分裂していないと考えられている。

40

【 0 0 9 1 】

50

本明細書において使用される、用語「セントラルメモリーT細胞」またはTcmは、エフェクターメモリーT細胞、もしくはTemと比較し、より低い発現またはアポトーシス促進性シグナル伝達遺伝子、例えば、Bid、Bnip3およびBadを有し、遺伝子がCD62L、CXCR3、CCR7を含む、二次リンパ器官への輸送と関連する、より高発現の遺伝子を有するT細胞の亜群あるいは亜集団を指す。

#### 【0092】

本明細書において使用される、用語「幹メモリーT細胞」、または「幹細胞メモリーT細胞」、またはTscmは、自己再生し、Tcm、TemおよびTeff(エフェクターティーT細胞)を生み出す能力があり、CD27、ならびに長期免疫を仲介するのに重要な特性であるCCR7およびCD62Lのようなリンパ球系ホーミング分子を発現するT細胞の亜群または亜集団を指す。本明細書において使用される、用語「NK細胞」または「ナチュラルキラー細胞」は、CD56またはCD16の発現、およびT細胞受容体(CD3)の不在により定義される末梢血リンパ球のサブセットを指す。本明細書において使用される、用語「養子NK細胞」および「メモリーNK細胞」は、互換可能であり、表現型の上でCD3-かつCD56+であり、CD57+、NKG2CおよびCD57、ならびに場合により、CD16の少なくとも1つを発現し、有するが、以下の:+、低PLZF、低SYK、FcεR、および低FcR、低EAT-2、低TIGIT、低PD1、低CD7、低CD161、高LILRB1、高CD45RO、ならびに低CD45RAの1つまたは複数の発現を欠くNK細胞のサブセットを指す。幾つかの実施形態において、CD56+NK細胞の単離された亜集団は、NKG2CおよびCD57の発現を含む。幾つかの他の実施形態において、CD56+NK細胞の単離された亜集団は、CD57、CD16、NKG2C、CD57、NKG2D、NCRリガンド、Nkp30、Nkp40、Nkp46、活性化するおよび阻害性KIR、NKG2A、ならびに/またはDNAM-1の発現を含む。CD56+は、弱い発現または完全な発現であり得る。

10

20

30

#### 【0093】

本明細書において使用される、用語「NKT細胞」または「ナチュラルキラーT細胞」は、T細胞受容体(TCR)を発現する、CD1d拘束T細胞を指す。従来の主要組織適合性(MHC)分子により提示されるペプチド抗原を検出する従来のT細胞と異なり、NKT細胞は、CD1d、非古典的MHC分子により提示される脂質抗原を認識する。2つのタイプのNKT細胞が、現在認められている。インバリアントまたはタイプI NKT細胞は、非常に制限されたTCRレパートリー、鎖の制限されたスペクトル(ヒトにおいてV11)と関連する古典的-鎖(ヒトにおいてV24-J18)を発現する。非古典的または非インバリアントなタイプII NKT細胞と呼ばれる、NKT細胞の第2の集団は、より不均一なTCRを使用を提示する。タイプI NKT細胞は、現在、免疫療法に適していると考えられている。養子またはインバリアントな(タイプI)NKT細胞は、以下のマーカー、TCR Va24-Ja18、Vb11、CD1d、CD3、CD4、CD8、aGalCer、CD161およびCD56の少なくとも1つまたは複数の発現で同定することができる。

#### 【0094】

本明細書において使用される、用語「単離された」などは、その本来の環境から分けられた細胞、または細胞の集団を指し、すなわち、単離された細胞の環境は、「単離されていない」参照細胞が存在する環境において見られる少なくとも1つの成分を実質的に含まない。用語は、その天然の環境、例えば、組織、生検において見られる幾つかまたは全ての成分から取り出された細胞を含む。用語はまた、細胞が天然に存在しない環境、例えば、培養液、細胞懸濁液において見られる、少なくとも1つ、幾つか、または全ての成分から取り出された細胞を含む。それ故、単離された細胞は、天然で見られるか、または天然に存在しない環境において成長するか、保存されるか、もしくは存在する、他の物質、細胞あるいは細胞集団を含む、少なくとも1つの成分から部分的あるいは完全に分けられる。単離された細胞の具体的な例は、部分的に純粋な細胞、実質的に純粋な細胞、および天然に存在しない培地において培養された細胞を含む。単離された細胞は、所望される細胞

40

50

、またはその集団を環境内の他の物質または細胞から分けることから、あるいは環境から1つもしくは複数の他の細胞集団または亜集団を取り出すことから、得られてもよい。本明細書において使用される、用語「精製する」などは、純度を増大させることを指す。例えば、純度は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%まで増大され得る。

【0095】

本明細書において使用される、用語「集団」は、T、NKまたはNKT細胞に関して使用されるとき、それぞれ、2つもしくはそれ以上のT、NK、またはNKT細胞を含む細胞の群を指す。T細胞を例として使用すると、T細胞の単離された、または濃縮された集団は、唯一1つのタイプのT細胞を含み得るか、または2つもしくはそれ以上のタイプのT細胞の混合物を含み得る。T細胞の単離された集団は、1つのタイプのT細胞の均一な集団、または2つもしくはそれ以上のタイプのT細胞の不均一な集団であり得る。T細胞の単離された集団はまた、T細胞、および少なくともT細胞以外の細胞、例えば、B細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋細胞、脳細胞などを有する不均一な集団であり得る。不均一な集団は、0.01%～約100%のT細胞を有し得る。したがって、T細胞の単離された集団は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%のT細胞を有し得る。T細胞の単離された集団は、本明細書において開示されるものを含むが、これらに限定されない、1つもしくは複数、または全ての異なるタイプのT細胞を含み得る。1つより多くのタイプのT細胞を含むT細胞の単離された集団において、それぞれのタイプのT細胞の割合は、0.01%～99.99%の範囲にあり得る。単離された集団はまた、T細胞のクローナルな集団であり得、ここで、集団の全てのT細胞は、单一のT細胞のクローンである。

10

20

30

【0096】

T、NKまたはNKT細胞の単離された集団は、ヒト末梢血または臍帯血のような天然供給源から得られてもよい。細胞を組織または細胞混合物から分離して様々な細胞タイプを分ける様々な方法が、当該技術分野において開発された。幾つかの場合において、これらの操作は、細胞の比較的均一な集団をもたらす。T細胞は、本明細書において記載されるソーティングもしくはセレクションプロセスにより、または当該技術分野において公知の他の方法により単離することができる。単離された集団におけるT細胞の割合は、天然の供給源におけるT細胞の割合より、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、または約95%高くなり得る。単離された集団のT細胞は、一般的なT細胞、または1つもしくは複数の特異的なタイプのT細胞であり得る。

【0097】

本明細書において使用される、用語「亜集団」は、T、NKまたはNKT細胞に関して使用されるとき、天然で見られる、決して全てではないタイプのT、NK、もしくはNK-T細胞をそれぞれ含むT、NKまたはNKT細胞の集団を指す。

【0098】

本明細書において使用される、用語「多能性」は、身体または体細胞（すなわち、胚本体）の全ての系列を形成する細胞の能力を指す。例えば、胚性幹細胞は、3種の胚葉、外胚葉、中胚葉、および内胚葉のそれぞれから細胞を形成することができる、多能性幹細胞の一種である。多能性は、完全な生物を生じることができない不完全または部分的に多能性の細胞（例えば、エピプラスト幹細胞もしくはE p i S C）から、完全な生物を生じることができるより原始的な、より多能性の細胞（例えば、胚性幹細胞）までの範囲にある一連の発生能力である。

40

【0099】

本明細書において使用される、用語「誘導多能性幹細胞」または「iPSC」は、全3種の胚もしくは胚葉：中胚葉、内胚葉、および外胚葉の組織に分化する能力がある細胞に誘導されたか、または変化させた（すなわち、リプログラミングされた）、分化した成熟細胞から生み出された幹細胞を指す。

50

## 【0100】

本明細書において使用される、用語「胚性幹細胞」は、胚胎盤の内部細胞塊の天然に存在する多能性幹細胞を指す。胚性幹細胞は、多能性であり、3種の原始胚葉：外胚葉、内胚葉および中胚葉の全ての派生物への発生中に生じる。それらは、胚体外膜または胎盤には関与せず、全能性ではない。

## 【0101】

本明細書において使用される、用語「前駆細胞」は、より高い発生ポテンシャル、すなわち、それが分化により生じ得る細胞と比べ、より原始的である（例えば、発生経路または進行に沿った初期の段階にある）細胞の表現型を有する細胞を指す。しばしば、前駆細胞は、有意または非常に高い増殖ポテンシャルを有する。前駆細胞は、より低い発生ポテンシャルを有する複数の別々の細胞、すなわち、分化した細胞タイプ、または発生経路、および細胞が発生し、分化する環境に依存し、単一の分化した細胞タイプを生じができる。

10

## 【0102】

本明細書において使用される、用語「リプログラミング」または「脱分化」または「細胞能力を増大すること」または「発生能力を増大すること」は、細胞の能力を増大させる方法、または細胞をより少なく分化した状態に脱分化させる方法を指す。例えば、増大した細胞能力を有する細胞は、リプログラミングされていない状態にある同じ細胞と比較して、より発生的柔軟性を有する（すなわち、より多くの細胞タイプに分化することができる）。言い換えると、リプログラミングされた細胞は、リプログラミングされていない状態にある同じ細胞より少なく分化した状態にあるものである。

20

## 【0103】

本明細書において使用される、用語「分化」は、特化されていない（「確約されていない」）またはより少なく特化された細胞が、例えば、血液細胞または筋細胞のような、特化された細胞の特性を取得するプロセスである。分化したまたは分化を誘導された細胞は、細胞の系列内により特化された（「確約された」）位置を得たものである。用語「確約された」は、分化のプロセスに適用されるとき、分化の経路において、通常の状況下で、それらが、特定の細胞タイプまたは細胞タイプのサブセットに継続して分化するであろうポイント、および通常の状況下で、異なる細胞タイプに分化することができないか、またはより少なく分化した細胞タイプに戻ることができないポイントに進んだ細胞を指す。

30

## 【0104】

本明細書において使用される、用語「コードする」は、遺伝子、cDNA、またはmRNAのような、ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特具体的な配列の、所定の配列のヌクレオチド（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）または所定の配列のアミノ酸およびそれから生じる生物学的特性のいずれかを有する、生物学的プロセスにおいて他のポリマーならびに高分子の合成の鑄型として機能を果たす、固有の特性を指す。したがって、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が、細胞または他の生物学的システムにおいてタンパク質を産生するなら、タンパク質をコードする。mRNA配列と同一であり、配列表において通常提供されるもののヌクレオチド配列であるコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写の鑄型として使用される非コード鎖の両方が、その遺伝子もしくはcDNAのタンパク質または他の産物をコードするとして言及され得る。

40

## 【0105】

本明細書において使用される、用語「外来」は、言及される分子または言及される活性が、宿主細胞に導入されることを意味することが意図される。分子は、例えば、宿主染色体への組込みにより、またはプラスミドのような非染色体遺伝子物質としてのよう、コード核酸の宿主遺伝子物質への導入により、導入することができる。それ故、コード核酸の発現に関して使用される用語は、発現可能な形態のコード核酸の細胞への導入を指す。用語「内在性」は、宿主細胞に存在する言及された分子または活性を指す。同様に、用語は、コード核酸の発現に関して使用されるとき、細胞内に含まれ、外来で導入されないコード核酸の発現を指す。

50

## 【0106】

本明細書において使用される、用語「ポリヌクレオチド」は、任意の長さのヌクレオチドの重合形態、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはその類似体を指す。ポリヌクレオチドの配列は、4種のヌクレオチド塩基：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；およびポリヌクレオチドがRNAであるとき、チミンの代わりにウラシル（U）からなる。ポリヌクレオチドは、遺伝子または遺伝子フラグメント（例えば、プローブ、プライマー、ESTもしくはSAGEタグ）、エクソン、インtron、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマーを含み得る。ポリヌクレオチドはまた、2本鎖分子と1本鎖分子の両方を指す。

## 【0107】

本明細書において使用される、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、互換的に使用され、ペプチド結合により共有結合したアミノ酸残基を有する分子を指す。ポリペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなければならず、ポリペプチドのアミノ酸の最大数に制限は設けられない。本明細書において使用される、用語は、ペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーなどとして当該技術分野において一般にまた言及される短鎖と、ポリペプチドまたはタンパク質として当該技術分野において一般的に言及されるより長い鎖の両方を指す。「ポリペプチド」は、数ある中でも、例えば、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドのバリエント、修飾されたポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質を含む。ポリペプチドは、天然のポリペプチド、組換えポリペプチド、合成ポリペプチド、またはその組み合わせを含む。

## 【0108】

本明細書において使用される、用語「生体外で」は、生物、好ましくは、天然の状態の最小の変化を有する生物の外側の人工的な環境内の生きている組織内もしくは組織上で行われる実験または測定のような、生物の外側で生じる活動を指す。「生体外での」手法は、生物から採取され、実験装置において、通常無菌条件下で、典型的には数時間もしくは最大約24時間だが、状況に依存して、最大2～28日間を含む間、培養された生きている細胞または組織を含み得る。かかる組織または細胞はまた、収集され、凍結され、生体外での処理のため後に融解され得る。生きている細胞もしくは組織を使用した数日より長く続く組織培養実験または手法は、典型的には、「試験管内」であるとみなされるが、ある種の実施形態において、この用語は、生体外と互換的に使用することができる。一方で、細胞生着、細胞ホーミング、細胞の自己再生、および細胞の拡大のような「生体内」活動は、生物の内部で生じる。

## 【0109】

本明細書において使用される、用語「試験管内」は、試験管内、培養皿内、または生きている生物の外側のどこかで行われるか、または生じる活動を指す。

## 【0110】

本明細書において使用される、用語「薬剤」、「調節薬剤」、および「モジュレーター」は、本明細書において互換的に使用され、免疫細胞を含む細胞の遺伝子発現特性もしくは生物学的特性を修飾する能力がある化合物または分子を指す。薬剤は、単一の化合物もしくは分子、または1つより多くの化合物もしくは分子の組み合わせであり得る。

## 【0111】

本明細書において使用される、用語「接触する」、「処理する」、または「調節する」は、免疫細胞に関して使用されるとき、本明細書において互換的に使用され、免疫細胞を本明細書において開示される薬剤の1つまたは複数と共に培養すること、インキュベーションすること、または曝露することを指す。

## 【0112】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される、「接触されていない」または「処理されていない」細胞は、対照薬剤以外の薬剤で処理されていない、例えば、培養されていない、接触されていない、またはインキュベーションされていない細胞である。DMSOのような対照薬剤と接触させた、または別のビヒクルと接触させた細胞は、接触させていない細胞の例である。

#### 【0113】

本明細書において使用される、「フィーダー細胞」または「フィーダー」は、フィーダー細胞が、もう一つの細胞タイプのサポートのための刺激、成長因子および栄養をもたらすので、もう一つのタイプの細胞が成長することができる環境をもたらすために、もう一つのタイプの細胞と共に培養される片方のタイプの細胞を記載する用語である。フィーダー細胞は、場合により、それらがサポートする細胞と異なる種由来である。例えば、幹細胞を含む、ある種のタイプのヒト細胞は、マウス胚線維芽細胞、または不死化マウス胚線維芽細胞の初代培養物により、サポートされ得る。別の例では、末梢血由来細胞または形質転換された白血病細胞が、ナチュラルキラー細胞の拡大および成熟をサポートする。フィーダー細胞は、典型的には、他の細胞と共に培養されるとき、それらがサポートする細胞をそれらが成長させ過ぎるのを防ぐために照射またはマイトイシンのような抗有糸分裂剤での処理により不活化され得る。フィーダー細胞は、内皮細胞、ストロマ細胞（例えば、上皮細胞または線維芽細胞）、および白血病細胞を含み得る。前述のものに限定されることなく、1つの具体的なフィーダー細胞タイプは、ヒト皮膚線維芽細胞のような、ヒトフィーダーであり得る。別のフィーダー細胞タイプは、マウス胚線維芽細胞（MEF）であり得る。一般に、様々なフィーダー細胞を部分的に使用して、多能性を維持し、ある種の系列への分化を指示し、増殖能力を増強し、エフェクター細胞のような、固有の細胞タイプへの成熟を促進することができる。

#### 【0114】

本明細書において使用される、「フィーダーフリー」（FF）な環境は、フィーダーもしくはストロマ細胞を本質的に含まず、および/またはフィーダー細胞の培養により事前に馴化させていない培養条件、細胞培養あるいは培地のような環境を指す。「予め条件付けられた」培地は、フィーダー細胞が、培地内で少なくとも1日間のような期間培養された後に回収された培地を指す。事前に馴化させた培地は、培地において培養されたフィーダー細胞により分泌された成長因子およびサイトカインを含む、多くのメディエーター物質を含有する。幾つかの実施形態において、フィーダーフリーな環境は、フィーダーまたはストロマ細胞の両方を含まず、またフィーダー細胞の培養により事前に馴化させていない。

#### 【0115】

本明細書において使用される、用語「類似体」は、それが、親化学物質と同じ化学骨格および機能を保持するなら、1つの單一エレメントもしくは基、または1つより多くの基（例えば、2、3、もしくは4つの基）で構造上異なる、構造および機能において別の化学物質に類似する化学分子を指す。かかる修飾は、当業者にとって日常的なことであり、例えば、酸のエステルもしくはアミド、アルコールもしくはチオールについてのベンジル基のような保護基、およびアミンについてのtert-ブトキシリカルボニル基のような、追加または置換された化学物質部分を含む。アルキル置換（例えば、メチル、ジメチル、エチルなど）のようなアルキル側鎖に対する修飾、側鎖の飽和または不飽和のレベルに対する修飾、ならびに置換されたフェニルおよびフェノキシのような修飾された基の付加もまた、含まれる。類似体はまた、ビオチンまたはアビジン部分のような抱合体、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素を含み得、放射標識された部分、生物発光部分、化学発光部分、または蛍光部分を含む。また、部分を、本明細書において記載される薬剤に加えて、他の望ましい特性の中でも、生体内もしくは生体外で半減期を増大すること、またはそれらの細胞侵入特性を増大することのような、それらの薬物動態特性を変更することができる。医薬の多数の望ましい性質（例えば、溶解性、バイオアベイラビリティ、製造など）を増強することが知られているプロドラッグも含まれる。

#### 【0116】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される、用語「増大」は、ビヒクルもしくは対照分子／組成物のいずれかにより引き起こされる応答と比較して、細胞においてより大きな生理的応答（すなわち、下流の効果）を生み出すか、または引き起こす薬剤の能力を指し、例えば、インターロイキン4またはインターロイキン10の産生は、T細胞の単離された集団により増大される。増大は、ある種の細胞シグナル伝達経路を介したシグナル伝達経路の増加の結果としての遺伝子発現における増大であり得る。「増大した」量は、典型的には、統計上有意な量であり、ビヒクル（薬剤の不在）もしくは対照組成物により生み出される応答と比較して、1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30またはそれ以上の倍数（例えば、500、1000倍）（1の間かつ1より上の全ての整数および小数点、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8など）である増大を含み得る。

10

#### 【0117】

本明細書において使用される、用語「低下」は、ビヒクルもしくは対照分子／組成物のいずれかにより引き起こされる応答と比較して、細胞においてより小さい生理的応答（すなわち、下流の効果）を生み出すか、または引き起こす薬剤の能力を指す。低下は、遺伝子発現における低下、細胞シグナル伝達における低下、または細胞増殖における低下であり得る。「低下した」量は、典型的には、「統計上有意な」量であり、ビヒクル（薬剤の不在）もしくは対照組成物により生み出される応答の、1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30またはそれ以上の倍数（例えば、500、1000倍）（1の間かつ1より上の全ての整数および小数点、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8など）である低下を含み得る。

20

#### 【0118】

本明細書において使用される、用語「相乗効果」または「相乗的」は、2つもしくはそれ以上の実体が一緒に働くことが、組み合わせにおける2つまたはそれ以上の実体が、それ他の効果を弱めるか、または中和するとき使用される「拮抗的」と比較して、および組み合わせにおける2つまたはそれ以上の実体が、それらの個々の効果の合計とほぼ等しい効果を生じるとき使用される「相加的」と比較して、それらの個々の効果の合計より大きな効果を生じるような、増強された効果についての2つまたはそれ以上の実体の組み合わせを指す。

30

#### 【0119】

本明細書において使用される、用語「実質的に含まない」は、細胞集団または培地のような組成物を記載するために使用されるとき、特定の物質の95%フリー、96%フリー、97%フリー、98%フリー、99%フリー、または従来の手段により測定され、検出可能でない特定の物質のような、任意の供給源の特定の物質を含まない組成物を指す。組成物の特定の物質または成分の不在に言及する場合、同様の意味が、用語「の不在」に適用され得る。

#### 【0120】

本明細書において使用される、用語「約」または「およそ」は、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、大きさ、量、重さもしくは長さに対して15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%または1%と同じくらいで変動する、量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、大きさ、量、重さあるいは長さを指す。量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、大きさ、量、重さまたは長さの範囲は、±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、もしくは±1%のおよそ参照の量、レベル、値、数、出現頻度、パーセンテージ、寸法、大きさ、量、重さまたは長さであり得る。

40

#### 【0121】

本明細書において使用される、用語「対象」は、哺乳類を指す。対象は、ヒト、またはイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、マウス、ラット、ウサギ、もしくはその遺伝子導入種のような非ヒトであり得る。

