

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-529847

(P2020-529847A)

(43) 公表日 令和2年10月15日 (2020. 10. 15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/078 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/078	4 B 0 6 5
<b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/47 Z N A	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 N 5/0781 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0781	4 C 0 8 7
<b>C 1 2 N 5/0783 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0783	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-505464 (P2020-505464)	(71) 出願人	511017508
(86) (22) 出願日	平成30年8月1日 (2018. 8. 1)		タイガ バイオテクノロジーズ, インク.
(85) 翻訳文提出日	令和2年3月2日 (2020. 3. 2)		アメリカ合衆国 8 0 0 4 5 - 7 3 3 6
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/044740		コロラド州 オーロラ イースト・モント
(87) 国際公開番号	W02019/028098		ビュー・ブルバード 1 2 6 3 5
(87) 国際公開日	平成31年2月7日 (2019. 2. 7)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	62/540, 901		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成29年8月3日 (2017. 8. 3)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫
		(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
			弁理士 井上 隆一
		最終頁に続く	

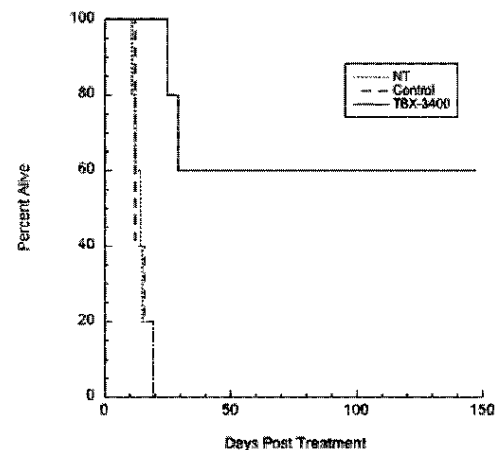
(54) 【発明の名称】 がんの処置のための方法および組成物

## (57) 【要約】

抗腫瘍活性を有する免疫細胞の治療的に有効な量を対象へ投与する工程であって、該対象への投与前に該免疫細胞をタンパク質形質導入ドメイン (PTD) -MYC融合ポリペプチドと接触させる、該工程を含む、がんの処置のための養子細胞移入のための方法が本明細書中に提供される。いくつかの態様において、該PTD-MYC融合ポリペプチドは、(i) HIV TATタンパク質形質導入ドメイン；および(ii) MYCポリペプチド配列を含む。

FIG. 1

M-TBX-3400 Experiment 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

(a) (i) タンパク質形質導入ドメイン；(ii) MYCポリペプチド配列を含む、MYC融合ペプチド；および

(b) 固形腫瘍を有するドナー対象から単離され、腫瘍特異的抗原に対して反応性である、1種類または複数種類の初代免疫細胞を含む、組成物。

**【請求項 2】**

前記固形腫瘍が、がん腫、腺腫、腺がん、芽細胞腫、肉腫、またはリンパ腫である、請求項1に記載の組成物。

**【請求項 3】**

前記固形腫瘍が転移性腫瘍である、請求項1に記載の組成物。

**【請求項 4】**

前記固形腫瘍が、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、絨毛がん、CNSがん、結腸がん、結腸直腸がん、結合組織がん、消化器系のがん、子宮内膜がん、食道がん、眼がん、胃がん (gastric cancer)、グリア細胞腫瘍、頭頸部がん、肝細胞がん、肝がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、表皮内新生物、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、メラノーマ、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、呼吸器系のがん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、扁平上皮細胞がん、胃がん (stomach cancer)、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、泌尿器系のがん、または外陰がんである、請求項1に記載の組成物。

**【請求項 5】**

前記MYC融合ペプチドがSEQ ID NO:1を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記1種類または複数種類の免疫細胞が、固形腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 7】**

前記1種類または複数種類の免疫細胞が、1種類または複数種類のリンパ球を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記1種類または複数種類のリンパ球が、T細胞、B細胞、NK細胞、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項7に記載の組成物。

**【請求項 9】**

前記1種類または複数種類のリンパ球が、腫瘍浸潤リンパ球、T細胞受容体修飾型リンパ球、またはキメラ抗原受容体修飾型リンパ球である、請求項7または8に記載の組成物。

**【請求項 10】**

前記腫瘍浸潤リンパ球が、CD8+CD25+シグネチャーまたはCD4+CD25+シグネチャーを有する、請求項9に記載の組成物。

**【請求項 11】**

前記1種類または複数種類の免疫細胞が検出可能な部分を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 12】**

それを必要とする対象へ1種類または複数種類の修飾型免疫細胞を投与する工程であって、該1種類または複数種類の修飾型免疫細胞がMYC融合ペプチドを含み、該MYC融合ペプチドが (i) タンパク質形質導入ドメイン；(ii) MYCポリペプチド配列を含み、かつ該1種類または複数種類の修飾型免疫細胞が腫瘍特異的抗原に反応性である、該工程を含む、対象におけるがんを処置するための方法。

**【請求項 13】**

10

20

30

40

50

前記1種類または複数種類の修飾型免疫細胞が、前記対象から単離された初代免疫細胞に由来する、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記1種類または複数種類の修飾型免疫細胞が、同一の型のがんを有する別のドナー対象から単離された初代免疫細胞に由来する、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

前記がんががん腫または肉腫である、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記がんが転移性がんである、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記がんが、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、絨毛がん、CNSがん、結腸がん、結腸直腸がん、結合組織がん、消化器系のがん、子宮内膜がん、食道がん、眼がん、胃がん、グリア細胞腫瘍、頭頸部がん、肝細胞がん、肝がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、表皮内新生物、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、メラノーマ、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、呼吸器系のがん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、扁平上皮細胞がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、泌尿器系のがん、または外陰がんである、請求項12～14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項18】

前記1種類または複数種類の修飾型免疫細胞が、前記初代免疫細胞を単離後にインビトロで前記MYC融合ペプチドと接触させることによって調製される、請求項13～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記MYC融合ペプチドとの接触の前または後にインビトロで前記初代免疫細胞を増大させる工程をさらに含む、請求項13～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記MYC融合ペプチドがSEQ ID NO:1を含む、請求項12～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記1種類または複数種類の修飾型免疫細胞が、前記対象におけるがん細胞に対する抗腫瘍活性を有する、請求項12～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記1種類または複数種類の修飾型免疫細胞が、1種類または複数種類のアネルギー性免疫細胞を含む、請求項12～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記1種類または複数種類の免疫細胞が、1種類または複数種類のリンパ球を含む、請求項12～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記1種類または複数種類のリンパ球が、T細胞、B細胞、NK細胞、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記1種類または複数種類のリンパ球が、腫瘍浸潤リンパ球、T細胞受容体修飾型リンパ球、またはキメラ抗原受容体修飾型リンパ球である、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記リンパ球が、CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD152<sup>-</sup>シグネチャー、CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>シグネチャー、またはCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>シグネチャーを有する、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記初代免疫細胞を前記ドナー対象から単離する工程をさらに含む、請求項13～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

10

20

30

40

50

前記1種類または複数種類の修飾型免疫細胞が、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、または腫瘍内に投与される、請求項12～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記1種類または複数種類の修飾型免疫細胞の投与前に前記対象をリンパ球枯渇状態にする工程をさらに含む、請求項12～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

サイトカインを前記対象へ投与する工程をさらに含む、請求項12～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記対象がヒトまたは動物である、請求項12～30のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 32】

追加のがん治療を実施する工程をさらに含む、請求項12～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

1種類または複数種類の免疫細胞をインビトロでMYC融合ポリペプチドと接触させる工程であって、該免疫細胞が、1種類または複数種類の腫瘍抗原に曝露されたドナーに由来し、かつ該MYC融合ペプチドが(i)タンパク質形質導入ドメイン；(ii)MYCポリペプチド配列を含み、かつ該免疫細胞が腫瘍特異的抗原に反応性である、該工程を含む、がん治療のための修飾型免疫細胞を調製するための方法。

【請求項 34】

20

1種類または複数種類の前記修飾型免疫細胞が、がんを有する対象から単離された初代免疫細胞に由来する、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

前記MYC融合ペプチドとの接触の前または後にインビトロで前記初代免疫細胞を増大させる工程をさらに含む、請求項33または34に記載の方法。

【請求項 36】

前記MYC融合ペプチドがSEQ ID NO:1を含む、請求項33～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

1種類または複数種類の前記修飾型免疫細胞が抗腫瘍活性を有する、請求項33または34に記載の方法。

30

【請求項 38】

前記1種類または複数種類の免疫細胞が、T細胞、B細胞、NK細胞、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項33～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記1種類または複数種類の免疫細胞が、腫瘍浸潤リンパ球、T細胞受容体修飾型リンパ球、またはキメラ抗原受容体修飾型リンパ球である、請求項33～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物を投与する工程を含む、対象における養子細胞治療またはT細胞治療の有効性を増大させるための方法。

40

【請求項 41】

がんの処置において使用するための、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 42】

がんの処置のための医薬の製造における、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

50

本願は、2017年8月3日に出願された米国仮特許出願第62/540,901号に基づく優先権の恩典を主張するものであり、その内容全体が参照によって本明細書中に組み入れられる。

【0002】

配列表

本願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる配列表を含有している。2018年7月24日に作成された該ASCIIコピーは、106417-0333\_SL.txtという名前であり、22,015バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

養子細胞移入 (ACT) は、抗腫瘍活性を有する免疫細胞の患者への移入を含む免疫治療の一形態である。ACTは、典型的には、抗腫瘍活性を有するリンパ球を患者から単離し、集団を増大させるためにインビトロでリンパ球を培養し、次いで、がんを保持する宿主へリンパ球を注入することを含む。養子移入のために使用されるリンパ球は、切除された腫瘍の間質 (例えば、腫瘍浸潤リンパ球)、リンパ管もしくはリンパ節、または血液のいずれかに由来し得る。いくつかのケースにおいて、単離されたリンパ球は、抗腫瘍性のT細胞受容体 (TCR) またはキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するよう遺伝学的に改変される。注入のために使用されるリンパ球は、ドナー (同種ACT) またはがんを保持する宿主 (自己ACT) から単離され得る。

【発明の概要】

【0004】

ある種の態様において、がんの処置のための養子細胞移入のための方法が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、抗腫瘍活性を有する免疫細胞の治療的に有効な量を対象へ投与する工程であって、対象への投与前に、免疫細胞をタンパク質形質導入ドメイン (PTD) -MYC融合ポリペプチドと接触させる、工程を含む、対象におけるがんの処置のための方法が提供される。いくつかの態様において、免疫細胞は、1種類または複数種類のリンパ球を含む。いくつかの態様において、1種類または複数種類のリンパ球は、T細胞および/またはB細胞を含む。いくつかの態様において、1種類または複数種類のリンパ球は、腫瘍浸潤リンパ球を含む。いくつかの態様において、がんは、転移性がんである。いくつかの態様において、がんは、がん腫、腺腫、腺がん、芽細胞腫、肉腫、またはリンパ腫である。いくつかの態様において、がんは、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、絨毛がん、CNSがん、結腸がん、結腸直腸がん、結合組織がん、消化器系のがん、子宮内膜がん、食道がん、眼がん、胃がん (gastric cancer)、グリア細胞腫瘍、頭頸部がん、肝細胞がん、肝がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、表皮内新生物、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、メラノーマ、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔がん、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、呼吸器系のがん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、扁平上皮細胞がん、胃がん (stomach cancer)、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、泌尿器系のがん、または外陰がんである。いくつかの態様において、免疫細胞は、固形腫瘍を有するドナー対象から得られる。いくつかの態様において、固形腫瘍は、転移性腫瘍である。いくつかの態様において、免疫細胞は、メラノーマまたは結腸がんを有するドナー対象から得られる。いくつかの態様において、ドナー対象と、免疫細胞を受容する対象とは、同一である (即ち、自己ACT)。いくつかの態様において、ドナー対象と、免疫細胞を受容する対象とは、異なる (即ち、同種ACT)。

【0005】

いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチドは、(i) HIV TATタンパク質形質導入ドメイン; および (ii) MYCポリペプチド配列を含む。いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチドは、免疫細胞の核へ移動する。いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチドは、MYC標的遺伝子の活性化のようなMYCの生物学的活性を示す。いくつかの態様において、融合ペプチドは、SEQ ID NO:1を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 6 】

ある種の態様において、(a)(i)タンパク質形質導入ドメイン；(ii)MYCポリペプチド配列を含む、MYC融合ペプチド；および(b)腫瘍を有するドナー対象から単離され、腫瘍特異的抗原に対して反応性である、1種類または複数種類の初代免疫細胞を含む、組成物が、本明細書中に記載される。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、1種類または複数種類の初代免疫細胞の核へ移動する。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、MYCの生物学的活性を示す。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、タンパク質形質導入ドメインとMYCポリペプチドとを連結する1つまたは複数の分子をさらに含む。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、以下の一般構造：

タンパク質形質導入ドメイン-X-MYC配列

を有するMYC融合ペプチドを含み、

ここで、-X-は、タンパク質形質導入ドメインとMYC配列とを連結する分子である。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメイン配列は、TATタンパク質形質導入ドメイン配列である。いくつかの態様において、TATタンパク質形質導入ドメイン配列は、TAT[48~57]およびTAT[57~48]からなる群より選択される。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、SEQ ID NO:1を含む。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、アセチル化されている。いくつかの態様において、1種類または複数種類の免疫細胞は、腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性を有する、いくつかの態様において、1種類または複数種類の免疫細胞は、1種類または複数種類のリンパ球を含む。いくつかの態様において、1種類または複数種類のリンパ球は、T細胞、B細胞、NK細胞、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、T細胞は、ナイーブT細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、メモリーT細胞、活性化T細胞、アネルギー性T細胞、寛容T細胞、キメラB細胞、および抗原特異的T細胞からなる群より選択される。いくつかの態様において、B細胞は、ナイーブB細胞、形質B細胞、活性化B細胞、メモリーB細胞、アネルギー性B細胞、寛容B細胞、キメラB細胞、および抗原特異的B細胞からなる群より選択される。いくつかの態様において、1種類または複数種類のリンパ球は、腫瘍浸潤リンパ球、T細胞受容体修飾型リンパ球、またはキメラ抗原受容体修飾型リンパ球である。いくつかの態様において、腫瘍浸潤リンパ球は、CD8+CD25+シグネチャーを有する。いくつかの態様において、リンパ球は、CD4+CD25+シグネチャーを有する。いくつかの態様において、1種類または複数種類の免疫細胞は、検出可能な部分を含む。

## 【 0 0 0 7 】

ある種の態様において、それを必要とする対象へ1種類または複数種類の修飾型免疫細胞を投与する工程であって、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞がMYC融合ペプチドを含み、MYC融合ペプチドが(i)タンパク質形質導入ドメイン；(ii)MYCポリペプチド配列を含み、かつ、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞が、腫瘍特異的抗原に反応性である、工程を含む、対象における腫瘍を処置するための方法が、本明細書中に記載される。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、対象から単離された初代免疫細胞に由来する。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、同一の型の腫瘍を有する別のドナー対象から単離された初代免疫細胞に由来する。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、初代免疫細胞を単離後にインビトロでMYC融合ペプチドと接触させることによって調製される。いくつかの態様において、方法は、MYC融合ペプチドとの接触前にインビトロで初代免疫細胞を増大させる工程をさらに含む。いくつかの態様において、方法は、MYC融合ペプチドとの接触後に初代免疫細胞を増大させる工程をさらに含む。いくつかの態様において、抗CD3抗体を使用して細胞を増大させる。いくつかの態様において、照射された同種フィーダー細胞を使用して細胞を増大させる。いくつかの態様において、外因性サイトカインの存在下で細胞を増大させる。いくつかの態様において、サイトカインは、インターロイキン2である。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、免疫細胞の核へ移動する。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、MYCの生物学的活性を示す。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、タンパク質形質導入ドメインとMYCポリペプチドとを連結す

10

20

30

40

50

る1つまたは複数の分子をさらに含む。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、以下の一般構造：

タンパク質形質導入ドメイン-X-MYC配列

を有するMYC融合ペプチドを含み、

ここで、-X-は、タンパク質形質導入ドメインとMYC配列とを連結する分子である。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメイン配列は、TATタンパク質形質導入ドメイン配列である。いくつかの態様において、TATタンパク質形質導入ドメイン配列は、TAT [48～57]およびTAT[57～48]からなる群より選択される。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、SEQ ID NO:1を含む。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、アセチル化されている。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、対象において腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性を有する。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、対象において腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性を有する。いくつかの態様において、がん細胞は、固形腫瘍細胞である。いくつかの態様において、固形腫瘍は、転移性腫瘍である。いくつかの態様において、がん細胞は、メラノーマ細胞または結腸腫瘍細胞である。いくつかの態様において、がん細胞は、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、絨毛がん、CNSがん、結腸がん、結腸直腸がん、結合組織がん、消化器系のがん、子宮内膜がん、食道がん、眼がん、胃がん、グリア細胞腫瘍、頭頸部がん、肝細胞がん、肝がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、表皮内新生物、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、メラノーマ、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、呼吸器系のがん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、扁平上皮細胞がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、泌尿器系のがん、または外陰がん由来する。いくつかの態様において、免疫細胞は、固形腫瘍を有するドナー対象から得られる。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、1種類または複数種類のアネルギー性免疫細胞を含む。いくつかの態様において、1種類または複数種類の免疫細胞は、1種類または複数種類のリンパ球を含む。いくつかの態様において、1種類または複数種類のリンパ球は、T細胞、B細胞、NK細胞、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、T細胞は、ナイーブT細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、メモリーT細胞、活性化T細胞、アネルギー性T細胞、寛容T細胞、キメラB細胞、および抗原特異的T細胞からなる群より選択される。いくつかの態様において、B細胞は、ナイーブB細胞、形質B細胞、活性化B細胞、メモリーB細胞、アネルギー性B細胞、寛容B細胞、キメラB細胞、および抗原特異的B細胞からなる群より選択される。いくつかの態様において、1種類または複数種類のリンパ球は、腫瘍浸潤リンパ球、T細胞受容体修飾型リンパ球、またはキメラ抗原受容体修飾型リンパ球である。いくつかの態様において、リンパ球は、CD8+CD28-CD152-シグネチャーを有する。いくつかの態様において、リンパ球は、CD8+CD25+シグネチャーを有する。いくつかの態様において、リンパ球は、CD4+CD25+シグネチャーを有する。いくつかの態様において、方法は、初代免疫細胞をドナー対象から単離する工程をさらに含む。いくつかの態様において、ドナー対象は、腫瘍を有する。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、または腫瘍内に投与される。いくつかの態様において、方法は、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞の投与前に、対象をリンパ球枯渇状態にする工程をさらに含む。いくつかの態様において、方法は、サイトカインを対象へ投与する工程をさらに含む。いくつかの態様において、サイトカインは、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞の投与の前、最中、または後に投与される。いくつかの態様において、サイトカインは、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、補体C5a、IL-2、TNF $\alpha$ 、CD40L、IL12、IL-23、IL15、IL17、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、

