

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6802150号  
(P6802150)

(45) 発行日 令和2年12月16日(2020.12.16)

(24) 登録日 令和2年11月30日(2020.11.30)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 35/17 (2015.01)	A 61 K 35/17 ZMDZ
A 61 K 31/7068 (2006.01)	A 61 K 31/7068
A 61 P 35/02 (2006.01)	A 61 P 35/02
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00 121

請求項の数 11 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2017-508517 (P2017-508517)
(86) (22) 出願日	平成27年8月17日 (2015.8.17)
(65) 公表番号	特表2017-527551 (P2017-527551A)
(43) 公表日	平成29年9月21日 (2017.9.21)
(86) 国際出願番号	PCT/CA2015/050780
(87) 国際公開番号	W02016/023134
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016.2.18)
審査請求日	平成30年8月17日 (2018.8.17)
(31) 優先権主張番号	62/037,889
(32) 優先日	平成26年8月15日 (2014.8.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	507148294 ユニバーシティ ヘルス ネットワーク カナダ、エム・ジ・エス・シ・エス オンタリオ、トロント、エリザベス・スト リート、190、アール・フレーザー・エ リオット・ビルディング、ルーム・1・エ ス-417
(74) 代理人	100076428 弁理士 大塚 康徳
(74) 代理人	100115071 弁理士 大塚 康弘
(74) 代理人	100112508 弁理士 高柳 司郎
(74) 代理人	100116894 弁理士 木村 秀二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】がん治療のための免疫療法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

必要とする対象者において化学療法剤と組み合わせて急性骨髄性白血病(AML)を治療する際に使用するための医薬であって、有効量の成熟同種ダブルネガティブ(DNT)細胞(DNT細胞)を含み、前記DNT細胞はin vitroまたはex vivoで増幅されており、前記化学療法剤はシタラビン(AraC)又は別のデオキシシチジン類似体であり、前記DNT細胞は前記化学療法剤から7日以内に使用するためのものである、医薬。

## 【請求項 2】

前記使用は、有効量のDNT細胞の1つ以上の別個の追加用量の投与をさらに含む、請求項1に記載の使用するための医薬。 10

## 【請求項 3】

前記1つ以上の別個の追加用量の投与は、最後のDNT細胞投与後3日から2週間の間、または最後のDNT細胞投与の少なくとも3日後である、請求項2に記載の使用するための医薬。

## 【請求項 4】

前記対象者は、再発性、再燃性、または難治性のAMLを有する対象者である、請求項1乃至3のいずれか1項に記載の使用するための医薬。

## 【請求項 5】

前記対象者は、化学療法抵抗性のAMLを有する対象者である、請求項1乃至4のいずれか1項に記載の使用するための医薬。 20

**【請求項 6】**

前記DNT細胞は、前記化学療法剤の後に使用するためのものである、請求項1乃至5のいずれか1項に記載の使用するための医薬。

**【請求項 7】**

前記DNT細胞は、前記化学療法剤の同日に使用するためのものである、請求項1乃至6のいずれか1項に記載の使用するための医薬。

**【請求項 8】**

前記DNT細胞は、前記化学療法剤の後2日から7日の間に使用するためのものである、請求項1乃至6のいずれか1項に記載の使用するための医薬。

**【請求項 9】**

前記DNT細胞は、がん細胞に優先結合するキメラ抗原受容体（CAR）を発現する、請求項1乃至8のいずれか1項に記載の使用するための医薬。

**【請求項 10】**

前記DNT細胞は、CD33、CD19、CD20、CD123、及び／またはLeYに結合する1つ以上の受容体を発現する、請求項9に記載の使用するための医薬。

**【請求項 11】**

前記化学療法剤がシタラビン（Arac）である、請求項1乃至10のいずれか1項に記載の使用するための医薬。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

20

**【0001】****【関連出願】**

本願は、2014年8月15日出願の米国仮特許出願第62/037,889号の優先権を主張し、その全体が本明細書に参考として組み込まれる。

**【0002】****【技術分野】**

本開示は、ダブルネガティブT細胞(double negative T cells)を使用して、急性骨髓性白血病(AML: Acute Myeloid Leukemia)を含む、白血病(leukemia)とリンパ腫(lymphoma)等のがんの治療に関する。

**【背景技術】**

30

**【0003】**

急性骨髓性白血病(AML)は、成人急性白血病の主な原因であり、成人白血病の全ての約80%を占める(Menzinら、2002)。この病気を標的とするより効果的な方法の発展を目的とする研究が広範囲にわたって行われたにも関わらず、AMLは低い長期生存率に関連する; AMLの高齢患者の約5%及び若い患者の約30%のみが5年以上生存する(UngewickellとMedeiros、2012; Hoandら、2012)。従来の化学療法では、治療されたAML患者の>70%において、初期の寛解(initial remission)を効果的に達成できる(UngewickellとMedeiros、2012)。しかし、病気の高い不均一性(heterogeneity)により、AML患者の約30%は、化学治療に応答しない(UngewickellとMedeiros、2012; Bucisanoら、2012)。さらに、化学療法では多くの患者において病気の完全なクリアランスを達成できず、寛解期の患者の70%超に対して初期治療の2年以内にAMLが再燃(relapse)する(UngewickellとMedeiros、2012; Bucisanoら、2012)。予後不良に関連する再燃AMLを患有患者に対しては、標準の治療計画は存在しない(Ferraraら、2004)。再燃するAMLは、微小残存病変(MRD: Minimal Residual Disease)という事象に起因し、それは化学療法に対する抵抗性を有するAML細胞集団により媒介される(Garces-Eisele、2012; LinとLevy、2012)。MRDは主に白血病幹細胞(LSC: Leukemic Stem Cell)集団により貢献されていることは知られ、化学療法のような過酷な環境や条件を耐える能力を有する(Ishikawaら、2010; KadokamiとKitawaki、2011; Vazら、2013)。したがって、病気の無再燃クリアランス(relapse-free clearance)を目的にし、AML-LSC及びMRDを標的

40

50

とする治療の開発は、活動的に研究されてきた領域である。

#### 【0004】

同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT: Allogeneic Hematopoetic Stem Cell Transplantation) は、AML患者に対して治癒可能性のある治療法であり、従来の化学療法よりも高い無病生存率に関連する (AlatrashとMolldrem、2009)。T細胞が枯渇した移植は、より高い再燃率に至るため、ドナー由来T細胞で媒介した抗白血病効果は、患者の増加した生存に貢献する (AlatrashとMolldrem、2009)。しかし、臨床におけるallo-HSCTの使用は、適切なドナーの不足、治療の毒性、及び他の関連する合併症により制限されている (AlatrashとMolldrem、2009; Shlomchik、2007)。正常な組織において強力な免疫応答を誘導でき、それにより組織損傷、若しくは重症例の場合は患者の死亡に至ることは (AlatrashとMolldrem、2009; Shlomchik、2007)、同種細胞治療の使用を制限する障害となっている。10

#### 【0005】

メラノーマ患者を治療するためのT細胞免疫療法の使用に関する早期研究以来、他のがんに対する養子T細胞治療 (adoptive T cell therapy) に関して有意な進歩がみられ、それも無再燃 AMLクリアランスを達成するために細胞治療を用いる可能性を支持する (Rosenbergら、1988)。白血病に関連する抗原 (LAA: Leukemia Associated Antigens) という、白血病細胞において増加調節されている抗原が識別され、LAA特異的T細胞の抗白血病効果は、in vitroおよび動物モデルにおいて示されている (Vazら、2013; TeagueとKline、2013)。しかし、LAA特異的T細胞の使用は、その細胞の単離及び拡大の難しさにより妨げられている (Kochenderferら、2010; Johnsonら、2009; Parkhurstら、2011; Robbinsら、2011)。また、AMLにおいては多くのLAAが過剰発現されるが、胸腺 (thymus) 等の他の組織にその抗原が発現されるため、T細胞特異性の胸腺選択により、LAAに対する高い結合能を有する受容体を持つ成熟T細胞の発生が妨害される (TeagueとKline、2013)。あるいは、それぞれウィルムス腫瘍抗原 (Wilms' tumour antigen) またはルイスY (Lewis Y) 等の、LAAに対するトランスジェニックTCRまたはキメラAg受容体を発現するトランスジェニックCD8+T細胞を使用することも試みられた (Peinertら、2010; Xueら、2010)。このT細胞は、有意に向上しているLAAに結合する能力を有し、優れた抗腫瘍活性を示す (Kochenderferら、2010; Johnsonら、2009; Parkhurstら、2011; Robbinsら、2011)。しかし、遺伝子療法に関連する潜在的副作用に併せて、複雑でありかつ長時間にわたる処置によって、AMLを治療する目的でこれらの戦略を使用することは制限されている。それに加え、超生理学的 (supra-physiological) な数の遺伝子組み換えT細胞を注入することは、死亡を含む、厳格な有害事象に至り得る。従って、LAAの識別を要件としない、広範囲のがんに対して強力な効果を有する新規細胞免疫治療法を開発すれば、白血病の免疫治療に革命を起こし得る。2030

#### 【0006】

ダブルネガティブT細胞 (DNT細胞またはDNT: Double Negative T Cells) は、CD3-TCR複合体を発現する一方、CD4、CD8、またはNKT細胞マーカーであるGalCerをロードしたCD1d及びJ24~V14を発現しない、成熟末梢性Tリンパ球 (mature peripheral T lymphocytes) であり、ヒトにおける末梢血单核球 (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells) の1~3%を占める (Zhangら、2000)。化学療法に誘導される完全寛解 (complete remission) 期間中に AML患者からDNTを増幅 (expand) するためのプロトコルは以前に記載され、AML患者のDNTは、同患者から取得された原発性AML細胞 (primary AML cell) に対して、顕著な抗白血病活性を有することが、in vitroで示された (Youngら、2003; Merimsら、2011)。40

#### 【0007】

以前に、DNTは、パーフォリン・グランザイムに依存する経路 (perforin-granzyme dependent pathway) を介して、用量依存的に同種 AML 細胞株の死滅を誘導することが50

示された (Merimsら、2011)。動物モデルにおいて、従来のCD4+またはCD8+T細胞とは異なり、同種マウスDNTの輸注 (infusion) は、免疫抑制機能 (immune inhibitory function) を与える可能性が示された (Zhangら、2000; Youngら、2003; Heら、2007)。しかし、患者の原発性白血病細胞に対してDNTの活性は、in vivoで研究されていなかった。

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

本発明のある側面において、ダブルネガティブ (DN) T細胞 (DNT) は、リンパ種または白血病などのがんの治療に有効であることが決定された。特に、DNTを使用する免疫療法は、化学療法に対する抵抗性を有する白血病細胞を死滅させることを含む、急性骨髓性白血病 (AML: Acute Myeloid Leukemia) の治療に有効であることが示された。随意的に、DNTは自家性 (autologous)、例えばがんを有する対象者 (subject) またはがんの疑いのある対象者からのDNT、若しくは同種のもの (allogenic)、例えばがんを患わない健常なドナーからのDNTであっても良い。意外なことに、DNTは、正常な細胞及び正常な組織に検知可能な毒性を与えることなく、異種移植片モデルに、in vitro及びin vivoにおいて、がん細胞に対する細胞毒性効果を有することが観察された。

10

#### 【0009】

例2に示されるように、注入されたDNTはin vivoにおいて増殖し生存し、血液、脾臓、肺を含む異なる組織へ移動することが示され、DNTの集団が肺、肝臓、及び骨髄にも観察されたため、DNTはこれらの臓器内の腫瘍を標的する可能性が示唆された。また、本発明者は健常なドナーからの同種DNTは、AML細胞を選択的に標的し、がん致死活性を奏することをも示した。DNTは、AML異種移植モデルにおいて、生着 (engraftment) を阻止することも示し、よってDNTはin vivoで白血病細胞のレベルを低下させることもできることも示した。さらに、例6に示すように、注入されたDNTは血液から骨髄へ移動し、既存のAMLがん細胞を標的するため、AMLを有する対象者の治療のために、臨床の場で有効であることが示唆されている。

20

#### 【0010】

また、Daudi (B細胞リンパ腫 (バーキットリンパ腫 [Burkitt's lymphoma]))、Jurkat (T細胞性急性リンパ腫)、K562 (慢性骨髓性白血病)、U937 (慢性骨髓性白血病)、及び原発性と樹立した肺がん細胞株を含む、いくつかのがん細胞株は、in vitroでDNT細胞媒介細胞傷害 (DNT cell mediated cytotoxicity) に高度な感受性を奏することが示された (データは非表示)。

