

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-515144

(P2022-515144A)

(43)公表日 令和4年2月17日(2022.2.17)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z 4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全54頁) 最終頁に続く

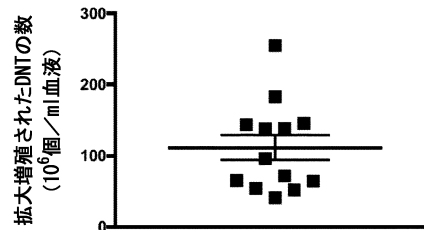
(21)出願番号	特願2021-535618(P2021-535618)	(71)出願人	508265055
(86)(22)出願日	令和1年12月19日(2019.12.19)		ユニバーシティー ヘルス ネットワーク
(85)翻訳文提出日	令和3年8月11日(2021.8.11)		カナダ国 オンタリオ州 トロント エリ
(86)国際出願番号	PCT/CA2019/051866		ザベス ストリート 190 アール・フ
(87)国際公開番号	WO2020/124248		レーザ エリオット ビルディング ル
(87)国際公開日	令和2年6月25日(2020.6.25)		ーム 1エス 417
(31)優先権主張番号	62/782,005	(74)代理人	100102978
(32)優先日	平成30年12月19日(2018.12.19)		弁理士 清水 初志
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 オフザシエルフのダブルネガティブT細胞の産生および治療的使用

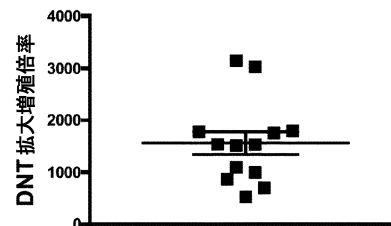
(57)【要約】

オフザシエルフ細胞療法としての、がんの処置のための凍結保存可能なダブルネガティブT細胞(DNT)の産生および使用のための方法を記載する。DNTの試料集団は、1つまたは複数のドナーからのDNTを使用して拡大増殖される。異なるドナーからのDNTの拡大増殖された集団は、拡大増殖された集団中の同種細胞に対して同種反応性を示さない。DNTの拡大増殖された集団は、凍結保存された産物として長期貯蔵することができる。

A



B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a. ダブルネガティブT細胞 (DNT) の試料集団を提供する段階であって、DNTの該試料集団が、1つまたは複数のドナーからのDNTを含む、段階；
- b. 培養培地中でDNTの該試料集団を培養して、DNTの拡大増殖された集団を産生する段階；
- c. 貯蔵培地中にDNTの該拡大増殖された集団を再懸濁する段階；および任意で
- d. 該貯蔵培地にDMSOを、約3%から約15%の間のDMSO、任意で約5%から10%の間のDMSOの終濃度まで添加する段階
- を含む、治療応用のためのDNTの集団を生産する方法。

10

【請求項 2】

貯蔵培地にDMSOを、約3%から約15%の間のDMSO、任意で約5%から10%の間のDMSOの終濃度まで添加する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

DNTの試料集団が、2つ以上のドナーからのDNTを含み、DNTの拡大増殖された集団中のDNTが、互いに対して同種反応性ではない、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

培養培地が動物血清不含培地である、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

培養培地が、AIM-V、GT-T551、Stemline T cell Expansion Medium、Immuno cult-XF T cell Expansion Medium、Human StemXVivo, Serum-Free Human T cell Base Media、CTS T-cell Expansion SFM、Prime-XV T cell expansion XSFM、または動物由来成分を有しない等価のヒトT細胞培養培地を含む、請求項4記載の方法。

20

【請求項 6】

培養培地が、ヒト血液由来成分、血漿、血清、またはHSA、任意でヒト血漿をさらに含む、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

ヒト血液由来成分が、DNTの試料集団に対して自己由来である、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

ヒト血液由来成分が、DNTの試料集団に対して同種である、請求項6記載の方法。

30

【請求項 9】

ヒト血液由来成分が、1人または複数人のドナーからのヒト血液由来成分を含む、請求項6記載の方法。

【請求項 10】

培養培地中のヒト血液由来成分が、1～20%の濃度である、請求項6～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

培養培地が、組換えIL-2、IL-15、IL-7、IFNガンマ、抗4-1BB、抗CD28、抗OX40、抗ICOS、抗CD40、組換えCD83、MIP-1a、IL-6、IL-8、IL-21、Jq1阻害剤および/または抗CD3を含む、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 12】

培養培地が、約50～800IU/mlのIL-2および/または約0.05～1μg/mlの抗CD3を含む、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

DNTの試料集団が、末梢血からのDNTを含み、DNTの拡大増殖された集団が、末梢血1ミリリットルあたり少なくとも0.2、0.5、0.8または 1.0×10^8 個のDNTをもたらす、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

DNTの拡大増殖された集団が、少なくとも80%のDNT、任意で少なくとも90%のDNT

50

を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

前記細胞を分割して、細胞集団を培養培地1mlあたり10万個超かつ培養培地1mlあたり400万個未満に維持する段階を含み、かつ/またはDNTを少なくとも5日、少なくとも8日、少なくとも10日、少なくとも12日、少なくとも14日、少なくとも17日、少なくとも20日、もしくは少なくとも25日、任意で10日～20日にわたり培養する段階を含む、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

DNTの試料集団が、末梢血、白血球フェレーシス、ロイコパック(Leukopak)、骨髓および/または臍帯血試料からのDNTを含む、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項17】

DNTの集団が、遺伝子改変されている、請求項1～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

a. 貯蔵培地中にダブルネガティブT細胞(DNT)の集団を再懸濁する段階；
b. 該貯蔵培地にDMSOを、約5%から約10%の間のDMSOの終濃度まで添加する段階；
および
c. 該貯蔵培地中のDNTの該集団を-70よりも低い温度で凍結保存する段階
を含む、DNTを凍結保存するための方法。

【請求項19】

貯蔵培地中にDNTの集団を再懸濁する前に、DNTの該集団が、エキスビボで拡大増殖されており、任意で、該集団が、請求項1～17のいずれか一項記載の方法により拡大増殖されている、請求項18記載の方法。 20

【請求項20】

前記細胞を凍結保存する段階の前に、該細胞が、エキスビボで5～25日、任意で約8～20日、または約10日にわたり拡大増殖される、請求項19記載の方法。

【請求項21】

DNTが、貯蔵培地中に約 2.5×10^7 ～約 2.5×10^8 個/ml、任意で約 $5 \sim 10 \times 10^7$ 個/mlの終濃度である、請求項18～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

DNTの集団が、10未満に冷却されているが凍っていない貯蔵培地中に再懸濁され、任意で、該貯蔵培地が、約8、6、4、または2に冷却されている、請求項18～21のいずれか一項記載の方法。 30

【請求項23】

貯蔵培地に添加される前のDMSOが、貯蔵培地の約10%～約20%の濃度、任意で、約10%、約15%または約20%の濃度である、請求項18～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

DMSOの終濃度が、約5%～約8.5%、任意で約7.5%である、請求項18～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】

貯蔵培地が、動物血清、任意でウシ胎仔血清を含む、請求項18～24のいずれか一項記載の方法。 40

【請求項26】

貯蔵培地が、動物血清不含、好ましくはCryostor(商標)である、請求項18～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】

凍結保存された細胞を-130よりも低い温度で、任意で液体窒素中で、貯蔵する段階をさらに含む、請求項18～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

凍結保存された細胞を-130よりも低い温度で貯蔵する前に、DNTの集団を-70～-90の温度で少なくとも8時間、少なくとも10時間、少なくとも12時間、または少なく 50

とも16時間にわたり貯蔵する段階を含む、請求項27記載の方法。

【請求項29】

請求項1～17のいずれか一項により生産された、または請求項18～28のいずれか一項により凍結保存された、DNTの集団であって、

任意で、該DNTが、生存率および/または機能を低下することなく少なくとも10日、少なくとも300日、少なくとも400日、または少なくとも600日にわたり凍結保存されることができ、

DNTの前記集団。

【請求項30】

2つ以上のドナーからのDNTを含み、かつ、がんの処置のための1つまたは複数の対象における使用または投与用である、請求項18～29のいずれか一項記載の方法により凍結保存されたDNTの集団。

10

【請求項31】

DNTが、1つまたは複数の表面マーカー、サイトカインおよび/またはケモカインを発現する、請求項1～17のいずれか一項により生産されたまたは請求項18～28のいずれか一項により凍結保存されたDNTの集団。

【請求項32】

拡大増殖の前にCD3を発現するがCD4もCD8も発現せず、かつ/または、拡大増殖の少なくとも5日、10日、14日、17日、もしくは20日後にCD3を発現するがCD4もCD8も発現しない、請求項31記載のDNTの集団。

20

【請求項33】

DNTが、CD11a+、CD18+、CD10-、および/またはTCR V 24-J 18-である、請求項31または32記載のDNTの集団。

【請求項34】

DNTが、CD49d+、CD45+、CD58+ CD147+ CD98+ CD43+ CD66b- CD35- CD36-および/またはCD103-である、請求項31または32記載のDNTの集団。

【請求項35】

表面マーカーが、1つもしくは複数の細胞傷害性分子、例えばパーフォリン、グラムエンザイム (gramenzyme) TRAIL、NKG2D、DNAM-1、Nkp30および/もしくはKIR2DS4、免疫共刺激分子、例えばCD28、CD27、CD30、GITR、CD40Lおよび/もしくはHVEM、免疫共抑制分子、例えばTIM-3、LAIR1、NKG2A、CD94、LAG-3、CD160および/もしくはBTLA、接着分子、例えばLFA-1、CD44、CD49dおよび/もしくはCD62L、ならびに/またはケモカイン受容体、例えばCXCR3、CCR3、CCR6および/もしくはCCR9、サイトカイン受容体、例えばCD122および/もしくはCD127を含む、請求項31～34のいずれか一項記載のDNTの集団。

30

【請求項36】

抗TIM3、抗NKG2A、抗LAIR1、抗CD94、抗LAG3、抗CD160および/もしくは抗BTLAアンタゴニスト剤を使用して免疫共抑制分子を抑制する段階、ならびに/または抗CD28、抗CD27、抗GITR、抗CD40L、抗HVEMおよび/もしくは抗CD30アゴニスト剤を使用して免疫共刺激分子を強化する段階を含む、DNTの活性を強化するための方法。

40

【請求項37】

所望の標的組織ならびに部位で接着リガンド/受容体をCD44、CD49dおよび/もしくはCD62Lに、ならびに/またはケモカインをCXCR3、CCR3、CCR6および/もしくはCCR9に誘導または送達する段階を含む、DNTの組織輸送およびホーミングをモジュレートするための方法。

【請求項38】

DNTが、免疫共抑制分子PD-1および/またはCTLA-4の無発現または低発現を有し、PD-1および/もしくはCTLA-4経路媒介性のT細胞抑制および疲弊、ならびに/またはがん免疫抑制もしくは回避メカニズムに抵抗性である、請求項1～17のいずれか一項により生産された、または請求項18～28のいずれか一項により凍結保存された、DNTの集団

50

。

【請求項 39】

同種の正常細胞に対してインビトロで細胞傷害性ではない、請求項29～35または38のいずれか一項記載のDNTの集団。

【請求項 40】

同種および異種の正常細胞に対してインビボで細胞傷害性ではない、請求項29～35、38または39のいずれか一項記載のDNTの集団。

【請求項 41】

対象における同種免疫細胞媒介性拒絶に対してインビボで抵抗性である、請求項29～35または38～40のいずれか一項記載のDNTの集団。

10

【請求項 42】

TCRおよび/またはMHC-I/IIの発現を低減または防止するように遺伝子改変されていない、請求項29～35または38～41のいずれか一項記載のDNTの集団。

【請求項 43】

その抗腫瘍活性を強化するためおよびレシピエントのリスクを低減するために遺伝子改変されている、請求項29～35または38～42のいずれか一項記載のDNTの集団。

【請求項 44】

2つ以上のドナーからの同種DNTが、エクスピボで拡大増殖される前に組み合わせられる、請求項29～35または38～43のいずれか一項記載のDNTの集団。

【請求項 45】

2つ以上のドナーからの同種DNTが、組み合わせられてDNTの集団を形成する前にエクスピボで別々に拡大増殖される、請求項29～35または38～43のいずれか一項記載のDNTの集団。

20

【請求項 46】

対象中に少なくとも24時間、または少なくとも2日、または少なくとも3日、または少なくとも4日、または少なくとも5日、少なくとも10日、少なくとも2週間、少なくとも3週間、または少なくとも4週間にわたり残留する、請求項29～35または38～45のいずれか一項記載のDNTの集団。

【請求項 47】

それを必要とする対象におけるがんの処置のための、請求項29～35または38～46のいずれか一項記載のDNTの集団の使用。

30

【請求項 48】

それを必要とする対象に、請求項29～35または38～46のいずれか一項記載のDNTの集団を投与する段階を含む、該対象におけるがんを処置する方法。

【請求項 49】

DNTの集団が、1つまたは複数のドナーからの同種DNTを含む、それを必要とする対象におけるがんを処置するためのDNTの集団の有効量の使用。

【請求項 50】

DNTの集団が、2つ以上のドナーからの同種DNTを含む、請求項49記載の使用。

【請求項 51】

対象が、DNTの集団の使用または投与の前または途中で免疫抑制療法を施されない、請求項48～50のいずれか一項記載の方法または使用。

40

【請求項 52】

DNTの集団が、1つまたは複数のドナーからのDNTの単回拡大増殖に由来し、かつ、単一のがん患者への単回または複数回の使用または投与用である、請求項48～51のいずれか一項記載の方法または使用。

【請求項 53】

DNTの集団が、1つまたは複数のドナーからのDNTの単回拡大増殖に由来し、かつ、がんの処置のための複数の対象への単回または複数回の使用または投与用である、請求項48～50のいずれか一項記載の方法または使用。

50

【請求項 5 4】

同種DNTが、エクスピボで拡大増殖されており、任意で、同種DNTが、請求項1～17のいずれか一項記載の方法により拡大増殖されており、かつ/または請求項18～30のいずれか一項により凍結保存されている、請求項48～53のいずれか一項記載の方法または使用。

【請求項 5 5】

対象への同種造血幹細胞（同種HSC）の集団の使用または投与をさらに含む、請求項48～54のいずれか一項記載の方法または使用。

【請求項 5 6】

同種HSCが、末梢血、白血球アフェレーシス、骨髄または臍帯血に由来し、任意で、同種HSCが、G-CSFを使用して動員される、請求項55記載の方法または使用。

10

【請求項 5 7】

DNTが、同種HSCと同時または異なる時間での対象への使用または投与用である、請求項55または56の方法または使用。

【請求項 5 8】

DNTおよびHSCが、同じまたは異なるドナーに由来する、請求項55～57のいずれか一項記載の方法または使用。

【請求項 5 9】

対象への末梢血単核細胞（PBMC）の集団の使用または投与をさらに含む、請求項48～58のいずれか一項記載の方法または使用。

20

【請求項 6 0】

PBMCが、リンパ球、任意で通常型CD4+ CD8+ T細胞である、請求項58記載の方法または使用。

【請求項 6 1】

DNTが、PBMCと同時または異なる時間に対象に投与される、請求項59または60記載の方法または使用。

【請求項 6 2】

CD3に対する抗体の使用または投与をさらに含む、請求項48～61のいずれか一項記載の方法または使用。

【請求項 6 3】

対象における非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、または急性もしくは慢性の骨髄性もしくはリンパ性白血病の処置のための、請求項48～62のいずれか一項記載の方法または使用。

30

【請求項 6 4】

(a) ダブルネガティブT細胞（DNT）の試料集団を提供する段階であって、DNTの該試料集団が、2つ以上のドナーからのDNTを含む、段階；

(b) 培養培地中でDNTの該試料集団を培養して、DNTの拡大増殖された集団を産生する段階

を含む、DNTの集団をエクスピボで拡大増殖させる方法。

【請求項 6 5】

DNTの拡大増殖された集団中の第1のドナーからのDNTが、第2のドナーからのDNTに対して同種反応性ではない、請求項64記載の方法。

40

【請求項 6 6】

培養培地が、動物血清不含培地、任意でAIM-Vである、請求項64または65記載の方法。

【請求項 6 7】

培養培地が、血漿、任意でヒト血漿をさらに含む、請求項64～66のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 8】

血漿が、DNTの試料集団に対して同種であり、任意で、血漿が、2つ以上のドナーからの血漿を含む、請求項67記載の方法。

50

【請求項 69】

培養培地中の血漿が、2～15%の濃度である、請求項67または68記載の方法。

【請求項 70】

DNTの試料集団が、末梢血からのDNTを含み、任意で、DNTの拡大増殖された集団が、末梢血1ミリリットルあたり少なくとも0.5、0.8または 1.0×10^8 個のDNTをもたらす、請求項64～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項 71】

DNTの拡大増殖された集団が、少なくとも80%のDNT、任意で少なくとも85%または90%のDNTを含む、請求項64～70のいずれか一項記載の方法。

【請求項 72】

前記細胞を分割して、細胞集団を培養培地1mlあたり10万個超かつ培養培地1mlあたり400万個未満に維持する段階を含む、請求項64～71のいずれか一項記載の方法。

【請求項 73】

(a) 貯蔵培地中にダブルネガティブT細胞(DNT)の集団を再懸濁する段階；
 (b) 該貯蔵培地にDMSOを、約5%から約15% DMSOの間の終濃度まで添加する段階；および
 (c) 該貯蔵培地中のDNTの該集団を-70℃よりも低い温度で凍結保存する段階を含む、DNTを凍結保存するための方法。

【請求項 74】

段階(a)の前に、DNTの集団を請求項64～72のいずれか一項記載の方法によりエキソビポで拡大増殖させる段階をさらに含む、請求項73記載の方法。

【請求項 75】

それを必要とする対象に、請求項64～72のいずれか一項記載の方法により拡大増殖されかつ/または請求項73もしくは74記載の方法により凍結保存されたDNTの集団を投与する段階を含む、該対象におけるがんを処置する方法。

【請求項 76】

それを必要とする対象におけるがんの処置のための、請求項64～72のいずれか一項記載の方法により拡大増殖されかつ/または請求項73もしくは74記載の方法により凍結保存されたDNTの集団の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる、2018年12月19日に出願された米国仮特許出願第62/782,005号の優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、ダブルネガティブT細胞(DNT)、より具体的には、凍結保存可能なDNTの調製およびがんの処置のためのオフザシェルフ養子細胞療法としてのDNTの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

種々の血液悪性腫瘍および固形悪性腫瘍を処置するためにT細胞を使用する養子細胞療法(ACT)の有効性が、複数の臨床試験で実証されている^{1,2}。免疫細胞を遺伝子改変してキメラ抗原受容体(CAR)またはトランスジェニックT細胞受容体を発現させること、および人工抗原提示細胞の使用などの技術の進歩が、ACTの治療効力を改善するためになされている^{3,4}。近年、CD19-CAR T細胞療法は、B細胞悪性腫瘍を有する患者において有効な臨床応答を達成し¹、FDAがこれらの疾患に対する臨床使用を承認している⁵。しかし、ACTで処置する必要がある患者の数が増加し続けているので、治療的に意味のあ

10

20

30

40

50

る数のT細胞を産生する不確実性を結果として生じる、洗練された拡大増殖、細胞の拡大増殖に必要とされる時間、細胞の拡大増殖のための臨床的に承認された施設の必要性、製造された細胞産物のばらつき、および高い生産コストを含む、現在のACTの形式の限界が明白になった⁶。

【0004】

同種造血幹細胞移植（同種HSCT）は、複数の種類の造血器悪性腫瘍を有する患者に対して長期治癒可能性を有する標準セカンドライン処置である⁷。同種HSCTの治療上の利益は、従来の導入化学療法に抵抗性の白血病芽球を標的とするドナー由来免疫細胞媒介性の移植片対白血病（GvL）効果から生じる⁷。同種HSCTを受けている患者における生存期間の改善は、免疫細胞媒介性のGvL効果の効力を実証しているが、その効果は不完全である。GvL効果を押し上げるために、患者をドナーリンパ球輸注（DLI）で処置することができ、DLIでは、移植後の疾患再発を予防または治療するための予防または治療レジメンとして、HSCドナーの末梢からの成熟リンパ球が、移植レシピエントに与えられる⁸。それにもかかわらず、再発疾患が主な死因のままであり、同種HSCT患者の30～40%に見られる⁹。

10

【0005】

さらに、同種HSCTは、高い処置関連毒性と関連する。これらのうち、移植片対宿主病（GvHD）は、同種HSCTを受けている患者における非再発死亡（NRM）の主因である^{10, 11}。GvHDは、ドナー由来免疫細胞がレシピエントの正常な同種組織を外来として認識し、それを攻撃することにより起こる。急性GVHDは、処置された患者の30～50%に見られ、14%がより重症のグレードIIIまたはグレードIVを患っており、慢性GvHDは、同種HSCTレシピエントの30～70%に出現する^{10, 11}。GvHDは、患者の生活の質を顕著に損ない、罹患率および死亡率を増加させる。残念ながら、現在利用可能な免疫抑制薬は、ドナー由来T細胞を標的としており、GvL効果を誘発するT細胞とGvHDを誘発するT細胞とを区別しない。したがって、現在の形の免疫抑制薬の副作用は、疾患再発および感染症のリスク増加を含む。したがって、同種HSCTの補助として使用する場合に、GvHDなしにGvLを誘発する、またはGvLを維持しながらGvHDを制御することができる処置が、同種HSCT患者にとっての「聖杯」である。

20

【0006】

オフザシェルフACTは、同種ドナーから細胞の大きなバッチを生成し、多数の患者を処置するためにそれを使用することに焦点を合わせている¹²。このアプローチは患者特異的ではないので、細胞産物を予備製造して時間を節約することができる^{6, 12}。大量生産により、産物の一貫性、入手性、および信頼性も低コストで上がる。しかし、有効な、臨床応用可能なオフザシェルフ同種T細胞療法は、以下の基準を満たすべきである：1）臨床的に適合した条件下で治療的に意味のある数に拡大増殖可能である；2）移植片対宿主病（GvHD）を引き起こさない；3）ドナー非制限的に多数のがんを標的とすることが可能である；4）レシピエントの免疫システムによって拒絶されずに十分に残留することができる；5）その機能を妨害せずにGMP条件下で貯蔵することができる。本発明者らの知るかぎりでは、長期貯蔵能を有し、宿主対移植片（HvG）拒絶を避けることができる一方で、いかなる遺伝子改変もなしにオフザシェルフ療法のための必要条件を満たす、養子細胞療法を示す報告は、これまでにない。