#### 【0122】

50

本明細書において使用される、用語「処置する」などは、対象に関して使用されるとき、疾患の症状の改善または除去を達成することを含むが、これらに制限されることなく、所望される薬理的および／または生理的効果を得ることを指す。効果は、疾患もしくはその症状を完全または部分的に妨げるという観点で、予防的であり得、ならびに／あるいは症状の改善または除去を達成するか、あるいは疾患および／もしくは疾患に起因する副作用の部分的または完全な治癒をもたらすという観点で治療的であり得る。用語「処置」は、哺乳類における、特に、ヒトにおける疾患の任意の処置を含み、(a) 疾患の素因があり得るが、まだそれを有すると診断されていない対象において疾患が生じるのを妨げること；(b) 疾患を阻害すること、またはその発症を止めること；(c) 疾患を軽減すること、または疾患の退縮を引き起こすこと、または疾患の症状を完全もしくは部分的に除去すること；および(d) 造血系を元に戻すことのような、個体を前疾患状態に回復させることを含む。

#### 【0123】

本明細書において使用される、「遺伝子修飾」は、(1)再編成、変異、遺伝子インプリントингおよび／もしくはエピジェネティック修飾から天然にもたらされるもの、または(2)細胞のゲノムにおける挿入、欠失もしくは置換を介したゲノム操作を介して得られるものを含む、遺伝子編集を指す。本明細書において使用される、遺伝子修飾はまた、ドナー、疾患、もしくは処置応答に特異的である、供給源特異的免疫細胞の1つまたは複数の保持可能な治療特質を含む。

#### 【0124】

本明細書において使用される、用語「遺伝子インプリント」は、供給源細胞における優先的な治療特質に関する遺伝子またはエピジェネティック情報を指す。具体的に選択されたドナー、疾患または処置状況から得られる供給源細胞の態様において、優先的な治療特性に関する遺伝子インプリントは、同定されるかもしくはされない基本的な分子現象に関わりない、保存可能な表現型、すなわち、優先的な治療特性を明らかにする任意の状況特異的遺伝子またはエピジェネティック修飾を含んでもよい。ドナー、疾患、または処理応答に特異的な供給源細胞は、iPSCおよびもたらされた造血系細胞において保持可能である遺伝子インプリントを含んでもよく、遺伝子インプリントは、例えば、ウイルス特異的T細胞またはインバリアントなナチュラルキラーT(iNKT)細胞由来の事前に決められた単一特異的TCR；例えば、選択されたドナーにおいて高親和性CD16受容体をコードする点変異についてホモ接合性である、トラッキング可能かつ望ましい遺伝子多型；ならびに事前に決定されたHLA要求、すなわち、増大した集団を伴って表現型を提示する、選択されたHLA一致ドナー細胞を含むが、これらに限定されない。本明細書において使用される、優先的な治療特性は、もたらされた細胞の改善された生着、輸送、ホーミング、バイアビリティー、自己再生、持続性、免疫応答制御および調節、生存、ならびに細胞毒性を含む。優先的な治療特性はまた、抗原ターゲティング受容体発現；HLA提示またはその欠如；腫瘍微小環境に対する抵抗性；バイスタンダー免疫細胞の導入および免疫調節；腫瘍を離れた効果の低減を伴った改善された的中した特異性；化学療法のような処置に対する抵抗性に関するものであってもよい。

#### 【0125】

本明細書において使用される、用語「セーフティスイッチタンパク質」は、細胞療法の可能性のある毒性またはそうでなければ副作用を妨げるよう設計された操作されたタンパク質を指す。ある場合において、セーフティスイッチタンパク質発現は、セーフティスイッチタンパク質をコードする遺伝子をそのゲノムに持続的に取り込んだ移植された操作された細胞についての安全性の関心に対処するよう条件付きで調節される。この条件付き制御は、可変であり得、小分子により仲介される翻訳後活性化ならびに組織特異的および／または一時的な転写制御を介した調節を含んでもよい。セーフティスイッチは、アポトーシスの誘導、タンパク質合成の阻害、DNA複製、成長停止、転写および転写後遺伝子制御、ならびに／または抗体により仲介される枯渇を仲介することができる。ある場合において、セーフティスイッチタンパク質は、活性化されたとき、治療細胞のアポトーシスお

10

20

30

40

50

および／または細胞死の引き金を引く、外来分子、例えば、プロドラッグにより活性化される。セーフティスイッチタンパク質の例は、カスパーゼ9（またはカスパーゼ3もしくは7）、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、B-細胞CD20、修飾されたEGFR、およびその任意の組み合わせのような、自殺遺伝子を含むが、これらに限定されない。このストラテジーにおいて、有害現象の場合に投与されるプロドラッグは、自殺遺伝子産生により活性化され、導入された細胞を殺傷する。

【0126】

本明細書において使用される、「治療上十分量」は、その意味において、所望される治療効果をもたらすことが言及されている特定の治療および／もしくは医薬組成物の非毒性だが、十分量ならびに／または有効量を含む。要求される正確な量は、患者の一般的な健康状態、患者の年齢、ならびに状態のステージおよび重症度のような要因に依存して、対象から対象で変動するだろう。特定の実施形態において、治療上十分量は、処置されている対象の疾患または状態と関連する少なくとも1つの症状を向上させる、低減する、および／もしくは改善するのに十分ならびに／または有効である。

10

【0127】

I. 細胞ベースの養子免疫療法の有効性を改善するための薬剤

本発明は、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための1つまたは複数の薬剤を十分量で含む組成物を提供する。改善された治療可能性を有する免疫細胞は、改善された増殖、持続性、細胞毒性、および／または細胞リコール／メモリーを提示する。免疫細胞は、特異的に改善された生体内増殖、生体内持続性、生体内細胞毒性、および／または生体内細胞リコール／メモリーを有してもよい。免疫細胞を改善するために、治療可能性は、T細胞集団におけるより良好な性質の免疫細胞を一般的に必要とし、例えば、ナイーブT細胞、幹細胞メモリーT細胞、ならびに／またはセントラルメモリ－T細胞の、その維持、拡大、分化、および／もしくは脱分化を介した数あるいは割合の増大は、改善された生体内養子治療可能性についての、T細胞のより良好な性質の指標である。NK細胞集団において、例えば、その維持、サブタイプ偏向、拡大、分化、および／もしくは脱分化を介した養子NK細胞の数または割合の増大は、改善された生体内養子治療可能性についての、NK細胞のより良好な性質の指標である。NKT細胞集団に関して、例えば、その維持、サブタイプスイッチング、拡大、分化、および／もしくは脱分化を介したタイプI NKT細胞の数または割合の増大は、改善された生体内養子治療可能性についての、NKT細胞のより良好な性質の指標である。

20

【0128】

養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞は、表1において含まれる1つまたは複数の薬剤と接触させられるか、それで処理されるか、または調節される。薬剤（複数を含む）での処理は、細胞拡大、維持、分化、脱分化、および／もしくは生存率を調節することによる、ならびに／または増殖、細胞毒性、持続性、および／もしくは細胞リコール／メモリー、そしてこれにより、処理された細胞の治療可能性を増大させることによる、を含む、細胞、あるいは細胞の亜集団の生物学的特性を修飾することができる。例えば、処理は、試験管内と生体内の両方で治療免疫細胞の生存率を改善することができる。さらに、処理は、処理された細胞集団の異なる亜集団の割合を変化させることができる。例えば、1つの実施形態において、ナイーブT細胞、幹細胞メモリーT細胞、および／またはセントラルメモリ－T細胞の数ならびに割合は、表1から選択される薬剤、ならびにその誘導体および類似体の1つまたは複数を使用した処理の際、単離されたT細胞集団において増大する。別の実施形態において、表1から選択される薬剤、ならびにその誘導体および類似体の1つまたは複数を使用したNKT細胞集団の処理の際、養子NK細胞の数およびパーセンテージは、集団において増大される。

30

【0129】

40

50

## 【表1-1】

表1-1 養子細胞療法における免疫細胞調節のための薬剤

化合物	CAS番号	群	群の記述
ドルソモルフィン	866405-64-3	I	代謝および栄養素センシング
ヘプテリジン酸	74310-84-2	I	代謝および栄養素センシング
1-ピロリジンカルボジチオ酸、 アンモニウム塩	5108-96-3	I	代謝および栄養素センシング
2-デオキシグルコース(2-DG)	154-17-6	I	代謝および栄養素センシング
GSK3阻害剤	例えば、BIO:6 67463-62-9;T WS119:601514- 19-6;CHIR9902 1: 252917-06- 9を含む	II	シグナル伝達経路
Rhoキナーゼ阻害剤	例えば、チアゾ ビビン:122605 6-71-8を含む	II	シグナル伝達経路
MEK阻害剤	例えば、PD032 5901:391210-1 0-9;U0126:109 511-58-2を含 む	II	シグナル伝達経路
PDK1アゴニスト	例えば、PS48: 1180676-32-7 を含む	II	シグナル伝達経路
TGF $\beta$ 阻害剤	例えば、SB431 542:301836-41 -9を含む	II	シグナル伝達経路
6-メルカプトプリン	6112-76-1	II	シグナル伝達経路
AC-93253ヨウ化物	108527-83-9	II	シグナル伝達経路
チラトリコール	51-24-1	II	シグナル伝達経路
PI-103	371935-74-9	II	シグナル伝達経路
フルベストラント	129453-61-8	II	シグナル伝達経路
タブシガルジン	67526-95-8	II	シグナル伝達経路

10

20

30

## 【0130】

40

50

## 【表1-2】

表1-養子細胞療法における免疫細胞調節のための薬剤

化合物	CAS番号	群	群の記述	
SU4312	5812-07-7	II	シグナル伝達経路	10
テルミサルタン	144701-48-4	II	シグナル伝達経路	
サイクロスポリンA	59865-13-3	II	シグナル伝達経路	
1,3,5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール	263717-53-9	II	シグナル伝達経路	
BAY61-3606	732983-37-8	II	シグナル伝達経路	
プロトポルフィリンIX二ナトリウム	553-12-8	II	シグナル伝達経路	
mTOR阻害剤	例えば、ラパマイシン・53123-88-9を含む	II	シグナル伝達経路	
HS173	1276110-06-5	II	シグナル伝達経路	
LY294002	154447-36-6	II	シグナル伝達経路	
ピクチリシブ	957054-30-7	II	シグナル伝達経路	
5-アザシチジン	320-67-2	III	増殖およびアポトーシス	20
フルダラビン	21679-14-1	III	増殖およびアポトーシス	
ロスコビチン、(S)-異性体	186692-45-5	III	増殖およびアポトーシス	
PAC-1	315183-21-2	III	増殖およびアポトーシス	
8-キノリノール、5,7-ジクロロ-	773-76-2	IV	抗感染	
ニトロフラントイン	67-20-9	IV	抗感染	
8-キノリノール、5-クロロ-7-ヨード-	130-26-7	IV	抗感染	
2-ナフタセンカルボキサミド、7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-オクタヒ	64-73-3	IV	抗感染	30
ニフロキサジド	965-52-6	IV	抗感染	
トスフロキサシン塩酸塩	100490-36-6	IV	抗感染	
セルトラリン	79617-96-2	V	他	
ジエチレントリアミンペニタ酢酸、ペニタナトリウム	67-43-6	V	他	
塩化エドロホニウム	116-38-1	V	他	
BIX01294	1392399-03-9	V	他	
テルフェナジン	50679-08-8	V	他	
dmPGE2 (16,16-ジメチルプロスタグランジンE2)	39746-25-3	V	他	40

## 【0131】

理論により制限されるものではないが、表1の薬剤は、細胞代謝、栄養素センシング、増殖、アポトーシス、シグナル伝達、感染過程に関与する特性、および／もしくは他の様の細胞機能の制御を介して細胞拡大、代謝、ならびに／または細胞分化を調節することにより、養子療法の免疫細胞の治療可能性を改善する。当業者により理解される通り、本発明の範囲はまた、表1において挙げられた薬剤の塩、エステル、エーテル、溶媒和物、水和物、立体異性体もしくはプロドラッグを含むが、これらに限定されない、類似体または誘導体を含む。例えば、表1の薬剤、dmPGE2 (16,16-ジメチルプロスタグランジンE2) の類似体および誘導体の実例は、PGE2、16,16-ジメチルPGE2

p - ( p - アセタミドベンズアミド ) フェニルエステル、11 - デオキシ - 16 , 16 - ジメチル P G E<sub>2</sub>、9 - デオキシ - 9 - メチレン - 16 , 16 - ジメチル P G E<sub>2</sub>、9 - デオキシ - 9 - メチレン P G E<sub>2</sub>、9 - ケトフルプロステノール、5 - トランス P G E<sub>2</sub>、17 - フェニル - オメガ - トリノル P G E<sub>2</sub>、P G E<sub>2</sub>セリノールアミド、P G E<sub>2</sub>メチルエステル、16 - フェニルテトラノル P G E<sub>2</sub>、15 ( S ) - 15 - メチル P G E<sub>2</sub>、15 ( R ) - 15 - メチル P G E<sub>2</sub>、8 - イソ - 15 - ケト P G E<sub>2</sub>、8 - イソ P G E<sub>2</sub>イソプロピルエステル、8 - イソ - 16 - シクロヘキシリ - テトラノル P G E<sub>2</sub>、20 - ヒドロキシ P G E<sub>2</sub>、20 - エチル P G E<sub>2</sub>、11 - デオキシ P G E<sub>i</sub>、ノクロプロスト、スルプロストン、ブタプロスト、15 - ケト P G E<sub>2</sub>、および 19 ( R ) ヒドロキシ P G E<sub>2</sub>を含むが、これらに限定されない。9位においてハロゲンで置換されている P G E<sub>2</sub> ( 例えは、国際公開第 2001/12596 号を参照、その開示は参照により全体が本明細書に取り込まれる ) 、ならびに米国公開第 2006/0247214 号 ( その開示は参照により全体が本明細書に取り込まれる ) において記載されるもののような 2 - デカルボキシ - 2 - ホスフィニコプロスタグラジン誘導体に類似する構造を有する P G 類似体または誘導体もまた含まれる。

### 【 0132 】

G S K 3 ( グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 ) 阻害剤は、G S K 3 を標的にする s i R N A 、 m i c r o R N A 、 アンチセンス核酸、および他のポリヌクレオチドのドミナントネガティブバリエントに結合する抗体を含み得る。本明細書において考慮される組成物における使用に適した G S K 3 阻害剤 ( G S K 3 i ) は、ケンパウロン、1 - アザケンパウロン、C H I R 9 9 0 2 1 、 C H I R 9 8 0 1 4 、 A R - A 0 1 4 4 1 8 、 C T 9 9 0 2 1 、 C T 2 0 0 2 6 、 S B 2 1 6 7 6 3 、 A R - A 0 1 4 4 1 8 、 リチウム、T D Z D - 8 、 B I O 、 B I O - アセトキシム、( 5 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル ) - ( 2 - フェニルキナゾリン - 4 - イル ) アミン、ピリドカルバゾール - シクロペナジエニルルテニウム錯体、T D Z D - 8 4 - ベンジル - 2 - メチル - 1 , 2 , 4 - チアジアゾリジン - 3 , 5 - ジオン、2 - チオ ( 3 - ヨードベンジル ) - 5 - ( 1 - ピリジル ) - [ 1 , 3 , 4 ] - オキサジアゾール、O T D Z T 、アルファ - 4 - ジブロモアセトフェノン、A R - A 0 1 4 4 - 1 8 , 3 - ( 1 - ( 3 - ヒドロキシプロピル ) - 1 H - ピロロ [ 2 , 3 - b ] ピリジン - 3 - イル ) - 4 - ピラジン - 2 - イル - ピロール - 2 , 5 - ジオン；T W S 1 1 9 、 L 8 0 3 H - K E A P P A P P Q S p P - N H 2 またはそのミリストイル化形態；2 - クロロ - 1 - ( 4 , 5 - ジブロモ - チオフェン - 2 - イル ) - エタノン；G F 1 0 9 2 0 3 X ； R O 3 1 8 2 2 0 ； T D Z D - 8 ； T I B P O ； および O T D Z T を含むが、これらに限定されない。1つの実施形態において、G S K - 3 阻害剤は、C H I R 9 9 0 2 1 、 B I O 、 T W S 1 1 9 、 またはケンパウロンである。1つの実施形態において、G S K 3 阻害剤は、T W S 1 1 9 である。別の実施形態において、G S K - 3 阻害剤は、C H I R 9 9 0 2 1 である。まだ別の実施形態において、G S K 3 阻害剤は、B I O である。

### 【 0133 】

M E K / E R K 経路阻害剤は、R a f / M E K / E R K 経路の一部である M E K または E R K セリン / スレオニンキナーゼいずれかの阻害剤を指す。本明細書において考慮される組成物における使用に適した E R K / M E K 阻害剤は、P D 0 3 2 5 9 0 1 、 P D 9 8 0 5 9 、 U O 1 2 6 、 S L 3 2 7 、 A R R Y - 1 6 2 、 P D 1 8 4 1 6 1 、 P D 1 8 4 3 5 2 、スニチニブ、ソラフェニブ、バンデタニブ、バゾバニブ、アキシチニブ、G S K 1 1 2 0 2 1 2 、 A R R Y - 4 3 8 1 6 2 、 R O 5 1 2 6 7 6 6 、 X L 5 1 8 、 A Z D 8 3 3 0 、 R D E A 1 1 9 、 A Z D 6 2 4 4 、 F R 1 8 0 2 0 4 、 P T K 7 8 7 、 6 - ( 4 - ブロモ - 2 - クロロ - フェニルアミノ ) - 7 - フルオロ - 3 - メチル - 3 H - ベンゾイミダゾール - e - 5 - カルボン酸 ( 2 , 3 - ジヒドロキシ - プロポキシ ) - アミド；6 - ( 4 - ブロモ - 2 - クロロ - フェニルアミノ ) - 7 - フルオロ - 3 - ( テトラヒドロ - ピラン - 2 - イル m - エチル ) - 3 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボン酸 ( 2 - ヒドロキシ - エトキシ ) - アミド、1 - [ 6 - ( 4 - ブロモ - 2 - クロロ - フェニルアミノ ) -

10

20

30

40

50

7 - フルオロ - 3 - メチル - 3 H - ベンゾイミダ - ゾール - 5 - イル] - 2 - ヒドロキシ - エタノン、6 - (4 - プロモ - 2 - クロロ - フェニルアミノ) - 7 - フルオロ - 3 - メチル - 3 H - ベンゾイミダゾール - e - 5 - カルボン酸 (2 - ヒドロキシ - 1、1 - ジメチル - エトキシ) - アミド、6 - (4 - プロモ - 2 - クロロ - フェニルアミノ) - 7 - フルオロ - 3 - (テトラヒドロ - フラン - 2 - イルm - エチル) - 3 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボン酸 (2 - ヒドロキシ - エトキシ) - アミド、6 - (4 - プロモ - 2 - フルオロ - フェニルアミノ) - 7 - フルオロ - 3 - メチル - 3 H - ベンゾイミダゾール - e - 5 - カルボン酸 (2 - ヒドロキシ - エトキシ) - アミド、6 - (2, 4 - ジクロロ - フェニルアミノ) - 7 - フルオロ - 3 - メチル - 3 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボン酸 (2 - ヒドロキシ - エトキシ) - アミド、6 - (4 - プロモ - 2 - クロロ - フェニルアミノ) - 7 - フルオロ - 3 - メチル - 3 H - ベンゾイミダゾール - e - 5 - カルボン酸 (2 - ヒドロキシ - エトキシ) - アミド、2 - [(2 - フルオロ - 4 - ヨードフェニル)アミノ] - N - (2 - ヒドロキシエトキシ) - 1, 5 - ジメチル - 6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロピリジン - 3 - カルボキサミド；本明細書において以下で M E K 阻害剤 2 として言及される；および 4 - (4 - プロモ - 2 - フルオロフェニルアミノ) - N - (2 - ヒドロキシエトキシ) - 1, 5 - ジメチル - 6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロピリダジン - 3 - カルボキサミド、またはその医薬的に許容される塩を含むが、これらに限定されない。さらなる説明としての M E K / E R K 阻害剤は、国際公開第 99 / 01426 号、第 02 / 06213 号、第 03 / 077914 号、第 05 / 051301 号および第 2007 / 044084 号において開示されるそれらの化合物を含む。1 つの実施形態において、M E K 阻害剤は、P D 0 3 2 5 9 0 1 である。別の実施形態において、M E K 阻害剤は、U 0 1 2 6 である。  
10 20

## 【0134】

R O C K (R h o 関連キナーゼ) 阻害剤は、R h o - G T P a s e / R O C K 経路の阻害剤を指す。経路は、R O C K のさらに下流である (R h o - R O C K - ミオシン I I が経路 / 系を形成する)、下流タンパク質ミオシン I I を含む。したがって、人は、本明細書において記載される効果を達成するための R h o G T P a s e 阻害剤、R O C K 阻害剤、もしくはミオシン I I 阻害剤のいずれかまたは全てを使用することができる。本明細書において考慮される組成物における使用に適した R O C K 阻害剤は、チアゾビピン、Y 2 7 6 3 2、ファスジル、A R 1 2 2 - 8 6、Y 2 7 6 3 2 H - 1 1 5 2、Y - 3 0 1 4 1、W f - 5 3 6、H A - 1 0 7 7、ヒドロキシル - H A - 1 0 7 7、G S K 2 6 9 9 6 2 A、S B - 7 7 2 0 7 7 - B、N - (4 - ピリジル) - N' - (2, 4, 6 - トリクロロフェニル) ウレア、3 - (4 - ピリジル) - 1 H - インドール、(R) - (+) - トランス - N - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミド、および米国特許第 8, 044, 201 号 (参照により全体が本明細書に取り込まれる)において開示される R O C K 阻害剤を含むが、これらに限定されない。1 つの実施形態において、R O C K 阻害剤は、チアゾビピン、Y 2 7 6 3 2、またはピリンテグリンである。1 つの実施形態において、R O C K 阻害剤は、チアゾビピンである。  
30