10

20

30

40

50

CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、およびXCL2からなる群より選択される。いくつかの態様において、腫瘍は、転移性である。いくつかの態様において、対象は、ヒトまたは動物である。いくつかの態様において、方法は、追加のがん治療を実施する工程をさらに含む。いくつかの態様において、追加のがん治療は、化学療法、放射線治療、免疫治療、モノクローナル抗体、抗がん性の核酸またはタンパク質、抗がん性のウイルスまたは微生物、およびそれらの任意の組み合わせの中より選択される。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、検出可能な部分を含む。

#### 【0008】

ある種の態様において、1種類または複数種類の免疫細胞をインビトロでMYC融合ペプチドと接触させる工程であって、免疫細胞が、1種類または複数種類の腫瘍抗原に曝露されたドナーに由来し、かつMYC融合ペプチドが、(i)タンパク質形質導入ドメイン；(ii)MYCポリペプチド配列を含み、かつ免疫細胞が腫瘍特異的抗原に反応性である、工程を含む、腫瘍治療のための修飾型免疫細胞を調製するための方法も、本明細書中に記載される。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、腫瘍を有する対象から単離された初代免疫細胞に由来する。いくつかの態様において、方法は、MYC融合ペプチドとの接触前にインビトロで初代免疫細胞を増大させる工程をさらに含む。いくつかの態様において、方法は、MYC融合ペプチドとの接触後に初代免疫細胞を増大させる工程をさらに含む。いくつかの態様において、抗CD3抗体を使用して細胞を増大させる。いくつかの態様において、照射された同種フィーダー細胞を使用して細胞を増大させる。いくつかの態様において、外因性サイトカインの存在下で細胞を増大させる。いくつかの態様において、サイトカインは、インターロイキン2である。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、免疫細胞の核へ移動する。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、MYCの生物学的活性を示す。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、タンパク質形質導入ドメインとMYCポリペプチドとを連結する1つまたは複数の分子をさらに含む。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、以下の一般構造：

タンパク質形質導入ドメイン-X-MYC配列  
を有するMYC融合ペプチドを含み、

ここで、-X-は、タンパク質形質導入ドメインとMYC配列とを連結する分子である。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメイン配列は、TATタンパク質形質導入ドメイン配列である。いくつかの態様において、TATタンパク質形質導入ドメイン配列は、TAT[48~57]およびTAT[57~48]からなる群より選択される。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、SEQ ID NO:1を含む。いくつかの態様において、MYC融合ペプチドは、アセチル化されている。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、抗腫瘍活性を有する。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、対象において腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性を有する。いくつかの態様において、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞は、1種類または複数種類のアネルギー性免疫細胞を含む。いくつかの態様において、1種類または複数種類の免疫細胞は、1種類または複数種類のリンパ球を含む。いくつかの態様において、1種類または複数種類のリンパ球は、T細胞、B細胞、NK、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、T細胞は、ナイーブT細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、メモリーT細胞、活性化T細胞、アネルギー性T細胞、寛容T細胞、キメラB細胞、および抗原特異的T細胞からなる群より選択される。いくつかの態様において、B細胞は、ナイーブB細胞、形質B細胞、活性化B細胞、メモリーB細胞、アネルギー性B細胞、寛容B細胞、キメラB細胞、および抗原特異的B細胞からなる群より選択される。いくつかの態様において、1種類または複数種類のリンパ球は、腫瘍浸潤リンパ球、T細胞受容体修飾型リンパ球、またはキメラ抗原受容体修飾型リンパ球である。いくつかの態様において、リンパ球は、CD8+CD28-CD152-シグネチャーを有する。いくつかの態様において、リンパ球は、CD8+CD25+シグネチャーを有する。いくつかの態様において、リンパ球は、CD4+CD25+シグネチャーを有する。

#### 【0009】

10

20

30

40

50



ある種の態様において、(a) 腫瘍細胞株に曝露された1種類または複数種類の単離された初代免疫細胞；および(b) (i) タンパク質形質導入ドメイン；(ii) MYCポリペプチド配列を含む、MYC融合ペプチドを含み、1種類または複数種類の初代免疫細胞が、腫瘍特異的抗原に対して反応性である、組成物も、本明細書中に記載される。

【0010】

ある種の態様において、がんの処置において使用するための前記の組成物のいずれかも、本明細書中に記載される。ある種の態様において、がんを処置するための医薬の製造において使用するための前記の組成物のいずれかも、本明細書中に記載される。

【0011】

ある種の態様において、前記の組成物のいずれかを投与する工程を含む、対象における養子細胞治療またはT細胞治療の有効性を増大させるための方法も、本明細書中に記載される。

10

【0012】

ある種の態様において、MYC融合ペプチドを含み、MYC融合ペプチドが(i) タンパク質形質導入ドメイン；(ii) MYCポリペプチド配列を含む、腫瘍浸潤リンパ球も、本明細書中に記載される。いくつかの態様において、腫瘍浸潤リンパ球は、がんを有する対象から単離された初代腫瘍浸潤リンパ球に由来する。

【0013】

ある種の態様において、キメラ抗原受容体とMYC融合ペプチドとを含み、MYC融合ペプチドが(i) タンパク質形質導入ドメイン；(ii) MYCポリペプチド配列を含む、リンパ球も、本明細書中に記載される。いくつかの態様において、リンパ球は、がんを有する対象から単離された初代リンパ球に由来する。

20

【0014】

ある種の態様において、1種類または複数種類の初代免疫細胞を、(i) タンパク質形質導入ドメイン；(ii) MYCポリペプチド配列を含む、MYC融合ポリペプチドと接触させる工程であって、1種類または複数種類の初代免疫細胞が、腫瘍を有する患者から単離され、かつ1種類または複数種類の初代免疫細胞が、腫瘍特異的抗原に反応性である、工程を含む、養子細胞治療のための組成物を調製するための方法も、本明細書中に記載される。

【0015】

がんの処置において使用するための、本明細書中に提供されるMYC融合ポリペプチドおよび/またはMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞を含むキットも、提供される。いくつかの態様において、キットは、投与されたMYC融合ポリペプチドおよび/またはMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の検出のための1種類または複数種類の試薬を含む。いくつかの態様において、キットは、本明細書中に提供されるMYC融合ポリペプチドによって処理するための細胞、例えば、造血幹細胞、ドナー白血球、T細胞、またはNK細胞を含む。いくつかの態様において、キットは、MYC融合ポリペプチドおよび/またはMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞を使用するための関連する説明書を含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】1時間TAT-MYCによって処理された腫瘍保持ドナーマウス由来のリンパ球の注入後の、メラノーマ腫瘍保持マウスの生存についての結果を例示する。マウスは、TAT-MYCリンパ球によって処置されたか、対照タンパク質によって処理されたリンパ細胞によって処置されたか、または未処置のままにされた。処置の日を0日目として死亡日を記録した。

40

【図2】TAT-MYCによって処理された腫瘍保持ドナーマウス由来のリンパ球の注入後の、メラノーマ腫瘍保持マウスの生存についての結果を例示する(図1に示された実験の反復)。マウスは、TAT-MYCリンパ球によって処置されたか、対照タンパク質によって処理されたリンパ細胞によって処置されたか、または未処置のままにされた。処置の日を0日目として死亡日を記録した。

【図3】TAT-MYCによって処理された腫瘍保持ドナーマウス由来のリンパ球の異なる量の注入後の、メラノーマ腫瘍保持マウスの生存についての結果を例示する。マウスは、TAT-

50

MYCリンパ球によって処置されたか、対照タンパク質によって処理されたリンパ細胞によって処置されたか、または未処置のままにされた。処置の日を0日目として死亡日を記録した。

【図4】TAT-MYCによって処理された腫瘍保持ドナーマウス由来のリンパ球の異なる量の注入後の、メラノーマ腫瘍保持マウスの生存についての結果を例示する。マウスは、TAT-MYCリンパ球によって処置されたか、対照タンパク質によって処理されたリンパ細胞によって処置されたか、または未処置のままにされた。処置の日を0日目として死亡日を記録した。

【図5】TAT-MYCによって処理された腫瘍保持ドナーマウス由来のリンパ球の注入後の、結腸腫瘍保持マウスの生存についての結果を例示する。マウスは、TAT-MYCリンパ球によって処置されたか、対照タンパク質によって処理されたリンパ系細胞によって処置されたか、または未処置のままにされた。処置の日を0日目として死亡日を記録した。

【図6】TAT-MYCによって処理された腫瘍保持ドナーマウス由来のリンパ球の異なる量の注入後の、結腸腫瘍保持マウスの生存についての結果を例示する。マウスは、TAT-MYCリンパ球によって処置されたか、または未処置のままにされた。処置の日を0日目として死亡日を記録した。

【発明を実施するための形態】

【0017】

発明の詳細な説明

本開示は、本願において記載された具体的な態様によって限定されず、それらは、本開示の個々の局面の単一の例示であるものとして意図される。本開示の様々な態様が、全て、本明細書中に記載されるわけではない。当業者に明白であるように、その本旨および範囲から逸脱することなく、本開示の多くの修飾物および変種が作製され得る。本明細書中に列挙されたものに加えて、本開示の範囲内にある機能的に等価な方法および装置が、前記の説明から、当業者に明白になるであろう。そのような修飾物および変種は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。本開示は、そのような特許請求の範囲が権利を有する等価物の完全な範囲と共に、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるべきである。

【0018】

本開示は、特定の使用、方法、試薬、化合物、組成物、または生物システムに限定されず、それらは、当然、変動し得ることが理解されるべきである。本明細書中で使用される専門用語は、具体的な態様を記載するためのものに過ぎず、限定的なものではないことも、理解されるべきである。

【0019】

さらに、本開示の特色または局面がマーカッシュ群によって記載される場合、本開示は、マーカッシュ群の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループによっても記載されることを、当業者は認識するであろう。

【0020】

当業者に理解されるように、ありとあらゆる目的のために、特に、書類の説明の提供に関して、本明細書中に開示された全ての範囲が、それらのありとあらゆる可能性のある部分範囲および部分範囲の組み合わせも包含する。列挙された範囲は、同範囲を十分に記載しており、同範囲が少なくとも半分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1等に等分されることを可能にすることが、容易に認識され得る。非限定的な例として、本明細書中に記述された各範囲は、下方の3分の1、中央の3分の1、および上方の3分の1等へ容易に分解され得る。当業者によって理解されるように、「まで」、「少なくとも」、「より大きい」、「未満」等のような語は、全て、明示された数を含み、後に前述のように部分範囲へ分解され得る範囲をさす。最後に、当業者によって理解されるように、範囲には、個々の各メンバーが含まれる。従って、例えば、1~3個の細胞を有する群は、1個、2個、または3個の細胞を有する群をさす。同様に、1~5個の細胞を有する群は、1個、2個、3個、4個、または5個の細胞を有する群をさし、他も同様である。

## 【0021】

他に定義されない限り、本明細書中で使用される技術用語および科学用語は、全て、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じの意味を有する。

## 【0022】

## I. 定義

本明細書中で使用される専門用語は、具体的な態様を記載するためのものに過ぎず、本開示を限定するためのものではない。本明細書中で使用されるように、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、前後関係が明白に他のことを示さない限り、複数形も含むことが意図される。

## 【0023】

本明細書中で使用されるように、「約」という用語は、値が、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、または $\pm 5\%$ 変動しても、本開示の範囲内にあることを意味する。例えば、「約200 IU/mLの濃度」には、160 IU/mL ~ 240 IU/mLの濃度が包含される。

## 【0024】

本明細書中で使用されるように、作用物質の対象への「投与」という用語には、その意図された機能を果たすよう作用物質を対象へ導入するかまたは送達する任意の経路が含まれる。投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下を含む任意の適切な経路によって実施され得る。投与には、自己投与および他者による投与が含まれる。

## 【0025】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸をさし、天然に存在するアミノ酸と類似の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体もさす。天然にコードされるアミノ酸は、20種類の一般的なアミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン）、ならびにピロリジンおよびセレノシステインである。アミノ酸類似体とは、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムのような、天然に存在するアミノ酸と同一の基本化学構造、即ち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基と結合している炭素を有する作用物質をさす。そのような類似体は、（ノルロイシンのように）修飾されたR基、または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同一の基本化学構造を保持する。いくつかの態様において、ポリペプチドを形成するアミノ酸は、D型である。いくつかの態様において、ポリペプチドを形成するアミノ酸は、L型である。いくつかの態様において、ポリペプチドを形成する第1の複数のアミノ酸はD型であり、第2の複数のものはL型である。

## 【0026】

アミノ酸は、一般的に公知の3文字記号、またはIUPAC-IUB 生化学命名委員会（IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission）によって推奨される1文字記号のいずれかによって本明細書中で言及される。ヌクレオチドも、同様に、一般的に認められている1文字コードによって言及される。

## 【0027】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーをさすために交換可能に本明細書中で使用される。これらの用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーにも当てはまり、1つまたは複数のアミノ酸残基が天然に存在しないアミノ酸、例えば、アミノ酸類似体であるアミノ酸ポリマーにも当てはまる。これらの用語には、アミノ酸残基が共有結合性ペプチド結合によって連結されている、全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖が包含される。

## 【0028】

本明細書中で使用されるように、「対照」とは、比較目的のため実験において使用される代替試料である。対照は「陽性」または「陰性」であり得る。例えば、実験の目的が特定の型の疾患のための処置について治療用物質の有効性の相関を判定することである場合

10

20

30

40

50

、典型的には、陽性対照（所望の治療効果を示すことが公知の組成物）および陰性対照（治療を受容しないかまたはプラセボを受容する対象または試料）が用いられる。

【0029】

本明細書中で使用されるように、「有効量」または「治療的に有効な量」という用語は、所望の治療効果を達成するために十分な作用物質の量をさす。治療的適用に関して、対象へ投与される治療用ペプチドの量は、感染の型および重症度、ならびに全身健康状態、年齢、性別、体重、および薬物に対する耐性のような個体の特徴に依る場合がある。それは、疾患の程度、重症度、および型にも依る場合がある。当業者は、これらおよびその他の要因に依って、適切な投薬量を決定することができるであろう。

【0030】

本明細書中で使用されるように、「発現」という用語は、ポリヌクレオチドがmRNAへ転写される過程、および/または転写されたmRNAが、その後、ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質へ翻訳される過程をさす。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現には、真核細胞におけるmRNAのスプライシングが含まれ得る。遺伝子の発現レベルは、細胞試料または組織試料においてmRNAまたはタンパク質の量を測定することによって決定され得る。1つの局面において、ある試料からの遺伝子の発現レベルを、対照試料または参照試料からのその遺伝子の発現レベルと直接比較することができる。別の局面において、ある試料からの遺伝子の発現レベルを、本明細書中に開示された組成物の投与後に、同一試料からのその遺伝子の発現レベルと直接比較してもよい。「発現」という用語は、以下のイベントのうちの1つまたは複数もさす：（1）細胞における（例えば、転写による）DNA配列からのRNA鋳型の産生；（2）細胞における（例えば、スプライシング、編集、5'キャップ形成、および/または3'末端形成による）RNA転写物のプロセッシング；（3）細胞におけるRNA配列のポリペプチドまたはタンパク質への翻訳；（4）細胞におけるポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾；（5）細胞表面におけるポリペプチドまたはタンパク質の提示；ならびに（6）細胞からのポリペプチドまたはタンパク質の分泌または提示または放出。

【0031】

「リンカー」という用語は、2つの配列を接続するかまたは連結する、例えば、2つのポリペプチドドメインを連結する合成配列（例えば、アミノ酸配列）をさす。いくつかの態様において、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸の配列を含有している。

【0032】

「凍結乾燥した」、「凍結乾燥」等の用語は、本明細書中で使用されるように、乾燥させるべき材料（例えば、ナノ粒子）を最初に凍結させ、次いで、氷または凍結した溶媒を真空環境で昇華によって除去する過程をさす。保管時の凍結乾燥生成物の安定性を増強するため、賦形剤が、予め凍結乾燥した製剤に含まれていてよい。凍結乾燥試料は、追加の賦形剤をさらに含有していてもよい。

【0033】

本明細書中で使用されるように、免疫細胞という用語は、免疫応答において役割を果たす細胞をさす。免疫細胞は、造血系起源のものであり、B細胞およびT細胞のようなリンパ球；ナチュラルキラー細胞；単球、マクロファージ、樹状細胞、好酸球、好中球、マスト細胞、好塩基球、および顆粒球のような骨髄系細胞を含む。

【0034】

「リンパ球」という用語は、組織特異的な種類および特殊な種類を含む、全ての未熟型、成熟型、未分化型、および分化型の白色リンパ球集団をさす。それには、非限定的な例として、B細胞、T細胞、NKT細胞、およびNK細胞が包含される。いくつかの態様において、リンパ球には、プレB細胞、前駆B細胞、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未熟B細胞、成熟B細胞、形質B細胞、メモリーB細胞、B-1細胞、B-2細胞、およびアネルギー性AN1/T3細胞集団を含む全てのB細胞系統が含まれる。

【0035】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用されるように、T細胞という用語には、ナイーブT細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、メモリーT細胞、活性化T細胞、アネルギー性T細胞、寛容T細胞、キメラB細胞、および抗原特異的T細胞が含まれる。