30

40

【0007】

ダブルネガティブT細胞（DNT）は、末梢T細胞の3～5%を構成する成熟T細胞であって、CD4およびCD8を発現せずにCD3を発現することによって定義される^{13～15}。近年、健康なドナー（HD）由来同種DNTが、インビトロおよび患者由来異種移植モデルにおいて急性骨髄性白血病（AML）を標的とすること、ならびに通常型化学療法と相乗的な抗がん活性を有することが実証された^{13～15}。

【発明の概要】

【0008】

一局面では、本発明者らは、長期貯蔵のために凍結保存することができるDNTをGMP条

50

件下で治療レベルに拡大増殖させる方法を開発し、フローサイトメトリーに基づく高スループットスクリーニングを使用してその表面分子発現パターンを特徴付けた。様々なドナー起源のDNTにより誘発される複数の種類のがんに対する細胞傷害性ならびにインビトロおよび異種移植モデルにおけるその腫瘍以外に対する(off-tumor)毒性を評価し、細胞の生存率および機能に対するGMP条件下での凍結保存の影響を決定することにより、臨床グレードのDNTのオフザシェルフの潜在性が検討された。さらに、通常型同種T細胞に対するDNTのインビトロおよびインビボ感受性が決定された。

【0009】

一局面では、本発明者らは、がんを処置するための単独療法として、または同種造血幹細胞移植(同種HSCT)の補助としてのオフザシェルフDNTの適用を検討した。末梢血単核細胞(PBMC)と共に注入されたDNTは、DNT単独療法よりも優れた抗白血病活性を示し、異種移植モデルにおいてPBMC単独療法よりも低減した、腫瘍以外に対する毒性を示した。

10

【0010】

注目すべきことに、実施例1に示すように、臨床グレードDNTは、17日で純度90%を有して1558±795.5倍に拡大増殖した。拡大増殖されたDNTは、単一のドナーからのDNTが複数の白血病標的をターゲティングし、様々なドナーからのDNTが同じ標的に対して類似の程度の抗白血病活性を示すという、様々な種類のがんに対するドナー非限定的で強力なインビトロ細胞傷害活性を示した。DNTは、エプスタイン-バーウイルス形質転換リンパ芽球様細胞株(EBV-LCL)の致死用量を注入されたマウスの生存期間を増大させ、ヒト白血病異種移植モデルにおいて白血病生着を有意に低減した。本発明者らは、臨床グレードの凍結保存可能なDNTを拡大増殖させるためのプロトコル、ならびに生存率および抗がん機能を少なくとも600日にわたり維持した、GMP準拠試薬を使用してそれらを最適に凍結保存するためのプロトコルを確立した。重要なことに、生きた同種DNTは、同種反応性CD8⁺T細胞の細胞傷害性をインビトロで誘発せず、マウスへの生きたDNTと、異なるドナーからのPBMCとの同時注入の結果、DNTに対する細胞傷害性の非存在下でDNTおよびPBMC由来同種通常型T細胞の同時生着が生じたが、これは、宿主対移植片反応の欠如を示唆している。したがって、本明細書に記載される方法は、オフザシェルフ養子細胞療法の必要条件を満たす、治療数の凍結保存可能な臨床グレードDNTを生成するために有用である。

20

30

【0011】

実施例2に示すように、臨床グレードDNTは、拡大増殖の間に相互に対する同種反応性を発生することなく同じ培養物中に複数の異なる(同種)ドナーから拡大増殖することができる。プールされたドナー試料からエクスピボで拡大増殖されたDNTの特徴付けにより、拡大増殖された同種細胞が正常細胞に対する細胞傷害性を誘発もせず、移植片対宿主病(GvHD)を引き起こしもせずに、がん細胞に対する細胞傷害性を維持したことが示された。したがって、一態様では、

a) ダブルネガティブT細胞(DNT)の試料集団を提供する段階であって、DNTの該試料集団が、1つまたは複数のドナーからのDNTを含む、段階;および

b) 培養培地中でDNTの該試料集団を培養して、DNTの拡大増殖された集団、任意でDNTの臨床グレードの集団を産生する段階

40

を含む、DNTの集団をエクスピボで拡大増殖させる方法が、提供される。

【0012】

一態様では、DNTの試料集団は、2つ以上のドナーからのDNTを含む。一態様では、DNTの試料集団は、末梢血、白血球アフェレーシス、ロイコパック(Leukopak)、骨髄および/または臍帯血試料からのDNTを含む。

【0013】

一態様では、異なるドナーからのDNTは、DNTの拡大増殖された集団中で互いに対して同種反応性ではない。一態様では、試料集団中の異なるドナーからのDNTは、相互に対して同種反応性ではない。一態様では、培養培地は動物血清不含培地である。一態様では

50

、培養培地は、ヒト血液由来成分、任意で、ヒト血漿、血清、またはHSAをさらに含む。ヒト血液由来成分は、DNTの試料集団に対して自己由来または同種であり得る。任意で、ヒト血液由来成分は、1人または複数人のドナーからの血漿を含む。一態様では、培養培地中のヒト血液由来成分の濃度は約1~20%である。一態様では、培養培地中の血漿濃度は2~15%である。一態様では、DNTの試料集団は、末梢血からのDNTを含む。一態様では、DNTの拡大増殖された集団は、末梢血1ミリリットルあたり少なくとも0.1、0.2、0.5、0.8または 1.0×10^8 個のDNTをもたらす。

【0014】

一態様では、DNTの拡大増殖された集団は、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%または90%のDNTを含む、またはそれからなる。一態様では、該方法は、細胞を分割して、細胞集団を培養培地1mlあたり10万個超かつ培養培地1mlあたり400万個未満に維持する段階を含む。

10

【0015】

実施例3に示すように、DNTの長期凍結保存へのさらなる研究により、細胞の生存率および細胞傷害活性を少なくとも600日保った凍結保存方法が同定された。

【0016】

一態様では、治療応用のためのダブルネガティブT細胞(DNT)の集団を生産する方法が提供される。一態様では、該方法は、

DNTの試料集団を提供する段階であって、DNTの該試料集団が1つまたは複数のドナーからのDNTを含む、段階；

20

培養培地中でDNTの該試料集団を培養して、DNTの拡大増殖された集団を産生する段階であって、任意で、該培養培地がGMPに準拠している、段階；

貯蔵培地中にDNTの該拡大増殖された集団を再懸濁する段階；および任意で

該貯蔵培地にDMSOを、約3%から約15%の間のDMSO、任意で約5%から10%の間のDMSOの終濃度まで添加する段階を含む。

【0017】

一態様では、該方法は、貯蔵培地にDMSOを、約3%から約15%の間のDMSO、任意で約5%から10%の間のDMSOの終濃度まで添加する段階を含む。

【0018】

DNTを凍結保存するための方法もまた、提供される。一態様では、該方法は、

a) 拡大増殖されたDNTの集団を貯蔵培地中に再懸濁する段階；

b) 該貯蔵培地にDMSOを、約3%から約15%の間のDMSOの終濃度まで添加する段階；および

c) 該貯蔵培地中のDNTの該集団を-70よりも低い温度で凍結保存する段階を含む。

30

【0019】

一態様では、DNTの集団は、貯蔵培地中にDNTの集団を再懸濁する前に、任意で、本明細書に記載されるDNTを拡大増殖させるための方法により、エクスピボで拡大増殖されている。

40

【0020】

一態様では、貯蔵培地中のDMSOの終濃度は、約3%~約15%、任意で約5%~10%である。一態様では、DMSOは、貯蔵培地に添加される。一態様では、DNTは、貯蔵培地中に約 2.5×10^7 ~約 2.5×10^8 個/ml、任意で約 $5 \sim 10 \times 10^7$ 個/mlの終濃度である。

【0021】

本明細書に記載の方法により生産、拡大増殖および/または凍結保存されたDNTの集団もまた提供される。一態様では、該集団は、1つまたは複数のドナーからのDNTの単回拡大増殖に由来し、かつがんの処置のための1つまたは複数の対象における使用または投与用である。一態様では、DNTの集団は、1つまたは複数のドナーからのDNTの単回拡大

50

増殖に由来し、かつがんを有する1つの対象に対する1つまたは複数の処置における使用または投与用である。一態様では、DNTの集団は、2つ以上のドナーからのDNTを含み、がんの処置のための使用または投与用である。

【0022】

一態様では、DNTの集団は、拡大増殖の前にCD3を発現するがCD4もCD8も発現せず、かつ/または拡大増殖の少なくとも5日、10日、14日、17日、もしくは20日後にCD3を発現するがCD4もCD8も発現しない。

【0023】

一態様では、DNTの集団は、CD11a+、CD18+、CD10-、および/またはTCR V 24-J 18-である。一態様では、DNTの集団は、CD49d+、CD45+、CD58+ CD147+ CD98+ CD43+ CD66b- CD35- CD36-および/またはCD103-である。

【0024】

別の局面では、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、本明細書に記載されるDNTの集団の有効量を、任意で同種HSCおよび/またはPBMCと組み合わせ、対象に投与する段階を含む方法が、提供される。一態様では、DNTの集団は、1つまたは複数のドナー、任意で2つ以上のドナーからの同種DNTを含む。単独療法としての、または同種HSCおよび/もしくはPBMCと組み合わせでの、がんを処置するためのDNTの集団の使用もまた提供され、ここで、DNTの集団は、1つまたは複数のドナー、任意で2つ以上のドナーからの同種DNTを含む。一態様では、本明細書に記載の方法および使用は、単独療法としてのDNTの投与または使用を含む。一態様では、本明細書に記載の方法および使用は、DNTならびに同種HSCおよび/またはPBMCの同時の投与または使用を含む。別の態様では、本明細書に記載の方法および使用は、DNTならびに同種HSCおよび/またはPBMCの異なる時点での投与または使用を含む。注目すべきことに、実施例3および図18Bに示されるように、AMLのNSG異種移植マウスモデルでは、PBMCに続いてDNTで処置されたマウスの骨髄中のAML細胞は検出不能であった。

【0025】

DNTおよびHSCを含む組成物またはキットもまた、提供される。DNTおよびPBMCを含む組成物またはキットもまた、提供される。一態様では、PBMCは、通常型CD4+ CD8+ T細胞などのリンパ球である。一態様では、本明細書に記載のDNTは、それを必要とする対象におけるがんの処置のためのドナーリンパ球輸注と組み合わせた使用のためのものである。一態様では、キットは、異なる容器中にDNTならびにHSCおよび/またはPBMCを含む。

【0026】

一態様では、DNTは、エキスピボで拡大増殖されており、任意で、同種DNTは、本明細書に記載の方法により拡大増殖されている。

【0027】

一態様では、異なるドナーからのDNTは、DNTの集団中で相互に対して同種反応性ではない。一態様では、DNTの集団は、対象における同種免疫細胞媒介性拒絶に対してインピボで抵抗性である。一態様では、DNTの集団は、インピボで対象中に少なくとも10日、任意で、少なくとも2週間、少なくとも3週間、または少なくとも4週間にわたり残留する。

【0028】

本明細書に記載されるDNTの集団を拡大増殖させる、および/または凍結保存するためのキットもまた、提供される。

【図面の簡単な説明】

【0029】

これから図面に関係付けて本発明の態様を説明する。

【0030】

【図1-1】臨床グレードDNTは、GMP条件下で拡大増殖した。(AおよびB)各血液1mlから得られたDNTの数(A)および17日培養後の拡大増殖倍率(B)を示す。各記号

は、11の異なるドナーから得られた13個のDNT培養物のうち1つからの結果を表す。(C)本明細書に記載されるように拡大増殖されたDNTを、免疫細胞サブセットマーカー：CD3、CD4、およびCD8で染色して、細胞の純度をチェックした。示された結果は、13回の拡大増殖から拡大増殖されたDNTの代表である。(D~I)3つのドナーから拡大増殖されたDNTに関するフローサイトメトリーに基づく表面分子高スループットスクリーニングの結果を示す。ヒストグラムは、スクリーニング法の妥当性を確認するためのT細胞関連マーカー、CD2、CD3、およびCD5、ならびにB細胞関連マーカー、CD19およびCD20についての代表的な結果を示す(D)。グラフは、3つのドナーから拡大増殖されたDNT上のT細胞分化マーカー(E)、ケモカイン受容体(F)、細胞傷害性分子(G)、共刺激分子(H)、および共抑制分子(I)の発現を示す。各記号は、1つのドナーからのDNTを表す。示した数字は、DNT上に対応する分子を発現した細胞の%である。水平バーは、平均±SEMを表す。(J)TIM-3抗体の添加は、AML3/OCIに対してDNTにより媒介される死滅レベルを低減した。(K)抗CD3抗体の添加は、AML3/OCIに対してDNTにより媒介される死滅を増加させた。

【図1-2】図1-1の説明を参照のこと。

【図1-3】図1-1の説明を参照のこと。

【図1-4】図1-1の説明を参照のこと。

【図1-5】図1-1の説明を参照のこと。

【図1-6】図1-1の説明を参照のこと。

【図2-1】DNTは、腫瘍以外に対する毒性なしに様々ながん標的に対して細胞傷害活性を誘発する。A)本明細書に記載されるインビトロのフローサイトメトリーに基づく死滅アッセイを使用した、様々ながんの種類：骨髄腫(82)、T細胞白血病(Jurkat)、パーキットリンパ腫(Daudi)、AML(OCI/AML3)、EBV-LCL、大細胞肺癌(H460)、および腺癌(A549)に由来する細胞株に対する、HDから拡大増殖されたDNTの細胞傷害性。実験を3つ組で行い、示された結果は、各標的についての3つを超える独立した実験の代表である。B)2つのHD(HD1およびHD2)から拡大増殖されたDNTおよび原発性AML患者の試料を使用して2つの白血病細胞株、OCI/AML3およびMV4-11に対して行われたインビトロ死滅アッセイにより、単一のドナーからのDNTが複数のがん標的を死滅させることが示されている。実験を3つ組で行った。示された結果は、3つの別々の実験の代表である。C)6つのHDから拡大増殖されたDNTを使用して、同じがん標的、OCI/AML3に対してインビトロ死滅アッセイを行い、該アッセイは、DNTのドナー非限定的な活性を示した。実験を3つ組で行った。示された結果は、3つの類似の独立した実験の代表である。(DおよびE)EBV-LCL(D)またはMV4-11(E)が生着したNSGマウスをDNTまたはPBSの3回の注入で処置した。D)DNT(n=6)またはPBS(n=6)で処置されたEBV-LCL注入マウスの生存率をモニタリングした。示された結果は、異なるドナーからのDNTを用いて行われた3つの別々の実験の代表である。E)骨髄におけるAMLの生着レベルを決定した。示された結果は、4つの別々の実験の代表である。各点は、1匹のマウスからの結果を表し、水平バーは、各群の平均値±SEMを表す。F)白血病芽球および正常細胞を含有する原発性AML患者試料に対して行われたインビトロ死滅アッセイ。左のフローパネルは、白血病細胞を正常細胞と区別するために使用されたゲート設定戦略を示す。ヒストグラムは、DNTにより媒介される腫瘍以外に対する毒性が存在しないのに対し、がん性細胞に対して強力な細胞傷害性を誘発することを示す。実験を3つ組で行った。示された結果は、異なる患者試料で行われた4つの独立した実験の代表である。(GおよびH)AML細胞株MV4-11を接種されたNSGマウスをPBS、ヒトDNTまたはPBMCで処置した。AMLの注射の28日後に、マウスを安楽死させ、肝臓および肺組織をホルマリン固定し、ヘマトキシリンおよびエオジン(H&E)で染色した。G)各群からの肝臓(倍率400×)および肺(倍率200×)の代表的なH&E染色スライドを示す。白い矢印は、胆管を示し、灰色の矢印は細気管支を示し、黒い矢印は血管を示す。PV-門脈；alv-肺胞。H)H&E染色された肺(左)および肝臓(右)スライドの組織損傷を病理学者が盲検的にスコア付けした。各点は、1匹のマウスを表し、水平バーは平

均 ± SEMを表す。示されたデータは、4つの別々の実験の代表である。対応のない学生t検定を使用して、**、p 0.01；***、p 0.001；****、p 0.0001。

【図2-2】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-3】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-4】図2-1の説明を参照のこと。

【図3-1】同種DNTは、臨床適合条件下でその機能を維持しながら凍結保存することができる。(AおよびB)エクスピボで拡大増殖されたDNTを、本明細書に記載される動物血清不含の試薬を使用して凍結保存した。冷凍および融解(FT)後のDNTの生存率%(A)およびインビトロ細胞傷害性(B)を、FTなしの同じ拡大増殖培養物からのDNTと比較した。C)凍結保存されたDNTを使用して、MV4-11を予備注入されたNSGマウスを処置し、図2Eに記載されるように骨髄中の生着レベルを決定した。D)異なる期間(617、534、276、129、および8日)凍ったDNTを解凍し、その生存率(左)および公知のDNT感受性がん標的(OCI/AML3)に対する細胞傷害性(右)をチェックすることにより、凍結保存されたDNTの貯蔵寿命を決定した。示されたデータは、3つの類似の実験の代表である。

【図3-2】図3-1の説明を参照のこと。

【図4-1】DNTは、同種CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の存在下でインビトロおよびインピボで残留することができる。(A~C)CFSE標識され、エクスピボで拡大増殖されたDNTを、亜致死照射NSGマウス(n=12)に静脈内注射した。表示した日に、血液、脾臓、骨髄(BM)、肝臓、および肺からの細胞を、抗ヒトCD45抗体および抗ヒトCD3抗体で染色し、DNTをフローサイトメトリーにより検出した(A、n=3/日)。注射の0、2、7、10、および14日後のDNTのCFSE蛍光強度中央値(MFI)をフローサイトメトリーにより測定した。ヒストグラム(B)および0日目のCFSE MFIに対するCFSE MFIの相対低下(C)を示す。示された結果は、1時点あたり3匹のマウスから得られた結果であり、2つの異なるHDからのDNTを使用した2つの別々の実験の代表である。(D~G)HD1のPBMCおよびHD2の拡大増殖されたDNTを使用して混合リンパ球反応(MLR)を行って、同種T細胞に対する拡大増殖されたDNTの免疫原性を決定した。D)模式図は、行われたMLRを示す。E)HD1のCFSE標識されたまたは未標識のPBMCを、HD1またはHD2の、生きた、または照射された拡大増殖DNTと4~6日共培養した。MLRの終了時に、未刺激対照と比較した。増殖している細胞における増加%を本明細書に記載のように決定した。左のヒストグラムは、CD8⁺ T細胞にゲート設定された代表的なCFSE希釈を示す。実験を3つ組で行い、右の棒グラフは、3つ組の平均を示す。結果は、自己由来DNTについて異なるHDを使用した2つの別々の実験、および同種DNTについて4つの異なるHDペアを使用した5つの別々の実験の代表である。F)生きたまたは照射された自己由来または同種DNTで刺激されたCD8⁺ T細胞によるDNTに対する細胞傷害性のレベルを決定した。MLR後に単離されたHD1 CD8⁺ T細胞を、自己由来(白)または同種(黒)DNTと様々なエフェクター対標的比で共培養した。示された結果は、同種DNTについてドナーの4つのペアを使用する5つの独立した実験、および自己由来DNTについてドナーの2つのペアを用いた2つの独立した実験の代表である。G)亜致死照射マウスにHLA-A2⁺ PBMCおよびHLA-A2⁻ DNT(n=5)を注入した。注入の28日後に、マウスを殺し、肺からの細胞をヒト抗CD45、抗HLA-A2、抗CD3、抗CD4、および抗CD8抗体ならびにDAPIで染色して、ヒトT細胞サブセットの生着を決定した。番号は、対応するゲートにおける細胞の%を表す。棒グラフは、肺におけるHLA-A2⁺ CD4⁺/CD8⁺ T細胞およびHLA-A2⁻ DNTの頻度を示す。各点は、単一のマウスを表す。示された結果は、2つの別々の実験の代表である。

【図4-2】図4-1の説明を参照のこと。

【図4-3】図4-1の説明を参照のこと。

【図4-4】図4-1の説明を参照のこと。

【図5】GMPグレードの試薬を使用する健康なドナー(HD)のDNTの拡大増殖の特徴

付け。2種類の動物血清不含培地（AIM VおよびGT-T551）を含むGMPグレードの試薬を用いてDNTをエキスビボで拡大増殖させた。（AおよびB）2つの異なる培養培地を使用する同じドナーからのDNTの拡大増殖プロファイル（A）および純度（B）。C）2種類の培地を使用して拡大増殖されたDNTのOCI/AML3およびMV4-11に対する細胞傷害性。結果は、3つのHDを使用する3つの実験の代表である。*、 $p < 0.01$ 。

【図6】2つの異なるドナーからのDNTの混合は、相互に対する同種反応性なしに抗白血病機能を保持する。A）HLA-A2⁻ DNT、HLA-A2⁺ DNT、および1：1の比で混合された2つのドナーDNTを使用してインビトロのフローサイトメトリーに基づく死滅アッセイをAML細胞株に対して行った。B）混合を行ったまたは行わなかった各ドナーからの死滅DNTの%を、2時間の共インキュベーション後にフローサイトメトリーにより決定した。結果は、2つの異なるセットのHD DNTを使用する2つの別々の実験の代表である。

10

【図7】同時生着した同種CD8⁺ T細胞は、DNTに対して細胞傷害性ではない。亜致死照射されたマウスにHLA-A2⁺ PBMCおよびHLA-A2⁻ DNTを注入した。PBMC注入の4週間後に、マウスを殺し、脾臓からの細胞をプールし、HLA-A2⁺ CD8⁺ T細胞を単離した。単離されたCD8⁺ T細胞を、インビトロ死滅アッセイにおける異種移植実験のために最初に使用したHLA-A2⁻ DNTに対するエフェクター細胞として、4：1のCD8：DNTで14時間使用した。フロープロットは、HLA-A2⁺ CD8⁺ T細胞と共培養を行うまたは行わないHLA-A2⁻ DNTの生存率を示す。示された結果は、2つの別々の実験の代表である。

【図8】同種DNTのオフザセルフの潜在性。A）異なるHDから拡大増殖されたDNTは、同じAML芽球に対して類似のレベルの細胞傷害性を示す。白血病細胞に対するエフェクターとして6つのHDから拡大増殖されたDNTを使用することにより、死滅アッセイを行った。B）単一のHDからのDNTが多数のAML試料をターゲティングできることを実証する、原発性および不死化AML試料に対して2つの異なるHDから拡大増殖されたDNTを使用する死滅アッセイ。

