

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7278296号

(P7278296)

(45)発行日 令和5年5月19日(2023.5.19)

(24)登録日 令和5年5月11日(2023.5.11)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

D

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

請求項の数 24 (全47頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-543999(P2020-543999)

(86)(22)出願日 平成31年2月22日(2019.2.22)

(65)公表番号 特表2021-514368(P2021-514368  
A)

(43)公表日 令和3年6月10日(2021.6.10)

(86)国際出願番号 PCT/EP2019/054493

(87)国際公開番号 WO2019/162472

(87)国際公開日 令和1年8月29日(2019.8.29)

審査請求日 令和3年9月7日(2021.9.7)

(31)優先権主張番号 18158169.5

(32)優先日 平成30年2月22日(2018.2.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 18189562.4

(32)優先日 平成30年8月17日(2018.8.17)

最終頁に続く

(73)特許権者 515098691

ユニヴェルズイテート チューリッヒ

スイス国 チューリッヒ CH-8006

レミーストラッセ 71

(74)代理人 110001379

弁理士法人大島特許事務所

(72)発明者 トウゲス、ソニア

スイス国チューリッヒ シーエイチー 8

050・ノインブルネンストラッセ 51

(72)発明者 ベッヒャー、ブルクハルト

スイス国マウル 8124・イム マッテ

ナッハー 3

審査官 石井 裕美子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 A l l o - H C T を受けた患者の血液悪性腫瘍の治療に使用するための G M - C S F または G M - C S F 受容体のリガンド

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または C D 1 1 6、C D 1 3 1、および／または C D 1 1 6 と C D 1 3 1 とを含むヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体の少なくとも 1 つに特異的に結合する非アゴニストリガンドと、

薬学的に許容される担体とを含み、

前記リガンドが、抗体、抗体フラグメント、アプタマーまたは抗体様分子であり、

同種造血幹細胞移植を受けた患者の移植片対宿主病の発生の治療および／または抑制に用いられ、

前記同種造血幹細胞移植が、血液悪性腫瘍の治療において前記患者に提供される、医薬組成物。

## 【請求項 2】

前記血液悪性腫瘍が白血病、リンパ腫、または多発性骨髄腫である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3】

前記白血病が、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病および急性単球性白血病を含む群から選択される、請求項 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

前記リンパ腫がホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫である、請求項 2 に記載の

医薬組成物。

【請求項 5】

前記リガンドが、ヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項 1 から請求項 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記リガンドが、マヴリリムマブ、ナミルマブ、レンジルマブ、オチリマブ、およびギムシルマブを含む群から選択される、請求項 1 から請求項 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または前記 CD 116、前記 CD 131 および／または前記 CD 116 と前記 CD 131 とを含む前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体のいずれかへの前記リガンドの結合が、 $10^{-7} \text{mol L}^{-1}$  よりも小さい  $K_D$  を有する、請求項 1 から請求項 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記リガンドが、前記患者に投与された核酸によってエンコードされるポリペプチドである、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または CD 116、CD 131、および／または前記 CD 116 と前記 CD 131 とを含むヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体の少なくとも 1 つに特異的に結合する非アゴニストリガンドと、  
薬学的に許容される担体とを含み、

前記リガンドが、抗体、抗体フラグメント、アプタマーまたは抗体様分子であり、

同種造血幹細胞移植を受けた患者の、前記同種造血幹細胞移植に関連する移植片対宿主病の発症または重症化を抑制するために使用され、

前記同種造血幹細胞移植が、血液悪性腫瘍の治療において前記患者に提供される、医薬組成物。

【請求項 10】

前記同種造血幹細胞移植と同時にまたはその後に前記患者に提供される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記血液悪性腫瘍が、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病および急性単球性白血病を含む群から選択される白血病である、請求項 9 または 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記リガンドが、マヴリリムマブ、ナミルマブ、レンジルマブ、オチリマブ、およびギムシルマブを含む群から選択される、請求項 9 から請求項 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または CD 116、CD 131、および／または前記 CD 116 と前記 CD 131 とを含むヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体の少なくとも 1 つに特異的に結合する非アゴニストポリペプチドリガンドと、  
薬学的に許容される担体とを含み、

前記リガンドが、前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または前記 CD 116、前記 CD 131、もしくは前記 CD 116 と前記 CD 131 とを含む前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体のいずれかの生理学的機能を中和する抗体、抗体フラグメント、アプタマーまたは抗体様分子であり、

同種造血幹細胞移植を受けた患者の血液悪性腫瘍の治療に使用するための、医薬組成物。

【請求項 14】

前記リガンドが、ヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記リガンドが、マヴリリムマブ、ナミルマブ、レンジルマブ、オチリマブ、およびギムシルマブから選択される、請求項 13 または 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または前記 CD 116、前記 CD 131、および／または前記 CD 116 と前記 CD 131 とを含む前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体のいずれかへの前記リガンドの結合が、 $10^{-7} \text{mol L}^{-1}$  よりも小さい  $K_D$  を有することを特徴とする、請求項 13 から 15 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

核酸分子と、薬学的に許容される担体とを含み、  
前記核酸分子が、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または CD 116、CD 131、および／または前記 CD 116 と前記 CD 131 とを含むヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体の少なくとも 1 つに特異的に結合する非アゴニストポリペプチドリガンドをエンコードし、  
前記リガンドが、前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または前記 CD 116、前記 CD 131、もしくは前記 CD 116 と前記 CD 131 とを含む前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体のいずれかの生理学的機能を中和する抗体、抗体フラグメント、アプタマーまたは抗体様分子であり、  
同種造血幹細胞移植を受けた患者の血液悪性腫瘍の治療に使用するための、医薬組成物。

【請求項 18】

前記核酸分子が、DNA 分子または RNA 分子である、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

核酸発現構築物と、薬学的に許容される担体とを含み、  
前記核酸発現構築物が、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または CD 116、CD 131、および／または前記 CD 116 と前記 CD 131 とを含むヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体の少なくとも 1 つに特異的に結合する非アゴニストポリペプチドリガンドをエンコードする核酸分子を含み、  
前記リガンドが、前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、または前記 CD 116、前記 CD 131、もしくは前記 CD 116 と前記 CD 131 とを含む前記ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体のいずれかの生理学的機能を中和する抗体、抗体フラグメント、アプタマーまたは抗体様分子であり、  
同種造血幹細胞移植を受けた患者の血液悪性腫瘍の治療に使用するための、医薬組成物。

【請求項 20】

前記核酸発現構築物が、DNA プラスミド、二本鎖リニア DNA、一本鎖 RNA およびウイルス、特にレンチウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスから選択される、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

非経口投与用の投与形態として製剤化された、請求項 13 から請求項 20 までのいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記同種造血幹細胞移植の結果として生じる合併症の治療のために使用される、請求項 13 から請求項 21 までのいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記血液悪性腫瘍が白血病、リンパ腫、または多発性骨髄腫である、請求項 13 から請求項 21 までのいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記血液悪性腫瘍が、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、急性単球性白血病、またはホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫を含む群から選択される、請求項 13 から請求項 21 までのいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願の相互参照)

2018年2月2日出願のヨーロッパ特許出願第18158169.5号明細書、2018年8月17日出願のヨーロッパ特許出願第18189562.4号明細書、2018年9月14日出願のヨーロッパ特許出願第18194549.4号明細書、および米国特許第16/269,572号明細書の利益を主張しており、それらの出願の全開示は、引用を以って本明細書の一部となす。

## 【0002】

(技術分野)

本発明は、a l l o - H C Tを受けた患者の血液悪性腫瘍の治療に使用するための、G M - C S F ( C S F - 2 ) または C S F 2 R P ( C D 1 3 1 ) および C S F 2 R a ( C D 1 1 6 ) を含む受容体複合体に特異的に結合する非アゴニストリガンド、特に抗体に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0003】

血液悪性腫瘍を患っている患者にとって、同種造血細胞移植 ( a l l o - H C T ) は治療と救命の可能性がある治療法である。一方で、全患者の40~60%は臨床的に重大な急性または慢性の移植片対宿主病 ( G v H D ) を発症し、これらを合わせると約50%の死亡率となる。ドナー由来のT細胞は以下の両プロセスを媒介する。移植片からのa l l o 反応性T細胞は宿主の悪性細胞を攻撃し、有益な移植片対腫瘍効果 ( G v L ) をもたらす。一方、このa l l o 反応性T細胞は健康な組織 (典型的には皮膚、腸、肝臓) を標的とする可能性があり、G v H Dをもたらす。a l l o - H C Tの前にドナー材料からT細胞を枯渇させることは、G v H Dを予防/減少させることができるが、移植片対腫瘍効果 ( G v L ) 活動の低下と再発率の増加という犠牲が伴う。したがって、G v LとG v H DのメカニズムをT細胞レベルで分離し、臨床的利益のためにどのように変調させることができるのかを理解することが急務となっている。

## 【0004】

多くの研究では、マウスモデルにおいてG v H Dを支える主要なT細胞サブセットとサイトカインの定義を試みてきたが、これまでのところ一貫した結論はほとんど得られていない。G v H DはもともとT<sub>H</sub>1が介在する病態であると提案されていたが、マウスを用いた研究により、T<sub>H</sub>1サイトカインI F N  $\gamma$ を欠損したドナーT細胞が疾患を悪化させることが明らかになった。T<sub>H</sub>2細胞は、実験的なG v H Dを抑制し、肝臓や皮膚に影響を与えるG v H Dを誘発する。同様に、I L - 1 7 A産生T細胞が炎症性疾患全般における組織損傷の顕著な媒介であるという証拠がある一方で、G v H DにおけるI L - 1 7の役割については、マウスモデルでは、実験条件に応じて、G v H Dを促進または改善することができるように思われるため、論争の的となっている。このように、分極したT<sub>H</sub>細胞はG v H Dの発生と永続化に明らかに関係しているが、これまでのところ、マウスモデルでもヒトでも、この疾患の発症に再現性があり、かつ重複しない機能を持つ特定の可溶性メディエーターを同定することはできなかった。上述の技術水準に基づいて、本発明の目的は、有益なG v L効果を維持しながらG v H Dを減衰させるための手段および方法を提供することである。この目的は、本明細書の独立請求項の主題によって達成される。

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

本発明の第1の態様は、同種移植を受けた患者において、移植片対宿主病に罹患している患者を治療する方法、または移植片対宿主病の発生を予防、抑制、または重症度を低下させる方法に関する。本発明の第2の態様は、がん、特に血液悪性腫瘍に罹患している患者を治療する方法であって、同種造血幹細胞移植 ( a l l o - H C T ) を受けた患者を治

10

20

30

40

50

療する方法に関する。本発明の任意の局面に従った方法は、GvHDを誘発する免疫サイトカインGM-CSFの信号伝達を妨害するステップを含む。これは、リガンド、特に抗体、より具体的には中和抗体によってGM-CSFを阻害することで達成することができる。本発明の目的はまた、GM-CSFがその天然の受容体に結合することを妨害するステップによって、またはこれらの受容体に非アゴニストリガンドを投与するステップ、特にGM-CSF受容体に対する中和抗体を投与するステップを経て信号カスケードを阻害するステップによっても達成することができる。他の考えられるメカニズムは、核酸干渉(RNAi、アンチセンス)によって、GM-CSFまたはその受容体のいずれかの発現を、一過性またはより長い期間にわたって抑制することである。特定の実施形態では、本発明は、非アゴニストリガンド、特に抗体、より具体的には、GM-CSFまたはCD116、CD131、およびCD116およびCD131を含むGM-CSF受容体のいずれかに反応する中和非アゴニスト抗体を患者に投与するステップを含む。この態様は、血液悪性腫瘍に苦しんでいる患者のGvHDの治療または予防に使用するために、他に以下から選択される薬剤の供給を以て実施することができる。

10

—中和ポリペプチドリガンド、特にGM-CSF、またはCD116、CD131もしくはCD116とCD131とを含むGM-CSF受容体のいずれかに反応する中和抗体および

—GM-CSF、CD116、および／またはCD131の発現を阻害する核酸剤

【図面の簡単な説明】

【0006】

20

図1A～1Hは、ドナーT細胞の同種移植反応時におけるGM-CSFとIFN $\gamma$ の分泌を示す図である。

【0007】

【図1A】CD45.1<sup>+</sup> WT C57BL/6 TCD-BM単独またはCD45.1<sup>+</sup> WT C57BL/6脾臓細胞との併用によるallo-HCT後に致死量の放射線を照射したCD45.2<sup>+</sup> BALB/cマウスの生存率を示す図である。データは、4つの個々の実験からプールされ、それぞれがn=5/グループである。生存曲線の比較には、ログランク(マンテル・コックス)検定を使用し、\*\*\*p<0.001である。

【図1B】allo-HCT後3日目と6日目の脾臓、肝臓、皮膚におけるライブシングレット内のCD45.1<sup>+</sup>細胞の頻度を示す図である。データはn=10/グループを得るためにプールされた。

30

【図1C】allo-HCT後3日目のマウスの肝臓からのCD45.1<sup>+</sup>群内のCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞を産生するIFN $\gamma$ 、GM-CSFおよびIL-17Aの頻度を示す図である。代表的なプロットは、3つの独立した実験の合計から示している。

【図1D】allo-HCT後3日目と6日目のマウスの肝臓、脾臓および皮膚からのCD45.1<sup>+</sup>群内のCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞を産生するIFN $\gamma$ 、GM-CSFおよびIL-17Aの頻度を示す図である。データは3つの個々の実験、合計n=10/グループからプールした。

【図1E】allo-HCT後6日目のマウスの血清IFN $\gamma$ およびGM-CSFレベルを示す図である。データは3つの個々の実験からプールし、n=2-5/グループである。平均値の比較のためにウェルチの補正を用いた対応のない2群についてのt検定を使用し、\*p<0.05、\*\*p<0.01である。

40

【図1F】同系間(C57BL/6)、同種(BALB/c)脾臓CD11c<sup>+</sup>DCのいずれかとWT C57BL/6マウスからのT細胞の共培養から得られた上清内のIFN $\gamma$ 、GM-CSFおよびIL-17Aを示す図である。データは3つの実験からプールされ、n=3-5/グループである。平均値の比較のためにウェルチの補正を用いた対応のない2群についてのt検定を使用し、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*p<0.001である。

【図1G】C57BL/6wt、Ifng<sup>-/-</sup>、Csrf2<sup>-/-</sup>、またはII17a<sup>-/-</sup>マウスのT細胞と同系(C57BL/6)または同種(BALB/c)脾臓CD11c<sup>+</sup>

50

D C sを共培養したT細胞によるトリチウムチミジン取り込みを示す図である。データは3つの個々の実験からプールされ、 $n = 2 - 5$  / グループである。平均値の比較のために、ボンフェローニ事後検定を用いた一元配置分散分析を使用した。データは、図1 Bでは平均+ / - S Dとして表示され、図1 D ~ 1 Gでは平均+ / - S E Mとして表示される。

【図1 H】 a l l o - H C T後3日目および6日目の肝臓および脾臓からのC D 4 5 . 1 + 群内のI F N  $\gamma$ 、G M - C S F産生C D 4 + およびC D 8 + T細胞の頻度を示す図である。3つの実験の1つからプールされた代表的なデータを示し、 $n = 3 - 4$  / グループである。

【0008】

略語について、T C DはT細胞枯渇、B Mは骨髄、H C Tは造血細胞移植、W Tは野生型、C p mは1分間のカウントを示す。

【0009】

図2 A ~ 2 Kにおいて、G M - C S Fは、完全なM H Cミスマッチのa l l o - H C T後の急性G v H Dに重要であることを示す。

【0010】

【図2 A】 W T C 5 7 B L / 6 T C D - B M単独で、またはC 5 7 B L / 6 W T C s f 2 - / -、I f n g - / -、またはI I 1 7 a - / -マウスの脾臓細胞との組み合わせによるa l l o - H C Tを受けたB A L B / cマウスが、致死量の放射線を照射された場合の生存率を示す図である。データは、4つの個々の実験からプールされ、それぞれが $n = 5$  / グループであった。生存曲線の比較 (W T対他のグループ) には、ログランク (マンテル・コックス) 検定を使用し、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  である。

【図2 B】 W T C 5 7 B L / 6 T C D - B M単独またはC 5 7 B L / 6 W TまたはC s f 2 - / -マウスの脾臓から精製されたT細胞との組み合わせによるa l l o - H C Tを受けたB A L B / cマウスが、致死量の放射線を照射された場合の生存率を示す図である。データは、各 $n = 5$  / グループの3つの個別の実験からプールされた。生存曲線 (W TとC s f 2 - / -) の比較には、ログランク (マンテル・コックス) 検定を使用し、\*\*\*  $p < 0.001$  である。

【図2 C】 a l l o - H C T後6日目のB A L B / cマウスから肝臓、小腸、皮膚の複合病理組織学的スコアを示す図である。3つの個々の実験からプールされたデータを示しており、 $n = 5$  / グループである。平均値 (W T対C s f 2 - / -) の比較には、対応のない2群についてのt検定を使用した。

【図2 D】 W TまたはC s f 2 - / - C 5 7 B L / 6マウスのいずれかからの脾臓細胞とW T C 5 7 B L / 6 T C D - B Mを組み合わせたa l l o - H C T後6日目のマウスの皮膚および小腸からのヘマトキシリンおよびエオシン染色切片の代表的な画像を示す図であり、 $n = 4 - 5$  / グループ (スケールバー:  $100 \mu\text{m}$ ) である。

【図2 E】 W TまたはC s f 2 - / - C 5 7 B L / 6マウスのいずれかからの脾臓細胞とW T C 5 7 B L / 6 T C D - B Mを組み合わせたa l l o - H C T後6日目のマウスの肝臓からの切片におけるp 2 2 p h o x標識の代表的な画像 (スケールバー:  $100 \mu\text{m}$ ) を示し、 $n = 4 - 5$  / グループ (上のパネル) である。視野ごとのp 2 2 p h o xについて陽性と標識された総面積の平均%を定量化している。平均値の比較 (W T対C s f 2 - / -) には、対応のない2群についてのt検定を使用し、\*\*  $p < 0.01$  である。

【図2 F】 W TまたはC s f 2 - / - C 5 7 B L / 6マウスのいずれかからの脾臓細胞と組み合わせたW T C 5 7 B L / 6 T C D - B Mを用いたa l l o - H C T後6日目の小腸からの切片におけるp 2 2 p h o x標識の代表的な画像 (スケールバー:  $100 \mu\text{m}$ ) を示し、 $n = 4 - 5$  / グループ (上のパネル) である。視野ごとのp 2 2 p h o xについて陽性と標識された総面積の平均%を定量化している。平均値の比較 (W T対C s f 2 - / -) には、対応のない2群についてのt検定を使用し、\*\*  $p < 0.01$  である。