## 【0135】

アクチビン受容体様キナーゼ 5 (A L K 5) は、T G F に対する細胞応答を仲介する主な T G F 受容体である。リガンド結合の際、恒常的に活性な T R I I キナーゼが、A L K 5 をリン酸化し、消化管において、下流のシグナル伝達カスケードを活性化する。T G F 受容体 / A L K 5 阻害剤は、T G F / A L K 5 受容体に対する抗体、T G F / A L K 5 受容体のドミナントネガティブバリアント、および s i R N A、m i c r o R N A、アンチセンス核酸、ならびに T G F / A L K 5 受容体の発現を抑制する他のポリヌクレオチドを含み得る。本明細書において考慮される組成物における使用に適した T G F 受容体 / A L K 5 阻害剤は、S B 4 3 1 5 4 2 ; A - 8 3 - 0 1 (3 - (6 - メチル - 2 - ピリジニル) - N - フェニル - 4 - (4 - キノリニル) - 1 H - ピラゾール - 1 - カルボチオアミド；2 - (3 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 1, 5 - ナフチリジン、W n t 3 a / B I O、G W 7 8 8 3 8 8 (- { 4 50

- [ 3 - ( ピリジン - 2 - イル ) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル ] ピリジン - 2 - イル }  
 - N - ( テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル ) ベンズアミド ) 、 S M 1 6 、 I N - 1  
 1 3 0 ( 3 - ( ( 5 - ( 6 - メチルピリジン - 2 - イル ) - 4 - ( キノキサリン - 6 - イ  
 ル ) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル ) メチル ) ベンズアミド ) 、 G W 6 6 0 4 ( 2 - フ  
 エニル - 4 - ( 3 - ピリジン - 2 - イル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル ) ピリジン ) 、 S  
 B - 5 0 5 1 2 4 ( 2 - ( 5 - ベンゾ [ 1 , 3 ] ジオキソール - 5 - イル - 2 - t e r  
 t - ブチル - 3 H - イミダゾール - 4 - イル ) - 6 - メチルピリジンヒドロクロリド ) ;  
 S U 5 4 1 6 ; 2 - ( 5 - ベンゾ [ 1 , 3 ] ジオキソール - 5 - イル - 2 - t e r t - ブ  
 チル - 3 H - イミダゾール - 4 - イル ) - 6 - メチルピリジンヒドロクロリド ( S B - 5  
 0 5 1 2 4 ) ; レルデリムマブ ( l e r d e l i m u m b ) ( C A T - 1 5 2 ) ; メテリ  
 ムマブ ( C A T - 1 9 2 ) ; G C - 1 0 0 8 ; I D 1 1 ; A P - 1 2 0 0 9 ; A P - 1 1  
 0 1 4 ; L Y 5 5 0 4 1 0 ; L Y 5 8 0 2 7 6 ; L Y 3 6 4 9 4 7 ; L Y 2 1 0 9 7 6 1  
 ; S D - 2 0 8 ; S M 1 6 ; N P C - 3 0 3 4 5 ; K i 2 6 8 9 4 ; S B - 2 0 3 5 8 0  
 ; S D - 0 9 3 ; グリベック ; 3 , 5 , 7 , 2 ' , 4 ' - ベンタヒドロキシフラボン ( モリ  
 ン ) ; アクチビン - M 1 0 8 A ; P 1 4 4 ; 溶解性 T B R 2 - F c ; およびピリミジン誘  
 導体 ( 例えば、参照により本明細書に取り込まれる、 S t i e f 1 等の国際公開第 2 0 0  
 8 / 0 0 6 5 8 3 号において挙げられるもの ) を含むが、これらに限定されない。さらには  
 「 A L K 5 阻害剤 」 は、非特異的なキナーゼ阻害剤を包含することは意図されていない  
 が、 「 A L K 5 阻害剤 」 は、例えば、 S B - 4 3 1 5 4 2 ( 例えば、 I n m a n , e t  
 a l . , J , M o l . P h a r m a c o l . 6 2 ( 1 ) : 6 5 - 7 4 ( 2 0 0 2  
 ) を参照 ) のような、 A L K 5 に加えて A L K 4 および / または A L K 7 を阻害する阻害  
 剤を包含することは理解されるべきである。 T G F / アクチビン経路の阻害は、 A L K  
 5 を阻害する同様の効果を有するであろうことはさらに確信される。したがって、 T G F  
 / アクチビン経路の任意の阻害剤 ( 例えば、上流もしくは下流 ) は、本明細書における  
 それぞれの段落において記載される A L K 5 阻害剤と組み合わせて、または代わりに使用  
 することができる。典型的な T G F / アクチビン経路阻害剤は、 T G F 受容体阻害剤  
 、 S M A D 2 / 3 リン酸化の阻害剤、 S M A D 2 / 3 と S M A D 4 の相互作用の阻害剤、  
 および S M A D 6 および S M A D 7 の活性化因子 / アゴニストを含むが、これらに限定され  
 ない。さらに、本明細書において記載される分類は、単に、組織的な目的のために過ぎ  
 ず、当業者は、化合物が経路内の 1 つまたは複数のポイントに影響することができ、これ  
 により、化合物が定義された分類の 1 つより多くにおいて機能し得ることを知っているだ  
 ろう。 1 つの実施形態において、 T G F 受容体阻害剤は、 S B 4 3 1 5 4 2 を含む。  
 10  
 20  
 30  
 40

### 【 0 1 3 6 】

P D K 1 または 3 ' - ホスホイノシチド依存性キナーゼ - 1 は、 A K T / P K B および P  
 K C 、 S 6 K 、 S G K を含む多くの他の A G C キナーゼの活性化と関連する優れたキナ  
 ゼである。 P D K 1 の重要な役割は、幾つかの成長因子およびインスリンシグナル伝達を  
 含むホルモンにより活性化されるシグナル伝達経路におけるものである。典型的な P D K  
 1 アゴニストは、スフィンゴシンを含む ( K i n g e t a l , J o u r n a l o f  
 B i o l o g i c a l C h e m i s t r y , 2 7 5 : 1 8 1 0 8 - 1 8 1 1 3 , 2  
 0 0 0 ) 。 P D K 1 の典型的なアロステリック活性化因子は、 P S 4 8 ( ( Z ) - 5 - ( 4 -  
 クロロフェニル ) - 3 - フェニルペンタ - 2 - エン酸 ) 、 P S 0 8 ( ( Z ) - 5 - ( 4 -  
 ブロモ - 2 - フルオロフェニル ) - 3 - フェニルペンタ - 2 - エン酸 ) 、 1 - ( 2 -  
 ( 3 - ( 4 - クロロフェニル ) - 3 - オキソ - 1 - フェニルプロピルチオ ) 酢酸 ; 化合物  
 1 2 Z ( 2 - ( 3 - ( 4 - クロロフェニル ) - 3 - オキソ - 1 - フェニルプロピルチオ )  
 酢酸、 ( Z ) - 5 - ( ナフタレン ( N a p t h a l e n ) - 2 - イル ) - 3 - フェニルペ  
 ンタ - 2 - エン酸 ) 、および化合物 1 3 Z ( ( Z ) - 5 - ( 1 H - インドール - 3 - イル  
 ) - 3 - フェニルペンタ - 2 - エン酸 ) のような 3 , 5 - ジフェニルペンタ - 2 - エン酸  
 を含む。 1 つの実施形態において、 P D K 1 アゴニストは、 P S 4 8 を含む。  
 50

### 【 0 1 3 7 】

ラパマイシン ( m T O R ) 阻害剤の哺乳類標的は、ラパマイシンの哺乳類標的の活性を

ロックする。mTORは、細胞成長および血管新生を刺激する成長因子を制御する、タンパク質キナーゼである。本発明の組成物および方法に適したmTOR阻害剤は、ラパマイシン、ならびにシロリムス、シロリムス誘導体、テムシロリムス、40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン(エベロリムス)、40-O-(3-ヒドロキシ)プロピル-ラパマイシン、40-O-[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-テトラゾール-ラパマイシン、ならびに他のO-アルキル化またはO-メチル化ラパマイシン誘導体を含むその類似体および誘導体を含むが、これらに限定されない。

#### 【0138】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、表1から選択される少なくとも1つの薬剤、ならびにその誘導体および類似体を含む。1つの実施形態において、免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、表1から選択される薬剤、ならびにその誘導体および類似体の少なくとも2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つ、または任意の数の組み合わせを含む。

10

#### 【0139】

1つの実施形態において、表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物は、有機溶媒をさらに含む。ある種の実施形態において、有機溶媒は、酢酸メチルを実質的に含まない。ある種の実施形態において、有機溶媒は、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメトキシエタン(DME)、ジメチルアセトアミド、エタノール、およびその組み合わせからなる群から選択される。幾つかの実施形態において、有機溶媒はDMSOである。幾つかの実施形態において、有機溶媒はエタノールである。幾つかの他の実施形態において、有機溶媒は、DMSOとエタノールの混合物である。

20

#### 【0140】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群I:ドルソモルフィン、ヘプテリジン酸、1-ピロリジンカルボジチオ酸、および2-DGから選択される少なくとも1つの薬剤を含む。理論に制限されるものではないが、群Iの薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、細胞代謝および栄養素センシングに影響を及ぼし得る。

30

#### 【0141】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群II:GSK3阻害剤、ROCK阻害剤、TGF受容体阻害剤、MEK阻害剤、PDK1アゴニスト、6-メルカプトブリン、AC-93253ヨウ化物、チラトリコール、PI-103、フルベストラント、タブシガルジン、SU4312、U0126、テルミサルタン、サイクロスボリンA、1,3,5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール、BAY61-3606、プロトポルフィリンIX二ナトリウム、mTOR阻害剤、TWS119、HS173、LY294002、およびピクチリシブから選択される少なくとも1つの薬剤を含む。理論に制限されるものではないが、群IIの薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、様々な機能的経路におけるシグナル伝達に影響を及ぼし得る。1つの実施形態において、群IIから選択される薬剤は、mTOR阻害剤である。1つの実施形態において、群IIから選択される薬剤は、ラパマイシン、またはその類似体もしくは誘導体である。幾つかの実施形態において、ラパマイシンの類似体または誘導体は、シロリムス、シロリムス誘導体、テムシロリムス、40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン(エベロリムス)、40-O-(3-ヒドロキシ)プロピル-ラパマイシン、40-O-[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-テトラゾール-ラパマイシン、および他のO-アルキル化またはO-メチル化ラパマイシン誘導体を含むが、これらに限定されない。

40

#### 【0142】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群III:5-アザシチジン、フルダラビン、ロスコビチン、お

50

より P A C - 1 から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む。理論に制限されるものではないが、群 I I I の薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、細胞増殖およびアポトーシスに影響を及ぼし得る。

【 0 1 4 3 】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群 I V : 5 , 7 - ジクロロ - 8 - キノリノール、2 - ナフタセンカルボキサミド、7 - クロロ - 4 - (ジメチルアミノ) - 1 , 4 , 4 a , 5 , 5 a , 6 , 11 , 12 a - オクタヒ、ニフロキサジド、およびトスフロキサシン塩酸塩から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む。理論に制限されるものではないが、群 I V の薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、感染過程に関連する細胞特性に影響を及ぼし得る。

10

【 0 1 4 4 】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群 V : セルトラリン、ジエチレントリアミンペニタ酢酸、塩化エンドロホニウム、B I X 0 1 2 9 4 、テルフェナジン、および d m P G E 2 から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む。理論に制限されるものではないが、群 V の薬剤は、他の可能性のある役割の中でも、拡大、維持、分化、脱分化、生存率、増殖、細胞毒性、細胞リコール、および / または持続性に関連する他の細胞特性に一般的に影響を及ぼし得る。

【 0 1 4 5 】

さらに幾つかの他の実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群 I から選択される少なくとも 1 つの薬剤、ならびに群 I I 、群 I I I 、群 I V 、および / または群 V から選択される 1 つまたは複数の薬剤を含む。

20

【 0 1 4 6 】

幾つかの他の実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群 I I から選択される少なくとも 1 つの薬剤、ならびに群 I 、群 I I I 、群 I V 、および / もしくは群 V から選択される 1 つまたは複数の薬剤を含む。1 つの実施形態において、組成物は、群 I I から選択される薬剤、および群 V から選択される薬剤を含む。1 つの実施形態において、群 I I から選択される薬剤は、m T O R 阻害剤である。1 つの実施形態において、群 I I から選択される薬剤は、ラパマイシン、またはその類似体もしくは誘導体である。幾つかの実施形態において、ラパマイシンの類似体または誘導体は、シロリムス、シロリムス誘導体、テムシロリムス、4 0 - 0 - ( 2 - ヒドロキシ ) エチル - ラパマイシン ( エベロリムス ) 、4 0 - 0 - ( 3 - ヒドロキシ ) プロピル - ラパマイシン、4 0 - 0 - [ 2 - ( 2 - ヒドロキシ ) エトキシ ] エチル - ラパマイシン、4 0 - 0 - テトラゾール - ラパマイシン、および他の O - アルキル化または O - メチル化ラパマイシン誘導体を含むが、これらに限定されない。1 つの実施形態において、群 V から選択される薬剤は、d m P G E 2 、またはその類似体もしくは誘導体である。

30

【 0 1 4 7 】

さらに幾つかの他の実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群 I I I から選択される少なくとも 1 つの薬剤、ならびに群 I 、群 I I 、群 I V 、および / または群 V から選択される 1 つまたは複数の薬剤を含む。

40

【 0 1 4 8 】

さらに幾つかの他の実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群 I V から選択される少なくとも 1 つの薬剤、ならびに群 I 、群 I I 、群 I I I 、および / もしくは群 V から選択される 1 つまたは複数の薬剤を含む。

【 0 1 4 9 】

さらに幾つかの他の実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、群 I V から選択される少なくとも 1 つの薬剤、ならびに群 I 、群 I I 、群 I I I 、および / もしくは群 I V から選択される 1 つまたは複数の薬

50

剤を含む。

【 0 1 5 0 】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、GSK3阻害剤、MEK阻害剤、ROCK阻害剤、TGF阻害剤、PDK1アゴニスト、およびmTOR阻害剤からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤を含む。

【 0 1 5 1 】

幾つかの実施形態において、組成物は、表1から選択される2つまたはそれ以上の薬剤の組み合わせであって、薬剤が組み合わせにおいて相加効果を有する、組み合わせを含む。定義される、「相加的」は、組み合わせにおける2つまたはそれ以上の薬剤が、個々の効果の合計とほぼ等しい効果を生み出すときを指す。幾つかの実施形態において、組み合わせにおける1つまたは複数の薬剤は、同じ群：群I、II、III、IV、またはVに由来する。幾つかの実施形態において、組み合わせにおける1つまたは複数の薬剤は、異なる群に由来する。

10

【 0 1 5 2 】

幾つかの実施形態において、免疫細胞の治療可能性を改善するための組成物は、ラバマイシンとdmpGE2の組み合わせ、またはそれらのそれぞれの類似体および誘導体の組み合わせを含む。

【 0 1 5 3 】

幾つかの実施形態において、組成物は、表1から選択される2つまたはそれ以上の薬剤の相乗的な組み合わせを含む。定義される、「相乗効果」は、それらの個々の効果の合計より高い効果を生み出すように2つもしくはそれ以上の薬剤が一緒に働くことのよう、増強された効果である。1つの実施形態において、相乗的な組み合わせを含む組成物は、TWS119、HS173、LY294002、ピクチリシブ、および2-DGからなる群から選択される少なくとも1つの薬剤を含む。1つの実施形態において、組成物は、TWS119、HS173、LY294002、ピクチリシブ、および2-DGからなる群から選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに表1において挙げられる化合物から選択される1つまたは複数の追加薬剤を含む組み合わせを含む。1つの実施形態において、TWS119を含む組成物は、表1から選択される2つまたはそれ以上の追加薬剤をさらに含む。1つの実施形態において、HS173を含む組成物は、表1から選択される2つまたはそれ以上の追加薬剤をさらに含む。1つの実施形態において、LY294002を含む組成物は、表1から選択される2つまたはそれ以上の追加薬剤をさらに含む。1つの実施形態において、ピクチリシブを含む組成物は、表1から選択される2つまたはそれ以上の追加薬剤をさらに含む。1つの実施形態において、2-DGを含む組成物は、表1から選択される2つまたはそれ以上の追加薬剤をさらに含む。

20

【 0 1 5 4 】

幾つかの実施形態において、表1において挙げられる化合物からなる群から選択される1つまたは複数の薬剤を含む組成物は、ペプチド、サイトカイン、マイトジエン、成長因子、スマールRNA、dsRNA(2本鎖RNA)、単核血液細胞、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分もしくは置換因子、対象となる1つもしくは複数のポリ核酸を含むベクター、抗体およびその抗体フラグメント、ならびに/または化学療法剤もしくは放射性部分からなる群から選択されるさらなる追加の添加剤の1つをさらに含む。幾つかの実施形態において、追加の添加剤は、抗体、または抗体フラグメントを含む。これらの実施形態の幾つかにおいて、抗体、または抗体フラグメントは、ウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態において、抗体、または抗体フラグメントは、腫瘍抗原に特異的に結合する。

30

【 0 1 5 5 】

幾つかの実施形態において、サイトカインおよび成長因子は、以下のサイトカインまたは成長因子：上皮成長因子(EGF)、酸性線維芽細胞増殖因子(aFGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、白血病抑制因子(LIF)、肝細胞成長因子(HGF)

40

50

、インスリン様成長因子1 ( IGF - 1 ) 、インスリン様成長因子2 ( IGF - 2 ) 、ケラチノサイト成長因子 ( KGF ) 、神経成長因子 ( NGF ) 、血小板由来成長因子 ( PDGF ) 、トランスフォーミング成長因子ベータ ( TGF - ) 、血管内皮細胞成長因子 ( VEGF ) トランスフェリン、様々なインターロイキン ( 例えば、IL - 1 ~ IL - 18 ) 、様々なコロニー刺激因子 ( 例えば、顆粒球 / マクロファージコロニー刺激因子 ( GM - CSF ) ) 、様々なインターフェロン ( 例えば、IFN - ) 、幹細胞因子 ( SCF ) およびエリスロポエチン ( Epo ) の1つまたは複数を含む。幾つかの実施形態において、サイトカインは、少なくともインターロイキン - 2 ( IL - 2 ) 、インターロイキン7 ( IL - 7 ) 、インターロイキン - 12 ( IL - 12 ) 、インターロイキン - 15 、インターロイキン18 ( IL - 18 ) 、インターロイキン21 ( IL - 21 ) 、またはその任意の組み合わせを含む。幾つかの実施形態において、組成物の成長因子は、線維芽細胞増殖因子を含む。これらのサイトカインは、市販で、例えば、R & D Systems ( ミネアポリス、ミネアポリス ) から得られてもよく、天然または組換えのいずれかであってもよい。特定の実施形態において、成長因子およびサイトカインは、本明細書において考慮される濃度にて加えられてもよい。ある種の実施形態において、成長因子およびサイトカインは、実験的に決定される、または確立されたサイトカインの技術分野により導かれる濃度にて加えられてもよい。

#### 【 0156 】

幾つかの実施形態において、組成物のマイトジエンは、コンカナバリンAを含む。幾つかの他の実施形態において、フィーダー細胞は、遺伝子的に修飾される。幾つかの実施形態において、フィーダー細胞は、以下：単核血液細胞、胸腺上皮性細網細胞、内皮細胞、線維芽細胞、白血病細胞K562、ラージ細胞、またはフィーダー細胞成分もしくはその置換因子の1つあるいは複数を含む。

#### 【 0157 】

幾つかの実施形態において、1つまたは複数のスモールRNAは、siRNA、shRNA、miRNAおよびアンチセンス核酸を含む。幾つかの他の実施形態において、スモールRNAは、以下：miR - 362 - 5p、miR - 483 - 3p、miR - 210およびmiR - 598の1つまたは複数を含む。

#### 【 0158 】

幾つかの実施形態において、対象となる1つまたは複数のポリ核酸を含むベクターは、組み込みまたは非組み込みである。幾つかの実施形態において、対象となる1つまたは複数のポリ核酸を含むベクターは、アデノウイルスベクター、プラスミドベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、エピソームベクターなどの骨格をさらに含む。幾つかの実施形態において、動物細胞における発現のためのプラスミドベクターは、例えば、pA1 - 11、pXT1、pRC / CMV、pRC / RSV、pCDNA1 / Neoなどを含む。幾つかの実施形態において、ベクターにおいて含まれる1つまたは複数のポリ核酸は、1つまたは複数のタンパク質もしくはポリペプチドをコードする。幾つかの実施形態において、1つまたは複数のポリ核酸は、デルタ様1 ( DLL1 ) 、デルタ様3 ( DLL3 ) 、デルタ様4 ( DLL4 ) 、Jagged1 ( Jag1 ) 、またはJagged2をコードする。幾つかの実施形態において、1つまたは複数のポリ核酸は、Jagged1をコードする。

#### 【 0159 】

#### I I . 養子細胞療法のための免疫細胞

本発明は、表1から選択される1つもしくは複数の薬剤と接触させた免疫細胞の単離された集団または亜集団を含む組成物を提供する。1つの実施形態において、免疫細胞の単離された集団または亜集団は、表1から選択される1つまたは複数の薬剤と免疫細胞の治療可能性を改善するのに十分な量で接触された。幾つかの実施形態において、処理された免疫細胞は、細胞ベースの養子療法において使用される。本発明は、免疫細胞の集団または亜集団、および表1において挙げられる薬剤から選択される1つまたは複数の薬剤をさらに提供し、ここで、表1において挙げられる薬剤から選択される1つもしくは複数の薬

10

20

30

40

50

剤を使用した免疫細胞の集団または亜集団の処理が、養子療法の免疫細胞の治療可能性を改善する。処理は、細胞増殖、細胞毒性、および持続性を改善する、ならびに／または細胞療法の再発率を低減する免疫細胞の生物学的な特性を修飾することができる。