20

【図9】エキスビボで拡大増殖されたDNTの冷凍のための凍結保護試薬中のDMSOの最適濃度を特定する。（AおよびB）本明細書に記載の方法を使用して健康なドナーからエキスビボで拡大増殖されたDNTを、5%、7.5%、または10% DMSOを含有するFBS中で凍結させた。解凍したDNT細胞の生存率をフローサイトメトリーでアネキシンV染色により決定し（A）、細胞傷害機能を、白血病細胞株に対するフローベースの死滅アッセイにより決定した（B）。水平バーは、平均を表し、エラーバーは、 \pm SEMを表す。統計解析のために対応のない両側スチューデントt検定を使用した。

30

【図10】凍結保存された拡大増殖DNT細胞の生存率および抗白血病活性に対する凍結媒液中の動物血清の効果。（AおよびB）同じ培養物からエキスビボで拡大増殖されたDNT細胞を、動物血清存在下または非存在下で同じ濃度のDMSOを含有する凍結媒液、それぞれFBS + 7.5% DMSOおよびCryostor + 7.5% DMSOの中で凍らせた。解凍した細胞の生存率（A）およびその抗白血病機能（B）を、図9に記載されるように決定した。水平バーは、平均を表し、エラーバーは、 \pm SEMを表す。統計解析のために対応のない両側スチューデントt検定を使用した。

【図11】拡大増殖され凍結保存されたDNTの生存率および機能の検証。（AおよびB）同じ培養物からエキスビボで拡大増殖されたDNT細胞を冷凍した、または培養状態のまま保った。図9に説明するように、解凍後、解凍された細胞の生存率（A）およびその抗白血病機能（B）を、冷凍せずに培養状態を保ったDNTと比較した。水平バーは、平均を表し、エラーバーは、 \pm SEMを表す。統計解析のために対応のない両側スチューデントt検定を使用した。（C）免疫不全NSGマウスに原発性AML試料を生着させ、PBSまたは解凍されたDNTで処理した。収集された骨髄細胞を抗ヒトCD45およびCD33抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析して、AMLの生着レベルを決定した。各点はマウスを表し、バーは、平均を表し、エラーバーは、 \pm SEMを表す。統計解析のために対応のない両側スチューデントt検定を使用した：* $p < 0.05$ 。

40

【図12】以前に確立された研究グレードの拡大増殖方法および本明細書に記載の、新た

50

に確立されたGMPグレードの拡大増殖方法を使用する14～17日のエクスピボ拡大増殖の終了時に獲得されたDNTの数。

【図13】本明細書に記載されたGMP-拡大増殖方法を使用する、血漿(a)またはHSA(b)の存在下または非存在下でのDNTのエクスピボ拡大増殖。

【図14】本明細書に記載のGMP-拡大増殖方法を使用する自己(白の記号)および2つの同種ドナー(黒の記号)から得られた血漿を添加した、DNTのエクスピボ拡大増殖。(bおよびc)自己由来血漿および同種血漿を使用するAML細胞株、AML3/OCIに対するエクスピボで拡大増殖されたDNTの生存率(b)および抗がん活性(c)。

【図15-1】プールされたドナーDNTの拡大増殖。a)HLA-A2発現パターンにより決定した、プールされたドナーDNTの拡大増殖培養の開始時(左)および終了時(右)でのHLA-A2⁻(HD1)およびHLA-A2⁺(HD2)DNTの組成。b)HD1のDNT、HD2のDNT、ならびに拡大増殖の開始時にHD1およびHD2から1:1の比で混合したDNTの拡大増殖プロフィール。c)HLA-A2⁺(左)DNTおよびHLA-A2⁻(右)DNTにゲート設定した、拡大増殖の終了時のDNTの生存率。d)拡大増殖の終了時のHD1のDNT培養物、HD2のDNT培養物、およびHD1とHD2との混合のDNT培養物の純度。数字は、各ゲートでの細胞の頻度を表す。e)様々なエフェクター:標的比での2つのAML細胞株、AML3/OCI(左)およびMV4-11(右)に対するHD1のDNT、HD2のDNT、および混合DNTの細胞傷害性。

10

【図15-2】図15-1の説明を参照のこと。

【図16】HLA-A2-およびHLA-A2+ドナーから得られたDNTをプールし、20日拡大増殖させた。混合DNTの拡大増殖の終了時にHLA-A2-およびHLA-A2+DNTを単離し、自己由来(黒)DNTおよび同種(白)DNTに対するエフェクター細胞として使用した。HD2のDNTで刺激したHD1の通常型CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞(T_{conv})を陽性対照として使用した。

20

【図17】PBMCと組み合わせたDNT療法の有効性および安全性。(AおよびB)担白血病マウスをDNT、PBMC、またはDNT+PBMCで処置した。A)骨髄中の白血病生着レベルを決定することにより各処置の有効性を評価した。B)図2に記載するように各処置により引き起こされた組織損傷レベルを病理学者が盲検的に評価した。C)DNTの存在下または非存在下の異種GvHD誘導ヒトPBMCで処置されたナイーブNSGマウスの生存率。

【図18】DNT療法は、T_{conv}細胞により媒介される移植片対白血病(GvL)活性を妨げずに全体的な抗白血病活性を強化する。(AおよびB)PBMCと組み合わせた場合のDNT細胞の相加的抗白血病活性を決定するために使用した実験モデルを示す模式図(A)。フローサイトメトリープロットは、PBMC+PBSおよびPBMC+DNTで処置されたマウスにおける骨髄白血病生着の代表である。点グラフは、各処置群における白血病生着レベルの概要を示す(B)。(C)生着のために使用した同じ白血病標的に対する、PBMC+PBSおよびPBMC+DNT細胞で処置されたマウスから単離されたCD8⁺T細胞のエクスピボ細胞傷害性を比較することにより決定されたCD8⁺T細胞の抗白血病活性に対するDNT注入の効果。

30

【図19】全血の代わりにPBMCから得られたDNTは、同等の拡大増殖倍率、純度、および抗白血病機能で拡大増殖することができる。全血または白血球アフェレーシス試料から得られたPBMCからDNTを単離した。A)17日拡大増殖されたPBMC由来DNTの純度。B)前記のように全血から得られたPBMCおよびDNTから単離したDNTの間の拡大増殖倍率の比較¹⁶。C)OCI-AML3およびMV4-11に対する、PBMCから単離されたDNTと全血から得られたDNTとのインビトロ細胞傷害性の比較。

40

【発明を実施するための形態】

【0031】

発明の詳細な説明

クリニックで同種T細胞療法を使用する主な限界の1つは、注入されたドナー細胞によるGvHDのリスクである。同種T細胞療法を開発する従来のアプローチは、遺伝子編集もしくはRNA干渉技法を使用してTCR をロックアウト/ダウンすること、または免疫抑制

50

に依存する^{17,18}。しかし、本発明者らは、同種DNTのTCRをロックアウトしなくても同種DNTが正常なPBMCを攻撃せず、TCRを除去する必要のない同種オフザセルフT細胞療法を開発するためのGvHDの問題を克服する新規な方法を提供することを実証した。しかし、DNTが白血病標的に対して活性化された場合、それらが近くの正常細胞に対して細胞傷害性を誘発し得るという可能性がある。エクスピボで拡大増殖されたHDのDNTのがんターゲット活性の間の、該DNTの正常細胞に対する潜在的同種反応性を評価するために、AML患者のPBに由来する白血病試料に対して、同種DNTを使用するインピト死滅アッセイを行った(図2F)。この試料は、CD33、CD34、およびCD45の発現パターンにより規定される白血病細胞と正常細胞との混合物を含有していた。とりわけ、DNTは、2つの白血病芽球集団(P1およびP2)に対して強力な細胞傷害性を誘発したが、正常細胞集団に対して細胞傷害性は見られず(P3; 図2F)、これは、単一の培養物中であっても、DNTが白血病芽球を選択的に認識および標的とすることができ、同じレシピエントからの正常細胞を温存することを実証している。これをさらに検証するために、ヒト担AMLマウスをPBS、PBMCまたはDNTで処置した。インピトの知見と一致して、異種移植モデルにおいてDNTの有意な抗がん活性が観察されたが、PBMC処置群とは異なり、DNT処置マウスは、異種GvHDの徴候を示さなかった(図2G)。PBMC処置マウスからの肝臓組織は、中等度の門脈リンパ球浸潤および重度の胆管損傷を示した(白の矢印)。対照的に、DNT処置マウスは、軽度の門脈リンパ球浸潤を示したが、胆管損傷を示さなかった。PBMC処置マウスは、肺において血管(黒い矢印)および細気管支(灰色の矢印)周囲に重度の炎症を示し、肺胞(alv)周囲に内皮炎および中隔炎もある。対照的に、DNT処置マウスは、血管および細気管支周囲に炎症を示さず、肺胞周囲に内皮炎も中隔炎も示さない。組織スライドに見られる組織損傷を病理学者が盲検的にスコア付けし、PBMC処置群よりもDNT処置群で有意に低い組織損傷スコアを付けた(図2H)。

10

20

30

40

50

【0032】

注入された免疫細胞の残留は、処置のアウトカムと相関することが示された¹⁹。同種療法の一般的な限界は、宿主対移植片(HvG)拒絶と呼ばれる現象を通じた宿主免疫システムによる、注入された細胞の急速な拒絶である^{6,20}。同種T細胞療法についてのHvGの問題を克服するための従来のアプローチは、ベータ2ミクログロブリン(ベータ-2M)鎖を遺伝子編集によりロックアウトすることによりMHC-Iを無力化することを試みているか、または免疫抑制に依存している^{20,21}。ここで驚くことに、本明細書に記載の方法を使用して生成された臨床グレードDNTが同種反応性を誘発せず、遺伝子編集してMHC-Iを除去する必要なしに同種T細胞の存在下で残留することができ、MHC-IもMHC-IIも除去する必要なしに同種オフザセルフ細胞療法を開発するためにHvGの問題を克服する新規な方法を提供すると判定された。図4Dは、同種DNTがレシピエントの通常型T細胞の同種反応性を誘発するかどうかを判定するために行った、HD1のPBMCを自己由来DNTまたはHD2からの同種DNTと共培養した混合リンパ球反応(MLR)を示す。通常型T細胞を活性化しうる同種抗原を同種DNTが保有するかどうかを決定するために、別の群で、MLRの前にDNTに照射を行った。図4Eに示すように、生きたまたは照射された自己由来DNTおよび生きた同種DNTと共培養されたPBMCは、有意なレベルの増殖を示さなかった。対照的に、照射された同種DNTで刺激されたPBMCは、有意なレベルの増殖を誘発したが、これは、照射された同種DNT培養物で示されたように、認識されうる同種抗原をDNTが実際に保有するものの、通常型同種反応性T細胞は生きたDNTにより活性化されないことを示唆している。続いて、CD8⁺細胞傷害性T細胞をMLRから単離し、最初に刺激のために使用されたDNTに対するエフェクター細胞として使用した。自己由来DNTまたは生きた同種DNTで刺激されたCD8⁺T細胞が細胞傷害性を誘発しなかった一方で、照射された同種DNTで刺激されたCD8⁺T細胞は細胞傷害性を誘発したが、これは、生きたDNTが通常型T細胞の同種反応性をもたらさないという考えを裏付けている(図4F)。

【0033】

この知見をインピボで検証するために、NSGマウスにHLA-A2⁺ドナーからのPBMCおよ

びHLA-A2⁻ドナーからのDNTを注入した(図4G)。注入の28日後に、レシピエントマウスの様々な組織から細胞を得て、CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の頻度について分析し、DNTならびにドナーCD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞をHLA-A2の発現により同定した。同じ組織中のHLA-A2⁺ CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびHLA-A2⁻ DNTの残留を検出し、同種DNTが通常型T細胞と同時残留できることを実証した。生着したCD8⁺ T細胞の同種反応性をさらに研究するために、続いてHLA-A2⁺ CD8⁺ T細胞をDNT処置マウスおよびPBMC処置マウスから単離し、異種移植実験のために使用されたものと同じドナー起源のHLA-A2⁻ DNTに対するエフェクターとして使用した。単離されたHLA-A2⁺ CD8⁺ T細胞の存在下でDNT細胞の生存率の有意な減少は見られなかったが(図7)、これは、異種移植モデルで同種CD8⁺ T細胞がDNTに対する同種反応性を発生しなかったことを実証している。まとめると、これらのデータは、エクスピゴで拡大増殖されたDNTが同種免疫細胞媒介性拒絶に抵抗性であることを示唆しており、HvG拒絶に抵抗性であるオフザセルフACTとしての同種DNTの潜在性を臨床試験でさらに検査するための根拠を提供している。

10

【0034】

本明細書に使用される用語「がん」は、身体の随伴組織または他の部分に拡大する可能性がある、細胞の制御されない異常な成長によって引き起こされる疾患群の1つを指す。がん細胞は、がん細胞と一緒にまとまった固形腫瘍を形成することができ、または白血病などの血液がんの場合のように分散した細胞として存在することができる。

【0035】

用語「がん細胞」は、制御されない異常な成長および別の組織に浸潤する能力によって特徴付けられる細胞またはそのような細胞から派生した細胞を指す。がん細胞には、例えば、がんを有する患者から得られる初代がん細胞、またはそのような細胞から派生した細胞株が含まれる。一態様では、がん細胞は、白血病細胞またはリンパ腫細胞などの血液がん細胞である。

20

【0036】

本明細書に使用される用語「対象」は、哺乳動物を含む動物界のすべてのメンバーを含み、適切にはヒトを指す。任意で、用語「対象」は、がんと診断された、または寛解中である哺乳動物を含む。一態様では、用語「対象」は、がんを有する、または有する疑いがあるヒトを指す。

30

【0037】

一態様では、本明細書に記載の方法および使用は、がんの処置を提供する。本明細書に使用され、当技術分野において十分に理解されている用語「処置すること」または「処置」は、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチを意味する。有益なまたは所望の臨床結果は、検出可能であろうと検出不能であろうと、1つまたは複数の症状または状態の軽減または改善、疾患の程度の減少、疾患の安定(すなわち、悪化しない)状態(例えば、患者を寛解に維持すること)、疾患を予防することまたは疾患の拡大を予防すること、疾患の進行の遅延または減速、病状の改善または緩和、疾患の再発の減少、および寛解(部分寛解または全寛解)を含むことができるが、それに限定されるわけではない。「処置すること」および「処置」はまた、処置を受けなかった場合に予想される生存期間と比較して生存期間を延長することを意味することができる。本明細書に使用される「処置すること」および「処置」はまた、予防的処置を含む。一態様では、処置方法は、本明細書に記載されるDNTの治療有効量を対象に投与する段階を含み、任意で、単回投与からなるか、またはその代わりに一連の投与を含む。

40

【0038】

一態様では、本明細書に記載の方法および使用は、DNTの有効量の投与または使用を伴う。一態様では、本明細書に記載の方法および使用は、同種の造血幹細胞(HSC)および/または末梢血単核細胞(PBMC)と組み合わせたDNTの有効量の投与または使用を伴う。一態様では、本明細書に記載の方法および使用は、通常型T細胞などのリンパ球と組み合わせたDNTの有効量の投与または使用を伴う。一態様では、PBMCおよび/また

50

はリンパ球は同種細胞である。本明細書に使用される語句「有効量」または「治療有効量」は、所望の結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効な量を意味する。例えば、がんを処置することに関連して、有効量は、例えば、化合物の投与なしに得られる応答と比較して、寛解を誘発し、腫瘍量を低減し、かつ/または腫瘍の拡大もしくはがん細胞の成長を防止する量である。有効量は、動物の病状、年齢、性別および体重などの要因に応じて変動する場合がある。そのような量に対応する所与の化合物または細胞集団の量は、所与の薬物、化合物または細胞集団、薬学的製剤、投与経路、疾患または障害の種類、処置されている対象または宿主の同一性、その他などの様々な要因に応じて変動するであろうが、それでも当業者により日常的に決定されることができる。

【0039】

一態様では、本明細書に記載の方法および組成物は、DNTの投与または使用を伴う。DNTは、それらを他の種類のT細胞と区別するいくつかの特徴を示す。一態様では、DNTは、CD4もCD8も発現しない。一態様では、10~20日拡大増殖されたDNTは、CD3-TCR複合体を発現し、CD4およびCD8を発現しない。一態様では、拡大増殖されたDNTはまた、CD11a+、CD18+、CD10-、および/またはTCR V 24-J 18-である。一態様では、拡大増殖されたDNTはまた、CD49d+、CD45+、CD58+ CD147+ CD98+ CD43+ CD66b- CD35- CD36-および/またはCD103-である。

【0040】

一態様では、本明細書に記載のDNTは、1つまたは複数の表面マーカー、サイトカインおよび/またはケモカインを発現する。一態様では、表面マーカーは、1つまたは複数の細胞傷害性分子、例えばパーフォリン、グラムエンザイム (gramenzyme) TRAIL、NK G2D、DNAM-1、NKp30および/もしくはKIR2DS4、免疫共刺激分子、例えばCD28、CD27、CD30、GITR、CD40Lおよび/もしくはHVEM、免疫共抑制分子、例えばTIM-3、LAIR1、NKG2A、CD94、LAG-3、CD160および/もしくはBTLA、接着分子、例えばLFA-1、CD44、CD49dおよび/もしくはCD62L、ならびに/またはケモカイン受容体、例えばCXCR3、CCR3、CCR6および/もしくはCCR9、サイトカイン受容体、例えばCD122および/もしくはCD127を含む。

【0041】

一態様では、本明細書に記載のDNTは、免疫共抑制分子PD-1および/またはCTLA-4の無発現または低発現を有し、PD-1および/もしくはCTLA-4経路媒介性のT細胞抑制および疲弊、ならびに/またはがん免疫抑制もしくは回避メカニズムに抵抗性である。

【0042】

本明細書に記載されるDNTは、非限定的に蛍光活性化細胞分取 (FACS) などの、当技術分野において公知の技法を使用して得られる場合がある。

【0043】

本明細書に使用される用語「同種」は、細胞の意図されるレシピエントと異なる個体であるがレシピエントと同じ種である対象から最初に得られた当該細胞を指す。任意で、同種細胞は、細胞培養物からの細胞であり得る。一態様では、DNTは、健康なドナーから得られた同種細胞である。本明細書に使用される用語「健康なドナー」(「HD」)は、がんを有しない1つまたは複数の対象を指す。一態様では、健康なドナーは、白血病細胞が検出不能である対象などの、がん細胞が検出不能の対象である。

【0044】

一態様では、DNTならびに/または同種HSCおよび/もしくはPBMC、任意でドナーリンパ球は、当技術分野において公知の薬学的に許容される製剤を使用する対象への使用のために製剤化されるか、または投与のために調製される場合がある。適切な製剤の選択および調製のための従来の手順および成分は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (2003 - 20th edition)および1999年に刊行されたThe United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19)に記載されている。用語「薬学的に許容される」は、動物、特に、ヒトの処置と適合性であることを意味する。

【0045】

10

20

30

40

50

本明細書に使用される「貯蔵培地」は、当業者により（例えば、拡大増殖培地と比べて）哺乳動物細胞の長期貯蔵のために使用するためと理解される任意の細胞培養培地を指す。貯蔵培地は、細胞の冷凍/凍結保存のために最適化された培地（すなわち、凍結媒液または凍結保存媒）を含む。そのような培地は、動物血清（例えば、ウシ胎仔血清）を含有する場合があり、または動物血清不含の場合がある。例示的な貯蔵培地は、DMSOを加えたFBSおよびCryostor（登録商標）を含む。

【0046】

本明細書に使用される「凍結保存」は、細胞、例えばT細胞および好ましくはDNTが、非常に低い温度に冷却されることにより保存される工程を指す。そのような低温は、-80 10
冷凍器、固体二酸化炭素を使用する-70 ~ -90、好ましくは約-80、または液体窒素を使用する-196 であり、細胞に損傷を引き起こす場合があるいかなる酵素活性または化学活性も減速/停止させるために利用される。凍結保存方法は、冷凍の間に細胞内に氷晶が形成することにより引き起こされる追加的な損傷を引き起こさずに低温に到達することを追求している。

【0047】

DNTの集団を産生し、凍結保存可能なオフザシェルフDNTを拡大増殖させ、かつ/または臨床使用のための拡大増殖されたDNTを凍結保存するための方法

一態様では、ダブルネガティブT細胞（DNT）の集団をエクスピボで拡大増殖させる方法が提供される。一態様では、該方法は、凍結保存可能なオフザシェルフDNTの集団をエクスピボで拡大増殖させるためのものである。一態様では、該方法は、 20

a) DNTの試料集団を提供する段階であって、DNTの該試料集団が、1つまたは複数のドナーからのDNTを含む、段階；および

b) 培養培地中でDNTの該試料集団を培養して、DNTの拡大増殖された集団を産生する段階

を含む。

【0048】

一態様では、DNTの試料集団は、2つ以上のドナーからのDNTを含む。一態様では、培養培地中でDNTの試料集団を培養することにより、DNTの拡大増殖された集団、任意で純度が80%超のDNTの拡大増殖された集団が産生される。

【0049】

一態様では、該方法は、DNTを少なくとも5日、8日または10日、任意で5日~20日にわたり培養する段階を含む。一態様では、DNTは、約8日~17日にわたり培養される。一態様では、該方法は、DNTを少なくとも5日、少なくとも8日、少なくとも10日、少なくとも12日、少なくとも14日、少なくとも17日、少なくとも20日、または少なくとも25日、任意で10日~20日にわたり培養する段階を含む。 30

【0050】

実施例に示されるように、驚くことに複数のドナーからのDNTが互いに対して同種反応性を示さないと判定されている。したがって、一態様では、異なるドナーからのDNTは、拡大増殖の間に互いに対して同種反応性ではない。

【0051】

一態様では、2つ以上のドナーからの同種DNTは、エクスピボで拡大増殖される前に組み合わせられる。一態様では、2つ以上のドナーからの同種DNTは、組み合わせられてDNTの集団を形成する前にエクスピボで別々に拡大増殖される。 40

【0052】

一態様では、培養培地は動物血清不含培地である。一態様では、培養培地は、AIM-V、GT-T551、Stemline T cell Expansion Medium、Immunocult-XF T cell Expansion Medium、Human StemXVivo、Serum-Free Human T cell Base Media、CTS T-cell Expansion SFM、Prime-XV T cell expansion XSFM、または等価の動物血清不含ヒトT細胞拡大増殖培地を含む。一態様では、培養培地はGMPに準拠している。 50