【図2 G】 W T C 5 7 B L / 6 T C D - B M単独、またはC 5 7 B L / 6 W Tマウスの脾臓細胞との組み合わせによるa l l o - H C Tを受けたB A L B / cマウスが、致死

10

20

30

40

50

量の放射線を照射された場合の生存率を示す図である。マウスには、HCTの2日前から実験期間中PBS、アイソタイプコントロール抗体、または抗GM-CSF抗体を3回／週に分けて投与した。データは、それぞれ $n=5$ ／グループで2つの個々の実験からプールされた。生存曲線（aGM-CSF対アイソタイプ）の比較については、ログランク（マンテル・コックス）検定を使用し、\*\*\* $p<0.001$ である。データは平均 $\pm$ SEMとして表示される。

【図2H】aに記載したように、allo-HCTの6日後のBALB/cマウスの結腸の長さ（cm）を示す図である。データは2つの個別の実験からプールされた。

【図2I】aに記載したように、allo-HCT後6日目のBALB/cマウスからの大腸内のアポトーシス細胞（TUNEL染色）の代表的な画像および定量化を示す図である。データは3つの個々の実験（スケールバー上50 $\mu$ m、下20 $\mu$ m）からプールされた。

10

【図2J】allo-HCT後6日目のBALB/cマウスからの血清中のアルカリホスファターゼ（AP）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、血中尿素窒素（BUN）およびアルブミンのレベルを示す図である。データは、 $n=3-5$ ／グループで、2つの個別の実験を示している。

【図2K】WT C57BL/6 TCD BM単独、またはC57BL/6 WTまたはCs f 2<sup>-/-</sup>マウス（CD4WTCD8WT、CD4WTCD8Cs f 2<sup>-/-</sup>、CD4Cs f 2<sup>-/-</sup>、CD4Cs f 2<sup>-/-</sup>CD8WTおよびCD4Cs f 2<sup>-/-</sup>CD8Cs f 2<sup>-/-</sup>）の脾臓から精製したCD4およびCD8 T細胞との組み合わせによるallo-HCTを受けたBALB/cマウスが、致死量の放射線を照射された場合の生存率を示す図である。TCD-BM単独で処置したマウスを対照として使用した。データは、 $n=5$ ／グループの2つの個々の実験を示している。生存曲線の比較（CD4WTCD8WT対他のグループ）には、ログランク（マンテル・コックス）検定を使用し、 $n s$ （非有意）、\*\* $p<0.01$ である。

20

【0011】

略語について、TCDはT細胞枯渇、BMは骨髄、HCTは造血細胞移植、WTは野生型を示す。

【0012】

図3A～3Hは、GM-CSFについて、部分的なMHCミスマッチのallo-HCT後のGvHD病理学の媒介を示す図である。

30

【0013】

【図3A】WT C57BL/6 TCD-BM単独またはC57BL/6 WT、Cs f 2<sup>-/-</sup>またはIf n g<sup>-/-</sup>マウスからの脾臓細胞と組み合わせて、部分的なMHCミスマッチのallo-HCTを受けたB6D2F1マウスが、致死量の放射線を照射された場合の生存率を示す図である。データは、5つの個々の実験からプールされ、それぞれが $n=5$ ／グループである。生存曲線の比較（WT対他のグループ）には、ログランク（マンテル・コックス）検定を使用し、\* $p<0.05$ 、\*\*\* $p<0.001$ である。

【図3B】WT C57BL/6 TCD-BM単独、またはC57BL/6 WT、Cs f 2<sup>-/-</sup>またはIf n g<sup>-/-</sup>マウスの脾臓から精製されたT細胞との組み合わせによるallo-HCTを受けたB6D2F1マウスが、致死量の放射線を照射された場合の生存率を示す図である。データは、2つの個別の実験からプールされ、それぞれが $n=5$ ／グループである。生存曲線の比較（WT対他のグループ）には、ログランク（マンテル・コックス）検定を使用し、\* $p<0.05$ 、\*\*\* $p<0.001$ である。

40

【図3C】allo-HCT後11日目のB6D2F1マウスからの肝臓、小腸および皮膚切片の複合病理組織学的スコアを示す図である。データは、2つの個々の実験からプールされ、 $n=5$ ／グループである。平均値（WT、Cs f 2<sup>-/-</sup>およびIf n g<sup>-/-</sup>）の比較には、ボンフェローニ事後検定を用いた一元配置分散分析を使用し、\* $p<0.05$ 、\*\*\* $p<0.001$ である。

【図3D】WT、If n g<sup>-/-</sup>またはCs f 2<sup>-/-</sup>C57BL/6マウスのいずれかか

50

らの脾臓細胞との組み合わせによるWT C57BL/6 TCD-BMを用いたa l l o-HCT後11日目のマウスの皮膚からのヘマトキシリンおよびエオシン染色切片の代表的な画像を示す図であり、 $n = 4 - 5$  / グループ (スケールバー:  $100 \mu\text{m}$ ) である。

【図3E】WT C57BL/6 TCD-BMとC57BL/6 WTまたはCs f 2<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞を組み合わせたa l l o-HCT後9日目のマウスの肝臓からの切片におけるp 2 2 p h o x (上側のパネル) およびF 4 / 8 0の標識の代表的な画像を示す図であり、 $n = 4 - 5$  / グループである。視野ごとのp 2 2 p h o x またはF 4 / 8 0 について陽性と認識された総面積の%を定量化している。平均値 (WT対Cs f 2<sup>-/-</sup>) の比較には、対応のない2群についてのt検定を使用し、\*\*\*  $p < 0.001$ 、\*\*  $p < 0.01$  である。

10

【図3F】WT C57BL/6 TCD-BMとC57BL/6 WTまたはCs f 2<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞を組み合わせたa l l o-HCT後9日目のマウスの小腸 (スケールバー:  $100 \mu\text{m}$ ) からの切片におけるp 2 2 p h o x (上側のパネル) およびF 4 / 8 0の標識の代表的な画像を示す図であり、 $n = 4 - 5$  / グループである。視野ごとのp 2 2 p h o x またはF 4 / 8 0 について陽性と認識された総面積の%を定量化している。平均値 (WT対Cs f 2<sup>-/-</sup>) の比較には、対応のない2群についてのt検定を使用し、\*\*\*  $p < 0.001$ 、\*\*  $p < 0.01$  である。

【図3G】C57BL/6 WT、I f n g<sup>-/-</sup>またはCs f 2<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞と組み合わせたWT C57BL/6 TCD-BMを用いたa l l o-HCT後9日目のマウスにおける血清I F N  $\gamma$  およびGM-CSFレベルを示す図である。データは、2~3の個々の実験からプールされ、 $n = 4 - 5$  / グループである。平均値 (WT対I f n g<sup>-/-</sup>またはWT対Cs f 2<sup>-/-</sup>) の比較には、ウェルチの補正を用いた対応のない2群についてのt検定を使用し、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  である。データは平均値 + / - S E Mとして表示されている。

20

【図3H】aに記載されているように、a l l o-HCT後9日目または28日目のB 6 D 2 F 1マウスの肝臓切についての複合病理組織学的スコアを示す図である。データは2つの独立した実験を示しており、 $n = 4 - 6$  / グループである。

【0014】

略語について、TCDはT細胞枯渇、BMは骨髄、HCTは造血細胞移植、WTは野生型を示す。

30

【0015】

図4A~4Hは、GM-CSFが、a l l o-HCT後の抗腫瘍活性のために不要であることを示している。

【0016】

図4A~4Dは、致死量の放射線を照射されたBALB/cマウスにGFPおよびルシフェラーゼを発現するA20腫瘍細胞と、WT C57BL/6 WT TCD-BM単独、またはC57BL/6 WTマウスまたはCs f 2<sup>-/-</sup>マウスの脾臓から精製されたT細胞と組み合わせたMHCミスマッチのa l l o-HCTを同時に静脈内注射した状態を示す図である。TCD-BM単独で処理したマウスを対照として使用した。

【0017】

40

【図4A】生体内生物発光イメージングによってモニターした腫瘍の成長を示す図である。2つの代表的な実験からの画像を示している。

【図4B】関心領域 (ROI) の信号強度の経時的なモニターを示す図である。

【図4C】経時的生存率を、致死的なGvHD (灰色)、腫瘍 (黒色) または生存者 (白色) の各処置群のマウスの割合として示す図である。データは、 $n = 5$  / グループの2つの個別の実験からプールされた。生存曲線 (WT対他の群) の比較には、ログランク (マンテル・コックス) 検定を使用し、 $n s$  (有意ではない)、\*\*  $p < 0.01$  である。

【図4D】死因を、致死量のGvHD (灰色)、腫瘍 (黒色) または生存者 (白色) を有する各処置群のマウスの割合として示す図である。データは、 $n = 5$  / グループの2つの個別の実験からプールされた。生存曲線 (WT対他の群) の比較には、ログランク (マン

50

テル・コックス) 検定を使用し、 $n s$  (有意ではない)、 $** p < 0.01$ である。

【0018】

図4E~4Hは、致死量の放射線を照射したBALB/cマウスに、GFPおよびルシフェラーゼを発現するA20腫瘍細胞と、WT C57BL/6 TCD-BM単独、またはC57BL/6 WTマウスの脾臓から精製したT細胞と組み合わせて、MHCミスマッチのallo-HCTと同時に静脈内に注入した状態を示す図である。TCD-BM単独で処理したマウスを対照として使用した。マウスへは、HCTの2日前から実験期間中、アイソタイプコントロール、または抗GM-CSF抗体を3回/週に分けて投与した。

【0019】

【図4E】生体内生物発光イメージングによってモニターした腫瘍の成長を示す図である。 $n = 6-7$ /グループの1つの実験からの画像を示している。

【図4F】関心領域(ROI)の信号強度の経時的なモニターを示す図である。

【図4G】経時的生存率を、致死的GvHD(灰色)、腫瘍(黒色)または生存者(白色)を有する各治療群のマウスの割合として示す図である。生存曲線の比較(WT対csf2<sup>-/-</sup>)には、ログランク(マンテル・コックス)検定を使用し、 $* p < 0.05$ である。データは平均値+/-SEMとして表示されている。

【図4H】死因を、致死的GvHD(灰色)、腫瘍(黒色)または生存者(白色)を有する各治療群のマウスの割合として示す図である。生存曲線の比較(WT対csf2<sup>-/-</sup>)には、ログランク(マンテル・コックス)検定を使用し、 $* p < 0.05$ である。データは平均値+/-SEMとして表示されている。

【0020】

略語について、TCDはT細胞枯渇、BMは骨髄、HCTは造血細胞移植、WTは野生型、BLIは生物発光イメージング、ROIは関心領域を示す。

【0021】

図5A~5Dは、重度のGvHD患者では、腸管生検でGM-CSFが高レベルで発現することを示す図である。

【0022】

【図5A】異なるGvHDグレードを有する患者からの消化管生検におけるmRNAレベルでのGM-CSFの相対的な発現を示す図であり、表3を参照されたい。平均値の比較には、ボンフェローニ事後検定を用いた一元配置分散分析を使用し、 $** p < 0.01$ である。データは平均+/-SEMとして表示されている。

【図5B】allo-HCT患者の小腸からの対照およびGvHDグレードIV生検におけるGM-CSF標識を示す画像であり、表1および2を参照されたい。茶色は抗ヒトGM-CSF、青色はヘマトキシリンを示す。スケールバーは100μm(ズーム画像では20μm)である。3つの個々の対照と患者のサンプルの代表的な画像を示している。

【図5C】GvHD患者グレードIVからの消化管生検のCD3(ピンク)、CD68(緑)およびGM-CSF(赤)の免疫蛍光染色を示す図である。3つの個々の患者サンプルの代表的な写真を示す。核は、青色(DAPI)で描かれている(スケールバー上50μm、下20μm)。

【図5D】PMA/イオノマイシンで4時間刺激した健康なドナー(HD)およびGvHD患者(GP)から採取したPBMCのフローサイトメトリー解析を示す図である。サイトカインを発現するT細胞の代表的なFACS-Plotを示している。GM-CSF、IFN、およびIL-17産生CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞は、個体の頻度として示されており、 $n = 10-9$ /group  $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ である。

【0023】

略語について、TCDはT細胞枯渇、BMは骨髄、HCTは造血細胞移植を示す。

【0024】

図6A~6DはWTマウスおよびcsf2<sup>-/-</sup>マウスのT細胞集団の比較表現型分析を示す図である。

【0025】

10

20

30

40

50

【図6A】ナイーブC57BL/6 WTおよびCs f 2<sup>-/-</sup>マウスにおける脾臓のT細胞集団頻度のフローサイトメトリー分析を示す図である。データは、各n=3/グループの2つの個々の実験からプールされた。

【図6B】ナイーブC57BL/6 WTおよびCs f 2<sup>-/-</sup>マウスにおける脾臓の活性化マーカー発現頻度のフローサイトメトリー分析を示す図である。データは、各n=3/グループの2つの個々の実験からプールされた。

【図6C】C57BL/6 WTまたはCs f 2<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞と組み合わせたWT C57BL/6 TCD-BMで再構成した致死量の放射線を照射されたBALB/cマウスの、allo-HCT後2日目および5日目における、レシピエントリンパ節(LN)、脾臓、肝臓および皮膚におけるドナーT細胞浸潤のフローサイトメトリー解析を示す図である。細胞は、H2-DbおよびCD45にゲートし、CD4およびCD8 T細胞は、CD3に予めゲートした。n=4/グループでの実験を示す。データは、平均+/-SEMとして表示されている。

10

【図6D】C57BL/6 WTまたはCs f 2<sup>-/-</sup>マウスからの脾臓細胞とWT C57BL/6 TCD-BMとを組み合わせる再構成した致死量の放射線を照射されたBALB/cマウスの、allo-HCT後5日目のレシピエントLNおよび脾臓におけるドナーT細胞浸潤のフローサイトメトリー解析を示す図である。細胞は、H2-DbおよびCD45、CD4およびCD8 T細胞にゲートした。n=4/グループでの実験を示す。データは、平均+/-SEMとして表示されている。

【0026】

20

略語について、TCDはT細胞枯渇、BMは骨髄、HCTは造血細胞移植、WTは野生型を示す。

【0027】

図7Aおよび7Bはそれぞれ、C57BL/6 WTマウスまたはCs f 2<sup>-/-</sup>マウスの脾臓およびリンパ節から単離したA20腫瘍細胞およびT細胞を用いたキリングアッセイを示す。

【0028】

【図7A】TO-PRO3染色による死細胞のフローサイトメトリー解析、代表的なプロットを示す図である。

【図7B】T細胞がエフェクター比1:1、1:20および1:50を標的として表したA20腫瘍細胞の特異的な溶解を示す図である。データは、各グループにつきn=3のマウスを用いた2つの実験の代表である。データは、平均+/-SEMとして表示される。

30

【0029】

略語について、WTは野生型を示す。

【0030】

【図8A】致死量の放射線を照射されたC57BL/6 WTマウスまたはCs f 2<sup>-/-</sup>マウスの、WT Balb/c T細胞枯渇(TCD)-BM単独またはBalb/c WTマウスの脾臓細胞との組み合わせによるallo-HCT後の生存率を示す図である。データは、2つの個別の実験からプールされ、それぞれn=5-7/グループである。

【図8B】致死量の放射線を照射されたBalb/c WTマウスの、C57BL/6 WTまたはCs f 2<sup>-/-</sup> TCD-BM単独またはC57BL/6 WTマウスの脾臓細胞との組み合わせによるallo-HCT後の生存率を示す図である。データは、2つの個別の実験からプールされ、それぞれn=5-7/グループである。

40

【0031】

図9A~9Hは、GM-CSFが、ドナー由来のミエロイド細胞を介してGvHDを駆動する状態を示す図である。

【0032】

【図9A】致死量の放射線を照射したWT C57BL/6およびCs f 2<sup>-/-</sup>マウスの、WT Balb/c TCD-BM単独またはBalb/c WTマウスの脾臓細胞との組み合わせによるMHCミスマッチのallo-HCT後の生存率を示す図である。

50

データは、2つの個別の実験からプールされ、それぞれが $n = 5$  / グループである。

【図9B】致死量の放射線を照射されたB a l b / c W Tマウスにおいて、C 5 7 B L / 6 W TマウスまたはC s f 2 r b - / -マウスT C D - B M単独またはC 5 7 B L / 6 W Tマウスの脾臓細胞との組み合わせによるM H Cミスマッチのa l l o - H C T後の生存率を示す図である。データは、2つの個々の実験からプールされ、それぞれ $n = 5$  / グループである。生存曲線の比較(W T対C s f 2 r b - / -レシピエント / ドナー)には、aおよびbでログランク(マンテル・コックス)検定を使用し、\*\* $p < 0.01$ である。

【図9C】フローサイトメトリー解析によって分析された、G M - C S F刺激時にS T A T 5リン酸化(黒から黄色の勾配)を示すW T C 5 7 B L / 6およびC s f 2 r b - / -マウスの骨髓からランダムにサンプリングされた200,000個の細胞を表示する注釈付きのt - S N Eマップを示す図である。データは、2つの独立した実験 $n = 3$  / グループを示す。

【図9D】図9Bに重ねて示したW T C 5 7 B L / 6マウスおよびC s f 2 r b - / -マウスの単球および好中球におけるG M - C S F誘発性p S T A T 5上方制御の頻度を示す図である。

【図9E】H C T後の異なるミエロイド細胞集団(D C s、好中球、単球およびM D C)のフローサイトメトリー解析を示す図である。肝臓のゲーティング例が示されている。

【図9F】脾臓(上段)および肝臓(下段)におけるミエロイド細胞群の定量(図9Eより)を示す図である。3つの個々の実験から1つの代表を示し、 $n = 4 - 5$  / グループである。

【図9G】a l l o - H C T後6日目のマウスの脾臓からのH 2 D b +、C D 4 5 +群内のp r o - I L - 1  $\beta$ 好中球および単球の産生の頻度を示す図である。代表的なプロットは、好中球、単球およびM D C(eのようにゲートされている)のために示されている。データは、2つの独立した実験 $n = 5$  / グループを表す。

【図9H】a l l o - H C T後6日目のマウスにおけるR O S (C e l l R O X試薬)のフローサイトメトリー解析を示す図である。好中球、単球およびM D C(図9Eのようにゲートされた)のM F Iの代表的なヒストグラムを示している。データは、 $n = 5 - 7$  / グループで1つの実験を表している。平均値の比較のために対応のない2群についてのt検定がf - hで使用され、\*\*\* $p < 0.001$ 、\*\*\* $p < 0.01$ 、\* $p < 0.05$ である。データは平均+ / - S E Mとして表示されている。