#### 【0160】

幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団は、T細胞を含む。幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団は、NK細胞を含む。幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団は、NKT細胞を含む。

#### 【0161】

幾つかの実施形態において、表1から選択される1つもしくは複数の薬剤と接触させたT細胞の集団または亜集団は、同じ処理をしていないT細胞と比較し、増大した数もしくは割合のナイーブT細胞(Tn)、幹細胞メモリーT細胞(Tscm)、および／またはセントラルメモリーT細胞(Tcm)、ならびに／あるいは改善された細胞増殖、細胞毒性、細胞リコール、および／または持続性を含む。幾つかの実施形態において、Tn、Tscm、および／またはTcmの数は、表1から選択される1つもしくは複数の薬剤での同じ処理をしていない細胞集団におけるTn、Tscm、および／またはTcmの数と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%増大されるか、あるいは少なくとも5、10、15、あるいは20倍増大される。

10

#### 【0162】

幾つかの実施形態において、表1から選択される1つまたは複数の薬剤と接触させたNK細胞の集団または亜集団は、同じ処理をしていないNK細胞と比較し、増大した数もしくは割合の養子(もしくはメモリー)NK細胞、ならびに／または改善された細胞増殖、細胞毒性、細胞リコール、および／もしくは持続性を含む。幾つかの実施形態において、養子NK細胞の数は、表1から選択される1つもしくは複数の薬剤での同じ処理をしていない細胞集団における養子NK細胞の数と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%増大されるか、あるいは少なくとも5、10、15、または20倍増大される。1つの実施形態において、GSK3阻害剤、MEK阻害剤、ROCK阻害剤、TGF阻害剤、PDK1アゴニスト、および／もしくはラバマイシンと接触させたNK細胞の集団または亜集団は、増大した数または割合の養子NK細胞を含む。1つの実施形態において、養子NK細胞は、CD3-およびCD56+、ならびにCD57+、NKG2C+、低PLZF、低SYK、低FcR、低EAT-2、低TIGIT、低PD1、低CD7、低CD161、高LILRB1、高CD45RO、および低CD45RAの少なくとも1つにより特徴付けられる。幾つかの実施形態において、養子NK細胞は、CD57+、NKG2C+、低PLZF、低SYK、低FcR、低EAT-2、低TIGIT、低PD1、低CD7、低CD161、高LILRB1、高CD45RO、および低CD45RAの少なくとも2つである。例えば、養子NK細胞は、CD57+かつNKG2C+であり得る。幾つかの実施形態において、養子NK細胞は、CD57+、NKG2C+、低PLZF、低SYK、低FcR、低EAT-2、低TIGIT、低PD1、低CD7、低CD161、高LILRB1、高CD45RO、および低CD45RAの少なくとも3つである。例えば、養子NK細胞は、SYK-、FcR-、かつEAT-2+であることができる。

20

1つの実施形態において、GSK-3阻害剤は、CHIR99021、BIO、TWS119、またはケンパウロンである。1つの実施形態において、GSK-3阻害剤は、TWS119である。別の実施形態において、GSK-3阻害剤は、CHIR99021である。まだ別の実施形態において、GSK-3阻害剤は、BIOである。1つの実施形態において、mTOR阻害剤は、ラバマイシン、あるいはシロリムス、シロリムス誘導体、テムシロリムス、40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラバマイシン(エベロリムス)、40-O-[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチル-ラバマイシン、40-O-テトラゾール-ラバマイシン、および他のO-アルキル化もしくはO-メチル化ラバマイシン誘導体を含むその類似体または誘導体である。

30

#### 【0163】

40

50

幾つかの他の実施形態において、表1から選択される1つもしくは複数の薬剤と接触させたNKT細胞の集団または亜集団は、表1から選択される1つもしくは複数の薬剤での処理をしていないNKT細胞の単離された集団または亜集団と比較し、タイプI NKT細胞の増大した数あるいはタイプIIに対するタイプI NKT細胞の増大した割合、ならびに/あるいは改善された細胞増殖、細胞毒性、細胞リコール、および/または持続性を含む。幾つかの実施形態において、タイプI NKT細胞の数は、表1から選択される1つもしくは複数の薬剤での同じ処理をしていない細胞集団におけるタイプI NKT細胞の数と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%増大されるか、あるいは少なくとも5、10、15、または20倍増大される。

10

#### 【0164】

幾つかの実施形態において、増大した数もしくは割合のナイーブT細胞(Tn)、幹細胞メモリーT細胞(Tscm)、セントラルメモリーT細胞(Tcm)、養子NKT細胞、および/またはタイプI NKT細胞は、これらの細胞タイプの改善された維持および拡大、ならびに/またはより成熟な細胞サブタイプから所望される分化状態にある細胞サブタイプまでの増大した細胞脱分化/リプログラミングに起因するものである。

#### 【0165】

幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団を、表1において含まれる薬剤の1つまたは複数と接触させた後、集団におけるナイーブT細胞(Tn)、幹細胞メモリーT細胞(Tscm)、セントラルメモリーT細胞(Tcm)の数は、処理されていない免疫細胞集団と比較し、増大され、ここで、Tn、TscmおよびTcmは、CCR7および/またはCD62Lの共発現により特徴付けられる。

20

#### 【0166】

幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団を表1において含まれる薬剤の1つまたは複数と接触させた後、集団における養子NKT細胞の数は、処理されていない免疫細胞集団と比較し、増大され、ここで、タイプI 養子NKT細胞は、CD3-、CD56+、CD16+、NKG2C+、およびCD57+により特徴付けられる。幾つかの他の実施形態において、養子NKT細胞は、CD3-、CD56+、ならびにCD57+、NKG2C+、低PLZF、低SYK、低FcR、低EAT-2、低TIGIT、低PD1、低CD7、低CD161、高LILRB1、高CD45RO、および低CD45RAの少なくとも1つ、2つまたは3つにより特徴付けられる。

30

#### 【0167】

幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団を表1において含まれる薬剤の1つまたは複数と接触させた後、集団におけるタイプI 養子NKT細胞の数は、処理されていない免疫細胞集団と比較し、増大され、ここで、養子NKT細胞は、CD3+、CD56+、TCRV24+、およびTCRV11+により特徴付けられる。

#### 【0168】

幾つかの実施形態において、本明細書において開示される薬剤による処理のためのT、NKTもしくはNKT細胞の集団または亜集団は、ヒトまたは非ヒト哺乳類から単離することができる。かかる非ヒト哺乳類の例は、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびその遺伝子導入種を含むが、これらに限定されない。

40

#### 【0169】

T細胞の集団または亜集団は、末梢血、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、および感染の部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、ならびに腫瘍を含むが、これらに限定されない、多数の供給源から得られるか、または単離され得る。骨髓は、大腿骨、腸骨稜、臀部、肋骨、および他の骨から得ることができる。加えて、ジャーカット、SupT1、および他のもののような、当該技術分野において入手可能なT細胞株をまた使用することができる。

#### 【0170】

NK細胞の集団または亜集団は、末梢血、臍帯血、および腫瘍を含むが、これらに限定

50

されない、多数の供給源から得ることができるか、または濃縮することができる。

【0171】

完全に成熟なNKT細胞は、骨髓、リンパ節組織および臍帯血、胸腺組織に潜在的にみられる成熟NKT細胞のより小さな集団を含む末梢血から得ることができるか、または濃縮することができる。

【0172】

本発明のある種の実施形態において、T、NK、NKT細胞の単離された、もしくは濃縮された集団または亜集団は、Ficoll(商標)分離のような、任意の数の当業者に公知の技術を使用して、血液ユニットから得ることができる。1つの実施形態において、個体の循環血液由来のT、NKまたはNKT細胞は、アフェレーシスにより得られる。アフェレーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、NK細胞、NKT細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含む、細胞を含有する。1つの実施形態において、アフェレーシスにより集められた細胞を洗浄して、血漿分画を取り除き、細胞を、続くプロセッシング工程のため適当な緩衝液または培地に置くことができる。本発明の1つの実施形態において、細胞は、リン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄される。代わりの実施形態において、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、または全部ではないが多くの2価カチオンを欠き得る。当業者は容易に理解するであろうが、洗浄工程は、製造元の指示に従い、半自動「フロースル」遠心分離機(例えば、Cobe 2991 cell processor、Baxter Cytomat、またはHemonetics Cell Saver 5)を使用することによるよう、当業者に公知の方法により、達成され得る。洗浄後、細胞は、例えば、Caフリー、MgフリーなPBS、PlasmaLyte A、または他の食塩水溶液を含むかもしくは含まない緩衝液のような様々な生体適合性緩衝液に再懸濁することができる。あるいは、アフェレーシス試料の望ましくない成分が取り除かれ、細胞は培地に直接再懸濁される。

10

20

【0173】

別の実施形態において、T、NKもしくはNKT細胞の集団または亜集団は、赤血球を溶解し、例えば、PERCOLL(商標)勾配を介した遠心分離により、もしくは向流遠心水篋により、単球を枯渇させることにより、末梢血リンパ球から単離されるか、または濃縮される。

【0174】

30

1つの実施形態において、T細胞の特異的な亜集団は、CD3、CD28、CD4、CD8、CD45RA、CD45RO、CD62L、CCR7、CD27、および/もしくはCD122抗体のようなポジティブまたはネガティブセレクションにより、さらに単離されるか、あるいは濃縮され得る。例えば、1つの実施形態において、T細胞の単離された、もしくは濃縮された集団または亜集団は、DYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 Tのような、抗CD3/抗CD28(すなわち、3×28)抱合ビーズと、所望されるT細胞のポジティブセレクションに十分な期間インキュベーションすることにより、拡大され、活性化される。1つの実施形態において、期間は、約30分間である。さらなる実施形態において、期間は、30分間から72時間またはそれより長いおよびその間の全ての整数値までの範囲にある。さらなる実施形態において、期間は、少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。さらに別の好ましい実施形態において、期間は、10~72時間である。1つの好ましい実施形態において、インキュベーション期間は、24時間である。白血病を有する患者からT細胞を単離するため、24時間のような、より長いインキュベーション時間の使用は、細胞収量を増大することができる。より長いインキュベーション時間を使用して、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を腫瘍組織から、または免疫不全状態の個体から単離する際のような、他の細胞タイプと比較して、T細胞があまり存在しないいすれかの状況においてT細胞を単離することができる。さらに、より長いインキュベーション時間を使用して、CD8<sup>+</sup>T細胞の補足の効率を増大することができる。したがって、時間を単に短縮するか、もしくは延長することにより、T細胞を、CD3/CD28ビーズに結合させ、および/あるいはT細胞に対するビーズの

40

50

割合（本明細書においてさらに記載される）を増やすか、もしくは減らすことにより、T細胞の特異的な集団または亜集団は、培養開始時に、またはプロセスの間の他の時間ポイントにてそれについて、またはそれに対してさらに選択され得る。加えて、ビーズまたは他の表面上の抗CD3および/もしくは抗CD28抗体の割合を増やすこと、または減らすことにより、T細胞の特異的な集団あるいは亜集団は、培養開始時に、または他の所望される時間ポイントにてそれについて、またはそれに対して優先的に選択され得る。当業者は、複数ラウンドのセレクションがまた、本発明の状況において使用され得ることを認識するだろう。ある種の実施形態において、セレクション手法を行うこと、ならびに活性化および拡大プロセスにおいて「選択されない」細胞を使用することが望ましくあり得る。「選択されていない」細胞はまた、さらなるラウンドのセレクションの対象にすることができる。

10

#### 【0175】

ネガティブセレクションによる、T、NKもしくはNKT細胞の集団または亜集団の単離あるいは濃縮は、ネガティブセレクションされた細胞に固有の表面マーカーに対する抗体の組み合わせで達成され得る。1つの方法は、ネガティブセレクションされた細胞に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用するネガティブ磁気免疫結合または蛍光活性化細胞ソーティングを介した細胞ソーティングおよび/またはセレクションである。例えば、ネガティブセレクションにより、CD3<sup>+</sup>細胞について濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、およびHLA-DRに対する抗体を含む。ある種の実施形態において、典型的には、CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、CD62Lhi、GITR<sup>+</sup>、およびFoxP3<sup>+</sup>を発現する制御性T細胞について濃縮するか、またはポジティブセレクションすることが望ましくあり得る。あるいは、ある種の実施形態において、T制御性細胞は、抗CD25抱合ビーズまたはセレクションの他の同様の方法により、枯渇される。幾つかの実施形態において、免疫療法のため所望されるT細胞亜集団は、CCR7およびCD62Lにより、T細胞を含む調節された免疫細胞から濃縮されるか、または選択される。あるいは、対象となる細胞は、サイズ、密度、粒度、変形能、抵抗性または容量の差異を含む物理的パラメーターに従い、選択されてもよい。

20

#### 【0176】

1つの実施形態において、養子NK細胞の集団または亜集団は、NK細胞を含む調節された免疫細胞内で、それらの表現型の上でのCD3<sup>-</sup>およびCD56<sup>+</sup>について、CD16、NKG2C、およびCD57の陽性発現を含むような、識別子を使用して、セレクションすることにより、濃縮される。さらに、養子亜集団のネガティブセレクションは、NKG2Cおよび/またはCD57の発現の欠如、加えて、以下の：低PLZF、低SYK、低FcR、低EAT-2、低TIGIT、低PD1、低CD7、低CD161、高LILRB1、高CD45RO、および低CD45RAの1つまたは複数の発現の欠如に基づき得る。

30

#### 【0177】

1つの実施形態において、NKT細胞の集団または亜集団は、NKT細胞の集団内で、インバリアントなTCR鎖を表現型の上で発現するもの、具体的には、以下のマーカー：CD3<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>、TCR<sup>V24+</sup>、および/またはTCR<sup>V11+</sup>の組み合わせについてセレクションすることにより、濃縮される。あるいは、NKT細胞は、インバリアントなTCR鎖の発現と合わせた表現型の組み合わせに基づき選択することができる。

40

#### 【0178】

対象由来の血液試料またはアフェレーシス産物は、本明細書において記載される免疫細胞が単離されるときに先立つ期間にて、集めることができる。したがって、調節されるべき細胞の供給源は、必須の任意の時間ポイントにて集められ、T細胞、NK細胞およびNKT細胞のような所望される細胞が、単離され、本明細書において記載されるもののような、かかる細胞療法から恩恵を受ける、任意の数の疾患または状態のための細胞ベースの

50

免疫療法において後に使用するため、凍結され得る。1つの実施形態において、血液試料またはアフェレーシス産物は、一般的な健常対象から集められる。ある種の実施形態において、血液またはアフェレーシス産物は、疾患を発症するリスクがあるが、まだ疾患を発症していない一般的な健常対象から集められ、対象となる細胞が、単離され、後の使用のため凍結される。他の実施形態において、血液試料またはアフェレーシス産物は、遺伝子的に修飾された免疫細胞（遺伝子的に操作された、または再編成、変異、遺伝子インプリントィングおよび／もしくはエピジェネティック修飾から天然にもたらされる）を既に投与された対象から集められる。ある種の実施形態において、T、NK、NKTまたは他の免疫細胞は、拡大され、凍結され、そして後に処理され、使用され得る。ある種の実施形態において、試料は、本明細書において記載される特定の疾患の診断の直後だが、任意の処置に先立ち、患者から集められる。幾つかの実施形態において、細胞は、CMV（サイトメガロウイルス）血清陽性を提示する対象から単離される。さらなる実施形態において、細胞は、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス薬、化学療法、放射線、サイクロスボリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸塩、およびFK506のような免疫抑制薬、抗体、またはCAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、サイクロスボリン、FK506、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、および照射のような他の免疫除去剤のような薬剤での処置を含むが、これらに限定されない、任意の数の関連する処置モダリティに先立ち、対象由来の血液またはアフェレーシス産物から単離される。さらなる実施形態において、細胞は、患者から単離され、フルダラビンのような化学療法薬、外照射療法（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAMPATHのような抗体のいずれかを使用した骨髄または幹細胞移植、T細胞除去療法と併せた（例えば、前、同時、または後）後の使用のため、凍結される。別の実施形態において、細胞は、処置に先立ち単離され、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサンのようなB細胞除去療法後の処置の後の使用のため凍結され得る。

#### 【0179】

幾つかの実施形態において、T、NKもしくはNKT細胞の集団または亜集団は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、または核酸置換を含む。修飾された免疫細胞は、サイトカイン導入遺伝子、発現抑制された阻害性受容体を発現するか；または活性化受容体、もしくは免疫細胞を再ターゲティングするためのCARを過剰発現してもよい。幾つかの実施形態において、対象、もしくはドナーから調節のため単離されるか、または対象／ドナーの末梢血、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、腫瘍から単離されるか、もしくはそこに含まれる免疫細胞の集団は、遺伝子的に修飾されていてもよい。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、および／または核酸置換を含む。幾つかの特定の実施形態において、免疫細胞は、T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、および／または過剰発現のCD16もしくはそのバリエントをコードする外来核酸を含む。

#### 【0180】

ゲノム的に操作された免疫細胞は、セーフティスイッチタンパク質、ターゲティングモダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、医薬的に有効なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；免疫細胞の生着、輸送、ホーミング、バイアビリティー、自己再生、持続性、免疫応答制御および調節、および／もしくは生存を促進するタンパク質の1つまたは複数を含む、遺伝子的に修飾されたモダリティを含む。幾つかの他の実施形態において、遺伝子的に修飾されたモダリティは、（i）欠失もしくは低減した発現のB2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITA、RFX5、またはRFXAP、および染色体6p21領域中の任意の遺伝子；（ii）誘導されたまたは増大した発現のHLA-E、HLA-G、HACD16、hncD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、Fc受容体、あるいは二重もしくは多特異性または普遍的エンゲイジャーとのカップリングのための表面トリガー受容体の1つあるいは複数を含む。幾つかの実施形態において、T、NKまたはNKT細胞は、外来

10

20

30

40

50

核酸を含む。幾つかの実施形態において、外来核酸は、細胞の直接ゲノム編集を介して免疫細胞に導入される。幾つかの他の実施形態において、外来核酸は、分化を通じて免疫細胞を生じる、ゲノム的に操作された造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、またはiPSCから同じものを保持することを介して免疫細胞に導入される。幾つかの実施形態において、T細胞についての外来核酸は、TCR (T細胞受容体)、CAR (キメラ抗原受容体)、二重特異性T細胞エンゲイジャー (BiTE)、三重特異性T細胞エンゲイジャー、多特異性T細胞エンゲイジャー、または複数の免疫細胞タイプと適合する普遍的エンゲイジャーをコードすることができる。幾つかの実施形態において、NK細胞についての外来核酸は、TCR、CAR、CD16もしくはそのバリエント、NY-ESO、二重特異性キラー細胞エンゲイジャー (BiKE)、三重特異性キラー細胞エンゲイジャー (TriKE)、多特異性キラー細胞エンゲイジャー、または複数の免疫細胞タイプと適合する普遍的エンゲイジャーをコードすることができる。幾つかの実施形態において、NKT細胞についての外来核酸は、変更されたTCRまたはCARであり得る。幾つかの実施形態において、外来核酸はCAR19をコードする。幾つかの実施形態において、CD16バリエントは、高親和性CD16 (HACD16)、切断不可能なCD16、および高親和性切断不可能なCD16 (hncD16)を含む。

#### 【0181】

幾つかの実施形態において、調節のための免疫細胞の集団または亜集団は、幹細胞または前駆細胞から試験管内で分化する。幾つかの実施形態において、T、NKもしくはNKT細胞の単離された集団または亜集団は、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞 (HSC)、または前駆細胞から分化することができる。前駆細胞は、CD34+造血性内皮細胞、多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、またはNKT細胞前駆細胞であり得る。幹細胞は、誘導された多能性幹細胞 (iPSC) および胚性幹細胞 (ESc) のような多能性幹細胞であり得る。iPSCは、天然に存在しないリプログラミングされた多能性細胞である。対象の細胞が、多能性状態にリプログラミングされると、次に、細胞は、T、NK、もしくはNKT細胞のような所望される細胞タイプまたはサブタイプにプログラムされるか、あるいは分化し得る。

#### 【0182】

幾つかの実施形態において、iPSCは、発症の様々なステージ由来の細胞が、中胚葉幹細胞から完全に分化したT、NKまたはNKT細胞の範囲に渡る造血表現型を想定して誘導され得る、複数のステージの分化プラットフォームにより、T、NKまたはNKT細胞に分化し得る（例えば、米国特許出願第62/107,517号および第62/251,016号を参照、その開示は、全体が本明細書に取り込まれる）。幾つかの実施形態において、T、NKもしくはNKT細胞分化のためのiPSC、HSC、または前駆細胞は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、または核酸置換を含む。

#### 【0183】

幾つかの実施形態において、ゲノム的に操作されるiPSC、HSCまたは造血前駆細胞は、セーフティスイッチタンパク質、ターゲティングモダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、医薬的に有効なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；あるいはiPSC、HSC、前駆細胞、もしくはそれらのもたらされた細胞の生着、輸送、ホーミング、バイアビリティー、自己再生、持続性、免疫応答制御および調節、および/または生存を促進するタンパク質の1つあるいは複数を含む、遺伝子的に修飾されたモダリティを含む。幾つかの他の実施形態において、遺伝子的に修飾されたモダリティは、(i)欠失もしくは低減した発現のB2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITA、RFX5、またはRFXAP、および染色体6p21領域中の任意の遺伝子；(ii)誘導されたまたは増大した発現のHLA-E、HLA-G、HACD16、hncD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、Fc受容体、二重もしくは多特異性または普遍的エンゲイジャーとのカップリングのための表面トリガー受容体、TCR (T細胞受容体)、あるいはCAR (キメラ抗原受容体)