【0036】

「1つのB細胞」または「複数のB細胞」という用語は、非限定的な例として、プレB細胞、前駆B細胞、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未熟B細胞、成熟B細胞、ナイーブB細胞、形質B細胞、活性化B細胞、アネルギー性B細胞、寛容B細胞、キメラB細胞、抗原特異的B細胞、メモリーB細胞、B-1細胞、B-2細胞、およびアネルギー性AN1/T3細胞集団をさす。いくつかの態様において、B細胞という用語には、その細胞表面上に免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖を発現するB細胞が含まれる。いくつかの態様において、B細胞という用語には、免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖を発現し分泌するB細胞が含まれる。いくつかの態様において、B細胞という用語には、細胞表面上の抗原に結合する細胞が含まれる。本明細書中に開示されたいくつかの態様において、B細胞またはAN1/T3細胞が、記載された過程において用いられる。ある種の態様において、そのような細胞は、任意で、例えば、造血幹細胞、ナイーブB細胞、B細胞、プレB細胞、前駆B細胞、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未熟B細胞、成熟B細胞、形質B細胞、メモリーB細胞、B-1細胞、B-2細胞、アネルギー性B細胞、またはアネルギー性AN1/T3細胞を含む、抗体を発現するのに適しているか、該抗体を発現することができるか（例えば、誘導可能な発現）、または該抗体を発現するのに適した細胞へ分化することができる任意の動物細胞に置換される。

10

20

【0037】

本明細書中で使用されるように、「養子細胞治療用組成物」とは、養子細胞移入に適した細胞を含む任意の組成物をさす。例示的な態様において、養子細胞治療用組成物は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、TCR（即ち、異種T細胞受容体）修飾型リンパ球、およびCAR（即ち、キメラ抗原受容体）修飾型リンパ球からなる群より選択される細胞型を含む。別の態様において、養子細胞治療用組成物は、T細胞、CD8+細胞、CD4+細胞、NK細胞、T細胞、制御性T細胞、および末梢血単核細胞からなる群より選択される細胞型を含む。別の態様において、TIL、T細胞、CD8+細胞、CD4+細胞、NK細胞、T細胞、制御性T細胞、または末梢血単核細胞が、養子細胞治療用組成物を形成する。1つの態様において、養子細胞治療用組成物は、T細胞を含む。

30

【0038】

本明細書中で使用されるように、「腫瘍浸潤リンパ球」またはTILとは、血流を出て、腫瘍へ遊走した白血球をさす。

【0039】

「MYC」および「MYC遺伝子」という用語は、同義語である。それらは、MYCポリペプチドをコードする核酸配列をさす。MYC遺伝子は、NCBIアクセッション番号NM-002467の配列と少なくとも60%~100%同一または相同、例えば、少なくとも60、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、または約70%~約100%のその他の任意のパーセント、同一である、少なくとも120ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、MYC遺伝子は、がん原遺伝子である。ある種の場合において、MYC遺伝子は、8番染色体上の8q24.21に見出される。ある種の場合において、MYC遺伝子は、pterから128,816,862bpで始まり、pterから128,822,856bpで終わる。ある種の場合において、MYC遺伝子は、約6kbである。ある種の場合において、MYC遺伝子は、少なくとも8種類の別々のmRNA配列、つまり、5種類の選択的にスプライシングされたバリエーションと3種類のスプライシングされていないバリエーションとをコードする。

40

【0040】

「MYCタンパク質」、「MYCポリペプチド」、および「MYC配列」という用語は、同義語であり、NCBIアクセッション番号UniProtKB/Swiss-Prot：P01106.1（MYCアイソフォーム1）またはNP\_002458.2（UniProtKB/Swiss-Prot：P01106.2；MYCアイソフォーム2）に開示

50

されたアミノ酸残基のポリマー、およびそれらの機能性の相同体、類似体、または断片を  
さす。UniProtKB/Swiss-Prot : P01106.1の配列は、

MPLNVSFTNRNYDL DYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTP  
PLSPSRRSGLCSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMV NQSFICDP  
DDETFIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQ  
DLSAAASECIDPSVVPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSDSL SSTE SPQGSPEPLVLHE  
ETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGH SKPPHSPLVLKRCHVS  
THQHNYAAPPSTRKDYPA AKRVKLDSVRVLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVL  
ERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQAE EQKLISEEDLLRKR  
REQLKHKLEQLRNSCA (SEQ ID NO: 2)

10

である。NP\_002458.2 (UniProtKB/Swiss-Prot : P01106.2) の配列は、

MDFFRVVENQQPPATMPLNVSFTNRNYDL DYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELQPP  
APSEDIWKKFELLPTPPLSPSRRSGLCSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVT  
ELLGGDMV NQSFICDPDDETFIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPN  
PARGHSVCSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSDSL S  
STESSPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGG  
HSKPPHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAPPSTRKDYPA AKRVKLDSVRVLRQISNNRKCTSP  
RSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILS  
VQAE EQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA (SEQ ID NO: 11)

20

である。

【 0 0 4 1 】

いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、完全MYCポリペプチド配列である。いく  
つかの態様において、MYCポリペプチドは、部分的MYCポリペプチド配列である。いくつ  
かの態様において、MYCポリペプチドは、SEQ ID NO:2または11の少なくとも400個の連続ア  
ミノ酸を含む。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、SEQ ID NO:2または11の少  
なくとも400個の連続アミノ酸を含み、かつ少なくとも1種類のMYC活性を保持している。  
いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、SEQ ID NO:2または11の少なくとも400個  
、少なくとも410個、少なくとも420個、少なくとも430個、または少なくとも450個の連続  
アミノ酸を含む。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、SEQ ID NO:2または11の  
少なくとも400個、少なくとも410個、少なくとも420個、少なくとも430個、または少なく  
とも450個の連続アミノ酸を含み、かつ少なくとも1種類のMYC活性を保持する。いくつ  
かの態様において、MYCポリペプチドは、c-MYCである。いくつかの態様において、MYCポリ  
ペプチド配列は、以下に示される配列：

30

MDFFRVVENQQPPATMPLNVSFTNRNYDL DYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELQPP  
APSEDIWKKFELLPTPPLSPSRRSGLCSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVT  
ELLGGDMV NQSFICDPDDETFIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPN  
PARGHSVCSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSDSL S  
STESSPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGG  
HSKPPHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAPPSTRKDYPA AKRVKLDSVRVLRQISNNRKCTSP  
RSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILS  
VQAE EQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLR (SEQ ID NO: 3)

40

50

を含む。

【0042】

いくつかの態様において、MYCポリペプチド配列は、以下に示される配列：

PLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELOPPAPSEDIWKKFELLPTPPL  
SPSRRLGLCSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNVQSFICDPD  
DETFIKNIHQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQD  
LSAAASECIDPSVVFPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSDLSSTESSPQGSPEPLVLHEE  
TPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHKPPHSPLVLKRCHVST  
HQHNYAAPSTRKDYPAAKRVKLDSVRVLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLE  
RQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVLKKATAYILSVQAEEQKLISEEDLLRKRR  
EQLKHKLEQLR (SEQ ID NO: 4)

10

を含む。

【0043】

いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、NCBIアクセッション番号NP002458.2またはUniProtKB/Swiss-Protアクセッション番号P01106.1の配列と少なくとも40%～100%同一、例えば、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または約40%～約100%のその他のパーセント、同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、MYCポリペプチドとは、439アミノ酸のポリマー、翻訳後修飾を受けていないMYCポリペプチドをさす。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、翻訳後修飾を受けた439アミノ酸のポリマーをさす。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、48,804kDaである。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスロイシンジッパー（bHLH/LZ）ドメインを含有している。いくつかの態様において、bHLH/LZドメインは、ELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVLKKATAYILSVQAEEQKLISEEDLLRKRRREQLKH  
KLEQLR (SEQ ID NO: 5)

20

30

の配列を含む。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、転写因子（例えば、転写因子64）である。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、EボックスDNA結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、CACGTGを含む配列に結合する。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、細胞の生存および/または増殖のうちの1つまたは複数を促進する。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、前記のもののうちの1つまたは複数を含み、1つまたは複数の翻訳後修飾（例えば、アセチル化）を含む。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、ポリペプチドのN末端またはC末端に、1個または複数個の付加的なアミノ酸残基を含む。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、融合タンパク質である。いくつかの態様において、MYCポリペプチドは、ポリペプチドのN末端またはC末端において1つまたは複数の付加的なペプチドと連結されている。

40

【0044】

本明細書中に記載された方法において使用するのに適したタンパク質には、本明細書中に記載されたタンパク質のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸変化を1～15個、例えば、アミノ酸の置換、欠失、または付加を1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個有するタンパク質を含む、機能性バリエーションも含まれる。他の態様において、改変されたアミノ酸配列は、本明細書中に記載されたタンパク質阻害物質のアミノ酸配列と、少なくとも75%同一、例えば、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である。改変

50

されたアミノ酸配列が本明細書中に記載された組成物および方法において機能性であるために十分な生物学的活性を保持する限り、そのような配列バリエーションタンパク質は、本明細書中に記載された方法に適している。アミノ酸置換がなされる場合、置換は、保存的アミノ酸置換であり得る。一般的な天然に存在するアミノ酸の中で、例えば、「保存的アミノ酸置換」は、以下の各群におけるアミノ酸の置換によって例示される：(1) グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、(2) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、(3) セリンおよびトレオニン、(4) アスパラギン酸およびグルタミン酸、(5) グルタミンおよびアスパラギン、ならびに(6) リジン、アルギニン、およびヒスチジン。BLOSUM62テーブルは、関連タンパク質の500種類を超える群の高度に保存された領域を表すタンパク質配列セグメントの約2,000個のローカルマルチプルアライメントに由来するアミノ酸置換マトリックスである (Henikoff et al., (1992), Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89:10915-10919)。従って、BLOSUM62置換頻度は、保存的アミノ酸置換を定義するために使用され、それらは、いくつかの態様において、本明細書中に記載または開示されたアミノ酸配列へ導入される。(前述のように) 化学的特性のみに基づきアミノ酸置換を設計することも可能であるが、「保存的アミノ酸置換」という語は、好ましくは、-1より大きいBLOSUM62値によって表される置換をさす。例えば、置換が0、1、2、または3のBLOSUM62値を特徴とする場合、そのアミノ酸置換は保存的である。このシステムによると、好ましい保存的アミノ酸置換は、少なくとも1 (例えば、1、2、または3) のBLOSUM62値を特徴とし、より好ましい保存的アミノ酸置換は、少なくとも2 (例えば、2または3) のBLOSUM62値を特徴とする。

10

20

#### 【0045】

「Eボックス配列」および「エンハンサーボックス配列」という語句は、交換可能に本明細書中で使用され、Nが任意のヌクレオチドであるヌクレオチド配列CANNTGを意味する。ある種の場合において、Eボックス配列は、CACGTGを含む。ある種の場合において、MYCによってコードされた転写因子の塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスドメインは、Eボックス配列と結合する。ある種の場合において、Eボックス配列は、遺伝子上流に位置する (例えば、p21、Bcl-2、またはオルニチンデカルボキシラーゼ)。ある種の場合において、MYCポリペプチドは、EボックスDNA結合ドメインを含有している。ある種の場合において、EボックスDNA結合ドメインは、

KRRTHNVLERQRRN (SEQ ID NO: 6)

の配列を含む。ある種の場合において、MYCによってコードされた転写因子のEボックス配列への結合は、RNAポリメラーゼがEボックス配列の下流の遺伝子を転写することを可能にする。

30

#### 【0046】

「MYC活性」または「MYC生物学的活性」または「生物学的活性を有するMYC」という用語には、細胞生存、細胞増殖、および/または抗体産生の増強または誘導のうちの1つまたは複数が含まれる。例えば、非限定的に、MYC活性には、抗CD3および抗CD28によって活性化されたT細胞の増大の増強、ならびに/または長期自己再生性造血幹細胞の増殖の増大が含まれる。MYC活性には、細胞の核への侵入、核酸配列との結合 (例えば、Eボックス配列との結合)、および/またはMYC標的遺伝子の発現の誘導が含まれる。

40

#### 【0047】

「患者」、「対象」、「個体」等の用語は、交換可能に本明細書中で使用され、動物、典型的には、哺乳動物をさす。1つの態様において、患者、対象、または個体は、哺乳動物である。1つの態様において、患者、対象、または個体は、ヒトである。いくつかの態様において、患者、対象、または個体は、以下に限定されるわけではないが、ウマ、ウシ、マウス、ヒツジ、イヌ、およびネコのような飼育動物のような動物である。

#### 【0048】

「タンパク質形質導入ドメイン (PTD)」または「トランスポーターペプチド配列」という用語 (細胞透過性タンパク質 (CPP) または膜転移配列 (MTS) としても公知) は、古典的エンドサイトーシスとは無関係に、はるかに大きい分子を細胞へ輸送することができる

50



小さいペプチドをさすために交換可能に本明細書中で使用される。いくつかの態様において、分子の細胞核へのさらなる転移を媒介する核移行シグナルが、タンパク質形質導入ドメイン内に見出され得る。

【0049】

「処置すること」または「処置」という用語は、本明細書中で使用されるように、ヒトのような対象における疾患の処置を包含し、かつ(i)疾患の阻害、即ち、その発症の阻害；(ii)疾患の軽減、即ち、疾患の退縮の誘導；(iii)疾患の進行の減速；および/または(iv)疾患の1つまたは複数の症状の阻害、軽減、またはその進行の減速を含む。がんに関して、「処置すること」または「処置」には、腫瘍の退縮、腫瘍成長の減速、腫瘍の転移の阻害、再発がんもしくは再発性がんの阻害、および/または寛解の維持も包含される。

10

【0050】

記載される医学的な疾患および状態の処置または防止の様々な様態は、完全な処置または防止のみならず、いくらかの生物学的または医学的に適切な結果が達成される不完全な処置または防止も含む「実質的」を意味するものであることも理解されるべきである。処置は、慢性疾患の連続的な長期的な処置であってもよいが、または急性状態の処置のための単回もしくは少数回の投与であってもよい。

【0051】

「治療的」という用語は、本明細書中で使用されるように、処置および/または予防を意味する。治療効果は、疾患状態の抑制、寛解、または根治によって得られる。

20

【0052】

II. 概説

本開示は、一部分、抗腫瘍活性を有する1種類または複数種類の免疫細胞（例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）のような、腫瘍に対する応答をモジュレートする免疫細胞）を含む組成物を投与することによる、対象におけるがんの処置に関し、1種類または複数種類の免疫細胞を、対象への投与前にインビトロでPTD-MYC融合ポリペプチドと接触させる。いくつかの態様において、免疫細胞は、腫瘍を有するドナー対象から入手される。いくつかの態様において、細胞は処置を受容する対象に対して自己である。いくつかの態様において、腫瘍はメラノーマ腫瘍である。

【0053】

30

本開示は、メラノーマ腫瘍を有するドナー対象から単離されたリンパ球を、MYCポリペプチドおよびHIV TATタンパク質形質導入ドメインのようなタンパク質形質導入ドメイン（PTD）を含有しているMYC融合ポリペプチドによって処理し、処理されたリンパ球をメラノーマ腫瘍を保持している対象へ投与することによって、腫瘍保持対象の生存が有意に増大することの発見に、少なくとも一部分、基づく。本明細書中に提供される例は、メラノーマ保持マウスのリンパ節から抽出された免疫細胞が、細胞を第2のメラノーマ保持マウスへの投与前にインビトロでTAT-MYC融合タンパク質によって処理した場合、有意に増大した治療有効性を有していたことを証明する。これらのデータは、PTD-MYC融合ポリペプチドによって処理された抗腫瘍免疫細胞を使用する養子細胞移入が、メラノーマのようながんの処置において用いられ得ることを支持する。

40

【0054】

いくつかの態様において、対象におけるがんの処置のための方法は、インビトロでPTD-MYC融合ポリペプチドと接触させた免疫細胞を投与する工程を含む。いくつかの態様において、本発明の方法において使用するための免疫細胞は、インビボで腫瘍抗原によって予備刺激される。いくつかの態様において、免疫細胞は、がんを有するドナーに由来する。いくつかの態様において、免疫細胞は、メラノーマ、がん腫、腺腫、腺がん、芽細胞腫、肉腫、またはリンパ腫のような固形腫瘍を有するドナーに由来する。いくつかの態様において、免疫細胞を、腫瘍抗原とインビボで接触させる。いくつかの態様において、免疫細胞は、1種類または複数種類の腫瘍抗原に曝露されたドナーに由来する。いくつかの態様において、免疫細胞は、抗腫瘍ワクチンに曝露されたドナーに由来する。いくつかの態様

50

において、免疫細胞は、B細胞、T細胞、NK細胞、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、免疫細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）である。いくつかの態様において、免疫細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）-T細胞である。

【0055】

いくつかの態様において、対象におけるがんの処置のための方法は、それを必要とする対象へ1種類または複数種類の修飾型免疫細胞を投与する工程であって、1種類または複数種類の修飾型免疫細胞がMYC融合ペプチドを含み、MYC融合ペプチドが（i）タンパク質形質導入ドメイン；（ii）MYCポリペプチド配列を含み、かつ1種類または複数種類の修飾型免疫細胞が腫瘍特異的抗原に反応性である、工程を含む。

【0056】

いくつかの態様において、対象におけるがんの処置のための方法は、

（a）免疫細胞をインビトロでMYC融合ポリペプチドと接触させる工程であって、免疫細胞が、1種類または複数種類の腫瘍抗原に曝露されたドナーに由来し、かつMYC融合ペプチドが、（i）タンパク質形質導入ドメイン；（ii）MYCポリペプチド配列を含む、工程；および

（b）接触させた免疫細胞をがん腫瘍保持対象へ投与し、それによって、がんを処置する工程を含む。

【0057】

いくつかの態様において、免疫細胞のインビトロでのPTD-MYC融合ポリペプチドとの接触は、免疫細胞をMYC融合ポリペプチドの存在下で培養することによって実施される。いくつかの態様において、免疫細胞は、1種類または複数種類のサイトカインおよび/または増殖因子（例えば、インターロイキン2（IL-2）、IL-4、IL-7、IL-9、およびIL-15）の存在下で培養される。いくつかの態様において、投与前に免疫細胞を増大させない。いくつかの態様において、投与前に免疫細胞を増大させる。いくつかの態様において、ドナーと、処置するための対象とは、同一である。