30

#### 【0011】

化学療法は、AML患者に使用される標準治療法であり、白血病のロードを低下させること、及び病気の初期寛解を達成することには有効である。しかし、多くの場合、化学療法では完全なクリアランスに至らず、よってAML患者における再燃率が高い。したがって、化学療法に対して非応答性であるAML細胞を排除し、再燃率を低下させる能力で、AML患者の生存率を有意に増加させることが期待されている。例7に示されているように、本発明者は、DNTは、化学療法抵抗性のがん細胞、特に化学療法抵抗性のAMLを殺傷することに有効であることを示した。したがって、DNTは、化学療法に応答しなかつた対象者に関する免疫治療、またはAML及び/または化学療法抵抗性の最小抵抗疾患 (MRD: Minimal Resistant Disease) 等の再燃または再発 (recur) するがんを予防または治療するために有用である可能性がある。

40

#### 【0012】

本発明の別の側面において、DNTは細胞周期阻害剤 (cell cycle inhibitor) との組み合わせでがん細胞を殺傷することに有効であることが示された。図9に示されているように、DNTと細胞周期阻害剤Aracを使用した併用療法は、Aracのみで治療した場合に比較して、AML生着のレベルを低下させた。

#### 【0013】

例10で示されているように、DNTは、in vitroの化学療法抵抗性がん細胞及び異種

50

移植性モデルを含む、原発性 A M L 患者芽球 (blast) に対して、正常な細胞や組織に検知可能な毒性なく、強力な抗白血病効果を有する。同種 D N T について、正常な末梢血単核球 ( P B M C ) 若しくは造血前駆細胞 / 幹細胞を攻撃すること、またはマウスにおいて異種移植片対宿主病 ( graft-versus-host disease ) の原因となることは観察されていない。

#### 【 0 0 1 4 】

したがって、ある実施形態において、それを必要とする対象者に対してがんを治療する方法であって、ここに記載するような D N T の有効量を対象者に投与することを含む方法を提供する。また、それを必要とする対象者に対してがんを治療するための、ここに記載するような D N T の使用を提供する。ある実施形態において、がんは白血病である。ある好ましい実施形態において、がんは急性骨髓性白血病 ( A M L ) である。ある実施形態において、がんは慢性骨髓白血病 ( C M L : Chronic Myeloid Leukemia ) である。ある実施形態において、がんはリンパ腫である。ある実施形態において、がんは非ホジキンリンパ腫 ( N H L : Non-Hodgkin Lymphoma ) である。ある実施形態において、がんは、バーキットリンパ腫等の B 細胞リンパ腫である。ある実施形態において、がんは T 細胞急性リンパ腫である。ある実施形態において、がんは肺がんである。

#### 【 0 0 1 5 】

ある実施形態において、がんは、化学療法の治療に対して抵抗性のがんである。例えば、ある実施形態において、がんは化学療法抵抗性の A M L である。ある実施形態において、ここに記載の方法及び使用は、再発性 ( recurring ) または再燃性 ( relapsing ) がんを有する対象者の治療のためのものである。ある実施形態において、がんは、再発性、再燃性、または難治性 ( refractory ) の白血病またはリンパ腫である。ある実施形態において、がんは、微小残存病変 ( M R D ) または白血病幹細胞に起因する再燃性の A M L 等の再燃性のがんである。ある実施形態において、対象者は完全寛解期にない。例えば、ある実施形態において、対象者は 1 つ以上の検知可能ながん細胞を有し、任意に 1 つ以上の検知可能な白血病細胞またはリンパ腫細胞を有する。ある実施形態において、対象者は、以前にがんのための化学療法の治療を受けたが、がん細胞は化学療法の治療に不応 ( つまり、難治性がん ) であった。ある実施形態において、対象者は、以前にがんのための化学療法の治療を受け、1 つ以上の検知可能ながん細胞を有する。ある実施形態において、対象者は、以前にがんのための化学療法の治療を受けていない。ある実施形態において、 D N T は、化学療法を受けていないがんを有する対象者またはがんの疑いのある対象者に対する使用または投与のためのものである。

#### 【 0 0 1 6 】

ある実施形態において、1 つ以上の D N T でがん細胞に接触することを含む、がん細胞の成長 ( growth ) または増殖 ( proliferation ) を阻害する方法を提供する。また、ここに記載するような D N T の、がん細胞の成長または増殖を阻害するための使用も提供する。がん細胞は、任意に in vivo または in vitro にある。ある実施形態において、がん細胞は白血病細胞である。ある好ましい実施形態において、がん細胞は A M L 細胞である。ある実施形態において、がん細胞はリンパ腫細胞である。ある実施形態において、がん細胞は、化学療法の治療に対して抵抗性の細胞である。例えば、ある実施形態において、がん細胞は、 A r a C 等の細胞周期阻害剤での治療に対する抵抗性を有する A M L 細胞である。ある実施形態において、がん細胞は、白血病幹細胞等のがん幹細胞である。

#### 【 0 0 1 7 】

ここに記載する D N T は、当業者により容易に入手可能なものであってもよく、他の種類の T 細胞から容易に区別できるものである。ある実施形態において、 D N T は C D 4 及び C D 8 を発現しない。ある実施形態において、 D N T は C D 3 - T C R 複合体を発現し、 C D 4 及び C D 8 を発現しない。ある実施形態において、 D N T は C D 3 + 、 - T C R + または - T C R + 、 C D 4 - 、 C D 8 - 、 - G a l - 、 P D - 1 - 、 C T L A 4 - の表現型 ( phenotype ) を有する。ある実施形態において、 D N T は C D 3 + 、 - T C R + または - T C R + 、 C D 4 - 、 C D 8 - 、 - G a l - 、 P D - 1 - 、

C T L A 4 - 、 C D 4 4 + 、 C D 2 8 - の表現型を有する。ある実施形態において、D N T は C D 3 + 、 C D 4 - 、 C D 8 - 、 - G a l - 、 P D - 1 - 、 C T L A 4 - 、 C D 4 4 + の表現型を有する。ある実施形態において、D N T は C D 3 + 、 C D 4 - 、 C D 8 - 、 - G a l - 、 J 2 4 - 、 V 1 4 - 、 C D 4 4 + 、 P D - 1 - 、 C T L A 4 - 、 C D 4 5 R o + の表現型を有する。ある実施形態において、D N T は、末梢血単核球( P B M C )を含むサンプルから取得可能である。ある実施形態において、サンプルは血液サンプルである。サンプルは、任意に健常なドナー、またはがんを有する対象者若しくはがんの疑いのある対象者からのものであり、D N T は対象者を治療するために使用される。

#### 【 0 0 1 8 】

D N T 細胞は、ここに記載されるようながんの治療のための投与または使用の前に、任意に *in vitro* または *ex vivo* で増殖し得る。ある実施形態において、D N T は、静脈内注射により対象者に使用または投与されるために調製される。10

#### 【 0 0 1 9 】

ある実施形態において、D N T は、がんを有する対象者またはがんの疑いのある対象者等の対象者から取得された自家性 D N T である。ある実施形態において、D N T は、1つ以上の検知可能ながん細胞、任意に1つ以上の白血病細胞またはリンパ腫細胞を有する対象者からのものである。ある実施形態において、D N T は以前にがんの治療を受けた対象者である。ある実施形態において、D N T は完全寛解期にある対象者からのものである。ある実施形態において、D N T は、完全寛解期にない対象者からのものである。ある実施形態において、D N T は、化学療法の前、途中、または後に対象者から取得したものである。例えば、D N T は化学療法コースの開始前、1回目の化学療法ラウンド後、化学療法のラウンドとラウンドの間、または化学療法の1つ以上のラウンドの後に取得可能である。ある実施形態において、D N T は、対象者に化学療法剤を投与した同日、3日以内、1週間以内、2週間以内、3週間以内、または1か月以内に、対象者から取得される。20

#### 【 0 0 2 0 】

ある実施形態において、D N T は、がんを有さない1つ以上の対象者から取得されたD N T 等のような、同種のものである。ある実施形態において、D N T は、1つ以上の健常なドナーから取得される。

#### 【 0 0 2 1 】

ある実施形態において、D N T は、白血病またはリンパ腫の治療等のようがんの治療のために、対象者に使用または投与するためのものである。ある実施形態において、D N T は、化学療法を受けていない対象者への使用または投与のためのものである。別の実施形態において、D N T は、化学療法の前、途中、または後に対象者に使用または投与するためのものである。例えば、D N T は、化学療法コースの開始前、1回目の化学療法ラウンド後、化学療法のラウンドとラウンドの間、または化学療法の1つ以上のラウンドの後に使用または投与するためのものであり得る。ある実施形態において、D N T は、化学療法と同日、3日以内、1週間以内、2週間以内、3週間以内、または1か月以内に、対象者に投与される。ある実施形態において、化学療法は、ここに記載する細胞周期阻害剤等の、1つ以上の化学療法剤の使用または投与を含む。30

#### 【 0 0 2 2 】

随意的に、それを必要とする対象者に、D N T を2つ以上の別々の用量で、がんの治療のために投与または使用され得る。例えば、ある実施形態において、ここに記載する方法及び使用は、D N T の第1用量と、D N T の少なくとも1つの追加用量を含む。ある実施形態において、前記少なくとも1つの追加用量は、D N T の最後の用量から少なくとも3日後、D N T の最後の用量から少なくとも5日後、または任意にD N T の最後の用量から3日から2週間後に使用または投与するためのものである。ある実施形態において、前記2つ以上の別々の用量は、化学療法の前、途中、または後の投与または使用のためのものである。

#### 【 0 0 2 3 】

ある実施形態において、D N T は、1つ以上の外来タンパク質( exogenous protein )

50

20

30

40

50

を発現するように改変された組換細胞 (recombinant cell) である。例えば、ある実施形態において、ここに記載する DNT は、がん細胞の表面に発現されるタンパク質等のような、がんのバイオーマーカーに対する高い結合能を有する受容体を発現する。ある実施形態において、DNT は、白血病細胞等のがん細胞に優先結合するキメラ抗原受容体 (CAR : Chimeric Antigen Receptor) を発現する。例えば、ある実施形態において、ここに記載する DNT は、CD33、CD19、CD20、CD123、及び / または LY に結合する 1 つ以上の受容体を発現する。

#### 【0024】

ある実施形態において、DNT は、正常な細胞に比較して、がん細胞を優先的に殺傷及び / またはその増殖を阻害する。ある実施形態において、DNT は、正常な細胞に比較して、白血病細胞を優先的に殺傷及び / またはその増殖を阻害する。例えば、ある実施形態において、DNT は、他の造血細胞または末梢血単核球 (PBMC) に比較して、AML 芽球を優先的に殺傷及び / またはその増殖を阻害する。ある実施形態において、DNT は、正常な造血幹細胞に比較して、白血病幹細胞を優先的に殺傷及び / またはその増殖を阻害する。

10

#### 【0025】

他の実施形態において、DNT は、がんの治療のために対象者に使用または投与された際に、同種免疫反応を起こさない。

#### 【0026】

本発明者は、DNT と、細胞周期阻害剤等の化学療法剤とを使用する併用療法は、がん細胞、そして特に AML を殺傷するに驚くほど有力であることを見出した。したがって、ある実施形態は、DNT と化学療法剤の有効量を対象者に投与することを含む、対象者がんを治療する方法を提供する。また、がんの治療のために、有効量の DNT 及び化学療法剤の使用も提供する。ある実施形態において、化学療法剤は、細胞周期阻害剤である。ある実施形態において、細胞周期阻害剤は、DNA 合成阻害剤である。DNT と化学療法剤は、任意に、異なる時間または同時に対象者に投与される。

20

#### 【0027】

ある実施形態において、化学療法剤は、細胞周期阻害剤である。ある実施形態において、細胞周期阻害剤は、細胞周期に依存する化学療法薬である。例示的な細胞周期阻害剤は、ドキソルビシン、メルファラン、ロスコビチン、マイトマイシン C、ヒドロキシ尿素、50 フルオロウラシル、シスプラチニン、Arac-C、エトポシド、ゲムシタビン、ボルテゾミブ、スニチニブ、ソラフェニブ、バルプロ酸ナトリウム、HDAC 阻害剤、またはダカルバジンを含むが、これらに限定されない。HDAC 阻害剤の例は、FR01228、トリコスタチン A、SAHA、及び PDX101 を含むが、これらに限定されない。

30

#### 【0028】

ある実施形態において、有効量の DNT と化学療法剤を対象者に投与することを含む、急性骨髄性白血病 (AML) を治療する方法を提供する。ある実施形態において、化学療法剤は、細胞周期阻害剤である。ある実施形態において、細胞周期阻害剤は、Arac-C である。ある実施形態において、対象者は、微小残存病変 (MRD) に起因する再発性または再燃性 AML 等の、再発性または再燃性 AML を有する。ある実施形態において、対象者は、化学療法に対して難治性である白血病を有する。