#### 【0033】

略語について、T C DはT細胞枯渇、B Mは骨髓、H C Tは造血細胞移植、W Tは野生型を示す。

#### 【0034】

記述されたシーケンスの簡単な説明

本明細書で提供される核酸配列は、37 C . F . F . R . 1 . 8 2 2に定義されるヌクレオチド塩基の標準的な文字略語を用いて示されている。各核酸配列の一本の鎖のみが示されているが、相補的な鎖は、示された鎖への任意の参照により含まれるものとして理解されたい。配列表は、「S e q p r o t o c o l u z 3 4 9 w o \_ S T 2 5 . t x t」という名称の約2 K BのA S C I Iテキストファイルとして提出され、参照により本明細書に組み込まれるものとする。S E Q I D N o . 1およびN o . 2はC S F 2遺伝子のフォワードおよびリバースP C R増幅プライマーである。S E Q I D N o . 3およびN o . 4は、G A P D H遺伝子のフォワードおよびリバースP C R増幅プライマーである。

【発明を実施するための形態】

#### 【0035】

用語と定義

本明細書の文脈での用語G v H Dは、遺伝的に異なる患者への免疫細胞の移植から生じる合併症である移植片対宿主病に関する。G v H Dは一般的に幹細胞移植、特に血液悪性腫瘍の治療の状況で発生するが、他の移植の状況で発生することがある。本明細書の文脈での用語a l l o - H C Tは、同種造血細胞移植に関連する。本明細書の文脈での用語G

10

20

30

40

50

M-C S Fは、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (Uniprot P04141、CAS No. 83869-56-1) に関する。本明細書の文脈での用語CD116は、GM-C S F受容体の $\alpha$ 鎖としても知られているCluster of Differentiation 116に関する (Uniprot P15509)。GM-C S F受容体は、IL-3 RやIL-5 Rのインターロイキン受容体にも存在するGM-C S F特異的 $\alpha$ 鎖 (CD116) と $\beta$ 鎖 (CD131) から構成されている。本発明のGM-C S FのリガンドまたはCD116、CD131およびCD131を含むGM-C S F受容体のいずれかは、GM-C S Fがその受容体に結合したときに開始される信号伝達を阻害するか、または中和することができる。本明細書の文脈での用語C L Lは、急性慢性リンパ球性白血病またはリンパ芽球性白血病に関する。本明細書の文脈における用語A L Lは、急性リンパ芽球性白血病に関する。本明細書の文脈における用語C M Lは、慢性骨髄性白血病または骨髄性白血病に関連する。本明細書の文脈における用語A M Lという用語は、急性骨髄性白血病に関連する。本明細書の文脈における用語A M o Lは、急性単球性白血病に関する。

#### 【0036】

本明細書の文脈での抗体という用語は、細胞生物学および免疫学の分野で公知の意味で使用され、それは、免疫グロブリンタイプG (I g G)、タイプA (I g A)、タイプD (I g D)、タイプE (I g E) またはタイプM (I g M) を含むがこれらに限定されない全抗体、任意の抗原結合フラグメントまたはその一本鎖および関連するまたは派生した構成を指す。全抗体とは、少なくとも2本の重鎖 (H) と2本の軽鎖 (L) がジスルフィド結合で相互に連結された糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域 ( $V_H$ ) と重鎖定数領域 ( $C_H$ ) とで構成されている。重鎖定数領域は、 $C_H1$ 、 $C_H2$  および  $C_H3$  の3つのドメインで構成されている。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (以下、 $V_L$  と略記) と軽鎖定数領域 ( $C_L$ ) とを含んでいる。軽鎖定数領域は、1のドメイン  $C_L$  で構成されている。重鎖および軽鎖の可変領域には、抗原と相互作用する結合ドメインが含まれている。抗体の定数領域は、免疫系の様々な細胞 (例えば、エフェクター細胞) および古典的補体システムの第1の構成要素を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介してもよい。同様に、この用語は、いわゆるナノボディまたはシングルドメイン抗体、すなわち単一の単量体可変抗体ドメインを含む抗体断片を包含する。

#### 【0037】

抗体という用語は、ラクダ抗体、特にヒト化ラクダ抗体を包含する。本明細書の文脈における用語「抗体様分子」は、高い親和性を有する他の分子または標的に特異的に結合することが可能な分子  $/aKd \leq 10E^{-8} mol/L$  を指す。抗体様分子は、抗体の特異的結合と同様に標的に結合する。抗体様分子という用語は、設計されたアンキリンリピートタンパク質 (モレキュラーパートナーズ、チューリッヒ)、高度に特異的で高親和性の標的タンパク質結合を示す人工抗体擬態タンパク質などのリピートタンパク質を包含する (米国特許第2012/142611号明細書、米国特許第2016/250341号明細書、米国特許第2016/075767号明細書および米国特許第2015/368302号明細書を参照されたい。これらのすべては引用を以って本明細書の一部となす)。抗体様分子という用語は、アルマジロリピートタンパク質に由来するポリペプチド、ロイシンリッチリピートタンパク質に由来するポリペプチド、およびテトラトリコペプチドリピー

10

20

30

40

50

ツ型プロテアーゼ阻害剤のクニッツドメインに由来するポリペプチド、および炭水化物結合モジュール32-2に由来するポリペプチドを包含する。

#### 【0038】

タンパク質Aドメイン由来ポリペプチドという用語は、タンパク質Aの誘導体であり、免疫グロブリンのFc領域およびFab領域に特異的に結合することができる分子を指す。アルマジロリピートタンパク質という用語は、少なくとも1つのアルマジロリピートを含むポリペプチドを指し、アルマジロリピートは、ヘアピン構造を形成する1対のαヘリックスを特徴とする。

#### 【0039】

本明細書の文脈でヒト化抗体という用語は、細胞生物学および生化学の分野で公知のその意味で使用され、それは、本来非ヒト種の免疫細胞によって産生された抗体を指し、そのタンパク質配列は、ヒトにおいて自然に産生される抗体バリエーションとの類似性を高めるように改変されている。本明細書の文脈における用語「ヒト化ラクダ抗体」とは、重鎖または重鎖の可変ドメイン（VHHドメイン）のみを含む抗体であって、そのアミノ酸配列が、ヒトにおいて天然に産生される抗体との類似性を高めるように改変されている抗体を指す。したがって、ヒトに投与すると、免疫原性の低下を示す。ラクダ抗体をヒト化するための一般的な戦略は、2009年1月30日発行、J Biol Chemの284(5)、3273-3284に掲載されたVinckeらの「General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold」および米国特許第2011/165621A1号明細書に記載されている。

#### 【0040】

本明細書の文脈では、キメラ抗体という用語は、細胞生物学および免疫学の分野で公知の意味で使用され、抗原結合部位（可変領域）が、異なるまたは変更されたクラス、エフェクター機能および／または種、またはキメラ抗体に新たな特性を付与する全く異なる分子、例えば、酵素、サイトカイン、毒素、ホルモン、成長因子、薬物などのような定数領域またはその一部が変更、置換または交換された抗体分子を指す。例えば、抗体は、その定数領域をサイトカインに置き換えることで修飾することができる。分子の機能（一部）を持ちながら、抗原を認識する特異性を保持することができる。

#### 【0041】

本明細書の文脈で用語解離定数（ $K_D$ ）は、化学および物理学の分野で公知の意味で使用される。それは、複合体がその構成分子に分解されるときのように、より大きな物体がより小さな成分に可逆的に解離する傾向を測定する平衡定数を指す。 $K_D$ はモル単位[M]で表され、[Ag]の結合部位が半分を占める[Ab]の濃度に対応している。換言すれば、未結合の[Ab]の濃度は[AbAg]複合体の濃度に等しい。解離定数は、次の式に従って計算することができる。

$$K_D = \frac{[Ab] * [Ag]}{[AbAg]}$$

[Ab] = 抗体の濃度、[Ag] = 抗原の濃度、[AbAg] = 抗体抗原複合体の濃度

#### 【0042】

本明細書の文脈では、オフレート（ $K_{off}$ 、[1/sec]）およびオンレート（ $K_{on}$ 、[1/sec \* M]）という用語は、化学および物理学の分野で公知の意味で使用され、それらは、標的抗原と抗体との解離（ $K_{off}$ ）または結合（ $K_{on}$ ）を測定する速度定数を指す。 $K_{off}$ および $K_{on}$ は、当技術分野で確立された方法を用いて実験的に決定することができる。抗体の $K_{off}$ と $K_{on}$ を決定する方法は、表面プラズモン共鳴を利用している。これは、Biacore（登録商標）やProtein（登録商標）シ

システムなどのバイオセンサーシステムの原理である。また、以下の式を使用して解離定数  $K_D$  を決定することもできる。

$$K_D = \frac{[K_{\text{off}}]}{[K_{\text{on}}]}$$

#### 【0043】

本明細書で使用される任意の疾患または障害（例えば、がんまたは移植片対宿主疾患）の「(treating) 治療する」または「(treatment) 治療」という用語は、一実施形態では、疾患または障害を改善すること（例えば、疾患またはその臨床症状の少なくとも1つの発症を遅らせるか、または停止させるか、または減少させること）を指す。

10

#### 【0044】

別の実施形態では、「治療する」または「治療」は、患者が識別できないかもしれないものを含む少なくとも1つの物理的パラメータを緩和または改善することを指す。

#### 【0045】

さらに別の実施形態において、「治療する」または「治療」は、物理的に、（例えば、識別可能な症状の安定化）、生理学的に、（例えば、物理的パラメータの安定化）、またはその両方のいずれかで、疾患または障害を調節することを指す。疾患の治療および／または予防を評価するための方法は、本明細書に具体的に記載されていない限り、当技術分野で一般的に知られている。

20

#### 【0046】

本明細書の文脈で用語アプタマーは、 $K_d \leq 10^{-8} \text{ mol/L}$  を有する高親和性で他の分子または標的に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドまたはペプチドを指す。アプタマーは、抗体の特異的結合と同様に、その標的に結合する。アプタマーという用語は、RNAまたはDNA分子、核酸類似体またはペプチド分子を包含する。アプタマーはまた、自己切断型RNA分子、いわゆるリボザイムに結合することもある。アプタマーのデノボを得るための方法が知られているが、これには、いわゆる「select」アプローチや、ランダムな選択から特定の結合剤を進化させることに基づく他の方法が含まれる。

30

#### 【0047】

本発明者らは、完全および部分的にMHCミスマッチのHCTのマウスモデルを用いて、GM-CSF (Csf-2) が、炎症性疾患の範囲にわたって新たな役割を持つサイトカインであり、移植後早期にドナーT細胞によって豊富に産生されることを示した。ドナーT細胞がGM-CSFを欠くと、GVHDは大幅に改善された。重要かつ驚くべきことに、GM-CSFの不存在は、マウスにおける腫瘍増殖を制御するドナーT細胞の能力 (GVLE効果) に影響を与えず、この制御は、完全なMHCミスマッチの文脈においてもGVHDの出現なしに達成された。本発明者らはまた、GVHD患者からの消化管生検において高レベルのGM-CSFを発見したが、これは、ヒトの状態における平行した役割と一致する。したがって、本発明者らは、GM-CSFを、allo-HCTを受けている患者がGVLEを維持しながらGVHDを減衰させるための新規の治療標的として提案する。

40

#### 【0048】

抗GMCSF抗体または抗GMCSFR抗体の使用は、GVHDの文脈で提案されてきたが、ここに提示されたデータは、GVHDが、全原性移植の治療上の利益に影響を与えることなく、治療または抑制することができることを初めて示し、GVHD (貪食球媒介) を抑制しながら、体が移植片対白血病応答をマウントすることを可能にするために、本発明のリガンドを採用する臨床的根拠があることを示している。これにより、GVHDのリスクのために現在はallo-HCTを予定していない患者をallo-HCTに含めることが可能になり、allo-HCT後の免疫抑制剤の使用をさらに制限することが可

50

能になる可能性がある。

【0049】

本発明の第1の態様は、GM-CSFに特異的に結合する非アゴニストリガンド、またはCD116、CD131、もしくはCD116およびCD131を含むGM-CSF受容体のいずれかに特異的に結合する非アゴニストリガンドであって、同種造血幹細胞移植（allo-HCT）を受けた患者における白血病の治療に使用するためのものに関する。すなわち、このリガンドは、同種造血幹細胞移植後の白血病の治療に用いられる。本発明の非アゴニストリガンドは、GM-CSFによってその受容体上に発現する生物学的信号を抑止し、GM-CSFの相互作用の下流効果をもたらす。従って、本明細書に記載された方法は、GvHDが起こり得る任意の同種移植の文脈において、GvHDの重症度を阻害または減少させるために使用されてもよいが、同種移植の有益な効果を著しく減少させることなく使用され得ることが理解されるであろう。

10

【0050】

特定の実施形態において、本明細書に記載される方法は、白血病、リンパ腫、または多発性骨髄腫を含む血液悪性腫瘍を治療するための方法であって、悪性腫瘍に対するallo-HCT治療の提供と同時に、またはそれに続いて、記載された非アゴニストリガンドを患者に投与することにより治療する方法である。

【0051】

他の実施形態では、GvHDの重症度を阻害または低減するための方法は、GM-CSF産生または誘導細胞を十分に産生することによってGvHDを誘導する危険性が存在する同種間移植を、全同種と共に提供することを可能にする。肝臓移植は、そのような移植の非限定的な一例である。

20

【0052】

特定の実施形態において、非アゴニスト抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131または抗GM-CSFレセプターリガンドは、抗体、抗体フラグメント、抗体様分子、アプタマーまたはタンパク質Aドメイン由来のポリペプチドである。抗体、特にモノクローナル抗体の使用は、ヒト患者における治療のために一般的であり、実際、GM-CSF特異的抗体およびCD116特異的抗体は、他の治療目的のために開発されてきたが、当業者は、DARPINs、アプタマー、または抗体由来分子のような他のモダリティが、本質的に同じ目的を果たすために使用されることがあると理解している。

30

【0053】

いくつかの実施形態では、非アゴニスト抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131または抗GM-CSF受容体ポリペプチドリガンドは、2本の重鎖および2本の軽鎖を含む免疫グロブリンである。

【0054】

いくつかの実施形態では、非アゴニスト抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131または抗GM-CSF受容体ポリペプチドリガンドは、重鎖または軽鎖から単離された可変ドメインを含む単一ドメイン抗体である。

【0055】

いくつかの実施形態では、非アゴニスト抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131または抗GM-CSF受容体ポリペプチドリガンドは、ラクダ類に見られる抗体のような重鎖のみを含む重鎖抗体である。

40

【0056】

特定の実施形態では、非アゴニスト抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131または抗GM-CSF受容体ポリペプチドリガンドは、抗体フラグメントである。

【0057】

特定の実施形態では、非アゴニスト抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131または抗GM-CSF受容体ポリペプチドリガンドは、特定の実施形態では、非アゴニスト抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131または抗GM-CSFレセプターポリペプチドリガンドは、Fabフラグメント、すなわち抗体の抗原結合フラグメント、または一本

50

鎖可変フラグメント、すなわちペプチドリinkerによって連結された抗体の重鎖および軽鎖の可変領域の融合タンパク質である。

【0058】

a l l o-H C T後の白血病治療のマウスモデルにおける、G M-C S Fに対する抗体を用いた治療の効果を図4に示す。

【0059】

特定の実施形態では、リガンドはモノクローナル抗体であり、特定の実施形態では、リガンドはヒト抗体である。

【0060】

特定の実施形態では、白血病などの血液悪性腫瘍を治療する方法で使用するためのリガンドは、同種造血幹細胞移植(a l l o-H C T)を受けた患者におけるヒト化抗体である。特定の実施形態では、リガンドはキメラ抗体である。

【0061】

特定の実施形態では、a l l o-H C Tを受けた患者における白血病などの血液悪性腫瘍の治療方法で使用するためのリガンドは、マヴリリムマブ(C A S N o . 1 0 8 5 3 3 7-5 7-0)である。特定の実施形態では、a l l o-H C Tを受けた患者における白血病などの血液悪性腫瘍の治療方法で使用するためのリガンドは、ナミルマブ(C A S N o . 1 2 0 6 6 8 1-3 9-1)である。特定の実施形態では、a l l o-H C Tを受けた患者の白血病などの血液悪性腫瘍を治療する方法で使用するためのリガンドは、レンジルマブ(C A S N o . 1 2 2 9 5 7 5-0 9-0)である。特定の実施形態では、a l l o-H C Tを受けた患者における白血病などの血液悪性腫瘍の治療方法における使用のためのリガンドは、オチリマブ(M O R 1 0 3またはG S K-3 1 9 6 1 6 5、C A S N o . 1 6 3 8 3 3 2-5 5-4)である。特定の実施形態では、a l l o-H C Tを受けた患者における白血病などの血液悪性腫瘍の治療方法で使用するためのリガンドは、ギムシルマブ(M O R A b-0 2 2、C A S N o . 1 6 4 8 7 9 6-2 9-5)である。

【0062】

特定の実施形態では、マヴリリムマブ、ナミルマブ、レンジルマブ、オチリマブ、またはギムシルマブのような抗体が、G v H Dの発生を阻害するか、またはその重症度を減少させる、同種移植を提供するための方法において使用され得ることが理解されるであろう。

【0063】

特定の実施形態では、a l l o-H C Tを受けた患者における白血病の治療方法において使用するためのリガンドは、 $10^{-7} \text{mol L}^{-1}$ よりも小さい $K_D$ 、特に $K_D < 10^{-8} \text{mol L}^{-1}$ 、より具体的には $K_D < 10^{-9} \text{mol L}^{-1}$ であることを特徴とする。

【0064】

本発明の第2の側面は、a l l o-H C Tを受けた患者の白血病を治療するための、本発明の第1の側面またはその特定の実施形態のいずれかに記載のリガンドをエンコードする核酸分子に関する。

【0065】

特定の実施形態では、a l l o-H C Tを受けた患者の白血病などの血液悪性腫瘍の治療に使用するための核酸分子は、一本鎖もしくは二本鎖のDNA分子、または一本鎖もしくは二本鎖のRNA分子である。

【0066】

特定の実施形態において、本発明に従ってa l l o-H C Tを受けた患者の白血病または他の悪性腫瘍の治療に使用するための核酸分子は、哺乳動物細胞において作動可能なプロモーターの制御の下で、上記で規定された核酸配列からなる核酸発現構築物である。

【0067】

特定の実施形態では、a l l o-H C Tを受けた患者における白血病などの血液悪性腫瘍の治療に使用するための核酸分子は、DNAプラスミド、二本鎖リニアDNA、一本鎖RNA、およびウイルスであって、特にレンチウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルスから選択される発現構築物である。核酸発現構築物は、