【0058】

いくつかの態様において、免疫細胞は、腫瘍浸潤リンパ球である。いくつかの態様において、腫瘍浸潤リンパ球は、自己腫瘍浸潤リンパ球である。従って、いくつかの態様において、対象におけるがんの処置のための方法は、インビトロでPTD-MYC融合ポリペプチドと接触させたリンパ球を投与する工程であって、免疫細胞がリンパ球由来であり、リンパ球が、対象由来の自己腫瘍浸潤リンパ球である、工程を含む。

【0059】

いくつかの態様において、対象におけるがんの処置のための方法は、

（a）リンパ球をインビトロでPTD-MYC融合ポリペプチドと接触させる工程であって、リンパ球が対象由来の自己腫瘍浸潤リンパ球である、工程、および

（b）接触させた自己腫瘍浸潤リンパ球を対象へ投与し、それによって、がんを処置する工程を含む。

【0060】

移入のための免疫細胞を入手および調製する方法

本明細書中に提供される方法において使用するための免疫細胞は、当技術分野において公知の任意の適切な方法を使用して入手され得る。いくつかの態様において、免疫細胞は、初代免疫細胞である。いくつかの態様において、免疫細胞は、T細胞およびB細胞のようなリンパ球である。いくつかの態様において、免疫細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞である。いくつかの態様において、免疫細胞は、リンパ球およびNK細胞の混合物である。いくつかの態様において、免疫細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）である。いくつかの態様において、免疫細胞は、腫瘍に浸潤したT細胞（例えば、腫瘍浸潤リンパ球）である。いくつかの態様において、T細胞は、腫瘍の手術中に取り出される。例えば、いくつかの態様において、T細胞は、生検によって腫瘍組織を取り出した後に単離される。いくつかの

10

20

30

40

50

態様において、免疫細胞は、ドナーから単離された後に修飾される。いくつかの態様において、免疫細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）-T細胞である。

【0061】

いくつかの態様において、T細胞は、血液、リンパ液、または組織生検試料のような細胞の集団を含有している試料から単離される。T細胞は、当技術分野において公知の任意の手段によって、細胞の集団から単離され得る。1つの態様において、方法は、当技術分野において公知の任意の適切な方法によって、腫瘍試料からT細胞のバルク集団を入手する工程を含む。例えば、T細胞のバルク集団は、腫瘍試料を細胞懸濁物に解離させることによって、腫瘍試料から入手され、そこから、特定の細胞集団が選択され得る。T細胞のバルク集団を入手する適切な方法には、腫瘍の機械的解離（例えば、粉碎）、腫瘍の酵素的解離（例えば、消化）、および（例えば、針による）吸引のうちの1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

10

【0062】

腫瘍試料から入手されたT細胞のバルク集団は、適切な型のT細胞を含んでいてよい。好ましくは、腫瘍試料から入手されたT細胞のバルク集団は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を含む。

【0063】

腫瘍試料は、任意の哺乳動物から入手され得る。他に記されない限り、本明細書中で使用されるように、「哺乳動物」という用語には、ウサギのようなウサギ目；ネコ科（ネコ）およびイヌ科（イヌ）を含む食肉目；ウシ科（ウシ）およびブタ科（ブタ）を含む偶蹄目；またはウマ科（ウマ）を含む奇蹄目の哺乳動物を含むが、これらに限定されるわけではない任意の哺乳動物をさす。哺乳動物は、霊長目、セボイド目（Ceboids）、もしくはシモイド目（Simoids）（サル）、または真猿亜目（ヒトおよび類人猿）の非ヒト霊長類であってもよい。いくつかの態様において、哺乳動物は、マウスおよびハムスターのような齧歯目の哺乳動物であってもよい。好ましくは、哺乳動物は、非ヒト霊長類またはヒトである。例示的な哺乳動物は、ヒトである。いくつかの態様において、免疫細胞を受容する対象は、腫瘍試料のドナーでもある（即ち、自己ACT）。

20

【0064】

T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、脾組織、および腫瘍を含む多数の起源から入手され得る。ある種の態様において、T細胞は、フィコール分離のような当業者に公知の多数の技術を使用して、対象から収集された血液の単位から入手され得る。1つの態様において、アフエレーシスまたは白血球フェレーシスによって、個体の循環血から細胞を入手することができる。アフエレーシス生成物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、その他の有核白血球、赤血球、および血小板を含むリンパ球を含有している。1つの態様において、アフエレーシスによって収集された細胞は、血漿画分を除去し、その後のプロセッシング工程のための適切な緩衝液または培地に細胞を置くため、洗浄され得る。本発明の1つの態様において、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄される。別の態様において、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠いていてもよく、二価陽イオンの全てではないにしても多くを欠いていてもよい。カルシウムの非存在下での初期活性化工程は、拡大された活性化をもたらす。当業者が容易に理解するように、洗浄工程は、製造業者の説明書に従った半自動「フロースルー」遠心分離（例えば、Cobe 2991 cell processor）の使用のような、当業者に公知の方法によって達成され得る。洗浄後、細胞は、例えば、Ca不含、Mg不含のPBSのような多様な生体適合性緩衝液に再懸濁され得る。あるいは、アフエレーシス試料の不要な成分を除去し、細胞を培養培地へ直接再懸濁させてもよい。

30

40

【0065】

別の態様において、T細胞は、赤血球を溶解し、例えば、PERCOLL（商標）勾配による遠心分離によって、単球を枯渇させることによって、末梢血リンパ球から単離される。CD28+T細胞、CD4+T細胞、CDC、CD45RA+T細胞、およびCD45RO+T細胞のようなT細胞の特定の亜集団を、ポジティブ選択またはネガティブ選択の技術によってさらに単離することができ

50

る。例えば、1つの態様において、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 TまたはXCYTE DYNABEADS（商標）のような、抗CD3/抗CD28（即ち、 $3 \times 28$ ）とコンジュゲートされたビーズと共に、所望のT細胞のポジティブ選択のために十分な期間、インキュベートすることによって、T細胞が単離される。1つの態様において、期間は、約30分である。さらなる態様において、期間は、30分～36時間またはそれ以上およびその中間の全ての整数値の範囲である。さらなる態様において、期間は、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、または6時間である。さらに別の態様において、期間は、10～24時間である。1つの態様において、インキュベーション期間は、24時間である。白血病を有する患者からのT細胞の単離のため、24時間のようなより長いインキュベーション時間の使用は、細胞収率を増加させることができる。より長いインキュベーション時間は、腫瘍組織または免疫低下個体から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を単離する場合のような、他の細胞型と比較してT細胞がほとんど存在しない状況において、T細胞を単離するために使用され得る。さらに、より長いインキュベーション時間の使用は、CD8+T細胞の捕獲の効率を増大させることができる。

10

#### 【0066】

ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブ選択される細胞に独特の表面マーカーに対する抗体の組み合わせによって達成され得る。1つの態様において、方法は、ネガティブ選択される細胞に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用する、ネガティブ磁気免疫付着またはフローサイトメトリーを介した細胞の選別および/または選択である。例えば、ネガティブ選択によってCD4+細胞を濃縮するため、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。

20

#### 【0067】

さらに、抗CD14によってコーティングされたビーズもしくはカラム、または除去を容易にするためのこれらの細胞の食作用活性の利用を含む、多様な方法論によって、血液生成物から単球集団（即ち、CD14+細胞）を枯渇させることができる。従って、1つの態様において、本発明は、食作用性単球によって貪食されるために十分なサイズの常磁性粒子を使用する。ある種の態様において、常磁性粒子は、市販のビーズ、例えば、Dynabeads（商標）という商標でLife Technologiesによって作製されているものである。1つの態様において、その他の非特異的細胞は、「無関係の」タンパク質（例えば、血清タンパク質または抗体）によって常磁性粒子をコーティングすることによって除去される。無関係のタンパク質および抗体には、単離すべきT細胞を特異的に標的としないタンパク質および抗体またはそれらの断片が含まれる。ある種の態様において、無関係のビーズには、ヒツジ抗マウス抗体、ヤギ抗マウス抗体、およびヒト血清アルブミンによってコーティングされたビーズが含まれる。

30

#### 【0068】

簡単に説明すると、単球のそのような枯渇は、全血、アフエレーシスされた末梢血、または腫瘍から単離されたT細胞を、22～37℃で、約30分～2時間、単球の除去を可能にする量（およそ20:1のビーズ:細胞比）で、1種類または複数種類の無関係の抗体がカップリングされた常磁性粒子または抗体がカップリングされていない常磁性粒子と予めインキュベートし、続いて、常磁性粒子に付着した細胞または常磁性粒子を貪食した細胞を磁氣的に除去することによって実施される。そのような分離は、当技術分野において利用可能な標準的な方法を使用して実施され得る。例えば、市販されている多様なもの（例えば、DYNAL（登録商標）Magnetic Particle Concentrator（DYNAL MPC（登録商標）））を含む磁気分離方法論を使用することができる。枯渇の前および後に、CD14陽性細胞のフローサイトメトリー分析を含む、当業者に公知の多様な方法論によって、必要な枯渇の保証をモニタリングすることができる。

40

#### 【0069】

ポジティブ選択またはネガティブ選択による所望の細胞集団の単離のため、細胞および表面（例えば、ビーズのような粒子）の濃度は、変動し得る。ある種の態様において、細

50

胞およびビーズの最大の接触を保証するため、ビーズおよび細胞が共に混合される体積を有意に減少させる（即ち、細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば、1つの態様において、細胞20億個/mlの濃度が使用される。1つの態様において、細胞10億個/mlの濃度が使用される。さらなる態様において、細胞1億個/ml超が使用される。さらなる態様において、細胞1000万個/ml、細胞1500万個/ml、細胞2000万個/ml、細胞2500万個/ml、細胞3000万個/ml、細胞3500万個/ml、細胞4000万個/ml、細胞4500万個/ml、または細胞5000万個/mlの細胞の濃度が使用される。さらに別の態様において、細胞7500万個/ml、細胞8000万個/ml、細胞8500万個/ml、細胞9000万個/ml、細胞9500万個/ml、または細胞1億個/mlからの細胞の濃度が使用される。さらなる態様において、細胞1億2500万個/mlまたは細胞1億5000万個/mlの濃度が使用され得る。高濃度の使用は、細胞収率の増加、細胞活性化、および細胞増大をもたらし得る。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞のような関心対象の標的抗原を弱く発現することができる細胞、または多くの腫瘍細胞が存在する試料（例えば、白血病血液、腫瘍組織）からの細胞の、より効率的な捕獲を可能にする。そのような細胞の集団は、治療的価値を有することができ、かつ、入手することが望ましい。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常、より弱いCD28発現を有するCD8+T細胞の、より効率的な選択を可能にする。

10

#### 【0070】

関連する態様において、より低い細胞の濃度を使用することが望ましい場合がある。T細胞および表面（例えば、ビーズのような粒子）の混合物を有意に希釈することによって、粒子と細胞との間の相互作用が最小化される。これは、粒子に結合すべき所望の抗原を多量に発現する細胞を選択する。例えば、CD4+T細胞は、より高いレベルのCD28を発現し、薄い濃度においてCD8+T細胞より効率的に捕獲される。1つの態様において、使用される細胞の濃度は、 $5 \times 10^6$ /mlである。他の態様において、使用される濃度は、約 $1 \times 10^5$ /ml ~  $1 \times 10^6$ /mlおよび中間の任意の整数値である。

20

#### 【0071】

T細胞を凍結させることもできる。凍結およびその後の解凍の工程は、細胞集団内の顆粒球を除去し、ある程度まで、単球を除去することによって、より均一な生成物を提供することができる。血漿および血小板を除去するための洗浄工程の後、細胞を凍結溶液に懸濁させることができる。多くの凍結溶液およびパラメータが当技術分野において公知であり、この状況において有用であるが、1つの方法は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミンを含有しているPBS、またはその他の適切な細胞凍結培地の使用を含み、次いで、細胞は、毎分1度の速度で-80℃に凍結され、液体窒素貯蔵タンクの蒸気相において保管される。その他の調節された凍結の方法が使用されてもよく、-20℃または液体窒素中での調節されない即時凍結の方法が使用されてもよい。

30

#### 【0072】

本発明において使用するためのT細胞は、抗原特異的T細胞であってもよい。例えば、腫瘍特異的T細胞を使用することができる。ある種の態様において、抗原特異的T細胞は、腫瘍を有する患者のような、がん罹患している患者のような、関心対象の患者から単離され得る。いくつかの態様において、患者は、メラノーマを有する。

40

#### 【0073】

1つの態様において、対象についてのネオエピトープを決定し、これらの抗原に特異的なT細胞を単離する。増大において使用するための抗原特異的細胞は、例えば、抗原特異的T細胞の生成および単離（Generation And Isolation of Antigen-Specific T Cells）という名称の米国特許出願公開第US 20040224402号または米国特許第6,040,177号に記載されるような、当技術分野において公知の多数の方法を使用して、インビトロで生成されてもよい。本発明において使用するための抗原特異的細胞は、例えば、いずれもJohn Wiley & Sons, Inc., Boston, Massによって出版されたCurrent Protocols in ImmunologyまたはCurrent Protocols in Cell Biologyに記載されるような、当技術分野において公知の多数の方法を使用して生成されてもよい。

50

#### 【0074】

関連する態様において、1回または2回の増大の前または後に、抗原特異的細胞を選別するかまたは他の方法で（例えば、磁気選択を介して）ポジティブ選択することが望ましい場合がある。抗原特異的細胞の選別またはポジティブ選択は、ペプチド-MHC四量体を使用して実施され得る（Altman, et al., 1996 Science, Oct. 4; 274(5284): 94-6）。別の態様において、適応可能なテトラマーテクノロジーアプローチが使用される（Andersen et al., 2012 Nat Protoc. 7: 891-902）。テトラマーは、事前の仮説に基づき予測された結合ペプチドを用いる必要があること、および特異的HLAへの拘束によって限定される。ペプチド-MHCテトラマーは、当技術分野において公知の技術を使用して生成され得、関心対象のMHC分子および本明細書中に記載される関心対象の抗原によって作製され得る。これに関して使用される特異的なエピトープは、当技術分野において公知の多数のアッセイを使用して同定され得る。例えば、MHCクラスIと結合するポリペプチドの能力は、<sup>125</sup>I標識 2ミクログロブリン（2m）のMHCクラスI/2m/ペプチドヘテロトリマー複合体への取り込みを促進する能力をモニタリングすることによって間接的に評価され得る（Parker et al., 1994, J. Immunol. 152: 163を参照すること）。

10

#### 【0075】

いくつかの態様において、T細胞は、修飾型受容体またはキメラ受容体を発現するよう組換えによって修飾される（例えば、キメラ抗原受容体（CAR）修飾型T細胞）。

#### 【0076】

1つの態様において、細胞は、フローサイトメトリーによる単離、その後の表現型およびTCRの特徴決定のため、エピトープ特異的な試薬によって直接標識される。1つの態様において、T細胞は、T細胞特異的抗体を接触させることによって単離される。抗原特異的T細胞、または、一般に、本発明の細胞の選別は、MoFloソーター（DakoCytomation, Fort Collins, Colo.）、FACS Aria（商標）、FACS Array（商標）、FACS Vantage（商標）、BD（商標）LSR II、およびFACS Calibur（商標）（BD Biosciences, San Jose, Calif.）を含むが、これらに限定されるわけではない、多様な市販のセルソーターのいずれかを使用して実施され得る。

20

#### 【0077】

1つの態様において、方法は、CD3も発現する細胞を選択する工程を含む。方法は、適切な様式で、細胞を特異的に選択する工程を含み得る。好ましくは、選択は、フローサイトメトリーを使用して実施される。フローサイトメトリーは、当技術分野において公知の適切な方法を使用して実施され得る。フローサイトメトリーは、適切な抗体および色素を用いることができる。好ましくは、抗体は、選択される特定のバイオマーカーを特異的に認識しそれに結合するよう選択される。例えば、CD3、CD8、TIM-3、LAG-3、4-1BB、またはPD-1の特異的な選択が、それぞれ、抗CD3抗体、抗CD8抗体、抗TIM-3抗体、抗LAG-3抗体、抗4-1BB抗体、または抗PD-1抗体を使用して実施され得る。抗体は、ビーズ（例えば、磁気ビーズ）または蛍光色素にコンジュゲートされ得る。好ましくは、フローサイトメトリーは、蛍光標示式細胞分取（FACS）である。T細胞上に発現されたTCRは、自己腫瘍に対する反応性に基づき選択され得る。さらに、腫瘍に反応性であるT細胞は、参照によってその全体が本明細書中に組み入れられる特許公報番号WO2014133567および同WO2014133568に記載された方法を使用して、マーカーに基づき選択され得る。さらに、活性化T細胞は、CD107aの表面発現に基づき選択され得る。

30

40

#### 【0078】

1つの態様において、方法は、濃縮された細胞集団においてT細胞の数を増大させる工程をさらに含む。そのような方法は、米国特許第8,637,307号に記載されており、参照によってその全体が本明細書中に組み入れられる。PTD-MYCポリペプチドによる細胞の処理の前または後にT細胞を増大させ得る。T細胞の数は、少なくとも約3倍（または4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、もしくは9倍）、より好ましくは、少なくとも約10倍（または20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、もしくは90倍）、より好ましくは、少なくとも約100倍、より好ましくは、少なくとも約1,000倍、最も好ましくは、少なくとも約100,000倍、増加し得る。T細胞の数は、当技術分野において公知の適切な方法を使用して増大し得る

50

。細胞の数を増大させる例示的な方法は、特許公報番号WO 2003057171、米国特許第8,034,334号、および米国特許出願公開第2012/0244133号に記載されており、これらの各々は参照によって本明細書中に組み入れられる。