40

#### 【0029】

別の実施形態において、DNT と化学療法剤を含む組成物を提供する。ある実施形態において、化学療法剤は、細胞周期阻害剤である。ある実施形態において、細胞周期阻害剤は、Arac-C である。組成物は、任意に医薬的に許容可能な担体をさらに含む。ある実施形態において、DNT と化学療法剤を含む組成物の、がんの治療のための使用を提供する。ある実施形態において、組成物は、AML の治療用である。ある実施形態において、組成物は、化学療法剤のみでの化学療法に対して抵抗性である AML の治療のための組成物である。

#### 【0030】

50

本開示の他の特徴や利点は、以下の詳細の説明から明らかになる。しかし、詳細な説明と具体例は、この詳細な説明により、本開示の趣旨及び範囲から逸脱することのない様々な変更や変形が当業者に明らかになるため、本開示の好ましい実施形態を示す一方、実例としてのみ示されていることを理解するべきである。

【図面の簡単な説明】

【0031】

次に、本開示の1つ以上の実施形態について、図面を参照して説明する。

【図1】図1aは、AML患者と健常ボランティアの末梢血液からの増幅と、前記DNTはex vivo及びin vitroにおいて増幅できることを示す。寛解期にある患者24人とHV7人の20mlのPBからのそれぞれ36つと7つのDNT増幅培養から増幅されたDNTの数が測定された。NSGマウスマルクスモデルにおいて、ex vivoで増幅されたHVのDNTについて、図1bは増殖を示し、図1cは移動を示す。 $2 \times 10^7$ のCFSEラベル付きDNTをNSGマウスへ静脈注入し、それに伴い0日目、2日目、3日目、及び7日目に $10^5$ のIU IL-2サプリメントを腹腔内に注入した。図1bは、注入後の2日目、7日目、10日目、及び14日目に測定された、脾臓にあるヒトCD45+細胞のCFSE蛍光性の変化の代表的なプロットを示す。図1cは、血液、脾臓、骨髄、肝臓、及び肺から採取(harvest)されたヒト細胞の頻度(frequency)及び数(number)を示す( $n=3$ )。数は平均値とSEMを表し、エラーバーは各グループのSEMを表す。(\*\*\*p < 0.001)

【図2】図2aは、DNT細胞媒介性細胞傷害に対する原発性AMLサンプルのin vitro感受性を判断するために新しく開発された、フローに基づく殺傷アッセイ(flow-based killing assay)の代表的なプロットを示す。アッセイは、異なるエフェクター対標的の比率で、原発性AMLサンプル090596と健常なドナーからの正常PBMで実行された。共培養(co-culture)後に、アポトーシスのレベルを判断するために、アネキシンV蛍光を使用した。図2bは、同種DNTを使用して、健常細胞及び白血病細胞に対して実行されたフローに基づく殺傷アッセイの結果を示す。特異的殺傷パーセントを判断するために、フローに基づく殺傷アッセイで、3人の健常ドナー(HD:Healthy Donor)から増幅された同種DNTを異なる標的に対して実行した: AML(塗りつぶし)、AML3と2つの原発的AML患者芽球、及び3人の健常ドナーから取得されたPBMと造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)(塗りつぶしなし)。各プロットは、実行された殺傷アッセイの3つの平均値を表し、エラーバーはSEMを表す。

【図3A】、

【図3B】図3aは、in vitroでDNT細胞媒介性細胞傷害に対する感受性に関して患者AML芽球をスクリーニングした結果を示し、そして、ある実施形態において、HD-DNTは、原発性AML芽球の大半に対して強力な細胞溶解活性(cytolytic activity)を誘導することを示す。4:1のエフェクター対標的の比率で、21つの原発性AMLサンプルの同種DNT媒介性特異的殺傷パーセンテージ。表3bは、注射前にAMLをDNTで治療すると、in vivoのAML生着レベルが有意に低下することを示す。原発性AML芽球#0578は、DNTありとDNTなしの状況において18時間かけて培養され、亜致死性照射(225cGy)されたNSGマウスに対して大腿内注射(intrafemoral injection)された(それぞれn=3及びn=5)。芽球移植の31日後、マウスは犠牲にされ、注入された骨髄細胞を採取し、ヒト抗-CD45+及びヒト抗CD33+で染色し、FACSで解析した。AMLの生着レベルは、ヒトのCD45+及びCD33+細胞の頻度により決定された。各グループについて生着の平均%が示され、エラーバーはSEMを表す。\*芽球のみのコントロールに比較して有意差を示す(\*p < 0.05)。

【図4】図4は、nti-白血病活性は同種DNTにより媒介されること、及び同種DNTはin vivoで原発性AML芽球を標的することを示す。亜致死性照射されたNSGマウスは、 $5 \times 10^6$ の#5786患者芽球(図4a)または#090392患者が球(図4b)の大腸内注射によって、原発性AMLを移植された。#5786または#090392の注入それぞれの10日後または14日後に、マウスは $2 \times 10^7$ のHV-DNTまた

10

20

30

40

50

はP B Sで静脈注射された。D N T注入の14～21日目にマウスは犠牲にされ、芽球が注入された骨からの細胞は抗ヒトC D 3 8、C D 3 3、C D 3 4、及びC D 4 5の蛍光タグ付き抗原で染色された。芽球が注入された骨におけるA M L細胞の頻度は、ヒトC D 3 8、C D 3 3、C D 3 3、及び／またはC D 4 5の陽性細胞のパーセントにより決定される。

【図5 A】、

【図5 B】図5は、複数回投与の治療によってD N T細胞治療の効能(efficacy)が向上することを示す。上記のように、 $2.4 \times 10^6$ の芽球(#090240)を移植したN S Gマウスは、芽球注入後に10日間D N Tで治療され、または治療されなかった。芽球が注入された37日後にマウスは犠牲にされ、脾臓を採取した。D N T細胞で治療されたマウス( )または治療されていない( )マウスの脾臓におけるA M L芽球、及び原発性患者A M L芽球090240( )は、2人の健常なドナーから増幅されたD N Tで実行されたフローに基づく殺傷アッセイの標的として使用され、例3に記載されているように、各標的の特異的殺傷%が決定された。D N T治療後の残存A M L芽球がD N T細胞媒介性細胞傷害に対して抵抗性であるかを判断するために、残存芽球をD N T細胞及びP B Sで治療されたマウスの脾臓から単離した。採取された残存A M L細胞と、最初に移植に使用された原発性A M L芽球について、in vitroのD N T細胞媒介性細胞溶解に対する感受性を、フローに基づく殺傷アッセイを使用して判断した(図5 a)。この観察に基づいて、複数回投与のD N T細胞治療の効能を試験した。図5 b及び図5 cは、D N Tは、in vivoで抗白血病活性を用量依存的に媒介できることを示す。 $2.4 \times 10^6$ の#090240芽球で移植されたN S Gマウスは、上記のように、芽球注入後の20日目に( $1 \times D N T$ )、または10日目と20日目に( $2 \times D N T$ )、 $2 \times 10^7$ のD N Tで治療され、あるいは治療されなかった。芽球注入後の34日目にマウスは犠牲にされ、上記のように芽球を注入した骨髄(図5 b)及び脾臓(図5 c)に生着したA M L細胞の頻度を決定した。A M L生着の平均%が示され、エラーバーはS E Mを表す(\* p < 0.05, \*\* p < 0.01)。

【図6】図6において、D N Tは化学療法感受性のA M L(chemotherapy-susceptible A M L)と化学療法抵抗性のA M L(chemotherapy resistant A M L)の両方を標的できることが示されている。フローに基づく殺傷アッセイを、化学療法抵抗性患者、難治性患者(塗りつぶしなし)または再燃性患者(塗りつぶし)(図6 a)、若しくは化学療法感受性の患者(図6 b)に対して実行した。細胞は、2時間かけて4:1のエフェクター対標的の比率で共にインキュベートされた。図6 cにおいて、化学療法抵抗性のサンプル(n=10)と化学療法感受性(n=8)から算出された、4:1のエフェクター対標的の比率での特異的殺傷パーセントの比較を示す。その数値は、平均の特異的殺傷パーセント値を表し、S E Mはn.s.である(統計的に有意でない)。

【図7】図7は、in vivoにおける、D N Tにより媒介されたL S Cが標的される可能性を示す。高悪性度の芽球090240が移植されたN S Gマウスを、芽球注入後の10日に $2 \times 10^7$ のD N TまたはP B Sで治療した。芽球注入後の39日目にマウスは犠牲にされ、未注入組織、未注入骨(図7 a)、及び脾臓(図7 b及び図7 c)のそれぞれに対して、A M L細胞の頻度、または頻度及び数が決定された。各線は平均を表し、エラーバーはS E Mを表す(\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)。

【図8】図8は、D N T及び化学療法剤の併用療法の抗白血病活性を示す。090240芽球を移植したN S Gマウスを、P B S(治療をしていない、 )、またはA r a C(A r a C、 )、またはA r a Cに続けてD N T(A r a C + D N T、 )で治療した。芽球注入後の37日目にマウスを犠牲にし、注入された骨(図8 a)、未注入の骨(図8 b)、及び脾臓(図8 c)におけるA M L細胞の頻度を決定した。各線は平均を表し、エラーバーはS E Mを表す(\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)。

【図9】図9 aは、D N Tの細胞傷害性に対するA M L細胞の感受性に対する、化学療法剤であるA r a Cの効果を示す。K G 1 aを、14時間をかけて $1 \mu g / m l$ のA r a CまたはP B Sで治療した。その後、K G 1 aと、4時間をかけて4:1のエフェクター対

10

20

30

40

50

標的の比率で、健常なドナーからの、ex vivoで増幅されたDNTとを共に培養した。各標的に關して誘導された特異的殺傷レベルを前述のように決定した。図9bにおいて、Aracは、DNTの細胞傷害性機能と干渉しないことが示されている。Ex vivoで増幅されたDNTは、14時間かけてAracまたはPBSで前処理され、4時間をかけて4:1のエフェクター対標的の比率で、AML細胞株であるOCI-AML3に対するin vitroの殺傷アッセイに使用された。各DNTにより誘導された特異的殺傷レベルは、前述の通りに決定された。

【図10】図10は、増幅後のPBM C及びDNTの表現型特性を示す。PBM C（上のパネル）または増幅後の14日目に採取されたDNT（下のパネル）は、ヒトCD3、CD4、CD8、及びGalleri - CD1dに対する抗体で染色された。塗りつぶしされたヒストグラムは、Fluorescence minus one (FMO) コントロールを示す。グラフにおける数値は、各四半部（quadrant）またはゲートにおける集団の頻度を表す（\*\*\* p < 0.001）。

【図11】図11a及び図11bは、健常なドナー（HD）からのDNTは、in vivoで造血幹細胞を攻撃せず、その分化に影響しないことを示す。CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>ヒトHSPCを、亜致死性照射されたNSGマウスに静脈注射した（5 × 10<sup>6</sup>細胞/マウス、n = 13）。HSPC注入の8週間後に、7匹のマウスに、ex vivoで増幅された同種DNTを10<sup>7</sup>静脈注射した。DNT注入の8週間後に、PBから細胞を採取し、抗マウスCD45、抗ヒトCD45、CD3、CD19、CD11b、CD56、CD33、及びCD34の抗体で染色した。ヒト白血球（図11a）及びそのサブセット（図11b）のパーセントは、フローサイトメトリ分析により決定された。横線は各グループの平均値を、エラーバーは各グループのSEMを表す。

【図12】図12において、DNT細胞は、致死量のAML細胞株を注入されたNSGマウスを救うことができる事を示す。亜致死性照射されたNSGマウスは、10<sup>6</sup>のMV4-11を静脈注射され、7日目から開始して、2 × 10<sup>7</sup>のDNT（n = 9）またはPBS（n = 10）の注射を、4日置きに受けた。矢印は、DNTまたはPBSの注射の時間を表す。\*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0032】

##### 【発明の詳細な説明】

ある側面において、本発明者は、がんの治療、そして特に白血病またはリンパ腫の治療のために、DNTは有用であることを見出した。ある実施形態において、化学療法に抵抗性を有するがん細胞を含めて、がん細胞の成長または増殖を阻害するため、またはがん細胞を殺傷するためにDNTは利用可能であることも見出した。ある好ましい実施形態において、ここに記載するDNTは、AMLの治療、または微小残存病変を原因とするAML等のような再発性AMLまたは再燃性AMLの治療のために使用可能である。別の実施形態において、ここに記載するDNTは、リンパ腫の治療に使用可能である。

##### 【0033】

ここにいう「がん」という用語は、隣接組織または身体の他の部分に転移できる、未制御で異常な細胞の増殖に起因する病気の群のうちの1つを指す。がん細胞は、がん細胞が集まった固形腫瘍を形成できる、あるいは、白血病のように分散した細胞として存在し得る。