10

20

30

40

50

の1つあるいは複数を含む。幾つかの実施形態において、T、NKもしくはNKT細胞分化のためのiPSC、HSC、または前駆細胞は、修飾されたHLAクラスIおよび/またはIIを含む。幾つかの実施形態において、修飾されたHLAクラスIおよび/もしくはIIを有するT、NKまたはNKT細胞分化のためのiPSC、HSC、あるいは前駆細胞は、B2M、HLA-E/G、PDL1、A2AR、CD47、LAG3、TIM3、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、RFKANK、CITA、RFX5、およびRFXAPの少なくとも1つの無発現または低発現を含む。幾つかの実施形態において、T、NKもしくはNKT細胞分化のためのiPSC、HSC、または前駆細胞は、外来核酸を有する。幾つかの実施形態において、外来核酸は、二重特異性T細胞エンゲイジャー(BiTE)、三重特異性T細胞エンゲイジャー、多特異性T細胞エンゲイジャー、CD16もしくはそのバリエント、NY-ESO、二重特異性キラー細胞エンゲイジャー(BiKE)、三重特異性キラー細胞エンゲイジャー(TriKE)、多特異性キラー細胞エンゲイジャー、または複数の免疫細胞タイプと適合する普遍的エンゲイジャーをコードすることができる。幾つかの実施形態において、外来核酸は、T、NKもしくはNKT細胞分化のためiPSC、HSC、または前駆細胞においてhNCD16をコードする。幾つかの実施形態において、外来核酸は、T、NKもしくはNKT細胞分化のためiPSC、HSC、または前駆細胞においてCAR19をコードする。

#### 【0184】

幾つかの実施形態において、免疫細胞の集団または亜集団は、T、NK、もしくはNKT前駆細胞、またはT、NK、もしくはNKT細胞のような完全に分化した特異的なタイプの免疫細胞であり得る、非造血運命の非多能性細胞から造血系細胞に、または第一の造血細胞タイプの非多能性細胞から異なる造血細胞タイプに試験管内で分化転換する(例えば、米国特許第9,376,664号および米国特許出願第15/072,769号を参照、その開示は、全体が本明細書に取り込まれる)。幾つかの実施形態において、非造血運命の非多能性細胞は、皮膚線維芽細胞、脂肪組織由来の細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)のような体細胞である。分化転換に有用な体細胞は、不死化体細胞であつてもよい。

#### 【0185】

様々なストラテジーを追及して、細胞において多能性を誘導するか、または能力を増大させる(Takahashi, K., and Yamanaka, S., Cell 126, 663-676 (2006); Takahashi et al., Cell 131, 861-872 (2007); Yu et al., Science 318, 1917-1920 (2007); Zhou et al., Cell Stem Cell 4, 381-384 (2009); Kim et al., Cell Stem Cell 4, 472-476 (2009); Yamanaka et al., 2009; Saha, K., Jaenisch, R., Cell Stem Cell 15, 584-595 (2009))、ならびにリプログラミングの効率を改善する(Shi et al., Cell Stem Cell 2, 525-528 (2008a); Shi et al., Cell Stem Cell 3, 568-574 (2008b); Huangfu et al., Nat Biotechnol 26, 795-797 (2008a); Huangfu et al., Nat Biotechnol 26, 1269-1275 (2008b); Silva et al., Plos Bio 6, e253. Doi: 10.1371/journal.pbio.0060253 (2008); Lyssiotis et al., PNAS 106, 8912-8917 (2009); Ichida et al., Cell Stem Cell 5, 491-503 (2009); Maheralli, N., Hochdlinger, K., Curr Biol 19, 1718-1723 (2009b); Esteban et al., Cell Stem Cell 6, 71-79 (2010); およびFeng et al., Cell Stem Cell 14, 301-312 (2009))、その開示は、参照により全体が本明細書に取

10

20

30

40

50

り込まれる。

【0186】

I I I . 養子療法のため免疫細胞を調節する方法

本発明は、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法を提供し、方法は、免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と接触させることを含む。

【0187】

1つの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と接触させることを含み、ここで、接触された免疫細胞は、表1の薬剤と接触させていない免疫細胞と比較し、増大した細胞拡大、増大した数もしくは割合の1つまたは複数の所望される細胞亜集団、ならびに/あるいは改善された増殖、細胞毒性、細胞リコール、および/または持続性を有する。

10

【0188】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と接触させることを含み、ここで、細胞の1つまたは複数の所望される亜集団の維持および拡大は、表1の薬剤と接触させていない免疫細胞と比較し、改善される。

【0189】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と接触させることを含み、ここで、分化の所望される状態にリプログラミングされた集団における免疫細胞の数または割合は、表1の薬剤と接触させていない免疫細胞と比較し、増大される。

20

【0190】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と、表1の薬剤と接触させていない免疫細胞と比較し、細胞拡大を増大させる、1つもしくは複数の所望される免疫細胞亜集団の数または割合を増大させる、ならびに/あるいは免疫細胞の増殖、細胞毒性、細胞リコール、および/または持続性を改善するのに十分な量で、接触させることを含む。1つの実施形態において、免疫細胞処置のための薬剤は、約0.1nM～約50μMである。1つの実施形態において、免疫細胞処置のための薬剤は、約0.1nM、0.5nM、1nM、5nM、10nM、50nM、100nM、500nM、1μ、5μ、10μ、20μ、もしくは25μ、または間の任意の濃度である。1つの実施形態において、免疫細胞処置のための薬剤は、約0.1nM～約5nMであり、約1nM～約100nMであり、約50nM～約250nMであり、約100nM～約500nMであり、約250nM～約1μであり、約500nM～約5μであり、約3μ～約10μであり、約5μ～約15μであり、約12μ～約20μであるか、または約18μ～約25μである。

30

【0191】

幾つかの実施形態において、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と、表1の薬剤と接触させていない免疫細胞と比較し、細胞拡大を増大させる、1つもしくは複数の所望される免疫細胞亜集団の数または割合を増大させる、ならびに/あるいは免疫細胞の増殖、細胞毒性、細胞リコール、および/または持続性を改善するのに十分な時間、接触させることを含む。1つの実施形態において、免疫細胞は、表1の1つまたは複数の薬剤と、少なくとも10分間、30分間、1時間、2時間、5時間、12時間、16時間、18時間、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、10日間、15日間、20日間、25日間、30日間、または間の任意の長さの期間、接触される。1つの実施形態において、免疫細胞は、表1の1つまたは複数の薬剤と、約0.5時

40

50

間～約2時間、約1時間～約12時間、約10時間～約2日間、約1日～約3日間、約2日～約5日間、約3日～約6日間、約5日～約8日間、約7日～約14日間、約12日～約22日間、約14日～約25日間、約20日～約30日間、接触される。幾つかの実施形態において、免疫細胞は、表1の1つまたは複数の薬剤と、16時間以上、14時間以上、12時間以上、10時間以上、8時間以上、6時間以上、4時間以上、2時間以上、または間の任意の長さの時間、接触される。したがって、当該十分な長さの時間は、例えば、15時間以上、13時間以上、11時間以上、9時間以上、7時間以上、5時間以上、3時間以上、または1時間以上である。方法の幾つかの他の実施形態において、当該十分な長さの時間は、24時間以上、36時間以上、48時間以上、60時間以上、72時間以上、または間の任意の長さの時間以上である。したがって、当該十分な長さの時間は、例えば、30時間以上、42時間以上、54時間以上、66時間以上、78時間以上、90時間以上である。

#### 【0192】

免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と接触させることを含む、養子細胞ベースの療法に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、接触後、1つもしくは複数の所望される亜集団を免疫細胞から濃縮するか、または単離することをさらに含み、ここで、1つまたは複数の所望される亜集団は、ナイーブT細胞、幹細胞メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、養子NK細胞、およびタイプI NK T細胞からなる群から選択される。

#### 【0193】

幾つかの実施形態において、対象は、CMV血清陽性であるか、または遺伝子的に修飾された免疫細胞を既に投与されていてもよい。幾つかの実施形態において、対象は、CMV血清陽性であってもよい。幾つかの他の実施形態において、調節のため単離された免疫細胞は、遺伝子的に修飾される（遺伝子的に操作されるか、または再編成、変異、遺伝子インプリンティングおよび／もしくはエピジェネティック修飾から天然にもたらされる）。幾つかの実施形態において、調節のため単離された免疫細胞は、少なくとも1つの遺伝子的に修飾されたモダリティを含む。幾つかの実施形態において、免疫細胞の単離された集団は、ゲノム的に操作され、挿入、欠失、および／または核酸置換を含む。幾つかの特定の実施形態において、免疫細胞は、T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、および／または過剰発現のCD16もしくはそのバリエントをコードする外来核酸を含む。したがって、遺伝子的に修飾された免疫細胞は、開示される本組成物および方法を使用した生体外での調節のため単離される。幾つかの実施形態において、調節後、対象から単離された、遺伝子的に修飾された免疫細胞は、同じドナーまたは異なる患者に投与されてもよい。幾つかの特定の実施形態において、調節のためのドナー由来免疫細胞は、T細胞受容体（TCR）、および／またはキメラ抗原受容体（CAR）をコードする外来核酸を含む。

#### 【0194】

あるいは、調節のための免疫細胞の集団は、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、または前駆細胞から試験管内で分化するか；あるいは造血系または非造血系の非多能性細胞から分化転換してもよい。幾つかの実施形態において、調節のための免疫細胞をもたらす、幹細胞、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、前駆細胞、または非多能性細胞は、ゲノム操作され、挿入、欠失、および／または核酸置換を含み、したがって、調節のためもたらされた免疫細胞は、供給源細胞においてゲノム操作することにより導入された同じ遺伝子モダリティを含む。

#### 【0195】

I.V. 处理された免疫細胞、免疫細胞集団または亜集団の治療上の使用

#### 【0196】

本発明は、細胞ベースの養子療法において使用されるとき、免疫細胞の治療可能性を改善するのに十分な量で、表1から選択される1つもしくは複数の薬剤と接触させた免疫細胞の単離された集団または亜集団を含む組成物を提供する。1つの実施形態において、処

10

20

30

40

50

理された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、増大した数もしくは割合のナイーブ T 細胞、幹細胞メモリー T 細胞、および / またはセントラルメモリー T 細胞を含む。1つの実施形態において、接触された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、増大した数または割合のタイプ I N K T 細胞を含む。別の実施形態において、接触された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、増大した数または割合の養子 N K 細胞を含む。腫瘍細胞を標的にするか、または N K 細胞の細胞毒性活性調節する他の薬剤と一緒に N K 細胞療法製品を使用する併用治療が、本明細書において考慮される。組成物の幾つかの実施形態において、組成物は、ペプチド、サイトカイン、マイトジエン、成長因子、スマート RNA 、 d s RNA (2本鎖 RNA) 、単核血液細胞、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分もしくは置換因子、対象となる 1 つもしくは複数のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤もしくは放射性部分、および免疫調節薬 (IMiD) からなる群から選択される 1 つまたは複数の追加の添加剤をさらに含む。

#### 【 0197 】

本発明はまた、表 1 において挙げられる化合物、および追加の治療薬剤を含む 1 つまたは複数の薬剤で調節された免疫細胞を含む併用治療の組成物ならびに方法を提供する。幾つかの実施形態において、追加の治療薬剤は、抗体、または抗体フラグメントを含む。幾つかの実施形態において、抗体は、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体であってもよい。幾つかの実施形態において、抗体、または抗体フラグメントは、ウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態において、抗体、または抗体フラグメントは、腫瘍抗原に特異的に結合する。幾つかの実施形態において、腫瘍またはウイルス特異的抗原は、調節された N K 細胞を活性化して、抗体依存性細胞障害 (ADCC) を使用し、標的細胞を溶解する。モノクローナル抗体 (mAb) は、標的細胞プラス N K 細胞および他の細胞タイプ上の動員 CD16 に結合し、これにより、生体内と試験管内の両方で ADCC による腫瘍細胞の殺傷をもたらす。mAb はまた、 N K 細胞阻害をブロッキングすることにより、ADCC を増強し、 N K 細胞を刺激することができる。幾つかの実施形態において、 N K 細胞により仲介される ADCC は、調節された N K 細胞により、発現された CD16 および遺伝子的に操作されたそのバリエントを介してである。CD16 の遺伝子的に操作されたバリエントは、切斷不可能な CD16 、高親和性 CD16 (hacCD16) 、および高親和性切斷不可能な CD16 (hnCD16) を含むが、これらに限定されない。したがって、本発明の上記態様は、抗体併用癌治療において ADCC を果たす能力がある GSKit により調節された N K 細胞を提供する。幾つかの実施形態において、本明細書において提供される抗癌 N K 細胞での併用処置に適した抗体は、抗 CD20 (リツキシマブ、ベルツズマブ、オファツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ) 、抗 Her2 (トラスツズマブ) 、抗 CD52 (アレムツズマブ) 、抗 EGFR (セルツキシマブ) 、および抗 CD38 (ダラツムマブ) 、ならびにそれらのヒト化および Fc 修飾されたバリエントを含むが、これらに限定されない。加えて、 N K 細胞上の CD16 を認識する別の Fc 領域と組み合わせた、抗 CD19 、 CD20 、および CD33 抗原のような腫瘍細胞抗原を標的にする抗体の Fc 領域を融合する、二重ならびに三重特異性抗体の設計は、 N K 細胞の刺激、その後の腫瘍殺傷につながる。

#### 【 0198 】

幾つかの実施形態において、追加の治療薬剤は、 1 つもしくは複数の化学療法剤または放射性部分を含む。化学療法剤は、細胞毒性抗腫瘍薬、すなわち、腫瘍細胞を優先的に殺傷するか、もしくは迅速に増殖する細胞の細胞サイクルを妨害する化学薬剤、または癌幹細胞を根絶することが見出されている化学薬剤、および腫瘍細胞の成長を妨げるかまたは低減するために治療上使用される化学薬剤を指す。化学療法剤はまた、抗腫瘍または細胞毒性薬もしくは薬剤としてもときに言及され、当該技術分野において周知である。

#### 【 0199 】

幾つかの実施形態において、化学療法剤は、アントラサイクリン、アルキル化剤、スルホン酸アルキル、アジリジン、エチレンイミン、メチルメラミン、ナイトロジエンマスター、ニトロソウレア、抗生素質、代謝拮抗物質、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジ

10

20

30

40

50

ン類似体、酵素、ポドフィロトキシン、白金含有薬剤、インターフェロン、およびインターロイキンを含む。典型的な化学療法剤は、アルキル化剤（シクロホスファミド、メクロレタミン、メファリン（mephalin）、クロラムブチル、ヘキサメチルメラミン、チオテバ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン）、代謝拮抗物質（メトトレキサート、フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、6-メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン）、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン）、エピポドフィロトキシン（エトポシド、エトポシドオルトキノン、およびテニポシド）、抗生物質（ダウノルビシン、ドキソルビシン、ミトキサントロン、ビスアンスレン、アクチノマイシンD、プリカマイシン、ピューロマイシン、およびグラミシジンD）、パクリタキセル、コルヒチン、サイトカラシンB、エメチン、メイタシン、ならびにアムサクリンを含むが、これらに限定されない。追加の薬剤は、アミノグルテチミド、シスプラチニン、カルボプラチニン、マイトマイシン、アルトレタミン、シクロホスファミド、ロムスチン（CCNU）、カルムスチン（BCNU）、イリノテカン（CPT-11）、アレムツザマブ、アルトレタミン、アナストロゾール、L-アスパラギナーゼ、アザシチジン、ベバシズマブ、ベキサロテン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルステロン、カペシタビン、セレコキシブ、セツキシマブ、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、ダカルバジン、デニロイキンジフチトクス、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドロモスタノロン、エピルビシン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エチニルエストラジオール、エキセメスタン、フロクスウリジン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、フルタミド、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロンアルファ（2a、2b）、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミソール、メクロレタミン、メゲストロール、メルファリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、ノフェツモマブ、オキサリプラチニン、パクリタキセル、パミドロネート、ペメトレキセド、ペガデマーゼ、ペグアスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、プリカマイシン、ポリフェプロザン、ポルフィマー、プロカルバジン、キナクリン、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテバ、トペテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスター、バルルビシン、ビノレルビン、およびゾレドロネートを含む。他の適当な薬剤は、化学療法剤または放射線療法剤として承認されるもの、および当該技術分野において公知のものを含む、ヒト使用を承認されたものである。かかる薬剤は、共に時々アップデートされる、多数の標準的な医師および腫瘍学者の参考文献（例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, N.Y., 1995）のいずれかを通じて、または国立がん研究所のウェブサイト（[fda.gov/cder/cancer/druglistfarne.htm](http://fda.gov/cder/cancer/druglistfarne.htm)）を通じて参照することができる。

#### 【0200】

サリドマイド、レナリドミド、およびポマリドミドのような免疫調節薬（IMiD）は、NK細胞とT細胞の両方を刺激する。本明細書において提供される通り、IMiDは、癌処置のため調節された治療免疫細胞と共に使用されていてもよい。

#### 【0201】

様々な疾患は、本発明の細胞を養子細胞療法に適した対象に導入することにより、改善され得る。疾患の例は、円形脱毛症、自己免疫溶血性貧血、自己免疫性肝炎筋炎、糖尿病（1型）、幾つかの形態の若年性特発性関節炎、糸球体腎炎、グレーヴス病、ギランバレー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、幾つかの形態の心筋炎、多発性硬化症、天疱瘡/類天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、関節リウマチ、強皮症/全身性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテ

10

20

30

40

50

マトーデス、幾つかの形態の甲状腺炎、幾つかの形態のぶどう膜炎、白斑、多発性血管炎を伴う肉芽腫症（ウェゲナーの）を含むが、これらに限定されない様々な自己免疫異常；急性および慢性白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫および骨髄異形成症候群を含むが、これらに限定されない造血器腫瘍；脳、前立腺、乳房、肺、結腸、子宮、皮膚、肝臓、骨、脾臓、卵巣、精巣、膀胱、腎臓、頭部、頸部、胃、子宮頸部、直腸、咽頭、または食道の腫瘍を含むが、これらに限定されない固形腫瘍；およびHIV-（ヒト免疫不全ウイルス）、RSV-（呼吸器多核体ウイルス）、EBV-（エプスタイン・バーウイルス）、CMV-（サイトメガロウイルス）、アデノウイルス-およびBKポリオーマウイルス-関連異常を含むが、これらに限定されない感染症を含む。

【実施例】

10

【0202】

以下の実施例は、説明の目的だが、制限の目的ではなく、与えられる。

【0203】

実施例1 - 方法および材料

試験管内細胞培養。フレッシュ leukopak (AllCells、アラメダ、カリフォルニア州) を健常ドナーから得て、それから、EasySep Human T cell 11 Enrichment Kit (ステムセルテクノロジーズ、バンクーバー、カナダ) を使用して、T細胞をネガティブセレクションした。新たに単離したT細胞を等分し、凍結保存した。スクリーニングを開始した日に、T細胞を解凍し、5%ヒトAB血清、IL-2、ペニシリン/ストレプトマイシン、およびさらに上清を含むX-vivo 15 に注いだ。細胞を、平底384ウェルプレートに、 $5 \times 10^5$ 細胞/m1にて、ビーズ対細胞比3:1の抗CD3/抗CD28 dynabead (サーモフィッシュ、ウォルサム、マサチューセッツ州)と共に分注した。各プレートのカラム3からカラム22までの各ウェルに、終濃度10 $\mu$ Mにて、個々の化合物を加えた。陽性および陰性対照をさらなるウェルに加えた。細胞を、約6日間、37にて、5%CO2でインキュベーションした。

20

【0204】

フローサイトメトリー。培養6日目に、細胞を、固定可能なバイアビリティマーカーならびにフルオロフォア抱合抗体：CD3、CD4、CD8、CD45RA、CD45RO、CD62L、CCR7、CD27、およびCD122 (ベクトン・デッキンソンバイオサイエンス、サンノゼ、カリフォルニア州；およびBioLegend、サンディエゴ、カリフォルニア州)で染色した。取得の直前に、Fluorescent absolute counting bead (Spherotech、レークフォレスト、イリノイ州)を加えた。BD Fortress X-20 (ベクトン・デッキンソンバイオサイエンス)にて、データ取得を行い、TreeStar software (FlowJo、アシュランド、オレゴン州)およびSpotfire (Tibco、ボストン、マサチューセッツ州)を使用して、データを解析した。

30

【0205】

表現型および枯渇マーカー評価のため大規模での細胞の培養。単離したCD8 T細胞を、IL-2を添加したT細胞培地においてCTS (Cell Therapy Systems) Dynabeads (商標) CD3/CD28 (サーモフィッシュサイエンティフィック、ウォルサム、マサチューセッツ州)を使用して、0日目にバルクで活性化した。1日目に、細胞をCARコンストラクトで形質導入し、細胞密度を $0.5 \times 10^6$ /m1に調整し、 $10^6$ 細胞を、12ウェルプレートにビヒクル、TWS119、またはDCC-2036の存在下で播種した。4日目に、細胞を6ウェルプレートに移し、T細胞培地2m1を、各ウェルに加えた。6日目に、培地さらに2m1を、各ウェルに加えた。8日目に、CAR T細胞を、表現型マーカー (CD62L、CCR7、およびCD27)ならびに枯渇マーカー (PD-1およびTim-3)の表面発現についてフローサイトメーターにおいて解析した。