#### 【0079】

1つの態様において、エクスピボT細胞増大は、T細胞の単離およびその後の刺激または活性化、これに続くさらなる増大によって実施され得る。本発明の1つの態様において、T細胞は、単一の作用物質によって刺激または活性化され得る。別の態様において、T細胞は、2種類の作用物質によって刺激または活性化され、一方は一次シグナルを誘導するものであり、他方は共刺激シグナルであるものである。単一のシグナルの刺激または一次シグナルの刺激のために有用なリガンド、および第2のシグナルを刺激するアクセサリー分子は、可溶型で使用され得る。リガンドは、細胞の表面、改変型多価シグナリングプラットフォーム（Engineered Multivalent Signaling Platform）（EMSP）に付着され得るか、または表面上に固定化され得る。1つの態様において、第1および第2の作用物質の両方が、表面、例えば、ビーズまたは細胞に共固定化される。1つの態様において、一次活性化シグナルを提供する分子は、CD3リガンドであり得、共刺激分子は、CD28リガンドまたは4-1BBリガンドであり得る。いくつかの態様において、メラノーマ腫瘍抗原または患者の腫瘍に由来する抗原のような1種類または複数種類の抗原による刺激によって細胞を増大させる。

10

#### 【0080】

いくつかの態様において、単離された免疫細胞は、単離後にPTD-MYC融合ポリペプチドによって即座に処理される。他の態様において、単離された免疫細胞は、PTD-MYC融合ポリペプチドによって処理される前に、適切な緩衝液で保管され、凍結される。いくつかの態様において、単離された免疫細胞は、単離後にPTD-MYC融合ポリペプチドによって即座に処理され、処理された細胞が、患者へ投与するために必要とされるまで、適切な緩衝液で保管され、凍結される。

20

#### 【0081】

ある種の態様において、単離された免疫細胞（例えば、混合集団免疫細胞、または腫瘍浸潤リンパ球のような単離された型）を、細胞によって取り込まれるために十分な期間、PTD-MYC融合ポリペプチドを含有している組成物と接触させる。いくつかの態様において、免疫細胞を、約24時間未満、約23時間未満、約22時間未満、約21時間未満、約20時間未満、約19時間未満、約18時間未満、約17時間未満、約16時間未満、約15時間未満、約14時間未満、約13時間未満、約12時間未満、約11時間未満、約10時間未満、約9時間未満、約8時間未満、約7時間未満、約6時間未満、約5時間未満、約4時間未満、約3時間未満、約2時間未満、または約1時間未満、PTD-MYC融合ポリペプチドを含有している組成物と接触させる。

30

#### 【0082】

ある種の態様において、免疫細胞を、約55分未満、約50分未満、約45分未満、約40分未満、約35分未満、約30分未満、約29分未満、約28分未満、約27分未満、約26分未満、約25分未満、約24分未満、約23分未満、約22分未満、約21分未満、約20分未満、約19分未満、約18分未満、約17分未満、約16分未満、約15分未満、約14分未満、約13分未満、約12分未満、約11分未満、または約10分未満、PTD-MYC融合ポリペプチドを含有している組成物と接触させる。ある種の態様において、免疫細胞を、約1時間、PTD-MYC融合ポリペプチドを含有している組成物と接触させる。

40

#### 【0083】

ある種の態様において、免疫細胞を、24時間またはそれ以上、PTD-MYC融合ポリペプチドを含有している組成物と接触させる。ある種の態様において、免疫細胞を、約12日未満、約11日未満、約10日未満、約9日未満、約8日未満、約7日未満、約6日未満、約5日未満、約4日未満、約2日未満、または約1日未満、PTD-MYC融合ポリペプチドを含有している組成物と接触させる。

#### 【0084】

50

上記の態様のいずれかと組み合わせられてもよいある種の態様において、細胞を、0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 500  $\mu\text{g/ml}$ 、0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.6  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.7  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.8  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.9  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも2  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも3  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも4  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも5  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも6  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも7  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも8  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも9  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも10  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも15  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも20  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも25  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも30  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも35  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも40  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも45  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも50  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも55  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも60  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも65  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも70  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも75  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも80  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも85  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも90  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも95  $\mu\text{g/ml}$ 、または少なくとも100  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、MYC融合ポリペプチドと接触させる。

10

【0085】

## MYC融合タンパク質

いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチドは、タンパク質形質導入ドメイン（PTD）、細胞の生存または増殖のうちの1つまたは複数を促進するMYCポリペプチドを含み、任意で、タンパク質タグドメイン、例えば、融合タンパク質の精製を容易にする1つまたは複数のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、MYCポリペプチドと接触させた細胞は、（例えば、MYCと接触させていない同じ型の同一もしくは類似の細胞と比較して）増加した生存時間、および/または（例えば、MYCと接触させていない同じ型の同一もしくは類似の細胞と比較して）増大した増殖を示す。

20

【0086】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、（a）タンパク質形質導入ドメイン；および（b）MYCポリペプチド配列を含む。いくつかの態様において、融合ペプチドは、式（I）：

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列  
のペプチドである。

【0087】

いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、（a）タンパク質形質導入ドメイン；（b）MYCポリペプチド配列；および（c）タンパク質形質導入ドメインとMYCポリペプチド配列とを連結する1つまたは複数の分子を含む。いくつかの態様において、融合ペプチドは、式（II）：

30

タンパク質形質導入ドメイン-X-MYCポリペプチド配列  
のペプチドであり、

ここで、-X-は、タンパク質形質導入ドメインとMYCポリペプチド配列とを連結する分子である。いくつかの態様において、-X-は、少なくとも1つのアミノ酸である。

【0088】

いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、（a）タンパク質形質導入ドメイン；（b）MYCポリペプチド配列；（c）少なくとも2つのタンパク質タグを含み；任意で、（d）リンカーを含む。いくつかの態様において、融合ペプチドは、式（III~VI）：

タンパク質形質導入ドメイン-X-MYCポリペプチド配列-X-タンパク質タグ1-X-タンパク質タグ2（式（III））、または

40

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列-X-タンパク質タグ1-X-タンパク質タグ2（式（IV））、または

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列-タンパク質タグ1-X-タンパク質タグ2（式（V））、または

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列-タンパク質タグ1-タンパク質タグ2（式（VI））

のペプチドであり、

ここで、-X-は、リンカーである。いくつかの態様において、-X-は、1つまたは複数のアミノ酸である。

50



## 【0089】

いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、(a)タンパク質形質導入ドメイン；(b)MYCポリペプチド配列；(c)6-ヒスチジントグ；(d)V5エピトープタグを含み、任意で、(e)リンカーを含む。いくつかの態様において、融合ペプチドは式(VII~XIV)：

タンパク質形質導入ドメイン-X-MYCポリペプチド配列-X-6-ヒスチジントグ-X-V5エピトープタグ(式(VII))、または

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列-X-6-ヒスチジントグ-X-V5エピトープタグ(式(VIII))、または

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列-6-ヒスチジントグ-X-V5エピトープタグ(式(IX))、または

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列-6-ヒスチジントグ-V5エピトープタグ(式(X))、

タンパク質形質導入ドメイン-X-MYCポリペプチド配列-X-V5エピトープタグ-X-6-ヒスチジントグ(式(XI))、または

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列-X-V5エピトープタグ-X-6-ヒスチジントグ(式(XII))、または

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列-V5エピトープタグ-X-6-ヒスチジントグ(式(XIII))、または

タンパク質形質導入ドメイン-MYCポリペプチド配列-V5エピトープタグ-6-ヒスチジントグ(式(XIV))

のペプチドであり、

ここで、-X-は、リンカーである。いくつかの態様において、-X-は、1つまたは複数のアミノ酸である。

## 【0090】

前述のように、いくつかの態様において、MYC融合タンパク質は、1つまたは複数のリンカー配列を含む。リンカー配列は、融合タンパク質のタンパク質形質導入ドメイン、MYCポリペプチド配列、V5エピトープタグ、および/または6-ヒスチジントグを連結するために用いられ得る。いくつかの態様において、リンカーは、1つまたは複数のアミノ酸を含む。いくつかの態様において、リンカーのアミノ酸配列は、KGELNSKLEを含む。いくつかの態様において、リンカーは、RTGのアミノ酸配列を含む。

## 【0091】

タンパク質形質導入ドメイン(PTD)

いくつかの態様において、MYC融合タンパク質は、タンパク質形質導入ドメインを含む。ペプチド輸送は、低分子、タンパク質、または核酸の、細胞の細胞内区画への細胞膜を介した送達のための代替法を提供する。十分に特徴決定されているタンパク質形質導入ドメイン(PTD)の1つの非限定的な例は、TAT由来ペプチドである。Frankelら(例えば、米国特許第5,804,604号、米国特許第5,747,641号、米国特許第5,674,980号、米国特許第5,670,617号、および米国特許第5,652,122号を参照すること)は、TATのアミノ酸48~57を含有しているペプチドを、カーゴタンパク質とコンジュゲートすることによる、カーゴタンパク質(ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ)の細胞への輸送を証明した。いくつかの態様において、TATは、MRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7)

のアミノ酸配列を含む。

## 【0092】

PTDの別の非限定的な例は、ペネトラチンである。ペネトラチンは、細胞膜を介して親水性高分子を輸送することができる(参照によってその全体が本明細書中に組み入れられるDerossi et al., Trends Cell Biol., 8:84-87(1998))。ペネトラチンは、培養中の細胞へ内部移行するショウジョウバエ転写因子、アンテナペディアのホメオドメインのアミノ酸43~58に相当する16アミノ酸ペプチドである。

## 【0093】

PTDのさらに別の非限定的な例は、VP22である。単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）由来の外被タンパク質、VP22は、細胞膜を介してタンパク質および核酸を輸送する能力を有する（参照によってその全体が本明細書中に組み入れられるElliot et al., Cell 88:223-233, 1997）。VP22の残基267～300が必要であるが、輸送のために十分とはなり得ない。輸送機能を担う領域が同定されていないため、一般的に、VP22タンパク質全体が、カーゴタンパク質および核酸を細胞膜を介して輸送するために使用される（Schwarze et al., Trends Pharmacol Sci, 21:45-48, 2000）。

## 【0094】

いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチドは、タンパク質形質導入ドメインを含む。例えば、非限定的に、いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインは、TAT、ペネトラチン、VP22、vpr、EPTD、R9、R15、VP16、およびアンテナペディアのうちの1つまたは複数のタンパク質形質導入ドメインを含む。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインは、TAT、ペネトラチン、VP22、vpr、およびEPTDのうちの1つまたは複数のタンパク質形質導入ドメインを含む。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインは、TAT、ペネトラチン、VP22、vpr、EPTD、R9、R15、VP16、およびアンテナペディアのうちの少なくとも1つのタンパク質形質導入ドメインを含む。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインは、合成タンパク質形質導入ドメイン（例えば、ポリアルギニンまたはPTD-5）を含む。具体的な態様において、タンパク質形質導入ドメインは、TATタンパク質形質導入ドメインを含む。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインは、MYCポリペプチドに共有結合で連結されている。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインは、ペプチド結合を介してMYCポリペプチドに連結されている。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインは、リンカー配列を介してMYCポリペプチドに連結されている。いくつかの態様において、リンカーは、短いアミノ酸配列を含む。例えば、非限定的に、いくつかの態様において、リンカー配列は、1アミノ酸長、2アミノ酸長、3アミノ酸長、4アミノ酸長、5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、または10アミノ酸長である。

## 【0095】

本発明のテクノロジーのMYC融合タンパク質は、所望の順序で配置されていてよい。例えば、いくつかの態様において、MYC融合タンパク質は、（a）MYCポリペプチドとインフレイムで連結されたタンパク質形質導入ドメイン、（b）V5ドメインとインフレイムで連結されたMYCポリペプチド、および（c）6-ヒスチジンエピトープタグとインフレイムで連結されたV5ドメインの順序で配置されていてよい。いくつかの態様において、MYC融合タンパク質は、（a）タンパク質形質導入ドメインとインフレイムで連結されたMYCポリペプチド、（b）V5ドメインとインフレイムで連結されたタンパク質形質導入ドメイン、および（c）6-ヒスチジンエピトープタグとインフレイムで連結されたV5ドメインという成分の順序を有する。いくつかの態様において、付加的なアミノ酸配列が、各配列の間に含まれていてもよい。いくつかの態様において、付加的なアミノ酸は、ポリペプチド配列の最初および/または最後に含まれていてよい。

## 【0096】

いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインはTATタンパク質形質導入ドメインである。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインは、TAT<sub>[48～57]</sub>である。いくつかの態様において、タンパク質形質導入ドメインは、TAT<sub>[57～48]</sub>である。

## 【0097】

タンパク質タグドメイン

いくつかの態様において、MYC融合タンパク質は、融合タンパク質の精製を容易にする1種類または複数種類のアミノ酸配列を含むタンパク質タグドメインを含む。いくつかの態様において、タンパク質タグドメインには、ポリヒスチジンタグおよびエピトープタグのうちの1つまたは複数が含まれる。例えば、非限定的に、例示的なタグには、V5、ヒスチジンタグ（例えば、6-ヒスチジンタグ）、HA（赤血球凝集素）タグ、FLAGタグ、CBP（カ

10

20

30

40

50

ルモジュリン結合ペプチド)、CYD(共有結合性であるが解離可能なNorpDペプチド)、Strept11、またはHPC(プロテインCの重鎖)のうちの1つまたは複数が含まれる。いくつかの態様において、タンパク質タグドメインは、約10~20アミノ酸長を含む。いくつかの態様において、タンパク質タグドメインは、2~40アミノ酸長、例えば、6~20アミノ酸長を含む。いくつかの態様において、前記の列挙されたタグのうちの2つ(例えば、V5およびHisタグ)が、タンパク質タグドメインを形成するために共に使用される。

#### 【0098】

いくつかの態様において、ヒスチジインタグは、6-ヒスチジインタグである。いくつかの態様において、ヒスチジインタグは、配列HHHHHH(SEQ ID NO:8)を含む。いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、V5エピトープタグを含む。いくつかの態様において、V5タグは、GKPIPNNLLGLDST(SEQ ID NO:9)

のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、V5タグは、IPNPLLGLD(SEQ ID NO:10)のアミノ酸配列を含む。

#### 【0099】

タンパク質タグは、適切な方法によって、本明細書中に開示された融合タンパク質に付加され得る。例えば、非限定的に、いくつかの態様において、TAT-MYCポリペプチド配列が、1種類または複数種類のタンパク質タグ、例えば、ポリHisタグおよび/またはV5タグをコードする発現ベクターへクローニングされる。いくつかの態様において、ポリヒスチジインタグおよび/またはV5タグは、PCRによって付加される(即ち、PCRプライマーが、ポリヒスチジン配列および/またはV5配列を含む)。

#### 【0100】

##### PTD-MYC融合ポリペプチドの構築

本明細書中に開示されたPTD-MYC融合ポリペプチド(例えば、TAT-MYC融合ポリペプチド)は、当技術分野において周知の方法によって構築され得る。例えば、非限定的に、TAT-MYC融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、PCRによって生成され得る。いくつかの態様において、ヒトMYC配列のための順方向プライマーは、TATタンパク質形質導入ドメインのインフレームN末端9アミノ酸配列(例えば、RKKRRQRRR)を含む。いくつかの態様において、ヒトMYC配列のための逆方向プライマーは、終止コドンを除くために設計される。いくつかの態様において、PCR産物は、適切な発現ベクターへクローニングされる。いくつかの態様において、発現ベクターは、ポリヒスチジインタグおよびV5タグを含む。

#### 【0101】

いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、(a) TATおよび(b) c-MYCを含む。いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、(a) TAT<sub>[48~57]</sub>および(b) c-MYCを含む。いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、(a) TAT<sub>[57~48]</sub>および(b) c-MYCを含む。

#### 【0102】

いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、(a) TAT、(b) c-MYC、(c) リンカー、(d) V5タグ、および(e) 6-ヒスチジインタグを含む。いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、(a) TAT<sub>[48~57]</sub>、(b) c-MYC、(c) リンカー、(d) V5タグ、および(e) 6-ヒスチジインタグを含む。いくつかの態様において、本明細書中に開示された融合ペプチドは、(a) TAT<sub>[57~48]</sub>、(b) c-MYC、(c) リンカー、(d) V5タグ、および(e) 6-ヒスチジインタグを含む。

#### 【0103】

いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチドは、SEQ ID NO:1を含み; いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチドは、SEQ ID NO:1である。

MRKKRRQRRRPLNVSTNRNYDL DYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELQPPAPSEDI  
WKKFELLPTPPLSPSRRSGLCSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGG  
DMVNQSFICDPDDETFIKNIIQDCMWSGFSA AAKLVSEKLASYQAARKDSGSPNPARG  
HSVCSTSSLYLQDL SAAASECIDPSVVFYPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSD SLLSSTES  
SPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHSKP  
PHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAPPSTRKDYPAAKRVKLD SVRVLRQISNNRKCTSPRSSD  
TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVLKKATAYILSVQAE  
EQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRKGELNSKLEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHHH  
(SEQ ID NO: 1)

10

## 【 0 1 0 4 】

前記融合タンパク質は、1種類または複数種類の官能基を含むよう合成中または合成後に修飾され得る。例えば、非限定的に、タンパク質は、アセチル、リン酸、酢酸、アミド、アルキル、および/またはメチル基のうちの1つまたは複数を含むよう修飾され得る。このリストは、網羅的ではなく、例示的なものに過ぎない。いくつかの態様において、タンパク質は、少なくとも1つのアセチル基を含む。

## 【 0 1 0 5 】

PTD-MYC融合ポリペプチドは、当技術分野において公知の適切な方法によって、例えば、細菌細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞のような細胞における組換えタンパク質発現によって生成され得る。いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチドは、微生物発酵によって組換え的に作製される。いくつかの態様において、微生物発酵は、約1～約10,000リットルの発酵体積、例えば、約10～約1000リットルの発酵体積で実施される。発酵は、適切な微生物宿主細胞および培養培地を用いることができる。例示的な態様において、大腸菌 (*E. coli*) が、微生物宿主細胞として用いられる。別の態様において、他の微生物、例えば、*S. セレビシエ* (*S. cerevisiae*)、*P. パストリス* (*P. pastoris*)、ラクトバチルス (*Lactobacilli*)、バチルス (*Bacilli*)、およびアスペルギルス (*Aspergilli*) が使用され得る。例示的な態様において、微生物宿主細胞は、BL-21 Star (商標) 大腸菌株 (*Invitrogen*) である。例示的な態様において、微生物宿主細胞は、BLR DE3大腸菌株である。