##### 【0034】

「がん細胞」という用語は、未制御で異常な細胞の増殖と、他の組織を浸潤する能力を特徴とする細胞、またはそのような細胞に由来する細胞を指す。がん細胞は、例えば、がんの患者から取得された原発性がん細胞、またはそのような細胞から樹立された細胞株を含む。ある実施形態において、がん細胞は、白血病細胞またはリンパ腫細胞等のような、血液がん細胞である。例えば、ある実施形態において、がん細胞は、AMLを有する対象者からの白血病細胞、または非ホジキンリンパ腫（NHL：Non-Hodgkin Lymphoma）を有する対象者からの細胞等のようなリンパ腫細胞であってもよい。ある実施形態において、

10

20

30

40

50

がん細胞は、 A M L を有する対象者における白血病がん細胞であってもよい。ある実施形態において、ここに記載する D N T は、 in vitro 、 ex vivo 、または in vivo でがん細胞の成長または増殖を阻害するために使用可能である。ある実施形態において、ここに記載する D N T は、 in vitro 、 ex vivo 、または in vivo でがん細胞を殺傷するために使用可能である。

#### 【 0 0 3 5 】

ここにいう「化学療法抵抗性がん」は、化学療法の治療に応答しないがん、または化学療法の治療後に再燃するがんを指す。例えば、化学療法抵抗性の細胞は、化学療法に応答しなかった対象者から取得された原発性がん細胞、または初期は化学療法に応答し、寛解に進んだが、病気の再燃を経験した対象者から取得されたがん細胞であってもよい。一部の対象者において、再燃後にがん細胞は化学療法に応答しなくなり、当該対象者は化学療法抵抗性がんを有する。ある実施形態において、化学療法抵抗性細胞は、対象者から直接取得した原発性白血病細胞である。10

#### 【 0 0 3 6 】

ここにいう「白血病」という用語は、造血組織、他の臓器、そして通常は血液において、増加した数で見られる異常な白血球の進行性増殖を含むあらゆる病気を指す。「白血病細胞」とは、そのような細胞の増加した異常な増殖を特徴とする白血球を指す。

#### 【 0 0 3 7 】

ここにいう「急性骨髓性白血病」（「 A M L 」）とは、骨髓に集積し、正常な血液細胞の産生を妨げる異常な白血球の迅速な成長を特徴とする、血液細胞の骨髓株のがんを指す。20

#### 【 0 0 3 8 】

ここにいう「慢性骨髓白血病」（「 C M L 」）は、骨髓における、主に骨髓細胞の成長の増加と制御されていない成長、及び血液におけるこの細胞の蓄積を特徴とするがんを指す。

#### 【 0 0 3 9 】

ここにいう「リンパ腫」とは、リンパ性細胞から発展する血液細胞腫瘍により特徴付けられる病気を指す。リンパ腫は任意にホジキンリンパ腫（ H L : Hodgkin Lymphoma ）または非ホジキンリンパ腫（ N H L : Non-Hodgkin Lymphoma ）であってもよい。 N H L の例は、バーキットリンパ腫及び T 細胞リンパ腫を含む。そのような細胞の増加した異常な増殖を特徴とするリンパ球を「リンパ腫細胞」という。30

#### 【 0 0 4 0 】

ここにいう「対象者（ subject ）」との用語は、哺乳動物を含む動物界の全てのメンバーを含み、好適にはヒトを指す。「対象者」という用語は、任意にがんと診断された哺乳動物、または寛解期における哺乳動物を含む。ある実施形態において、「対象者」との用語は、血液がんのヒト、または血液がんの疑いのあるヒトを指す。ある実施形態において、「対象者」との用語は、 A M L のヒト、または A M L の疑いのあるヒト、任意には再発性若しくは再燃性 A M L のヒトを指す。

#### 【 0 0 4 1 】

ある実施形態において、ここに記載する方法及び使用は、がんの治療のためのものを提供する。ここにいう「治療する」または「治療」との用語は、それが当技術分野においてよく理解されているように、臨床結果を含み、有益な結果または望ましい結果を得るためにアプローチを意味する。有益な臨床結果または望ましい臨床結果は、検知可能または検知不可能であるに関わらず、1つ以上の症状の軽減または改善、病気の進行度の減少、病態の安定化（つまり、悪化させない）（例えば、患者を寛解期に維持する）、病気の予防または病気の広がりの防止、病気の進行を遅延または遅らせること、病態の改善または緩和、病気の再発の減少、及び（部分または完全であるかを問わず）寛解を含むが、それらに限定されない。「治療する」及び「治療」は、治療を受けていない場合に予測される生存期間に比べて生存期間を延期することも意味し得る。ここにいう「治療する」または「治療」は、予防的治療も含む。ある実施形態において、治療方法は、ここに記載するよう40

な治療上有効量のDNTを対象者に投与することを含み、任意には単回投与、またはその代わりに一連の投与を含む。一部の実施形態において、ここに記載する治療方法及び使用は、DNTと細胞周期阻害剤との併合治療方法を含む。

#### 【0042】

ここにいう「がん細胞の成長または増殖を低下させる」とは、細胞の成長または細胞分裂の結果としてがん細胞に由来する細胞の数の減少を指し、細胞死を含む。ここにいう「細胞死」との用語は、細胞壊死及びアポトーシスを含む、細胞を死滅させる全ての形を含む。

#### 【0043】

ある実施形態において、ここに記載する方法及び使用は、有効量のDNT、そして随意的には細胞周期阻害剤の投与または使用を含む。ここにいう「有効量」または「治療上有効量」とのフレーズは、望む結果を達成するために必要な用量及び期間中に有効である量を意味する。例えば、AML等のがんの治療という面において、有効量とは、化合物を投与しない場合に得られる応答と比べて、寛解を誘導する、腫瘍負荷を低下させる、及び/または腫瘍の拡がり若しくは白血病細胞の成長を防止する量である。有効量は、動物の病態、年齢、性別、及び体重等の因子によって変化し得る。そのような量に対応する特定の化合物の量は、特定の医薬または化合物、医薬製剤、投与の用法、病気または障害(disorder)の種類、治療する対象者または宿主(host)の正体(identity)等々のような、様々なファクターに依存して変化する。

#### 【0044】

ある実施形態において、ここに記載する方法及び組成物は、ダブルネガティブ(DN)T細胞の投与または使用を含む。DNTは、他のT細胞との区別となる、いくつかの特徴を奏する。ある実施形態において、DNTはCD4またはCD8を発現しない。ある実施形態において、DNTはCD3-TCRを発現し、CD4及びCD8を発現しない。ある実施形態において、DNTはCD3+、-TCR+、CD4-、CD8-、CD44-、CD28-の表現型を有する。ある実施形態において、DNTはCD3+、-TCR+、CD4-、CD8-、-Gal-、PD-1-、CTLA4-、CD44+、CD28-の表現型を有する。ある実施形態において、DNTはCD3+、CD4-、CD8-、-Gal-、PD-1-、CTLA4-、CD44+の表現型を有する。ある実施形態において、DNTはCD3+、CD4-、CD8-、-Gal-、J24-、V14-、CD44+、PD-1-、CTLA4-、CD45RO+の表現型を有する。DNTは、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS: Fluorescent Activated Cell Sorting)等のような、しかしそれに限定されない、当分野に知られている技術を使用して取得可能である。ある実施形態において、DNTは末梢血単核球から単離され得る。随意的に、DNTは自家細胞または同種細胞であってもよい。

#### 【0045】

ある実施形態において、DNTは、がんを有する対象者若しくはがんの疑いのある対象者から取得した同種細胞である。随意的に、DNTは化学療法の前、途中、または後に対象者から取得される。ある実施形態において、DNTは、化学療法のコースの前、途中、または後に対象者から取得される。例えば、ある実施形態において、DNTは1回目の化学療法ラウンド後、または化学療法の1つ以上のラウンドの後に取得される。

#### 【0046】

一部の実施形態において、DNTは、対象者への使用または投与の前に、in vitroまたはex vivoで増幅され得る。DNTを単離し増幅するための例示的な方法は、米国特許第6,953,576号「Method of Modulating Tumor Immunity」、及び国際公開第WO2007/056854「Method of Expanding Double Negative T Cells」に記載され、それらの全体が本明細書に参考として組み込まれる。

#### 【0047】

ある実施形態において、DNTは、がんを治療するため、がん細胞の成長または増殖を低下させるため、またはがん細胞を殺傷するために、後でDNTを投与する対象者から取

10

20

30

40

50

得し得る（つまり、自家細胞である）。ある実施形態において、DNTは同種のものであつてもよい。ここにいう「同種」との用語は、元々予定の受容者とは別の個人であり、受容者とは同種の動物である個人である対象者から取得された細胞を指す。同種細胞は、随意的に細胞培養からの細胞であってもよい。ある好ましい実施形態において、DNTは健常なドナーから取得される。ここにいう「健常なボランティア」（「HV」）または「健常なドナー」（「HD」）との用語は、がんのない1人以上の対象者を指す。ある実施形態において、健常なドナーは、検知可能ながん細胞を有さない対象者、例えば検知可能な白血病細胞を有さない対象者である。

#### 【0048】

ある実施形態において、DNTは当技術分野で知られている医薬的に許容可能な製剤を使用して、対象者への使用のために製剤化される、または対象者への投与のために調製され得る。適切な製剤の選択及び調製のための従来の手順及び材料は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences (2003、20版) 及び1999年発行の米国薬局方 (The United States Pharmacopeia: The National Formulary) (USP 24 NF19) に記載されている。「医薬的に許容可能」との用語は、動物、特にヒトの治療と両立可能であることを意味する。

10

#### 【0049】

ある実施形態において、ここに記載するDNTは、がん細胞の増殖を低下させる、及び/または化学療法剤と併合してがんを治療することに、驚くほど有効である。ある実施形態において、化学療法剤は、細胞周期阻害剤である。ある実施形態において、細胞周期阻害剤は、DNA合成阻害剤である。したがって、ある実施形態において、対象者のがんを治療する方法であって、対象者にDNT及び化学療法剤を投与することを含む方法を提供する。また、対象者のがんを治療するためのDNTと化学治療剤を、それを必要とする対象者への使用も提供する。ある実施形態において、化学療法剤は、シタラビン (Arac; cytarabine) である。ある実施形態において、がんは、急性骨髄性白血病 (AML) 等のような白血病である。一部の実施形態において、DNTと、細胞周期阻害剤等のような化学療法剤との組み合わせを、再発性または再燃性AML等のような化学療法抵抗性のがんを治療するために使用可能である。

20

#### 【0050】

ここにいう「細胞周期阻害剤」との用語は、細胞の分裂及び/または複製を阻害または防止する化学療法剤を指す。ある実施形態において、「細胞周期阻害剤」との用語は、ドキソルビシン、メルファラン、ロスコビチン、マイトイシンC、ヒドロキシ尿素、50フルオロウラシル、シスプラチニン、Arac-C、エトポシド、ゲムシタビン、ボルテゾミブ、スニチニブ、ソラフェニブ、バルプロ酸ナトリウム、HDAC阻害剤、またはダカルバジンから選択される化学療法剤を含む。HDAC阻害剤の例は、FRO1228、トリコスタチンA、SAHA、及びPDX101を含むが、これらに限定されない。

30

#### 【0051】

ここにいう「DNT合成阻害剤」との用語は、がん細胞によるDNAの合成を阻害または防止する化学療法剤を指す。DNA合成阻害剤の例は、Arac (シタラビン)、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、5-フルオロウラシル、カペシタビン、フロクスウリジン、ゲムシタビン、デシタビン、ビダーザ、フルダラビン、ネララビン、クラドリビン、クロファラビン、ペントスタチン、チアラビン、トロキサシタビン、サバシタビン、またはフォロデシンを含むが、これらに限定されない。ある実施形態において、DNA合成阻害剤は、シタラビンまたはここに記載のような他のデオキシリチジン類似体である。ある実施形態において、DNA合成阻害剤は、フルダラビン、ネララビン、クラドリビン、またはクロファラビン等のようなDNA伸長ターミネーター (DNA elongation terminator) であり、シタバリンと同じように機能する。

40

#### 【0052】

ここにいう「Arac」（アラビノフラノシリルシチジン：Arabinofuranosyl Cytidine）は、シトシン塩基とアラビノース糖を含む化合物であって、in vivoでアラビノフラノ

50

シルシトシン三リン酸 (Arabinofuranosylcytosine triphosphate) に変換される化合物を指す。AraCは、シタラビン (cytarabine) またはシトシンアラビノシド (cytosine arabinoside) とも知られている。