【 0 0 5 3 】

一態様では、培養培地は、ヒト血液由来成分、血漿、血清、またはHSA、任意でヒト血漿をさらに含む。一態様では、ヒト血液由来成分およびDNTは、同じ個体からのもの、すなわちDNTの試料集団に対して自己由来であり得る。注目すべきことに、実施例に示すように、DNTは、DNTの試料集団に対して同種であるヒト血液由来成分を使用して拡大増殖される場合がある。例えば、一態様では、血漿は、1人または複数人のドナー、任意で2人以上のドナーからプールされた血漿を含む。一態様では、培養培地中のヒト血液由来成分の濃度は、1~20%、任意で約2%~15%である。

【 0 0 5 4 】

一態様では、培養培地は、可溶性抗CD3抗体、IL-15、IL-7および/またはIL-2を含む。一態様では、培養培地は、組換えまたは外因性IL-2、IL-15、IL-7、IFNガンマ、抗4-1BB、抗CD28、抗OX40、抗ICOS、抗CD40、組換えCD83、MIP-1a、IL-6、IL-8、IL-21、Jq1阻害剤および/または抗CD3を含む。一態様では、培養培地は、外因性IL-4を含まない。例えば、一態様では、培養培地は、約50~500、もしくは約50~800 IU/mlのIL-2および/または約0.05~1.0 ug/mlの抗CD3を含む。一態様では、該方法は、培養培地に抗CD3抗体および/またはIL-2を添加する段階を含む。

10

【 0 0 5 5 】

図12に示すように、本明細書に記載の方法は、ヒト試料からDNTの顕著な拡大増殖を産生することができる。一態様では、DNTの集団は、末梢血からのDNTを含み、DNTの拡大増殖された集団は、末梢血1ミリリットルあたり少なくとも0.1、0.2、0.5、0.8または 1.0×10^8 個のDNTをもたらす。本明細書に記載の方法はまた、比較的高レベルの純度を有するDNTの集団を産生する。例えば、一態様では、DNTの拡大増殖された集団は、少なくとも50%、60%、70%、75%、または80%のDNT、任意で少なくとも85%または90%のDNTを含むか、またはそれからなる。一態様では、DNTの拡大増殖された集団は、少なくとも80%のDNT、任意で少なくとも85%または90%のDNTを含む。

20

【 0 0 5 6 】

一態様では、該方法は、健康で拡大増殖している細胞集団を維持するために細胞を分割する段階を含む。一態様では、該方法は、細胞を分割して、細胞集団を培養培地1mlあたり10万個超かつ培養培地1mlあたり400万個未満に維持する段階を含む。

【 0 0 5 7 】

様々な起源のDNTの試料集団が、本明細書に記載されるDNTの集団を産生するまたは拡大増殖させるために使用される場合がある。例えば、一態様では、DNTの試料集団は、末梢血、白血球フェレーシス、ロイコパック、骨髄および/または臍帯血試料からのDNTを含むか、またはそれからなる。

30

【 0 0 5 8 】

一態様では、本明細書に記載のDNTは、遺伝子改変されている。例えば一態様では、DNTは、1つまたは複数の外因性タンパク質を発現するように改変されている組換え細胞である。一態様では、DNTは、その抗腫瘍活性を強化するためおよびレシピエントのリスクを低減するために遺伝子改変されている。

【 0 0 5 9 】

別の態様では、DNTは遺伝子改変されていない。一態様では、DNTは、TCRおよび/またはMHC-I/IIの発現を低減または防止するように遺伝子改変されていない。一態様では

40

【 0 0 6 0 】

DNTの凍結保存のための方法

一態様では、ダブルネガティブT細胞(DNT)を凍結保存するための方法が提供される。

一態様では、該方法は、

a) 貯蔵培地中にDNTの集団を再懸濁する段階；

b) 該貯蔵培地にDMSOを、約2.5%から約15%のDMSOの間の終濃度まで添加する段階；および

c) 該貯蔵培地中のDNTの該集団を-70 よりも低い温度で凍結保存する段階

50

を含む。

【0061】

一態様では、該方法は、貯蔵培地中に、本明細書に記載される方法を使用して拡大増殖されたDNTの集団を再懸濁する段階を含む。一態様では、該方法は、貯蔵培地中にDNTの集団を再懸濁する前に、DNTの集団を、本明細書に記載される方法を使用して拡大増殖させる段階をさらに含む。

【0062】

一態様では、該方法は、貯蔵培地中のDNTの集団を-70 ~ -90、好ましくは約-80の温度で凍結保存する段階を含む。

【0063】

一態様では、DNTの集団は、細胞を凍結保存する前にエクスピボで拡大増殖されている。例えば、本明細書に記載されるDNTの集団をエクスピボで拡大増殖させるための方法を使用して、DNTを凍結保存する前に、DNTは、エクスピボで拡大増殖される場合がある。

【0064】

一態様では、細胞を凍結保存する前に、細胞は、5~25日、任意で約8~14日、または約10日にわたりエクスピボで拡大増殖される。一態様では、細胞を凍結保存する前に、細胞は、約8~20日、拡大増殖される。

【0065】

一態様では、本明細書に記載のDNTの集団を凍結保存するための方法は、DMSOの添加を伴う。好ましい態様では、DMSOは貯蔵培地に滴下して添加される。一態様では、DMSOの終濃度は、約3%~15%、4%~10%、または約5%~約8.5%である。一態様では、DMSOの終濃度は、約7%~8%、任意で約7.5%である。

【0066】

一態様では、DMSOは、貯蔵培地中のDMSOの濃度の増加速度が制御されるように貯蔵培地に添加される。

【0067】

一態様では、DMSOは、貯蔵培地に添加される前に、約10%~約20%の濃度、任意で、約10%、約15%または約20%の濃度である。

【0068】

一態様では、DNTは、貯蔵培地中に約 2.5×10^7 ~ 約 2.5×10^8 個/ml、任意で約 $5 \sim 10 \times 10^7$ 個/mlの終濃度である。

【0069】

一態様では、DNTと接触している貯蔵培地が冷却される。例えば、一態様では、DNTの集団は、10 未満に冷却されているが凍っていない貯蔵培地中に再懸濁され、任意で、貯蔵培地は、約8、6、4、または2 に冷却されている。

【0070】

一態様では、該方法は、段階b)の後であるが段階c)の前に、DNTの集団を約1 ~ 約7の温度で貯蔵する段階をさらに含む。一態様では、該方法は、DNTの集団を約2分から20分の間、任意で、約5分、約10分または約15分、貯蔵する段階を含む。

【0071】

実施例に述べるように、貯蔵培地の選択は、DNTの生存率および/または活性に影響する可能性がある。一態様では、貯蔵培地は、動物血清、任意でウシ胎仔血清を含む。一態様では、貯蔵培地は、動物血清不含、好ましくはCryostor(商標)である。

【0072】

任意で、本明細書に記載の方法により凍結保存された細胞は、次いで、-130 よりも低い温度で、任意で液体窒素中で、貯蔵される場合がある。一態様では、該方法は、凍結保存された細胞を-130 よりも低い温度で貯蔵する前に、DNTの集団を-70 ~ -90の温度で少なくとも8時間、少なくとも10時間、少なくとも12時間、または少なくとも16時間にわたり貯蔵する段階を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

薬学的組成物および細胞集団

一態様では、本明細書に記載される方法により拡大増殖および/または凍結保存されたDNTの集団が提供される。一態様では、DNTの集団は、がんの処置に使用するためのものである。造血幹細胞（HSC）の集団と組み合わせた、本明細書に記載される方法により拡大増殖および/または凍結保存されたDNTの集団もまた提供され、ここで、DNTおよびHSCは、同じドナーまたは異なるドナーに由来する。一態様では、同種HSCと組み合わせたDNTは、強化された抗がん活性を示したのに対し、DNTは、同種HSCからのGvHDもまた低減する。PBMCの集団、任意で通常型T細胞などのリンパ球の集団と組み合わせて、本明細書に記載される方法により拡大増殖および/または凍結保存されたDNTの集団もまた提供され、ここで、DNTおよびPBMCは、同じドナーまたは異なるドナーに由来する。一態様では、同種PBMCと組み合わせたDNTの使用は、同種PBMCからのGvHDを低減する。

10

【 0 0 7 4 】

一態様では、1つまたは複数のドナーからのDNTの単回の拡大増殖からのDNTは、がんの処置のための1つもしくは複数の対象における使用もしくは投与のため、またはがんの複数の処置のための1つもしくは複数の対象における使用もしくは投与のためのものである。一態様では、DNTは、2つ以上のドナーからのDNTの単回の拡大増殖のためのものであり、かつがんの処置のための1つもしくは複数の対象における使用もしくは投与のため、またはがんの複数の処置のための1つもしくは複数の対象における使用もしくは投与のためのものである。それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、本明細書に記載されるDNTの集団の有効量、および任意でHSCまたはPBMCを、対象に投与する段階を含む方法もまた、提供される。医薬、任意でがんの処置のための医薬の調製に使用するための、本明細書に記載されるDNTの集団、および任意でHSCまたはPBMCの使用もまた提供される。

20

【 0 0 7 5 】

がんの処置のための同種DNTの方法および使用

実施例に示すように、異なるドナーからの同種DNTを含む製剤は、がんの処置のために有用であることが驚くことに実証された。

【 0 0 7 6 】

一態様では、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、ダブルネガティブT細胞（DNT）の集団の有効量を対象に投与する段階を含む方法が提供され、ここで、DNTの集団は、1つまたは複数の健康なドナー（HD）からの同種DNTを含む。一態様では、DNTの集団は、2つ以上のHDからの同種DNTを含む。がんの処置のための1つもしくは複数のドナーまたは2つ以上のドナーからの同種DNTを含むDNTの有効な集団の使用である。

30

【 0 0 7 7 】

一態様では、同種DNTは、任意で、本明細書に記載される方法を使用してエキスピボで拡大増殖されている。一態様では、2つ以上のドナーからの同種DNTは、エキスピボで拡大増殖される前に組み合わされる。別の態様では、2つ以上のドナーからの同種DNTは、組み合わされてDNTの集団を形成する前に、エキスピボで別々に拡大増殖される。一態様では、1つまたは複数のドナーは、がんを有しない1つまたは複数の対象である。

40

【 0 0 7 8 】

本明細書に記載の同種DNTの集団は、がんの処置のためのインピボ使用に望ましいいくつかの特徴を示す。一態様では、異なるドナーからのDNTは、DNTの集団中の相互に対して同種反応性ではない。一態様では、DNTの集団は、対象における同種免疫細胞媒介性拒絶に対してインピボで抵抗性である。

【 0 0 7 9 】

一態様では、DNTは、インピボで対象中に少なくとも10日にわたり残留する。一態様では、DNTの集団は、対象中に少なくとも2週間、少なくとも3週間、または少なくとも4

50

週間にわたり残留する。一態様では、DNTの集団は、正常細胞に対してインビボで細胞傷害性ではない。

【0080】

一態様では、DNTの集団は、任意で、本明細書に記載されるDNTを凍結保存するための方法を使用することにより、DNTの集団を対象に投与する前に凍結保存されている。一態様では、DNTの集団は、生存率および/または機能を低下することなく凍結保存されている。例えば一態様では、DNTの集団は、生存率および/またはがんの処置のための機能を低下することなく少なくとも10日、30日、60日、100日、300日、400日または600日にわたり凍結保存することができる。

【0081】

一態様では、DNTの集団は、がんの処置のためのその使用または投与の前に、遺伝子改変されていない。例えば一態様では、DNTは、TCRおよび/またはMHC-I/IIの発現を低減または防止するように遺伝子改変されていない。一態様では、対象は、がんの処置のためのDNTの集団の投与の前または途中で免疫抑制療法を施されない。別の態様では、対象は、がんの処置のためのDNTの集団の投与の前または途中で免疫抑制療法を施される。

【0082】

実施例に示すように、本明細書に記載のDNTは、がんの処置のために同種造血幹細胞（HSC）および/または末梢血単核細胞（PBMC）と組み合わせて使用される場合がある。一態様では、PBMCはリンパ球、任意で通常型T細胞である。したがって、一態様では、本明細書に記載の方法は、それを必要とする対象に、DNTと、HSCを含む細胞の集団とを投与する段階を含む。一態様では、本明細書に記載の方法は、それを必要とする対象に、DNTと、PBMCを含む細胞の集団とを投与する段階を含む。がんの処置のための、同種HSCを含む集団と組み合わせた、本明細書に記載されるDNTの集団の使用もまた提供される。がんの処置のための、同種PBMCを含む集団と組み合わせた、本明細書に記載されるDNTの集団の使用もまた、提供される。

【0083】

一態様では、DNTは、複数の健康なドナーからの同種DNTであり、任意で、該DNTは、本明細書に記載の方法により拡大増殖される。

【0084】

一態様では、対象は、DNTの集団の投与の前または途中で免疫抑制療法を施されない。一態様では、本明細書に記載のDNTは、免疫抑制療法の非存在下での対象における使用または投与用である。

【0085】

一態様では、DNTの集団は、1つまたは複数のドナー、任意で2つ以上のドナーからのDNTの単回拡大増殖に由来し、かつ単一のがん患者または複数のがん患者への使用または投与用である。

【0086】

一態様では、DNTの集団は、1つまたは複数のドナーからのDNTの単回拡大増殖に由来し、かつがんの処置のための複数の異なる対象への使用または投与用である。

【0087】

一態様では、DNTは、任意で本明細書に記載の方法によって、拡大増殖されかつ/またはエクスピボで凍結保存された同種DNTである。

【0088】

一態様では、DNTは、HSCおよび/もしくはPBMCと同時または異なる時間での対象への使用または投与用である。例えば一態様では、DNTは、HSCおよび/またはPBMCの使用または投与から1時間以内、2時間以内、4時間以内、8時間以内、12時間以内、1日以内、2日以内、3日以内、4日以内、5日以内、6日以内、1週間以内、10日以内、2週間以内、3週間以内、4週間以内、またはさらに長い期間以内での対象への使用または投与用である。一態様では、DNTと、HSCおよび/またはPBMCとの組み合わせは、対象

10

20

30

40

50

における骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、または白血病の処置用である。

【0089】

一態様では、HSCは、末梢血、白血球アフェレーシス、骨髄または臍帯血に由来する。一態様では、同種HSCは、G-CSFを使用して動員される。一態様では、DNTおよびHSCは、同じドナーに由来する。一態様では、DNTおよびHSCは、異なるドナーに由来し、任意で、がんの処置に使用するための同種DNTおよびHSCである。

【0090】

一態様では、PBMCは、リンパ球、任意で通常型CD4+ CD8+ T細胞である。一態様では、DNTは、PBMCと同時または異なる時間での対象への使用または投与用である。

10

【0091】

一態様では、本明細書に記載の方法および使用は、抗TIM3、抗NKG2A、抗LAIR1、抗CD94、抗LAG3、抗CD160および/もしくは抗BTLAアンタゴニスト剤を使用して免疫共抑制分子を抑制すること、ならびに/または抗CD28、抗CD27、抗GITR、抗CD40L、抗HVEMおよび/もしくは抗CD30アゴニスト剤を使用して免疫共刺激分子を強化することを含む。一態様では、DNTの活性を強化するための方法であって、抗TIM3、抗NKG2A、抗LAIR1、抗CD94、抗LAG3、抗CD160および/もしくは抗BTLAアンタゴニスト剤を使用して免疫共抑制分子を抑制する段階、ならびに/または抗CD28、抗CD27、抗GITR、抗CD40L、抗HVEMおよび/もしくは抗CD30アゴニスト剤を使用して免疫共刺激分子を強化する段階を含む方法が、提供される。一態様では、該方法は、DNTの抗がん活性を強化するための抗CD3の使用または投与を含む。

20

【0092】

したがって、一態様では、本明細書に記載の方法および使用は、抗CD3、抗TIM3、抗NKG2A、抗LAIR1、抗CD94、抗LAG3、抗CD160および/もしくは抗BTLAアンタゴニスト剤、ならびに/または抗CD28、抗CD27、抗GITR、抗CD40L、抗HVEMおよび/もしくは抗CD30アゴニスト剤の使用または投与を含む。一態様では、がんの処置のための本明細書に記載の方法および使用は、CD3に対する抗体の使用または投与をさらに含む。一態様では、CD3に対する抗体は、DNTの使用または投与と同時または異なる時間での対象への使用または投与用である。

【0093】

図1Jおよび1Kに示すように、TIM-3またはCD3抗体の添加は、AML3/OCIに対してDNTにより媒介される死滅レベルをモジュレートした。したがって、DNTとDNT上に発現される分子に対する抗体とを使用してDNTの機能を改善する組み合わせ療法は、がんの処置のためのDNTの治療応用を改善すると予想される。一態様では、抗体は、DNTと同時または異なる時間での使用または投与用である。例えば一態様では、DNTは、抗体の使用または投与から1時間以内、2時間以内、4時間以内、8時間以内、12時間以内、1日以内、2日以内、3日以内、4日以内、5日以内、6日以内、1週間以内、10日以内、2週間以内、3週間以内、4週間以内、またはさらに長い期間以内での、対象への使用または投与用である。

30

【0094】

DNTの組織輸送およびホーミングをモジュレートするための方法もまた、提供される。一態様では、該方法は、所望の標的組織および部位で接着リガンド/受容体をCD44、CD49dおよび/もしくはCD62Lに、かつ/またはケモカインをCXCR3、CCR3、CCR6および/もしくはCCR9に誘導または送達する段階を含む。

40

【0095】

以下の非限定的な例は、本開示の説明である。

【実施例】

【0096】

実施例1：がんに対するオフザセルフ養子細胞療法としての同種ダブルネガティブT細胞養子T細胞療法は、がん患者のための実際的な処置選択肢である。しかし、養子細胞療法

50

(ACT)の臨床使用の増加に伴い、高い処置コストおよび技術的要件を含むその限界が明らかになりつつあり、ACTの広い臨床使用を制限している²²。オフザシェルフ同種ACTは、より低い処置コスト、細胞産物の信頼できる供給および容易な利用可能性を含むいくつかの利点を有するが、その臨床応用の前にいくつかの要件を満たさなければならない^{12,20}。本実施例は、腫瘍以外に対する明らかな毒性なしに、様々ながんの種類を標的とし；宿主対移植片反応を克服し、十分な残留を達成することができ；かつ貯蔵可能である治療法という、オフザシェルフACTの要件を満たす、健康なドナーから凍結保存可能な臨床グレードダブルネガティブT細胞を拡大増殖させるための、単純明快で容易に適用可能な方法を説明する。注目すべきことに、本明細書に記載されるDNTの使用は、いかなる遺伝子改変もなくオフザシェルフ療法として使用することができるT細胞療法を表す。

10

【0097】

材料および方法

GMP条件下でのDNTのエキスビボ拡大増殖

以前に記載されたように²⁰、GMP条件下で幾分修正を加えてDNTの拡大増殖を行った。簡潔には、CD4+およびCD8+細胞を枯渇したPBMCを、抗CD3抗体コーティングプレート(GMPグレードOKT3; Miltenyi)上、250IU/ml IL-2(Proleukin, Novartis Pharmaceuticals, Canada)を有する無血清培地(AIM-V(ThermoFisher)またはGT-551(Takara Bio))中で3日にわたり培養し、可溶性抗CD3抗体およびIL-2を培養物に添加した。拡大増殖の0および10日目に、ならびに回収してからその後の実験に使用する前に、DNTの純度を評価した。蛍光色素コンジュゲート抗ヒトCD3、-CD4、-CD8、および-CD56抗体を用いた細胞染色ならびにフローサイトメトリー分析によりDNTの純度を測定した。検証実施のために、DNTを、Princess Margaret Cancer CentreのPhilip S. Orsino細胞治療施設またはSunnybrook Research InstituteのGMP施設で拡大増殖させた。無菌性、マイコプラズマ、およびエンドトキシンについて検査するために、拡大増殖されたDNT産物をそれぞれMount Sinai Hospital、WuXiApp Tech、およびPrincess Margaret Cancer Centreに送った。

20

【0098】

フローサイトメトリーに基づくインビトロ死滅アッセイ

非接着がん細胞について、DNTを標的細胞と2~4時間共培養し、次いで細胞を抗ヒトCD3抗体(HIT3a)、CD33抗体(WM53)、CD45抗体(HI30)、およびCD34抗体(561)、アネキシンV、ならびに7AAD(すべてBioLegend製)で染色し、フローサイトメトリーを使用して分析した。特異的死滅は、

30

$$\frac{\% \text{アネキシン}V^+_{DNTあり} - \% \text{アネキシン}V^+_{DNTなし}}{100 - \% \text{アネキシン}V^+_{DNTなし}} \times 100$$

により計算した。

【0099】

接着がん細胞について、細胞株をDiO(Invitrogen)で標識し、DNTと14時間共培養した。0.25%トリプシン-EDTA溶液中でインキュベーション後、すべての細胞を収集し、TO-PRO-3(Life Technologies)で染色した。細胞懸濁物をフローサイトメトリーにより分析して、標識された標的細胞の特異的溶解を決定した。特異的死滅は、

40

$$\frac{\%DiO^+TO\ PRO-3^+_{DNTあり} - \%DiO^+TO\ PRO-3^+_{DNTなし}}{100 - \%DiO^+TO\ PRO-3^+_{DNTなし}} \times 100$$

により計算した。

【0100】

抗体およびフローサイトメトリー

50

以下の抗ヒト抗体：CD3-FITCまたはCD3-PECy7、CD4-FITCまたはCD4-PE、CD8-FITCまたはCD8-PE、CD33-APCまたはCD33-PECy5、CD56-PE、iNKT TCR (V24-J18 TCR)-APC、およびアネキシンV-FITCまたはアネキシンV-パシフィックブルーを細胞染色のために使用し、これらはBioLegendから購入された。BD Accuri C6 フローサイトメーター (BD Bioscience) またはAttune NXTサイトメーター (ThermoFisher) のいずれかを使用してデータの獲得を行った。FlowJoソフトウェア (Tree Star, Inc.) を使用してフローサイトメトリデータを分析した。

【0101】

高スループットフローサイトメトリースクリーニング

以前に記載されたように²³、フローサイトメトリーに基づく高スループットスクリーニングのためにエクスピボで拡大増殖されたDNTを調製した。簡潔には、拡大増殖されたDNTを遠心沈殿し、0.5% BSAを含有するPBS中、FcX TrueStain (Biolegend) で10分間処理し、続いて抗CD3 PE-Cy7抗体で染色した。続いて、細胞をPrincess Margaret Genomics Centreに送り、そこで細胞を385種の異なる細胞表面分子に対する抗体で染色し、続いて生存性色素、DAPIで染色し、その後、フローサイトメトリーにより分析した。本明細書に記載のプロトコルを使用してCTLA-4の細胞内染色を行った。FlowJoソフトウェア (Tree Star, Inc.) を使用してデータを分析した。