40

【0206】

50

## 実施例 2 - 免疫細胞調節のための薬剤

データを解析して、より高い割合もしくはより大きい絶対数のいずれかの、表現型の上で同定したナイーブ、幹細胞メモリー、またはセントラルメモリーT細胞を生じた化合物を同定した。これらの細胞を、CCR7およびCD62Lの発現により特徴付ける。それ故、これらの同定マーカーの両方を共発現する細胞を評価した。生CD4<sup>+</sup>集団および生CD8<sup>+</sup>集団内で、CCR7およびCD62Lを共発現する細胞のパーセントを決定した。所望されるT細胞サブセットの指標として、T細胞上でのCD62LまたはCCR7のいずれかの発現を、CAR-T細胞療法、および可能性のある他の養子T細胞療法の好ましい機能的特徴を有すると記載した。ドルソモルフィン、ヘプテリジン酸、GSK3阻害剤、6-メルカプトプリン、AC-93253ヨウ化物、チラトリコール、PI-103、5-アザシチジン、5,7-ジクロロ-8-キノリノール、ニトロフラントイイン、5-クロロ-7-ヨード-8-キノリノール、またはジエチレントリアミンペニタ酢酸の処理の下で、CCR7およびCD62Lを共発現する細胞の数または割合は、生存CD4<sup>+</sup>集団と生存CD8<sup>+</sup>集団の両方において増大した(表2)。フルベストラント、タブシガルジン、SU4312、フルダラビン、2-ナフタセンカルボキサミド、7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-オクタヒ、ニフロキサジド、塩化工ドロホニウムの処理の下で、CCR7およびCD62Lを共発現する細胞の数または割合は、少なくとも生存CD8<sup>+</sup>集団において増大した(表2)。1-ピロリジンカルボジチオ酸、アンモニウム塩、U0126、テルミサルタン、サイクロスボリンA、1,3,5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール、BAY61-3606、プロトポルフィリンIX二ナトリウム、ラパマイシン、ロスコビチン、PAC-1、トスフロキサシン塩酸塩、BIX01294、およびテルフェナジンの処理の下で、CCR7およびCD62Lを共発現する細胞の数または割合は、少なくとも生存CD8<sup>+</sup>集団において増大した(表2)。

### 【0207】

加えて、GSK3(グリコーゲン合成酵素キナーゼ3)阻害剤は、CD3-CD19-CD56<sup>+</sup>NK細胞を保存することを示し、CD57<sup>+</sup>およびNKG2C<sup>+</sup>発現を含むが、これらに限定されない、観察に基づき、細胞成熟およびサブタイプ偏向に影響することにより、養子NK細胞亜集団を増大した。

### 【0208】

各試料中のビーズのカウントの絶対数に相關するこれらのゲートのそれぞれにおける現象の数を計算し、CD4<sup>+</sup>および/もしくはCD8<sup>+</sup>集団内のナイーブ、幹細胞メモリー、またはセントラルメモリーT細胞の絶対数の相対的測定を定義する。各384ウェルプレート内のスクリーニングされた化合物試料に相關するz値を、これらの4種の値：1) CD4<sup>+</sup>におけるパーセントCCR7+CD62L+、2) CD8<sup>+</sup>におけるパーセントCCR7+CD62L+、3) CD4<sup>+</sup>におけるCCR7+CD62L+の絶対相対数、および4) CD8<sup>+</sup>におけるCCR7+CD62L+の絶対相対数のそれについて計算した(図1Aおよび1B)。各試料内の全ての細胞のパーセントバイアビリティー、および各試料内の細胞の相対絶対数について、Zスコアを計算した。「Zスコア」は、スコアの群における平均とのスコアの関連の統計的測定値である。Z値0は、スコアが、平均と同じであることを意味する。Zスコアはまた、それが、平均より上かもしくは下であるかどうかを、かつどれだけ多くの標準偏差かにより示す、正または負であり得る。

### 【0209】

T細胞増殖またはバイアビリティーに対する有害な影響を有する化合物の排除は、最も恐らくT細胞製造方法に適している化合物に対する成果に焦点を当てたものである。以下の基準：-1より大きい「パーセントバイアビリティー」Z-スコア、-1より大きい細胞のZ-スコアの「相対絶対数」、および+2より大きい4つの値の1つのZ-スコアにより、第一のヒット化合物を選択した。ずっと高いZ-スコアを有し、かつ4つの第一の値の1つより多くについて上記基準を満たすという点で、34種の化合物(表2)を選択した。さらに5種の化合物をまた、T細胞を調節するそれらの能力の点で含める(表3)。

10

20

30

30

40

50

【0210】

【表2-1】

表2-1 養子細胞療法におけるT細胞調節のための薬剤

化合物	CAS番号	化合物情報	群	群の記述	CD8ヒット	CD4ヒット
ドルソモルフイン	866405-6-4-3	AMPK阻害剤	I	代謝および栄養素センシング	CD8	CD4
ヘプテリジン酸	74310-84-2	GAPDH阻害剤	I	代謝および栄養素センシング	CD8	CD4
1-ピロリジンカルボジチオ酸、アンモニウム塩	5108-96-3	一酸化窒素合成酵素の誘導を妨げる	I	代謝および栄養素センシング		CD4
GSK3阻害剤	例えば、BIO;6674-63-62-9	GSK-3 $\alpha$ / $\beta$ 阻害剤	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
6-メルカプトプリン	6112-76-1	プリン誘導体ヒポキサンチンおよび酵素HGPRTについてグアニンと競合する	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
AC-93253ヨウ化物	108527-8-3-9	サブタイプ選択性RAR(RAR $\alpha$ )アゴニスト	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
チラトリコール	51-24-1	甲状腺ホルモン類似体	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
PI-103	371935-7-4-9	mTOR/PI3K阻害剤	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
フルベストラント	129453-6-1-8	エストロゲン受容体アンタゴニスト	II	シグナル伝達経路	CD8	
タブシガルジョン	67526-95-8	サルコ/ER Ca <sup>2+</sup> -ATPaseアンタゴニスト	II	シグナル伝達経路	CD8	
SU 4312	5812-07-7	VEGF受容体タンパク質チロシンキナーゼ1/2およびPDGF受容体阻害剤	II	シグナル伝達経路	CD8	

10

20

30

40

【0211】

50

## 【表2-2】

表2-養子細胞療法におけるT細胞調節のための薬剤

化合物	CAS番号	化合物情報	群	群の記述	CD8 ヒット	CD4 ヒット
U0126	109511-5 8-2	MAPK/ERKキナーゼ;AP-1転写活性と拮抗する	II	シグナル伝達経路		CD4
テルミサルタン	144701-4 8-4	ミカルディス;アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト	II	シグナル伝達経路		CD4
サイクロスボリンA	59865-13 -3	ネオーラル;免疫抑制性	II	シグナル伝達経路		CD4
1,3,5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール	263717-5 3-9	PPT;特異的エストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )アゴニスト	II	シグナル伝達経路		CD4
BAY61-3606	732983-3 7-8	脾臓チロシンキナーゼ(Syk)阻害剤	II	シグナル伝達経路		CD4
プロトポルフィリンIX二ナトリウム	553-12-8	GCS(グアニル酸シクラーゼ)活性化因子	II	シグナル伝達経路		CD4
ラパマイシン	53123-88 -9	シロリムス;免疫抑制剤	II	シグナル伝達経路		CD4
5-アザシチジン	320-67-2	核酸合成と干渉するシトシンヌクレオシド類似体	III	増殖およびアポトーシス	CD8	CD4
フルダラビン	21679-14 -1	核酸合成と干渉するプリン類似体	III	増殖およびアポトーシス	CD8	
ロスコビチン、(S)-異性体	186692-4 5-5	サイクリン依存性キナーゼ(Cdk)阻害剤	III	増殖およびアポトーシス		CD4
PAC-1	315183-2 1-2	プロカスパーゼ-3活性化化合物;	III	増殖およびアポトーシス		CD4

10

20

30

## 【0212】

40

50

## 【表2-3】

表2-3 養子細胞療法におけるT細胞調節のための薬剤

化合物	CAS番号	化合物情報	群	群の記述	CD8 ヒット	CD4 ヒット
8-キノリノール、5,7-ジクロロ-	773-76-2	カピトロール; 抗菌性	IV	抗感染	CD8	CD4
ニトロフラントイ	67-20-9	抗菌性	IV	抗感染	CD8	CD4
8-キノリノール、5-クロロ-7-ヨード-	130-26-7	クリオキノール; 抗菌性	IV	抗感染	CD8	CD4
2-ナフタセンカルボキサミド, 7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-オクタヒ	64-73-3	リボソームタンパク質合成阻害剤	IV	抗感染	CD8	
ニフロキサジド	965-52-6	ニトロフラン抗菌性	IV	抗感染	CD8	
トスフロキサシン塩酸塩	100490-3-6	オゼックス; フルオロキノロン抗菌性	IV	抗感染		CD4
セルトラリン	79617-96-2	ゾロフト; 抗うつ薬	V	他	CD8	CD4
ジエチレントリアミンペニタ酢酸、ペニタナトリウム	67-43-6	鉄キレート剤	V	他	CD8	CD4
塩化エドロホニウム	116-38-1	可逆性アセチルコリンエステラーゼ阻害剤	V	他	CD8	
BIX01294	1392399-03-9	GLPおよびG9aヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ阻害剤	V	他		CD4
テルフェナジン	50679-08-8	抗ヒスタミン薬	V	他		CD4
dmPGE2	39746-25-3	プロスタグランジン分子	V	他		

10

20

30

40

## 【0213】

50

## 【表 3】

表 3 - 養子細胞療法における T 細胞調節のための追加薬剤

化合物	CAS番号	化合物情報	群	群の記述
2-DG	154-17-6	解糖を阻害する	I	代謝および栄養素センシング
GSK3阻害剤	例えば、 TWS119: 601514-1 9-6	GSK3阻害剤	II	シグナル伝達 経路
HS173	1276110-06-5	PI3K阻害剤	II	シグナル伝達 経路
LY294002	154447-3 6-6	PI3K阻害剤	II	シグナル伝達 経路
ピクチリシブ	957054-3 0-7	PI3K阻害剤	II	シグナル伝達 経路

10

## 【0214】

20

## 実施例 3 - 選択した化合物の試験管内トリアージ実験

試験管内実験を行い、T 細胞機能に対して決定的な影響を有する化合物曝露およびトリアージ化合物の方法を最適化する。第一の試験が、既に観察したナイーブ、幹細胞メモリー、およびセントラルメモリー T 細胞に対する影響が、さらなるドナーにおいて繰り返されるかどうかを評価しながら、個々の化合物の最適な用量を決定する。T 細胞に対する可能性のある決定的な機能的影響を有する化合物をトリアージするために、増殖能力、T h 1 および T h 1 7 に二極化させる能力、凍結保存 / 解凍サイクルを通じた生存、伝達効率、ならびに C A R により伝達された T 細胞の殺腫瘍活性についての試験管内評価を行う。T 細胞機能に対して有意な負の影響を伴わないので、拡大中にナイーブ、幹細胞メモリー、もしくはセントラルメモリー T 細胞の割合または数を再生可能な方法で改善する化合物を、組み合わせて試験し、相加または相乗効果について評価する。これらの評価を通じて、有力候補または組み合わせを、生体内での追加試験に優先させる。

30

## 【0215】

## 実施例 4 - 選択した化合物を使用した養子細胞療法の生体内モデル

生体内スクリーニングおよび追跡試験管内トリアージ実験の結果を説明するために、選択した化合物の有力候補を、養子細胞療法の生体内モデルに適用する。具体的には、生着、殺腫瘍活性、2 次的な殺腫瘍応答、遊走、細胞持続性、および移植片対宿主疾患について、養子細胞療法に対する小分子調節の影響を調べる。臨床において有効な応答と関連することが見い出された永続的養子細胞療法の特徴である他の読み取り情報もまた、調べる。

40

## 【0216】

これらの実験を、ヒト細胞を、ヒト腫瘍を生じる免疫不全 N S G マウスに養子性に移植するヒト化システムにおいて、または免疫コンピテント動物が、同系腫瘍を生じ、同系細胞療法で処置される代替マウスモデルにおいてのいずれかで、行う。

## 【0217】

代替またはヒト化モデルシステムのいずれかにおいて、マウスに対象となるルシフェラーゼ標識リンパ腫または他の腫瘍を注入する。その後すぐに、本明細書において開示されるビヒクルまたは調節化合物によって前処理された養子細胞療法を行う。細胞療法と腫瘍の両方の用量を、化合物処理の正または有害な効果を観察するウインドウを可能にするように最適化する。動物の重さ、血漿サイトカイン濃度、腫瘍の量、および末梢血、二次リンパ器官および腫瘍塊における養子細胞療法；全身腫瘍組織量、腫瘍転移、および細胞療

50

法の表現型を、実験の持続のためモニターする。

【0218】

生体内での1つまたは多数の腫瘍関連パラメーターを向上させることができる化合物は、有効な腫瘍クリアランスに必要な細胞療法の用量を低下させること、末梢血において養子細胞療法の持続性を増大させること、腫瘍部位への遊走を増強させること、および/または高腫瘍用量での負荷に対する増大した生存を含むが、これらに限定されない予想される効果を有する。

【0219】

実施例5 - T細胞におけるラバ+d m P G E 2処理でのCD27における相乗的増大

CD27は、4-1BBおよびOX-40も誘導するTRA結合TNF(腫瘍壞死因子)受容体ファミリーのメンバーである。これらの膜貫通型タンパク質は、リンパ球機能の制御に関与する。ヒトにおいて、大部分のナイーブ末梢T細胞(Tn)は、CD27を発現する。ナイーブ末梢T細胞が活性化されると、CD27の発現は有意に増大する。しかしながら、T細胞の最終エフェクター分化は、CD27の不可逆的な喪失と関連する(Hintzen et al. 1994)。CD27の役割のさらなる解明は、それが、T細胞免疫の発生および長期維持に必要であったことを示した(Hendriks et al. 2000)。

【0220】

ラバマイシン(時々「ラバ」として言及する)、ジメチルプロスタグラニンE2(d m P G E 2)、または両方の化合物の組み合わせで処理した細胞は、ビヒクル単独(DM SO)で処理した細胞と比較したとき、多くの態様において有意差を示した。しかしながら、観察した最大の変化の1つは、ビヒクルまたはいずれかの化合物単独で処理したCD8 T細胞上のCD27の発現と比べ、ラバ+d m P G E 2で処理したCD8 T細胞の表面上で発現したCD27のレベルにおける相乗的増大であった。これらの研究を行うために、単離したCD8 T細胞を、IL-2を添加したT細胞培地においてCTS(Cel1 Therapy Systems) Dynabeads(商標) CD3/CD28(サーモフィッシュ-サイエンティフィック、ウォルサム、マサチューセッツ州)を使用して、0日目にバルクで活性化した。1日目に、細胞を、図2において示すCARコンストラクト1で形質導入し、細胞密度を $0.5 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整し、 $10^6$ 細胞を、12ウェルプレートにビヒクル、20nMラバ、10μM d m P G E 2または同じ濃度の両方の化合物の存在下で播種した。4日目に、細胞を6ウェルプレートに移し、培地2mlを、各ウェルに加えた。6日目に、培地さらに2mlを、各ウェルに加えた。8日目に、細胞を、CD27の細胞表面発現についてフローサイトメーターにおいて解析した。

【0221】

2人の独立したドナー由来の処理したT細胞および処理していないT細胞におけるCD27の発現を、図3において示す。ビヒクル処理で観察したCD27の発現を、MFI(平均蛍光強度)1として定義し、化合物で処理した細胞の相対的MFIを計算した。CD8 T細胞をラバ単独とインキュベーションしたとき、CD27発現はおよそ2倍増大し、d m P G E 2単独では、増大は存在せず、すなわち、d m P G E 2単独は、CD27発現に影響を及ぼさない。しかしながら、CD8 T細胞を、ラバマイシンとd m P G E 2の組み合わせ(ラバ+d m P G E 2)の存在下でインキュベーションするとき、ビヒクルと比べた、CD27発現における増大は、ほぼ6倍のレベルであり、これは、2種の個々の化合物の相加効果を通じてであると単純に説明することができない。したがって、化合物の組み合わせにより誘導されたCD27の細胞表面発現は相乗的であると思われ、化合物の組み合わせが、Tエフェクター細胞よりむしろナイーブT細胞の表現型をもたらすようと思われる。

【0222】

実施例6 - ラバ+d m P G E 2処理はT細胞セントラルメモリーサブセットを増大する  
非ヒト靈長類モデルとNOD/Scid IL-2R<sup>chain</sup>(NSG)マウスモデルの両方における研究は、セントラルメモリー(Tcm)表現型を有するT細胞が、養子

10

20

30

40

50

移植後、改善された持続性を有することを示した (Berger et al. 2008; Wang et al. 2011)。加えて、CARを発現するCD4かつCD8セントラルメモリーT細胞 (Tcm) サブセットを、造血幹細胞移植後の非ホジキンリンパ腫患者に投与し、Tcm由来のCAR-T細胞が、改善された拡大を示し、これは、Tcmが、ヒトの癌の処置において治療上の利点を有し得ることを示している。Tcm表現型に集団を偏向させる際のラパマイシンとdmpGE2の組み合わせの能力を評価した。CD8 Tcmサブセットを、細胞表面マーカーCD45RAおよびCCR7の発現に基づき定義した。図4Aは、活性化されていないT細胞におけるCD45RAおよびCCR7発現の散布図を示し、次に、それを、Tcm、ナイーブ (Tn)、エフェクターメモリー (Tem) およびCD45RA<sup>+</sup>エフェクターメモリー (Temra) 細胞を含むT細胞サブセットのゲーティングのため使用した。TnおよびTcm細胞は最低限分化し、最大の増殖可能性を有し、一方、Temra細胞は、最も十分に分化し、乏しい増殖可能性を有するが、強力なエフェクター機能を有する (D'Asaro et al. 2006)。

#### 【0223】

CD8 T細胞を、実施例5において記載した通り、ビヒクル、ラバ、dmpGE2またはラバ+dmpGE2で処理した。図4Bは、それぞれの処理後に培養物に存在するT細胞サブセットの略図を示す。図4Cは、異なるサブセットを同定するために使用されるフローサイトメトリー解析を示す。ビヒクルまたはいずれかの化合物単独と比べ、ラパマイシンとdmpGE2の組み合わせでの処理後、より分化したTemサブセットにおける喪失により説明される、Tcmサブセットのパーセンテージにおける増大が存在する。したがって、ラバ+dmpGE2での処理は、CAR-T細胞療法のためより望ましいT細胞サブセット (Tcm) において増大を引き起こす。理論により制限されるものではないが、TemからTcmへの表現型変化および/または促進されたTcm拡大は、調節した集団におけるTcmの増大したパーセンテージに関与し得た。

#### 【0224】

実施例7 - ラバ+dmpGE2処理はT細胞枯渇マーカー発現を低減する

「枯渇」に起因したT細胞不全は、癌または感染症の十分な制御を起きないようにすることができる状態である。T細胞枯渇は、乏しいエフェクター細胞機能、ならびにPD-1およびTim-3を含む枯渇マーカーとして集合的に公知の、複数の細胞表面タンパク質の増大した発現により特徴付けられる (Wherry and Kurachi 2015)。枯渇マーカー発現に対するCAR-T細胞の化合物処理の効果を決定するために、実施例5において記載した通り、2人の異なるドナー由来の細胞を調製し、処理し、次に、PD-1およびTim-3について染色し、発現を、フローサイトメトリーを使用して決定した。図5において示した通り、ラパマイシンまたはdmpGE2のいずれかでの処理は、PD-1発現を低下させ、一方、ラパマイシンとdmpGE2の組み合わせでの処理は、ビヒクル、またはそれぞれの個々の化合物処理と比べ、PD-1発現においてわずかに大きな低減に至った。様々な処理下でのTim-3発現に関して、ビヒクルと比較したとき、ラパマイシン単独はTim-3発現を低下させ、一方、dmpGE2単独は効果を示さなかった。しかしながら、ラパマイシンとdmpGE2の組み合わせは、任意の単一の化合物処理または処理なしと比較して、Tim-3発現をより顕著に低減した。単独で使用したとき、dmpGE2は、Tim-3発現に対する効果を有しないという事実にも関らず、ビヒクル、ラパマイシン、およびdmpGE2と比べ、ラバ+dmpGE2の組み合わせによりTim-3発現において増強された低減を観察した。このデータは、ラパマイシンとdmpGE2の組み合わせでのT細胞の処理が、免疫不全に関するT細胞枯渇を低減することにより、細胞の抗腫瘍能を増強することを示した。

#### 【0225】

実施例8 - ラバ+dmpGE2処理はT細胞ミトコンドリア予備呼吸容量を増大する

細胞は、一般的に、2つの主要なエネルギー経路、解糖およびミトコンドリア呼吸を利用する。増大したストレスまたは労働に応答してエネルギーを生じるための細胞において利用可能な特別な能力である、ミトコンドリア予備呼吸容量 (SRC) は、Tメモリー細

10

20

30

40

50

胞において増大するが、TemraのようなTエフェクター細胞において増大しないことが示された(van der Windt et al. 2012)。

【0226】

本発明者らは、実施例5において記載した通り、形質導入し、処理した細胞を使用して、化合物処理が、SRCに対する効果を有したかどうかを決定した。処理後、ミトコンドリア呼吸の測定値である酸素消費速度(OCR)を、Seahorse(商標)XF e9 6システム(Seahorse Bioscience、サンタクララ、カリフォルニア州)を使用して決定した。これを行うために、細胞を洗浄し、非緩衝アッセイ培地に再懸濁した。次に、細胞を96ウェルプレートに播種し、Seahorse(商標)ミストレス試験アッセイの対象にした。SRCを、基礎OCRと最大呼吸速度のOCRの間の差に基づき、決定する。図6は、SRCが、ビヒクル対照と比べ、ラパ+dMPGE2で処理した細胞においてほぼ2倍増大し、一方、それぞれ個々の化合物での処理は、約20~50%の若干の増大のみを示すことを示す。これらのデータは、ラパ+dMPGE2で処理したCAR-T細胞は、増大するか、またはTcm表現型に偏向されているばかりでなく、メモリーT細胞サブセットに関連する所望される代謝特性も提示することを示す。