10

20

30

40

50

特定の遺伝子を標的細胞に導入するために使用され、遺伝子によってエンコードされるタンパク質を産生するために、細胞のタンパク質合成機構を指揮することができる。核酸発現構築物は、プロモーター領域として作用する調節配列、および任意にエンハンサー領域として作用する配列を含み、発現構築物上に担持された遺伝子の効率的な転写を導くように設計されている。

【0068】

記載された方法で使用するための核酸発現ベクターは、当技術分野で一般的である。哺乳類タンパク質の発現のための例示的なベクターは、特に、Promega Corp (マディソン、ウィスコンシン州) および Thermo Fisher Scientific, Inc. (ウォルサム、マサチューセッツ州) から入手可能なものが含まれる。

10

【0069】

別の実施形態では、非アゴニストリガンドを投与する代わりに、GM-CSF、GM-CSFの受容体(CD116およびCD131)、またはGM-CSF受容体の個々のサブユニット(CD116および/またはCD131)の発現を阻害することを含む治療方法を記載している。そのような方法では、GM-CSFまたはその受容体ペプチドの発現を阻害することが可能な核酸が、それを必要とする患者に提供される(例えば、allo-HCTの後に、またはallo-HCTの間に)。特定の実施形態では、ターゲティング核酸は、アンチセンスDNA、siRNA、またはそのようなものであってよい。適切な標的およびターゲティング配列を決定する方法は、当技術分野で公知である。

【0070】

20

本発明の上記の他の側面では、allo-HCTを受けた患者における白血病などの血液悪性腫瘍の治療に使用するための医薬組成物に関する。組成物は、GM-CSFに特異的に結合する非アゴニストリガンド、またはCD116、CD131もしくはCD116とCD131とを含むGM-CSF受容体のいずれか、またはそれをエンコードする核酸発現構築物と、薬学的に許容される担体であって、特に非経口投与用の投与形態、特に静脈内投与用の投与形態として製剤化された担体とから構成される。GM-CSFに対する抗体、およびCD116、CD131、もしくはCD116とCD131とを含むGM-CSF受容体のいずれかに対する抗体が当技術分野で公知である。

【0071】

GM-CSFに特異的なモノクローナル抗体が開発され、関節リウマチの有効性について臨床試験が行われている。本発明を実施するための抗体の非限定的な例としては、Cohenらの米国特許第2014/079708号明細書、米国特許第2012/141464号明細書、米国特許第2009/130093号明細書、米国特許第2014/079708号明細書および米国特許第2015/376285号明細書にすべて開示されているCD116/131抗体が含まれ(マヴリリムマブ)、引用を以って本明細書の一部となす。

30

【0072】

他の非限定的な例は、Haertleらの米国特許第2015/246969号明細書に開示されたGM-CSF抗体(オチリマブ)、およびKirchnerらの米国特許第2011/189082号明細書および米国特許第2013/071923号明細書の抗体であり、これらはすべて引用を以って本明細書の一部となす。

40

【0073】

他の非限定的な例は、Steidlらの米国特許第2009/053213号明細書、米国特許第2011/045000号明細書、米国特許第2017/218061号明細書に開示されたGM-CSF抗体であり、これらはすべて引用を以って本明細書の一部となす。

【0074】

また、GM-CSFに対する抗体は、武田薬品が関節リウマチに使用するために「Namilumab」の名称で開発を進めている。

【0075】

50

GM-CSFに対するもう一つの抗体は、慢性骨髄球性白血病（CMML）の前治療歴のある患者を対象に、レンジルマブ（CAS No. 1229575-09-0）の名称で臨床試験が行われている。

【0076】

同様に、本発明の範囲内では、allo-HCTを受けた患者において白血病などの血液悪性腫瘍を治療する方法であって、非アゴニストリガンド、特に抗体、GM-CSF、またはCD116、CD131もしくはCD116とCD131とを含むGM-CSF受容体のいずれかに特異的に結合する抗体を患者に投与するステップを含む方法が、上記の記載にしたがって提供される。

【0077】

同様に、本発明の上記の側面のいずれかに従ったリガンドまたは核酸構築物を含む、allo-HCTを受けた患者における白血病の予防または治療のための剤形が提供される。剤形は、経腸投与用のものであれば、例えば、経鼻投与用、頬側投与用、直腸投与用、経皮投与用、経口投与用、吸入投与用、坐剤投与用などがある。あるいは、皮下、静脈内、肝内、または筋肉内注射の形態などの非経口投与が使用されてもよい。必要に応じて、薬学的に許容される担体および／または賦形剤が存在してもよい。

【0078】

本明細書で「実施形態」として単一の分離可能な特徴の代替案が示される場合は常に、そのような代替案を自由に組み合わせて、本明細書で開示される本発明の個別の実施形態を形成できることを理解されたい。

【0079】

本発明は、以下の項目によって例示的にさらに説明される。

項目1：特異的に結合し、中和することができる非アゴニストリガンドの生理機能であって、GvHDの治療に使用するためのもの。

— GM-CSFまたは

— CD116、CD131、およびCD116とCD131とを含むGM-CSF受容体の1つ

項目2：項目1に記載のGvHDの治療に使用するためのリガンドであって、抗体、抗体フラグメント、アプタマーまたは抗体様分子であるリガンド。

項目3：リガンドがヒト抗体またはヒト化抗体である、GvHDの治療に使用するための項目1または2に記載のリガンド。

項目4：マヴリリムマブ、ナミルマブ、レンジルマブ、MOR103およびMORab-022から選択される、GvHDの治療に使用するための前記項目のいずれか1項に記載のリガンド。

項目5：GvHDの治療に使用するための前記項目のいずれか1つに従うリガンドであって、前記リガンドのGM-CSF、またはCD116、CD131もしくはCD116とCD131とを含むGM-CSF受容体のいずれかへの結合が、10<sup>-7</sup>よりも小さいKD、特にKD<10<sup>-8</sup>、より詳細にはKD<10<sup>-9</sup>であることを特徴とする、GvHDの治療に使用するための前記項目のいずれか1項に記載のリガンド。

項目6：GvHDの治療に使用するための、上記の項目1～4のいずれか1項に記載のリガンドをエンコードする核酸分子。

項目7：項目6に記載のGvHDの治療に使用するための核酸分子であって、DNA分子またはRNA分子である核酸分子。

項目8：項目5または7に記載のGvHDの治療に使用するための、核酸配列を含む核酸発現構築物。

項目9：項目8に記載のGvHDの治療に使用するための核酸発現構築物であって、DNAプラスミド、二本鎖リニアDNA、一本鎖RNA、およびウイルス、特にレンチウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルスから選択される核酸発現構築物。

項目10：allo-HCTの結果として生じる合併症の治療に使用するための、前記

10

20

30

40

50

項目1～5のいずれか1項に記載のリガンド、または項目6もしくは7に記載の核酸分子、または項目8もしくは9に記載の核酸発現構築物。

項目11：前記項目1～5のいずれか1項に記載のリガンド、または前記項目6もしくは7に記載の核酸分子、または前記項目8もしくは9に記載の核酸発現構築物であって、血液悪性腫瘍に罹患しているか、または回復している患者のa l l o - H C Tの結果として生じる合併症の治療に使用するためのものであり、前記血液悪性腫瘍は、

－特に白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫から選択される血液悪性腫瘍、

－より具体的には、慢性骨髄性白血病（CML）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）および急性単球性白血病（AMoL）から選択される血液悪性腫瘍であって、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫である。

【0080】

本発明は、以下の実施例および図によってさらに例示され、そこからさらなる実施形態および利益を引き出すことができる。これらの実施例は、本発明を例示することを意図しているが、その範囲を限定するものではない。

【0081】

例

材料と方法

研究デザイン

この研究は、ある種のT細胞由来のサイトカインがG v H DとG v Lを分離できるかどうかを判断するために開始されたもので、血液悪性腫瘍の治療における有望な新規治療標的となる可能性がある。この目的を達成するために、G v H Dの実験モデルであるG v Lの実験モデルとヒトの実験モデルの2種類を用いた。すべての動物実験は、地方自治体（スイス・カントーナル獣医局）の承認を受け、適切な実験ライセンス（76／2012および052／2015）に基づいて実施された。動物を無作為に実験グループに割り当て、生存期間の臨床スコアを盲検法で実施したほか、臓器切片の画像分析処理を行った。サンプルサイズと疾患の終了時点は、先行研究に基づいて選択した。フローサイトメトリー、病理組織学的分析、混合リンパ球反応（MLR）、キリングアッセイ、サイトカイン分析を行い、G v H D／G v L標的臓器の特徴を明らかにした。特異的なGM－CSFブロッッキング抗体の臨床スコアに対する効果を、治療の盲検化を行った治験責任医師が評価した。信頼できる統計分析を行うために、図の凡例で特に示されていない限り、原稿に示されている各データに対して少なくとも3つの独立した実験が行われた。すべてのヒトサンプルは、書面によるインフォームドコンセントに基づき、ドイツのアルベルト・ルートヴィヒ大学フライブルク校倫理委員会（プロトコル番号：267／11）の承認を得た後に採取した。腸生検では免疫組織化学と定量的RT－PCRを、PBMCではマルチパラメーターフローサイトメトリーを行った。

【0082】

マウスおよび生体内操作

マウスは、特定の病原体のない条件で、個別に換気されたケージで飼育された。WT C57BL／6、BALB／cおよびB6D2F1マウスは、フランスのJanvier Laboratoriesから購入した。先天性C57BL／6 CD45.1マウスを社内で飼育した。Ifng<sup>－／－</sup>マウスはJackson Laboratoriesから入手し、Csf2<sup>－／－</sup>マウスはJeffrey Whitsettから提供され、さらにスピードコンジェニック法を用いてC57BL／6に逆交配した。II17a<sup>－／－</sup>マウスはY. Iwakuraより提供された。すべての動物実験は、地方自治体（スイス、カントーナル獣医局）の認可を受け、適切な実験ライセンス（76／2012および052／2015）に基づいて実施された。実験には7～12週齢の雌マウスを使用した。

【0083】

G v H Dの誘導：ドナーC57BL／6マウスまたはBALB／cマウスの脾臓およびBMからの単細胞懸濁液を以下のように調製した（「リンパ球の単離」の項参照）。BM

のT細胞枯渇のために、細胞を $25 \times 10^6$  / mLで完全なRMP I (RPM I 1640、10%のFCS、1%のペニシリン／ストレプトマイシン、2mMのL-グルタミンおよび0.5mMのβ-メルカプトエタノールを含む) 中で、αCD90.2-ビオチン(1:100、eBioscience)を添加して、攪拌しながら4℃で30分間インキュベートした。その後、冷たいMACS緩衝液(0.5%のBSAおよび2mMのEDTAを含むPBS)で洗浄するステップの後、細胞をMACS緩衝液中で $100 \times 10^6$  cells / mLで再懸濁し、抗ビオチンビーズ(1:5、Miltenyi)またはストレプトアビジンビーズ(1:10、Miltenyi)で攪拌しながら4℃で20分間インキュベートした。MACS緩衝液で洗浄した後、Miltenyi Biotech社のAutoMACS Proで、「depletes」プログラムを用いて細胞を分離した。陰性画分を収集し、血算盤を用いて細胞数を測定した。枯渇効率はフローサイトメトリーで分析した。BM中のT細胞頻度は1~3%から $0.055 \pm 0.022\%$ に減少した。脾臓細胞から非標識T細胞を分離するために、製造者のプロトコルに従って、Miltenyi社のPan T細胞分離キット(II)を使用した。Miltenyi Biotech社のAutoMACS Proで、「depletes」プログラムを用いて細胞を分離した。陰性画分を収集し、血算盤を用いて細胞数を測定した。濃縮効率はフローサイトメトリーで分析し、T細胞純度は通常  $95.2 \pm 2.16\%$ であった。CD4およびCD8 T細胞は、メーカーの指示(Biolegend社)に従って、MojoSort Mouse CD4 T細胞単離キットおよびMojoSort Mouse CD8 T細胞単離キットを用いて分離した。

【0084】

レシピエントBALB/cマウスまたはB6D2F1マウスを、フィルターケージ内の特定の病原体のない条件下で、850 (BALB/c)、1200 (B6D2F1) または1100 (C57BL/6) radの分割線量で致死的に照射し、少なくとも5時間の間隔を置いた。レシピエントには、C57BL/6またはB6D2F1マウス1匹あたり、BM細胞 $5 \times 10^6$ 個、脾臓細胞 $0.1 \times 10^6$ 個、またはT細胞 $6-7.5 \times 10^6$ 個を静脈注射した。レシピエントに、 $7 \times 10^6$ 個のBM細胞と $20 \times 10^6$ 個の脾臓細胞/BALB/cマウスをi.v.注射したマウスには、細菌感染を防ぐために、飲料水に0.1%のBorgal (Intervet)を3週間投与した。マウスはまた、(Cooke, K. R. 他「An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin.」Blood 88, 3230-3239 (1996)) および補足表4に示されているものから適応するGvHD症状のために毎日スコアされた。研究者はGvHDをスコアリングする際、グループの割り付けを盲検化した。基準体重は0日目、移植細胞注入前に測定した。GM-CSFのブロッキングのために、マウスをPBS、 $300 \mu\text{g}$ アイソタイプコントロール(2A3)または $300 \mu\text{g}$ 抗GM-CSF抗体(MP1) (BioXCell)でHCTの2日前から3回/週に分けて処理した。

【0085】

GvLの誘導: A20-ルシフェラーゼ+GFP+B細胞リンパ腫細胞株(A20-luc-gfp、Emma Svensson、免疫学、遺伝学および病理学部門、スウェーデン、ウプサラ大学より提供)は、A20(ATCC)をCMV-GFP-(T2A)-Lucをエンコードするレンチウイルスで導入することにより、BALB/cバックグラウンドで生成された。WEHI-3-ルシフェラーゼ+細胞は、R. Zeiserによって提供された。HCT当日、マウス1匹あたり $2.5 \times 10^5$ 個のA20細胞、 $5 \times 10^5$ 個のA20細胞、または $1 \times 10^5$ 個のWEHI-3細胞と、 $5 \times 10^6$  WT C57BL/6 BM細胞と、WTマウスもしくはCs f2- C57BL/6マウスのいずれかからの $1 \times 10^5$ 精製脾臓T細胞/マウスを単独で、または一緒に静脈内注射した。HCT当日、マウス1匹あたり $2.5 \times 10^5$ 個のA20細胞と、 $5 \times 10^6$  WT C

57BL/6 BM細胞と、WTもしくはCs f 2-/- C57BL/6マウスのいずれかからの $1 \times 10^5$ 精製脾臓T細胞/マウスを単独または一緒に静脈内注射した。腫瘍の進行は、生物発光イメージング (BLI) によって監視した。Xenogen IVIS 200 preclinical in vivo イメージングシステム (PerkinElmer 社、ウォルサム、マサチューセッツ州) を使用してイメージングする10分前にPBSでD-ルシフェリン (プロメガ) の $150 \text{ mg/kg}$ をマウスの腹腔内に注入した。露光時間1~120秒、ピニング2~8、視野15cm、絞り値1、フィルタなしである。

【0086】

マウスは、イメージングの前と中にイソフルラン (2%は $\text{O}_2$ で気化) で麻酔をかけた。全光子束 (光子/秒) は、リビングイメージソフトウェア (PerkinElmer 社) を使用して、全身にわたって固定された関心領域 (ROI) から測定した。写真は常に各ケージで撮影され、マウスの異なるグループが同じケージ内で混合されたときにはトリミングされている。腫瘍とGvHDの死亡率は、BLI信号強度 (腫瘍の発生率については $\text{ROI} > 1 \times 10^7$ )、後肢麻痺 (腫瘍の発生を示す) およびGvHDの臨床症状 (個々のGvHD基準のうち2つで少なくともグレード2) によって区別された。GM-CSFをブロックするために、マウスをHCTの2日前から $300 \mu\text{g}$ のアイソタイプコントロール (2A3) または $300 \mu\text{g}$ の抗GM-CSF抗体 (MP1) (BioXCell) で週3回処理した。3週目からは抗体の投与量を $150 \mu\text{g}$ に減少させた。

【0087】

リンパ球の分離

$\text{CO}_2$ 吸入を用いてマウスを安楽死させ、 $40 \text{ mL}$ の低温PBSで灌流した。以下で特に指定しない限り、臓器を採取し、小片に切断し、 $37^\circ\text{C}$ でコラゲナーゼを用いてインキュベートし、次いで20ゲージ針を介して繰り返し通過させることにより機械的に破壊した。赤血球溶解を行い、得られた細胞懸濁液は、次いで、 $70 \mu\text{m}$ の細胞ストレーナーで濾過し、さらなる手順に使用した。

【0088】

脾臓：骨ミエロイド細胞の単離のために、臓器片を $2 \text{ mL}$ のコラゲナーゼD ( $0.4 \text{ mg/mL}$ 、Roche 社) および $0.1 \text{ mg/mL}$ のDNase I (Sigma 社) のRPMI中において $37^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした。T細胞の単離のために、脾臓を機械的破壊によってホモジナイズし、 $70 \mu\text{m}$ のセルストレーナーを介してろ過した。

【0089】

BM：大腿骨、脛骨、骨盤をPBSフラッシングし、BM幹細胞を得た。

【0090】

肝臓：臓器片を、10%のFCSを含むHBSS中の $1.6 \text{ mg/mL}$ のコラゲナーゼタイプIV (クロストリジウム ヒストリチウム、Sigma 社) 中において $37^\circ\text{C}$ で約45分間インキュベートした。細胞を $10 \text{ mL}$ のPercoll (連続勾配、27%、GE) に再懸濁し、 $\text{RT } 1700 \text{ rpm}$ で30分間遠心分離した。脂肪および上清を除去し、ペレットを赤血球溶解にかけた。

【0091】

皮膚：臓器片を、 $1 \text{ mg/mL}$ のコラゲナーゼタイプIV (クロストリジウム ヒストリチウム、Sigma 社) および $0.1 \text{ mg/mL}$ のDNase I (Sigma 社) をRPMIにおいて $37^\circ\text{C}$ で1.5~2時間インキュベートした。

【0092】

小腸：器官について、管腔粘液を機械的に除去する前に腸間膜脂肪から分離した。そして、器官を、2%のFCS、 $1 \text{ mM}$ のDTTおよび $1.35 \text{ mM}$ のEDTAを含むカルシウムおよびマグネシウムを含まないHBSS中において $37^\circ\text{C}$ で15分間インキュベートした。EDTAを補ったHBSSにおいて $37^\circ\text{C}$ で30分間さらにインキュベーションした後、大腸を切断し、 $37^\circ\text{C}$ で45分間、 $0.4 \text{ mg/mL}$ のコラゲナーゼIV (Sigma Aldrich 社) を使用して消化した。サンプルは、その後、18ゲージ針とシリンジを使用してホモジナイズし、 $70 \mu\text{m}$ の細胞ストレーナーを介してろ過した。