10

【0102】

DNTの凍結保存

7~20日目に、2% 臨床グレードDMSO (StemCell Tech.) を含有する4 のCryoStor2 (StemCell Tech.) 中に、エクスピボで拡大増殖されたDNTを再懸濁し、続いて適切な体積の10% DMSO含有CryoStor10 (StemCell Tech.) を添加して、DMSOの終濃度を7.5%に、細胞濃度を5~10×10⁷個/mlにした。細胞をCoolCell (商標) (Fisher Scientific) の-80 冷凍器に移して、温度をゆっくりと低下させた。翌日、凍った細胞をより長い貯蔵のために液体窒素に移した。

20

【0103】

DNTを解凍するために、液体窒素から取り出した細胞を37 の水浴またはビーズ浴中で解凍し、細胞体積の20倍の血清を添加した。細胞を300×gで10分間遠心分離した。さらなる使用のためにIL-2および抗CD3 (OKT3) 抗体含有無血清培養培地と共にペレットを細胞10⁶個/mlで再懸濁した。

30

【0104】

混合リンパ球反応

健康なドナーから得られたCFSE標識または未標識のPBMCを、自己または同種ドナーからの生きたまたは照射された拡大増殖DNTと、2:1のPBMC対DNT比で4~6日共培養した。CFSE希釈に基づく増殖している細胞のパーセントをフローサイトメトリーにより決定した。増殖の増加パーセントを、

$$\frac{\% \text{増殖}_{DNTあり} - \% \text{増殖}_{DNTなし}}{100 - \% \text{増殖}_{DNTなし}} \times 100$$

により計算した。

40

【0105】

同種反応性を決定するために、CD8陽性選択キット (StemCell Tech.) を使用してCD8⁺ T細胞を単離し、単離されたCD8⁺ T細胞をDNTと共に4:1のCD8:DNT比で4~14時間共培養した。次いで、細胞をアネキシンVおよび抗CD8抗体で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。

【0106】

異種移植モデル

すべての異種移植実験のために、University Health Network (UHN) の動物施設で維持したNOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) マウス (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) を使用した。DNTの残留を特徴付けるために、5 μM CFS

50

Eで標識した 2×10^7 個のDNTの単回注射の前に8~12週齢雌マウスに24時間照射した(250cGy)。骨髄、脾臓、肝臓、肺、および末梢血からの細胞を2、7、10、および14日目に収集し、DNTの頻度およびCFSEの希釈をフローサイトメトリーにより決定した。インビボ抗がん活性を決定するために、照射されたNSGマウスに尾静脈注射により $1 \sim 5 \times 10^6$ 個のMV4-11またはEBV-LCL細胞を注入した。がん細胞注射の3、6、および10日後に $1 \sim 3 \times 10^7$ 個のDNTを静脈内注射した。MV4-11を注入されたマウスを最終DNT注射の2週間後に殺し、以前に記載されたように²⁰、骨髄中のMV4-11の生着を、フローサイトメトリーを使用して決定した。EBV-LCLを注入されたマウスの体重が20%減少した場合、マウスを殺した。組織損傷を評価するために、上記のように担MV4-11マウスにDNTまたは陽性対照としてのPBMCを注入した。肝臓および肺組織を収集し、10%ホルマリン中で一晩固定し、ヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色のためにPathology Research Program Laboratory(Toronto General Hospital)に送った。以前に記載されたスコア付け方法²⁴を幾分修正したものに従って、病理学者がH&E染色した組織スライドを組織損傷について盲検的にスコア付けした。使用した修正スコア付け方法を本明細書に記載する。DNTの同種反応性を決定するために、マウスに0日目に $2 \sim 3 \times 10^6$ 個のHLA-A2+ PBMCならびに0、3、および6日目にHLA-A2- DNTを注入した。注入の4週間後に、骨髄、脾臓、および肺からの細胞をフローサイトメトリーにより分析して、ヒトT細胞の生着レベルをモニタリングした。すべての実験において、rIL-2(Proleukin)を、DNT注入の時点で、および最終DNT注射の後に殺まで毎週、腹腔内投与した(10^4 IU/マウス)。

10

20

【0107】

統計解析

GraphPad Prism 5を使用してすべてのグラフおよび統計解析を生成した。スチューデントのt検定および線形回帰検定を使用した。*p 0.05; **p 0.01; ***p 0.001; ****p 0.0001は、実験値と対照値との間の有意性を示す。エラーバーは、表示のように \pm SEMまたはSDを表す。

【0108】

ヒト試料および試験の承認

書面によるインフォームドコンセントを得た後、健康な成人ドナーからヒト血液を収集し、UHN Research Ethics Board(05-0221-T)に従って使用した。UHNの施設内動物管理使用委員会(AUP:741.22)が動物試験を承認し、カナダ動物管理協会(Canadian Council on Animal Care)のガイドラインに従って実行した。

30

【0109】

抗体、フローサイトメトリーおよびELISA

以下の抗ヒト抗体を細胞染色のために使用した: CD3-FITCまたはCD3-PECy7、CD4-FITCまたはCD4-PE、CD8-FITCまたはCD8-PE、CD34-FITCまたはCD34-PE、およびCD33-APCまたはCD33-PECy5をBioLegendから購入した。BD Accuri C6フローサイトメトリー(BD Bioscience)またはLSRII(BD Biosciences)フローサイトメーターのいずれかを使用してデータの獲得を行い、FlowJoソフトウェア(Tree Star, Inc.)を使用してデータを解析した。

40

【0110】

細胞株

細胞株、AML3/OCI、MV4-11、Jurkat、Daudi、H460、およびA549をATCC KG1aから得て、EBV-LCLを、The Hospital for Sick Childrenの応用ゲノミクスセンター(Center for Applied Genomics)から得た。10%ウシ胎仔血清(FBS)を補充したアルファ-MEM中でAML3/OCIを培養し、10% FBSを補充したRPMI-1640中でEBV-LCL、JurkatおよびDaudiを培養し、10% FBSを補充したIMDM中でMV4-11を培養し、10% FBSを補充したDMEM/F12中でH460およびA549を維持した。すべての細胞株を5% CO₂中37 °Cでインキュベートした。

【0111】

50

CTLA-4の細胞内染色

エクスピボで拡大増殖されたDNTを抗ヒトCD3抗体、抗ヒトCD4抗体、および抗ヒトCD8抗体で表面染色し、細胞内固定-透過処理キット(eBioscience)を使用して固定および透過処理した。透過処理された細胞を、抗CTLA-4抗体(Clone L3D10)を用いて4で30分間染色した。洗浄後、細胞をフローサイトメトリーにより分析した。

【0112】

GvHDモデル組織損傷のスコア付け

PBS、DNT、またはPBMCで処置されたマウスを殺し、肝臓および肺組織を収集し、10%ホルマリン中で固定し、H&E染色した。下のスコア付けチャートに従い病理学者が肝臓および肺組織スライドを盲検的にスコア付けした。

10

【0113】

(表1) GvHDモデル組織損傷に関するスコア付けチャート

肝臓GVHDスコア付け

	0	1	2	3
門脈炎	なし	軽度 門脈路の30%未満に存在	中等度 門脈路の30%~50%に存在	重度 門脈路の大部分(50%超)に存在
小葉炎	なし	軽度 肝細胞の壊死もアポトーシスもほとんどない	中等度 癒合を起こした巣状壊死および/またはいくつかのアポトーシスあり	重度 架橋性/重度実質壊死あり
胆管損傷	なし	軽度 細胞質好酸球増加を伴う胆管上皮のわずかな障害	中等度 患部胆管の部分壊死を伴う胆管上皮崩壊	重度 患部胆管の完全壊死を伴う広範な胆管上皮崩壊
胆管減少	なし	軽度 30%以下を冒す	中等度 30~60%を冒す	重度 60%超を冒す
胆汁うっ滞	なし	軽度 倍率20倍以上でのみ視認可能	中等度 倍率5~10倍で視認可能であるが、容易でない	重度 倍率5倍で容易に視認可能
総スコア				

20

30

肺GVHDスコア付け

40

50

	0	1	2	3
炎症	なし	軽度 内皮炎を伴わず 血管周囲に存在	中等度 内皮炎±中隔肥厚±軽 度肺胞拡張を伴って 存在	重度 広範な中隔肥厚、 重い肺胞内炎± を伴って存在
気管支/ 細気管支 上皮損傷	なし	軽度 上皮内炎を伴わない 上皮下炎	中等度 上皮内炎を伴うが、上 皮壊死および/または アポトーシスのない 上皮下炎	重度 上皮内炎を伴う 上皮下炎
総スコア (/6)				

10

【 0 1 1 4 】

結果

臨床グレードDNTのエクスピボ拡大増殖および特徴付け

20

GMP条件下の細胞産物の拡大増殖が、その臨床応用の前に必要である。本発明者らの以前の研究は、異種成分を含有する研究グレード試薬を使用して拡大増殖されたDNTを用いて行われた^{14,15}。動物由来サプリメントの使用により、異種添加剤に関連するリスクのせいで、患者の処置のための最終産物の使用が制限される²⁴。GMP条件下でDNTを拡大増殖させるために、臨床グレード試薬を使用し、異なる種類の動物血清不含培地を使用して拡大増殖されたDNTの収率、純度、および機能を比較した(図5)。続いて、細胞濃度、IL-2濃度、および細胞分割スケジュールを含むいくつかのパラメーターを検討した。本明細書に記載の改良された拡大増殖方法を用いて、11のドナーから13個の培養物にDNTを拡大増殖した。拡大増殖の17日目までに、末梢血それぞれ1ミリリットルから $1.11 \pm 0.63 \times 10^8$ 個のDNTが生成され(PB; 図1A)、拡大増殖の平均倍率は 1558 ± 795.5 (図1B)であり、平均純度は $91.9\% \pm 4.29\%$ (図1C)であった。本発明者らの方法を確認するために、3回の「検証運転」をGMP認証施設内で行った。類似の収率、純度および注入緩衝液中の細胞安定性が3つの運転の全部で見られ、拡大増殖されたDNTの3つのバッチすべてが、無菌性、マイコプラズマ、およびエンドトキシンの検査に合格した。

30

【 0 1 1 5 】

拡大増殖されたDNTを特徴付けるために、3つのドナーからエクスピボで拡大増殖されたDNTに、Gedye C.らが開発した高スループットフローサイトメトリースクリーニング法²³を使用する細胞表面分子発現プロファイリングを行った。385種の異なる表面分子に対する抗体を用いて染色したDNTをフローサイトメトリーにより分析した。T細胞関連マーカー、CD2、CD3、およびCD5の発現、ならびにB細胞マーカー、CD19およびCD20についての発現の欠如をチェックすることによりスクリーニング方法の妥当性を確認した(図1D)。全体として、エクスピボで拡大増殖されたDNTは、CD45RA、CD44、CD43、およびCD49dを発現し、CCR7、CD62L、BTLA、およびCD127を低発現するまたは発現を欠如するエフェクターメモリーT細胞表現型を示す(図1E)。エクスピボで拡大増殖されたDNTは、ケモカイン受容体、CXCR3(38.0%)、CCR3(42.6%)、CCR6(20.1%)、およびCCR9(17.6%)(これらのすべては、免疫細胞の炎症領域への動員に関連する^{25~27})について陽性であったが(図1F)、他のケモカイン受容体については陰性であった。

40

【 0 1 1 6 】

50

DNTにより媒介される免疫応答をより十分に理解するために、細胞傷害性分子（図1G）、共刺激分子、（図1H）および共抑制分子（図1I）の発現を調べた。細胞傷害性分子の中で、DNT媒介性抗白血病活性に関与する2つの以前に同定された分子、NKG2DおよびDNAM-1は、高レベル（それぞれ83.3%および77.3%）で発現していた。より低いレベルの他の細胞傷害性分子、NKp30（13.4%）、KIR2DS4（15.2%）、および膜結合型TRAIL（16.3%）が検出されたが、DNTは、FasL、NKp44、NKp46、およびKIR3DS1について陰性であった。DNTは、共刺激分子CD30（49.5%）、GITR（22.5%）、CD27（15.3%）およびCD28（25.2%）を発現したが、OX40、CD40、4-1BB、およびHVEMの発現は非常に低いまたは存在しなかった。エクスピボで拡大増殖されたエフェクターT細胞の大部分とは異なり、拡大増殖されたDNTは、共抑制分子、ICOS、CTLA-4およびPD-1、ならびにPD-1リガンドが低く、これは、DNTがT細胞疲弊またはがん免疫回避メカニズムに対する回復力に富む可能性を示唆している。しかし、TIM-3（65.7%）、LAIR1（95%）、ならびにNKG2A/CD94（58.9%および42.6%）の高い発現も検出され、これは、DNT媒介性抗がん活性に対するこれらの分子の潜在的抑制活性を示唆している。

10

20

30

40

50

【0117】

DNTとの抗TIM3、抗NKG2A、および抗CD94アンタゴニスト抗体ならびに抗CD27、抗CD28、抗GITR、または抗CD30アゴニスト抗体の使用の組み合わせは、DNTの活性を促進する可能性がある。DNTの標的組織への遊走がその活性のために必要とされるので、DNT上のケモカイン受容体発現パターンが、DNTの所望の組織への遊走を促進するために使用される可能性がある。

【0118】

図1Jおよび1Kに示すように、種々の抗体の添加は、AMLに対するDNTの細胞傷害性をモジュレートすることができる。例えば、TIM-3抗体の添加は、比較的抵抗性の大きい細胞株、AML3/OCIに対するDNTにより媒介される死滅のレベルを低減したのに対し、高感受性白血病株、MV4-11に対する細胞傷害性は、依然として同等であった。対照的に、抗CD3抗体の添加は、AML3/OCIに対するDNTの細胞傷害性を増加させた。

【0119】

拡大増殖されたDNTは、ドナー非限定的にインビトロおよびインビボで様々な種類のがんを標的とする

オフザシエルFACTのためには、単一のドナーから製造された細胞が、ドナー非限定的に複数の患者からのがんをターゲティングできるべきである。臨床グレードDNTの機能を決定するために、骨髄腫、T細胞白血病、バーキットリンパ腫、AML、EBV-LCL、大細胞肺癌、および肺腺癌に由来する様々ながん細胞株に対する拡大増殖された細胞の細胞傷害性をインビトロで調査した。DNTは、検査したすべてのがん標的に対して広い抗がん細胞傷害性を示した（図2A）。さらに、単一のドナーからの臨床グレードDNTは、複数のがん標的、OCI/AML3およびMV4-11ならびに原発性AML試料を効果的にターゲティングし（図2B）、同じがん標的に対して6つの異なるドナーからのDNTにより類似のレベルの細胞傷害性が媒介された（図2C）。さらに、2つの異なるドナーから拡大増殖されたDNTを混合することにより、いずれか1つだけのドナーからのDNTにより誘発される細胞傷害性と比較して全体的な細胞傷害性が損なわれることがなく、ドナーDNTは、インビトロで混合した場合に相互に対する同種反応性を示さなかった（図6）。これらの結果は、まとめると、DNTがドナー非限定的に広いがん特異的細胞傷害性を誘発することを実証している。

【0120】

DNTのインビボ抗腫瘍活性を決定するために、免疫不全NOD.Cg-Prkdcscid Il2rg^{tm1Wjl/SzJ} (NSG) マウスにおいてヒトEBV-LCLおよびAMLを用いて異種移植モデルを樹立した。EBV-LCL異種移植モデルにおいて、致死用量のEBV-LCLを接種したマウスをPBSまたはDNTで処置した。PBS処置群のマウスは、すべて28日以内に死亡したが（n=6）、一方で、この試験の期間（85日）にわたり6匹のDNT処置マウスのうち4匹が生

存した(図2D)。同様に、DNTで処置された、ヒトAML細胞を担持するマウスは、PBSで処置されたマウス(40.5±4.56%)と比較して、骨髄のAML生着レベルに17.1倍の低減(2.37±0.749%)を示した(図2E)。興味深いことに、DNTは、同じ死滅アッセイで、白血球芽球に関連するマーカーを発現している原発性AML患者細胞(CD33⁺CD45^{low}CD34⁺およびCD33^{high}CD34⁺)に対して強力な細胞傷害活性を示したが、正常細胞に関連する表現型を有する細胞(CD33⁻CD45^{high}CD34⁻)には細胞傷害活性を示さなかった(図2F)。これは、DNTが、正常細胞ではなく、白血球細胞を優先的に標的とすることを示している。この結果をさらに検証するために、2Eに記載されるAML異種移植モデルにおいて、DNTにより引き起こされる組織損傷のレベルを評価し、PBMCにより引き起こされる組織損傷と比較した。インビトロの知見と一致して、異種移植モデルでDNTの有意な抗がん活性が観察されたが、担がんDNT処置マウスはどれも異種GvHDの徴候を示さなかった(図2Gおよび2H)。PBMC処置マウスからの肝臓組織は、中等度の門脈リンパ球浸潤および重度の胆管損傷を示したが、一方で、DNT処置マウスは、胆管、血管または他の損傷なしに軽度の門脈リンパ球浸潤を示した(図2G)。肺では、PBMC処置マウスは、血管および細気管支周囲の重度の炎症、肺胞周囲の内皮炎および中隔炎を示した。対照的に、DNT処置マウスは、血管および細気管支周囲に炎症を示さず、肺胞周囲に内皮炎も中隔炎も見られなかった。肝臓および肺における組織損傷を病理学者が盲検的にスコア付けしたが、DNT処置群は、PBMC処置群よりも有意に低いスコアであった(図2H)。まとめると、これらのデータは、GMP条件下で拡大増殖されたHD由来DNTが広範囲のがんの種類をインビトロおよび異種移植モデルでドナー非限定的に腫瘍以外に対する毒性を有さずにターゲティングするのに有効であることを実証しており、これらは、オフザセルフ同種ACTの成功のために必要な特徴である。

【0121】

拡大増殖されたDNTはGMP条件下で凍結保存することができる

拡大増殖された細胞を臨床的に適合する条件下で凍結保存し、細胞生存率および機能に対する影響が無視できることの重要性は、しばしば見過ごされている²⁸。効果的な凍結保存法は、製造された細胞の貯蔵を可能にし、細胞産物の一貫性を上げ、患者に注入するための細胞療法の即時利用性を提供し、細胞を製造できない地域に細胞を配送する方法を提供し、全体的に見て、ACTの柔軟性および利用性を増加させる。この目的で、エクスピボで拡大増殖されたDNTをGMP準拠動物血清不含培地中で凍結保存するために、DMSO濃度、DMSOの添加方法および除去方法、解凍されたDNTの再刺激、および冷凍のための細胞濃度を含む複数のパラメーターを研究した。最適に凍結保存されたDNTは、その生存率(図3A)ならびにインビトロ(図3B)および異種移植モデル(図3C)での抗白血球活性を保持した。凍結保存されたDNTをすぐに使用できる(ready-to-go)産物として使用するために、冷凍細胞としてのその有効期間が重要である。これを研究するために、617、534、276、129、または8日凍結したDNTの生存率および細胞傷害性を決定した。すべてのDNTは生存を維持し、その抗白血球機能を保持した(図3D)。まとめると、臨床的に許容される条件下で拡大増殖されたDNTは、GMP準拠培地中で少なくとも600日にわたり、その機能を損なわずに凍結保存することができ、同種DNTをがん患者にとって「すぐに使用できる」処置として使用する方法を提供する。

【0122】

生きたDNTはインビトロ同種免疫応答を活性化せず、インビボで残留することができる養子移入された細胞がレシピエント中で残留する能力は、ACTのアウトカムに影響し²⁹、注入された細胞を患者の免疫システムが認識および拒絶できるので³⁰、その重要性は、同種の設定でより明らかである。したがって、エクスピボで拡大増殖されたCFSE標識ヒトDNTを、亜致死照射されたナイーブNSGマウスに全身注射することにより、インビボのDNTの残留、増殖能、および遊走パターンを決定した。末梢血、脾臓、骨髄(BM)、肝臓および肺からの細胞を、注入の2、7、10および14日後に得た。注入の2日後に、調査したすべての組織からDNTが検出され、その後、DNTの頻度は減少したが、注射の14日後も細胞はまだ検出可能であった(図4A)。0日目と比較して、CFSEの蛍光強度

は、注入の10日後まで希釈されたが、10日目～14日目にさらなる低減はなかった（図4Bおよび4C）。これらの結果は、DNTが異なる組織に遊走し、インビボで限られた細胞分割を受け、ナイーブNSGマウスへの注入後少なくとも2週間は検出できることを実証している。

【0123】

しかし、免疫不全マウスは注入された細胞を拒絶できないので、ナイーブNSGマウス中のDNTの残留は、臨床設定でのそれらの残留性を反映しない。DNTが同種免疫応答による拒絶を受けやすいかどうか決定するために、本発明者らは、図4Dに図示する古典的な混合リンパ球反応（MLR）アッセイを設定した。1つのドナー（HD1）からのCFSE標識PBMCを、同じドナー（HD1）または異なるドナー（HD2）からの生きたまたは照射されたエキスビボ拡大増殖DNTで刺激して、通常型T細胞に対する同種DNTの免疫原性を決定した。照射された同種DNTによる刺激は、CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の増殖をそれぞれ27.7% ± 0.12%および37.7% ± 0.91%増加させ、これは、照射された自己由来DNTによる増殖よりも有意に高かった（CD4⁺ T細胞について13.7% ± 0.94%およびCD8⁺ T細胞について10.8% ± 0.12%；図4E）。興味深いことに、生きた同種DNTにより、CD4⁺ T細胞（6.04% ± 0.69%）およびCD8⁺ T細胞（6.32% ± 0.55%）の有意に低い増殖度が誘発されたが、これは、生きた自己由来DNTにより誘発される増殖レベル（CD4⁺ T細胞について6.61% ± 0.38%およびCD8⁺ T細胞について6.79% ± 0.21%；図4E）と同等であった。自己由来または同種DNTと共培養されたCD8⁺ T細胞が同種DNTをターゲットングできたかどうかをさらに決定するために、共培養の4～6日後にCD8⁺細胞を単離し、図4Dに示すように自己由来または同種DNTに対するエフェクター細胞として使用した。予想通り、生きたまたは照射された自己由来DNTで刺激されたCD8⁺ T細胞は、同種DNTに対していかなる細胞傷害性も誘発しなかった。重要なことに、照射された同種DNTにより刺激されたCD8⁺ T細胞が同種DNTに対して強力な細胞傷害性を用量依存的に誘起した一方で、CD8細胞を生きたDNTで刺激した場合、同種DNTに対するCD8⁺ T細胞の細胞傷害性は検出されなかった（図4F）。まとめると、これらの結果は、DNTが同種抗原を保有するものの、生きた同種DNTは、インビトロで通常型T細胞の同種反応性を有意なレベルで誘発しないことを実証している。