10

【0227】

実施例9-ラパ+dMPGE2で処理したCD8<sup>+</sup>T細胞のゲノム全体での発現特徴

試験管内T細胞拡大プロセス中の、個々または組み合わせでのラパマイシンおよびdMPGE2処理のゲノム全体での影響を特徴付けるために、実施例5において記載した通り、形質導入し、処理した細胞からRNAを抽出し、Human Transcriptome Array gene(マイクロアレイ)チップ(アフィメトリクス、サンタクララ、カリフォルニア州)において解析し、結果を、ビヒクルで処理した試料と比較した。図7Aは、個々および組み合わせでの小分子により誘導された遺伝子プローブの転写変化を示すために、マイクロアレイチップを使用したゲノム全体での転写変化を描写する。図7Bにおいて模式的に示す通り、ラパ+dMPGE2処理下で、ビヒクル対照と比較して2倍より多く上方制御される遺伝子の総数は377であり、一方、それぞれ、ラパマイシン単独およびdMPGE2単独の処理下で215ならびに71であることは注目に値する。377種の上方制御された遺伝子のうち、264種の遺伝子は、組み合わせ処理で固有に上方制御されるが、いずれかの個々の化合物処理によってはされない。下方制御された遺伝子に関して、計581種の遺伝子が、ラパ+dMPGE2処理の下で、ビヒクル対照と比較して2倍より大きく下方制御され、一方、284種および38種のみの遺伝子が、それぞれ、ラパマイシン単独、およびdMPGE2単独処理下で下方制御される。581種の下方制御された遺伝子のうち、351種の遺伝子は、組み合わせ処理で固有に下方制御されるが、いずれかの個々の化合物処理によってはされない。单一または組み合わせの化合物処理下の差次の遺伝子発現特性は、両方の小分子を使用した組み合わせ処理が、それぞれの個々の処理の合計より有意に大きい、予め見い出された転写効果を有することを示し、これは、両方の経路の調節薬の存在下での相乗的応答を示している。

20

【0228】

单一または組み合わせ化合物処理下で差次の遺伝子を、図8A、および表4において示す。

30

【0229】

40

50

【表4-1】

表4-单一または組み合わせ化合物処理下で差次的に発現する関連遺伝子

	遺伝子	タンパク質名	UniProtKB /Swiss-Protエントリ識別子		遺伝子	タンパク質名	UniProtKB /Swiss-Protエントリ識別子
1	TCF7	転写因子7	P36402	27	PFKM	ATP-依存性ホスホフルクトキナーゼ	P08237
2	CD27	CD27抗原	P26842	28	CD74	HLAクラスII組織適合性抗原ガンマ鎖	P04233
3	LEF1	リンパ系エンハンサー結合因子1	P27782	29	LAG3	リンパ球活性化遺伝子3タンパク質	P18627
4	FOXP1	フォークヘッドボックスタンパク質P1	Q9H334	30	CD69	初期活性化抗原CD69	Q07108
5	CCR7	C-Cケモカイン受容体タイプ7	P32248	31	CD58	リンパ球機能関連抗原3	P19256
6	CREB1	サイクリックAMP応答配列結合タンパク質1	P16220	32	PXN	パキシリン	P49023
7	CROT	ペルオキシソームカルニチンO-オクタノイルトランスフェラーゼ	Q9UKG9	33	Tim-3	タンパク質3T細胞免疫グロブリンムチンを含有するT細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン	Q8TDQ0
8	MEF2A	筋細胞特異的エンハンサー因子2A	Q02078	34	CYP1A1	チトクロムP450 1A1	P04798
9	ACAC-A	5'-AMP活性化タンパク質キナーゼ触媒サブユニットアルファ-1	Q13131	35	KIR3DL2	キラー細胞免疫グロブリン様受容体3DL2	P43630
10	ALDOA	フルクトース二リン酸アルドラーゼA	P04075	36	TNFRSF9	腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー9	Q07011
11	ALDOC	フルクトース二リン酸アルドラーゼC	P09972	37	FAS	腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー6	P25445
12	CD93	補体成分Clq受容体	Q9NPY3	38	SLC2A3	溶質キャリアファミリー2、促進性グルコース輸送体メンバー3	P11169
13	PGAM1	ホスホグリセリン酸ムターゼ1	P18669	39	SLC1A5	中性アミノ酸輸送体B	Q15758

10

20

30

40

【0230】

【表4-2】

表4-单一または組み合わせ化合物処理下で差次的に発現する関連遺伝子

	遺伝子	タンパク質名	UniProtKB /Swiss-Protエントリ識別子		遺伝子	タンパク質名	UniProtKB /Swiss-Protエントリ識別子
14	PGK1	ホスホグリセリン酸キナーゼ1	P00558	40	GPR56	接着性G蛋白質共役受容体G1	Q9Y653
15	LDHA	L-乳酸脱水素酵素A鎖	P00338	41	PRDM1	PRドメインジングルフィンガータンパク質1	O75626
16	PDCD1	プログラム細胞死1リガンド1	Q9NZQ7	42	IL7R	インターロイキン-7受容体サブユニットアルファ	P16871
17	ENO2	ガンマ-エノラーゼ	P09104	43	SLC3A2	4F2細胞表面抗原重鎖	P08195
18	HK1	ヘキソキナーゼ-1	P19367	44	PRF1	PRF1	P14222
19	IL15	インターロイキン-15	P40933	45	IL2	インターロイキン-2	P60568
20	SMAD7	マザーズアゲンストデカペンタプレジック相同体7	O15105	46	NKG7	タンパク質NKG7	Q16617
21	ELF4	ETS-関連転写因子Elf-4	Q99607	47	SLC7A5	巨大中性アミノ酸輸送体小サブユニット1	Q01650
22	CD244	ナチュラルキラー細胞受容体2B4	Q9BZW8	48	SLAMF7	SLAMファミリーメンバー-7	Q9NQ25
23	GFI1	ジンクフィンガータンパク質Gfi-1	Q99684	49	GZMH	グランザイムH	P20718
24	KLRF1	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリー-Fメンバー1	Q9NZS2	50	TNF	腫瘍壞死因子	P01375
25	RUNX3	Runt-関連転写因子3	Q13761	51	CCL4	C-Cモチーフケモカイン4	P13236
26	HK2	ヘキソキナーゼ-2	P52789	52	IFNG	インターフェロンガンマ	P01579

【0231】

40

実施例10-ラバ+d m P G E 2で処理したCD8<sup>+</sup>T細胞の遺伝子パネル特徴

T細胞成熟に重要な遺伝子のパネルについての発現変化に対する、組み合わせでの両方の小分子の影響をさらに特徴付けるために、実施例5において形質導入し、調製した細胞から、トータルRNAを抽出した。RNAを、アフィメトリクスヒトトランスクリプトームアレイにおいて解析し、パネル中の遺伝子の（ヒビクル処理と比べた）変化の倍数を決定した。両方の小分子を含めることは、そのうち幾つかがメモリー表現型を促進することが公知である多くの鍵となるT細胞遺伝子に対する予め見いだされた転写の影響、同じく代謝への影響を有した（図8A）。ラバマイシンとd m P G E 2の両方での処理は、転写因子遺伝子（図8B）と解糖に関与する遺伝子（図8B）の両方に対して相乗的效果をもたらした。転写因子TCF7およびLEF1は、機能的メモリー細胞の発生に重要であり

50

(Zhou et al., J Immunol. 2012; 189(6): 2722-2726)、ラパマイシンとd m P G E 2の両方での処理は、いずれかの化合物単独よりこれらの遺伝子の発現を増大した(図8B)。BLIMP-1は、最後まで分化したT細胞およびエフェクターメモリーT細胞において発現した転写抑制性遺伝子であり、BLIMP-1欠損は、セントラルメモリーT細胞特性の獲得を促進する(Rutishauser et al., Immunity. 2009; 31(2): 296-308)。ラパマイシンとd m P G E 2の組み合わせでの処理は、いずれかの化合物単独と比較して、BLIMP-1発現のよりおおきな低下をもたらした(図8B)。興味深いことに、BLIMP-1は、d m P G E 2単独で処理したとき、わずかに上方制御され、それは、d m P G E 2がエフェクターティー細胞分化を促進するという観察と一致する(Sreeramkumar et al., 2015)。故に、ラパマイシンとd m P G E 2の両方を使用した組み合わせ処理は、T細胞分化をもたらす際のd m P G E 2の傾向を「正す」だけでなく、下方制御されているBLIMP-1発現において、ラパマイシンと組み合わされたとき相乗的効果を達成することは驚くべきことである。10

#### 【0232】

転写因子発現における変化に加えて、ラパマイシンとd m P G E 2の組み合わせはまた、代謝に関する遺伝子の発現に影響した。遺伝子ALDOC、ENO2、およびPGK1は全て、解糖経路の異なる工程に関与し、ラパマイシンおよびd m P G E 2での組み合わせ処理は、これらの遺伝子の下方制御をもたらした(図8C)。対照的に、いずれかの化合物単独での処理は、これらの解糖に関連する遺伝子の全3種の上方制御を引き起こした(図8C)。活性化されたT細胞は、全エフェクター機能をサポートするのにより適している好気的解糖に優先的に切り替わる(Chang et al., Cell. 2013; 153(6): 1239-1251)。CD8<sup>+</sup>T細胞における高い解糖活性の誘導は、メモリー細胞よりむしろ最後まで分化した状態にT細胞を至らせる(Sukumar et al., J Clin Invest. 2013; 123(10): 4479-4488)。実施例8において示した予備呼吸容量における増大と共に、ALDOC、ENO2、およびPGK1の低減した発現を介して解糖を経験するラパマイシンおよびd m P G E 2で処理した細胞の能力における低減は、組み合わせ処理が、セントラルメモリー表現型に細胞を偏向させるという見解をサポートする。20

#### 【0233】

実施例11-ラパ+d m P G E 2で処理したCD8<sup>+</sup>T細胞におけるCCR7およびCD62LのRT-qPCR定量30

メモリー細胞偏向におけるラパ+d m P G E 2の影響をさらに特徴付けるために、メモリーT細胞において高度に発現することが公知の、2つの鍵となる遺伝子CCR7およびCD62Lについての発現変化を調べた。トータルRNAを、実施例5において記載した通り、化合物で処理した細胞から抽出した。RNAを、各遺伝子に特異的なRT-qPCRおよびTaqMan遺伝子発現アッセイを使用して解析した。各遺伝子転写物の相対量を、各試験管内処理について決定した。図9Aおよび9Bは、ラパ+d m P G E 2処理での両方の鍵となるメモリーT細胞遺伝子の発現における劇的な増大を示し、一方、個々の化合物は、これらの遺伝子の両方について比較的小限の転写の増大を誘導した。図9Cは、実施例5および図3におけるCD27の細胞表面発現を裏付ける、CD27遺伝子発現に対するラパ+d m P G E 2処理の同様の効果を示した。ラパマイシンとd m P G E 2の両方について観察した要件は、発現の変化をメモリーT細胞に向けて促進する経路間の相乗的応答を暗示する。40

#### 【0234】

実施例12-ラパ+d m P G E 2での処理は連続殺傷アッセイにおいてCAR-T細胞拡大を改善する

臨床試験におけるCAR-T細胞療法の臨床上の診断マーカーは、処置後の患者においてCAR-T細胞の拡大である(Porter et al. 2015)。CAR-T細胞が、複数回のラウンド後に試験管内で腫瘍細胞を「排除する」ことを可能にする、試験

10

20

30

40

50

管内連続殺傷アッセイは、CARにより認識される抗原を発現する腫瘍細胞の存在下でのCAR-T拡大を評価することができるモデルである。この終わりに、CD8 T細胞を形質導入して、CAR-T細胞を得て、実施例5において記載する通り処理し、次に、凍結保存した。解凍後、CAR-T細胞を、内在性CD19および遺伝子導入mKate2遠赤色蛍光タンパク質を発現するNa1m6腫瘍細胞と共に培養した。CAR-T細胞におけるeGFP、およびNa1m6標的細胞におけるmKate2の発現は、連続殺傷アッセイにおいて両方の細胞タイプの容易かつ信頼性のある同定およびカウントを可能にする。殺傷の各ラウンドを開始する前に、Na1m6標的細胞に対するCAR-T細胞の同じ比が、異なる化合物処理から生じたCAR-T細胞培養に渡り維持されるように、細胞数を調整した。

10

## 【0235】

図10Aは、腫瘍細胞殺傷の各ラウンド後、2人のドナー由来のCAR-T細胞の拡大の倍数を示す。ラバ+dMPGE2で処理したCAR-T細胞は、ビヒクル、または個々のいずれかの化合物と比べて、一貫して改善された拡大を示す。全3ラウンドの連続殺傷後のトータルの拡大を決定するとき(図10B)、ラバ+dMPGE2は、個々のいずれかの化合物よりずっと大きな拡大を示し、これは、この重要なパラメーターにおける可能性のある相乗的効果を示している。

拡大における観察した相違に関らず、試験管内で腫瘍細胞を殺傷するCAR-T細胞の能力は、3ラウンドの試験管内殺傷について影響しなかった。ラバ、dMPGE2、またはラバ+dMPGE2で予め処理したCAR-T細胞は、時間と共に標的細胞を首尾よく排除した(図11A)。3ラウンドの終わりに、共培養物における生存細胞のフローサイトメトリー解析は、ビヒクルおよび全ての、化合物で処理した細胞について非常にわずかのmKate2陽性細胞を示した(図11B)。

20

## 【0236】

実施例13-大規模培養フォーマットでのラバ+dMPGE2での改善されたCAR-T細胞拡大の証明

CD4 T細胞に対するラバ+dMPGE2の効果を決定するために、およびラバ+dMPGE2の増大した拡大が、より大きな拡大フォーマットまで増えるであろうことを示すために、CD4かつCD8 T細胞を、別々に活性化し、試験管内で拡大させた。活性化の1日後、細胞をCAR-2コンストラクト(図2)で形質導入し、次に、化合物を含むかまたは含まない24ウェルGRENプレートに再度蒔いた。半分の培地を、活性化の1週間後の回収までその後2日毎に置き換えた。図12は、ラバ+dMPGE2の添加が、DMSOと比べ、活性化の1週間後に増大したCD4かつCD8 T細胞拡大(図12A)およびバイアビリティー(図12B)をもたらすことを示す。

30

## 【0237】

実施例14-ラバ+dMPGE2で処理したCAR-T細胞の改善された生体内有効性

ラバ+dMPGE2処理が、CAR-T細胞の生体内腫瘍クリアランスおよび持続性を増大したかどうかを決定するために、NSGマウスに、ホタルルシフェラーゼを発現するように操作したNa1m-6-1uc、CD19<sup>+</sup>ヒト腫瘍株を注射した。CAR-T細胞を、別々に活性化させ、試験管内で拡大させたCD4<sup>+</sup>かつCD8<sup>+</sup>T細胞から生じさせた。活性化の1日後、細胞をCAR-2コンストラクト(図2)で形質導入し、次に、化合物を含むかまたは含まない24ウェルGRENプレートに再度蒔いた。半分の培地を、活性化の1週間後の回収までその後2日毎に置き換えた。腫瘍注入の1週間後、NSGマウスを、後眼窩注射を介して、比1:1で混合した0.2×10<sup>6</sup>CD4かつCD8 CAR-T細胞で処置した。マウスを、定期的に画像処理し、腫瘍負荷量を決定した。図13Aは、ラバ+dMPGE2またはPI3K阻害剤PI-103で処理したCAR-T細胞が、マウスの大部分から腫瘍を排除することができたが、一方、形質導入していないT細胞、またはDMSO、U0126もしくはTWS119で処理したCAR-T細胞で処置したものは、最小の腫瘍制御を示した。

40

## 【0238】

50

実施例 15 - ラパ + d m P G E 2 で処理した C A R - T 細胞での改善された二次性腫瘍抗腫瘍応答

最初の腫瘍クリアランスを仲介した C A R - T 細胞が、持続することができ、長期の保護をもたらすかどうかを決定するために、原発腫瘍注入の 60 日後に、原発腫瘍負荷を生存したマウス（実施例 14）に、 C D 19 を発現するよう操作したヒト骨髓性白血病株 K 562 - C D 19 を再負荷した。この再負荷研究の開始まで生存したマウスを有した唯一の 2 群は、ラパ + d m P G E 2 および P I - 103 で処理したコホートであった。図 13 B は、二次性腫瘍での負荷の 21 日後に、ラパ + d m P G E 2 で処理した C A R - T のマウスの 75% (3/4) 、および P I 103 C A R - T で処置したマウスの 60% (3/5) が、検出可能な腫瘍を有しなかったことを示す。

10

【 0239 】

実施例 16 - 凍結保存したラパ + d m P G E 2 で処理した C A R - T 細胞の改善された生体内有効性

ラパ + d m P G E 2 処理が、凍結保存後の C A R - T 細胞の生体内腫瘍クリアランスおよび持続性を増大したかどうかを決定するために、本発明者らは、 N S G マウスに、ホタルルシフェラーゼを発現するよう操作した、  $0.5 \times 10^6$  N a l m - 6 - 1 u c 、 C D 19 発現ヒト腫瘍株を注入した。4 日後、マウスを、比 1 : 1 で混合した  $1.0 \times 10^6$  、  $0.5 \times 10^6$  または  $0.2 \times 10^6$  C D 4 かつ C D 8 C A R - T 細胞で処置した。 C A R - T 細胞を、実施例 14 において記載した通り、別々に活性化し、試験管内で拡大した C D 4<sup>+</sup> かつ C D 8<sup>+</sup> T 細胞から生じさせた。活性化の 1 日後、細胞を C A R - 2 コンストラクト（図 2）で形質導入し、次に、化合物を含むかまたは含まない 24 ウエル G R E X プレートに再度蒔いた。半分の培地を、活性化の 1 週間後の回収までその後 2 日毎に置き換えた。細胞を凍結保存し、次に使用のため解凍した。 N S G マウスに腫瘍細胞を注入し、続いて 1 週間後、後眼窩注射を介して C A R - T を移植した。

20

【 0240 】

1 つの実験において、（1） D M S O ；（2）ラパマイシン；または（3）ラパマイシンおよび d m P G E 2 (右のパネル、実践) の存在下で成長させた、準最適な用量の C A R - T 細胞 ( $0.2 \times 10^6$ ) を、腫瘍を生じているマウスに注射した。ラパマイシン（図 15 A）またはラパマイシンおよび d m P G E 2 (図 15 B) で処理した C A R - T 細胞は、養子移植の 1 週間以内に腫瘍負荷量を低減することができたが、一方、 D M S O で処理した C A R - T 細胞はできなかった。 D M S O で処理した C A R - T 細胞を注射したマウスは、腫瘍負荷量を検出未満に低減することができず、全てのマウスは、抗腫瘍応答を持続するのに失敗し、再発した（図 15 A および 15 B）。図 15 A において示す通り、ラパマイシンで処理した C A R - T 細胞を注射した 4 匹のうち 1 匹のマウスが再発した。ラパマイシンで処理した C A R - T 細胞を注射した他の 2 匹は、腫瘍負荷量を検出未満に低減することができ、それらの 3 匹のうち 1 匹のマウスは、長期の抗腫瘍応答を持続することができ、一方、検出不可能な腫瘍負荷量を有する 3 匹のうち他の 2 匹は、それぞれ、 30 日および 45 日を超えては生存しなかった（図 15 A）。ラパマイシンおよび d m P G E 2 で処理した C A R - T 細胞を注射した 4 匹のマウスのうち、 4 匹のうち 2 匹が、長期の抗腫瘍応答を持続することができたが、一方他の 2 匹は再発した。長期の抗腫瘍応答を持続した 2 匹のうち 1 匹のマウスは、腫瘍負荷量を検出未満に低減することができた。ラパマイシンおよび d m P G E 2 で処理した C A R - T 細胞を注射した全 4 匹のマウスは、 60 日を超えて生存した。

30

【 0241 】

当業者は、本明細書において記載される方法、組成物、および製品が、典型的な実施形態の代表であり、本発明の範囲に対する制限として意図されないことを容易に理解するだろう。様々な置換および修飾が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書において開示される本開示に成され得ることは、当業者に容易に明らかであるだろう。

40

【 0242 】

本明細書において述べられたすべての特許および刊行物は、本開示が関係する当業者の

50

レベルの指標である。全ての特許および刊行物は、それぞれの個々の刊行物が、参照により組み込まれる具体的かつ個別に示されたかのように、同じ程度まで本明細書において参照により取り込まれる。

#### 【 0 2 4 3 】

本明細書において説明として適切に記載される本開示は、本明細書において具体的に開示されていない任意の構成要件または複数の構成要件、限定または複数の限定の不在下で、実施され得る。したがって、例えば、本明細書における各場合において、用語「含むこと」、「本質的にからなる」、および「からなる」は、他の2つの用語のいずれかで置き換えられ得る。利用された用語および表現は、説明の用語として使用され、制限の用語として使用されず、示され、記載される特性、またはその一部の任意の均等物を除外するというかかる用語および表現の使用において、制限は存在しないが、様々な修飾が、請求される本開示の範囲内で可能であることが、認められる。したがって、本開示は、好ましい実施形態により具体的に開示されているが、本明細書において開示される概念の場合による特性、修飾、およびバリエーションが、当業者により再分類され得ること、ならびにかかる修飾およびバリエーションが、添付の請求の範囲により定義される本発明の範囲内であるとみなされることは、理解されるべきである。