20

30

## 【 0 1 0 6 】

いくつかの態様において、宿主細胞は、発現されたタンパク質の翻訳を改善するため、宿主微生物細胞コドンバイアスを克服するために用いられる希少コドンのためのtRNAを提供するため修飾される。例示的な態様において、AGGコドン、AGAコドン、AUAコドン、CUAコドン、CCCコドン、GGAコドンのためのtRNAを発現する、pRARE (CamR) のようなプラスミドによって形質転換された宿主細胞 (例えば、大腸菌)。特定のコドンのためのtRNAを提供するための追加の適切なプラスミドまたは構築物は、当技術分野において公知であり、提供された方法において用いられ得る。

40

## 【 0 1 0 7 】

組込み型ベクターまたは自己複製型ベクターが、PTD-MYC融合ポリペプチド発現カセットを選択された宿主細胞へ導入するため、使用され得る。発現カセットにおいて、PTD-MYC融合ポリペプチドのためのコード配列は、誘導性プロモーターのようなプロモーターに機能的に連結される。誘導性プロモーターとは、培養条件の何らかの変化、例えば、栄養素の有無または温度の変化に応答して、その調節下にあるDNAからの増大したレベルの転写を開始するプロモーターである。いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチドをコードする核酸は、細菌発現のために最適化されたコドンである。

## 【 0 1 0 8 】

可能性のある多様な宿主細胞によって認識される例示的なプロモーターは、周知である

50

。これらのプロモーターは、存在する場合、制限酵素消化によって、起源DNAからプロモーターを取り出し、単離されたプロモーター配列をベクターへ挿入することによって、PTD-MYC融合ポリペプチドをコードするDNAと機能的に連結され得る。微生物宿主と共に使用するのに適したプロモーターには、ラクタマーゼおよびラクトースプロモーターシステム (Chang et al., (1978) Nature, 275:617-624 ; Goeddel et al., (1979) Nature, 281:544 ) 、アルカリホスファターゼ、トリプトファン ( trp ) プロモーターシステム ( Goeddel (1980) Nucleic Acids Res. 8:4057 ; EP 36,776 ) 、およびtacプロモーター ( deBoer et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 ) のようなハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定されるわけではない。選択された宿主細胞による発現に適したプロモーターが、使用され得る。当業者が、必要とされる制限部位を供給するためのリンカーまたはアダプターを使用して、PTD-MYC融合ポリペプチドをコードするDNAにそれらを機能的にライゲートすることを可能にする、適切なヌクレオチド配列は、公開されている ( 例えば、Siebenlist et al., (1980) Cell 20:269を参照すること ) 。例示的な態様において、細菌システムにおいて使用するためのプロモーターは、コード配列に機能的に連結されたシャイン・ダルガーノ ( S.D. ) 配列を含有していてもよい。いくつかの態様において、誘導性プロモーターは、当技術分野において周知のイソプロピル -D-1-チオガラクトピラノシド ( IPTG ) によって誘導されるlacZプロモーターである。プロモーターおよび発現カセットは、関心対象のDNA配列を合成するための周知の技術を使用して新規に合成されてもよい。例示的な態様において、本明細書中のPTD-MYC融合ポリペプチドの発現のための発現ベクターは、pET101/D-Topo ( Invitrogen ) である。

10

20

#### 【 0 1 0 9 】

PTD-MYC融合ポリペプチドの発現のため、PTD-MYC融合ポリペプチドをコードする発現ベクターを含有している微生物宿主は、典型的には、発酵リアクタにおいて高密度に増殖する。いくつかの態様において、リアクタは、グルコースの制御されたフィードを有する。いくつかの態様において、発酵槽接種原は、最初に、抗生物質が補足された培地において培養される ( 例えば、終夜培養 ) 。次いで、発酵槽接種原は、タンパク質の発現のため、発酵槽培養物に接種するために使用される。発酵槽培養物の少なくとも約15、一般的には、少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約30、またはそれ以上のOD600で、組換えタンパク質の発現が誘導される。例示的な態様において、誘導性プロモーターがlacZプロモーターである場合、PTD-MYC融合ポリペプチドの発現を誘導するため、IPTGが発酵培地に添加される。一般に、IPTGは、対数増殖期を表すOD600で発酵槽培養物に添加される。

30

#### 【 0 1 1 0 】

提供された方法のある種の態様において、誘導されたタンパク質発現は、誘導後約2～約5時間維持され、誘導後約2～約3時間維持され得る。より長い誘導期間は、組換えタンパク質の分解のため、望ましくない場合がある。誘導中の反応混合物の温度は、好ましくは、約28 ～ 約37 、一般的には、約30 ～ 約37 である。特定の態様において、誘導は、約37 でなされる。

#### 【 0 1 1 1 】

PTD-MYC融合ポリペプチドは、典型的には、微生物細胞においてサイトゾル封入体として発現される。封入体を採集するためには、誘導後、発酵培養物の遠心分離によって細胞ペレットを収集し、-70 またはそれ以下で凍結させ、解凍し、破碎緩衝液に再懸濁させる。従来の方法、例えば、超音波処理、均質化等によって細胞を溶解する。次いで、溶解物を、一般的には、タンパク質を可溶化するために有効な濃度、例えば、約5M、6M、7M、8M、9M、またはそれ以上の尿素の存在下で、可溶化緩衝液に再懸濁させる。再懸濁は、均質性を達成するため、機械的にペレットを破壊し、攪拌することを必要とし得る。いくつかの態様において、細胞ペレットを、尿素緩衝液に直接再懸濁させ、均質になるまで混合する。いくつかの態様において、再懸濁/可溶化緩衝液は、8M尿素、50mMリン酸 pH7.5であり、懸濁物はホモジナイザーに通される。

40

#### 【 0 1 1 2 】

いくつかの態様において、均質化された懸濁物は、スルホニル化される。例えば、いく

50

つかの態様において、均質化された懸濁物は、200mM亜硫酸ナトリウムおよび10mMテトラチオン酸ナトリウムを含むよう調整される。次いで、その溶液を、均質になるまで室温で混合する。次いで、混合された溶解物を、スルホニル化を完成させるため、追加の時間（例えば、2～8 で12時間以上）混合する。次いで、スルホニル化された溶解物を、1時間遠心分離した。次いで、スルホニル化されたPTD-MYC融合ポリペプチドを含有している上清を、遠心分離によって収集し、細胞ペレットを廃棄する。次いで、溶解物を清澄化するため、フィルタ、例えば、0.22  $\mu$ mメンブランフィルタに、上清を通す。

#### 【0113】

次いで、可溶化されたタンパク質を精製する。精製方法には、アフィニティークロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、ゲル排除クロマトグラフィ等が含まれ得る。いくつかの態様において、アフィニティークロマトグラフィが使用される。例えば、便利な精製のため、エピトープタグまたはヒスチジン6タグがタンパク質に提供される。本発明の方法において、例示的なPTD-MYC融合ポリペプチドは、Ni樹脂を用いるNiアフィニティークロマトグラフィを用いる精製のため、ヒスチジン6タグを含む。

10

#### 【0114】

例示的な態様において、Ni樹脂カラムを、尿素を含有している緩衝液で平衡化する。いくつかの態様において、平衡化緩衝液は、6M尿素、50mMリン酸、500mM NaCl、10%グリセロール溶液である。次いで、PTD-MYC融合ポリペプチドを含むスルホニル化され清澄化された上清を、Ni樹脂カラムに負荷する。次いで、カラムを、洗浄緩衝液、例えば、6M尿素、50mMリン酸、10%グリセロール、500mM NaCl、pH7.5で洗浄する。次いで、カラムを、減少する塩濃度を有する洗浄緩衝液で連続的に洗浄した。例えば、例示的なその後の洗浄には、6M尿素、50mMリン酸、10%グリセロール、および2M NaCl、pH7.5が含まれ得、その後、6M尿素、50mMリン酸、10%グリセロール、50mM NaCl、および30mMイミダゾール、pH7.5でもう1回洗浄される。

20

#### 【0115】

洗浄緩衝液の連続適用の後、PTD-MYC融合ポリペプチドを、溶出緩衝液、例えば、100～300mMイミダゾールの勾配を有する6M尿素、50mMリン酸、10%グリセロール、および50mM NaCl、pH7.5の添加によってカラムから溶出させ、画分を収集する。次いで、プールすべきタンパク質含有画分を0.22  $\mu$ m膜で濾過する。タンパク質収率の評価は、適切な方法、例えば、UV波長280での分光測光法を使用して測定され得る。

30

#### 【0116】

いくつかの態様において、1種類または複数種類の追加の精製方法が、単離されたPTD-MYC融合ポリペプチドをさらに精製するために用いられ得る。例示的な態様において、Niセファロースクロマトグラフィ工程からプールされた画分は、Qセファロース樹脂を用いる陰イオン交換クロマトグラフィによってさらに精製される。いくつかの態様において、プールは、Niセファロースクロマトグラフィ工程から、第2の洗浄緩衝液（例えば、6M尿素、50mMリン酸、10%グリセロール、2M NaCl、pH7.5）で、Qセファロース緩衝液の伝導率（17.52 $\pm$ 1mS/cm）へ試料を希釈することによって、Qセファロースカラムへの負荷のため、準備される。次いで、希釈されたプールを、Qセファロースカラムに負荷し、その後、チェイス（chase）緩衝液（例えば、6M尿素、50mMリン酸、300mM NaCl、および10%グリセロール）を用いる2回のチェイス工程を行い、UVトレースが基線に到達し、タンパク質がカラムから溶出したことが示されるまで、チェイス緩衝液をさらに連続適用する。

40

#### 【0117】

##### 処置の方法

PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞は、患者におけるがんの処置のため、投与される。いくつかの態様において、患者は、固形腫瘍を有する。いくつかの態様において、患者は、がん腫、腺腫、腺がん、芽細胞腫、肉腫、またはリンパ腫を有する。いくつかの態様において、患者は、転移性腫瘍を有する。いくつかの態様において、患者は、PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の投与の前に、がんの処置のための1種類または複数種類の剤を受容したことがある。いくつかの態様において、がんは、再発がんまたは難治性

50

がんである。いくつかの態様において、がんは、がんの処置のための1種類または複数種類の剤に対して抵抗性である。

【0118】

本明細書中に提供される処置の方法のためのヒトにおける例示的な腫瘍には、メラノーマ、膀胱腫瘍、乳腺腫瘍、前立腺腫瘍、がん腫、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん、骨がん、脳がん、CNSがん、グリオーマ腫瘍、子宮頸がん、絨毛がん、結腸直腸がん、結合組織がん、消化器系のがん、子宮内膜がん、食道がん、眼がん、頭頸部がん、胃がん、表皮内新生物、腎臓がん、喉頭がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔がん、卵巣がん、脾臓がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸がん、腎がん、呼吸器系のがん、肉腫、皮膚がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、および泌尿器系のがんが含まれるが、これらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、がんは、転移性がんである。いくつかの態様において、がんは、再発がんまたは難治性がんである。

10

【0119】

いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の投与は、腫瘍の成長を阻害するかまたは腫瘍の体積を低下させる。いくつかの態様において、がんを有する対象へのPTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の投与は、がんの1つまたは複数の症状を緩和する。いくつかの態様において、がんを有する対象へのPTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の投与は、対象の全体生存率を増加させる。いくつかの態様において、がんを有する対象へのPTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の投与は、がんの退縮を増大させる。

20

【0120】

本明細書中に提供される方法によるPTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞（例えば、PTD-MYC融合ポリペプチドによって処理された腫瘍浸潤リンパ球）の投与は、注射、輸液、植え込み、または移植を含むが、これらに限定されるわけではない、細胞を対象へ投与するのに適した様式で実施され得る。いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞は、患者へ、皮下投与されるか、皮内投与されるか、腫瘍内投与されるか、リンパ節内投与されるか、髄内投与されるか、筋肉内投与されるか、くも膜下腔内投与されるか、静脈内注射もしくはリンパ内注射によって投与されるか、または腹腔内投与される。いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチド免疫細胞は、腫瘍組織の切除によって形成された腔へ投与されるか（即ち、腔内送達）、または切除前の腫瘍へ直接投与される（即ち、腫瘍内送達）。1つの態様において、MYC融合ポリペプチド免疫細胞は、静脈内注射によって投与される。

30

【0121】

PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞に加えて、投与のための組成物は、薬学的に許容される担体、緩衝剤、賦形剤、佐剤、添加剤、防腐剤、増量剤、安定化剤、および/もしくは増粘剤、ならびに/または対応する生成物に通常見出される成分のような、その他の剤を含んでもよい。特定の投与経路のための組成物を製剤化するのに適した構成要素および適切な製造方法の選択は、当技術分野において一般に公知である。

【0122】

PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞を含む養子細胞治療用組成物は、投与に適した固体、半固体、または液体のような任意の形態であり得る。製剤は、溶液、乳濁液、懸濁液、錠剤、ペレット、およびカプセルからなる群より選択され得るが、これらに限定されるわけではない。組成物は、ある種の製剤に限定されず、組成物は、任意の公知の薬学的に許容される製剤へ製剤化され得る。薬学的組成物は、当技術分野において公知の従来の過程によって作製され得る。

40

【0123】

いくつかの態様において、MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の投与は、体重1kg当たり $10^4 \sim 10^{10}$ 個の細胞、例えば、体重1kg当たり $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞（これらの範囲内の細胞数の全ての整数値を含む）の投与を含む。いくつかの態様において、例えば、シクロホス

50

ファミドによる、リンパ球枯渇（lymphodepletion）の過程ありまたはなしで、細胞は投与される。

【0124】

MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞は、1つまたは複数の用量で投与され得る。1つの態様において、治療的に有効な量のPTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞は、単回投与される。いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の単回投与は、治療効果を有する。別の態様において、有効量のMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞が、ある期間にわたり複数回投与される。投与のタイミングは、管理する医師の判断の範囲内にあり、患者の年齢、性別、または臨床状態、およびがんの型、程度、または位置を含むがんの特徴を含むがこれらに限定されるわけではない、様々な要因に依る。個々の必要性は変動するが、特定の疾患または状態の処置のためのMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の有効量の最適範囲の決定は、当業者の技術の範囲内にある。

10

【0125】

PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞は、例えば、最初の2週間、3週間、4週間に、1ヶ月毎に、または処置期間中に、1～10回、投与され得る。いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞は、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回、投与される。いくつかの態様において、PTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞は、1週毎、2週毎、3週毎、または1ヶ月毎に投与される。

【0126】

治療的に有効な量とは、治療的または予防的な利益を提供する量を意味する。投与される投薬量は、レシピエントの年齢、健康、および体重、存在する場合、同時処置の種類、処置の頻度、および所望の効果の性質に依存すると考えられる。

20

【0127】

いくつかの態様において、PTD-MYC修飾型免疫細胞を受容する患者は、最初に、1種類または複数種類のサイトカインおよび/またはその他の免疫調整剤によって前処置される。いくつかの態様において、PTD-MYC修飾型免疫細胞を受容する患者は、PTD-MYC修飾型免疫細胞の投与前にリンパ球枯渇状態にされる。リンパ球枯渇の目的は、特に、ホメオスタシスサイトカインについて競合する制御性T細胞およびその他の非特異的T細胞を排除することによって、注入されるリンパ球のための場所を空けることである。

【0128】

いくつかの態様において、PTD-MYC修飾型免疫細胞は、追加の治療用物質と共に投与される。いくつかの態様において、追加の治療用物質は、PTD-MYC修飾型免疫細胞による処置の前に、それと同時に、それと断続的に、またはその後に投与される。いくつかの態様において、追加の治療用物質は、インターロイキン（例えば、IL-2、IL-7、IL-12）、サイトカイン、ケモカイン、またはおよび免疫調整薬のような免疫調整剤である。いくつかの態様において、サイトカインは、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、補体C5a、IL-2、TNF、CD40L、IL12、IL-23、IL15、IL17、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5（= RANTES）、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、およびXCL2からなる群より選択されるサイトカインの中より選択される。いくつかの態様において、追加の治療用物質は、化学療法または放射線治療のような抗がん剤である。

30

40

【0129】

いくつかの態様において、がんの処置のために投与される修飾型免疫細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）-T細胞を含む、遺伝学的に修飾された抗原受容体を有するT細胞である。T細胞受容体（TCR）の特異性を改変することによって、例えば、選択されたペプチド特異

50



性を有する新しいTCR 鎖および 鎖を導入することによって（例えば、米国特許第8,697,854号；PCT特許公報のWO2003020763、WO2004033685、WO2004044004、WO2005114215、WO2006000830、WO2008038002、WO2008039818、WO2004074322、WO2005113595、WO2006125962、WO2013166321、WO2013039889、WO2014018863、WO2014083173；米国特許第8,088,379号を参照すること）、T細胞を遺伝学的に修飾するため、例えば、様々な戦略が用いられ得る。キメラ抗原受容体（CAR）は、悪性細胞のような選択された標的に特異的なT細胞のような免疫応答細胞を生成するため、使用され得、多様な受容体キメラ構築物が記載されている（例えば、米国特許第5,843,728号；同第5,851,828号；同第5,912,170号；同第6,004,811号；同第6,284,240号；同第6,392,013号；同第6,410,014号；同第6,753,162号；同第8,211,422号；およびPCT公報WO9215322を参照すること）。CAR T細胞の調製のための方法は、当技術分野において公知であり、本明細書中に記載されるMYC融合ポリペプチド（例えば、PTD）を含む修飾型CAR T細胞を生成するため、本明細書中に提供される方法と組み合わせ使用され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0130】

一般に、CARは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインから構成され、ここで、細胞外ドメインは、予め決定された標的に特異的な抗原結合ドメインを含む。CARの抗原結合ドメインは、しばしば、抗体または抗体断片（例えば、単鎖可変断片、scFv）であるが、標的の特異的な認識をもたらす限り、結合ドメインは、特に限定されない。例えば、いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、CARがその受容体のリガンドに結合することができるよう、受容体を含んでいてよい。あるいは、抗原結合ドメインは、CARがそのリガンドの内在性受容体に結合することができるよう、リガンドを含んでいてよい。