【0124】

生きたDNTがインビボで同種免疫応答に抵抗性であることをさらに確認するために、ナイーブNSGマウスに、HLA-A2⁺ ドナーからのPBMCを注入し、続いて別のドナーからのHLA-A2⁻ DNTを0または3回注射した。注入の4週間後に、脾臓、骨髄、および肺からの細胞を単離し、ヒトT細胞の生着を決定した。本発明者らは、5匹の処置マウスのうち4匹で、有意なレベルのHLA-A2⁻ DNTが、同じ組織にHLA-A2⁺ CD4⁺およびCD8⁺ T細胞と同時生着したことを見出し（図4G）、これは、DNTが同種通常型T細胞の存在下でレシピエント中に少なくとも4週間にわたり残留したことを示している。生着したCD8⁺ T細胞の同種反応性をさらに研究するために、続いてHLA-A2⁺ CD8⁺ T細胞をDNT処置マウスおよびPBMC処置マウスから単離し、異種移植実験に使用したものと同じドナー起源からのDNTに対するエフェクターとして使用した。単離されたHLA-A2⁺ CD8⁺ T細胞の存在下で、DNT細胞生存率に有意な減少は見られず（図7）、これは、同種CD8⁺ T細胞が異種移植モデルでDNTの消失を引き起こさなかったことをさらに裏付けている。まとめると、これらのデータは、エキスビボで拡大増殖されたDNTが同種免疫細胞媒介性拒絶に抵抗性であることを示唆し、臨床設定でHvG拒絶に抵抗性であるオフザシェルフACTとしての同種DNTの潜在性をさらに検査することを正当化している。

【0125】

考察

新規治療法の有効性および安全性は新しい処置の開発における優先事項であるものの、患者の処置への変換の実現可能性を見逃すべきでない。現行の形式のACTは、患者自身の免疫細胞を使用して「オンデマンド」で個別の患者用の細胞産物を生成する「個別化」アプローチを行い、一部の患者に顕著な結果を達成したが、その広い適用を制限している要

10

20

30

40

50

因もまた、これらの研究から明らかになった^{31,32}。したがって、より大きい患者利用可能性を可能にするオフザセルフ細胞療法が、次世代のACTとして考慮されている^{12,33}。

【0126】

オフザセルフ細胞産物の不可欠な特性は、それがドナー非依存的に広範囲のがんをターゲティングできることである。本発明者らは、臨床グレードDNTがインビトロで多数の血液がんおよび固形がん（図2A）を、ならびに異種移植モデルにおいてEBV-LCLおよびAML（それぞれ図2Dおよび2E）を標的とすることを実証した。本研究に提示されるがんの種類に加えて、本発明者らは、異種移植モデルでDNT処置後の顕著に抑制された非小細胞肺癌の進行を観察した³⁴。とりわけ、単一のドナーからのDNTは、異なる起源のがん細胞を死滅させることができ（図2B）、同じがん標的に対する細胞傷害性のレベルは、異なるドナーに由来するDNTの間で同等であり（図2C）、腫瘍以外に対する毒性は観察されなかった（図2Fおよび2G）。さらに、臨床的に適合した条件下で拡大増殖されたDNTの凍結保存は、DNTの機能を損なわなかった（図3）。まとめると、これらの知見は、複数の患者のためのすぐに使用できる処置としての、拡大増殖されたDNTの大きなバッチを凍結保存することの可能性を強調している。

10

【0127】

同種T細胞を細胞療法として使用する主な懸念の1つは、GvHDのリスクである⁶。Jacob yらは、内因性TCRによる宿主同種抗原の認識が原因で、同種CD19-CAR T細胞の注入が、レシピエントマウスに重度のGvHDを誘発したことを報告した³⁵。この問題に対処するために、いくつかのグループがCD19-CAR T細胞¹⁸またはトランスジェニックTCR形質導入T細胞³⁶から内因性TCRをノックアウトし、GvHDの発生をうまく予防し、抗がん活性を維持した。しかし、内因性TCRの失われた抗腫瘍特異性を置換するために、がん関連抗原に対する外因的に形質導入された受容体の使用が必要なため、そのようなアプローチは、公知の腫瘍抗原に対するACTに限られ、細胞産生に別のハードルを設けるものである。本発明者ら他は、以前に、同種マウスDNTまたは異種ヒトDNTの注入が、通常型CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞とは異なりGvHDを引き起こさないことを示した^{14,37}。以前の知見と一致して、DNTは、同じ細胞傷害性アッセイにおいて同じ患者試料からの白血病細胞を特異的にターゲティングしたのに対し、正常細胞を温存し（図2F）、拡大増殖されたヒトDNTで処置された担がんマウスは、正常マウス組織に毒性の徴候なしに白血病負荷の顕著な低減を示した（図2G）。まとめると、これらの研究は、遺伝子改変されていない同種DNTの注入がGvHDを引き起こす可能性が低いことを実証している。

20

30

【0128】

注入された免疫細胞の残留は、処置アウトカムと関連することが示されている¹⁹。注入されたT細胞の残留は、内因性要因および外因性要因により決定される。細胞内因性要因として、注入された細胞の活性化状態がその残留に影響することができる。本発明者らは、DNTが単独で注射された場合、それらが、NSGマウスの肝臓、肺、血液、骨髄、および脾臓を含む様々な組織に最大14日遊走および残留したことを見出した（図4A）。表面分子プロファイリングデータに基づき、DNTは、中枢性メモリーT細胞と比較してより強い免疫応答およびより短い残留に関連する¹⁹エフェクターメモリー表現型を示した（図1E）。患者に注入された同種DNTの残留は本発明者らの第I相臨床試験で現在試験中であるが、より長い残留が望ましい場合、細胞拡大増殖方法を改変することにより、中枢性メモリー表現型を有するDNTの生成を助け得る。あるいは、そのような問題は、DNTのオフザセルフ特性を使用し、必要に応じて患者に凍結保存されたDNTを再注入することにより克服することができる。

40

【0129】

細胞残留に影響する主な外因性要因は、注入された細胞の宿主免疫システムによる拒絶である。同種ACTに関する多くの研究がGvHDを避けることに着目しているが、HvG拒絶にはあまり目を向けていない。Torakaiらによって行われた一研究で、同種CAR-T細胞

50

上のHLA発現が遺伝子操作によりロックアウトされ、そのことが、同種CD8⁺ T細胞媒介性の細胞傷害性をうまく回避した²¹。しかし、臨床設定におけるこのアプローチの実現可能性および安全性は、検証する必要がある。興味深いことに、本発明者らは、生きた同種DNTによる通常型T細胞の刺激が、同種DNTに対する細胞傷害性を誘起しないことを見出した(図4E)。さらに、同種DNTと異なるドナーからのPBMCとの同時注入の結果、NSGマウスにその同時生着が生じ(図4G)、同時生着した同種CD8⁺ T細胞は、DNTに対する同種反応性を示さなかった(図7)。本発明者らの知るところでは、これは、遺伝子改変または外因性免疫抑制薬なしのHvG反応に抵抗性である同種ACTの最初の形態である。それにもかかわらず、照射された同種DNTが同種反応性T細胞の強力な刺激因子であったことを考えると、HvG反応の発生を防止するために、患者注入のためのDNTの生存率を慎重にモニタリングする必要がある。

10

【0130】

生きた同種DNTが通常型T細胞による拒絶を回避するメカニズムは、研究途中である。マウスDNTが、DNTを活性化したものと同一同種抗原により活性化された同種反応性CD8⁺ T細胞を死滅させることができたことを、本発明者らは以前に示した³⁸。さらに、DNT対CD8⁺ T細胞の比がより高いことが、同種造血幹細胞移植患者におけるGvHDの重症度がより低いことと相関する³⁹。まとめると、これらのデータは、通常型T細胞とは異なり、生きた同種DNTの注入がHvG反応の結果として拒絶を生じる可能性が低いことを裏付けている。

【0131】

NK細胞は、HLA非拘束性抗腫瘍機能および限られたGvHD発症活性により、遺伝子改変なしのオフザセルフ療法として使用される潜在性を有する⁴⁰。患者NK細胞リンパ腫由来細胞株であるNK-92は、臨床研究においてオフザセルフACTとして安全かつ実行可能であることが示されている⁴⁰。しかし、1つの研究のみが、15人の処置された患者のうち、2人がまちまちの応答を有し、1人が安定病態を有したと報告した。NK-92が注入後約48時間だけ検出可能であったことから⁴¹、限られた抗腫瘍活性は、短い残留が原因であり得、それは、潜在的なインビボ腫瘍形成を避けるための患者注入前の細胞の照射(NK-92が不死化細胞であるので)が原因の可能性もある⁴¹。Romeeらにより行われた臨床研究では、サイトカイン誘導メモリー様同種初代NK細胞の注入は、9人中4人のAML患者が完全寛解を達成し、用量制限毒性が存在しなかったという、より有望な臨床応答を示した⁴²。しかし、ドナー由来NK細胞は、注入後2~3週間までに検出不能になった。これは、宿主免疫システムが回復し、ドナー由来同種NK細胞を拒絶したが、または注入されたNK細胞に限られた平均余命を有することを示唆している。本発明者らは、リンパ球枯渇の非存在下で同種PBMCとの同時注入した4週間後のマウスにおいて有意な数のDNTが検出されたことを見出した。これは、同種DNTのインビボ残留がNK細胞よりも良好なことを示唆している(図4G)。

20

30

【0132】

本発明者らの以前の研究において¹⁴、本発明者らは、DNTの細胞傷害活性を、NK-92および拡大増殖された初代NK細胞と直接比較した。本発明者らは、公知のNK細胞標的、K562に対して類似の傷害性が見られた一方で、NK-92媒介性細胞傷害性に抵抗性の4つの試料を含む7つの被験AML標的のすべてに対して、DNTの方が優れた死滅を媒介したことを示した。同様に、健康なドナー由来のDNTは、初代活性化NK細胞よりもAML細胞株に対して優れた死滅を示した。これは、DNTがNK細胞と異なるメカニズムにより機能し、NK-92に抵抗性のがんをDNTがターゲティングできる可能性があることを示唆している。さらに、HvG反応に対するDNTの抵抗性は、結果として患者におけるDNTのより長い残留を、したがって、より大きな長期効果を生じる可能性がある。

40

【0133】

要約すると、本発明者らは、健康なドナーから遺伝子改変も大きな操作もなしに臨床グレードDNTを拡大増殖させる方法確立した。本発明者らの知るところでは、DNTは、遺

50

伝子変化なしにオフザセルフ同種細胞療法のすべての必要条件を満たす最初のT細胞ACTである。拡大増殖されたDNTは、凍結保存することができ、免疫抑制の非存在下で同種環境中に残留し、腫瘍以外に対する毒性なしに様々ながんをターゲティングすることに有効である。これらの特性は、単独型(stand-alone)療法としての、または他の通常型療法と組み合わせた、異なる種類のがんを有する患者に対するオフザセルフACTとしての同種DNTの使用を可能にする。さらに、DNTはまた、Tim-3、CD94/NKG2A、LAIR-1、CCR3、およびCXCR3などをモジュレートすることができる抗体と組み合わせて使用することができる。

【0134】

実施例2：同種DNTの凍結保存およびオフザセルフの潜在性

10

正常細胞に対するいかなる毒性も観察されずに、異なる健康なドナーから拡大増殖された同種DNTが同じAML標的に対して類似のレベルの細胞傷害性を示したこと(図8)、および単一のドナーからのDNT細胞が多数のAML患者から得られたAML細胞をターゲティングできたこと(図8)が決定された。これらの知見は、DNTがどのドナーに由来するかにかかわらずDNT療法による応答のレベルは同等であること、および単一のドナーからのDNTを使用して複数のAML患者を処置できることを示唆しており、これは、同種DNT細胞を「オフザセルフ」治療アプローチとして利用する潜在性を裏付けている。しかし、エクスピボで拡大増殖されたDNTの抗白血病機能を保つことができる貯蔵方法の欠如は、「オフザセルフ」療法としてのそれらの使用を妨げる。

【0135】

20

拡大増殖され、凍結保存されたDNTの機能分析

抗白血病機能を決定するために、凍結保存されたDNTを、がん細胞株に対するインピトロ細胞傷害アッセイにおけるエフェクター細胞として使用し、同じドナーまたは培養物からの非冷凍DNTを対照として使用した。凍結保存されたDNTの抗白血病機能をAML異種移植モデルでさらに検証した。

【0136】

エクスピボで拡大増殖されたDNTの凍結保存

本出願者らは、拡大増殖されていないDNT細胞を凍結保存するための標準的なプロトコルを確立した¹⁵が、同プロトコルは、エクスピボで拡大増殖されたDNTの機能および生存率を保つことができなかった。いくつかのパラメーターを修飾して、エクスピボのDNTのための最適な凍結方法を開発した。最初に、凍結媒液中のDMSOの最適な濃度およびDMSOを添加する方法を、FBS+5% DMSO、FBS+7.5% DMSO、およびFBS+10% DMSO中で冷凍されたDNTの生存率および細胞傷害機能を比較することによって決定した。FBS+7.5%中で凍結されたDNTが、FBS+5% DMSOまたは10% DMSO中で凍結された細胞よりも高い生存率および細胞傷害機能を有したことが見いだされた(図9)。

30

【0137】

臨床への技術移転を容易にするために、凍結工程への動物血清の使用を避けることができるかどうかを検査するために、FBS+7.5% DMSOおよびCryostor+7.5% DMSO中で冷凍されたDNTの生存率および細胞傷害機能が比較され、両方の冷凍試薬からの細胞の生存率(図10)および細胞傷害機能(図10)が同等であったことを示した。

40

【0138】

凍結保存後の、エクスピボで拡大増殖されたDNTの機能の検証

上記研究が、拡大増殖されたDNTを凍結保存するための最適な方法を示したのに対し、本発明者らは、凍結保存されたDNTが非冷凍DNTと比較して機能を損なわなかったことを確認することを望んだ。このために、本明細書に記載の最適化プロトコルを使用して拡大増殖され、凍結保存されたDNTのインピトロ抗白血病機能を、同じドナーまたは同じ拡大増殖培養物から拡大増殖された非冷凍DNTと比較した。図11に示すように、DNTの生存率および細胞傷害機能は同等であった。冷凍細胞のインピボ機能が保たれることをさらに確認するために、原発性AML芽球が生着した免疫不全NSGマウスを解凍DNTで処置した。非冷凍DNTと同様に、冷凍保存されたDNTは、異種移植モデルにおけるAMLの生

50

着レベルを有意に低減する（図11）。

【0139】

まとめると、本発明者らは、凍結保存方法の各段階を最適化することにより、エキスビボで拡大増殖されたDNTの凍結保存のための方法を開発した。この方法を使用して、本発明者らは、エキスビボで拡大増殖されたDNTを凍結保存することができ、インビトロおよびインビボの両方でその抗腫瘍機能を維持することを実証している。この方法は、DNTを、必要とする患者を処置するための「オフザセルフ」の生きた薬物として貯蔵することを可能にする。これはまた、他の拡大増殖された抗腫瘍T細胞、NKT細胞およびNK細胞をその研究および臨床使用のために凍結保存するためにも適用され得る。

【0140】

実施例3：オフザセルフ同種細胞療法のための臨床グレードDNTの拡大増殖

特許出願番号PCT/CA2006/001870は、ダブルネガティブT（DNT）細胞のエキスビボ拡大増殖のための方法を記載している。その方法を使用して、異種添加物を含む拡大増殖方法および試薬を使用して血液1ミリリットルから 2.5×10^6 個のDNT細胞を生成することが可能である。しかし、単回拡大増殖から得られたDNTを複数の処置および/または患者のために使用することができるオフザセルフ療法における使用のためのDNTを産生するには、より高いDNTの収率が必要である。さらに、以前の方法を用いて生成されたDNTは、研究グレードであった。DNT療法の臨床への変換を可能にするために、1）最終細胞収率を改善する方法を、2）臨床適合する拡大増殖方法および試薬を使用して樹立することが必要であった。本明細書では、結果として拡大増殖の終了時の収率を顕著に改善する臨床グレードDNTを生じる新しいエキスビボDNT細胞拡大増殖プロトコルを記載する。

【0141】

拡大増殖中の細胞濃度、細胞分割日、拡大増殖の間に与えられる添加剤の種類および濃度、ならびに異なる種類の臨床グレード培養培地などの様々なパラメーターを研究した。新たに樹立されたGMPグレードの拡大増殖方法を使用して拡大増殖された、健康なドナー（HD）からのDNTは、以前に定義された研究グレードの拡大増殖方法を使用して拡大増殖されたDNTと比較して、拡大増殖の終了時に有意に高い数のDNTを結果として生じた（図12）。

【0142】

実施例1および図5に示されるように、2つの異なる臨床適合する培養培地（AIM VおよびGT-T551）を使用して拡大増殖されたDNTは、結果として拡大増殖に有意差を生じた。AIM Vは、より高い数の細胞を産生し、その後のDNT拡大増殖のために使用された。

【0143】

ヒト血清アルブミン（HSA；図13B）ではなく、血漿の添加（図13A）もまた、HD-DNTのエキスビボ拡大増殖を有意に改善する。

【0144】

驚くことに、DNTは、同種起源からの血漿を使用して拡大増殖させることができ、自己由来の血漿を使用することと同等の拡大増殖プロファイル（図14A）、生存率（図14B）、およびがん細胞に対する細胞傷害性（図14C）を与える。

【0145】

驚くことに、異なるドナー由来のDNTを混合し、同じ培養物として拡大増殖することができる（図15A）が、その拡大増殖プロファイル（図15B）も、生存率（図15C）も、純度（図15D）も、抗がん活性（図15E）も妨げられることはない。

【0146】

プールされたドナーから拡大増殖されたDNTが拡大増殖中に相互に対して同種反応性を発生するかどうか決定するために、差次的に発現されたHLAサブタイプを使用して、異なるドナーに由来するDNTを単離し、その相互に対する細胞傷害性を検査した。図16に示すように、同じドナーに由来する通常型T細胞が強力な同種反応性を発生するのに対し、17日にわたり共培養されたDNTは、相互に対する同種反応性を発生しない。

10

20

30

40

50

【0147】

同種HSCTは、長期治癒可能性を有する多くの血液悪性腫瘍のための唯一の地固め療法であるにもかかわらず、その有効性および安全性は改善する必要がある。同種HSCTの有効性および安全性を改善するための補助としてDNTを使用できるかどうかを決定するために、担がんマウスにPBMCをDNTと共にまたはDNTなしで注入した。とりわけ、DNTとPBMCとの同時注入は、DNT単独よりも優れた抗白血病活性を示し、5匹の処置マウスすべてでがんを完全に根絶したが、それに対し、PBMC単独群では5匹中1匹の処置マウスが検出可能なレベルのがんを有した(図17A)。重要なことに、DNTの同時注入は、PBMC由来T細胞により誘発されるGVHDの程度を低減した(図17B)。DNT注入がPBMCで処置されたマウスの生存期間を有意に延長したGVHD異種移植モデルでこれをさらに検証した(図17C)。

【0148】

次に、DNTが、PBMCで処置された担白血病宿主における全体的な抗白血病効果を強化するかどうかを決定するために、侵襲性ヒトAML細胞株MV411を生着させたNSGマウスをPBS、ヒトPBMC、エクスピボで拡大増殖されたDNT、またはヒトPBMCに続くDNTで処置し、骨髄中の白血病生着レベルを評価した(図18A)。以前に報告したように¹⁶、DNTを用いた処置の結果として、PBS対照群と比較して白血病負荷の50%低下(20.6% ± 7.8% から 10.5% ± 3.7%)が生じたが、効果は不完全であった(図18B)。PBMC由来T_{conv}細胞は強い抗白血病応答を媒介し、AMLレベルを0.68% ± 0.27%に低減したが、それでも骨髄中に検出可能な残留白血病細胞があった(図18B)。興味深いことに、AML細胞は、PBMCに続くDNTで処置されたマウスの骨髄においては検出不能であった(図18B)。CD8⁺ T細胞がPBMC処置群におけるGvLおよびGvHDの両方に関与すること、ならびにDNTがGvHDの重症度を弱めることを考えて、PBMC + DNT処置群におけるCD8⁺ T細胞媒介性GvL活性に対するDNT同時処置の効果を、PBMC処置群の効果と比較した。CD8⁺ T細胞を、PBMC-およびPBMC+のDNT処置マウスから単離し、異種移植実験のために最初に使用された白血病細胞に対するエフェクター細胞として使用した。両方の群からのCD8⁺ T細胞がAML細胞に対してエクスピボで顕著かつ同等の程度の細胞傷害性を誘発することが見出されたが(図18C)、これは、異種移植モデルにおいて、DNTがT_{conv}細胞の抗白血病活性にマイナスに影響しない一方で、それら自体の抗白血病活性を誘発して、より大きな抗白血病活性をもたらすことを示唆している。まとめると、これらのデータは、DNTがT_{conv}細胞のGvL効果を弱めず、むしろ全体的な抗白血病応答を増加させることができ、それが疾患の根絶をもたらし得るという考えを裏付けている。

【0149】

DNT単離の現在使用されている方法は、CD4⁺細胞およびCD8⁺細胞が赤血球との架橋により枯渇されるので、ドナーから全血を得る必要がある。この方法は、1~2人の患者を処置するために十分な数をうまく提供してきたものの、大規模拡大増殖は、ドナーから安全に抜き取ることができる血液量により制限される。したがって、全血の代わりに白血球アフエーシス試料を利用することによりDNT拡大増殖をスケールアップするための方法は、1回に拡大増殖できるDNTの量を増加させ、DNT療法のオフザシェルフの潜在性を最大にするであろう。このために、白血球アフエーシスに由来するPBMCから選択カラムを使用して出発DNT細胞集団を単離し、平均純度89.5% ± 2.51%のDNT(図19A)が得られた。さらに、PBMCから得られたDNTは、平均拡大増殖倍率1899 ± 615.7で全血から得られたDNTと同等の拡大増殖倍率を示した(図19B)。最後に、PBMCから拡大増殖されたDNTは、全血から単離および拡大増殖されたDNTと同等のインビトロ細胞傷害性を示した(図19C)。これらのデータは、最適化された方法を使用してDNTをPBMCから単離および拡大増殖でき、全血から単離されたDNTと同等の特徴を示すことを実証している。

【0150】

まとめると、本特許に概略を述べた結果は、複数ドナーの白血球アフエーシス試料から

DNTを単離およびプールして大規模拡大増殖を可能にできることを実証している。大規模拡大増殖を使用すると、単一のドナーから1回で得ることができる全血の最大量を使用して2~3人の患者を処置するのではなく、単回の拡大増殖培養から数百人の患者を処置するために十分な細胞産物を製造することができる。

【0151】

本明細書において引用されるすべての刊行物、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かつ個別にその全体で参照により組み入れられると示された場合と同じ程度で、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。

【0152】

参考文献

- 1 Park, J. H. *et al.* Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **378**, 449-459, doi:10.1056/NEJMoa1709919 (2018).
- 2 Tran, E. *et al.* T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2255-2262, doi:10.1056/NEJMoa1609279 (2016).
- 3 Kalos, M. & June, C. H. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity* **39**, 49-60, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.002 (2013).
- 4 Maus, M. V. *et al.* Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat. Biotechnol.* **20**, 143-148, doi:10.1038/nbt0202-143 (2002).
- 5 FDA Approves Second CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov* **8**, 5-6, doi:10.1158/2159-8290.CD-NB2017-155 (2018).
- 6 June, C. H., Riddell, S. R. & Schumacher, T. N. Adoptive cellular therapy: a race to the finish line. *Sci Transl Med* **7**, 280ps287, doi:10.1126/scitranslmed.aaa3643 (2015).
- 7 Dickinson, A. M. *et al.* Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Front Immunol* **8**, 496, doi:10.3389/fimmu.2017.00496 (2017).
- 8 Chang, X., Zang, X. & Xia, C. Q. New strategies of DLI in the management of relapse of hematological malignancies after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* **51**, 324-332, doi:10.1038/bmt.2015.288 (2016).
- 9 Devillier, R. *et al.* Outcome of relapse after allogeneic stem cell transplant in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **54**, 1228-1234, doi:10.3109/10428194.2012.741230 (2013).
- 10 Zeiser, R. & Blazar, B. R. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2167-2179, doi:10.1056/NEJMra1609337 (2017).
- 11 Zeiser, R. & Blazar, B. R. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2565-2579, doi:10.1056/NEJMra1703472 (2017).
- 12 Ruella, M. & Kenderian, S. S. Next-Generation Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Going off the Shelf. *BioDrugs* **31**, 473-481, doi:10.1007/s40259-017-0247-0 (2017).
- 13 Chen, B., Lee, J. B., Kang, H., Minden, M. D. & Zhang, L. Targeting chemotherapy-resistant leukemia by combining DNT cellular therapy with conventional chemotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 88, doi:10.1186/s13046-018-0756-9 (2018).
- 14 Lee, J. *et al.* Allogeneic human double negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms. *Clinical Cancer Research (provisionally accepted)* (2017).