#### 【0053】

ある実施形態において、DNTと化学療法剤は、同時に対象者に投与され、随意的にはDNTと化学療法剤を含む組成物、若しくは2つの別の投与として投与される。ある実施形態において、DNTと化学療法剤は、異なる時点で対象者に使用または投与される。例えば、ある実施形態において、DNTは化学療法剤の前に、または後に投与される。ある実施形態において、DNTは、少なくとも1分、2分、5分、10分、30分、45分、1時間、1.5時間、2時間、3時間、4時間、5時間、8時間、10時間、12時間、16時間、または24時間の間隔をおいて、化学療法剤の前または後に投与される。随意的に、一部の実施形態において、DNTと化学療法剤は、24時間、36時間、48時間、3日、4日、5日、6日、1週間、10日、12日、2週間、3週間、1か月、6週間、2ヶ月、または2ヶ月超の間隔をおいて投与される。ある実施形態において、DNTは、化学療法剤後の2日目から7日目の間に投与または使用される。

10

#### 【0054】

別の実施形態において、DNT及び化学療法剤を含む組成物を提供する。ある実施形態において、化学療法剤は、DNA合成阻害剤である。ある実施形態において、DNA合成阻害剤は、シタラビンまたはここに記載のような他のデオキシシチジン類似体である。ここに記載の組成物は、随意的に、Remington's Pharmaceutical Sciences (2003、20版) 及び1999年発行の米国薬局方 (The United States Pharmacopeia: The National Formulary) (USP 24 NF19) に記載されているような医薬的に許容可能な担体を含む。また、がんの治療のための、DNTと化学療法剤を含む組成物の使用も提供する。ある実施形態において、がんは白血病、随意的にはAMLである。ある実施形態において、組成物は、化学療法のみの治療に抵抗性であるがんの治療に使用される。ある実施形態において、対象者は白血病を有する対象者、随意的にはAMLを有する対象者である。

20

#### 【0055】

以下の非限定的な例は、本発明の開示を例証する。

##### [例1] 健常なドナーからDNTを増幅する。

化学療法後に完全寛解期におけるHDまたはAML患者から、20mlのPBを取得した。DNTは、前述のように増幅された (Merimsら、2011)。一時的に、RosetteSep (TM) を使用することにより、末梢血単核球 (PBMC) からCD4+及びCD8+の細胞が除去された。残ったCD4-CD8-PBMCは、プレートに結合された抗CD3抗体で3日間刺激され、洗浄され、そして7日目から10日目まで溶解性CD3で再刺激された。3日目、7日目、及び10日目に、培地をIL-2を含む新しい培地に交換された。細胞は、2週間の増幅の終わりに数えられ、抗CD3、CD4、CD8、iNKT TCR (TCR V 24-J 18) 抗体及びNKT抗原受容体 (-ガラクトシリセラミド [-Galactosylceramid]) で染色された。HDのPBから増幅された際に得たDNTの数 ( $3.97 \pm 1.8. 24 \times 10^8$ ) が患者から得られた数 ( $3.25 \pm 0.9169 \times 10^7$ ) よりも有意に高かったため (図1a)、完全寛解期におけるAML患者のPBとHDのPBを同等の容積で用意された増幅カルチャーにおいて、患者のDNTに対するHDのDNTのより高い増幅可能性が示された。なお、AMLの約50%の場合、DNTは増幅せず、AML患者のPBを使用した場合の65.5% ± 19.8%に比べてHDのPBを使用した場合 (90.74 ± 1.7%) により高い純度のDNT集団が得られた (表1)。患者のDNTのより低い増幅可能性及び純度は、部分的に、患者の血液でAML細胞に遭遇することによる疲労、及び/または厳格な化学療法による異常な生理が原因であり得る。治療のための純粋なDNTの増幅または取得の失敗は、臨床の場におけるDNTの使用に対して重大な制限となり得る。しかし、このデータによって、そのような制限はHDのDNTを使用することによって回避できることが示され、同種HDのDNTに集中する理論的根拠が提供された。

30

40

50

50

【0056】

【表1】

	患者	H V
カルチャー#	28	24
%CD3	94.0 ± 7.2	97.04 ± 0.3
統計	P = 0.044	
%DNT	65.0 ± 19.8	90.74 ± 1.7
統計	P < 0.001	

10

表1：增幅の終わりにおける患者及びH VのDNT細胞頻度。患者またはH Vの末梢血液でセットアップされた增幅培養の終了におけるDNT細胞の純度の要約。

[例2] NSGマウスモデルにおけるヒトDNTの特徴付け。

20

【0057】

養子T細胞治療の成功は、受容者における注入されたT細胞が、腫瘍細胞を見つけて排除できるように、T細胞の生存力及び存続力(persistence)に依存する。理想的には、注入されたT細胞は受容者においてさらに複製でき、そのため注入の際に比較的少ない数のT細胞を必要とする。DNTは相対的に短い期間で生成されるため(初期のサンプル収穫から2週間以内)、このDNTは早期エフェクターである可能性が高く、注入後に増殖し存続し得る。この仮説をテストするために、NSGマウスモデルを使用した。Ex vivoで増幅された10日目のDNTは、5 μMのCFSEでラベルされ、 $2 \times 10^7$ の細胞を亜致死照射したNSGマウスに静脈注射した。ヒトのDNTを維持するために、受容マウスにh r IL-2 (10,000国際単位(i.u. [international unit]))を腹腔内注射で補充された。In vivoにおけるDNTの増殖、移転、及び存続力を判断するために、2日目、4日目、及び7日目に血液、脾臓、骨髄、肝臓、及び肺を採取した。図1bに示すように、2日目から4日目にCFSE希釈を観察したが、それは4日目から7日に観察されず、よって養子移入(adoptive transfer)後にDNTは、注射後の最初の数日において増殖したことが示されている。採取された細胞は抗ヒトCD45抗原で染色され、時間に渡って異なる組織におけるDNTの頻度を判断するために、FACSを使用して解析された。注射後の血液、脾臓、及び肺に比較的高い頻度のDNTが検知されたが、より少ないけど顕著なDNT集団が、注射後の7日目まで、肝臓及び骨髄に観察された(図1c)。

30

[例3] フローに基づく殺傷アッセイの開発。

40

【0058】

クロムリリースアッセイ(chromium release assay)は、標的細胞の細胞傷害性レベルを判断するために広く使用されてきた標準アッセイである。しかし、クロム同位体ローディングの低い効率と、原発性AML患者芽球の自発的死滅の高い率により、広く使用されたクロムリリースアッセイは、in vitroのDNT媒介細胞傷害性に対する原発性AML芽球の感受性を判断するために最適ではなかった。Ex vivoで増幅されたDNTについて、in vitroでAMLに対して細胞毒性活性を誘導する能力を判断するために、新しいフローサイトメトリーに基づく殺傷アッセイが開発された。このアッセイにおいて、DNTは蛍光性の膜染料であるPKH-26でラベルされ、原発性AML芽球と共に、2時間かけて、異なるエフェクター対標的比率で培養された。自発的細胞死滅のレベルを判断するた

50

めのコントロールとして、標的及びエフェクター細胞を単独で培養した。共インキュベーションの2時間後、細胞は、CD45<sup>10w</sup>及び/またはCD33<sup>+</sup>であるAMLを識別するために表面マーカーであるCD33及びCD45抗体で染色され、及び細胞死滅のレベルを識別するためにアネキシンVで染色された(図2)。特異的殺傷パーセントは、次のように決定された。

$$\% \text{特異的殺傷} = \% \text{アネキシンV}_{\text{AML-DMT共カルチャー}}^+ - \% \text{アネキシンV}_{\text{AMLのみ}}^+$$

#### 【0059】

従来のクロムリリースアッセイに比較して、フローに基づく殺傷アッセイは早く、低い背景雑音(background noise)に関連され、そして同位体ローディングなどのような標的細胞の追加的準備を必要としない。この新しいアッセイは、用量依存的にDNTに媒介されるAML細胞アポトーシスのレベルを直接監視することを可能としながら、標準のクロムリリースアッセイに関連する制限を回避する。なお、AML集団の異なるサブ集団に対するDNTの影響を判断するために使用できる。しかし、フローに基づく殺傷アッセイは、累積細胞死滅のレベルを決定できない。

[例4] HDから増幅されたDNTは、用量依存的にAMLを選択的に標的するが、in vitroで正常の同種PBM Cを殺傷しない。

#### 【0060】

正常なPBM Cに対する白血病細胞への同種DNTの細胞毒性を判断するために、3つの異なる健常なドナーから増幅された同種DNTを、2つのHDから取得された正常なPBM C、2つのHDから取得されたHSPC、2つの原発性AML患者のサンプル、及びAML細胞株であるOCI-AML3及びKG1aに対してフローに基づく殺傷アッセイを実行した。全3ドナーからのDNTは、2つの原発性AML芽球及びAML細胞株に対して、用量依存的な強力な殺傷活性を示したが、同種PBM C及びHSPCに対する殺傷活性を示さない(図2b)。例2及び図1cで見られるように、DNTは受容者に存続し得るため、健常なPBM C及び同種DNTの共培養は、14時間まで延長された。DNTはまた正常な同種PBM Cの殺傷を誘導しなかった(データは非表示)。この結果は、マウスにおいて同種DNTの注入は受容者において病理学的病変(pathological lesion)を起こさないため安全である報告と両立する。正常なPBM C標的にせず同種白血病細胞を標的できるDNTの能力は、白血病の患者を治療するために同種DNTは安全であることを示唆する。

[例5] DNTはin vitroで原発性AML芽球を殺傷でき、NSGマウスにおいて白血病の生着を阻害できる。

#### 【0061】

HDから増幅されたDNTの、白血病細胞を殺傷する能力を決定するために、患者23人のパネルから取得した原発性AML芽球サンプルに対して細胞毒性アッセイを実行した。感受性のレベルに変動が見られたが、23件中の19件において、in vitroで患者の原発性芽球は用量依存的にDNT媒介細胞毒性に対して感受性であり、一方患者4人の芽球は高いレベルの抵抗性を示した(図3a)。このデータによって、同種DNTは効果的に多くの原発性AML芽球を標的することが示されている。

#### 【0062】

In vitroのスクリーニングによって、有意なレベルのDNT媒介細胞毒性が示されたが、これがより低いAML生着性もしくは一時的なAML数の低下に移るかは不明なままである。次に、in vivoにおいてAML生着性に対するDNTの影響を調べるために、DNT細胞で治療されたAML及びDNT細胞で治療されていないAMLの生着レベルを、確立されているAML-NSG異種移植モデル(Barabeら、2007)を使用して決定した。簡単に言うと、AML芽球#0578は18時間をかけてDNTと、及びDNTなしで培養され、そして亜致死照射されたNSGマウスの右大腿骨に注射された。移植の31日後にマウスは犠牲にされ、注射された骨におけるAMLの生着を決定した。未治療のコン

10

20

30

40

50

トロールに比べて、DNTで前インキュベートされたAML芽球を注射されたマウスにおいて、AMLの生着レベルは有意に低下され、よってDNTで媒介した効果は、in vivoにおいて白血病細胞のレベルを低下させることであることが示された（図3b）。

[例6] DNTは、in vivoで用量依存的に原発性AMLに対する抗白血病活性を媒介する。

【0063】

図3bで見られるAML生着の低下は、おそらく注入前に、in vitroでAML細胞を殺傷した結果である。注入したDNTが、白血病生着の部位に移動し、骨髄における既存のAMLを除去できるか（これは臨床の場の条件により似ている）をさらに決定するために、前述の通りにAML芽球を移植されたNSGマウスにDNT治療を与えた（Barabeら、2007）。簡単に言うと、マウスの右大腿骨に $2.5 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$ の原発性AML芽球である#5786または#090392が注入された。ヒト白血病細胞が受容者に生着した時点である10日から14日後に、AMLを移植したマウスはPBSまたは $2 \times 10^7$ のDNTを静脈注射された。DNT注射の14～21日後にマウスは犠牲にされ、AML細胞を注入した骨から細胞が採取され、FACS解析を介してAMLの生着レベルを決定するために、蛍光タグの付いた抗ヒトCD3、CD33、CD45、CD19、CD34、及びCD38抗体で染色された。DNT及びPBSで治療されたグループの間でAML細胞の生着頻度を比較した。PBSで治療されたグループに対してDNTで治療されたグループの注射された骨におけるAML芽球である#5786及び#090392の頻度は有意に低下していた（図4a及び図4b）。この結果は、DNTは、血液からAMLが由来する場所である骨髄へ移動できること、そして骨髄における既存のAMLを標的できることを示す。