#### 【0131】

いくつかの態様において、所望のCARを発現するT細胞は、がん抗原および共刺激分子を共発現する 線照射された活性化増殖細胞（activating and propagating cell：AaPC）との共培養を通して選択される。いくつかの態様において、例えば、IL-2およびIL-21のような可溶性因子の存在下でAaPCとの共培養によって、改変されたCAR T細胞を増大させる。この増大は、例えば、メモリーCAR+T細胞を提供するために実施され得る。このように、（任意で、インターフェロン のような所望のケモカインの産生と共に）抗原保持腫瘍に対する特異的な細胞傷害活性を有するCAR T細胞が提供され得る。

#### 【0132】

いくつかの態様において、がんの処置のための修飾型CAR T細胞を生成するため、CAR T細胞をインビトロで、本明細書中に提供されるPTD-MYC融合ポリペプチドと接触させる。修飾型CAR T細胞は、前記のPTD-MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の投与のための方法を含む、適切な方法に従って投与され得る。

#### 【0133】

キット

本明細書中に提供されるMYC融合ポリペプチドおよび/またはMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞を含む薬学的組成物は、がんの処置において使用するため、キットまたは薬学的システムへ組み立てられ得る。この態様によるキットは、バイアル、チューブ、アンプル、ボトル、注射器、またはバッグのような1個または複数個の容器が密封されたボックス、カートン、チューブのような運搬手段を含み得る。キットは、MYC融合ポリペプチドおよび/またはMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞を使用するための関連する説明書も含み得る。

#### 【0134】

いくつかの態様において、キットは、MYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞のような養子細胞治療の有効量を含む。いくつかの態様において、キットは、投与されたMYC融合ポリペプチドおよび/またはMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞の検出のための1種類または複数種類の試薬を含む。いくつかの態様において、キットは、本明細書中に提供されるMYC融合ポリペプチドによって処置するための細胞、例えば、造血幹細胞、ドナー白血球

、T細胞、またはNK細胞を含む。いくつかの態様において、キットは、本明細書中に提供されるMYC融合ポリペプチドおよび/またはMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞と組み合わせて投与される治療用物質の有効量をさらに含む。いくつかの態様において、治療用物質は、抗がん剤である。

#### 【0135】

本明細書中に提供されるキットは、本明細書中に提供されるMYC融合ポリペプチドおよび/またはMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞を対象へ投与するためのデバイスも含み得る。ポリペプチドおよび細胞を対象へ投与するための当技術分野において公知の多様なデバイスのいずれかが、本明細書中に提供されるキットに含まれてよい。例示的なデバイスには、皮下注射針、静脈内注射針、カテーテル、無針注射が含まれるが、皮下注射針、静脈内注射針、カテーテル、無針注射デバイス、吸入器、および点眼器のような液体ディスペンサーに限定されない。典型的には、キットのMYC融合ポリペプチドおよび/またはMYC融合ポリペプチド修飾型免疫細胞を投与するためのデバイスは、組成物の投与の所望の方法と適合性である。例えば、静脈内送達される組成物は、皮下注射針および注射器と共にキットに含まれ得る。

10

#### 【実施例】

#### 【0136】

実施例1. メラノーマ腫瘍の免疫治療のためのTAT-MYC処理リンパ球を生成するためにTAT-MYCによって処理された免疫細胞

本実施例においては、HIV-1トランス活性化タンパク質 (TAT) のタンパク質形質導入ドメインおよびMYCを含むPTD-MYC融合ポリペプチドの、インビボでメラノーマ細胞に対する免疫応答をモジュレートする能力を調査した。具体的には、メラノーマ保持マウスに由来しかつTAT-MYCによって処理されたリンパ系細胞の、メラノーマ腫瘍を保有しているマウスを処置する能力を研究した。これらの研究の目的は、メラノーマ保持マウスに由来し、かつTAT-MYCリンパ球を生成するためにTAT-MYCによって処理された、免疫細胞が、メラノーマ保持マウスへ移植されると、メラノーマ腫瘍のための有効な処置になるか否かを判定することであった。

20

#### 【0137】

材料および方法

C57BL/6Jは、最も広く使用されている近交系であり、そのゲノムが配列決定された最初の系統である。この系統は、多くの腫瘍に対して難治性であるが、大部分の変異の最大発現を許容するバックグラウンドである。C57BL/6Jマウスは、聴原発作に対して抵抗性であり、比較的低い骨密度を有し、年齢に関連した難聴を発症する。それらは、食事によって誘導される肥満、2型糖尿病、およびアテローム性動脈硬化症にもかかりやすい。この系統に由来するマクロファージは、炭疽菌致死毒素の効果に対して抵抗性である。

30

#### 【0138】

処置群

体重がおよそ25gであり、メラノーマ腫瘍を保有している15匹のC57BL/6マウス (Jackson Laboratory Stock # 000664) を作製し、5匹の3コホートの、未処置対照としての1匹の1コホート、腫瘍保持マウスに由来しかつ対照TAT融合タンパク質によって処理されたリンパ系細胞によって処置される1コホート、およびTAT-MYCリンパ球によって処置された1コホートに分割した。

40

#### 【0139】

腫瘍保持ドナーマウスの作製およびドナー細胞の調製

植え込みのためのB16-F10メラノーマ細胞 (ATCC CRL 6475、マウス皮膚メラノーマ) を、D10培地 (DMEM、10% FBS、Pen/Strep (10,000単位/ml) (Gibco Cat # 15140) ; L-グルタミン (200mM) (Gibco Cat # 25030) ; MEM非必須アミノ酸 (Gibco Cat # 11140) ) において培養した。

#### 【0140】

C57BL/6jマウス (Jackson Laboratory # 003548) に、尾静脈注射を介して、250  $\mu$ L PBS

50

中の $1 \times 10^4$ 個のB16-F10メラノーマ細胞を植え込んだ。注射前に、各試験マウスを1~2分間250W加熱ランプの下に置き、次いで、メラノーマ細胞を静脈内注射した。移植後14日目に、注射されたマウスからリンパ節を採集し、10mL注射器のプランジャーによって破碎した。

#### 【0141】

第1の研究のため、5匹のマウスからリンパ節を採集した。第2のため、10匹のマウスからリンパ節を採集した。細胞を、C10で洗浄し、収集し、 $260 \times g$ で5分間スピンした。上清を廃棄した後、細胞を、10mLの無菌TACに再懸濁させ、 $260 \times g$ で5分間スピンした。上清を廃棄した後、細胞を、5%BSAを含む滅菌濾過されたPBS 2mLに再懸濁させた。

#### 【0142】

リンパ節細胞を、TAT-MYCリンパ球を生成するためにTAT-MYCによって処理するか、または対照TAT融合タンパク質によって処置した。細胞を、2個の15mL円錐管に分割し（各1mL）、1mLの25ug/mlの対照タンパク質（実験1についてはTAT-CRE、実験2についてはTAT-GFP）または1mLの25ug/mlのTAT-MYCロットC18によって処理した。室温での1時間のインキュベーションの後、各チューブを無菌PBSで3回洗浄し、5mLの無菌チューブへ移し、氷上に置いた。

#### 【0143】

5匹のC57BL/6jマウスの各コホートについて、250uL PBS中の $1 \times 10^4$ 個のB16-F10メラノーマ細胞を尾静脈へ注射することによって、試験マウスを調製した。注射後、マウスを1日1回観察した。体重の変化、飼料消費量、活動量、および死亡率をモニタリングした。次いで、移植後7日目に、TAT-MYCリンパ球または対照リンパ系細胞を、メラノーマ細胞を注射されたマウスへ移植した。

#### 【0144】

症状を毎日モニタリングした。重度の症状が提示された場合、マウスを安楽死させ、死亡を記録した。マウスは、死亡していることが見出されるか、または荒い呼吸、円背位、および不動のような重度の症状を有することが見出された場合に安楽死されるかのいずれかであった。処置の日を0日目として死亡日を記録した。

#### 【0145】

実験1および2からの結果は、それぞれ、図1および2に示される。図に示されるように、メラノーマ保持マウスに由来するマウスリンパ系細胞をTAT-MYCと接触させることによって生成されたTAT-MYCリンパ球（TBX-3400）によるメラノーマ保持マウスの処置は、対照TAT融合タンパク質によって処置されたリンパ系細胞の移植と比較して、マウスの全体生存率を有意に改善した。これらの結果は、免疫細胞のTAT-MYC処置が、養子細胞移入を使用するメラノーマの処置において有用であることを示唆する。

#### 【0146】

実施例2. メラノーマ腫瘍の免疫治療のためのTAT-MYC処理リンパ球の用量応答効果

本実施例においては、メラノーマ腫瘍の免疫治療のためのTAT-MYC処理リンパ球の異なる投与量の治療効果を調査した。この実験は、TAT-MYC処理リンパ球のいくつかの異なる用量が注射され比較されたこと以外は、前記の実施例1と同様に実施された。2回の実験を実施した。第1の実験、実験3においては、TAT-MYCリンパ球を、以下の投薬群に従って、尾静脈注射を介して、メラノーマ保持マウスへ投与した：細胞 $3.0 \times 10^6$ 個/kg、細胞 $6.0 \times 10^6$ 個/kg、細胞 $14.0 \times 10^6$ 個/kg、および細胞 $70.0 \times 10^6$ 個/kg。対照群については、 $70.0 \times 10^6$ 個のTAT-Cre処理細胞をマウスへ投与するか、または細胞の投与を行わなかった（NT）。第2の実験、実験4においては、TAT-MYCリンパ球を、以下の投薬群に従って、尾静脈注射を介して、メラノーマ保持マウスへ投与した：細胞 $4.0 \times 10^3$ 個/kg、細胞 $4.0 \times 10^4$ 個/kg、細胞 $4.0 \times 10^5$ 個/kg、細胞 $4.0 \times 10^6$ 個/kg、および細胞 $4.0 \times 10^7$ 個/kg。対照群については、 $4.0 \times 10^6$ 個のTAT-Cre処理細胞をマウスへ投与するか、または細胞の投与を行わなかった（NT）。実験3および4からの結果は、それぞれ、図3および4に示される。図に示されるように、両方の実験において、増加する量のTAT-MYCリンパ球（TBX-3400）によるメラノーマ保持マウスの処置は、有意に改善された全体生存率をもたらした。これらの実験は

10

20

30

40

50

、メラノーマ保持対象を処置するためのTAT-MYCリンパ球の再現性および有効性の両方を証明する。

【0147】

実施例3. 結腸がんの免疫治療のためのTAT-MYC処理リンパ球を生成するためにTAT-MYCによって処理された免疫細胞

本実施例においては、HIV-1トランス活性化タンパク質 (TAT) のタンパク質形質導入ドメインおよびMYCを含むPTD-MYC融合ポリペプチドの、インビボで結腸がん細胞に対する免疫応答をモジュレートする能力を調査した。具体的には、結腸腫瘍保持マウスに由来しかつTAT-MYCによって処理されたリンパ系細胞の、結腸がん細胞由来腫瘍を保有しているマウスを処置する能力を研究した。これらの研究の目的は、結腸腫瘍保持マウスに由来し、かつTAT-MYCリンパ球を生成するためにTAT-MYCによって処理された、免疫細胞が、結腸腫瘍保持マウスへ移植されると結腸がんのための有効な処置になるか否かを判定することであった。

10

【0148】

材料および方法

植え込みのためのMC-38マウス結腸腺がん細胞 (Kerafast # ENH204) を、D10培地 (DMEM、10% FBS、Pen/Strep (10,000単位/ml) (Gibco Cat # 15140) ; L-グルタミン (200mM) (Gibco Cat # 25030) ; MEM非必須アミノ酸 (Gibco Cat # 11140) ) において培養した。

【0149】

体重およそ25gの9匹のドナーC57BL/6Jマウス (Jackson Laboratory Stock # 000664) に、尾静脈注射を介して、250  $\mu$ L PBS中の $1 \times 10^6$ 個のMC-38マウス結腸腺がん細胞を植え込んだ。1週間後に、18匹のレシピエントC57BL/6Jマウスに、 $1 \times 10^6$ 個のMC-38マウス結腸腺がん細胞を植え込んだ。

20

【0150】

ドナーマウスの移植後14日目に、9匹の注射されたドナーマウスからリンパ節を採集し、10mL注射器のプランジャーによって破碎した。細胞を、C10で洗浄し、収集し、260  $\times$  gで5分間スピンした。上清を廃棄した後、細胞を、10mLの無菌TACに再懸濁させ、260  $\times$  gで5分間スピンした。上清を廃棄した後、細胞を、5% BSAを含む滅菌濾過されたPBS 2mLに再懸濁させた。リンパ節細胞を、TAT-MYCリンパ球を生成するためにTAT-MYCによって処理するか、または対照TAT融合タンパク質によって処理した。細胞を、2個の15mL円錐管に分割し (各1mL) 、1mLの25ug/mlの対照TAT融合タンパク質 (TAT-CRE) または1mLの25ug/mlのTAT-MYCロットC18によって処理した。室温での1時間のインキュベーションの後、各チューブを無菌PBSで3回洗浄し、5mLの無菌チューブへ移し、氷上に置いた。次いで、各6匹の3コホート：未処置対照である1コホート、腫瘍保持マウスに由来しかつ対照TAT融合タンパク質によって処理されたリンパ系細胞によって処置された1コホート、および腫瘍保持マウスに由来しかつTAT-MYC融合タンパク質によって処理されたリンパ系細胞 (TAT-MYCリンパ球) によって処置された1コホートを作成するため、(細胞 $5 \times 10^6$ 個/kgに等しい) 250  $\mu$ L PBS中の125,000個のリンパ系細胞を、各レシピエントマウスの尾静脈へ注射した。

30

【0151】

注射後、マウスを1日1回観察した。体重の変化、飼料消費量、活動量、および死亡率をモニタリングした。症状を毎日モニタリングした。重度の症状が提示された場合に、マウスを安楽死させ、死亡を記録した。マウスは、死亡していることが見出されるか、または荒い呼吸、円背位、および不動のような重度の症状を有することが見出された場合に安楽死させられるかのいずれかであった。処置の日を0日目として死亡日を記録した。

40

【0152】

結果

この実験からの結果は、図5に示される。処置後27日目に、最初の未処置マウスおよびTAT-CRE対照マウスが、死亡していることが見出された。処置後34日目までに、全ての未処置マウスおよびTAT-CRE対照マウスが、死亡していることが見出されるか、または安楽死させられる必要があった。対照的に、TAT-MYCリンパ球によって処置されたマウスの最初

50

の死亡は、処置後32日目に起こった。52日目までに、TAT-MYCリンパ球によって処置されたマウスのうち、3匹のみが死亡した。

【0153】

従って、図に示されるように、結腸腫瘍保持マウスに由来するマウスリンパ系細胞をTAT-MYCと接触させることによって生成されたTAT-MYCリンパ球による腫瘍保持マウスの処置は、対照TAT-MYC融合タンパク質によって処理されたリンパ系細胞の移植と比較して、マウスの全体生存率を有意に ( $p < 0.0019$ ) 改善した。これらの結果は、免疫細胞のTAT-MYC処理が、養子細胞移入を使用する結腸がんの処置において有用であることを示唆する。

【0154】

実施例4. メラノーマ腫瘍の免疫治療のためのTAT-MYC処理リンパ球の用量応答効果

10

本実施例においては、メラノーマ腫瘍の免疫治療のためのTAT-MYC処理リンパ球の異なる投与量の治療効果を調査した。この実験は、TAT-MYC処理リンパ球のいくつかの異なる用量が注射され比較されたこと以外は、前記の実施例3と同様に実施された。この実験においては、TAT-MYCリンパ球を、以下の投薬群に従って、尾静脈注射を介して、メラノーマ保持マウスへ投与した（各群5匹の腫瘍保持マウス）：細胞 $5.0 \times 10^3$ 個/kg、細胞 $5.0 \times 10^4$ 個/kg、細胞 $5.0 \times 10^5$ 個/kg、細胞 $5.0 \times 10^6$ 個/kg、細胞 $5.0 \times 10^7$ 個/kg、および細胞 $5.0 \times 10^8$ 個/kg、細胞/kg。対照群については、細胞をマウスへ投与しないか（NT）（8匹）、または細胞 $5.0 \times 10^7$ 個/kgを非腫瘍保持マウスへ投与した（5匹）。この実験からの結果は、図6に示される。図に示されるように、増加する量のTAT-MYCリンパ球（TBX-3400）によるメラノーマ保持マウスの処置は、有意に改善された全体生存率をもたらした。未処置コ

20

ホートにおいて、動物の75%が19日目までに死亡し、残りの未処置マウスは、腫瘍移植後41日目までに死亡した。細胞 $5 \times 10^3$ 個/kgを受容したマウスは、全て、19日目までに死亡した。対照的に、細胞 $5 \times 10^5$ 個/kgを受容した動物の60%、細胞 $5 \times 10^6$ 個/kgまたは細胞 $5 \times 10^7$ 個/kgを受容した動物の100%が、研究の間中、生存した。さらに、細胞 $5 \times 10^7$ 個/kgを受容した非腫瘍保持マウスの100%が、研究の間中、生存した。細胞 $5 \times 10^8$ 個/kgを受容したマウスは、全て、体毛の減少を示した。細胞 $5 \times 10^8$ 個/kgを受容したマウスの40%が、41日目までに死亡した。細胞 $5 \times 10^8$ 個/kgを受容したマウスの残りの60%は、研究の間中、生存した。

【0155】

これらの実験は、他の場合では致死的であるMC-38結腸直腸がん腫瘍モデルにおいて結腸腫瘍保持対象を処置するためのTAT-MYCリンパ球の再現性および有効性の両方を証明する。

30

【0156】

実施例5. 固形腫瘍の免疫治療のためのTAT-MYC処理リンパ球を生成するためにTAT-MYCによって処理された免疫細胞

本実施例においては、HIV-1トランス活性化タンパク質（TAT）のタンパク質形質導入ドメインおよびMYCを含むPTD-MYC融合ポリペプチドの、インビボで追加の腫瘍細胞型に対する免疫応答をモジュレートする能力を調査した。具体的には、腫瘍保持マウスに由来しかつTAT-MYCによって処理されたリンパ系細胞の、固形腫瘍を保有しているマウスを処置する能力を研究した。これらの研究の目的は、腫瘍保持マウスに由来し、かつTAT-MYCリン