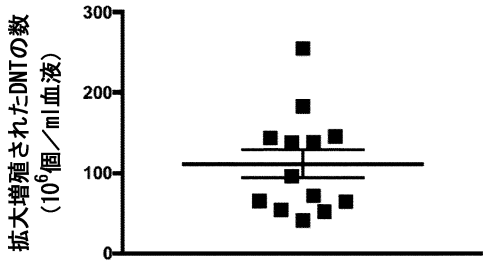
- 15 Merims, S. *et al.* Anti-leukemia effect of ex vivo expanded DNT cells from AML patients: a potential novel autologous T-cell adoptive immunotherapy. *Leukemia* **25**, 1415-1422, doi:10.1038/leu.2011.99 (2011).
- 16 Lee, J. B. *et al.* Developing Allogeneic Double-Negative T Cells as a Novel Off-the-Shelf Adoptive Cellular Therapy for Cancer. *Clin. Cancer Res.* **25**, 2241-2253, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2291 (2019).
- 17 Legut, M., Dolton, G., Mian, A. A., Ottmann, O. G. & Sewell, A. K. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells. *Blood* **131**, 311-322, doi:10.1182/blood-2017-05-787598 (2018).
- 18 Poirot, L. *et al.* Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res.* **75**, 3853-3864, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3321 (2015). 10
- 19 Gattinoni, L., Klebanoff, C. A. & Restifo, N. P. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 671-684, doi:10.1038/nrc3322 (2012).
- 20 Torikai, H. & Cooper, L. J. Translational Implications for Off-the-shelf Immune Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors. *Mol. Ther.* **24**, 1178-1186, doi:10.1038/mt.2016.106 (2016).
- 21 Torikai, H. *et al.* Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. *Blood* **122**, 1341-1349, doi:10.1182/blood-2013-03-478255 (2013).
- 22 Rosenbaum, L. Tragedy, Perseverance, and Chance - The Story of CAR-T Therapy. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1313-1315, doi:10.1056/NEJMp1711886 (2017). 20
- 23 Gedye, C. A. *et al.* Cell surface profiling using high-throughput flow cytometry: a platform for biomarker discovery and analysis of cellular heterogeneity. *PLoS ONE* **9**, e105602, doi:10.1371/journal.pone.0105602 (2014).
- 24 Chimenti, I. *et al.* Serum and supplement optimization for EU GMP-compliance in cardiospheres cell culture. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 624-634, doi:10.1111/jcmm.12210 (2014).
- 25 O'Boyle, G. *et al.* Chemokine receptor CXCR3 agonist prevents human T-cell migration in a humanized model of arthritic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4598-4603, doi:10.1073/pnas.1118104109 (2012). 30
- 26 Hirota, K. *et al.* Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.* **204**, 2803-2812, doi:10.1084/jem.20071397 (2007).
- 27 Oswald, C. *et al.* Intracellular allosteric antagonism of the CCR9 receptor. *Nature* **540**, 462-465, doi:10.1038/nature20606 (2016).
- 28 Woods, E. J., Thirumala, S., Badhe-Buchanan, S. S., Clarke, D. & Mathew, A. J. Off the shelf cellular therapeutics: Factors to consider during cryopreservation and storage of human cells for clinical use. *Cytotherapy* **18**, 697-711, doi:10.1016/j.jcyt.2016.03.295 (2016).
- 29 Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 666-675, doi:10.1038/nrc1167 (2003). 40

- 30 Boni, A. *et al.* Adoptive transfer of allogeneic tumor-specific T cells mediates effective regression of large tumors across major histocompatibility barriers. *Blood* **112**, 4746-4754, doi:10.1182/blood-2008-07-169797 (2008).
- 31 Chambers, J. D. & Neumann, P. J. Listening to Provenge--what a costly cancer treatment says about future Medicare policy. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1687-1689, doi:10.1056/NEJMp1103057 (2011).
- 32 Brenner, M. K. Will T-cell therapy for cancer ever be a standard of care? *Cancer Gene Ther.* **19**, 818-821, doi:10.1038/cgt.2012.74 (2012).
- 33 Sheridan, C. Allogene and Celularity move CAR-T therapy off the shelf. *Nat. Biotechnol.* **36**, 375-377, doi:10.1038/nbt0518-375 (2018). 10
- 34 Yao, J. *et al.* Human double negative T cells target lung cancer via ligand-dependent mechanisms that can be enhanced by IL-15. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* volume 7, Article number: 17 (2019), doi:https://doi.org/10.1186/s40425-019-0507-2.
- 35 Jacoby, E. *et al.* Murine allogeneic CD19 CAR T cells harbor potent antileukemic activity but have the potential to mediate lethal GVHD. *Blood* **127**, 1361-1370, doi:10.1182/blood-2015-08-664250 (2016).
- 36 Provasi, E. *et al.* Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat. Med.* **18**, 807-815, doi:10.1038/nm.2700 (2012).
- 37 Young, K. J., Kay, L. S., Phillips, M. J. & Zhang, L. Antitumor activity mediated by double-negative T cells. *Cancer Res.* **63**, 8014-8021 (2003). 20
- 38 Young, K. J., DuTemple, B., Zhang, Z. X., Levy, G. & Zhang, L. CD4-CD8-regulatory T cells implicated in preventing graft-versus-host and promoting graft-versus-leukemia responses. *Transplant. Proc.* **33**, 1762-1763, doi:10.1016/s0041-1345(00)02670-1 (2001).
- 39 Bian, Z. *et al.* Association of Epstein-Barr virus reactivation with the recovery of CD4/CD8 double-negative T lymphocytes after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **52**, 264-269, doi:10.1038/bmt.2016.238 (2017).
- 40 Suck, G. *et al.* NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 485-492, doi:10.1007/s00262-015-1761-x (2016). 30
- 41 Tonn, T. *et al.* Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* **15**, 1563-1570, doi:10.1016/j.jcyt.2013.06.017 (2013).
- 42 Romee, R. *et al.* Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med* **8**, 357ra123, doi:10.1126/scitranslmed.aaf2341 (2016).

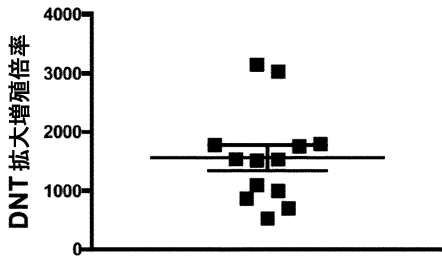
【 図 画 】

【 図 1 - 1 】

A

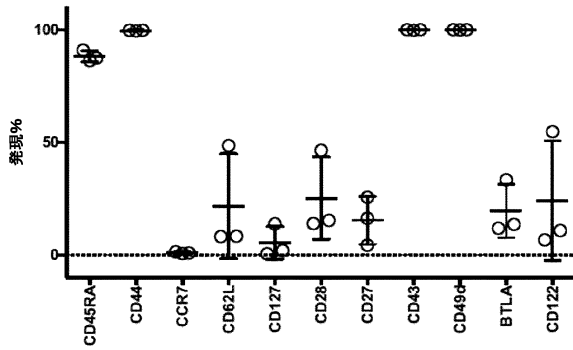


B

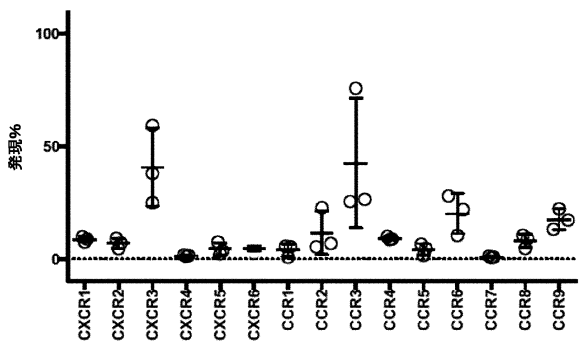


【 図 1 - 3 】

E

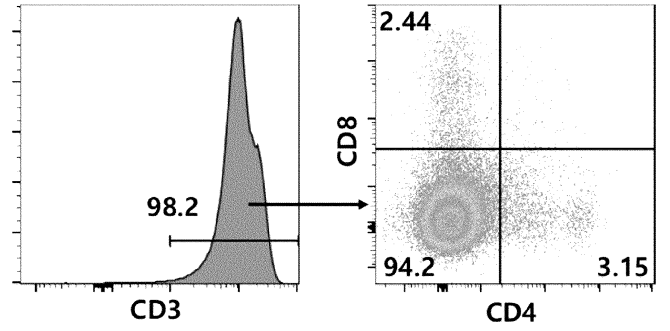


F



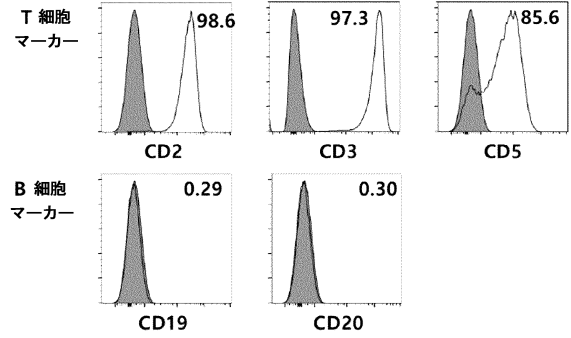
【 図 1 - 2 】

C



10

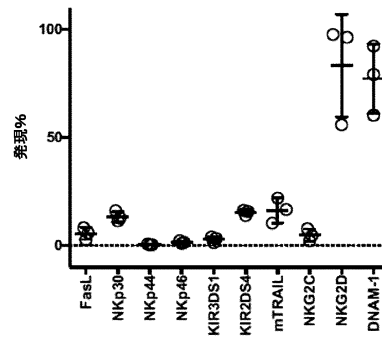
D



20

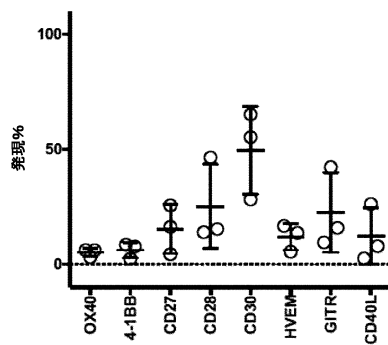
【 図 1 - 4 】

G



30

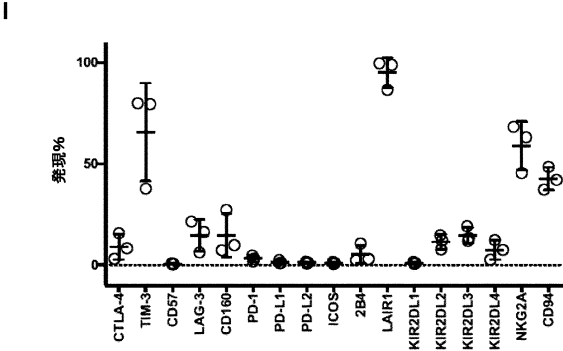
H



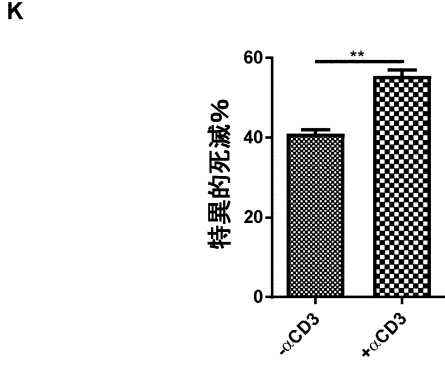
40

50

【図 1 - 5】

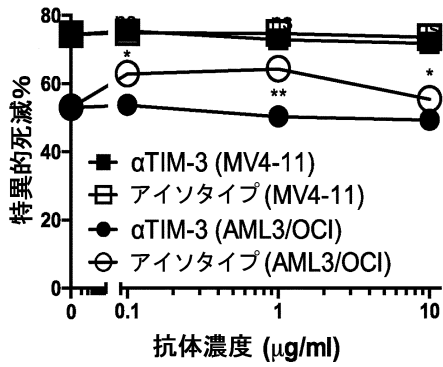


【図 1 - 6】



10

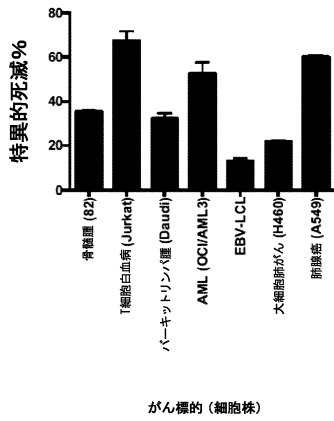
J



20

【図 2 - 1】

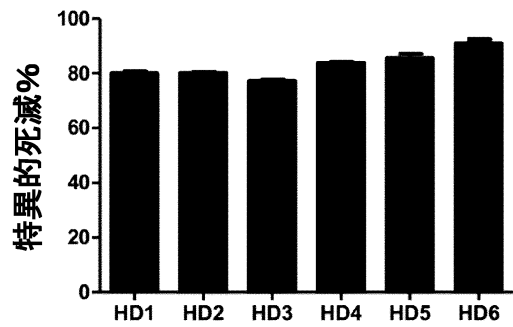
A



がん標的 (細胞株)