## 【0093】

## フローサイトメトリー

フローサイトメトリー分析を、(Perfetto, S. P. P., Chattopadhyay, P. K. および Roederer, M. の「Seventeen-color flow cytometry, unravelling immune system」Nat Rev Immunol 4, 648-655 (2004)) でレビューされている標準的な方法に従って行った。全ての蛍光色素コンジュゲート抗体について、滴定実験を用いて最適濃度を決定した。CD4 (GK1.5)、CD8 (53-6.7)、CD3 (17A2)、CD45 (30F11)、CD45.1 (A20)、CD45.1 (104)、CD44 (IM7)、CD62L (MEL-14)、CD69 (H1.2F3)、MHCクラスI H2-Dd (34-2-12) および H2-Db (KH95)、GM-CSF (MP1-22E9)、IFN $\gamma$  (TC11-18H10)、IL-17A (XMG1.2) および FoxP3 (FJK-16s) は、BD社、BioLegend社またはeBioscience社のいずれかから入手した。表面染色のために、細胞をそれぞれの抗体と共に4℃で20～30分間インキュベートした。すべての実験で、死細胞は、アクアまたは近赤外ライブ/死固定染色試薬 (Invitrogen/BioLegend) を使用して分析から除外され、ダブレットは、FSC-Area対FSC-Heightゲーティングによって除外された。細胞内サイトカイン染色のために、T細胞を、PMA (50 ng/mL)、イオノマイシン (500 ng/mL) およびゴルジプラグ (Brefeldin A、BDを1:10000希釈で含む) を含む10%のFCSのRPMI中で、37℃で4～5時間インキュベートした。表面染色後、メーカーの指示に従ってCytifix/Cytoperm (BD社) を使用し、Perm/Washバッファは自社で調製した (0.5%のサポニンと5%のBSAを含むPBS)。細胞内染色のために、細胞をそれぞれの抗体と一緒に4℃で20～30分間インキュベートした。核内FoxP3染色については、表面染色後にFixation/Permeabilizationバッファ (eBioscience社) を使用し、次いで社内で調製したPerm/Washバッファを使用した。

## 【0094】

一般に、細胞は、破片を除外するためにFSC-AreaおよびSSC-Areaに基づいてゲーティングされ、ダブレットは、FSC-Area対FSC-Heightゲーティングによって除外された。死細胞は、AquaまたはNear-IR Live/Dead 固定染色試薬 (Invitrogen社/BioLegend社) を用いて分析から除外した。該当する場合は、CD45.1細胞をCD4またはCD8 T細胞にゲーティングする前にゲーティングした。ゲーティングに使用したすべてのマーカー (CD4、CD8、CD3、CD44、CD62L、CD69) は、陰性集団と陽性集団の明確な分離を示した。キリングアッセイ細胞については、シングレットを上記のようにゲーティングし、次いで腫瘍細胞をCellular Tracer violetによって同定し、TOPRO-3取り込みを示すヒストグラムを生成した。フローサイトメトリー分析は、FACSCanto II (BD社) またはLSRII Fortessa (特注研究製品、BD社、405 nm、488 nm、561 nmおよび640 nmのレーザーラインを装備) のいずれかを用いて、FACS Divaソフトウェアを用いて実施した。データ解析はFlowJo 10.0.x (Tree star社) を用いて行った。

## 【0095】

## STAT5リン酸化のフローサイトメトリー解析

骨髄の単細胞懸濁液を20分間表面染色し、その後GM-CSF含有培地 (20 ng/mL) を添加した。細胞を37℃で30分間インキュベートし、STAT5のリン酸化を誘導した後、4%のPFA溶液 (pH 7.4) を最終濃度の2%に添加した。細胞を20分間固定し、洗浄し、1 mLの4℃メタノール中に再懸濁した。40分後、細胞を2回洗浄し、45  $\mu$ LのFACSバッファ中に再懸濁した5  $\mu$ Lの抗pSTAT5 APC (BD Biosciences社) を、1:10の最終染色比になるように添加した。細

胞を、最終的な洗浄ステップおよび捕捉の前に、4℃で45分間インキュベートした。フローサイトメトリー解析は、LSRII Fortessa（特注研究品、BD社、405nm、488nm、561nm、640nmのレーザーラインを搭載）を用いて、FACS Diva Softwareを用いて行った。データ解析はFlowJo 10.0.x（Tree star社）を用いて行った。

【0096】

フローサイトメトリーによるヒトPBMCの表現型分析

37℃の水浴で解凍するまで、凍結保存したPBMCを液体窒素中で保存した。細胞を、1:10,000ベンゾナーゼ（Invitrogen社）で補充した、1mLの予め加温した細胞培養培液（CCM、RPMI-1640（PAN biotech社）、10%のFCS（Biochrom社）、1×L-グルタミン、および1×ペニシリン／ストレプトマイシン（いずれもLife Technologies社））中で穏やかに再懸濁した。その後、細胞を5mLチューブに移し、CCMで洗浄し、細胞を計数し、CCM中で $20 \times 10^6$ 細胞/mLに調整した。フローサイトメトリーでサイトカイン産生を決定するためにゴルジプラグ（プレフェルジンA、BD社、1:1000希釈）およびゴルジストップ（モネンシン、BD社、1:1000希釈）の存在下において、50ng/mLのフォルボル12-ミリスチン酸13-アセテート（PMA、Sigma-Aldrich社）および1μg/mLのイオノマイシン（Sigma-Aldrich社）で、細胞を37℃で4時間刺激した。非特異的結合は、Human TruStain FcX（Biolegend社）を用いてブロックした。

【0097】

C57BL/6 WT、Cs f2<sup>-/-</sup>、Ifn g<sup>-/-</sup>、またはIl17a<sup>-/-</sup> responder T細胞を、BALB/c（同種遺伝子）マウスまたはC57BL/6（同系遺伝子）マウスのDCと共培養した。あるいは、BALB/c WT responder T細胞を、BALB/c（同系遺伝子）またはC57BL/6 WTおよびCs f2r b<sup>-/-</sup> DCs（同種遺伝子）からのDCと共培養した。T細胞およびDCは、それぞれ抗CD4および抗CD8（T細胞用）または抗CD11c（DC用）磁気ビーズ（Miltenyi Biotec社）およびAutoMACS Proを用いたポジティブセクションにより脾臓細胞から精製した。細胞は、37℃、5%のCO<sub>2</sub>の完全RPMI1640培地中で3日間、1/10（ $2 \times 10^4$  DCs、 $2 \times 10^5$  T細胞）の刺激剤／応答剤比でU底96ウェルプレート中に3倍速でプレーティングした。その後、培養上清を回収し、希釈した3H-チミジン（1/100、50μCi）で16時間置換した。細胞を96ウェルハーベスター（PerkinElmer社）によって採取し、シンチレーションをβカウンター（1450 Microbeta Plus, Wallac）で測定した。

【0098】

キリングアッセイ

Pan T Cell Isolation Kit II, mouse（MACS、Miltenyi Biotec社）を用いて、脾臓およびリンパ節のT細胞を単離した。A20-オールシフェラーゼ<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>またはWEHI-3-オールシフェラーゼ<sup>+</sup>細胞をCell Trace Violet Cell Proliferation Kit（ThermoFisher Scientific社、C34557）で染色した。細胞を、10% FCSを添加したRPMI中で、可溶性α-CD3（1μg/mL）およびα-CD28（0.5μg/mL）の存在下においてエフェクター／ターゲット比1:1、20:1、50:1で、5%のCO<sub>2</sub>中で37℃、24時間インキュベートした。培地を除去した後、Topro（0.8μM）を細胞に添加し、LSRII Fortessa flow cytometer（BD社）上で細胞を取得した。データは、FlowJo Version X（Tree Star）を用いて分析した。パーセンテージ比溶出は、以下のよう

に計算した。  
[（実験的溶解－自発的溶解）／（最大溶解－自発的溶解）] × 100%

【0099】

### Treg抑制アッセイ

前述のように、C57BL/6 WTマウスおよびCs f 2-/-マウスからリンパ節および脾臓からT細胞を単離した。CD4 T細胞は、まずCD4単離キット (Mojo Sort、Mouse CD4 Nanobeads) を用いて濃縮し、次いでCD45、CD25、CD62LおよびCD4で染色した。純度98~99%のBD FACSAria IIセルソーターを使用し、CD4+CD25-CD62L+ (Tconv) およびCD4+CD25high (Treg) 細胞をフローサイトメトリーで選別した。APCを>3400ラド (4分、12.2 Gy/min、225 kV、17.7 mA) で照射し、10%のクローン培液中で4x10<sup>6</sup>/mL (または2x10<sup>6</sup>細胞/mL) に希釈した。APCおよびTconv細胞は、96ウェル丸底プレート (ウェルあたり4x10<sup>4</sup> Tconv) 中で、濃度を変えて自家Treg細胞と共培養した。細胞を、1 μg/mLの濃度のαCD3において37℃で2日間刺激し、次いで3H-チミジンで16時間インキュベートした。細胞をFilterMate (PerkinElmer社) を用いて採取し、プログラムMicrobetaを用いてβカウンターで分析した。Treg抑制率は、生きている細胞の中で  $[(cpm\ Tconv - cpm\ Treg : Tconv) / cpm\ Tconv\ 単独] * 100$  として計算し、cpmは1分間のカウント数で、Tconv細胞の抑制率として計算した。

【0100】

### サイトカイン分析

血清は、allo-HCTレシピエントマウスから指定された時間に得た。MLRの培養上清は、3日間の共培養後に採取した。血清または細胞培養上清中のGM-CSF、IFNγおよびIL-17Aの測定は、製造者の指示 (BD Biosciences社およびBiologend社) に従ってサイトカイン特異的ELISAにより行った。

【0101】

### 肝機能パラメータ

肝酵素 ((アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (AP))、アルブミン及び血中尿素窒素 (BUN) は、Piccolo Liver Panel Plus (Abaxis社) を用いてマウスの血清中で測定した。

【0102】

### 組織学

病理組織学的評価のために、臓器をHOPE (DCS、ハンブルグ、ドイツ) に固定し、パラフィンに埋め込んだ。3~5 μmの切片をマイクロトーム (Micro HM 325、Thermo Scientific社) で切断し、その後ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。組織学的GvHDスコアを生成するために、半定量的な組織特異的スコアリングシステムを使用した。絨毛の鈍化、陰窩の再生、陰窩細胞のアポトーシス、徹底的な陰窩破壊と粘膜固有層リンパ球浸潤を含む小腸のパラメータのために、次のスコアで評価された。0 = 正常、0.5 = 焦点性でまれ、1 = 焦点性で軽度、2 = 拡散性で軽度、3 = 拡散性で中程度、4 = 拡散性で重度、(Hill, G. R. 他「Total body irradiation and acute graft-versus-host disease, the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines.」Blood 90、3204-3213 (1997)) から引用。

【0103】

皮膚については、以下のパラメータが評価された。推定毛包数：0 = 正常 (比較的接近して配置)、0.5 = わずかに減少 (通常は局所的)、推定皮脂腺数：0 = 正常 (比較的大きな細胞、小さなグループ、ヘアネックレベル)、1.0 = わずかに減少 (数とサイズ、通常は局所的)、2.0 = 明らかに減少 (少数の細胞のみ存在)、皮脂腺アポトーシスと変性：0 = 存在しない、0.5 = まれ、1 = 関与する腺の数が少ない、2 = 中程度の数の腺が関与する毛包のアポトーシス & 変性。0 = 存在しない、0.5 = まれ、1 = 関与する毛包の数が少ない、2 = 関与する毛包の数が中程度、3 = 関与する毛包の数が多い。白

10

20

30

40

50

血球浸潤（付属外）：0＝低、1＝わずかに増加、2＝中等度に増加。白血球浸潤（付属）：0＝存在しない、1＝わずか、2＝中等度。表皮（アポトーシス細胞、白血球浸潤）：0＝存在しない、0.5＝まれ、1＝少ない、2＝中等度、3＝多い。皮下脂肪：0＝連続、1＝連続していない、2＝不在、（Kaplan, D. H. 他、「Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype.」J. Immunol. 173, 5467-5475 (2004)）から引用。

【0104】

門脈拡張と浸潤、胆管浸潤、核胆管多層化、ピクノティック胆管細胞、上皮内胆管細胞、血管内皮炎、肝細胞汎小葉壊死、好酸球、微小膿瘍、細胞分裂の数値、肝細胞ステアトーシスを含む肝臓のパラメータについて、以下のスコアで評価した。0＝正常、0.5＝局所的でまれ、1＝局所的で軽度、2＝拡散性で軽度、3＝拡散性で中等度、4＝拡散性で重度、（Hill, G. R. 他、「Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation.」J. Clin. Invest. 102, 115-123 (1998)）から引用。すべてのスライドをコード化し、Olympus BX41 TF顕微鏡上においてブラインド方式で読み取った。

【0105】

人間の被験体

すべてのヒトサンプルは、書面によるインフォームドコンセントに基づき、アルベルト・ルートヴィヒ大学フライブルク校（ドイツ）の倫理委員会（プロトコル番号：267／11）の承認を得た後に収集された。腸管組織生検は、2007年から2014年の間にGvHD患者または健常対照者から前向きな方法で収集された。腸GvHDの等級付けは、公表された病期分類システム（Lerner, K. G. 他、「Histopathology of graft-vs.-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors.」Transplant. Proc. 6, 367-371 (1974)）に従い、病理組織学に基づいて経験豊富な病理医によって行われた。対照個体は腸生検で異常を示さなかった。レシピエントの年齢、性別、基礎となる診断、ドナーおよび移植片の種類、前処置レジメン、免疫抑制レジメンおよびGvHDのグレードを含む患者の特徴は、GvHD患者については補足表1および3に、対照者については補足表2に詳細に記載されている。

【0106】

免疫組織化学

製造者の指示に従って、固定パラフィン包埋組織切片において、二段階IHC染色キットEnVision+System HRP DAKO（グロストルプ、デンマーク）を用いて免疫組織化学を実施した。切片について、Dako Target Retrieval Solution (1x) で10分間熱媒介抗原検索を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性を、DAKO内因性ペルオキシダーゼブロッキングキットを用いて、RTで30分間ブロックした。一次抗体をPBS+5%のNormal Goat Serum (NGS) で希釈した。単一免疫染色は、ヒト被験者からの生検については非共役mAb抗ヒトGM-CSF抗体（クローン3209.1、R&D Systems）またはIgGアイソタイプコントロール、マウス組織切片についてはラットα-F4／80（クローンCI、A3-1、BioRad）およびウサギα-p22phox（クローンFL-195、Santa Cruz）を用いて、4℃で一晩インキュベートすることで行った。クロモゲンとしてDABを使用した。次いで、切片をヘマトキシリンで対比染色し、DPXでマウントし、カラーカメラColorViewer I IIu（Olympus社）と結合した顕微鏡オリンパスBX41で分析し、Fiji/ImageJソフトウェアパッケージ（GNU General Public License）を用いて分析した。

## 【0107】

## 免疫蛍光法

組織を免疫組織化学のためにHyrax C60 cryostat (Zeiss社) を使用して凍結切除 (厚さ10  $\mu$ m) し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。切片は、4% PFAで固定し、PBSで洗浄し、0.1%のTriton X-100と4%の正常ヤギ血清を補充したPBSでブロックした。その後、切片を、以下の一次抗体、ラット抗GMCSF抗体 (BD Pharmingen、クローンBVD2-21C11、1:50)、ウサギ $\alpha$ -CD3 (Novus、クローンSP7、1:200) およびマウス抗CD68抗体 (DAKO、クローンEMB11、1:50) でインキュベートし、一晚 $4^{\circ}\text{C}$ のブロッキング溶液中で希釈した。切片を、DAPI (Invitrogen社) 含有のSlowFade Gold褐色防止用封入剤でマウントした。蛍光顕微鏡写真は、アルゴンおよびヘリウムレーザーを備えたライカ共焦点レーザー走査型顕微鏡 (SP5、Leica社、ヘーアブルーク、スイス) の40倍対物レンズ (油浸、NA1.25) を使用して撮影した。画像は、Imarisイメージングソフトウェア (Bitplane社、チューリッヒ、スイス) によって処理され、マージされた。

10

## 【0108】

## TUNELアッセイ

4%のPFAで固定した切片を、大腸内の断片化された核を検出するためにTUNELアッセイのために処理した。メーカーの指示にしたがって、ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kitを使用した。簡潔に言えば、スライドをH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で前処理し、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間、TdTおよびジゴキシゲニン結合dUTPを含む反応混合物でインキュベートした。標識DNAはAF488標識二次抗体で可視化した。蛍光顕微鏡写真は、40倍対物レンズ (油浸、NA1.25) を使用して、アルゴンおよびヘリウムレーザーを装備したSP5ライカ共焦点レーザー走査顕微鏡 (SP5、Leica社、ヘーアブルーク、スイス) を用いて撮影した。画像は、Imarisイメージングソフトウェア (Bitplane社、チューリッヒ、スイス) によって処理され、マージされた。

20

## 【0109】

## RNA分離および定量的rt-PCR

メーカーの指示に従い、RNeasy FFPEキット (Qiagen社、キシレンを用いた脱パラフィン化) を用いて、固定パラフィン包埋組織切片からRNAを単離した。RNA濃度は、NanoDrop 1000分光光度計 (Thermo Scientific社) を用いて推定した。第1鎖cDNA合成には、メーカーの指示に従ってMLV逆転写酵素 (Invitrogen社) を使用した。遺伝子発現は、CFX 384リアルタイム検出システム (Bio-Rad社、ハーキュリーズ、カリフォルニア、USA) とSYBR Green Supermix (Bio-Rad社) を使用したリアルタイム定量PCR分析によって測定した。PCRプライマーの配列は、以下の表に示すとおりである。トランスクリプト発現をGAPDHハウスキーピング遺伝子に正規化し、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$  ( $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \Delta C_{\text{Control}}$ ) として表した。

30

## 【0110】

40

| 遺伝子   | プライマーシーケンス(5' to 3')                               |
|-------|----------------------------------------------------|
| CSF2  | Fwd: CAC TGC TGC TGA GAT GAA TGA AA (SEQ ID NO: 1) |
|       | Rev: GTC TGT AGG CAG GTC GGC TC (SEQ ID NO: 2)     |
| GAPDH | Fwd: GAA GGT GAA GGT CGG AGT CAA C (SEQ ID NO: 3)  |
|       | Rev: TGA TTT TGG AGG GAT CTC GCT C (SEQ ID NO: 4)  |