10

20

20

【0064】

DNT治療は有意にAML生着の頻度を低下させたが、DNTで治療されたグループにおいて、いくつかの残存芽球が観察された。残存AML細胞の説明としては、2つの可能性があり得る：（1）この細胞はDNT媒介細胞毒性に抵抗性である；（2）単回投与のDNT治療は、多数の既存AML細胞を除去するためには十分でない可能性がある。残存のAML細胞はDNT媒介細胞毒性に感受性であるかを決定するために、残存AML芽球をDNTで治療したグループと未治療のグループとから単離し、最初にフローに基づく殺傷アッセイにおける移植に使用した原発性AML芽球に加えて、標的として使用した。DNTで治療したマウスから取得された残存AML芽球は、試験官内において、原発性AML細胞及びPBSで治療したグループから取得したAML細胞と同等にDNT媒介殺傷に対して感受的であったため（図5a）、AML細胞の存続は、DNT殺傷に対する抵抗性によるものであった可能性は低いことが示された。また、AML生着を低下させるDNTの能力は、受容者における既存AML細胞の頻度と逆に相關することを観察し（図5b）、それは1回より多いDNT治療はAML生着のレベルをより低下させ得る概念を裏付ける。この仮説をテストするために、NSGマウスに高生着性の芽球である#090240を注射した。AML細胞注入の10日後に、前回と同様に受容者マウスに単回投与でDNTを静脈注入した。そのまた10日後に、DNTで治療したマウスの半分に、同じドナーからのDNTの2回目の投与で治療した。コントロールのマウスには、コントロールとして、PBSを注入した。DNTを2回投与で治療したグループは、骨髄及び脾臓において、最も低いAML生着レベルを示した（図5b及び図5c）。脾臓において、2回目のDNT投与は、DNTの単回投与で治療されたグループに比較して芽球の頻度を有意に低下させた。統計的には有意ではなかったが、骨髄についても同じ傾向が見られ（図5b）、これは骨髄における既存のAML細胞の頻度が極めて高いからである可能性がある。まとめると、このデータによって、DNTは異種移植モデルにおいて、AML細胞を除去し、白血病の生着を阻害できることが示された。したがって、DNT治療は、複数の注入によって効能を向上できる可能性が高い。なお、DNTは、従来の化学療法により大多数のAML細胞を除去した後に、MRDを標的するための補助療法（adjuvant therapy）として特に有効であり得る。Arac等のような化学療法の初期の投与または使用によって、が

30

40

50

ん細胞の大多数の根絶を促進し得、それに追って、化学療法抵抗性である残存する比較的に少ない数の細胞に対しては、DNTの投与がより効果的である可能性がある。

[例7] 化学療法抵抗性AMLは、DNTに感受性である。

**【0065】**

化学療法は、AML患者に使用される標準治療である。化学療法は、白血病のロードを低下させることと、病気の初期の寛解を達成することに効果的である。しかし、多くの場合、病気の完全クリアランスに達成しないため、AML患者において、高い再燃率につながる。

**【0066】**

したがって、AML患者の治療に関する1つの大きい制限は、化学療法抵抗性のAMLを効果的に標的できないことにあり、その結果としてAMLには高い再燃性がある。DNTが化学療法抵抗性のAMLを標的できるか否かを研究するために、化学療法感受性の患者と化学療法抵抗性の患者から得たAMLサンプルを、DNTの標的として、我々のin vitroの殺傷アッセイに使用した。驚くべきことに、化学療法抵抗性のAML患者サンプル10つのうち7つ(図6a)、そして化学療法感受性のAML患者サンプル8つのうち7つ(図6b)が、DNTに対する有意な感受性を示した。なお、特異的殺傷の平均レベルは、化学療法感受性のグループと、化学療法抵抗性グループとで相当するレベルであり、それぞれ $19.8 \pm 3.7\%$ と $16.6 \pm 4.1\%$ であった(図6c)。DNTによる化学療法抵抗性のAMLの殺傷は、例6に記載された通りに、化学療法抵抗性で不応の患者(#5786、図4a)及び再燃性患者(#090240、図5b及び図5c)から得たサンプルで実行されたin vivoの実験により、さらに確認された。両方のサンプルにおいて、DNT治療はAMLのロードを有意に低下させた。この結果によって、DNTは化学療法に応答しない患者を治療するための潜在的な免疫療法として利用できることを示し、そして無再燃寛解を達成するために、化学療法抵抗性のMRDに対するDNTの潜在的な臨床的使用を強調する。

[例8] DNTに媒介される、LSCを標的する潜在的な活性。

**【0067】**

以前、LSCに対するDNTの潜在的な細胞毒性活性は、LSCに発現されるマーカーであるCD34を発現するAMLを、DNTが標的したことで示された(Merimsら、2011)。しかし、全てのCD34+細胞がLSC集団を表すわけではないため、LSCに対するDNTの効果は不明のままであった。高悪性のAMLサンプルである#090240で実行されたin vivo実験において、未注入組織、脾臓、及び未注入骨における高度のAML生着が示された。AMLの発がん性及び集団化特性のため、未注入組織におけるAMLの生着は、LSCにより媒介されていると思われる。ここに提供する結果は、DNT治療により未注入の骨(図7a)及び脾臓(図7b及び図7c)におけるAML生着レベルが低下したため、DNTが媒介するLSCの殺傷の可能性の証拠を示す。この低下が生着の部位で非LSC性AMLの殺傷によるものなのか、若しくは生着を誘導するLSCの殺傷によるものなのかは未知である。

[例9] DNTと化学療法剤の併合治療の有効性。

**【0068】**

化学療法は、数多く白血病のサイズを低下させること、そして病気の初期の寛解を達成することに効果的である。しかし、病気の完全なクリアランスを達成することについてあまり効果的ではなく、したがってMRDが媒介する再燃性AMLの制限が伴う。それに対してDNT治療は、例7で示したように、化学療法により殺傷できないがんを含み、AMLを特異的に標的することについては効果的である。しかし、DNT治療の有効性に関しては、他のがんに対する他の細胞治療の場合と同様に、AMLロードのレベルが重要な決定的要素のようである。それぞれ個別の治療法と関連する制限を克服するために、DNT治療と化学療法を組み合わせて使用できるかを判断するために、#909240AMLを移植したNSGマウスに、標準な化学療法剤であるアラビノフラノシリルシチジン(AraC)60mg/kgを、芽球注入の13日後に開始して5日間に渡って腹腔内注射した

10

20

30

40

50

。最後の Ar a C 注射の 3 日後、マウスは、前述のように、DNT または PBS と IL-2 補充剤を注射された。DNT 注射の 14 日後にマウスは犠牲にされ、骨髓と脾臓を採取した。併合治療によって、注射を受けた骨(図 8 a)、未注入の骨(図 8 b)、及び脾臓(図 8 c)において、AML の頻度が有意的に低下した。統計的に有意ではなかったが、全 3 細胞において、片方の治療のみの場合に対して併合治療の場合では、より低い平均 AML 生着頻度が得られた。脾臓においては、併合治療を受けたグループは、Ar a C 治療のみを受けたグループに対して有意に低い AML 生着レベルを有した(図 8 c)。合わせてこのデータは、DNT 治療と化学療法により媒介された付加的な抗白血病効果を示し、そして臨床の場において、化学療法後の残存芽球を標的するために、化学療法の後に DNT 治療を利用する可能性を示す。したがって、DNT と Ar a C 等のような化学療法剤の併合治療は、DNT での免疫療法または化学療法のみの場合に対して、AML をより効果的に治療できる可能性が高い。以前は、化学療法に追って DNT を与えることで、がん細胞の低下においていかなる利点を得られるかどうかは未知でした。上述のように、Ar a C と DNT は異なる AML 細胞を標的するようであり、したがって併合治療によって、片方の治療のみの場合に比較して有意な利点を得る可能性がある。  
10

#### 【0069】

Ar a C と DNT の併合治療の優れた抗白血病活性は、その 2 つの相乗的な効果によるものであるのか、若しくは 2 つの異なる治療の相加的な効果によるものであるのかを決定するために、白血病幹細胞に類似する AML 細胞株である KG1a に対して、in vitro の殺傷アッセイを実行した。14 時間をかけて Ar a C または PBS で治療した KG1a を、DNT と共にインキュベートした。未治療の KG1a に対する DNT に誘導された殺傷% は  $15.38 \pm 0.51\%$  に対し、Ar a C で治療した KG1a に対する殺傷% は  $45.59 \pm 2.34\%$  であったため、Ar a C によって KG1a の DNT に対する感受性が有意に増加した(図 9 a)。それにもかかわらず、OCI-AML3 に対する in vitro の殺傷アッセイの 14 時間に前に DNT 細胞を Ar a C で治療しても、DNT 媒介細胞傷害性には影響がなかったため、DNT は化学療法剤と同時に使用できることが示唆された。  
20

[例 10] 急性骨髓性白血病に対する同種ダブルネガティブ細胞の選択的細胞毒性活性。

#### 【0070】

以下に説明するように、本発明者は、同種ヒト DNT について、in vitro で、及び異種移植モデルにおいて、正常な細胞及び組織に対する検知可能な毒性なく、化学療法抵抗性のものを含む原発性の AML 患者の芽球に対して強力な抗白血病効果を有することを決定した。これらの結果により、現在の治療法の制限を克服し、患者の生存率を増加させる AML 患者の新たな細胞治療法として、HD から増幅された DNT の使用を裏付ける。  
30

Ex vivo で増幅された DNT は、in vitro 及び in vivo で、原発性 AML 患者の芽球に対して強力な細胞溶解活性を誘導する。

#### 【0071】

以前、完全寛解期における AML 患者の末梢血液(PB)から ex vivo で増幅された DNT の、自家 CD34+ 白血病芽球に対する細胞毒性は、in vitro で示された(Merimsら、2011)が、患者の DNT のただ 30% が増幅可能であった(36 のうち 12 のカルチャーが  $3 \times 10^7$  以上の DNT に増幅された)。  
40

#### 【0072】

ここに、本発明者は、驚くべきことに、試験された HD の全てから DNT を増幅できることを示し、AML 患者の場合に比べて 10 倍大きい平均総数の DNT が得られ(図 1 a)、有意に高い純度も得られたことを示した(HD の DNT の場合は  $90.74\% \pm 1.7\%$  に対して患者の DNT の場合は  $65.0\% \pm 19.8\%$ )(図 10)。

DNT の注入は、正常な同種 PBMC 及び CD34+ の HSPC を攻撃しない。

#### 【0073】

正常な HSPC 生着及び分化に対する同種 DNT の潜在的な影響をさらに決定するためには、NSG マウスを CD34+ CD133+ の HD の HSPC を移植することでヒト化し  
50

、異なるHDからのDNTで治療した。他者に報告されているように(McDermottら、2010; Drakeら、2011)、移植されたマウスの脾臓及びBMにおいて一貫して高いキメラ性(約70~80%)が観察された一方、末梢血液におけるキメラ性は約15%であった。重要なことに、DNTで治療したマウスと未治療のマウスの間で頻度(図11a)及び系譜(lineage)の分化(図11b)に関する差は観察されなかった。この結果によって、DNTはHSPCを標的しないこと、そしてHSPCの造血系譜への分化を阻害しないことが示唆された。まとめてこの結果は、ex vivoで増幅された同種DNTは強力な抗白血病活性を有する一方、正常な組織及び造血細胞に対して細胞毒性を有さないことを示すことにより、新たながらん免疫療法としてDNTの安全性を支持する。

同種DNTは、致死的なAMLのNSGマウスの生存を延期する。

10

#### 【0074】

原発性AML芽球の大多数とは対照的に、MV4-11のAML細胞株は、NSGマウスに対して致死的である。MV4-11を注入したマウスに3回のDNT注射を与えた際、DNTで治療されたグループにおいて、有意な生存利益が観察された(図12)。これらの結果はまとめて、ex vivoで増幅された同種DNTはin vitroで化学療法抵抗性の原発性AML芽球に対して細胞毒性であり、異種移植モデルにおいて白血病のロードを低下させることに効果的であることを示す。

#### 討議(Discussion)

#### 【0075】

過去10年間にAML患者を治療するために化学療法が多く使用されてきたが、化学療法抵抗性による高再燃率は、依然として患者の生存に関する大きなチャレンジである(LinとLevy、2012; HouriganとKarp、2013)。同種HSC-Tは、AML患者のための潜在的な治療的処置であるが、その応用は毒性及びドナーの利用可能性により制限される(BrissotとMohty、2015; Vyasら、2015; MacDonaldら、2013)。HSC-T、T細胞、及びNK細胞治療で明白であるように、ドナーの免疫細胞が同種抗原を認識し、形質転換細胞(transformed cell)への強い免疫反応を誘い出すため、同種状況における移植片対白血病の影響は、自家状況における影響よりも強い(ArpinatiとCurti、2014; CampbellとHasegawa、2013; Ruggeriら、2002、2007年7月)。健常人からの異種DNTは、in vitro(図2b、図3a、図6a、及び図6b)及びin vivo(図4及び図6c)で原発性AML芽球の大きいアレイを効果的に標的できる。さらに、DNT治療後の残存芽球は、DNT殺傷に対する高度な感受性を示し、それも未治療のグループと最初に移植に使用した原発性芽球に関連する感受性に相当する感受性である(図5a)。このことは、化学療法の場合とは異なり、AML芽球は治療後にDNTに対する抵抗性がないことを示唆する。これと一貫して、複数のDNT治療は、白血病の負荷をさらに低下させる(図5b及び図5c)。より重要なことに、DNTは化学療法抵抗性のAML細胞を効果的に標的した(図5b、図5c及び図6)。このデータによって、DNTは、化学療法とは異なるメカニズムを介してAML細胞を標的し、そしてAML患者の治療に関する現在の制限を克服するために、単独で化学療法に応答しないAMLに使用可能、または化学療法との組み合わせで再燃を起こす化学療法抵抗性のAMLを標的するためには可能であることを示唆する。