10

20

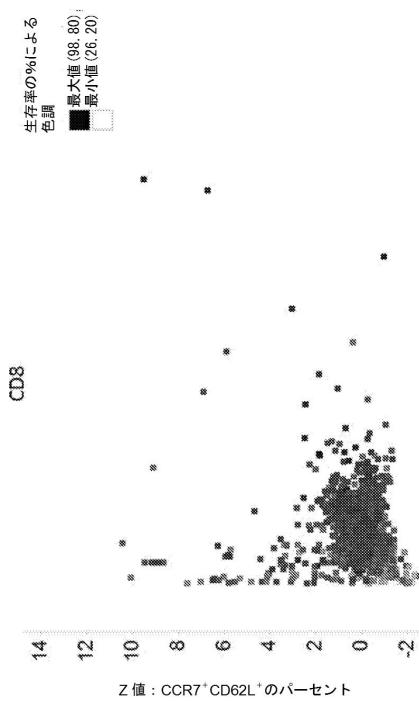
30

40

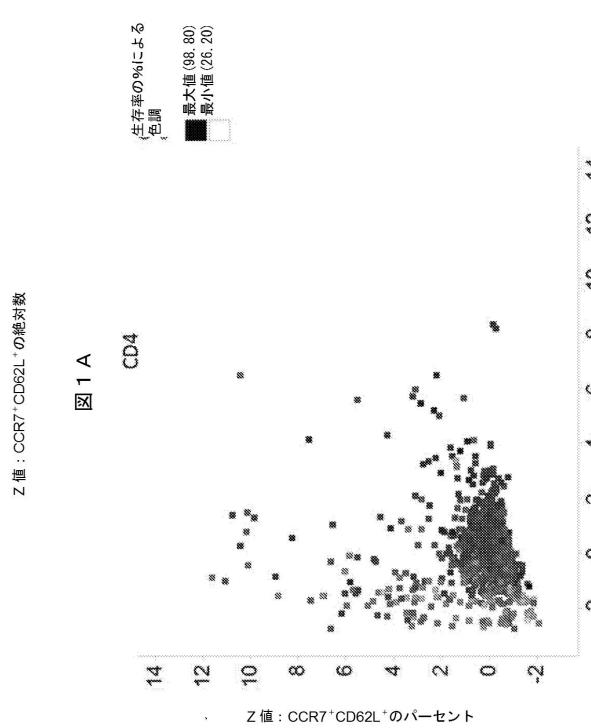
50

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

20

30

40

図 1 B

【図 2】

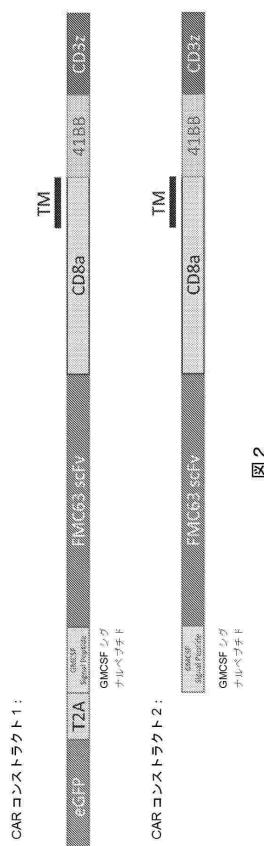


図 2

50

【図 3】

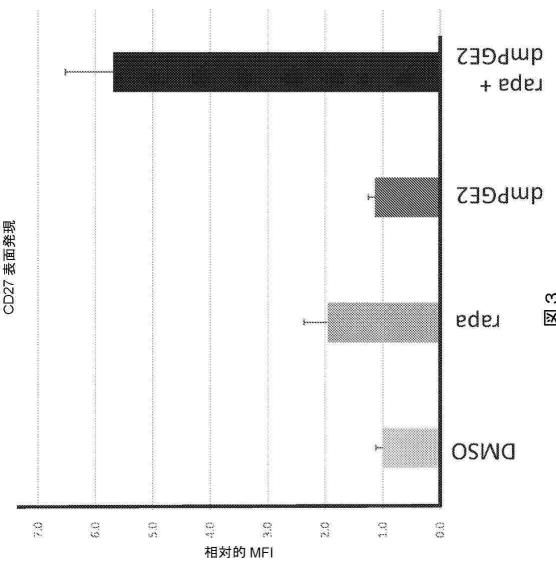
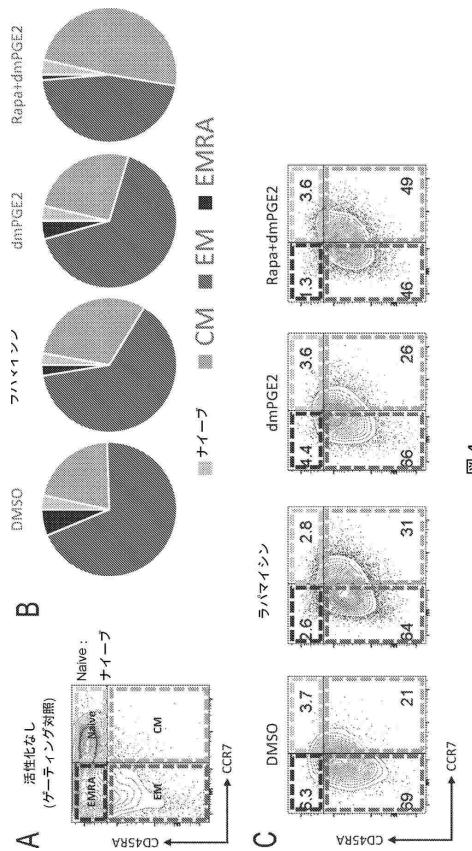
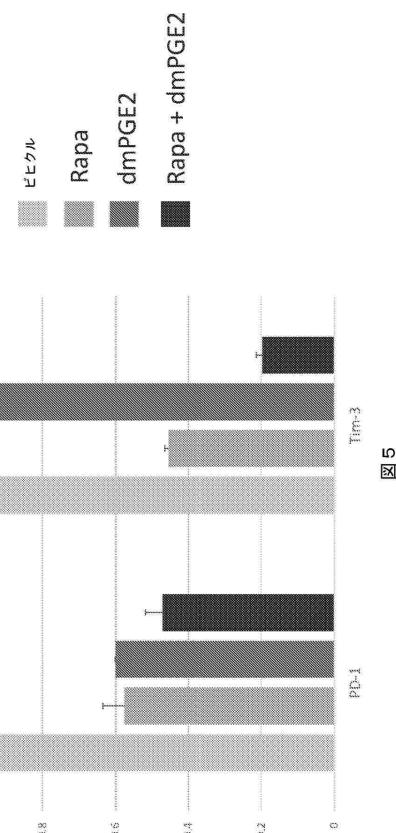


図 3

【図4】



【図5】



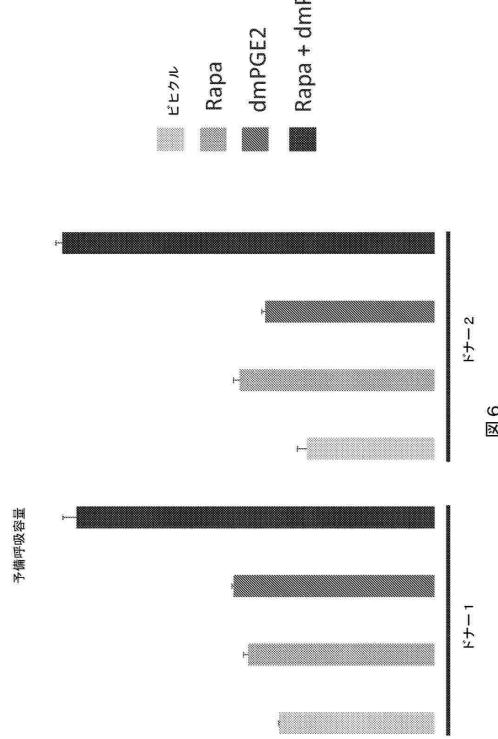
10

20

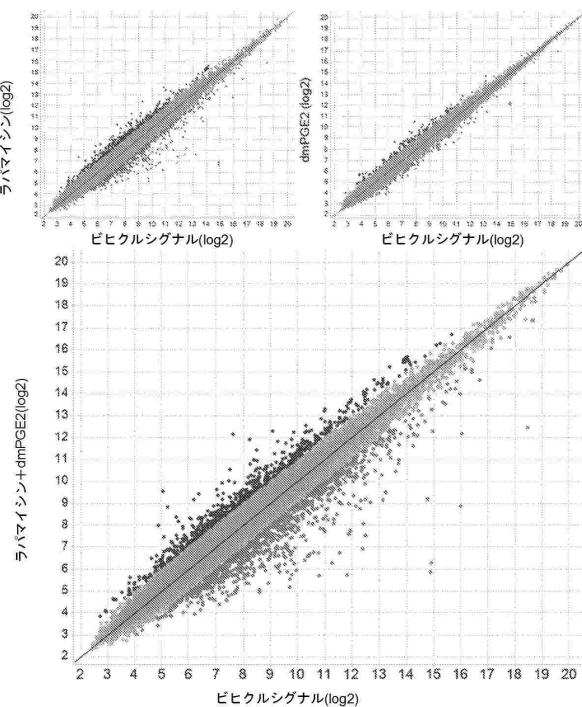
30

40

【図6】



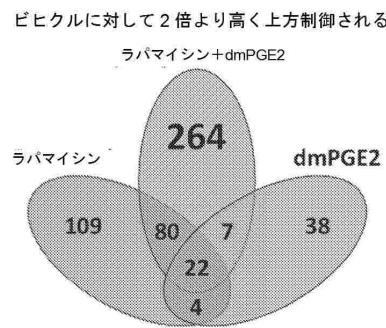
【図7 A】



【図7 A】

50

【図7B】



ビヒクルに対して 2 倍より高く下方制御される

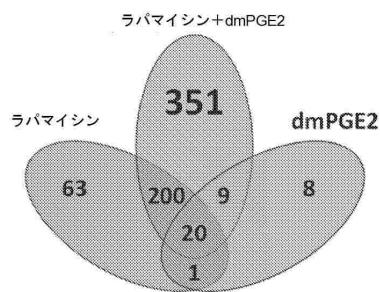
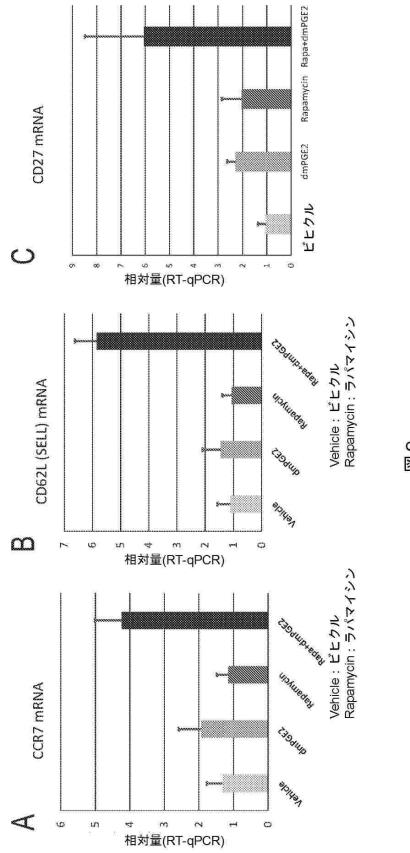
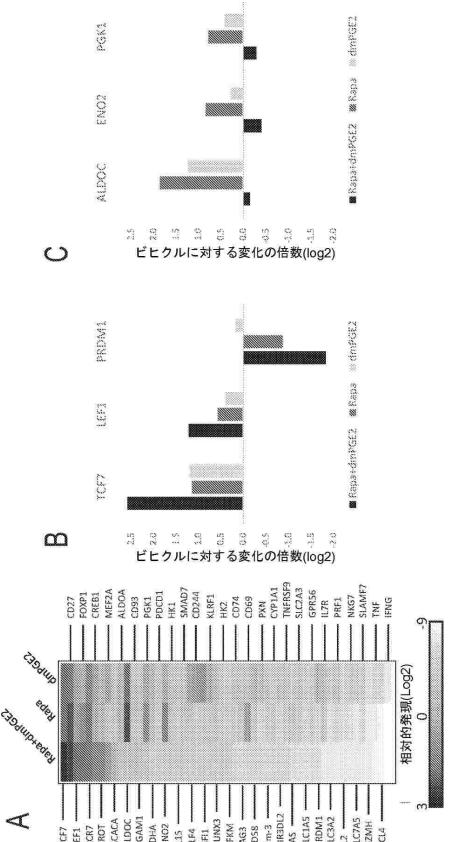


図7B

【 図 9 】

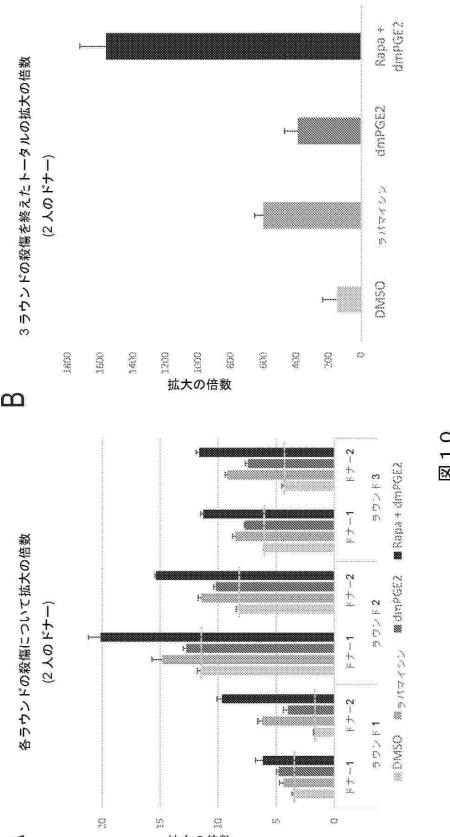


【 四 8 】



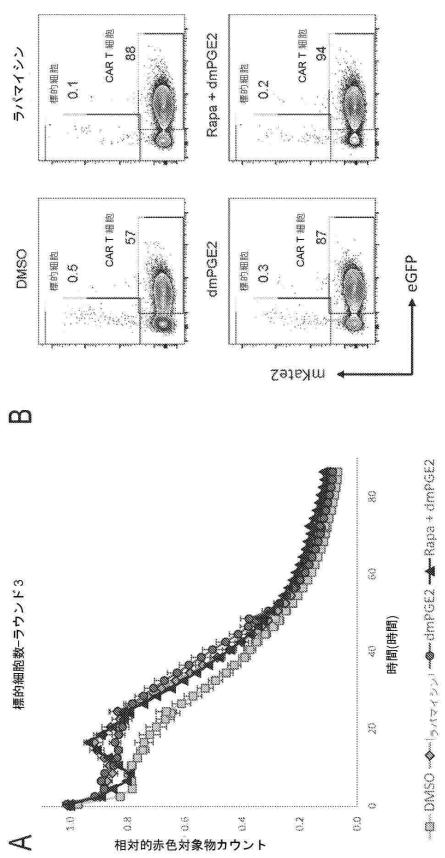
8

【 10 】

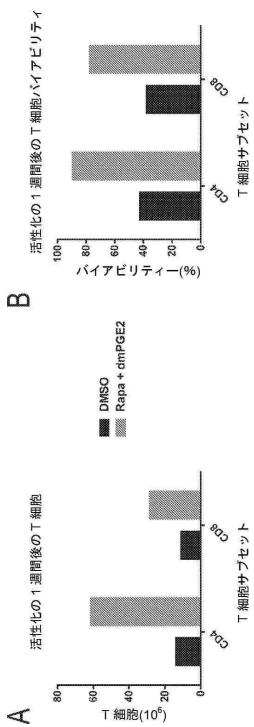


10

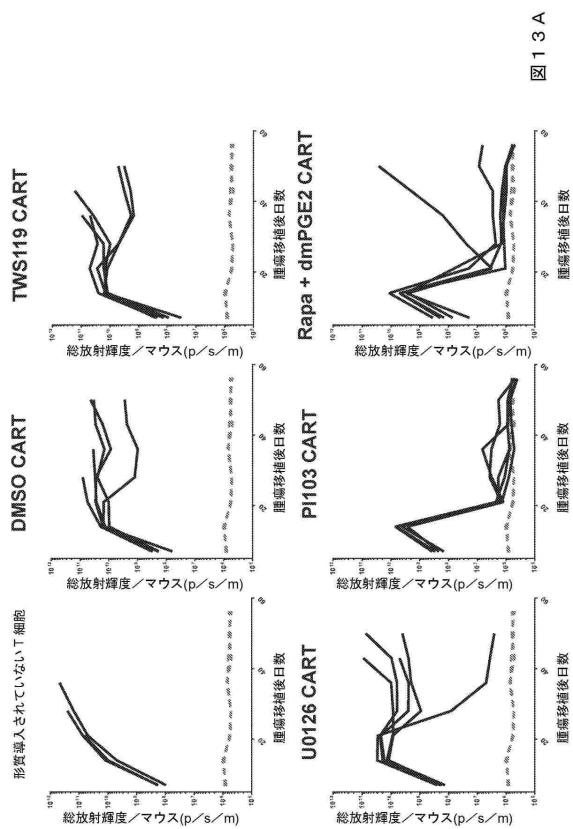
【図 1 1】



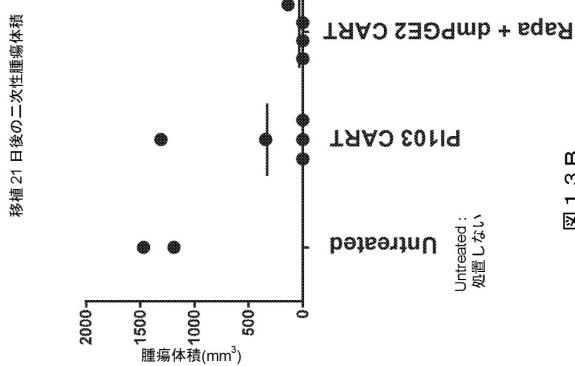
【図 1 2】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 14】

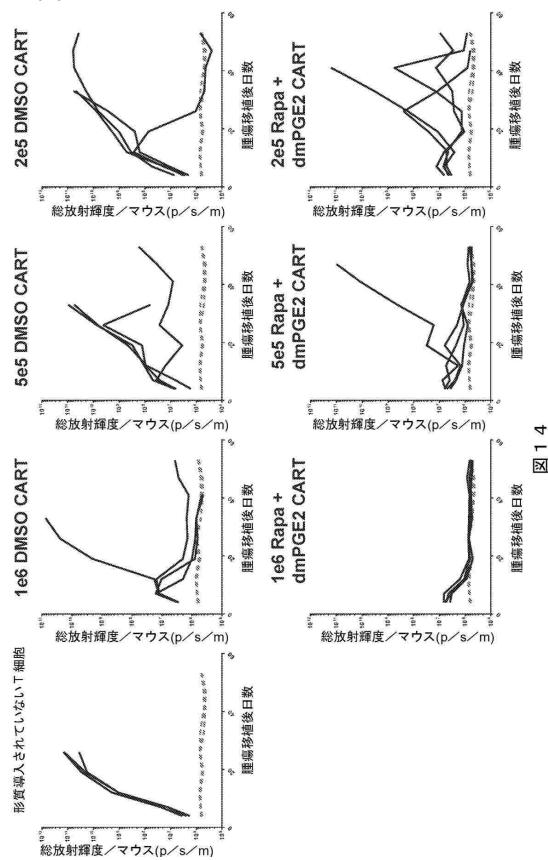


図 14

【図 15】

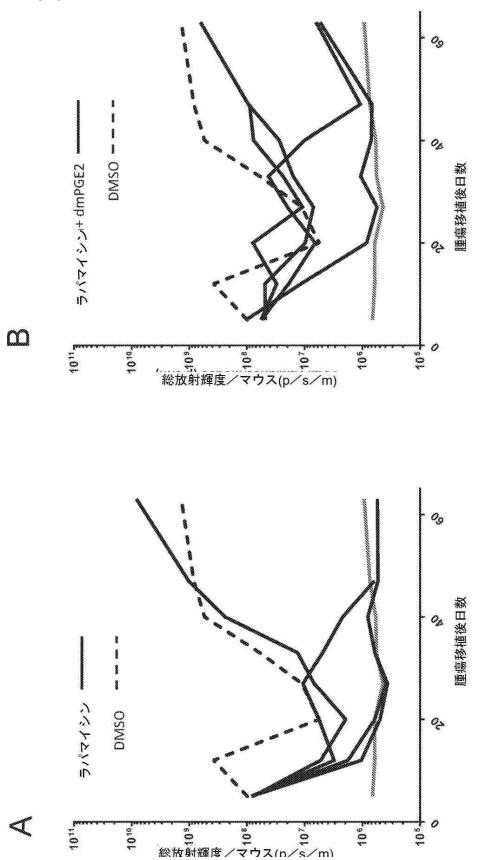


図 15

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F	I			
A 6 1 K	35/51	(2015.01)	A 6 1 K	35/51	
A 6 1 K	38/04	(2006.01)	A 6 1 K	38/04	
A 6 1 K	38/18	(2006.01)	A 6 1 K	38/18	
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K	38/19	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
			C 1 2 N	15/62	Z

(31)優先権主張番号 62/402,883

(32)優先日 平成28年9月30日(2016.9.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121、サンディエゴ、ジェネラル アトミクス コート  
3535、スイート 200 フェイト セラピューティクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 バラマール, バーラム

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121、サンディエゴ、ジェネラル アトミクス コート  
3535、スイート 200 フェイト セラピューティクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ビョーダール, リヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121、サンディエゴ、ジェネラル アトミクス コート  
3535、スイート 200 フェイト セラピューティクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ペラルタ, アイゲン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121、サンディエゴ、ジェネラル アトミクス コート  
3535、スイート 200 フェイト セラピューティクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ハーディ, イアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121、サンディエゴ、ジェネラル アトミクス コート  
3535、スイート 200 フェイト セラピューティクス, インコーポレイテッド内

合議体

審判長 吉田 佳代子

審判官 伊藤 幸司

審判官 松波 由美子

(56)参考文献 特表2012-515213号公報( J P , A )

J Immunol, 2012年01月01日, 188(1), pp.21-28

J Pharmacol Sci, 2010, 112, pp.1-5

Cellular Immunology, 1981, 61, pp.52-61

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

A61K

C12N

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / BIOSIS / EMBASE ( ST  
N )