40

パ球を生成するためにTAT-MYCによって処理された、免疫細胞が、腫瘍保持マウスへ移植されると固形腫瘍のための有効な処置になるか否かを判定することである。

【0157】

がん細胞株の移植を使用する多数のマウス異種移植モデルが、当技術分野において入手可能であり、かつ、固形腫瘍の処置を評価するために本実施例において用いられ得る。異種移植腫瘍の生成のためのがんおよび利用可能な細胞株の非限定的な例は、下記表に列举される。

組織型	細胞株
副腎	H295R
膀胱	SW780
脳	SF-295, SK-N-AS, U87 MG, U251
乳房	BT474, HCC-1806, HCC-1954, JIMT-1, MCF-7, MDA-MB-231, HCC70
結腸	CL-34, COLO 205, DLD-1, HCT 116, HCT-15, HT-29, LoVo, LS-174T, LS411N, RKO, SW48, SW480, SW620
上皮	A-431
ユーイング肉腫	RD-ES
胃	N87, SNU-5, MKN-45
頭頸部	FaDu
白血病	HL-60, MOLM-13, MOLT-4, MV4-11, RS4;11, SET2, THP-1, HEL92.1.7, K-562, Kasumi-1
肝臓	Hep3B, HuH-7, SNU-398
肺（非小細胞）	A-427, A549, H1299, H1975, H226, H23, H292, H460, H520, H522, H647, H727, H810, HCC-44, NCI-H2122, SK-MES-1, COR-L23, NCI-H1963, H2009, H1581, H1993, H441
肺（小細胞）	H69, H82, H211, H526, SHP-77, DMS 114
リンパ腫	Daudi, DoHH-2, Granta 519, JEKO-1, KARPAS-299, MOLT-4, Raji B, Ramos, REC-1, RL, SU-DHL-4, WSU-DLCL2, Mino, Namalwa
メラノーマ	A2058, A375, IGR-37, SK-MEL-5, UACC-62, CHL-1, COLO 800, IGR-1, IGR-37
中皮腫	MSTO-211H
多発性骨髄腫	H929, OPM-2, RPMI 8226
神経芽細胞腫	SKNAS
卵巣	A2780, IGR0V1, OVCAR-3, OVCAR-5, SK-OV-3, TOV-21G, OV-90
膵臓	BxPc-3, HPAC, HPAF II, KP4, MIA PaCa-2, PANC-1
前立腺	22Rv1, PC3, DU145, LNCaP, VCaP
腎臓	786-0, G-401, G-402
肉腫	HT-1080, SJSA-1
甲状腺	8505C, FTC-238, K1
子宮	ECC-1, MFE-280, HEC-1-A, HEC-1-B

10

20

30

## 【 0 1 5 8 】

## 材料および方法

体重がおよそ25gであり、固形腫瘍を保有している15匹のC57BL/6マウス（Jackson Laboratory Stock # 000664）を作製し、5匹の3コホートの、未処置対照としての1匹の1コホート、腫瘍保持マウスに由来しかつ対照TAT融合タンパク質によって処理されたリンパ球によって処置された1コホート、およびTAT-MYCリンパ球によって処置された1コホートに分割する。

## 【 0 1 5 9 】

## 腫瘍保持ドナーマウスの作製およびドナー細胞の調製

植え込みのための固形腫瘍細胞を、D10培地（DMEM、10%FBS、Pen/Strep（10,000単位/ml）（Gibco Cat # 15140）；L-グルタミン（200mM）（Gibco Cat # 25030）；MEM非必須アミノ酸（Gibco Cat # 11140））において培養する。

## 【 0 1 6 0 】

C57BL/6jマウス（Jackson Laboratory # 003548）に、尾静脈注射を介して、250  $\mu$ L PBS中の $1 \times 10^4$ 個の腫瘍細胞を植え込む。注射前に、各試験マウスを1～2分間250W加熱ランプの下に置き、次いで、腫瘍細胞を静脈内注射した。移植後14日目に、注射されたマウスからリンパ節を採集し、10mL注射器のプランジャーによって破碎する。

## 【 0 1 6 1 】

40

50

第1の研究のため、5匹のマウスからリンパ節を採集する。第2の研究のため、10匹のマウスからリンパ節を採集する。細胞を、C10で洗浄し、収集し、 $260 \times g$ で5分間スピンする。上清を廃棄した後、細胞を、10mLの無菌TACに再懸濁させ、 $260 \times g$ で5分間スピンする。上清を廃棄した後、細胞を、5%BSAを含む滅菌濾過されたPBS 2mLに再懸濁させる。

【0162】

リンパ節細胞を、TAT-MYCリンパ球を生成するためにTAT-MYCによって処理するか、または対照TAT融合タンパク質によって処理する。細胞を、2個の15mL円錐管に分割し（各1mL）、1mLの25ug/mlの対照タンパク質（実験1についてはTAT-CRE、実験2についてはTAT-GFP）または1mLの25ug/mlのTAT-MYCロットC18によって処理する。室温での1時間のインキュベーションの後、各チューブを無菌PBSで3回洗浄し、5mLの無菌チューブへ移し、氷上に置く。

10

【0163】

5匹のC57BL/6jマウスの各コホートについて、 $250 \mu\text{L}$  PBS中の $1 \times 10^4$ 個の腫瘍細胞を尾静脈へ注射することによって、試験マウスを調製する。注射後、マウスを1日1回観察する。体重の変化、飼料消費量、活動量、および死亡率をモニタリングする。次いで、移植後7日目に、TAT-MYCリンパ球または対照リンパ系細胞を、腫瘍細胞が注射されたマウスへ移植する。

【0164】

症状を毎日モニタリングする。重度の症状が提示された場合に、マウスを安楽死させ、死亡を記録する。マウスは、死亡していることが見出されるか、または荒い呼吸、円背位、および不動のような重度の症状を有することが見出された場合に安楽死させられるかのいずれかである。処置の日を0日目として死亡日を記録する。

20

【0165】

腫瘍保持マウスに由来するマウスリンパ系細胞をTAT-MYCと接触させることによって生成されたTAT-MYCリンパ球（TBX-3400）による腫瘍保持マウスの処置は、対照TAT融合タンパク質によって処理されたリンパ系細胞の移植と比較して、マウスの全体生存率を有意に改善すると予想される。これらの結果は、免疫細胞のTAT-MYC処理が、養子細胞移入を使用する固形腫瘍の処置において有用であることを示すと考えられる。

【0166】

実施例6. 固形腫瘍の免疫治療のためのTAT-MYC処理リンパ球の用量応答効果

30

本実施例においては、固形腫瘍の免疫治療のためのTAT-MYC処理リンパ球の異なる投与量の治療効果を調査する。この実験は、TAT-MYC処理リンパ球のいくつかの異なる用量が注射され比較されること以外は、前記と同様に実施される。2つの実験が実施される。第1の実験においては、TAT-MYCリンパ球を、以下の投薬群に従って、尾静脈注射を介して、腫瘍保持マウスへ投与する：細胞 $3.0 \times 10^6$ 個/kg、細胞 $6.0 \times 10^6$ 個/kg、細胞 $14.0 \times 10^6$ 個/kg、および細胞 $70.0 \times 10^6$ 個/kg。対照群については、マウスへ $70.0 \times 10^6$ 個のTAT-Cre処理細胞を投与するか、または細胞を投与しない（NT）。第2の実験、実験4においては、TAT-MYCリンパ球を、以下の投薬群に従って、尾静脈注射を介して、腫瘍保持マウスへ投与する：細胞 $4.0 \times 10^3$ 個/kg、細胞 $4.0 \times 10^4$ 個/kg、細胞 $4.0 \times 10^5$ 個/kg、細胞 $4.0 \times 10^6$ 個/kg、および細胞 $4.0 \times 10^7$ 個/kg。対照群については、マウスへ $4.0 \times 10^6$ 個のTAT-Cre処理細胞を投与するか、または細胞を投与しない（NT）。増加する量のTAT-MYCリンパ球（TBX-3400）による腫瘍保持マウスの処置は、両方の実験において、有意に改善された全体生存率をもたらすと考えられる。これらの実験は、腫瘍保持対象を処置するためのTAT-MYCリンパ球の再現性および有効性も証明すると考えられる。

40

【0167】

本開示の好ましい態様が本明細書中に示され記載されたが、そのような態様は例として提供されるに過ぎないことが当業者には明白であろう。本開示から逸脱することなく、多数の変種、変化、および置換が、当業者に想到されるであろう。本明細書中に記載された本開示の態様の様々な代替物が、本開示の実施において用いられ得ることが理解されるべきである。添付の特許請求の範囲が本開示の範囲を定義すること、およびそれによってこ

50

れらの特許請求の範囲の範囲内の方法および構造ならびにそれらの等価物が包含されることが意図される。

【0168】

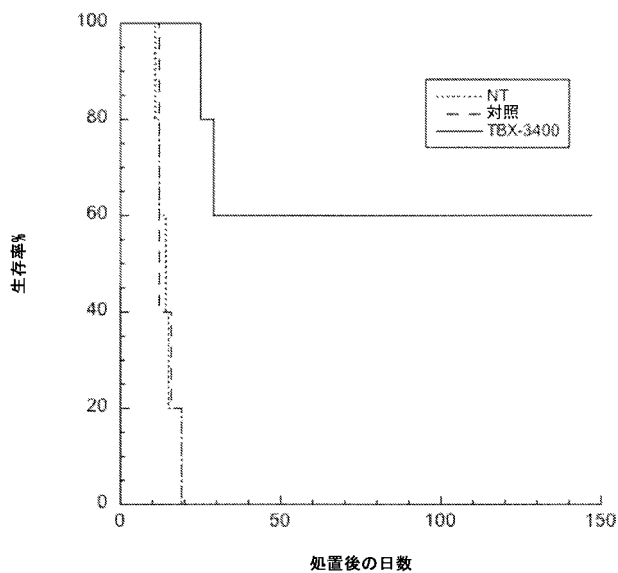
本明細書中で言及または引用された全ての特許、特許出願、特許仮出願、および刊行物は、本明細書の明示的な教示と相反しない限り、全ての図面および表を含むその全体が参照によって組み入れられる。

【0169】

他の態様は、添付の特許請求の範囲において示される。

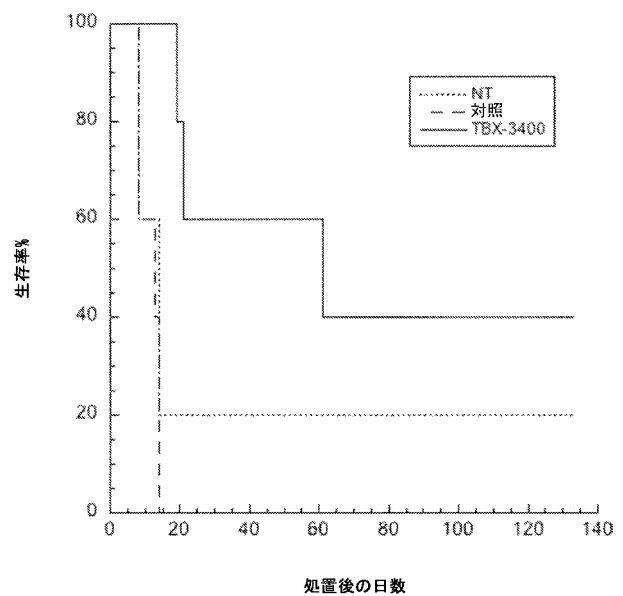
【図1】

M-TBX-3400 実験1



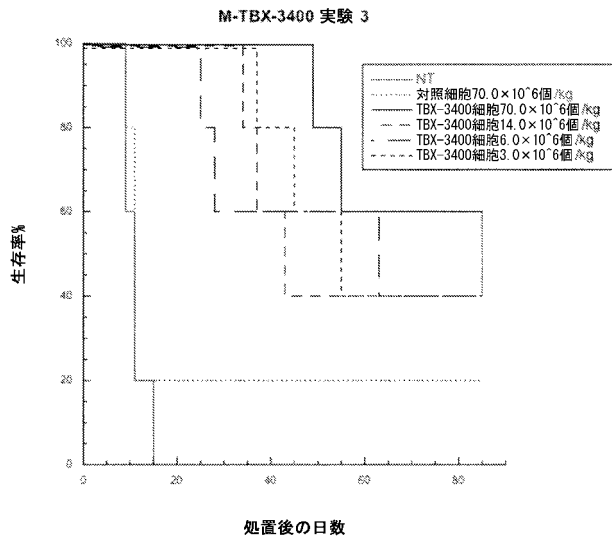
【図2】

M-TBX-3400 実験2

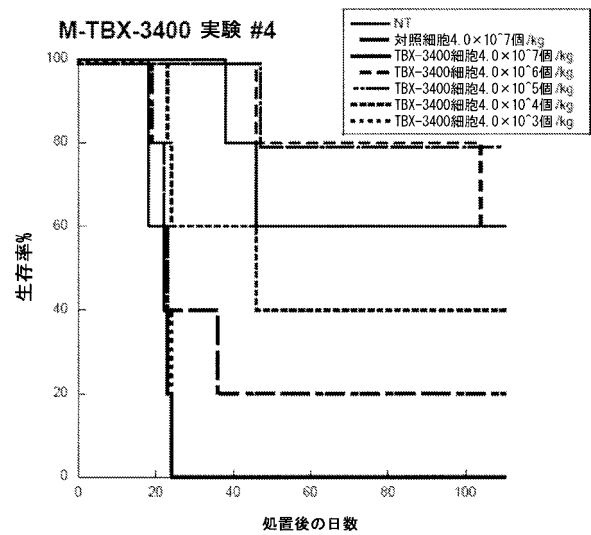




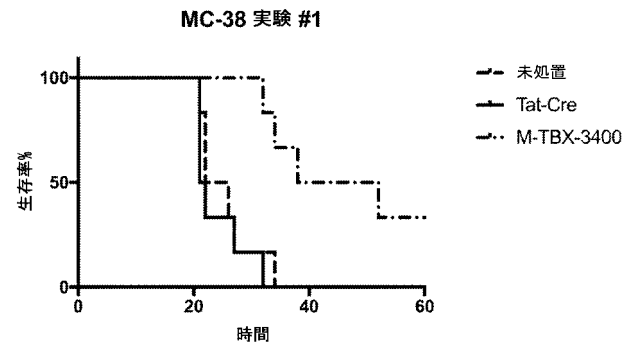
【図 3】



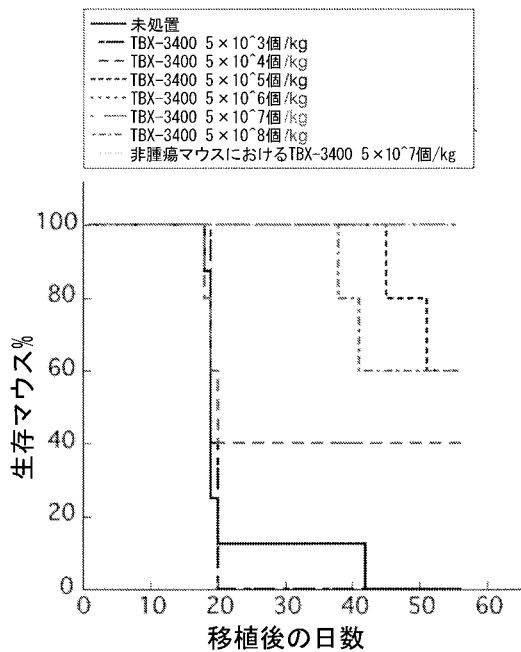
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

2020529847000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/044740

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:  
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).  
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-13 were searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/044740

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-11, 18-32, 36, 38-42  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/044740

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C07K 14/47; C12N 5/06 (2018.01)

CPC - C07K 14/4702; C07K 2319/10; C12N 5/0634; C12N 2501/606 (2018.08)

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC - 424/573; 424/93.21; 424/192.1 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0356392 A1 (TAIGA BIOTECHNOLOGIES, INC.) 04 December 2014 (04.12.2014) entire document	33, 35, 37
Y		1-4, 12-17, 34
Y	US 2015/0164950 A1 (TAIGA BIOTECHNOLOGIES, INC.) 18 June 2015 (18.06.2015) entire document	1-4, 12-17, 34
Y	US 2012/0251563 A1 (NICCHITTA et al) 04 October 2012 (04.10.2012) entire document	3, 16
P, X	US 2018/0036396 A1 (TAIGA BIOTECHNOLOGIES, INC.) 08 February 2018 (08.02.2018) entire document	1-5, 12-17, 33-35, 37
A	US 6,358,739 B1 (BAETGE et al) 19 March 2002 (19.03.2002) entire document	1-5, 12-17, 33-35, 37
A	US 2006/0222657 A1 (DOWDY et al) 05 October 2006 (05.10.2006) entire document	1-5, 12-17, 33-35, 37
A	US 2012/0027792 A1 (PAVLAKIS et al) 02 February 2012 (02.02.2012) entire document	1-5, 12-17, 33-35, 37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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

"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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2018

Date of mailing of the international search report

16 OCT 2018

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

(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, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, KG, 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, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(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 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ラファエリ ヨセフ

アメリカ合衆国 8 0 2 0 6 コロラド州 デンバー スティール ストリート 1 1 1 5

(72)発明者 ターナー ブライアン シー

アメリカ合衆国 8 0 2 4 6 コロラド州 デンバー サウス グレンコー ストリート 6 5 5

(72)発明者 バード グレゴリー アラン

アメリカ合衆国 8 0 1 2 3 コロラド州 リトルトン サウス シェリダン ウェイ 5 9 5 2

F ターム(参考) 4B065 AA92X AC20 BC12 BD39 CA44

4C084 AA02 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 CA53 DA01 MA02 MA55

MA56 MA65 MA66 MA67 NA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC751

4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 DA20 MA02 MA55 MA56 MA65 MA66

NA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC75

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 EA28 FA74

【要約の続き】

## M-TBX-3400 実験 1