20

30

40

#### 【0076】

同種反応のなかったこと(図2b及び図12)と一致して、1つのドナーからのDNTは原発性AML細胞のアレイを殺傷でき、1人の患者からのAML芽球は異なるドナーからのDNTにより同程度に溶解された(データは非表示)。この特徴は、細胞治療としてDNTのより広い応用可能性を示し、各患者から治療的細胞を生成する必要性を回避できることを示す。なお、リンパ腫の治療に関する最近の成功(Maudeら、2014)で、CAR技術を利用してAMLを標的する研究がより活発的になってきた(Kenderianら、2015; Lichteneggerら、2015; Tettamantiら、2014; Wangら、2015)。DNTの容易な増幅可能性及び構造上抗がん免疫応答を有するエフェクター分子の高い発現性(Merimsら、2011)を考えると、DNTは、抗腫瘍活性をさらに向上させるために

50

、CAR技術の良い細胞ベクターとして機能し得る。さらに、化学療法抵抗性の患者と再燃している患者から取得した原発性芽球は、*in vitro*及び*in vivo*でDNT媒介細胞毒性に感受性であるため(図6及び図7)、DNTは化学療法では難治性の患者を治療するための第1選択治療として、または化学療法抵抗性微小残存病変を標的する従来の化学療法後の強化療法(consolidation therapy)として使用可能である。

#### 【0077】

本開示は、現時点では好ましい例として考えられる例を参照して記載したが、本開示は開示された例に限定されないことを理解されたい。逆に、本開示は、添付の請求項の趣旨および範囲内に含まれる種々の変形および均等な構成を包含することを意図する。

#### 【0078】

ここに記載する全ての刊行物、特許、および特許出願は、各個別の刊行物、特許または特許出願が具体的に、そして個別にその全体が参考として組み込まれることが示された場合と同じ程度に、その全体が参考として組み込まれる。

#### 【0079】

##### 参考文献：

Menzin J, Lang K, Earle CC, Kerney D, Mallick R. The outcomes and costs of acute myeloid leukemia among the elderly. *Arch Intern Med.* 2002;162:1597- 1603.

Ungewickell A, Medeiros BC. Novel agents in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2012;96:178-185.

Hoang VT, Zepeda-Moreno A, Ho AD. Identification of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia and their clinical relevance. *Biotechnol J.* 2012;7:779-788.

Bucisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, Arcese W, Amadori, S, Venditti A. Prognostic and therapeutic implication of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012;119:332-341.

Ferrara F, Palmieri S, Mele G: Prognostic factors and therapeutic options for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Haematologica* 89 (8): 998-1008, 2004.

Garces-Eisele J. Molecular biology strategies to detect residual disease. *Hematology.* 2012;17 Suppl 1:S66-8.

Lin TL, Levy MY. Acute myeloid leukemia: focus on novel therapeutic strategies. *Clin Med Insights Oncol.* 2012;6:205-217.

Ishizawa K, Rasheed ZA, Karisch R et al. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell.* 2010;7:279-282.

Kadowaki N, Kitawaki T. Recent advance in antigen-specific immunotherapy for a acute myeloid leukemia. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:104926.

Vaz AP, Ponnusamy MP, Batra SK. Cancer stem cells and therapeutic targets: an emerging field for cancer treatment. *Drug Deliv Transl Res.* 2013; 3(2):113-120.

Alatrash G Molidrem JJ. Immunotherapy of AML. *Cancer treatment and research.* 2009; 145:237-55

Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:340-352.

Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1988;319:1676-1680.

Teague RM, Kline J. Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. *J Immunother Cancer.* 2013;1(13)

Kochenderfer JN, Yu Z, Frasher D, Restifo NP, Rosenberg SA. Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. *Blood.* 2010;116:3875-3886.

10

20

30

40

50

Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 2009;114:535-546.

Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther*. 2011;19:620-626.

Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol*. 2011;29:917-924.

Peinert S, Prince HM, Guru PM et al. Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen. *Gene Ther*. 2010;17:678-686. 10

Xue SA, Gao L, Thomas S et al. Development of a Wilms' tumor antigen-specific T-cell receptor for clinical trials: engineered patient's T cells can eliminate autologous leukemia blasts in NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2010;95:126-134.

Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, Riviere I, Sadelain M. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther*. 2010;18:666-668

Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med*. 2000;6:782-789. 20

Young KJ, Kay LS, Phillips MJ, Zhang L. Antitumor activity mediated by double-negative T cells. *Cancer Res*. 2003;63:8014-8021.

Merims S, Li X, Joe B et al. Anti-leukemia effect of ex vivo expanded DNT cells from AML patients: a potential novel autologous T-cell adoptive immunotherapy. *Leukemia*. 2011;25:1415-1422.

Young KJ, DuTemple B, Phillips MJ, Zhang L. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J Immunol*. 2003;171:134-141.

He KM, Ma Y, Wang S et al. Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. *Eur J Immunol*. 2007;37:3455-3466. 30

McIver Z, Serio B, Dunbar A et al. Double-negative regulatory T cells induce allogotolerance when expanded after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2008;141:170-178.

Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2001;7:789-794.

Barabe F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science*. 2007;316:600-604.

Ali N, Flutter B, Sanchez Rodriguez R, Sharif-Paghaleh E, Barber LD, Lombardi G, Nestle FO. Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R $\gamma$  null mice display a T-effector memory phenotype. *PLoS One*. 2012;7(8):e44219. 40

Merims, S., P. Dokouhaki, B. Joe, and L. Zhang. 2011. Human Vd1-T cells regulate immune responses by targeting autologous immature dendritic cells. *Hum. Immunol.* 72: 32-36.

Kenderian, S. S. et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia*, doi:10.1038/leu.2015.52 (2015).

Lichtenegger, F. S., Krupka, C., Kohnke, T. & Subklewe, M. Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol* 52, 207-214, doi:10.1053/j.seminhematol.201 50

5.03.006 (2015).

Tettamanti, S., Biondi, A., Biagi, E. & Bonnet, D. CD123 AML targeting by chimeric antigen receptors: A novel magic bullet for AML therapeutics? *Oncoimmunology* 3, e28835, doi:10.4161/onci.28835 (2014).

Wang, Q. S. et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther* 23, 184-191, doi:10.1038/mt.2014.164 (2015).

Arpinati, M. & Curti, A. Immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Immunotherapy* 6, 95-106, doi:10.2217/imt.13.152 (2014).

Campbell, K. S. & Hasegawa, J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132, 536-544, doi:10.1016/j.jaci.2013.07.006 (2013). 10

Ruggeri, L. et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097-2100, doi:10.1126/science.1068440 (2002).

LZ June, C. H. (2007). "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic." *Journal of Clinical Investigation* 117(6): 1466-1476.

Hourigan, C. S. & Karp, J. E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Nat Rev Clin Oncol* 10, 460-471, doi:10.1038/nrclinonc.2013.100 (2013).

Brissot, E. & Mohty, M. Which Acute Myeloid Leukemia Patients Should Be Offered Transplantation? *Semin Hematol* 52, 223-231, doi:10.1053/j.seminhematol.2015.03.001 (2015). 20

Vyas, P., Appelbaum, F. R. & Craddock, C. Reprint of: Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 21, S3-10, doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.032 (2015).

MacDonald, K. P., Shlomchik, W. D. & Reddy, P. Biology of graft-versus-host responses: recent insights. *Biol Blood Marrow Transplant* 19, S10-14, doi:10.1016/j.bbmt.2012.11.005 (2013).

McDermott, S. P., Eppert, K., Lechman, E. R., Doedens, M. & Dick, J. E. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood* 116, 193-200, doi:10.1182/blood-2010-02-271841 (2010). 30

Drake, A. C. et al. Human CD34+ CD133+ hematopoietic stem cells cultured with growth factors including Angpt15 efficiently engraft adult NOD-SCID IL2rgamma-- (NSG) mice. *PLoS One* 6, e18382, doi:10.1371/journal.pone.0018382 (2011)

Covassin, L. et al. Human peripheral blood CD4 T cell-engrafted non-obese diabetic-scid IL2rgamma(null) H2-Ab1 (tm1Gru) Tg (human leucocyte antigen D-related 4) mice: a mouse model of human allogeneic graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 166, 269-280, doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04462. (2011).

【図1】

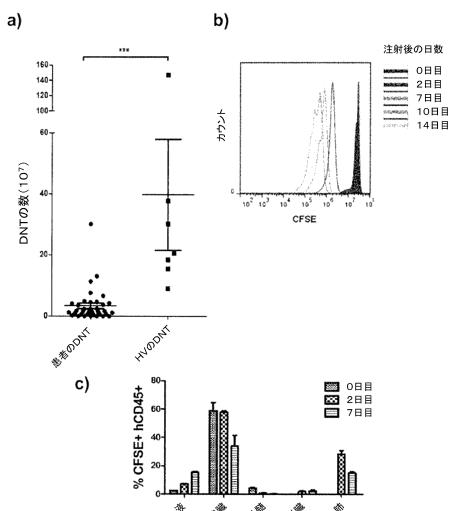


Fig. 1

【図2】

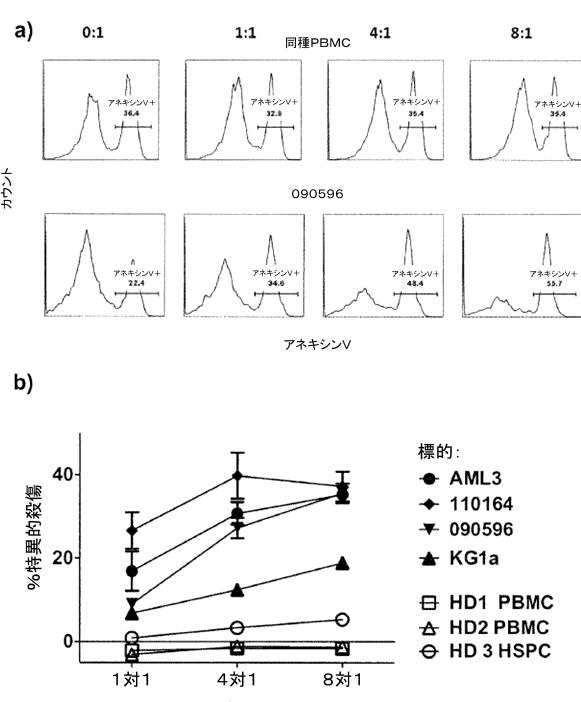


Fig. 2

【図3 A】

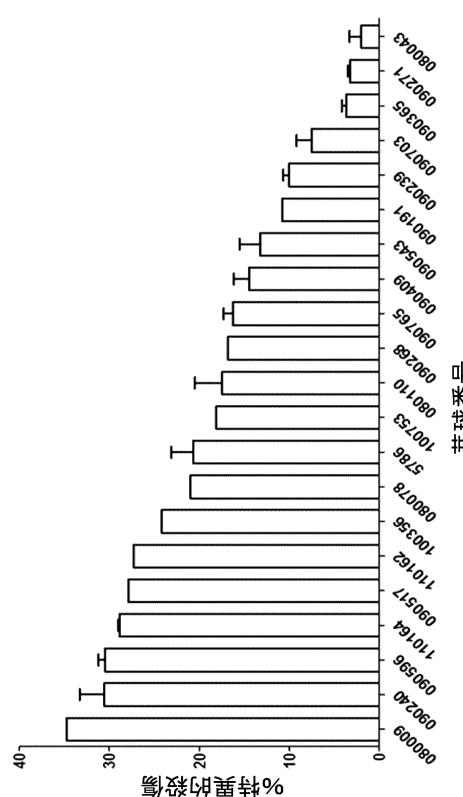


Fig.3

【図3 B】

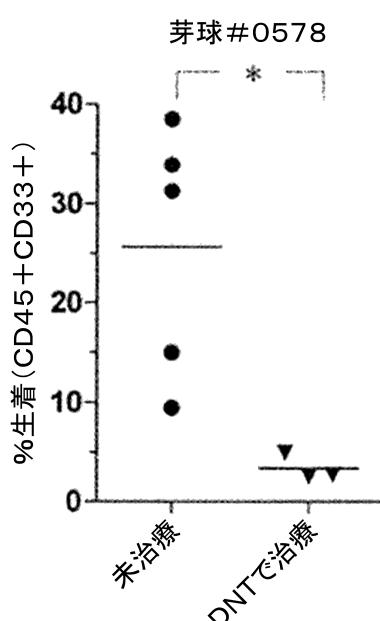


Fig. 3 (Cont.)