50

## 【0111】

高次元データ解析における母集団識別の自動化

BD FACSymphony™セルアナライザーで取得したデータを補正し、FlowJo バージョン v10.4 (TreeStar社) でエクスポートし、Cyt M ATLAB (登録商標) (バージョン2017b) を用いて正規化し、非バイアス分析を、以下に記載されているように行った (Nowicka他、F1000Res 6, 748 (2017)、Hartmann他、J. Exp. Med. 213, 2621-2633 (2016))。

## 【0112】

統計学

グラフは、GraphPad Prism (GraphPad Software社) を用いて作成した。生存曲線はカプラン・マイヤー法でプロットされ、生存曲線の比較にはログラंक (マンテル・コックス) 検定を使用した。データは、個々のデータポイントとして、または図の凡例に示されているように、平均+/-標準偏差 (SD) または平均の標準誤差 (SEM) として表示される。平均の比較は、対応のない2群についてのt検定 (該当する場合はウェルチ補正を含む)、またはボンフェローニ事後検定を用いた一元および二元配置分析を用いて、それぞれ実施した。サンプルサイズを決定するための統計的手法は使用されていないが、我々のサンプルサイズは現場で一般的に使用されているものと同様であった。無作為化の方法は使用しなかった。

## 【0113】

データの可用性

本研究の間に生成されたデータセット、および/または分析されたデータセットは、合理的な要求があれば、対応する著者から入手可能である。

## 【0114】

例1

組織浸潤ドナーT細胞は、MHCミスマッチのHCTに続いてGM-CSFとIFN $\gamma$ を産生する。急性GVHDに対するT細胞由来GM-CSFの寄与を理解するために、本発明者らは、まず、MHCミスマッチのHCTのモデルを採用した。本発明者らは、野生型 (WT) BALB/c CD45.2<sup>+</sup>マウス (MHCハプロタイプH2d) に致死量の放射線を照射した後、成熟T細胞の供給源となるB6 CD45.1<sup>+</sup>脾臓細胞の有無にかかわらず、WT CD45.1<sup>+</sup> C57BL/6 (B6) マウス (MHCハプロタイプH2b) から得たT細胞枯渇 (TCD) 骨髓 (BM) 細胞を静脈内に注入した。BMと脾臓細胞のレシピエントは、3日目から6日目までの間に致命的なGVHDを発症し (図1A)、これは脾臓、肝臓、皮膚のドナーCD45.1<sup>+</sup>細胞の再構成と拡張と一致している (図1B)。CD45.1<sup>+</sup>ドナーのコンパートメント内では、T細胞集団は高頻度のGM-CSFおよびIFN $\gamma$ 産生細胞を含んでおり、allo-HCT後3日目から肝臓 (図1C) および脾臓 (図1D) で最初に見られ、6日目からは皮膚で見られた (図1D)。これらの集団ではIL-17Aはほとんど検出されなかった (図1C、1D)。従って、本発明者らは、BMプラス脾臓細胞を受けたマウスの血清中に、BM単独の場合と比較して有意に高い量のGM-CSFおよびIFN $\gamma$ を見いだした (図1E)。本発明者らは、同種混合リンパ球反応 (MLR) を用いて、生体内における同種反応中のGM-CSFおよびIFN $\gamma$ の産生を確認した (図1F)。さらに、wt、Cs f2<sup>-/-</sup>、IL17a<sup>-/-</sup>およびIfn $\gamma$ <sup>-/-</sup>のT細胞は、同種DCとの共培養後、これらの細胞の増殖能の先験的な差異を除いて、等しく増殖した (図1G)。まとめると、GM-CSFとIFN $\gamma$ は、IL-17Aではなく、GVHDの間に標的臓器に浸潤するT細胞によって産生される。

## 【0115】

例2

同種T細胞によるGM-CSF産生はGVHDの病態に不可欠

allo反応性TH細胞によるGM-CSFおよびIFN $\gamma$ の産生を考慮して、本発明

者らは、急性GvHDの重症度を決定する上でのこれらのサイトカインの関連性を評価した。上記のように、本発明者らは、WT BALB/cマウスに致死量の放射線を照射した後、WT B6マウスまたはGM-CSF、IFN $\gamma$  (Ifng $^{-/-}$ ) またはIL-17 (Il17a $^{-/-}$ ) を欠くB6マウス (Cs f 2 $^{-/-}$ ) からの脾細胞の有無にかかわらず、WT B6マウスからのTCD-BM細胞注入の結果を比較した。BMプラスCs f 2 $^{-/-}$ 脾臓細胞を受けたマウスは、allo-HCT後20日目まで致死的なGvHDから保護されたが、BMプラスWT脾臓細胞を受けたマウスはすべてHCT後15日目までに死亡していた (図2A)。BMプラスIfng $^{-/-}$ またはIl17a $^{-/-}$ 脾臓細胞をマウスに注射することもまた、致死的なGvHDの動態に有意な影響を与えたが、それでもこれらのマウスのほぼ100%は20日目までに死亡した (図2A)。

10

#### 【0116】

ドナー脾臓の調製物が複数の異なる免疫細胞タイプを含むため、本発明者らは、その後、T細胞が、我々のGvHDモデルにおけるGM-CSFの生物学的に重要な供給源であるかどうかを調査した。本発明者らは、致死的に照射されたBALB/cレシピエントに、WTまたはCs f 2 $^{-/-}$  B6マウスの脾臓から単離された精製T細胞の有無にかかわらず、WT B6ドナーからのTCD-BM細胞を注入した。この方法により、Cs f 2 $^{-/-}$  T細胞を受けたマウスは、WTのT細胞を受けたマウスとは対照的に、allo-HCT後70日まで致死的なGvHDから完全に保護されていることが確認された (図2B)。2つの集団が同等の組成 (図6A)、活性化状態 (図6B)、HCT後のGvHD標的臓器への浸潤能力 (図6C)、脾臓または末梢リンパ節 (LN) における活性化 (CD44<sup>high</sup>) T細胞の頻度 (図6D)、調節性T細胞 (Tregs) の頻度およびグランザイム産生 (データは示していない)、またはIFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ またはIL-17Aのような炎症性サイトカインを産生するそれらの能力を示したため、この保護効果がWTおよびCs f 2 $^{-/-}$ マウスの脾臓T細胞の間の生来の違いと関連しているという証拠はなかった。

20

#### 【0117】

次に、本発明者らは、CD4およびCD8 T細胞からのGM-CSFのGvHD病理学に対する相対的な寄与を調べた。この目的のために、本発明者らは、以下4つの組み合わせを用いて「クリスクロス」実験を行った。CD4 WT T細胞+CD8 WT T細胞、CD4 WT T細胞+CD8 Cs f 2 $^{-/-}$  T細胞、CD4 Cs f 2 $^{-/-}$  T細胞+CD8 WT T細胞、およびCD4 Cs f 2 $^{-/-}$  T細胞+CD8 Cs f 2 $^{-/-}$  T細胞である。CD4 T細胞からGM-CSFが欠落している組み合わせのみが致死的なGvHDに対する防御効果を示した (図2K) ことから、allo反応性TH細胞がGvHDの発症におけるGM-CSFの主要な供給源であるという考えを支持する。したがって、本発明者らは、T細胞由来のGM-CSFが、MHCミスマッチのHCTに続く致死的なGvHDの誘発に関与していると結論付けた。GM-CSFを欠いたT細胞のallo-HCTによって与えられた生存の優位性は、個々のGvHDターゲット組織のレベルでも明らかであった。allo-HCT後6日目の組織病理学的分析により、Cs f 2 $^{-/-}$ 脾臓細胞の移植は、WT脾臓細胞の移植と比較して、皮膚および小腸の組織損傷を有意に減少させたことが明らかになった (図2C、2D)。より詳細には、Cs f 2 $^{-/-}$ 細胞を投与されたマウスの皮膚は、毛包および表皮の周囲および内の細胞のアポトーシスおよび細胞浸潤の減少を示したのに対し、小腸は完全な陰窩破壊の減少を示した (図2D)。

30

40

#### 【0118】

本発明者らはさらに、ここでは、増加した結腸長および減少したアポトーシス指数 (図2H、2I) によって示されるように、Cs f 2 $^{-/-}$ 細胞移植に伴う減少した結腸病理を報告している。また、肝機能障害の無症状の徴候をスクリーニングしたところ、Cs f 2 $^{-/-}$ 脾臓細胞を移植したマウスでは、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (AP) および血中尿素窒素 (BUN) の血清レベルがWTマウスと比較して低下していることが示された (図2G)。また、GM-CSF不存在下では、全身のTNF $\alpha$ 血清レベルが低下したが、IL-6の量は変化しなかった (データは示してい

50

ない)。活性酸素種 (ROS) がGVHDの組織損傷に関与しているので、本発明者らは、この組織損傷の減少がROS産生の低レベルと関連しているかどうかを調査した。本発明者らは、Cs f 2<sup>-/-</sup>脾臓細胞を移植した6日後のマウスの肝臓および小腸からの切片が、食細胞の活性酸素産生機械の重要な構成要素であるp 2 2 p h o xを発現する細胞を、WT脾臓細胞を投与されたマウスの切片よりも有意に少ない数で含んでいることを見出した(図2 E、2 F)。GVHDにおけるGM-CSFの機能的役割をさらに確認するために、本発明者らは、BALB/cマウスについてMHCミスマッチのHCTの前に、WT B 6 T C D-BMを単独またはBMプラスWT 脾臓細胞を用いて、レシピエントマウスを抗GM-CSF抗体で処理した。GM-CSFの作用を体系的に遮断することで、これらのマウスにCs f 2<sup>-/-</sup>脾臓細胞を移植した際の生存優位性を複製することに成功した(図2 G)。

10

#### 【0119】

完全なMHCミスマッチのHCTのマウスモデルは有益であるが、本発明者らは次に、GVHD病理におけるGM-CSFの役割が、急性GVHDのハプロミスマッチモデルのより臨床的に関連する環境において維持されているかどうかを調査した。本発明者らは、WT B 6 T C D-BMとWT、Cs f 2<sup>-/-</sup>またはIf n g<sup>-/-</sup>の脾臓細胞を組み合わせ、致死量の放射線を照射したB 6 D 2 F 1マウスに細胞を移植したが、これはB 6 とDBAマウスとの交配であるため、MHCハプロタイプH 2 b/dを有するものである。また、Cs f 2<sup>-/-</sup>脾臓細胞を移植することで、WT脾臓細胞を移植したマウスと比較して有意に生存率が向上し、致死的なGVHDからマウスをT C D-BM単独とほぼ同等のレベルまで保護することができたが(図3 A)、これは、精製されたCs f 2脾臓T細胞の移入時に再び複製された(図3 B)。脾臓細胞とT細胞を移植した実験において、本発明者らはまた、If n g<sup>-/-</sup>細胞を移植した後の死亡率が著しく増加したことにも注目した(図3 A、3 B)が、これはGVHDにおけるこのサイトカインの既知の、防御的免疫調節機能と一致する。HCT後9日目に、組織学的スコアが最も高い臓器は皮膚であった。ここで、本発明者らは、WT脾臓細胞と比較してCs f 2<sup>-/-</sup>を受けたマウスでは組織損傷が少なく、If n g<sup>-/-</sup>脾臓細胞を受けたマウスではより多くの組織損傷が見られた(図3 C、3 D)。これは、皮脂腺の数の変化、組織構成および毛包や表皮の周囲や内部の細胞浸潤の変化と一致している(図3 D)。

20

#### 【0120】

a l l o-HCTの後の段階(28日間)では、Cs f 2<sup>-/-</sup>脾臓細胞の移植はまた、門脈管浸潤と胆管の乱れの変化を特徴とする肝臓病理学(図3 H)の減少をもたらした。この部分的ミスマッチモデルにおいて、皮膚は、最も高いGVHDスコアを有する最も影響を受けた器官であった。ここで、本発明者らは、WT脾臓細胞と比較してCs f 2<sup>-/-</sup>を受けたマウスでは組織損傷が有意に少なく、If n g<sup>-/-</sup>脾臓細胞を受けたマウスでは組織損傷が著しく多いことを理解した(図3 C、3 D)。細胞レベルでは、本発明者らはまた、Cs f 2<sup>-/-</sup>細胞を受けたマウスの肝臓および小腸においてGVHDの減少の徴候を観察したが、これは、F 4/8 0<sup>+</sup>ミエロイド細胞の浸潤の減少を伴うp 2 2 p h o x<sup>+</sup>細胞の有意な減少をもたらした(図3 E、3 F)。これらのマウスで見られたIFN $\gamma$ のGVHD保護的役割を考えると、本発明者らは次に、GM-CSFの不存在がこのサイトカインのレベルに関係しているかどうかを調べた。ハプロミスマッチHCTの10日後、本発明者らは、Cs f 2<sup>-/-</sup>脾臓細胞を受けたマウスにおいて、WT脾臓細胞と比較してIFN $\gamma$ のレベルが有意に高いことを発見した(図3 G)。興味深いことに、本発明者らはまた、If n g<sup>-/-</sup>脾臓細胞を受けたマウスの血清中のGM-CSFが増加した証拠を発見した(図3 G)。これは、GM-CSFがさらにIFN $\gamma$ の不存在によって誘導されるGVHDの増強を媒介している可能性を示唆している。以上のことから、T細胞由来のGM-CSFは、2つのマウスa l l o-HCTモデルにおけるGVHD免疫病理学の発症に重要な役割を果たしていると結論づけた。

30

40

#### 【0121】

##### 例3

50

GM-CSFは、ドナー由来の骨髄細胞を介してGvHDの致死を仲介する

致死的条件付けに続いて、放射線感受性宿主抗原提示細胞（APC）は、HCT後の最初の数日以内に失われ、ドナーからのAPCで置換される。宿主APCがGvHDのプライミングフェーズに必要とされるのに対し、ドナーAPCは病気の誘発にはあまり役割を果たさないが、組織の損傷を永続させることに関与している可能性がある。病理的に関連するGM-CSF応答細胞型がドナー由来であるか宿主由来であるかを明確にするために、本発明者らは、GM-CSFRのベータサブユニットを欠損したCsfrb<sup>-/-</sup>マウスをHCTのドナーまたは宿主として使用した。レシピエントコンパートメントにおけるGM-CSFR欠損は、GvHDの生存に影響を与えなかった（図9A）。対照的に、Csfrb<sup>-/-</sup>マウスからのBMの移植は、劇的に遅延した死亡率（図9B）をもたらした。Csfrb<sup>-/-</sup>脾臓細胞の移植をフェノコピーした（図2A）。

10

【0122】

本発明者らは、教師なしの非線形次元削減（t-SNE）を用いて、ドナーグラフト内のGM-CSF応答細胞を同定し、可視化した。このアプローチにより、本発明者らは、単球および好中球がGM-CSFに対して特に敏感であることを見出したが、これは、GM-CSF受容体複合体の下流の転写因子であるリン酸化されたSTAT-5の単細胞分析によって評価された。Csfrb<sup>-/-</sup>マウスを、GM-CSF未応答細胞の供給源として使用した（図9C、9D）。GM-CSFに応答する細胞が骨髄コンパートメントに限定されることを確認したことから、本発明者らは、allo-HCTの5日後に炎症を起こした標的臓器に見られる骨髄細胞サブセットの徹底的な特徴付けを行った。Csfrb<sup>-/-</sup>脾臓細胞の移植は、樹状細胞（DC）、好中球、単球および単球由来細胞（MDC）を含むいくつかの骨髄サブセットの頻度の減少をもたらした（図9E、9F）。好中球および単球/MDCsの減少は、抗GM-CSF治療の標的臓器でも認められたが、これらの骨髄系サブセットの全身的な数は変化しなかった。本発明者らは、ドナー単球/MDCが、GM-CSFの非存在下でより少ないIL-1βを産生することを観察した（図9G）。重要なことに、IL-1βは、GM-CSFによって誘発される病原性プログラムのシグネチャーサイトカインであり、GvHDの発生において重要な役割を果たすことが示された。本発明者らはまた、allo-HCT後のドナー骨髄細胞による活性酸素の発現について、同種のCsfrb<sup>-/-</sup>T細胞を受けたマウスの組織切片においてそれらが低レベルであること、および組織損傷の駆動におけるそれらの報告された役割を考慮して、調査した。本発明者らは、Csfrb<sup>-/-</sup>脾臓細胞の移植は、単球/MDCおよび好中球サブセットの両方におけるROS産生の減少をもたらしたことを見出した（図9H）。まとめると、これらの知見は、GM-CSFライセンスされたドナー由来のミエロイド細胞が、GvHDの病理学に極めて重要であることを実証している。

20

30

【0123】

#### 例4

GM-CSF非存在下でも効率的にGvLが維持される

GvHDにおける組織損傷につながる免疫応答とGvLにおける腫瘍除去は、同じメカニズムを介して媒介されると広く考えられている。ドナーT細胞由来のGM-CSFは致死的なGvHDに必須であることから、本発明者らは、MHCミスマッチのHCTモデルにおいてもGvLを媒介するかどうかを検討した。これを試験するために、本発明者らは、GFPおよびルシフェラーゼを共発現するA20 B細胞リンパ腫細胞（BALB/c由来）（A20-GFP-Luc）を、WT B6 TCD-BM細胞と共に、単独で、または精製B6 WT細胞またはCsfrb<sup>-/-</sup>脾臓T細胞と共に、致死量を照射されたBALB/cのレシピエントに静脈内注射した。腫瘍の成長を、生物発光イメージング（BLI）によってモニターした。A20細胞をTCD-BM単独で注入した場合、すべてのレシピエントは35日以内に成長した腫瘍により死亡した（図4A～4C）、GvL効果におけるT細胞の重要な役割と一致した。従って、WTまたはCsfrb<sup>-/-</sup>T細胞をBMトランスファーに添加すると、腫瘍増殖の効率的な制御が得られたが（図4A～4C）、Csfrb<sup>-/-</sup>T細胞を受けたマウスのみが生存期間の有意な改善を示した（図4C）。TCD

40

50

ーBMプラスWT T細胞を受けたリンパ腫保有マウスは主に重度のGVHDで死亡したのに対し、TCDーBMプラスCs f 2ー／ーT細胞を受けたマウスのGV L効果は低下しなかったが、GVHDからは保護された(図4C、4D)。Cs f 2ー／ーT細胞を受けたマウスの生存率のこの改善は、単球細胞株WEHIー3を用いた代替GV Lモデルにおいても観察された。

#### 【0124】

また、本発明者らが、接種したA20リンパ腫細胞の数を増やすと、Cs f 2ー／ーのT細胞は、WT細胞よりもさらに効率的にGV Lを実行し、全生存期間の有意な増加をもたらした。一貫して、ナイーブまたはa l l oーHCTを受けたマウスから分離されたCs f 2ー／ーおよびWT T細胞は、生体外でA20リンパ腫およびWEHIー3細胞を殺すことが等しく可能であり、脾臓およびLNで等しく拡大し、活性化細胞(CD44 h i g h)、増殖細胞(K i 6 7+)およびグランザイムB産生細胞の類似の頻度を示した。臨床環境における所見の移植可能性を試験するために、本発明者らはGMーCSFに対する中和性mAbを使用した。印象的なことに、TCDーBMプラスT細胞を受けた抗GMーCSF治療済みである白血病のマウスは、強力なGV L効果を示し、アイソタイプ治療されたコントロールマウスよりも有意に良好な生存を示した(図4E～4H)。より高い生存率は、GVHDの発生率の減少と関連していた(図4H)。注目すべきことに、GMーCSFの中和は、HCTを受けなかったマウスでは腫瘍の成長に影響を与えなかった。本発明者らは、異なるグループ間で死因(腫瘍またはGVHD)を比較した。リンパ腫保有マウスは、HCTを受けず、撤退基準に達し、安楽死させる必要があった。TCDーBMとWT T細胞を受けたリンパ腫保有マウスは、腫瘍の進行が遅れたが、代わりに重度のGVHDで死亡したのに対し、TCDーBMとCs f 2ー／ーT細胞を受けたマウスは、強いGV L効果を示し、GVHDから保護された(図4D)。

#### 【0125】

これらのデータと一致するように、Cs f 2ー／ーおよびWT T細胞は、A20リンパ腫細胞を生体外で殺傷する能力を等しく有していた(図7A、7B)。本発明者らは、臨床現場での知見の翻訳可能性を検証するために、GMーCSFに対する中和性mAbを使用した。驚くべきことに、TCDーBMプラスT細胞を受けた抗GMーCSF治療済みの白血病マウスは、強力なGV L効果を示し、アイソタイプ処理したコントロールマウスよりも有意に良好な生存率を示した(図4E～4H)。より高い生存率は、GVHDの発生率の減少と関連していた(図4H)。注目すべきことに、GMーCSFの中和は、HCTを受けなかったマウスでは腫瘍の成長に影響を与えなかった。注目すべきことに、Cs f r b 2ー／ードナーからa l l oーHCTを受けたマウスは、WTドナーと比較して有意な生存率の改善を示し(図8Aおよび8B)、GMーCSF受容体の中和がGVHDの緩和に有効であることを実証した。このように、GMーCSFの非存在下では、ドナーT細胞は、MHCミスマッチのa l l oーHCTの高度な免疫原性のコンテキストであっても、致死的なGVHDを誘導することなく、マウスにおける治療的GV L応答の効果的なメディエーターとなる。

#### 【0126】

##### 例5

##### ヒト生検におけるGMーCSFの上昇

次に、本発明者らは、GMーCSFがヒトHCTレシピエントにおけるGVHDにおいて同様の役割を果たすという証拠があるかどうかを調べた。本発明者らは、様々な異なる状態について、HCT後の臨床的に文書化されたGVHDの異なるグレードを有する患者からの消化管生検におけるGMーCSF遺伝子の発現およびタンパク質の豊富さを評価した(表1～3)。転写レベルでは、本発明者らは、グレードIVを有する患者からの消化管生検において、グレードIのGVHDと比較して有意に高いGMーCSFの発現を検出した(図5A)。さらに、本発明者らは、グレードIVのGVHDを有する患者からのサンプルにおいて、間質コンパートメントにおけるGMーCSFに対する強い免疫反応性を観察した。一方、本発明者らは、GVHDを有しない患者からの生検においては、GMー

C S Fを検出しなかった（図5B）。合わせて、これらの結果は、G M - C S Fとヒト患者におけるa l l o - H C T後の重篤なG v H Dの存在との間に相関関係があることを示している。

【0127】

考察

様々なT<sub>H</sub>細胞サブセットとそのシグネチャーサイトカインがG v H Dにどのように寄与しているかについては多くの文献があるが、炎症とそれに続く組織破壊のメカニズムは完全には解明されていない。ここでは、G M - C S Fがマウスの致死的なG v H Dの推進にこれまで知られていなかった役割を果たしており、重度のG v H Dを持つヒトのa l l o - H C T患者でも同様に上昇していることを明らかにした。さらに、G M - C S Fは、G v L効果に不可欠ではないようであり、G v H Dの予防と治療における新たな治療標的として有望視されている。また、急性G v H DにおけるT細胞由来のI L - 1 7 Aの役割は除外されているが、I F N γの保護効果は実証されている。

【0128】

G M - C S Fは、いくつかの病理学的炎症性疾患に関与しており、骨髄系細胞に強力な炎症促進作用がある。ここで、本発明者らは、急性G v H Dの2つの異なるマウスモデルを使用して、ドナーT細胞由来のG M - C S Fが重度のG v H Dを直接仲介することを示しているが、これは豊富な骨髄細胞浸潤とR O S産生機構の構成要素における組織染色の増加に関連しており、病原体に対する宿主防御のために食細胞によって古典的に使用されている。組織損傷と白血球浸潤が手を取り合って進行するG v H Dの免疫病理学においても、同じメカニズムは明らかに有害である。ここでは、a l l o反応性C s f 2 - - T細胞を受けた動物で観察されたG v H D感受性臓器における骨髄性駆動型酸化ストレスの減少は、この考えを支持するものである。慢性腸管炎症におけるG M - C S Fの重要な役割、およびG v H D患者からの消化管生検で発見された高量のG M - C S Fは、この特定の器官におけるこのサイトカインの量を調節することがG v H Dの予防および／または治療のために非常に有益である可能性を示唆している。

【0129】

本発明者らはまた、G v H D中のマウスにおけるG M - C S FおよびI F N γの潜在的な相互調節の証拠を明らかにした。活性化されたドナーT細胞によって産生されるI F N γは、G v H Dを促進し、保護することが以前に示されている。活性化されたドナーT細胞によって産生されるI F N γは、G v H Dを促進し、保護することが以前に示されている。ここでは、I F N γ欠損脾臓細胞を用いた部分的なM H CミスマッチのH C Tを受けたマウスは、W T脾臓細胞を受けたマウスよりも致死的なG v H Dに対して著しく感受性が高いことが明らかになった。興味深いことに、これらのマウスの血清G M - C S Fレベルが上昇したのに対し、G M - C S F欠損脾臓細胞を受けたマウスは血清中のI F N γが上昇した。I F N γがエフェクターT<sub>H</sub>細胞においてG M - C S Fをネガティブに制御することは以前に報告されているが、G M - C S Fは受容体複合体を発現していないT細胞には直接影響を与えないため、G M - C S FがI F N γ産生に影響を与えるメカニズムについては、さらに研究が必要である。

【0130】

ドナーT細胞主導のG v H Dと治療的G v L効果は同じメカニズムを介して媒介されているという長年の仮説があった。ここに提示されたデータは、この説に挑戦している。a l l o - H C Tの前にG M - C S F阻害抗体でマウスを治療すると、致死的な急性G v H Dの発生から有意に保護された。一方、抗G M - C S Fで治療された担腫瘍マウスは、腫瘍の成長とG v H Dからの保護の効果的な制御から恩恵を受けた。したがって、G M - C S Fは、T細胞媒介の悪性リンパ系細胞の殺傷を制御しない。代わりに本発明者らは、理論に縛られることを望まず、G v H Dにおいて、G M - C S Fは、病原性T細胞と骨髄系細胞との間のコミュニケーション導管として機能し、後者が組織破壊を引き起こすことを提示するG v LはT細胞による直接的な細胞毒性に依存している可能性が高いが、骨髄細胞のG M - C S F駆動型反応はG v H Dの病理学的意義をより強く示唆しており、G v L

の効果とGvHDを分離する潜在的なメカニズムを表していると考えられる。自己免疫疾患や炎症性疾患におけるGM-CSFの病理学的役割は、ヒト疾患におけるGM-CSF経路を標的とするモノクローナル抗体の開発につながっている。今回の実験的GvHDにおけるGM-CSFの中和効果を考えると、allo-HCT患者においてGM-CSFをブロックすると臨床転帰が改善することは明らかである。重度のGvHD患者の罹患組織で観察されたこのサイトカインのレベルの著しい増加は、この考えをさらに裏付けている。しかし、GM-CSFは界面活性剤のホメオスタシスや肺宿主の防御に重要な役割を果たしているため、臨床現場でGM-CSFをブロックする際には、肺疾患のパラメータを厳密にモニターすることが重要になるだろう。GM-CSFがIL-23媒介の免疫応答に決定的に寄与し、抗IL-23p19療法がGvHD関連大腸炎を改善することができることがマウスで証明されている。このように、GM-CSFの直接遮断は、IL-23を標的とした臨床試験を補完する貴重なものとなるかもしれない。GM-CSFの不存在は、GvLの応答を損なうことなくGvHDの発症を停止させることができるという事実は、臨床試験でallo-HCT後のGvHDの予防と治療のためのこの治療戦略を検証することを容易にする。さらに、GM-CSFがGvHDの最も重篤な症状を示す患者で上昇したことは、この治療法が最も予後が悪く致死リスクが高い患者群に対して特に有望であることを意味する。

【0131】

表1. GvHD患者セットIの臨床病理学的特徴

【0132】

【表1】

| 患者<br>番号 | 性別 | 年齢 | 病気    | ドナー<br>タイプ | 移植組織<br>タイプ | 状態           | 免疫抑制            | GvHD<br>グレード |
|----------|----|----|-------|------------|-------------|--------------|-----------------|--------------|
| 1        | 男  | 44 | CVID  | MRD        | PBSC        | FLU/BCNU/MEL | CyA/Campath     | 3            |
| 2        | 男  | 57 | sAML  | MMURD      | PBSC        | FLU/BCNU/MEL | CyA/Campath/MMF | 4            |
| 3        | 女  | 21 | T-ALL | MURD       | PBSC        | TBI/VP16     | CyA/Campath     | 4            |
| 4        | 男  | 69 | sAML  | MURD       | PBSC        | FLU/BCNU/MEL | CyA/Campath     | 4            |
| 5        | 男  | 6  | MDS   | MURD       | BM          | TT/FLU/ATG   | CyA/MTX         | 3            |

CVID：分類不能型免疫不全症、sAML：二次性急性骨髄性白血病、T-ALL：T細胞急性リンパ性白血病、MDS：骨髄異形成症候群、MRD：HLA適合血縁ドナー、MMURD：HLA非適合血縁ドナー、MURD：HLA適合非血縁ドナー、PBSC：末梢血幹細胞、BM：骨髄、FLU：フルダラビン、BCNU：ビスクロロエチルニトロソウレア、MEL：メルファラン、TBI：全身放射線照射、VP16：エトポシド、TT：チオテパ、ATG：抗胸腺細胞グロブリン、CyA：シクロスポリンA、MMF：ミコフェノール酸モフェチル、MTX：メトトレキサート

【0133】

表2. 制御対象の特徴

【0134】

10

20

30

40

50

【表 2】

| 患者番号 | 性別 | 年齢 | 生検   |
|------|----|----|------|
| 1    | 男  | 59 | 異常なし |
| 2    | 男  | 60 | 異常なし |
| 3    | 男  | 46 | 異常なし |

【0135】

表 3. GvHD 患者セット I I の臨床病理学的特徴

【0136】

【表 3】

| 患者 | 性別 | 年齢 | 病気          | ドナータイプ       | 移植組織タイプ | 状態            | 免疫抑制                 | GvHD<br>グレード |
|----|----|----|-------------|--------------|---------|---------------|----------------------|--------------|
| 1  | 男  | 70 | AML         | MMURD        | PBSC    | FLU/BCNU/MEL  | CyA, Campath         | 4            |
| 2  | 男  | 45 | AML         | MRD          | PBSC    | FLU/BCNU/MEL  | CyA, MTX             | 4            |
| 3  | 男  | 51 | マントル細胞リンパ腫  | MMURD        | PBSC    | FLU/BCNU/MEL  | CyA, Campath         | 4            |
| 4  | 男  | 29 | ホジキン病       | ハプロタイプ<br>同胞 | PBSC    | FLU/MEL/TREOS | MMF/シクロホスファミド/エベロリムス | 4            |
| 5  | 男  | 43 | B-ALL       | MURD         | PBSC    | TBI/VP-16     | CyA, MTX, ATG        | 4            |
| 6  | 男  | 54 | CVID        | MRD          | PBSC    | FLU/BCNU/MEL  | CyA/Campath          | 3            |
| 7  | 女  | 60 | MDS-RAEB II | MURD         | PBSC    | FLU/BCNU/MEL  | CyA/Campath          | 3            |
| 8  | 女  | 61 | AML         | MMURD        | PBSC    | FLU/TT        | CyA/Campath          | 3            |
| 9  | 女  | 59 | T-NHL       | MMURD        | PBSC    | FLU/TT        | CyA/Campath          | 3            |
| 10 | 男  | 76 | 急性赤白血病      | MURD         | PBSC    | FLU/BCNU/MEL  | CyA/ATG/MMF          | 3            |
| 11 | 女  | 47 | AML         | MURD         | PBSC    | FLU/BU/TT     | CyA/MMF/ATG          | 3            |
| 12 | 男  | 52 | AML         | MURD         | PBSC    | BU/CY         | CyA/Campath          | 1            |
| 13 | 男  | 76 | MDS-RAEB    | MURD         | PBSC    | FLU/BCNU/MEL  | CyA/Campath          | 1            |
| 14 | 女  | 58 | AML         | MMURD        | PBSC    | FLU/TT        | CyA/MMF/ATG          | 1            |
| 15 | 女  | 48 | AML         | MMURD        | PBSC    | BU/CY         | CyA/MTX/MMF/ATG      | 1            |
| 16 | 女  | 71 | sAML/MPN    | MMURD        | PBSC    | FLU/TT/MEL    | CyA/MMF/ATG          | 1            |
| 17 | 女  | 59 | MM          | MRD          | PBSC    | FLU/BU/TT     | CyA/MMF              | 1            |

AML：急性骨髄性白血病、B-ALL：B細胞急性リンパ性白血病、CVID：分類不能型免疫不全症、MDS：骨髄異形成症候群、RAEB：芽球増加を伴う不応性貧血、T-NHL：T細胞非ホジキンリンパ腫、sAML：二次性急性骨髄性白血病、MPN：骨髄増殖性腫瘍、MM：多発性骨髄腫、MMURD：HLA非適合血縁ドナー、MRD：HLA適合血縁ドナー、MURD：HLA適合非血縁ドナー、PBSC：末梢血幹細胞、FLU：フルダラビン、BCNU：ビスクロロエチルニトロソウレア、MEL：メルファラン、TREOS：トレオスルファン、TBI：全身放射線照射、VP16：エトポシド、TT：チオテパ、BU：ブスルファン、CY：シクロホスファミド、CyA：シクロスポリンA、MTX：メトトレキサート、MMF：ミコフェノール酸モフェチル、ATG：抗胸腺細胞グロブリン

【0137】

表 4. allo-HCTマウスのGvHDスコアリングシステム

【0138】

10

20

30

40

50

【表 4】

| GvHD基準 | グレード 0 | グレード 1         | グレード2            | グレード 3            |
|--------|--------|----------------|------------------|-------------------|
| 体重減少   | < 10%  | 10 - 20%       | 20 - 25%         | > 25%             |
| 姿勢     | 正常     | 安静時にのみ、猫背が見られる | 動作時にも中程度の猫背      | 重度の猫背で動きが悪くなる     |
| 活動     | 正常     | 軽度から中等度の減少     | 減少               | 激減                |
| 毛皮の質感  | 正常     | 軽度～中等度のフリル     | 酷いフリル・毛羽立ちの悪さ    | 毛皮喪失              |
| 皮膚の完全性 | 正常     | 皮膚の斑状の鱗屑や性器の浮腫 | 皮膚の中程度のスケーリングと炎症 | びまん性潰瘍性皮膚病変と重度の炎症 |

10

20

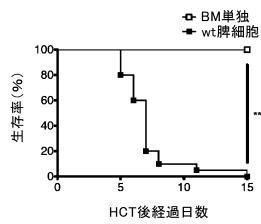
30

40

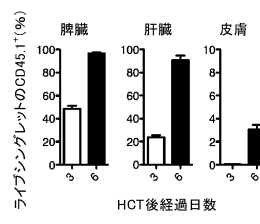
50

【図面】

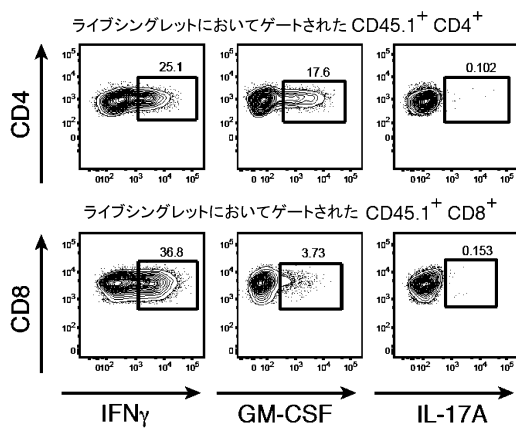
【図 1 A】



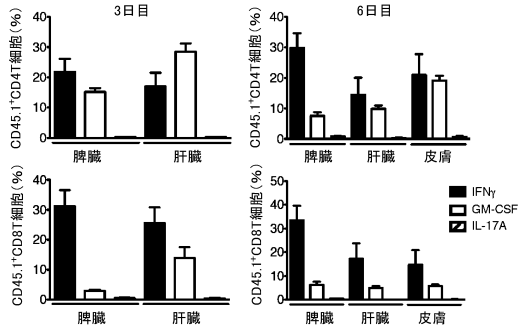
【図 1 B】



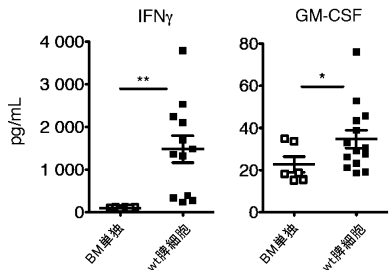
【図 1 C】



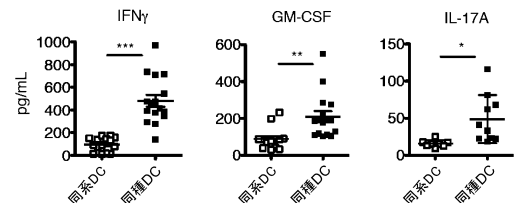
【図 1 D】



【図 1 E】



【図 1 F】



10

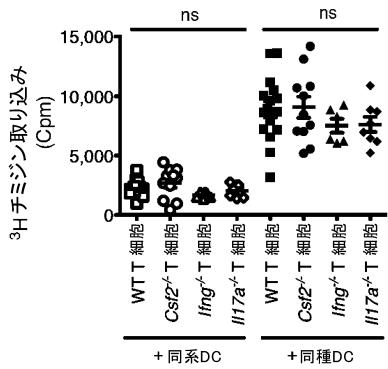
20

30

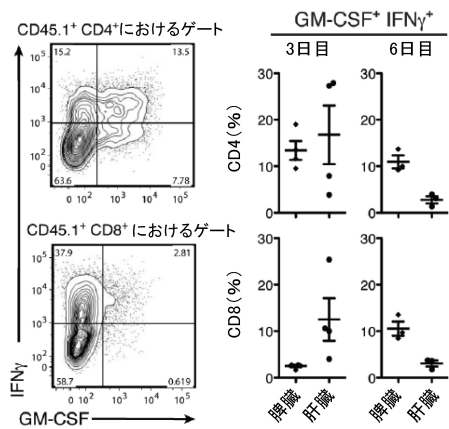
40

50

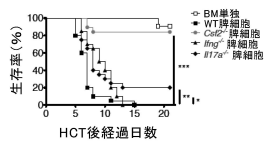
【図 1 G】



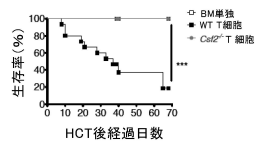
【図 1 H】



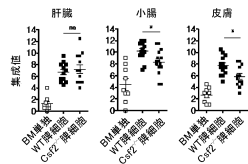
【図 2 A】



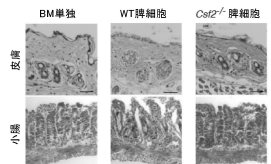
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】



10

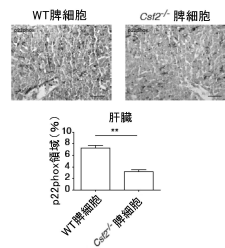
20

30

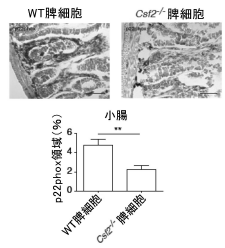
40

50

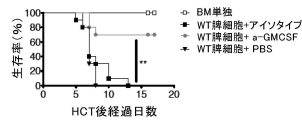
【図 2 E】



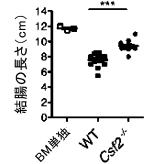
【図 2 F】



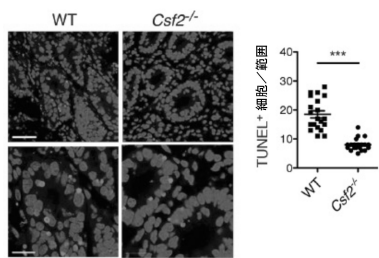
【図 2 G】



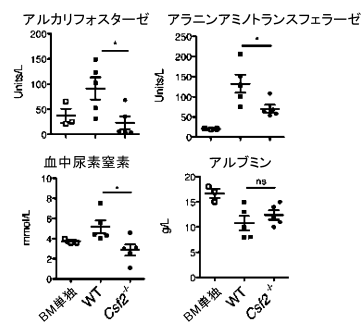
【図 2 H】



【図 2 I】



【図 2 J】



10

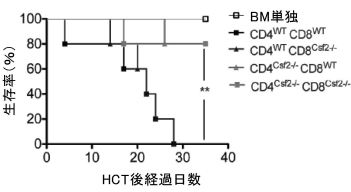
20

30

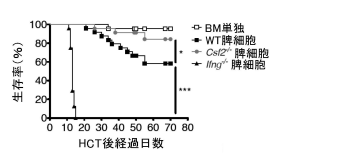
40

50

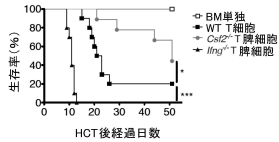
【図 2 K】



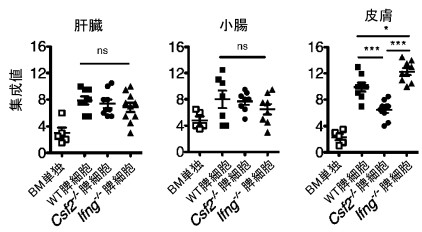
【図 3 A】



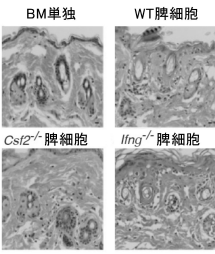
【図 3 B】



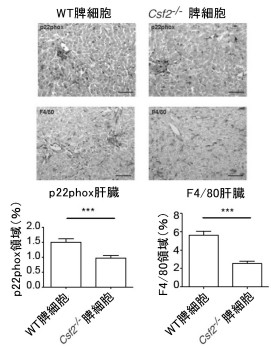
【図 3 C】



【図 3 D】



【図 3 E】



10

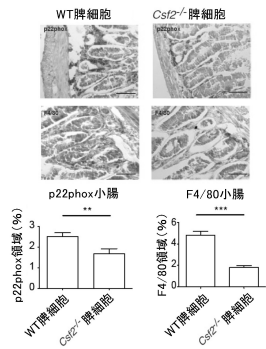
20

30

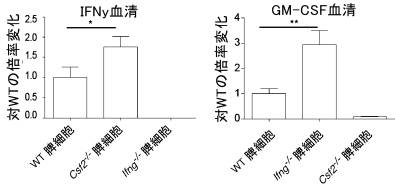
40

50

【図 3 F】

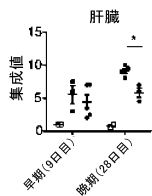


【図 3 G】

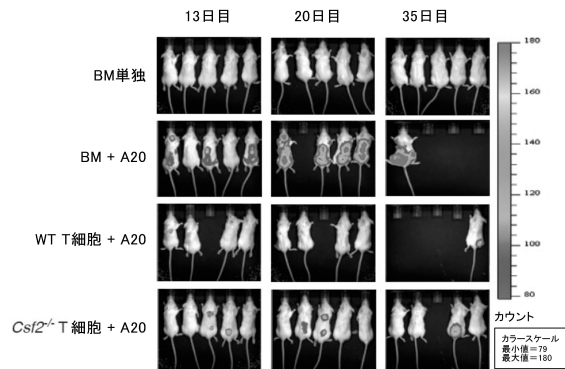


10

【図 3 H】

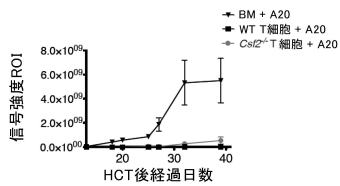


【図 4 A】

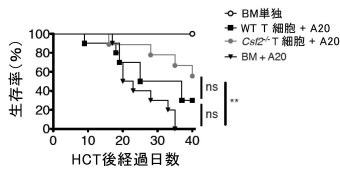


20

【図 4 B】



【図 4 C】

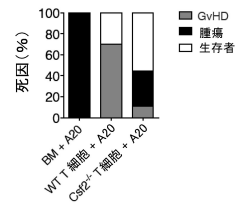


30

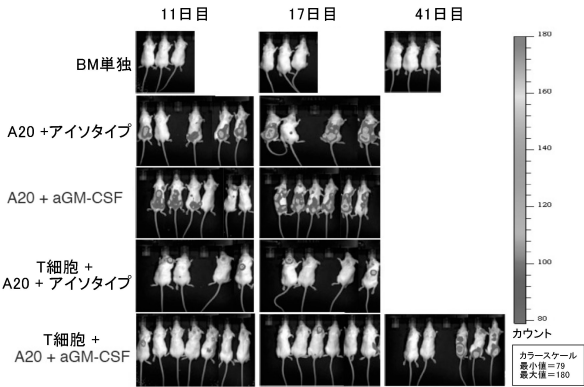
40

50

【図 4 D】

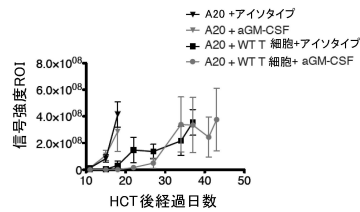


【図 4 E】

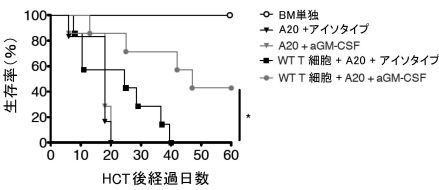


10

【図 4 F】

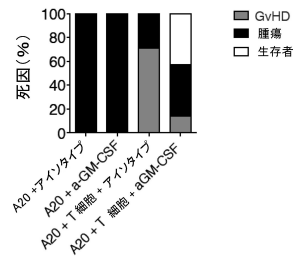


【図 4 G】

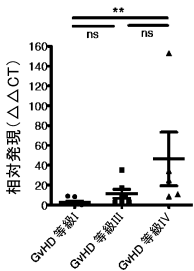


20

【図 4 H】



【図 5 A】

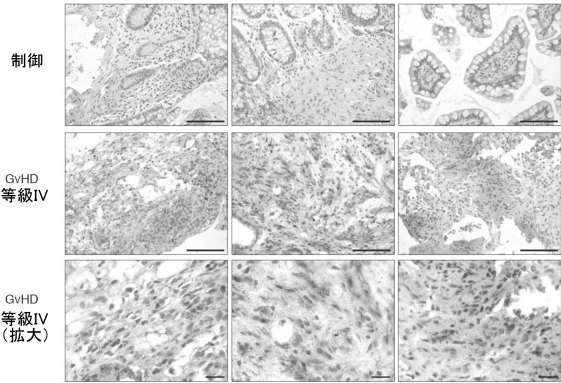


30

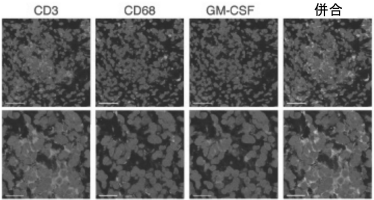
40

50

【図 5 B】

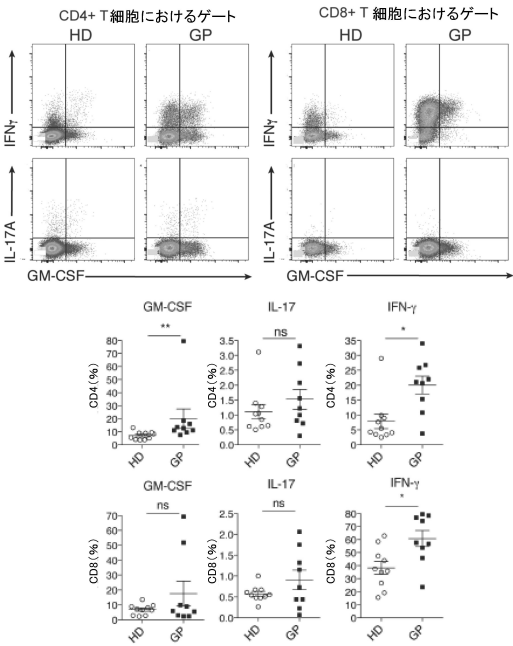


【図 5 C】

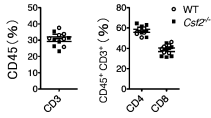


10

【図 5 D】



【図 6 A】



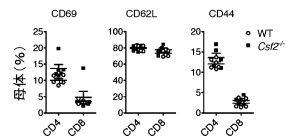
20

30

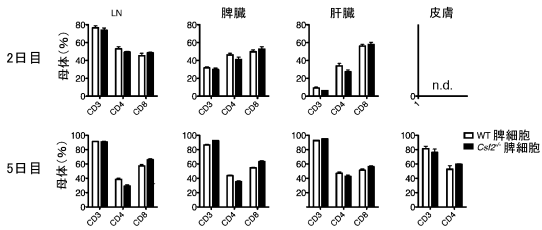
40

50

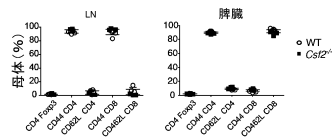
【図 6 B】



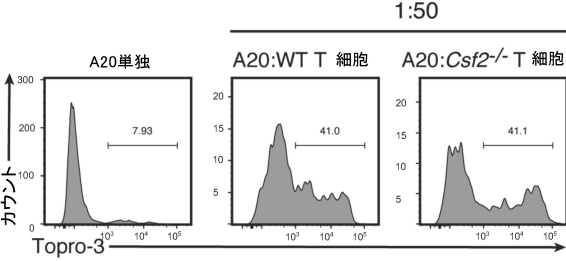
【図 6 C】



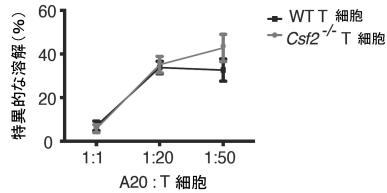
【図 6 D】



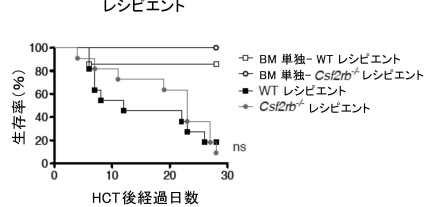
【図 7 A】



【図 7 B】



【図 8 A】



10

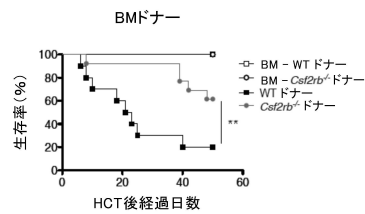
20

30

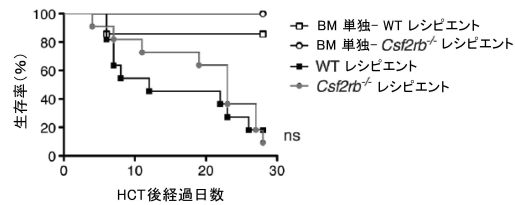
40

50

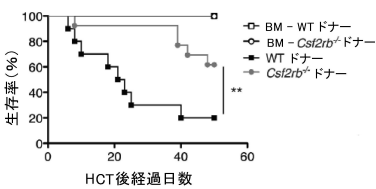
【図 8 B】



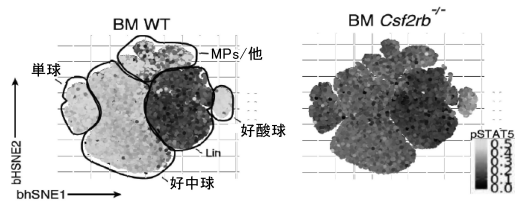
【図 9 A】



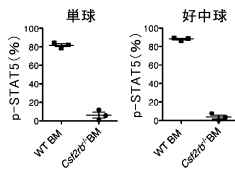
【図 9 B】



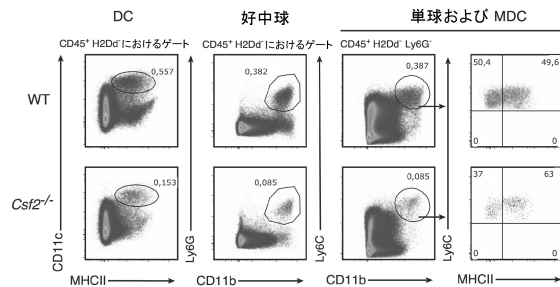
【図 9 C】



【図 9 D】



【図 9 E】



10

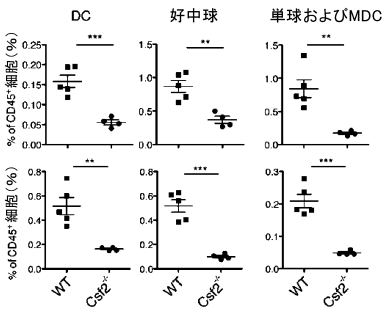
20

30

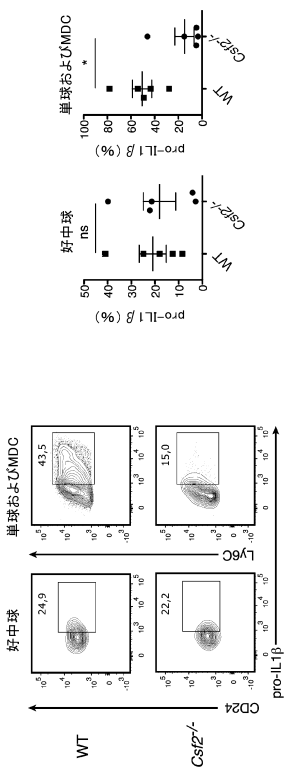
40

50

【図 9 F】



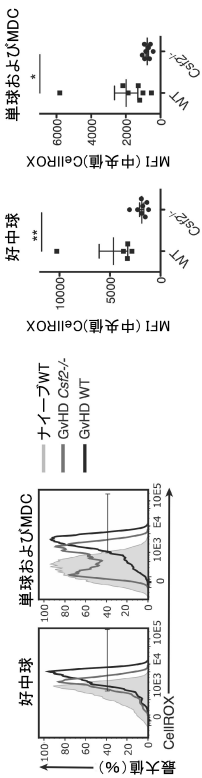
【図 9 G】



10

20

【図 9 H】



30

40

50

【配列表】  
0007278296000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

|                |              |                  |                |              |
|----------------|--------------|------------------|----------------|--------------|
| <b>C 1 2 N</b> | <b>15/13</b> | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>48/00</b> |
| <b>C 0 7 K</b> | <b>16/28</b> | <b>(2006.01)</b> | <b>C 1 2 N</b> | <b>15/13</b> |
|                |              |                  | <b>C 0 7 K</b> | <b>16/28</b> |

## (33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

## (31)優先権主張番号 18194549.4

## (32)優先日 平成30年9月14日(2018.9.14)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

## (31)優先権主張番号 16/269,572

## (32)優先日 平成31年2月7日(2019.2.7)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (56)参考文献

特開2016-117700(JP, A)

特開2007-116947(JP, A)

米国特許出願公開第2015/0246969(US, A1)

米国特許出願公開第2015/0376285(US, A1)

特表2011-518857(JP, A)

特表2002-541195(JP, A)

Clinical Trial : Study NCT02546284, 2017年03月13日, <https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT02546284?A=10&B=10&C=merged#StudyPageTop>

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 39/00-39/44

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 38/00-38/58

A 6 1 K 45/00-45/08

A 6 1 P 1/00-43/00

C 1 2 N 15/00-15/90

C 0 7 K 1/00-19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)