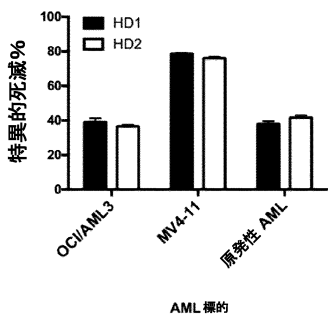
【図 2 - 2】

C



30

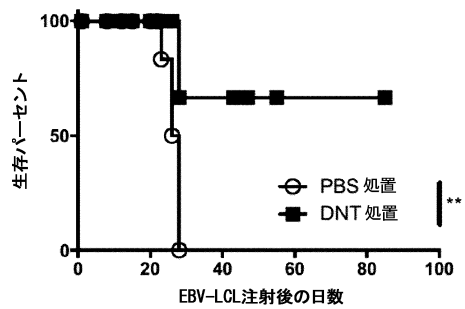
B



AML 標的

D

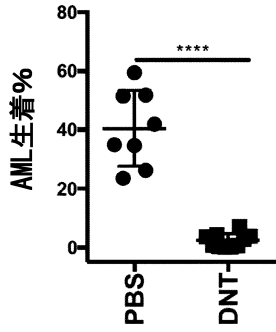
EBV-LCL



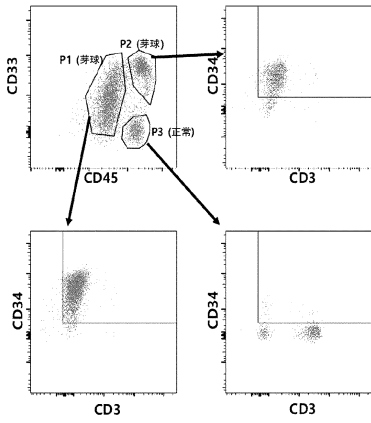
40

50

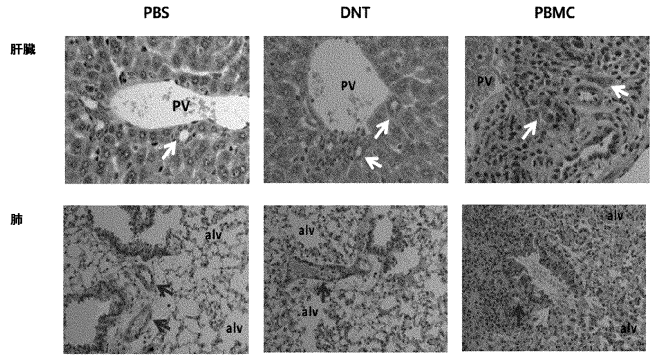
【 図 2 - 3 】
E



F

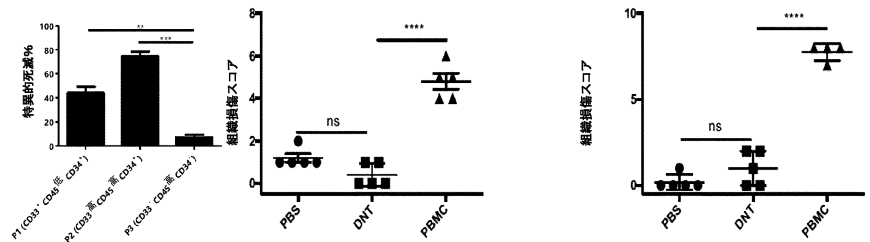


【 図 2 - 4 】
G



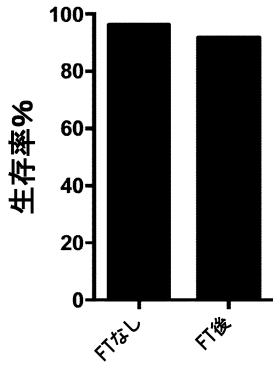
10

H



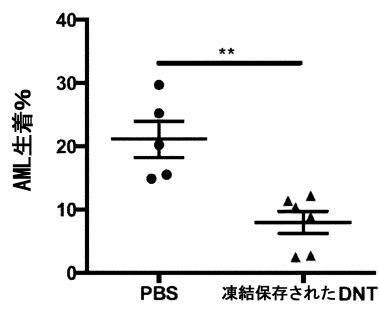
20

【 図 3 - 1 】
A



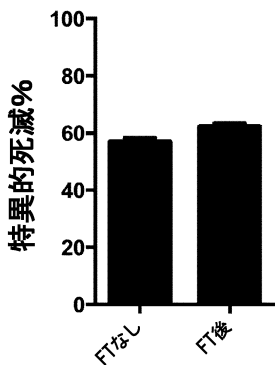
30

【 図 3 - 2 】
C

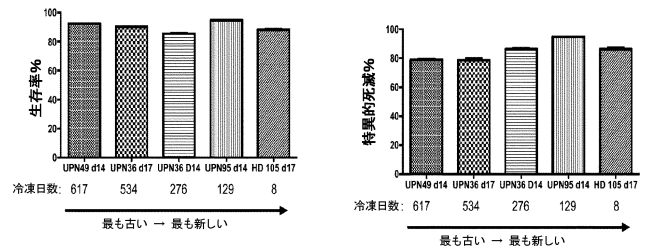


40

B



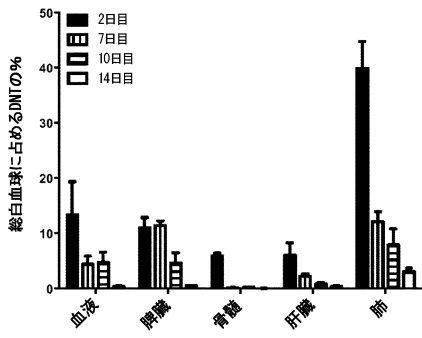
D



50

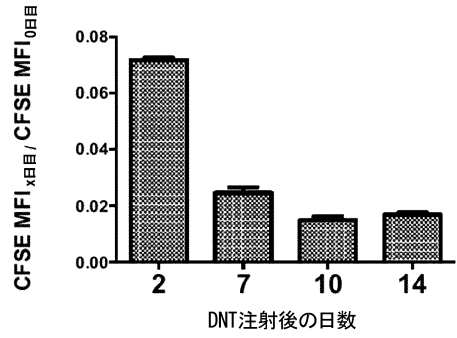
【 図 4 - 1 】

A



【 図 4 - 2 】

C



10

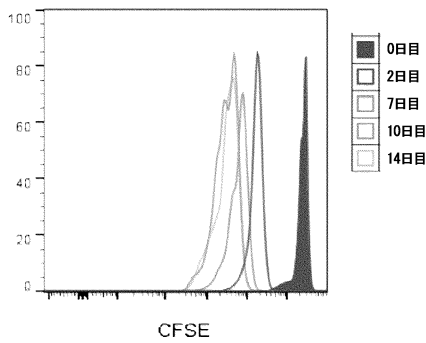
20

30

40

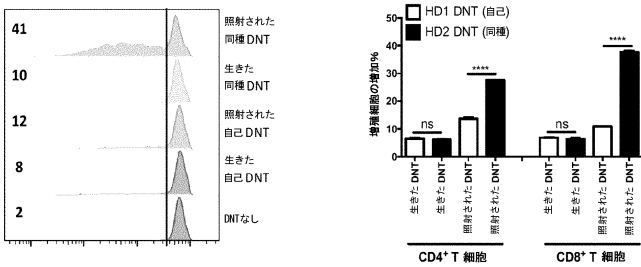
50

B

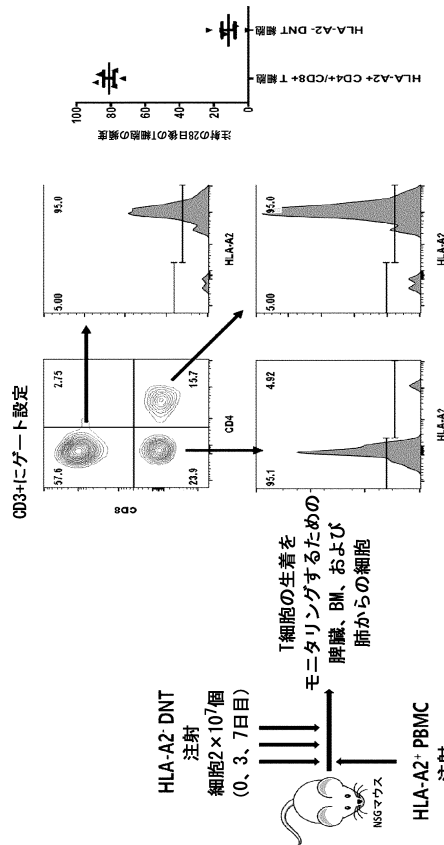


【 図 4 - 3 】

E

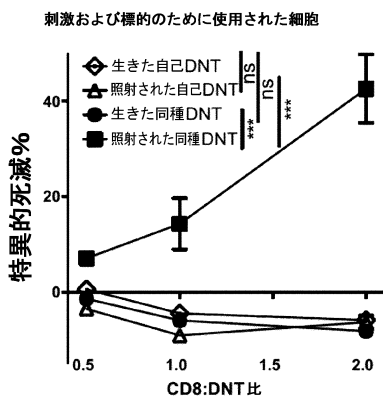


【 図 4 - 4 】



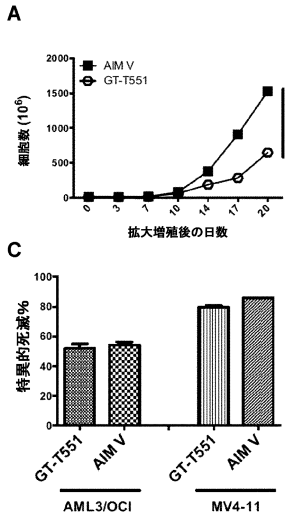
50

F

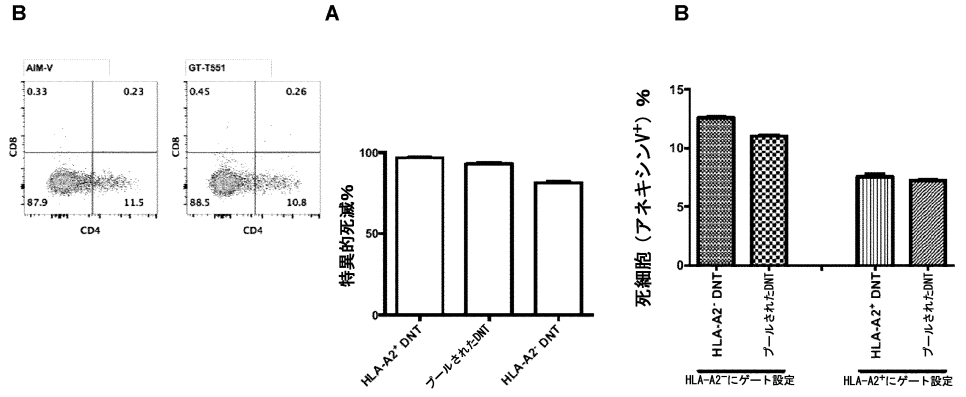


G

【 図 5 】

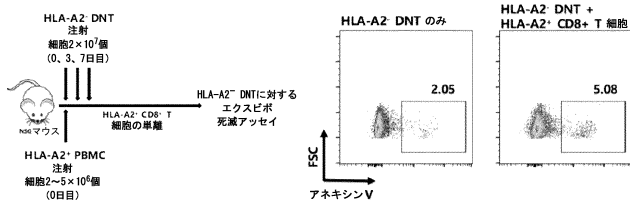


【 図 6 】

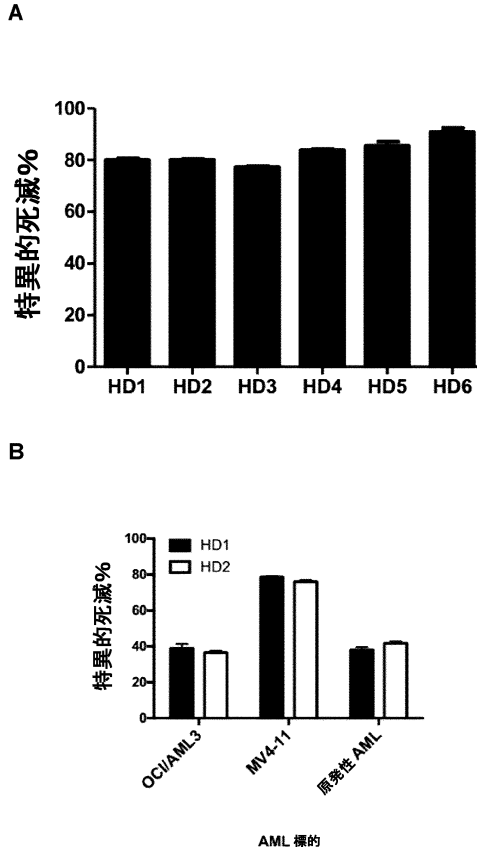


10

【 図 7 】



【 図 8 】



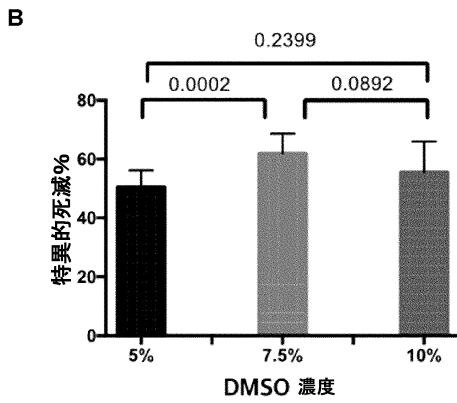
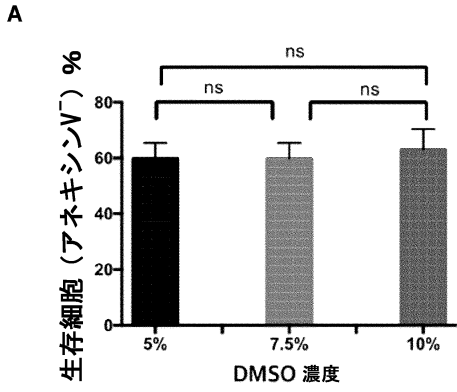
20

30

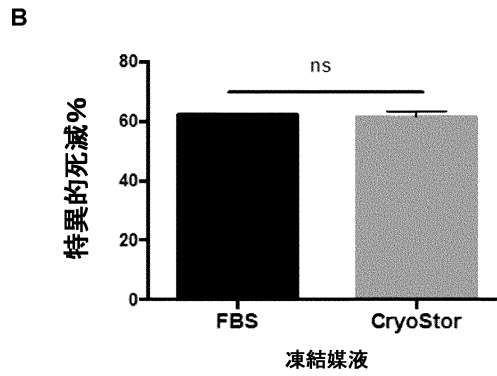
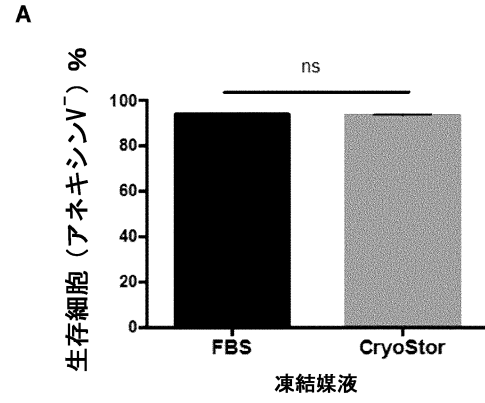
40

50

【 図 9 】



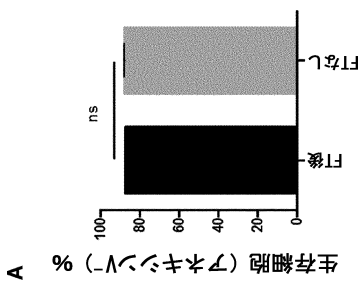
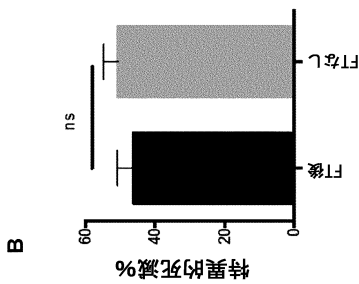
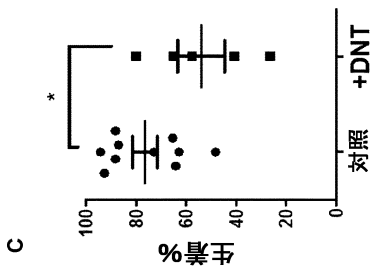
【 図 10 】



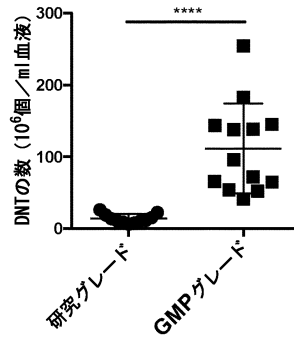
10

20

【 図 11 】



【 図 12 】

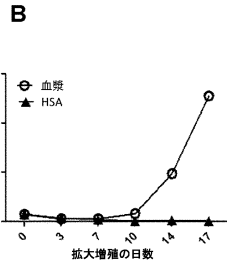
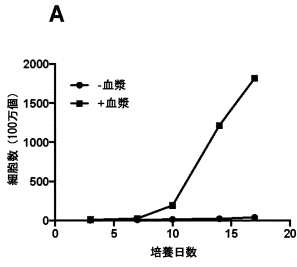


30

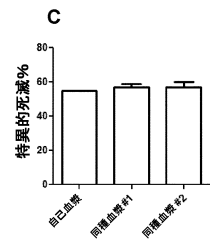
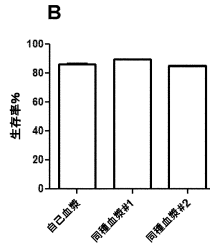
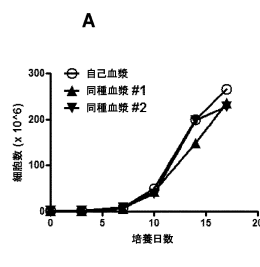
40

50

【 13 】



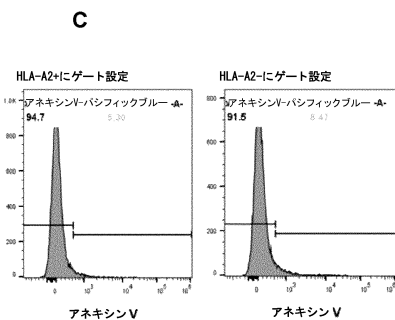
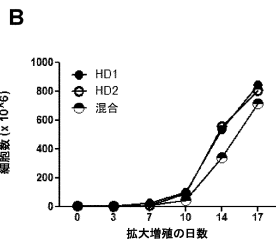
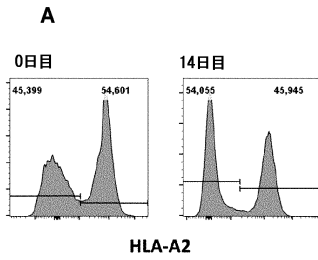
【 14 】



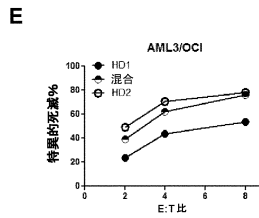
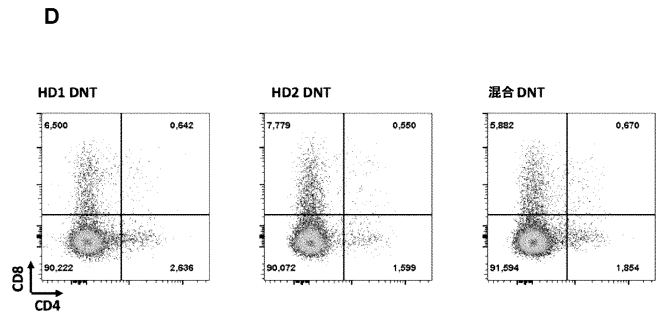
10

20

【 15 - 1 】



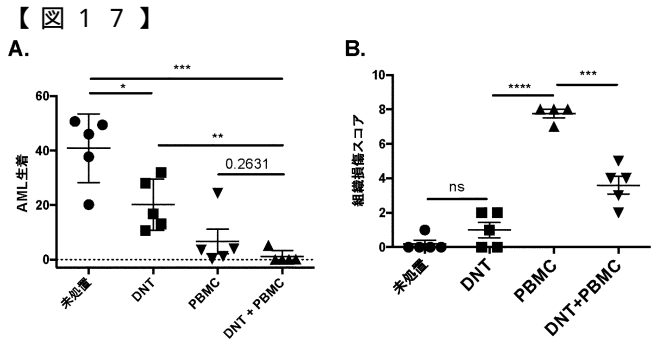
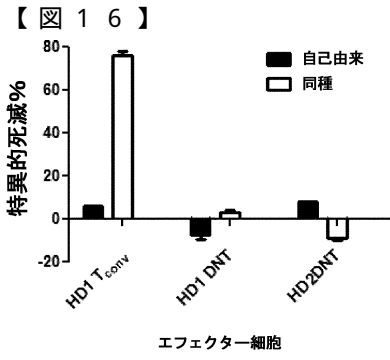
【 15 - 2 】



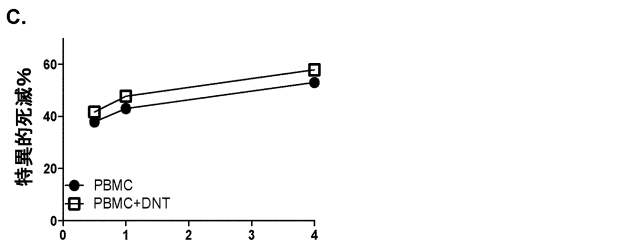
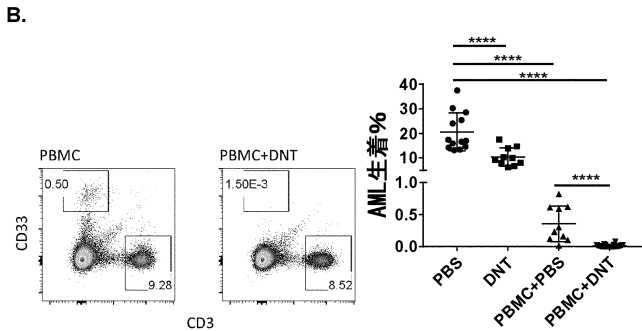
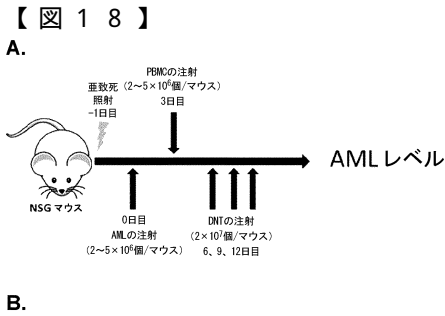
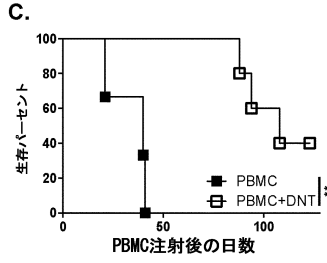
30

40

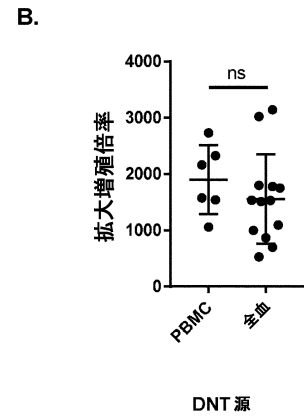
50



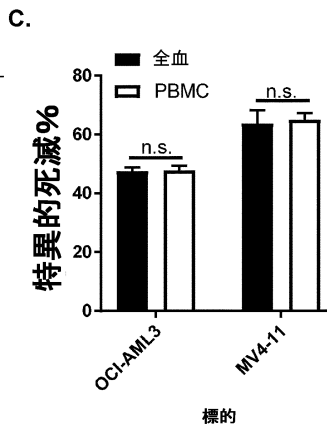
10



20



30



40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2019/051866
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12N 5/0783</i> (2010.01), <i>A01N 1/02</i> (2006.01), <i>A61K 35/17</i> (2015.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: ALL		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched None		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Questel-Orbit and PubMed (keywords: "double negative", T-cell, storage, cancer, therapy, tumour, CD44, homing, chemokine, target*, regression, engineer*, antitumor, Zhang, L, Lee, J.)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<input checked="" type="checkbox"/> X Y	WO2007056854A1 (ZHANG, L. et al.) 24 May 2007 (24-05-2007) whole document	1-12, 14-16, 18-20, 23-25, 27-34, 39-42, 44-54, 59-69 and 71-76 13, 17, 21, 22, 35, 36, 43, 55-58 and 70
Y	CHEN, B. et al. "Targeting Chemotherapy-Resistant Leukemia by Combining DNT Cellular Therapy with Conventional Chemotherapy". J. Exp. Clin. Cancer Res. 2018. Vol. 37, pp 1-11 ISSN: 1756-9966 (Electronic) whole document	35 and 55-58
Y	LEE, J. et al. "Allogeneic Human Double Negative T Cells as a Novel Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia and Its Underlying Mechanisms". Clin. Cancer Res. 2018. Vol. 24, pp 370-82 ISSN: 1078-0432 (Electronic) whole document	13, 21, 22 and 70
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 07 February 2020 (07-02-2020)		Date of mailing of the international search report 28 February 2020 (28-02-2020)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Philip Marshall (819) 639-5251

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2019/051866

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANKRI, C. et al. "Human T Cells Engineered To Express a Programmed Death 1/28 Costimulatory Retargeting Molecule Display Enhanced Antitumor Activity". J. Immunol. 2013. Vol. 191, pp 4121-29 ISSN: 1550-6606 whole document	17, 36 and 43
A	SINGH, V. et al. "Cooperativity of CD44 and CD49d in Leukemia Cell Homing, Migration, and Survival Offers a Means for Therapeutic Attack". J. Immunol. 2013. Vol. 191, pp 5304-16 ISSN: 1550-6606	

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2019/051866

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

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

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

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

- 3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Group A - Claims 1-17, 29-35 (partially), 38-63 (partially), 64-72, 75 (partially) and 76 (partially) are directed to a method of producing a population of double negative T cells (DNTs) from one or more donors, a population of DNTs produced by said method, a method of treating cancer by administering DNTs, use of DNTs for treating cancer, a method of expanding a population of DNTs from two or more donors and use of said expanded DNTs;

Group B – Claims 18-28, 29-35 (partially), 38-63 (partially), 73, 74, 75 (partially) and 76 (partially) are directed to a method of cryopreserving DNTs, a population of DNTs produced by said method, a method of treating cancer by administering DNTs, use of DNTs for treating cancer, a method for cryopreserving DNTs at less than -70°C and use of said cryopreserved DNTs;

(continued on page 6)

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

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

30

40

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

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2019/051866

(continued from box III on page 2)

Group C - Claim 36 is directed to a method to enhance activity of DNTs by inhibiting co-inhibitory molecules; and

Group D - Claim 37 is directed to a method to modulate tissue trafficking and homing of DNTs.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13. The only common feature between claims of groups A to D is DNTs but said DNTs were well known in the art at the time of filing as exemplified by D1. Therefore, there is no single inventive general concept linking claims of groups A to D and each claim group is considered a separate invention.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2019/051866

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2007056854A1	24 May 2007 (24-05-2007)	CA2629532A1	24 May 2007 (24-05-2007)
		CA2629532C	09 August 2016 (09-08-2016)
		CN101313061A	26 November 2008 (26-11-2008)
		CN101313061B	15 May 2013 (15-05-2013)
		EP1948788A1	30 July 2008 (30-07-2008)
		EP1948788A4	01 July 2009 (01-07-2009)
		US2009098095A1	16 April 2009 (16-04-2009)
		US9018004B2	28 April 2015 (28-04-2015)
		US2016045550A1	18 February 2016 (18-02-2016)
		US9925220B2	27 March 2018 (27-03-2018)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/04 (2006.01)
C 1 2 N 5/0789(2010.01)

F I

A 6 1 K 39/395
C 1 2 N 1/04
C 1 2 N 5/0789

テーマコード (参考)

N

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

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャン リー

カナダ エム6 エス 1 エス6 オンタリオ州 トロント ウェザレル ストリート 3

(72)発明者 イ ジョン ボク

カナダ エム5 ジー 2 アール3 オンタリオ州 トロント ベイ ストリート 7 6 3 スイート 2 3 0 8

(72)発明者 カン ヒョンジョン

カナダ エム2 エヌ 7 エイチ2 オンタリオ州 ノース ヨーク ロレイン ドライブ 1 8 0 7 - 7

F ターム (参考) 4B065 AA92X AA94X BB19 BB32 BD09 BD39 CA44

4C085 AA13 AA14 BB11

4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 NA05 NA14 ZB26 ZB27

【要約の続き】

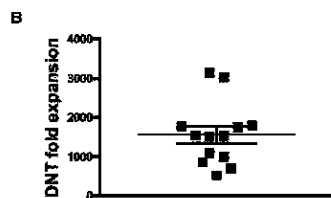
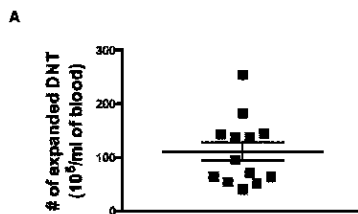


FIG. 1