【図4】

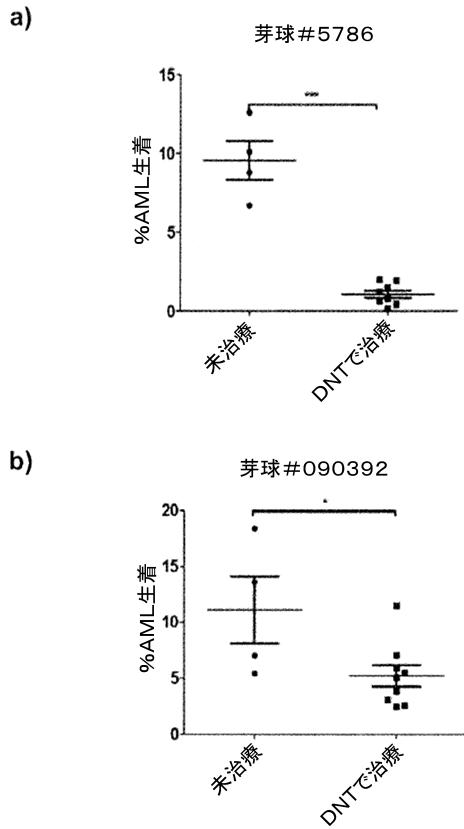


Fig. 4

【図5 A】

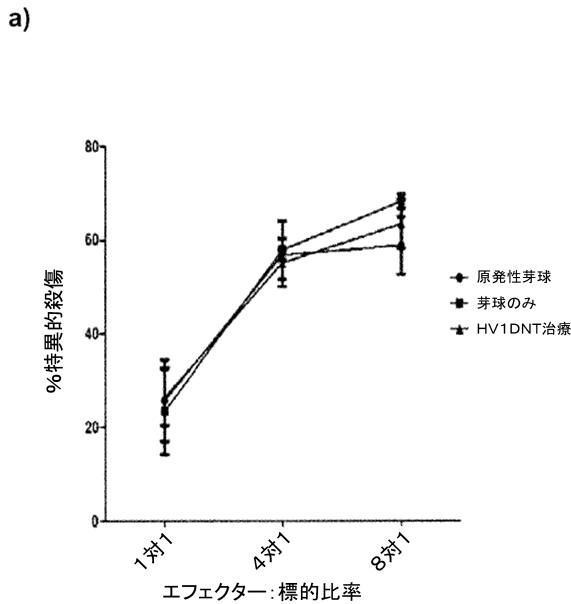


Fig. 5

【図5 B】

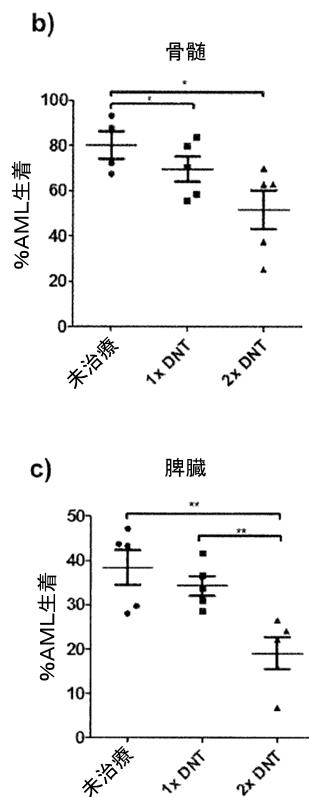


Fig. 5 (Cont.)

【図6】

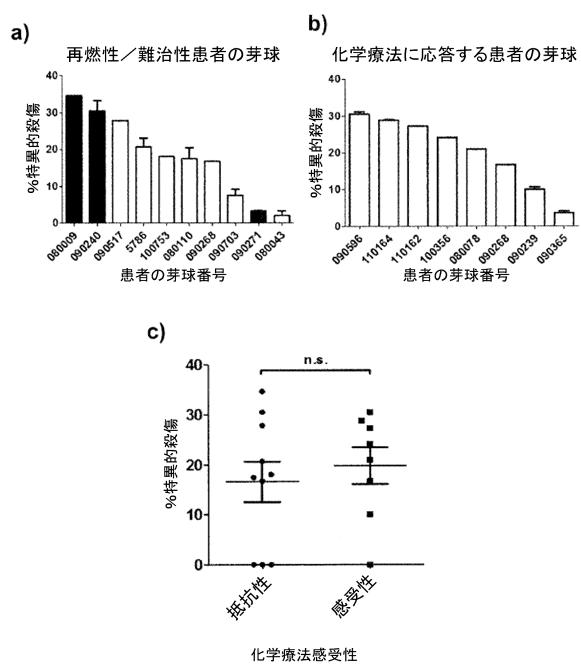


Fig. 6

【図7】

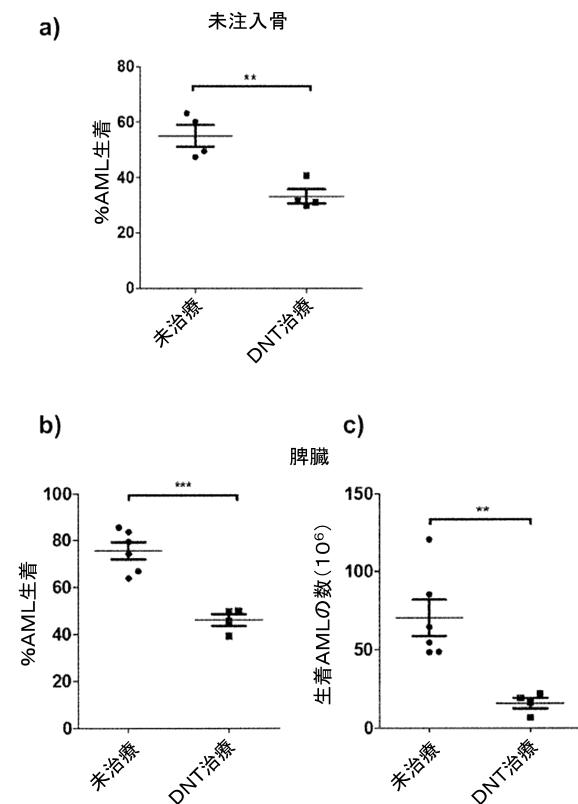
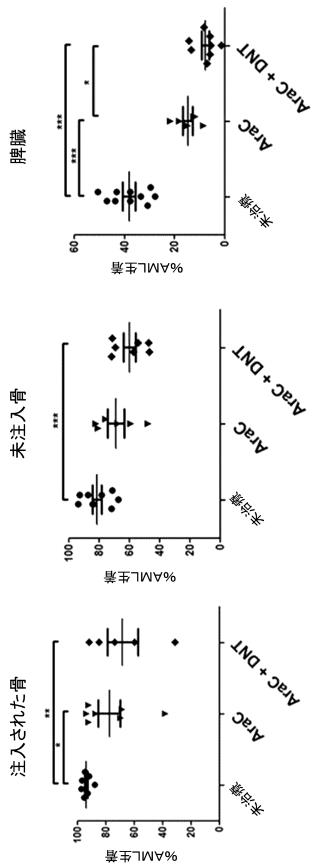


Fig. 7

【図8】



【図9】

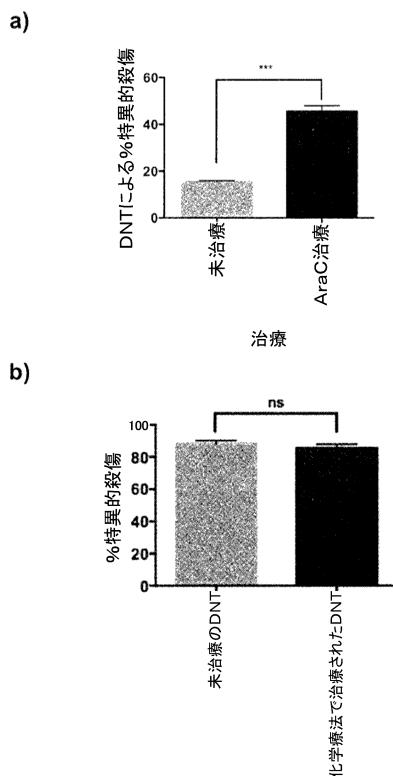
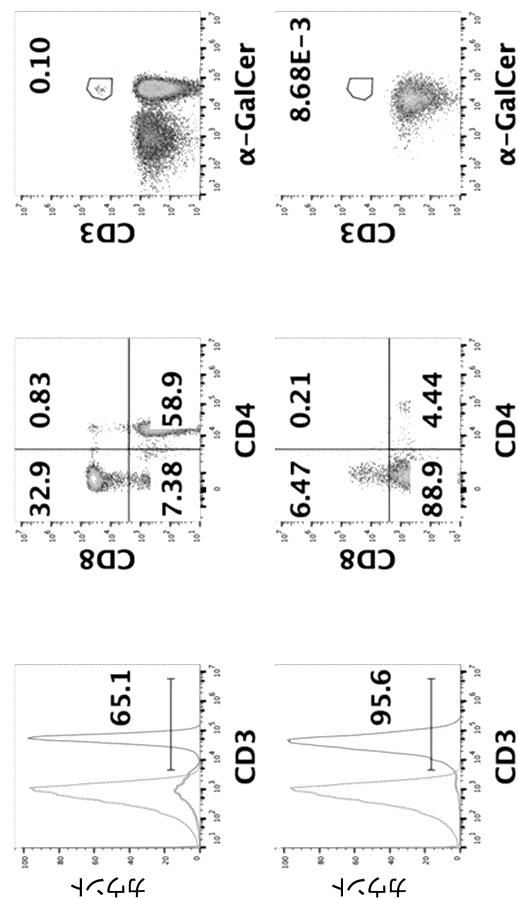
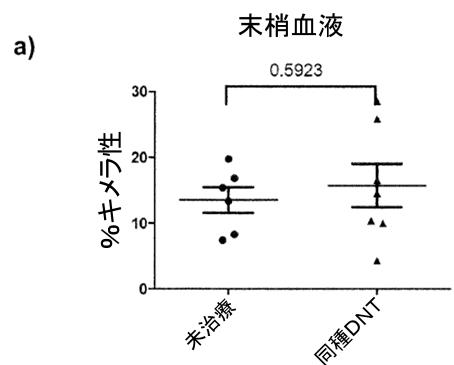


Fig. 9

【図10】



【図 1 1】



【図 1 2】

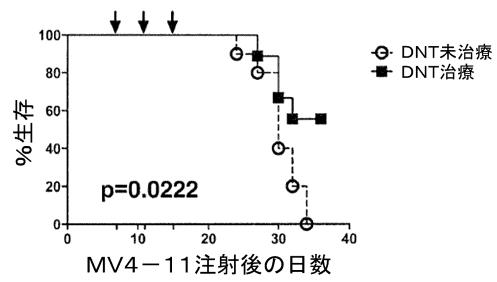


Fig. 12

b)

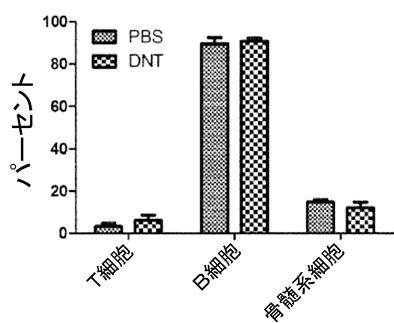


Fig. 11

---

フロントページの続き

(74)代理人 100130409  
弁理士 下山 治  
(74)代理人 100134175  
弁理士 永川 行光  
(74)代理人 100188857  
弁理士 木下 智文  
(72)発明者 チャン, リ  
カナダ国 オンタリオ エム6エス 1エス6, トロント, ウェザレル ストリート 3  
(72)発明者 リー, ジョン ボク  
カナダ国 オンタリオ エム3エイチ 0エ-7, トロント, スイート 828, ウィルソン アヴェニュー 525  
(72)発明者 チェン, ブランソン  
カナダ国 オンタリオ エム1ヴィー 1エックス9, トロント, オークヘブン ドライブ 26

審査官 中村 浩

(56)参考文献 国際公開第2007/056854 (WO, A1)  
Leukemia, 2011, 25(9), p.1415-1422  
J. Immunol., 2013, 190(1 Suppl.), 177.7  
Cytotherapy, 2013, 15(4), Suppl., p.S41  
J. Transl. Med., 2014-Feb-15, 12:45  
Clin. Dev. Immunol., 2011, vol. 2011, ID 104926  
Clin. Exp. Immunol., 2010, 161(2), p.223-232  
Oncologist, 2009, 14(3), p.240-252

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61K  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )