

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7701925号

(P7701925)

(45)発行日 令和7年7月2日(2025.7.2)

(24)登録日 令和7年6月24日(2025.6.24)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 41/17 (2020.01)

A 6 1 K 41/17

A 6 1 K 35/17 (2025.01)

A 6 1 K 35/17

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/02

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

請求項の数 11 (全41頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-534200(P2022-534200)

(86)(22)出願日 令和2年12月17日(2020.12.17)

(65)公表番号 特表2023-506413(P2023-506413
A)

(43)公表日 令和5年2月16日(2023.2.16)

(86)国際出願番号 PCT/EP2020/086733

(87)国際公開番号 WO2021/122969

(87)国際公開日 令和3年6月24日(2021.6.24)

審査請求日 令和5年12月14日(2023.12.14)

(31)優先権主張番号 19218724.3

(32)優先日 令和1年12月20日(2019.12.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 521438571

マリנקロット ファーマシューティカ
ルズ アイルランド リミテッド
アイルランド国 ダブリン 15, ブラ
ンチャーズタウン, クルーズラス ロー
ド, カレッジ ビジネス アンド テクノ
ロジー パーク

(74)代理人 100107489

弁理士 大塩 竹志

(72)発明者 ツァイザー, ロベルト

ドイツ国 7 9 1 0 0 フライブルク,
リーゼ マイトナー シュトラッセ 1 0

(72)発明者 アポストロヴァ, ペチャ

ドイツ国 7 9 1 0 6 フライブルク,
フーグシュテッターシュトラッセ 5 0

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血液由来試料中の免疫調節細胞を生成するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫調節NK細胞を製造する方法であって、前記方法が、

ーチェックポイント阻害剤療法を受け、かつ自己免疫大腸炎を含む免疫関連有害事象（
i r A E）の症状を示すか、または罹患した、対象の単核細胞を含む血液試料に由来する
試料を提供するステップと、

ー前記試料に8-メトキシプソラレンを添加するステップと、

ー前記試料をUVA照射に供するステップと、を含み、

前記試料に8-メトキシプソラレンを添加し、前記試料をUVA照射に供することによ
り、前記試料中の免疫調節NK細胞を生成するか、または前記試料中の免疫調節NK細胞
の形成を誘導する、方法。

【請求項2】

前記対象においてi r A Eの症状および／もしくは徴候が生じた後に、前記チェックポ
イント阻害剤療法が中止された、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

i r A Eの症状および／または徴候が、前記免疫チェックポイント阻害剤療法が中止さ
れた後に生じた、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

i r A Eの症状および／または徴候が、前記免疫チェックポイント阻害剤療法が中止され
た後に維持された、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記対象が、がんに罹患している、請求項 1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記対象が、悪性黒色腫またはチェックポイント阻害剤療法によって治療可能な別のがんに罹患している、請求項 1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記対象が、免疫抑制薬を受けている、請求項 1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫抑制薬が、ステロイド、コルチコステロイド、シクロスポリン、抗 T N F 抗体、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 7に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗 T N F 抗体が、インフリキシマブである、請求項 8に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象が、免疫抑制薬に対して難治性である、請求項 1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記チェックポイント阻害剤療法が、抗 C T L A 4 抗体および抗 P D - 1 抗体のうち少なくとも 1 つの投与を含む、請求項 1～10のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、チェックポイント阻害剤療法を受け、かつ免疫関連有害事象（i r A E）の症状を発症する疑いがあるか、または発症した、対象の血液試料に由来する試料の提供のステップと、試料に光増感剤を添加するステップと、試料を照射に供するステップと、を含み、好ましくは、上記試料中に免疫調節 N K 細胞を生成する、方法に関する。実施形態では、光増感剤は 8 - メトキシプソラレンであり、かつ／または照射は U V A 照射である。別の態様において、本発明は、対象の単離された血液試料に由来する試料の提供のステップと、試料に光増感剤を添加するステップと、試料を照射に供するステップと、を含む方法から得られた免疫調節 N K 細胞に関する。さらに、本発明は、チェックポイント阻害剤療法を受けた対象における i r A E の治療および／または予防における使用のための免疫調節 N K 細胞を包含する。

【背景技術】

【0002】

免疫チェックポイントは、免疫系の調節分子であり、免疫恒常性および自己寛容性の維持において重要な役割を果たす。同定された最初の免疫チェックポイントとしては、細胞傷害性 T リンパ球タンパク質 - 4（C T L A - 4）およびプログラム細胞死タンパク質 - 1（P D - 1）が挙げられる。C T L A - 4 は、T 細胞の表面上で発現され、抗原提示細胞上の B 7 - 1（C D 8 0）または B 7 - 2（C D 8 6）分子に結合し、T 細胞の負の調節因子として機能する。P D - 1 はまた、プログラムされたデスリガンド - 1（P D - L 1）およびプログラムされたデスリガンド - 2（P D - L 2）を含む、そのリガンドとの相互作用を通じて T 細胞活性に悪影響を及ぼす。C T L A - 4 とは異なり、P D - 1 は T 細胞上で見出されるだけでなく、B 細胞およびナチュラルキラー細胞を含む多くの免疫細胞上で広く発現される。健常個体では、C T L A - 4 と P D - 1 の両方の表面発現が緊密かつ動的に調節される。

【0003】

がんの発症中、悪性細胞は、免疫チェックポイントを活性化することによって免疫応答を阻害する。以前の研究では、P D - L 1 が広範囲のがんにおいて発現していることが示されている。腫瘍微小環境において、がん性細胞によって発現された P D - L 1 は、T 細胞の表面上で P D - 1 と相互作用して、T 細胞のエフェクター機能を阻害する。さらに、いくつかの研究は、P D - L 1 の高い腫瘍発現は、がんの予後不良と著しく相関している

10

20

30

40

50

ことを示している。これらの研究は、がんにおけるPD-1シグナル伝達経路遮断の治療効果があることを示唆する。

【0004】

最近の臨床試験により、いくつかの抗PD-1および抗PD-L1免疫チェックポイント阻害剤（ICI）が、黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞がん、および頭頸部がんなどの様々ながんの有効であることが明らかになった。ICIの効能を拡大するための追加の臨床試験が、現在進行中である。これまでに、米国食品医薬品局（FDA）は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、およびセミプリマブという3つの抗PD-1抗体、ならびにアテゾリズマブ、アベルマブ、およびデュルバルマブという3つの抗PD-L1阻害剤を、異なるタイプのがんの治療のために承認している。

10

【0005】

ICIの使用が増加するにつれて、このクラスの薬物に関連する有害事象は、重要な問題となっている。ICIは、従来の細胞傷害性化学療法とは異なる毒性プロファイルを有する。免疫関連有害事象（irAE）として知られるICIによる免疫系の活性の増加と関連する副作用は、皮膚、消化管、内分泌系、肝臓、肺、神経系、および筋骨格系を含む体の複数の臓器に影響を及ぼし得る。

【0006】

例えば、抗CTLA4抗体および抗PD-1抗体との免疫チェックポイント阻害剤療法の組み合わせは、悪性黒色腫の効率的な第一選択治療である。しかしながら、患者の約50%は、重篤な免疫関連有害事象（irAE）を発症する^{1, 2}。自己免疫大腸炎は、20%の症例で発生し、コルチコステロイド難治性となる可能性がある³。

20

【0007】

要約すると、チェックポイント阻害剤療法、特に抗CTLA4および抗PD-1抗体による療法は、複数の形態のがん、特に悪性黒色腫に対する有効な治療であるが、治療は、チェックポイント阻害剤療法に起因する免疫系の活性化に起因し得る実質的な副作用と関連し得る。そのような副作用は、自己免疫反応をもたらし、異なる臨床症状に現れる可能性があり、irAEとして要約され得る。顕著なirAEは、自己免疫大腸炎である。自己免疫反応、特に自己免疫大腸炎などの治療の副作用は、チェックポイント阻害剤治療を停止した後も持続する場合がある。

【0008】

したがって、チェックポイント阻害剤療法を受けた患者における自己免疫反応、特に自己免疫大腸炎などの免疫関連有害事象を治療するための代替的または改善された手段の必要性が、当該技術分野において存在する。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

従来技術を踏まえると、本発明の基礎となる技術的課題は、チェックポイント阻害剤療法を受けた患者における自己免疫反応、特に自己免疫大腸炎などの免疫関連有害事象の治療および／または予防のための改善されたまたは代替的手段を提供することである。

【0010】

この課題は、独立請求項の特徴によって解決される。本発明の好ましい実施形態は、従属請求項によって提供される。

40

【0011】

第1の態様において、本発明は、

－チェックポイント阻害剤療法を受け、かつ免疫関連有害事象（irAE）の症状を発症する疑いがあるか、または発症した、対象の血液試料に由来する試料の提供のステップと、

－試料に光増感剤を添加するステップと、

－試料を照射に供するステップと、を含む、方法に関する。

【0012】

50

本発明は、例えばがん性疾患によりチェックポイント阻害剤療法を受け、特に自己免疫大腸炎などのirAEをもたらしした患者が、ECPを適用することによって効果的に治療することができるという完全に驚くべき知見に基づく。実施例で使用されたECPは、基本的に、irAE患者の血液由来試料に光増感剤を添加し、試料を照射に供する方法に対応する。驚くべきことに、この方法を血液試料、特に単核細胞(MNC)を含む血液試料などの上で予め形成することは、上記試料中の免疫調節NK細胞の生成につながるが見出された。この関連において、免疫調節NK細胞「の生成」は、試料中のかかる細胞の形成を誘導または誘導するものとして理解される。言い換えると、試料中に含まれる細胞は、免疫調節NK細胞に分化またはその表現型を採用する。

【0013】

本発明の方法から生じる試料、特に試料によって含まれる誘導された免疫調節NK細胞は、irAE患者の治療に有用であることが見出された。チェックポイント阻害剤療法を受けた対象に、本発明の方法を受けたそのような試料中に含まれるそのような試料または細胞を投与することは、irAEの発生を予防するのに有効であり、対象において既に確立されているirAEの治療においても有効であることが驚くべきことに示され得る。重要なことに、本発明の方法は、チェックポイント阻害剤療法を受けた同じ対象の試料に対して実施することができる。したがって、本発明の方法から生じる細胞または試料は、血液ドナーとして機能した同じ対象に投与することができ、したがって、得られる試料は、自己由来細胞療法を表すことができる。

【0014】

本明細書で使用される場合、「チェックポイント阻害剤療法を受けた対象」という用語は、現在進行中のチェックポイント阻害剤療法を受けている対象、または、例えばirAE症状が発生した後に中止されたチェックポイント阻害剤療法を受けた対象を含む。

【0015】

本発明の方法から生じる試料または細胞を使用するこのような細胞療法は、ステロイドまたは抗TNF抗体などの他の免疫抑制療法に難治性であり、チェックポイント阻害剤治療が中止された後もirAEの症状を示し続ける、または依然として罹患し続けるirAE患者にさえ有効であることは、全く予想外であった。

【0016】

実施例に示すように、本発明の方法を受けた試料の投与の正の効果および有効性は、試料に含まれるNK細胞のNK細胞機能の調節に少なくとも部分的に起因する可能性があり、上記調節は、光増感剤の存在下での照射の結果である。したがって、本発明はまた、チェックポイント阻害剤療法を受けた対象における免疫関連有害事象(irAE)の治療および／または予防における使用のための免疫調節性NK細胞を包含する。好ましくは、免疫調節性NK細胞は、個人、好ましくはチェックポイント阻害剤療法を受け、かつirAEを発症する疑いがあるか、または発症した対象からの血液またはMNCもしくはNK細胞を本発明の方法に供することによって生成され、その後、チェックポイント阻害剤療法を受け、かつirAEを発症する疑いがあるか、または発症した、対象、好ましくはドナーである対象、を治療するために使用される。

【0017】

さらなる態様において、本発明は、
-対象の単離された血液試料に由来する試料の提供のステップと、
-試料に光増感剤を添加するステップと、
-試料を照射に供するステップと、を含む方法から得られた、免疫調節NK細胞に関する。

【0018】

本発明のこの態様は、光増感剤を添加した後に照射を受けた血液由来の試料中にNK細胞が含まれているという観察に基づき、irAEの治療および／または予防において得られた細胞を使用する際に有利な免疫調節表現型を採用する。このような有利かつ有益な特性は、この文脈において、いかなる他のNK細胞についてもこれまで観察されていない。

10

20

30

40

50

【0019】

好ましくは、本発明の対象は、ヒトである。好ましくは、本発明の血液試料および細胞は、ヒトである。

【0020】

好ましい実施形態では、本発明の免疫調節NK細胞を生成するために使用される血液試料は、チェックポイント阻害剤療法を受け、かつ免疫関連有害事象（irAE）の症状を発症する疑いがあるか、または発症した、対象に由来する。この実施形態は、細胞が上記患者に対して自己由来であり、異種細胞の移植時に生じ得る有害事象が存在しないため、特に有利である。

【0021】

本発明のさらなる態様は、チェックポイント阻害剤療法を受けた対象における免疫関連有害事象（irAE）の治療および／または予防における使用のための免疫調節NK細胞を対象とする。これは、現在進行中のチェックポイント阻害剤を受けている対象、または、例えば、irAE症状が発生した後に中止されたチェックポイント阻害剤療法を受けた対象を含む。

【0022】

好ましくは、このような治療または予防における使用のための免疫調節NK細胞は、ヒト対象の血液試料に由来する試料に光増感剤を添加し、試料を照射に供することによって生成されている。

【0023】

血液由来試料に光増感剤を添加し、試料を照射に供することは、上記試料中の免疫調節NK細胞を生成するか、または（その形成を）誘導する。

【0024】

実施形態では、光増感剤は、8-メトキシプソラレンである。さらに、実施形態では、照射は、UVA照射である。好ましい実施形態では、光増感剤は8-メトキシプソラレンであり、かつ照射はUVA照射である。

【0025】

本発明の文脈において、照射は、好ましくは、体外循環式光化学療法（ECP）システムによって予め形成される。血液試料の照射は、当業者に既知の任意の好適なシステムまたは照射デバイスを使用して行うことができる。

【0026】

実施形態では、本発明の方法は、インビトロまたはエクスピボで行われる。本明細書で使用される場合、インビボおよびエクスピボという用語は、同義的に使用される。本発明の文脈において、用語は、ヒトの体から取り出した血液由来の試料に対して行われる方法に関し、本発明の方法は、ヒトの体外の血液由来の試料に対して行われる。このために、ドナー対象の血液を体外に取り出し、これは生理学的循環系の血液を取り出すことを意味する。本明細書で使用される場合、「単離された血液試料」は、ドナーの循環系から人の体外の位置に取り出された血液（ある特定の量の血液を意味する）の試料である。

【0027】

そのような単離された血液試料を、本発明の方法の少なくとも特定のステップを実行するための体外循環式光化学療法（ECP）システムまたはアフエーシスシステムに供給または導入することができる。その中で、そのようなシステムは、対象の血液循環系と流体接続しているオンラインシステムであり得る。代替の実施形態では、方法は、オフラインで実行することができ、照射に供される血液由来試料は、ドナー対象の循環系から切断される。

【0028】

したがって、実施形態では、本発明の方法は、インビトロ方法である。本発明の方法の実施形態では、血液試料は、単離された血液試料である。実施形態では、方法はインビトロ方法であり、血液試料は単離された血液試料である。

【0029】

本明細書で使用される場合、「血液試料」という用語は、血液から生成されるMNC試料などの血液細胞試料を含む、あらゆる種類の血液由来試料を含む。

【0030】

本発明の実施形態では、対象（血液ドナーおよび／または細胞のレシピエント）は、irAEの症状を示すか、またはirAEに罹患している。さらなる実施形態では、対象はチェックポイント阻害剤療法を受けてきたが、チェックポイント阻害剤療法は、上記対象において症状および／またはirAEの徴候が生じた後に中止された。実施形態では、irAEの症状および／または徴候は、チェックポイント阻害剤療法が中止された後に対象において生じた。実施形態では、irAEの症状および／または徴候は、チェックポイント阻害剤療法が中止された後に維持された。

10

【0031】

本発明の実施形態では、チェックポイント阻害剤療法を受け、かつirAEの症状を発症する疑いがあるか、または発症した、対象が、血液ドナーとして機能する場合、血液試料の提供および／または単離は、上記実施形態に記載される時点のいずれかで行われ得る。例えば、試料単離は、irAE症状の発症の前または後に生じ得る。さらに、試料単離は、チェックポイント阻害剤療法中に、または上記療法の中止後に生じ得る。

【0032】

本発明の好ましい実施形態では、本発明の方法から生じる試料または本発明に従う使用のためのNK細胞は、チェックポイント阻害剤療法が進行している間に対象に投与される。

【0033】

好ましい実施形態では、試料単離は、irAE症状の発生の前後のいずれかで、チェックポイント阻害剤療法の進行中に生じる。実施例の方法から生じる試料または細胞は、進行中のチェックポイント阻害剤療法中に対象に試料／細胞を投与することによって、予防的または治療的に使用することができる。したがって、本発明の好ましい実施形態では、チェックポイント阻害剤療法を受けた対象は、免疫調節NK細胞を受容することができ、免疫調節NK細胞は、好ましくは自己由来であり、本明細書に記載の方法に従って血液由来試料に照射することによって生成されている一方で、チェックポイント阻害剤療法が進行している。抗がんチェックポイント阻害剤療法などのチェックポイント阻害剤療法が維持され得る一方で、患者は、本発明の細胞および／または本発明の方法から生じる細胞を受容するので、そのような実施形態は特に有利である。

20

30

【0034】

したがって、そのような実施形態では、照射された細胞の投与は、irAEの発生を防止するか、またはチェックポイント阻害剤療法を継続することができるように、irAEを寛解するかのものであるため、チェックポイント阻害剤療法は、より長い期間対象に投与することができる。本発明の方法、特に本発明の免疫調節性NK細胞から生じるかかる細胞の投与が、チェックポイント阻害剤療法の対象の抗がん応答を妨げないことが驚くべきことに示され得る。これは、irAEの既知の治療／予防措置、特にコルチコステロイドなどの免疫抑制薬の投与と比較して、重要な利点を表す。驚くべきことに、ECPを行うことは、チェックポイント阻害剤療法の抗がん効果を顕著に変えることはなく、一方、グルココルチコイド（特定のクラスのコルチコステロイド）、特にプレドニゾロンの並行投与は、チェックポイント阻害剤治療の有効性の低下を示す、より悪い転帰をもたらした。

40

【0035】

さらに、試料に光増感剤を添加し、試料を照射に供する方法を受けた（ヒト）血液由来の試料が、チェックポイント阻害剤療法を受けた対象におけるirAEの治療および／または予防に使用される実施形態では、血液由来の試料（自己由来または異種）の供給源にかかわらず、そのような方法から生じる試料または細胞の投与は、例えば、irAE症状の発症の前もしくは後、および／またはチェックポイント阻害剤療法の間、もしくはチェックポイント阻害剤療法の中止後に生じ得る。

【0036】

50

本発明の実施形態では、i r A E（血液ドナーおよび／または細胞のレシピエント）は、自己免疫疾患の症状を含み、および／または自己免疫反応によって引き起こされる。好ましい実施形態では、i r A Eは、自己免疫大腸炎を含むか、または自己免疫大腸炎である。

【0037】

実施形態では、i r A Eは、自己免疫大腸炎、自己免疫肝炎、自己免疫甲状腺炎および自己免疫皮膚炎を含む群から選択される少なくとも1つのi r A Eを含む。

【0038】

実施形態では、i r A Eは、免疫チェックポイント阻害剤関連大腸炎、免疫チェックポイント阻害剤関連肝炎、免疫チェックポイント阻害剤関連甲状腺炎、および免疫チェックポイント阻害剤関連皮膚炎を含む群から選択される少なくとも1つのi r A Eを含む。

10

【0039】

実施形態では、対象（血液ドナーおよび／または細胞のレシピエント）は、悪性黒色腫またはチェックポイント阻害剤療法によって治療可能な別のがんなどのがんに罹患している。

【0040】

実施形態では、対象は、ステロイド、コルチコステロイド、シクロスポリン、および／もしくは抗T N F抗体（例えば、インフリキシマブ）などの免疫抑制薬を受けている、かつ／または免疫抑制薬に対して難治性である。

【0041】

免疫調節NK細胞などの本明細書に記載の方法から生じた細胞の投与が、i r A E症状を治療するために投与されている免疫抑制薬に対して難治性であるi r A E患者に対する治療効果を有することは、まったく驚くべきことであった。かかる患者について、i r A Eの症状を寛解するために利用可能な有効な治療はなく、したがって、本発明は、これらの患者におけるi r A Eの治療の全く予期しない可能性を表す。

20

【0042】

実施形態では、チェックポイント阻害剤療法は、抗C T L A 4抗体および抗P D - 1抗体のうちの少なくとも1つの投与を含む。

【0043】

実施形態では、チェックポイント阻害剤療法を受けた対象におけるi r A Eの治療および／または予防における使用のための免疫調節NK細胞は、上記対象に対して自己由来である。代替的な実施形態では、NK細胞は、上記対象に対して異種であり得る。

30

【0044】

実施形態では、本発明による使用のための免疫調節NK細胞は、i r A E症状の発生時に投与される。実施形態では、細胞は、i r A E症状の発生後1、2、3、4、5、6もしくは7日または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、35、40、45もしくは50週間投与される。実施形態では、免疫調節NK細胞は、チェックポイント阻害剤療法が進行する間、またはチェックポイント阻害剤療法が中止された後に投与される。

【0045】

実施形態では、免疫調節NK細胞は、対象に少なくとも1回、好ましくは少なくとも2回、好ましくは連日で投与される。したがって、対象は、1回用量を超えるNK細胞の投与を受けることができるが、好ましくは、1日当たり1回用量を超えない投与が行われる。さらなる実施形態では、対象は、少なくとも2、3、4、または5回投与量の本発明のNK細胞を受ける。実施形態では、本発明の免疫調節NK細胞は、少なくとも8週間ごと、好ましくは2～4週間ごとに対象に投与される。

40

【0046】

本発明の一態様の文脈において開示または記載される本発明の各任意選択的または好ましい特徴は、本明細書に記載される本発明の他の態様の文脈においても本明細書に開示される。

50

【0047】

さらに、本発明はまた、以下の実施形態に関する。

【0048】

1. チェックポイント阻害剤療法を受けた対象における免疫関連有害事象（irAE）の治療および／または予防における使用のための体外循環式光化学療法（ECP）システムであって、ECPが、好ましくは8-メトキシプソラレンの投与と共に実施される、体外循環式光化学療法（ECP）システム。

【0049】

本発明は、例えばがん性疾患によりチェックポイント阻害剤療法を受け、特に自己免疫大腸炎などのirAEをもたらした患者が、ECPを適用することによって効果的に治療することができるという完全に驚くべき知見に基づく。これは、ステロイドまたは抗TNF抗体などの他の免疫抑制療法に対して難治性であり、チェックポイント阻害剤治療が中止された後もirAEの症状を示し続ける、または依然として罹患する患者においても当てはまる。

【0050】

驚くべきことに、ECP治療の正の効果および有効性は、特に、ECP後のNK細胞機能の調節から生じたことが分かった。したがって、本発明はまた、特に、チェックポイント阻害剤療法を受けた対象における免疫関連有害事象（irAE）の治療および／または予防における使用のための免疫調節性NK細胞に関し、免疫調節性NK細胞は、個人、好ましくは本発明の対象からの血液またはMNCもしくはNK細胞をECP治療に供することによって生成された。

【0051】

2. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、ECPシステムがオンラインECPシステムである、ECPシステム。

【0052】

3. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、ECPシステムがオフラインECPシステムである、ECPシステム。

【0053】

4. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、対象が、irAEの症状を示すか、またはirAEに罹患している、ECPシステム。

【0054】

5. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、チェックポイント阻害剤療法は、上記対象においてirAEの症状および／または徴候が発生した後、中止された、ECPシステム。

【0055】

6. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、irAEの症状および／または徴候は、チェックポイント阻害剤療法が中止された後に生じた、ECPシステム。

【0056】

7. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、irAEの症状および／または徴候は、チェックポイント阻害剤療法が中止された後に維持された、ECPシステム。

【0057】

8. いずれかの本発明に従う使用のためのECPシステムであって、ECP治療が、irAE症状の発生時に開始される、ECPシステム。

【0058】

9. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、ECP治療が、irAE症状の発生から1、2、3、4、5、6、もしくは7日後、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、35、40、45、もしくは50週間後に開始される、ECPシステム。

【0059】

10. いずれかの本発明に従う使用のためのECPシステムであって、ECP治療が、

10

20

30

40

50

チェックポイント阻害剤療法が進行中の間、またはチェックポイント阻害剤療法が中止された後に開始される、E C Pシステム。

【0060】

11. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、E C P治療が、少なくとも1、好ましくは少なくとも2サイクルのE C Pを、好ましくは連日で含む、E C Pシステム。

【0061】

12. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、E C P治療が、少なくとも2、3、4、または5回行われる、E C Pシステム。

【0062】

13. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、E C P治療が、少なくとも8週間ごと、好ましくは2～4週間ごとに行われる、E C Pシステム。

【0063】

14. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、i r A Eが、自己免疫疾患の症状を含む、E C Pシステム。

【0064】

15. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、i r A Eが、自己免疫反応によって引き起こされる、E C Pシステム。

【0065】

16. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、i r A Eが、自己免疫大腸炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性甲状腺炎および自己免疫性皮膚炎を含む群から選択される少なくとも1つのi r A Eを含む、E C Pシステム。

【0066】

17. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、i r A Eが、免疫チェックポイント阻害剤関連大腸炎、免疫チェックポイント阻害剤関連肝炎、免疫チェックポイント阻害剤関連甲状腺炎、および免疫チェックポイント阻害剤関連皮膚炎を含む群から選択される少なくとも1つのi r A Eを含む、E C Pシステム。

【0067】

18. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、i r A Eが、自己免疫大腸炎を含む、E C Pシステム。

【0068】

19. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、I r A Eが、自己免疫大腸炎である、E C Pシステム。

【0069】

20. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、対象が、ヒトである、E C Pシステム。

【0070】

21. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、対象が、悪性黒色腫またはチェックポイント阻害剤療法によって治療可能な別のがんなどのがんに罹患している、E C Pシステム。

【0071】

22. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、対象が、ステロイド、コルチコステロイド、シクロスポリン、および／もしくは抗T N F抗体（例えば、インフリキシマブ）などの免疫抑制薬を受けている、かつ／または免疫抑制薬に対して難治性である、E C Pシステム。

【0072】

23. 本発明に従う使用のためのE C Pシステムであって、対象が、ステロイド、コルチコステロイド、シクロスポリンおよび／または抗T N F抗体（例えばインフリキシマブ）などの免疫抑制薬に対して難治性である、E C Pシステム。

【0073】

10

20

30

40

50

24. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、チェックポイント阻害剤療法が、抗CTLA4抗体および抗PD-1抗体のうちの少なくとも1つの投与を含む、ECPシステム。

【0074】

25. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、ECPシステムが、血液照射療法を行うために使用される、ECPシステム。

【0075】

26. 本発明に従う使用のためのECPシステムであって、ECPシステムが、免疫調節分子、好ましくは、ECPシステムの膜に結合された免疫調節分子性を含み、免疫調節性分子が、対象の免疫細胞と接触する、ECPシステム。

【0076】

27. インビトロ方法であって、
ーチェックポイント阻害剤療法を受け、かつ免疫関連有害事象(irAE)の症状を発症する疑いがあるか、または発症した、対象の単離された血液試料に由来する試料の提供のステップと、
ー上記試料を体外循環式光化学療法に供するステップと、を含む、インビトロ方法。

【0077】

28. チェックポイント阻害剤療法を受け、かつ免疫関連有害事象(irAE)の症状を発症する疑いがあるか、または発症した、対象を治療する方法であって、上記対象を、ECPシステムによる血液照射療法などの体外循環式光化学療法(ECP)療法(ECP)に供することを含む、方法。

【0078】

29. チェックポイント阻害剤療法を受けた対象における免疫関連有害事象(irAE)の治療および／または予防における使用のための免疫調節NK細胞。

【0079】

30. 本発明に従う使用のための免疫調節NK細胞であって、免疫調節NK細胞が、ヒト血液試料またはヒト血液試料中に含まれる細胞を体外循環式光化学療法に供することによって生成されている、免疫調節NK細胞。

【0080】

31. 本発明に従う使用のための免疫調節NK細胞であって、NK細胞が、上記対象に対して自己由来または異種である、免疫調節NK細胞。

【0081】

32. 本発明に従う使用のための免疫調節NK細胞であって、上記対象にNK細胞を静脈内投与する、免疫調節NK細胞。

【0082】

33. 本発明に従う使用のための免疫調節NK細胞であって、NK細胞が、体外循環式光化学療法へ供する前または後に、ヒト血液試料から単離される、免疫調節NK細胞。

【0083】

本発明のチェックポイント阻害剤療法を受けた対象における免疫関連有害事象(irAE)の治療および／または予防における使用のためのECPシステムの文脈において開示されるすべての特徴はまた、本発明のインビトロ法、本発明の治療方法および本発明のチェックポイント阻害剤療法を受けた対象における免疫関連有害事象(irAE)の治療および／または予防における使用のためのNK細胞、ならびにその逆の文脈においてもまた本明細書において開示される。

(発明を実施するための形態)

【0084】

特許文献および非特許文献のすべての引用文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0085】

本明細書に開示されるのは、対象、好ましくは、チェックポイント阻害剤療法を受け、

10

20

30

40

50

かつ免疫関連有害事象（irAE）の症状を発症する疑いがあるか、または発症した、対象の血液試料に由来する試料の提供のステップと、試料に光増感剤を添加するステップと、試料を照射に供するステップと、を含む、方法である。血液試料の照射は、当業者に既知の任意の好適なシステムまたは照射デバイスを使用して行うことができる。好ましくは、照射は、体外循環式光化学療法（ECP）システムによって行われる。

【0086】

本発明はまた、チェックポイント阻害剤療法を受けた対象における免疫関連有害事象（irAE）の治療および／または予防における使用のための体外循環式光化学療法（ECP）システムに関し、ECPは、好ましくは8-メトキシプソラレンの投与と共に行われる。

【0087】

照射および体外循環式光化学療法（ECP）

光化学療法、または体外循環式光化学療法（ECP）は、血液を光増感剤で処理し、その後特定の波長の光を照射して効果を達成するアフレーションおよび光線力学療法の一形態である。例えば、バフィーコート（WBC+血小板）は、全血から分離し、8-メトキシプソラレンで化学的に処理し（収集バッグに滴下するか、または予め数回投与する）、紫外線（UVA）に曝露し、患者に戻すことができる。活性化された8-メトキシプソラレンは、曝露細胞内でDNAを架橋し、最終的には有核細胞のアポトーシスをもたらす。患者に戻された光化学的に損傷したT細胞は、T細胞の形成に細胞傷害効果を誘導するように見える。

【0088】

8-メトキシプソラレンを伴うフォトフェレーシス光化学療法は、1987年のNew England Journal of Medicine publicationの出版物（Edelson, R, et al. (1987) 「Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results」 New England Journal of Medicine. 316 (6) : 297-303.）で初めて記載された。光化学療法は、現在、米国食品医薬品局（FDA）によって皮膚T細胞リンパ腫に対して承認されている標準療法である。この治療は、移植片対宿主病の治療に有効である可能性があることが示唆されている。光化学療法はまた、他のすべての治療が無効であった場合の表皮溶解性水疱症の治療にも成功している。

【0089】

本明細書で使用されるECPは、血液照射療法を含む。実施形態では、本発明のECPおよびECPシステムは、血液照射療法および血液照射療法のためのシステムに関する。本発明の実施形態では、ECPは、血液照射療法を除くECPに関する。

【0090】

血液照射療法は、治療上の理由により血液が低レベルの赤色光（多くの場合レーザー光）に曝露される手順である。血液照射療法は、3つの方式で投与することができる。体外で、血液を引き出し、特殊なキュベットにおいて、それに照射する。この方法は、UVランプによる紫外線（UV）血液照射（UVBI）のために使用される。レーザー光は、単色であり、すなわち、光を光ファイバに取り込み、静脈内のカテーテルを介して静脈内照射を行うことができるような波長を有する。この方法は、よりシンプルで有効性がある。血液照射療法は、大血管の突起上の皮膚を介して外部にも投与される。

【0091】

静脈内または血管内レーザー血液照射（ILBI）は、任意の治療効果が循環系を通じて循環するであろうとの仮定の下、632.8nmの波長で1~3mWのヘリウム-ネオンレーザーによって生成された低レベルのレーザー光を血管チャネル、通常は前腕の静脈に送り込むことによって、血液のインビボ照明を伴う。ほとんどの場合、365、405、525、635nmの波長と2.3mWの電力が使用される。この手法は、現在、ロシアでは広く使われているが、アジアではあまり使われておらず、世界の他の地域では広く

10

20

30

40

50

使われていない。ILBIは、血流およびその輸送活性を改善することが示され、したがって、組織栄養性は、免疫系および細胞代謝に好影響を及ぼす。この問題は、懐疑の対象となる。このトピックの研究を増やすためのいくつかの需要があった。経皮療法は、多数の血管（前腕など）がある領域の壊れていない皮膚にレーザー光を適用する。皮膚は血液への障壁として作用し、低レベルのレーザーエネルギーを吸収するため、レーザーの力は、しばしば補償するために増強される。課題は、パルス化されたマトリックスレーザー光源を使用することによって解決することができる。体外照射は、静脈を介して血液を引き出し、体外に照射することに関与する紫外線血液照射にのみ使用される。がんの治療として推進されたが、1952年のJournal of the American Medical Associationのレビューおよび1970年のAmerican Cancer Societyの別のレビューでは、この治療は効果がないと結論づけられた。【0092】

10

体外循環式光化学療法（ECP）は、体外光免疫療法または光化学療法としても知られており、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）の患者に最初に使用された白血球アフェレーションに基づく療法である。具体的には、白血球変異型であるセザリー症候群に罹患している難治性CTCL患者の治療について、ECPは、1988年にFDA（米国食品医薬品局）の承認を受けた。ECP中、患者の全血は、血漿および非核細胞から白血球を分離するために、肘静脈または永久に埋め込まれたカテーテルを介して収集される。この手順のために特別に構築されたデバイスでは、収集された白血球、いわゆるバフィーコートは、患者への再注入の前に、8-メトキシプソラレンという光増感剤の存在下で紫外線A（UVA）照射に曝露される。【0093】

20

ECP手順を実行するための2つの基本的に異なる方法が記載されており、本発明によって含まれる。これらは、白血球収集およびUVA照射のために使用されるデバイスで異なる：「クローズドシステム」およびいわゆる「オープンシステム」。クローズドシステムは、Edelsonと同僚によるオリジナルの設計に基づき、FDAが承認した唯一のシステムである。オープンシステムは、様々な分離器具を組み込んだシステムであり、ほとんどがアメリカ合衆国外で使用されている。ECPは、30年以来有効な治療法であり、200万回を超える治療が実施されているが、否定的な細胞遺伝学的影響に関する報告はない。【0094】

30

ECPを開始するための適応症は、その導入以来継続的に延長された。ECP治療は、一般に患者によって良好な寛容性を有し、著しく望ましくない副作用はほとんどない。総合すると、ECPは優れた安全性プロファイルと有効性を組み合わせる。【0095】

体外循環式光化学療法（体外光化学療法とも称されることがある）は、以下を含むプロセスである：（1）患者由来の単核細胞（MNC）の収集、（2）収集されたMNC細胞の光活性化処理、および（3）処理された細胞（MNC）の患者への再注入。より具体的には、ECPは、8-メトキシプソラレンまたは「8-MOP」などの光活性化化合物と組み合わせた末梢血単核細胞の体外曝露を伴い、その後、紫外線によって光活性化され、続いて処理された単核細胞の再注入を伴う。8-MOPおよびUV放射線の組み合わせは、ECPで治療されたT細胞のアポトーシスまたはプログラムされた細胞死を引き起こすと考えられている。【0096】

40

ECP治療における（異なる疾患状態における）正確な作用機構は、完全には知られていないが、初期の理論によれば、光活性化は、8-MOPをT細胞核に含まれるDNA鎖に不可逆的に共有結合させると考えられた。光化学的に損傷したT細胞が再注入されると、細胞傷害効果が誘発される。例えば、細胞傷害性T細胞または「CD8+細胞」は、感染または損傷した細胞に曝露したときに細胞毒を放出するか、あるいはそうでなければその表面上に特定の外来分子または異常分子を担持する細胞を攻撃する。細胞毒は、損傷し

50

た細胞の膜を標的とし、標的細胞に入り、最終的には、標的細胞のアポトーシスまたはプログラムされた細胞死につながる。つまり、処理された単核細胞が体内に戻された後、免疫系は瀕死の異常な細胞を認識し、それらの細胞に対抗するために健康なリンパ球（T細胞）を生成し始める。

【0097】

上記に加えて、体外循環式光化学療法はまた、単球（単核細胞の一種）を誘導して、アポトーシスT細胞抗原を食作用させ処理することができる樹状細胞に分化させることも理論化されている。これらの活性化された樹状細胞を全身循環に再注入すると、上記のような処理されたアポトーシスT細胞抗原に対する全身細胞傷害性CD8+Tリンパ球媒介性免疫応答を引き起こし得る。他の可能な作用機構は、単核細胞のECP治療から観察されている利益、およびECPベースの療法を受けている患者に対するその後の利益の達成に

10

【0098】

最近では、ECPは、患者において免疫寛容応答をもたらす可能性があると仮定されている。例えば、移植片対宿主病の場合、アポトーシス細胞の注入は、調節T細胞の生成を刺激し、炎症性サイトカイン産生を阻害し、有効なT細胞の欠失を引き起こし、他の応答をもたらす得る。Peritt, "Potential Mechanisms of Photopheresis in Hematopoietic Stem Cell Transplantation," *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 12:7-12 (2006) を参照されたい。現在、免疫寛容応答の理論は、主要な説明の中にあるように思われるが、移植片対宿主病、ならびに他の疾患状態に対するECPの作用機構については、他の理論が存在する。

20

【0099】

ECPを実施するためのシステムとしては、例えば、Therakos, Inc., of Exton, Pa. から入手可能なUVAR XTS Photopheresis SystemおよびCellEx Photopheresis Systemが挙げられる。TherakosシステムでECPを実行するさらなる詳細は、例えば、米国特許第5,984,887号に見出すことができる。

【0100】

現在、光化学療法ーオンラインおよびオフラインのシステムおよび方法を実行するために一般的に使用される2つの方法がある。

30

【0101】

オンライン方法では、上記のTherakosデバイスなどの専用光化学療法デバイスを使用して、処理されたMNCの再注入を含む治療全体を実施する。かかるデバイスは、光化学療法を実行するためにのみ設計された「専用の」光化学療法デバイスであり、例えば、血小板、血漿、RBC、節細胞の収集および／または血漿／RBC交換プロトコルを実行するための多機能アフエーシスプロトコルを含む、病院または血液処理設定で必要とされる他の収集プロトコルを実行することができない。

【0102】

オフライン光化学療法の方法では、単核細胞を収集するために多機能性アフエーシスデバイスを使用してもよい。典型的に1つ以上の収集容器に含まれる収集されたMNCは、収集中に使用されるチューブセットから切り離されるか、またはそうでなければ分離され、それらは後に別個の照射またはUVA光デバイスで処理され、続いて処理された細胞が患者に手動で再注入される。しかしながら、このようなオフライン方法の間、細胞がアフエーシスデバイスから照射デバイス（デバイスは別の部屋または実験室に配置され得る）に移されるとき、ドナーとの通信は切断されなければならない、したがって、細胞はドナーから切り離されなければならない。したがって、処理されたMNC生成物が最終的に正しいドナーに再注入されることを確実にするために、追加のトレーサビリティ手順が必要である。

40

【0103】

50

デバイスおよびデバイス内の酵素の固定化：

本発明の実施形態では、ECPシステムは、固定化された免疫調節性分子または酵素などの他の生体分子を有するマトリックスを含むデバイスを含み得る。好ましくは、結合した分子を有するマトリックスは、本発明の文脈において血液またはMNCに曝露される。

【0104】

したがって、本明細書で使用される「マトリックス」は、血液または血漿が通過する内部材料または表面を提供する血液処理デバイスの内部の材料を指す。本発明の文脈において使用されるマトリックスは、好ましくは、固定化された免疫調節性分子または他の生体分子が結合している支持体を含む。したがって、支持体は、他の機能を果たし得るにもかかわらず、固定化された免疫調節性分子または他の生体分子の担体として機能する。

【0105】

本明細書で使用される「支持体」は、本発明による固定化された免疫調節性分子または他の生体分子が結合した「基質」または「支持体材料」として機能するマトリックスの一部を指す。このような支持体または支持体材料は、「吸着カラム」または「カラム」または「吸着カートリッジ」で使用される場合、「吸着材料」または「吸着剤」とも称されることがある。本発明による好適な支持体は、使用中の酵素の浸出がない、または無視できる程度の温度で、関連するpH範囲および温度にわたって均一、親水性、機械的および化学的に安定であり、全血および／または血漿のための良好な流動特性を有するべきであり、かつ酵素結合のための大きい表面積を提供する。

【0106】

支持体は、例えば、樹脂、膜、または不織布材料であり得る。「不織布」材料は、広義には、繊維またはフィラメントを巻き付けることによって（およびフィルムを穿孔することによって）、機械的に、熱的に、または化学的に、しかし織りまたは編み物によってではなく、一緒に接合されたシート、布地またはウェブ構造として定義される材料を指す。「樹脂」は、ゲルもしくはゲルビーズもしくは微孔性ビーズ、またはスポンジの形態をとることができる不溶性材料を指す。かかる樹脂は、天然または生体ポリマー、合成ポリマーおよび無機材料であり得る。アガロース、デキストロースおよびセルロースビーズは、一般的に用いられる天然支持体である。合成高分子または有機支持体は、主にアクリルアミド、ポリスチレンおよびポリメタクリレート誘導体に基づくが、多孔質シリカおよびガラスは、いくつかの頻繁に使用される無機支持体である。

【0107】

本発明の一実施形態によれば、樹脂は、アルギン酸塩、キトサン、キチン、コラーゲン、カラギーナン、ゼラチン、セルロース、デンプン、ペクチンおよびセファロースからなる群から選択されるポリマー、ゼオライト、セラミック、セライト、シリカ、ガラス、活性炭および炭素からなる群から選択される無機材料、またはポリエチレン（PE）、ポリオキシメチレン（POM）、ポリプロピレン（PP）、ポリ塩化ビニル（PVC）、ポリ酢酸ビニル（PVA）、ポリ塩化ビニリデン（PVDC）、ポリスチレン（PS）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリアクリレート（PAA）、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリアクリルアミド、ポリグリシジルメタクリレート（PGMA）、アクリロニトリルブタジエンスチレン（ABS）、ポリアクリロニトリル（PAN）、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリアミド、ポリアラミド、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリスルホン（PS）、ポリエーテルスルホン（PES）、ポリアリールエーテルスルホン（PEAS）、エチレン酢酸ビニル（EVA）、エチレンビニルアルコール（EVOH）、ポリアミドイミド、ポリアリールエーテルケトン（PAEK）、ポリブタジエン（PBD）、ポリブチレン（PB）、ポリブチレンテレフタレート（PBT）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）、ポリエーテルケトンケトン（PEKK）、ポリエーテルイミド（PEI）、ポリイミド、ポリ乳酸（PLA）、ポリメチルペンテン（PMP）、ポリ（p-フェニレンエーテル）（PPE）、ポリウレタン（PU）、スチレンアクリロニトリル（SAN）

10

20

30

40

50

、ポリブテン酸、ポリ（４－アリル－安息香酸）、ポリ（アクリル酸グリシジル）、メタクリル酸ポリグリシジル（PGMA）、アクリロニトリルブタジエンスチレン（ABS）、ポリジビニルベンゼン（PDVB）、ポリ（アリルグリシジルエーテル）、ポリ（ビニルグリシジルエーテル）、ポリ（ビニルグリシジルウレタン）、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、上記ポリマーのコポリマー、および官能基の導入によって修飾されたこれらのポリマーのいずれかからなる群から選択される合成ポリマーから構成される。

【0108】

固定化された免疫調節性分子または他の生体分子を本発明に従って支持体および／またはマトリックスに固定化するために、様々な既知の方法を使用することができる。このような固定化は、好ましくは、酵素を固定化するという点で特異的または選択的であるが、一方で、血液もしくは血漿またはその試料中に存在する他のタンパク質および成分（インビトロ）は、かなりの程度まで固定化されない。

【0109】

固定化された免疫調節性分子または他の生体分子の、本発明に従うデバイスで使用されるマトリックスを提供するための支持体への「固定化」は、2つの分子と一緒に保持する非共有結合または共有結合相互作用を指す。本発明の一実施形態によれば、発現は、共有結合相互作用、すなわち、共有結合された固定化された免疫調節性分子または他の生体分子を指す。非共有結合相互作用には、水素結合、荷電基間のイオン相互作用、ファンデルワールス相互作用、および非極性基間の疎水性相互作用が含まれるが、これらに限定されない。これらの相互作用のうちの1つ以上が、2つの分子の互いに結合を媒介することができる。結合は、それ以外の場合、特異的であっても、選択的であっても、または非特異的であってもよい。

【0110】

一実施形態によれば、固定化された免疫調節性分子または他の生体分子は、それを支持体上に固定化するための親和性タグを含む。親和性タグは、生成中にタンパク質を精製するため、および／または本発明のマトリックスの支持体上にそれらを固定化するために使用することができる。親和性タグは、短いポリペプチド配列または酵素と融合パートナーとして共発現される全タンパク質であり得る。異なるタイプの親和性タグが当該技術分野で周知であり、ポリヒスチジンまたはHis₆タグ、C-mycタグ、およびFLAGタグが特によく記載されており、本発明に従う酵素を支持体材料に結合させるためのオプションである。ビオチンのストレパビジンまたはアビジンへの非共有結合もまた、固定化された免疫調節性分子または他の生体分子を支持体に固定化するために使用することができる。

【0111】

本発明の別の実施形態によれば、固定化された免疫調節性分子または他の生体分子は、以下にさらに詳細に記載されるように、および／または従来技術に記載されるように、支持体に共有結合される。共有結合は、一般に、タンパク質の共有結合非部位指向性結合またはタンパク質の部位指向性結合のいずれかを含む。マトリックスの生成の基礎を形成する支持体は、化学的活性化を提供するか、または促進しなければならず、したがって、固定化された免疫調節性分子または他の生体分子の化学的カップリングを可能にする。固定化された免疫調節性分子または他の生体分子を固定化するための多くのカップリング方法は、当該技術分野で周知である。

【0112】

例えば、活性化化学は、酵素の無視できるほどの浸出をもたらす幅広いpH、緩衝条件、および温度にわたって安定であるべきである。カップリング方法は、固定化された免疫調節性分子または他の生体分子の不適切な配向、多部位結合、または立体障害を避けるべきである。マトリックスの体積当たりの酵素密度は、標的のアクセス可能性および反応を促進するように最適化することができる。

【0113】

共有結合は、アミン、アルコール、カルボン酸、アルデヒド、およびエポキシ基を含む

、共通の官能基を介して実行することができる。カルボジイミド化合物を使用して、タンパク質のカルボキシル基を活性化して、アミド結合を介して支持体表面の一級アミンへの直接のコンジュゲーションのために使用することができる。最も一般的に使用されるカルボジイミドは、水性架橋用の水溶性EDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド）および非水有機合成方法用の水不溶性DCC（N', N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド）である。

【0114】

代替的に、支持体は、リンカーおよび／またはそれに酵素を結合するための特定の官能基を担持し得る。例えば、官能基化された樹脂は、市販されており、当業者に知られている。一級アミン、スルフヒドリル、アルデヒド、ヒドロキシル、およびカルボン酸を含む広範囲のカップリング化学物質は、上記商業的支持体において入手可能である。市販の活性化樹脂の例としては、CarboLinkカップリング樹脂、Profinity（商標）エポキシ樹脂、Affi-Gel 10および15、エポキシ活性化Sepharose（商標）6B、塩化トレスル活性化アガロース、ならびにEpoxy基で官能基化されたPuroLite（登録商標）LifeTech（商標）メタクリル酸塩ポリマーが挙げられる。

【0115】

本発明の一実施形態によれば、支持体材料は、多孔質でなければならず、孔径は10～200nmの範囲である。本発明の別の実施形態によれば、支持体は、ビーズの形態をとる。さらに別の実施形態によれば、本発明による支持体は、磁気ビーズを含む。磁気ビーズは、本発明に従う酵素が固定化されているアガロースまたは他の高分子材料内に磁鉄鉱を封入することによって調製される。

【0116】

本発明の別の実施形態によれば、支持体は、膜である。親和性マトリックスの構成要素としての膜は、それらの単純さ、取り扱いの容易さ、表面積の減少、ならびにゲル、樹脂およびビーズと比較して低い拡散制限により、タンパク質精製に使用されている。膜は、中空繊維の物理的形態をとることもでき、代替的に、平板膜の物理的形態をとることもできる。一実施形態によれば、支持体は、血液透析中空繊維膜透析器を含み、フィルタは、血液透析器である。

【0117】

本発明に従うデバイスにおける支持体としての使用のための中空繊維または平板膜は、セルロース、セルロースエステル（酢酸セルロースおよび三酢酸セルロース）、ポリ（メチルメタクリレート）（PMMA）、ポリアミド（PA）、他の窒素含有ポリマー（ポリベンズイミダゾール、ポリアクリロニトリル（PAN）、ポリグリシジルメタクリレート（PGMA）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリスルホン（PS）、ポリエーテルスルホン（PES）またはポリアリールエーテルスルホン（PAES）から構成され得る。本発明に従うデバイスを提供するために有利に利用することができる中空繊維膜は、好ましくは、100～500μmの範囲の内径を有する。本発明の別の実施形態によれば、具体的には、膜支持体が上述のように血液透析膜である場合、中空繊維膜は、繊維の管腔側で本発明に従う酵素によって追加的または代替的に官能基化され、それらは、中空繊維膜の管腔を灌流する血液または血漿中の標的代謝産物と直接相互作用することができる。酵素はまた、代替的に膜の外側に固定化されてもよい。

【0118】

体外血液治療のための方法：

本発明は、患者の血液が通過する体外血液回路に位置されるように構成され、患者の血管系から血液を規定の流量で血液治療デバイスに輸送し、次に治療された血液を患者に戻すための手段を含み、さらに、血液中のADMAおよび／またはMMAのレベルを低下させるように構成されるデバイスを含む。さらに、本発明はまた、体外の血液または血液細胞治療に使用できるデバイスを含み、そのデバイスは、体外の血液回路から分離もしくは切り離されるか、または分離可能／取り外し可能であり得る。

【0119】

本発明によれば、「体外血液浄化」という表現は、好ましくは、患者の体の外で（体外）の迂回路において血液を流すことから、それらのクリアランスを通じて体液から物質を除去するプロセスを指す。上記物質は、内因性毒素（すなわち、尿毒性毒素）、外因性毒素（すなわち、エチレングリコールまたは真菌毒素）、投与される薬物、ウイルス、細菌、抗体、代謝産物およびタンパク質（すなわち、IMHA、重症筋無力症）、異常細胞（すなわち、白血病）、および過剰な水を含み得る。治療手順には、間欠的血液透析（HD、HDF、HF）および連続腎補充療法（CRRT）を含む血液透析、血液灌流、血漿交換および治療的アフェレーシスが含まれる。かかる方法は、当業者に知られており、本発明のデバイスは、それに応じて組み込むことができる。

10

【0120】

本明細書で使用される「血液」という表現は、血漿中に懸濁された赤血球、白血球、および血小板を含む、生物の血液のすべての成分を含有する全血を指す。「血漿」という表現は、約92%の水、アルブミン、ガンマグロブリン、フィブリノーゲン、補体因子、凝固因子などの7%のタンパク質、ならびに全血の一部を形成するが、もはや赤血球、白血球、血小板を含まなくなる1%のミネラル塩、糖、脂肪、電解質、ホルモン、およびビタミンからなる流体を指す。本発明の文脈において、「血漿（blood plasma）」または「血漿（plasma）」という表現は、例えば、血清などのその標準的な意味における上記定義の血漿の特定の画分を指す。

【0121】

一態様によれば、体外血液浄化回路における血流量は、20ml〜700ml／分である。本発明に従う血液治療デバイスに加えて、または血液透析器がADMAおよび／またはMMAを代謝するように構成されている場合のいずれかで、腎不全を治療するための血液透析器を含む体外回路における典型的な透析液流量は、0,5l／時間〜800ml／分の範囲である。

20

【0122】

治療用アフェレーシスでは、全血を治療することができ、または、血液は例えば遠心分離によって、または形質膜もしくはフィルタによって、その成分の画分に分割され、除去されるべき溶質を含有する画分は、患者に戻る前に具体的に治療される。

【0123】

本発明は、全血または血漿（標的タンパク質を含む）が患者の流動血液から除去され、本発明に従うデバイスまたはマトリックスと接触した後、患者に戻されるアフェレーシス治療を提供する。血液処理デバイスが全血または血漿で灌流される体外回路における典型的な血液または血漿の流量は、それぞれ30ml／分〜200ml／分、または7ml／分〜50ml／分の範囲である。

30

【0124】

一態様によれば、本発明に従う体外血液回路は、血液透析を行うように構成される。この場合、本発明によるデバイスは、例えば、本発明による標的タンパク質を固定化するように追加的に構成された血液透析器である。回路は、血液透析、血液透析濾過、血液濾過モードなど、医療ニーズに応じて異なる治療モードで操作することができる。

40

【0125】

免疫関連有害事象（irAE）

本明細書で使用される場合、「免疫関連有害事象」（irAE）という用語は、免疫チェックポイント阻害剤治療の関連で、例えばがん療法の文脈で特異的に生じる任意の副作用に関する。irAEは固有であり、従来のがん治療の関連で生じる有害事象とは異なり、典型的には、遅延発症および長期間持続を有する。irAEは、任意の臓器または系を伴う場合がある。これらの効果は、頻繁に低グレードであり、治療可能かつ可逆的である。しかしながら、いくつかの副作用は、重篤であり、永続的な障害につながる可能性がある。管理は主にコルチコステロイドおよびその他の免疫調節剤に基づいており、短期および長期の合併症の可能性を減らすために慎重に処方されるべきである。

50

【0126】

具体的には、この用語は、（自己免疫）大腸炎、（自己免疫）肝炎、（自己免疫）甲状腺炎および（自己免疫）皮膚炎などの、自己免疫疾患および自己免疫疾患の症状を含む。

【0127】

本発明におけるチェックポイント阻害剤療法の投与による *i r A E* は、特に限定されない。*I r A E* は、免疫関連であると推定される有害事象として理解されるべきである：*i r A E*（例えば、2016年4月に改訂されたOPDIVO（登録商標）静脈内注入20mg-100mgの薬物インタビューフォーム（バージョン9）、日本皮膚科学会の悪性黒色腫のための新薬の安全性委員会によって発行された2015年8月24日付の抗CTLA-4抗体、イピリムマブ（YERVOY（登録商標）の有害事象の特性および取り扱い、を参照されたい）。

10

【0128】

本発明の *i r A E* の具体的な実施形態は、間質性肺疾患、重症筋無力症、筋炎、大腸炎、1型糖尿病、肝機能障害（肝障害）、肝炎などの肺障害（例えば、自己免疫肺炎）、下垂体機能低下症または下垂体炎などの下垂体機能低下症、甲状腺機能低下症、神経障害、腎症、脳炎、副腎機能低下症などの副腎障害、重度の皮膚障害、静脈血栓塞栓症、輸液反応、乾癬、乾癬様発疹、下痢（例えば、重度の下痢）、関節リウマチ、ブドウ膜炎、上皮炎、滑液包炎、放射性角膜炎の悪化、慢性炎症性脱髄性多発性硬化症（以下、脱髄性多発性硬化症とも称する）、腸管障害、または腎炎が挙げられ、下垂体機能低下症が好ましい。

【0129】

免疫関連有害事象（*I r A E*）は、例えば、投与後8週間または8～12週間後に生じることが知られている。免疫関連有害事象は、「グレード」または「*I r A E* 評価」によって評価することができる。ここで、「*i r A E* 評価」は、疾患の重症度を表す指標であり、1～3で表される。*i r A E* 評価において、1は、「*i r A E* による追加の治療的介入を必要としない」状態を表し、2は、「*i r A E* による薬物介入などを必要とするが、入院治療を必要としないか、または治療の中断を必要としない」状態を表し、3は、「*i r A E* による入院を伴い、治療の中断を必要とする」状態を表す。「*i r A E* 評価」と「グレード」との対応関係は、各疾患によって異なる。

20

【0130】

免疫チェックポイント分子およびチェックポイント調節物質

30

本発明の文脈において、免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイント分子を調節することによって免疫細胞を活性化する薬物である。

【0131】

免疫チェックポイント分子は、免疫エフェクター細胞に提供されるシグナル（共刺激分子）を上げるか、またはシグナルを下げるかのいずれかである、免疫系内の分子である。したがって、免疫チェックポイント分子は、共刺激チェックポイント分子または共阻害チェックポイント分子に細分することができる。共刺激性チェックポイント分子には、リンパ球表面受容体であり、リンパ球エフェクター機能の活性化または刺激をもたらすことができる共刺激性リンパ球受容体が含まれる。共阻害チェックポイント分子には、リンパ球表面受容体であり、リンパ球エフェクター機能の阻害をもたらすことができる共阻害リンパ球受容体が含まれる。

40

【0132】

共刺激チェックポイント分子は、HVEM、CD27、CD40、OX40、GITR、CD137、CD28、およびICOSを含むが、これらに限定されない。

【0133】

本発明の好ましい実施形態では、共刺激リンパ球受容体という用語は、CD122を指さない。

【0134】

HVEM（ヘルペスウイルス侵入メディエーター、CD270）は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー14（TNFRSF14）としても知られており、BTL

50

Aに結合することができるTNF受容体スーパーファミリーの受容体である。

【0135】

CD27は、ナイーブT細胞の抗原特異的増殖を支持し、T細胞記憶の生成に不可欠であり、B細胞のメモリーマーカーでもある。CD27の活性は、そのリガンドであるCD70がリンパ球および樹状細胞上で一過性に利用可能であることによって支配される。CD27共刺激は、Th17エフェクター細胞機能を抑制することが知られている。CD27に対するアゴニストモノクローナル抗体CDX-1127/Varliumabは、動物モデルにおけるT細胞受容体刺激の文脈において有効であることが示されている。

【0136】

CD28は、ほぼすべてのヒトCD4+T細胞上、およびすべてのCD8 T細胞の約半分上で構成的に発現される。例えば、樹状細胞上で発現される、その2つのリガンドCD80およびCD86のうちの1つの結合は、T細胞増殖を促す。

【0137】

CD40は、抗原提示細胞を含む様々な免疫系細胞上で発現される。CD40のリガンドは、CD154としても知られるCD40Lと称され、そのリガンドとして活性化されたCD4+T細胞の表面上で一過性に発現される。CD40シグナル伝達は、樹状細胞が成熟することを「ライセンス」し、それによってT細胞活性化および分化を引き起こすことが知られている。

【0138】

4-1BB (CD137) は、CD137リガンドによって結合され、T細胞増殖をもたらす。CD137媒介性シグナル伝達は、T細胞、特にCD8+T細胞を活性化誘発性細胞死から保護することも知られている。完全ヒトIgG2アゴニストモノクローナル抗体Utomilumab (PF-05082566) は、4-1BBを標的にして、がんに対するより強力な免疫系攻撃を刺激する。

【0139】

OX40 (CD134) は、OX40L (CD252) をそのリガンドとする。OX40は、エフェクターT細胞およびメモリーT細胞の増殖を促進し、T調節細胞の分化および活性を抑制する能力でも知られている。OX40は、T細胞受容体結合後に一過性に発現されており、それが炎症性病変内の最近の抗原活性化されたT細胞に対してのみ上方制御される理由であり、これは、OX40が貴重な薬物標的である理由である。アゴニスト抗OX40モノクローナル抗体は、進行がんにおいて臨床的有用性を有することが示されている。製薬会社のAstraZenecaは、OX40を標的化した3つの薬剤：MED10562は、ヒト化OX40アゴニストであり、MED16469は、マウスOX40アゴニストであり、MED16383は、OX40アゴニストを開発している。

【0140】

GITR (グルココルチコイド誘導TNFRファミリー関連遺伝子) は、T細胞増殖を促す。GITR (GITRL) のためのリガンドは、主に抗原提示細胞で発現される。GITRに対する抗体は、Treg系統安定性の喪失を通じて抗腫瘍応答を促進することが示されている。

【0141】

ICOS (誘導性T細胞共刺激剤、CD278とも称される) は、活性化されたT細胞上で発現される。そのリガンドは、主にB細胞および樹状細胞上に発現するICOSLである。この分子は、T細胞エフェクター機能において重要であると思われる。

【0142】

共阻害チェックポイント分子は、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、TIGITおよびVISTAを含むが、これらに限定されない。

【0143】

A2AR (アデノシンA2A受容体) は、A2a受容体の活性化につながる免疫微小環境におけるアデノシンが負の免疫フィードバックループであり、腫瘍微小環境が比較的高

10

20

30

40

50

い濃度のアデノシンを有するため、がん療法における重要なチェックポイントとみなされる。

【0144】

CD276とも称されるB7-H3は、当初は共刺激分子であると理解されたが、現在では共阻害分子とみなされている。MacroGenicsは、B7-H3を標的とするFc最適化モノクローナル抗体であるMGA271 (Enoblituzumab) について研究している。

【0145】

B7-H4 (またはVTGN1) は、腫瘍細胞および腫瘍関連マクロファージによって発現され、腫瘍回避において役割を果たす。

【0146】

BTLA (BおよびTリンパ球減衰器、CD272とも称される) は、HVEM (Herpesvirus Entry Mediator) をそのリガンドとする共阻害受容体である。BTLAの表面発現は、ヒトCD8+T細胞のナイーブからエフェクター細胞表現型への分化の間に徐々に下方調節されるが、しかしながら、腫瘍特異的ヒトCD8+T細胞は、高レベルのBTLAを発現する。

【0147】

CTLA-4 (細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4、CD152とも称される) は、Treg細胞上で発現され、T細胞増殖を制御する役割を果たす。CTLA-4 (CD152) は、免疫チェックポイントとして機能するタンパク質受容体であり、活性化されたT細胞によって発現され、T細胞に阻害シグナルを伝達する。CTLA4は、T細胞共刺激タンパク質CD28と相同であり、両方の分子は、抗原提示細胞上でCD80およびCD86 (それぞれB7-1およびB7-2) に結合する。CTLA-4は、CD28よりもCD80およびCD86に対する親和性および結合活性が高い。CTLA4は、阻害シグナルをT細胞に伝達する。CTLA4に対するアンタゴニスト抗体としては、イピリムマブおよびトレメリムマブが挙げられる。

【0148】

IDO (インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ) は、免疫抑制特性を有するトリプトファン異化酵素である。もう一つの重要な分子は、TDO、トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼである。IDOは、T細胞およびNK細胞を抑制し、Tregおよび骨髄由来抑制細胞を生成および活性化し、腫瘍血管新生を促進することが知られている。

【0149】

KIR (キラー細胞免疫グロブリン様受容体) は、ナチュラルキラー細胞上のMHCクラスI分子の受容体である。Lirilumabは、KIRに対するモノクローナル抗体である。

【0150】

LAG-3 (リンパ球活性化遺伝子-3) は、Tregに対する作用およびCD8+T細胞に対する直接的効果によって免疫応答を抑制するように働く。

【0151】

PD-1 (プログラム死1、またはCD279) は、免疫系の下方調節およびT細胞の炎症活性の抑制による自己耐性の促進において重要な役割を果たす細胞表面受容体である。PD-1は、2つのリガンド、PD-L1およびPD-L2を有する。PD-1を標的化する利点は、腫瘍微小環境において免疫機能を回復することができることである。PD1のリガンドであるPD-L1は、いくつかのがんにおいて高度に発現され、T細胞による抗がん免疫応答の阻害をもたらす可能性がある。PD-1受容体を標的とするいくつかのがん免疫療法剤が開発されており、アンタゴニスト抗体のニボルマブ (Opdivo - Bristol Myers Squibb)、ペンブロリズマブ (Keytruda、MK-3475、Merck)、ピディリズマブ (CT-011、Cure Tech)、およびBMS-936559 (Bristol Myers Squibb) が挙げられる。アテゾリズマブ (MPDL3280A、Roche) およびアベルマブ (Merck

10

20

30

40

50

K G a A、D a r m s t a d t, G e r m a n y & P f i z e r) の両方は、P D - 1 のリガンドである P D - L 1 に対して指向されるモノクローナル抗体である。

【0152】

T I M - 3 (T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3) は、活性化ヒト C D 4 + T細胞上で発現し、T h 1 および T h 1 7 サイトカインを調節する。T I M - 3 は、そのリガンドであるガレクチン-9 との相互作用時に細胞死を引き起こすことによって、T h 1 / T h 1 7 機能の負の調節因子として機能する。

【0153】

V I S T A (T細胞活性化のV-ドメインI g 抑制剤) は、腫瘍内の白血球上での V I S T A の一貫した発現が、V I S T A の遮断が広範囲の固形腫瘍にわたって有効であることを可能にし得るように、造血細胞上で主に発現されるタンパク質である。

10

【0154】

T I G I T (I g および I T I M ドメインを有するT細胞免疫受容体、別名 W U C A M および V s t m 3) は、いくつかのT細胞およびナチュラルキラー細胞に存在する免疫受容体であり、T細胞媒介性免疫を調節する。T I G I T は、高い親和性で D C およびマクロファージ上で C D 1 5 5 と結合し、より低い親和性で C D 1 1 2 と結合し得る。

【0155】

本発明の共阻害性リンパ球受容体は、P D - 1、C T L A - 4、T I M - 3、L A G - 3、T I G I T、B T L A または V I S T A を含む。本発明の共刺激性リンパ球受容体は、O X 4 0、4 - 1 B B、G I T R、C D 2 7、H V E M、C D 2 8、または C D 4 0 を含む。

20

【0156】

受容体の阻害剤は、それぞれの受容体によるシグナルの生成を防止する。したがって、共阻害性リンパ球受容体の阻害剤は、それぞれの受容体の活性化を防止し、それによって阻害性シグナルの生成を防止する分子である。逆に、受容体の活性化剤は、それぞれの受容体によるシグナルの生成を誘導し、共刺激リンパ球受容体の活性化剤は、刺激シグナルの生成をもたらす。

【0157】

チェックポイント調節物質は、免疫チェックポイント分子の活性を刺激または阻害することによって、免疫チェックポイント分子の活性を妨げる分子である。

30

【0158】

可溶性チェックポイント調節物質は、自由に拡散することができ、例えば、細胞膜に結合されないか、または細胞内に留まらない分子である。

【0159】

本発明の意味でのチェックポイント阻害剤は、リンパ球刺激チェックポイント調節物質を含み、これは、共刺激チェックポイント分子の活性化を通じて、または共阻害チェックポイント分子の阻害を通じてのいずれかのリンパ球、好ましくはエフェクターT細胞の活性化をもたらす分子である。さらに、可溶性リンパ球刺激チェックポイント調節物質には、膜結合免疫チェックポイント分子の活性化を妨げる分子、例えば、それぞれの免疫チェックポイント分子の可溶性形態が含まれる。

40

【0160】

チェックポイント調節物質は、免疫チェックポイント分子の活性を妨害または調節するそれぞれの機能を有する天然に生じる分子または操作された分子であり得る。チェックポイント調節物質として、例えば、アゴニストまたはアンタゴニストを有する免疫チェックポイント分子に対する抗体または抗体断片活性、および免疫チェックポイント分子のリガンドまたは修飾リガンドが挙げられる。

【0161】

免疫細胞：

本明細書に記載される免疫細胞は、対象における免疫応答に関与する生体細胞に関する。免疫細胞は、好ましくは、T細胞、B細胞、樹状細胞、顆粒球、先天性リンパ球 (I L

50

C)、巨核球、単球／マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、血小板、赤血球（RBC）および／または胸腺細胞から選択される。

【0162】

「免疫細胞」という用語は、血液中に含まれるMNCを含み、これは、末梢血単核細胞（PBMC）とも称され得る。PBMCは、丸い核を有する任意の末梢血細胞を含み、主にリンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）および単球からなるが、赤血球および血小板は、核を有さず、顆粒球（好中球、好塩基球、および好酸球）は多葉核を有する。ヒトでは、リンパ球は、PBMC集団の大部分を占め、次いで単球であり、樹状細胞の割合はわずかである。これらの細胞は、血液の層を分離する親水性多糖であるフィコール、および血漿の上層、続いてPBMCの層、ならびに多形核細胞（好中球および好酸球など）および赤血球の底部画分を分離する勾配遠心分離を使用して全血から抽出することができる。多形核細胞は、赤血球を溶解することによってさらに単離することができる。好塩基球は、より密度の高い画分およびPBMC画分の両方において見出されることがある。

【0163】

T細胞またはTリンパ球は、細胞媒介性免疫において中心的な役割を果たすリンパ球（白血球のサブタイプ）の一種である。これらは、細胞表面上のT細胞受容体の存在によって、B細胞およびナチュラルキラー細胞などの他のリンパ球と区別することができる。T細胞のいくつかのサブセットは、各々異なる機能を有する。T細胞サブタイプとしては、Tヘルパー1型（Th1）細胞、Tヘルパー2型（Th2）細胞、Tヘルパー9型（Th9）細胞、Tヘルパー17型（Th17）細胞、Tヘルパー22型（Th22）細胞、濾胞ヘルパーT（Tfh）細胞、調節T（Treg）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、ガンマデルタT細胞、CD8+細胞傷害性Tリンパ球（CTL）が挙げられるが、これらに限定されない。T細胞のさらなる非限定的な実施形態としては、胸腺細胞、未成熟Tリンパ球、成熟Tリンパ球、静止Tリンパ球、サイトカイン誘導キラー細胞（CIK細胞）、または活性化Tリンパ球が挙げられる。サイトカイン誘導キラー（CIK）細胞は、典型的には、CD3-およびCD56-陽性の非大規模組織適合複合体（MHC）制限付きナチュラルキラー（NK）様Tリンパ球である。T細胞は、CD4+T細胞、細胞傷害性T細胞（CTL、CD8+T細胞）、CD4+CD8+T細胞、CD4CD8-T細胞、またはT細胞の任意の他のサブセットであり得る。

【0164】

本発明は、特に、チェックポイント阻害剤療法、好ましくは細胞療法を受けた対象における免疫関連有害事象（irAE）の治療および／または予防における使用のための免疫調節NK細胞（免疫調節NK細胞とも称され得る）に関する。

【0165】

免疫調節性NK細胞は、先天性リンパ球細胞（ILC）の特定の形態である。ILCは、リンパ系統（リンパ球）に属するが、B細胞またはT細胞受容体を欠くため、抗原特異的な方法では応答しない先天性免疫細胞の群である。この比較的新しく記載された細胞群は、異なる生理機能を有し、そのいくつかはヘルパーT細胞に類似しているが、細胞傷害性NK細胞も含む。それによれば、これらは、保護免疫ならびに恒常性および炎症の調節において重要な役割を果たす。ナチュラルキラー（NK）細胞は、適応免疫系の細胞傷害性T細胞に類似する細胞傷害性自然エフェクター細胞である。それらは、血液、臓器、リンパ組織全体に分布し、末梢血リンパ球の約15%を占める。NK細胞は、腫瘍監視およびウイルス感染細胞の迅速な排除において役割を果たす。それらは、MHCクラスIの欠損した「自己」シグナルを必要とせず、抗体の非存在下でストレス細胞を認識することができ、適応免疫系よりもはるかに迅速に反応することを可能にする。ナチュラルキラー（NK）細胞は、がんに対する宿主免疫において重要な役割を果たす。これに応答して、がんは、NK細胞攻撃を逃れるか、または欠陥NK細胞を誘導する機構を発達させる（Cheng M et al. Cell Mol Immunol. 2013 May; 10(3): 230-52. doi: 10.1038/cmi.2013.10. Epub 2013 Apr 22）。

【0166】

本発明の免疫調節NK細胞は、好ましくは、低発現（または下方調節発現）またはCD16、特にCD56^{dim} NK細胞上で特徴付けられる。CD16は、FcRγIII、強力なサイトカイン産生を誘導することができる活性化NK細胞受容体である。CD16の脱落／下方調節は、自己免疫を防止するためのNK細胞の免疫調節機構であり得る。CD16下方調節は、NK細胞応答を調節し、抗体およびT細胞依存性経路の両方の免疫恒常性の維持に寄与する。さらに、本発明の免疫調節NK細胞は、GM-CSF、IFN-γ、TNFおよび／またはIL-2の低発現を示すことができる。

【0167】

実施形態では、試料中の免疫調節NK細胞の生成または誘導は、例えば、フローサイトメトリー、遺伝子発現、および／またはタンパク質存在量の質量分析によって、本発明の方法を実施する前後の試料中のNK細胞の表現型および集団分布を比較することによって測定することができる。例えば、照射後のCD16高NK細胞からCD16低NK細胞への移行は、免疫調節表現型の誘導を示す。さらに、NK細胞集団におけるGM-CSF、IFN-γ、TNFおよび／またはIL-2発現における減少は、免疫調節NK細胞の誘導も示すであろう。当業者は、試料中の異なるNK細胞集団を同定するための好適な方法およびプロトコルを認識している。例えば、血液由来の試料において、総NK細胞集団は、好ましくは、フローサイトメトリーによって、CD45-陽性、CD14-陰性、CD3-陰性、CD19-陰性およびCD56-陽性細胞集団として定義および識別され得る。この集団内では、例えばCD16、GM-CSF、IFN-γ、TNFおよび／またはIL-2発現を決定することによって、免疫調節NK細胞のさらなる同定および定量化を行うことができる。免疫調節NK細胞は、好ましくはCD56に対して陽性であるが、CD56の比較的低い発現レベル（「dim」発現）を示す。

【0168】

免疫調節NK細胞のさらなる特徴および定義は、当該技術分野で十分に確立されており、当業者に既知であるか、または当業者によって識別され得る複数の研究およびレビュー記事の対象である。

【0169】

「免疫調節性機能」という用語は、免疫系の任意の構成要素の機能、作用もしくは状態の変化もしくは調節を誘発する分子もしくは細胞の機能または特性に関する。

【0170】

細胞療法は、典型的には、患者の血液から単離された免疫細胞の投与を伴う。このように使用可能な細胞型は、ナチュラルキラー細胞、リンホカイン活性化キラー細胞、細胞傷害性T細胞、単球、マクロファージ、顆粒球、および樹状細胞であるが、これらに限定されない。樹状細胞療法は、樹状細胞に腫瘍抗原を提示させることによって抗腫瘍応答を誘発する。樹状細胞は、リンパ球に抗原を提示し、リンパ球は抗原を活性化し、抗原を提示する他の細胞を殺すようにプライミングする。

【0171】

本発明の治療適用

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、治療または療法のために選択されるヒトまたは非ヒト動物を意味する。治療または予防を必要とする対象または患者などの対象は、動物、脊椎動物、哺乳動物、げっ歯類（例えば、モルモット、ハムスター、ラット、マウス）、マウス（例えば、マウス）、イヌ（例えば、イヌ）、ネコ（例えば、ネコ）、ウマ（例えば、ウマ）、霊長類、サル（例えば、サルまたは類人猿）、サル（例えば、マーモセット、ヒヒ）、類人猿（例えば、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、テナガザル）、またはヒトであり得る。「動物」、「哺乳動物」などという用語の意味は、当該技術分野で周知であり、例えば、Wehner und Gehring (1995; Thieme Verlag) から推測することができる。本発明の文脈において、特に、動物は、経済的、農学的、または科学的に重要な治療を受けることが想定される。好ましくは、対象／患者は、哺乳動物である。より好ましくは、対象／患者は、ヒトである。

【0172】

本発明の実施形態では、チェックポイント阻害剤療法を受けた対象は、悪性黒色腫またはチェックポイント阻害剤療法によって治療可能な別のがんなどのがんに罹患する。

【0173】

本発明の文脈において、「がん」という用語は、がんが固形腫瘍の形成と関連しているかどうか、またはがん細胞が固形腫瘍を形成していないかどうかに関係なく、特定の白血病の場合と同様に、すべての種類のがんの治療に関する。

【0174】

がんは、身体のあるあらゆる部分に影響を及ぼす可能性があり、異常な細胞増殖および増殖によって引き起こされる疾患の群を含む。これらの増殖細胞は、周囲の組織に侵入する、および／または転移を形成する身体他の部分に広がる可能性を有する。世界では、2012年に1400万人のがん新規患者と820万人のがん関連死がある（World Cancer Report 2014）。がんの大部分は、タバコの使用、肥満、および感染症などを伴う環境シグナルによって引き起こされるが、約5〜10%が遺伝的症例である。がんは、起源の細胞に基づいてサブカテゴリーに分類することができる。最も一般的なサブカテゴリーは、上皮細胞由来のがん、結合組織由来の肉腫およびリンパ腫、ならびに造血細胞由来の白血病である。がんは、様々な局所および全身症状と関連しており、多くの場合、治療することはできない。新たながん患者およびがん関連死が多いことを踏まえ、新たな治療戦略が求められる。

【0175】

本発明によるがんは、白血病、肉腫、黒色腫およびがんを含む、哺乳動物に見られるすべてのタイプのがんまたは新生物または悪性腫瘍を指す。固形腫瘍および／または液体腫瘍（白血病またはリンパ腫など）のいずれかが治療され得る。

【0176】

黒色腫としては、例えば、尖弁黒色腫、メラニン欠乏性黒色腫、良性若年性黒色腫、Cloudman黒色腫、S91黒色腫、Harding-Passey黒色腫、若年性黒色腫、レンチゴ悪性黒色腫、悪性黒色腫、結節性黒色腫、外陰部黒色腫、および表面的に広がる黒色腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【0177】

白血病としては、急性非リンパ球性白血病、慢性リンパ性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T細胞白血病、白血病性白血病、白血病性白血病、基底膜性白血病、芽球性白血病、ウシ白血病、慢性骨髄球性白血病、皮膚白血病、胚性白血病、好酸球性白血病、Gross白血病、有毛細胞白血病、血芽球性白血病、血球芽球性白血病、組織球性白血病、幹細胞性白血病、急性単球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ性白血病、リンパ性白血病、リンパ性白血病、リンパ肉腫細胞白血病、肥満細胞白血病、巨核芽球性白血病、微小骨髄芽球性白血病、単球性白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄球性白血病、骨髄性顆粒球性白血病、骨髄性単球性白血病、Naegeli白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、前骨髄球性白血病、リーダー細胞白血病、シリングの白血病、幹細胞白血病、亜白血病性白血病、および未分化細胞白血病が含まれるが、これらに限定されない。

【0178】

肉腫としては、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色腫、粘液肉腫、骨肉腫、アバネシーの肉腫、脂肪肉腫、脂肪肉腫、胞巣状軟部肉腫、エナメル芽細胞肉腫、ブドウ状肉腫、クロロマ肉腫、絨毛がん、胚性肉腫、ウィルムス腫瘍肉腫、子宮内膜肉腫、間質性肉腫、ユーイング肉腫、筋膜肉腫、線維肉腫、巨細胞肉腫、顆粒球肉腫、ホジキンリンパ腫、特発性多発性色素性出血性肉腫、B細胞の免疫芽球性肉腫、リンパ腫、T細胞の免疫芽球性肉腫、ジェンセン肉腫、カボジ肉腫、クッパー細胞肉腫、血管肉腫、白質肉腫、悪性間葉肉腫、傍骨肉腫、網状肉腫、ラウス肉腫、血清嚢胞性肉腫、滑膜肉腫、および毛細血管拡張性肉腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【0179】

がんとしては、腺房がん (acinar carcinoma)、腺房がん (acinous carcinoma)、腺様嚢胞がん、腺様嚢胞がん、がん腺腫、副腎皮質のがん、肺胞がん、肺胞細胞がん、基底細胞がん (basalcell carcinoma)、基底細胞がん (carcinoma basocellulare)、類基底細胞がん、基底扁平上皮がん、細気管支肺胞がん、細気管支がん、気管支原性がん、大脳様がん、胆管細胞がん、絨毛がん、コロイドがん、コメドがん、コーパスがん、クリブリフォームがん、キュイラスがん、皮膚がん、円柱状がん、円柱状細胞がん、管がん、がん腫デューラム、胚性がん、脳様がん、類表皮がん、がん上皮アデノイド、外方増殖性がん腫、潰瘍がん、線維性がん、ゼラチン状がん、膠状がん、巨細胞がん (giantcell carcinoma)、巨細胞がん (carcinoma gigantocellulare)、腺がん、顆粒膜細胞がん、毛母細胞がん、血様細胞がん、肝細胞がん、Hurthle細胞がん、硝子がん、高腎がん、乳児胚性がん、上皮内がん、表皮内がん、上皮内がん、Krompecherがん、Kulchitzky細胞がん、大細胞がん、レンズ状がん (lenticularcarcinoma)、レンズ状がん (carcinoma lenticulare)、脂肪腫性がん、リンパ上皮がん、髓様がん、髓様がん、メラニン性がん、軟がん腫、粘液性がん腫、粘液性がん腫、粘液細胞がん、粘表皮がん、がん腫粘液、粘液がん、がん性粘液腫、鼻咽頭がん、オート麦細胞がん、骨がん、類骨がん、乳頭がん、門脈周囲がん、前浸潤がん、棘細胞がん、髓質様がん、腎臓の腎細胞がん、予備細胞がん、がん肉腫、シュナイダーがん、硬性がん、陰嚢がん、印環細胞がん、単純がん、小細胞がん、ソラノイドがん、球状細胞がん、紡錘細胞がん、がん性海綿状がん、扁平上皮がん、扁平上皮がん、ひも状がん、がん腫性毛細血管拡張症、がん腫性毛細血管拡張症、移行上皮がん、結節性がん、塊茎がん、いぼ状がん、および絨毛がんが挙げられるが、これらに限定されない。

【0180】

追加のがんとしては、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳がん、卵巣がん、肺がん、横紋筋肉腫、原発性血小板増加症、原発性マクログロブリン血症、小細胞肺腫瘍、原発性脳腫瘍、胃がん、結腸がん、悪性膵臓インスリン腫、悪性カルチノイド、膀胱がん、前がん性皮膚病変、精巣腫瘍、リンパ腫、甲状腺がん、食道がん、泌尿生殖器がん、悪性高カルシウム血症、子宮頸がん、子宮内膜がん、副腎皮質がん、および前立腺がんが挙げられるが、これらに限定されない。

【0181】

いくつかの実施形態では、「腫瘍」は、限定するものではないが、前立腺腫瘍、膵臓腫瘍、扁平上皮がん、乳房腫瘍、黒色腫、基底細胞がん、肝細胞がん、胆管血管細胞がん、精巣腫瘍、神経芽細胞腫、神経膠腫または多形性神経膠芽細胞腫などの悪性星状細胞腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜がん、肺がん、卵巣腫瘍、子宮頸部腫瘍、骨肉腫、棒状体／平滑筋肉腫、滑膜肉腫、血管肉腫、ユーイング肉腫／PNET、および悪性リンパ腫を含むものとする。これらには、原発性腫瘍および転移性腫瘍（血管化および非血管化の両方）が含まれる。

【0182】

本明細書で使用される場合、「治療」または「療法」は、概して、所望の薬理学的効果および／または生理学的効果を得ることを意味する。効果は、例えば、特定の疾患もしくは症状を有する対象のリスクを低減させることによって、疾患および／もしくは症状を完全にもしくは部分的に予防することを考慮して予防的であってもよく、または、疾患および／もしくは該疾患の有害作用を部分的もしくは完全に治癒させることを考慮して、治療的であり得る。本発明において、「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患または状態の任意の治療、例えば以下の治療 (a) ～ (c) を含む：(a) 患者における疾患、状態または症状の発症の予防、(b) 状態の症状の阻害、すなわち、症状の進行の予防、(c) 状態の症状の改善、すなわち、疾患または症状の退縮の誘導。

【0183】

本明細書で使用される場合、「投与すること」という用語は、対象に組成物を含有する細胞もしくは液体または組成物を提供することを意味し、限定されないが、医療専門家による投与および自己投与を含む。組成物、物質、化合物、または薬剤を対象に投与するこ

10

20

30

40

50

とは、当業者に既知の様々な方法のうちの1つを使用して行うことができる。例えば、化合物または薬剤は、静脈内、動脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、皮下、眼内、舌下、経口（摂取による）、鼻腔内（吸入による）、脊髄内、脳内、および経皮（吸収による、例えば、皮膚管を通じて）投与することができる。化合物または薬剤はまた、充電可能もしくは生分解可能な高分子デバイス、または化合物もしくは薬剤の持続的、遅い、もしくは制御された放出を提供する他のデバイス、例えば、パッチもしくはポンプ、もしくは製剤によって適切に導入することもできる。投与は、例えば、1回、複数回、および／または1回以上の長期間にわたって実施され得る。

【0184】

本発明は、治療上有効な数の細胞、特に本発明の免疫調節性NK細胞を対象の血流に導入することによる患者の治療を包含する。本明細書で使用される場合、「対象の血流に「細胞」を導入すること」は、限定されないが、注射を介して対象の静脈または動脈の1つにそのような細胞を導入することを含むものとする。かかる投与は、例えば、1回、複数回、および／または1回以上の長期間にわたって実施され得る。単回注射が好ましいが、場合によっては経時的に繰り返し注射（例えば、毎週、毎月、毎四半期、毎半年、または毎年）が必要であり得る。このような投与は、好ましくは、CD34-陰性細胞と薬学的に許容される担体との混合物を使用して実施される。薬学的に許容される担体は、当業者に周知であり、0.01~0.1M、好ましくは0.05Mのリン酸緩衝液または0.8%の生理食塩水、ならびに一般的に使用される独自の凍結保存培地を含むが、これらに限定されない。投与はまた、例えば、症候性臓器または組織に近接する対象の身体の領域に注射することによって局所的に行われてもよい。

【0185】

さらに、かかる薬学的に許容される担体は、水溶液または非水溶液、懸濁液、および乳剤であってよく、最も好ましくは水溶液であり得る。水性担体としては、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール／水溶液、乳剤および懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲルおよび固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養補充剤、リンゲルデキストロースなどの電解質補充剤、リンゲルデキストロースに基づくものなどが挙げられる。静脈内投与に一般的に使用される流体は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., p. 808, Lippincott Williams & Wilkins (2000)で見出される。防腐剤および他の添加剤、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどもまた、存在し得る。

【0186】

一実施形態では、治療上有効な数の細胞が投与される。これは、組み合わせた免疫療法として、本発明のNK細胞または治療用免疫細胞のいずれかに関することができる。本明細書で使用される場合、「治療上有効な細胞数」は、以下の量および量の範囲を含むが、これらに限定されない：(i) 約 1×10^2 ~約 1×10^8 個の細胞/kg体重、(ii) 約 1×10^3 ~約 1×10^7 個の細胞/kg体重、(iii) 約 1×10^4 ~約 1×10^6 個の細胞/kg体重、(iv) 約 1×10^4 ~約 1×10^5 個の細胞/kg体重、(v) 約 1×10^5 ~約 1×10^6 個の細胞/kg体重、(vi) 約 5×10^4 ~約 0.5×10^5 個の細胞/kg体重、(vii) 約 1×10^3 個の細胞/kg体重、(viii) 約 1×10^4 個の細胞/kg体重、(ix) 約 5×10^4 個の細胞/kg体重、(x) 約 1×10^5 個の細胞/kg体重、(xi) 約 5×10^5 個の細胞/kg体重、(xii) 約 1×10^6 個の細胞/kg体重、および(xiii) 約 1×10^7 個の細胞/kg体重。想定されるヒト体重としては、約5kg、10kg、15kg、30kg、50kg、約60kg、約70kg、約80kg、約90kg、約100kg、約120kgおよび約150kgが挙げられるが、これらに限定されない。これらの数値は、CD34+造血幹細胞の移植からの前臨床動物実験およびヒト試験ならびに標準プロトコルに基づく。単核細胞(CD34+細胞を含む)は、通常、1:23000~1:300000のCD34-

陰性細胞を含有する。これらの細胞数は、本発明のNK細胞に適用され得る。

【0187】

本開示はまた、本明細書に記載のECPシステムおよびその構成要素、ならびに本発明のインビトロ方法および治療方法を実施するための材料、ならびに本発明のNK細胞を調製および単離するための材料のキット、パッケージ、およびマルチコンテナユニット、ならびに他の材料も含む。

【0188】

図

本発明は、以下の図によってさらに説明される。これらは本発明の範囲を限定することを意図するものではないが、本明細書に記載の本発明のより大きい例示のために提供される本発明の態様の好ましい実施形態を表す。

【図面の簡単な説明】

【0189】

【図1-1】難治性自己免疫大腸炎は、ECPに応答し、免疫調節NK細胞の増殖につながる。(a)異なる治療による経時的(x軸)な共通毒性基準(y軸)による患者の下痢の重症度を示す。(b)粘膜浮腫および潰瘍を示す免疫チェックポイント阻害剤関連大腸炎の初期診断からの大腸内視鏡画像(左パネル)およびH&E染色生検切片(右パネル)。(c)自己免疫大腸炎の徴候を示さない成功したECP治療後の大腸内視鏡画像(左パネル)およびH&E染色生検切片(右パネル)。結腸陰窩は、顆粒球浸潤、アポトーシスまたは陰窩損失を伴わない規則的な形態を示す。

【図1-2】難治性自己免疫大腸炎は、ECPに応答し、免疫調節NK細胞の増殖につながる。(d)ECPの開始前および開始後8週間の患者の末梢リンパ球区画を可視化するtSNEプロット。(e)ECP治療の前後の相対的なNK細胞数。

【図1-3】難治性自己免疫大腸炎は、ECPに応答し、免疫調節NK細胞の増殖につながる。(f)UMAPによって可視化された健康な年齢適合ドナー(HD、n=5)およびECP開始後53週目および75週目の患者のNK細胞(単一/生/CD45^{pos}/CD14^{neg}/CD3^{neg}/CD19^{neg}/CD56^{pos}として定義される)におけるCD16、CD56およびCD57の発現強度。FlowSOMクラスター化されたNK細胞サブセットは、右側の2つのプロットに重ねられている。

【図1-4】難治性自己免疫大腸炎は、ECPに応答し、免疫調節NK細胞の増殖につながる。(g)CD56^{dim}成熟NK細胞上のCD16のMFI(マーカー発現中央値、値範囲:0~1)。HD(n=5)、ボックスプロットのひげは、HDデータセットの最小値および最大値を表す。(h)補足書付録に記載の抗PD1抗体誘発性irAEのモデルにおける、NK細胞(マウス当たり 4×10^4 個または 4×10^5 個のNK用量)の有無にかかわらず、T細胞(Tc)を注射したマウスの生存率。 $**p=0.003$ 、 $***p<0.0001$ 。

【図2-1】(a)各時点の1000個の確率的に選択されたCD45⁺リンパ球(FSC/SSCによって定義されるリンパ球)を、指示されたマーカーの発現と共に表示するtSNEプロット。(b)各注釈付き母集団のマーカー発現中央値(値範囲:0~1)を示すヒートマップ。

【図2-2】(c)ECP治療前後のNK細胞の絶対数値。(d)ECP治療前後のB細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、およびCD4⁻CD8⁻T細胞の相対数。(e)ECP治療前後のB細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、およびCD4⁻CD8⁻T細胞の絶対数。(f)UMAPによって可視化したHD(n=5)および53週目および75週目の患者におけるNK細胞(単一/生/CD45^{pos}/CD14^{neg}/CD3^{neg}/CD19^{neg}/CD56^{pos}として定義される)における指示されたマーカーの発現強度。

【図2-3】(g)FlowSOMクラスタリングによって定義される注釈付きNK細胞サブセットのマーカー発現中央値(値範囲:0~1)を示すヒートマップ。(h-j)健康な年齢適合ドナー(HD)および患者のCD56^{bright}CD16^{dim}成熟NK細胞

細胞、 $CD56^{dim}$ 成熟NK細胞および $CD57^{dim}$ 末端分化NK細胞上の指示されたマーカーのMFI（マーカー発現中央値、値範囲：0-1）（ECP開始後53週目および75週目）。HD（ $n=5$ ）、ボックスプロットのひげは、HDデータセットの最小値および最大値を表す。

【図3-1】（a）～（d）健康な年齢適合ドナー（HD）および患者（ECP開始後53週目および75週目）の $CD56^{bright}$ NK細胞、 $CD56^{dim}$ NK細胞、 $CD4^{+}$ メモリーT細胞、 $CD4^{+}$ ナイーブ細胞、および $CD8^{+}$ T細胞内のサイトカイン発現細胞の割合。HD（ $n=5$ ）、ボックスプロットのひげは、HDデータセットの最小値および最大値を表す。

【図3-2】（a）～（d）健康な年齢適合ドナー（HD）および患者（ECP開始後53週目および75週目）の $CD56^{bright}$ NK細胞、 $CD56^{dim}$ NK細胞、 $CD4^{+}$ メモリーT細胞、 $CD4^{+}$ ナイーブ細胞、および $CD8^{+}$ T細胞内のサイトカイン発現細胞の割合。HD（ $n=5$ ）、ボックスプロットのひげは、HDデータセットの最小値および最大値を表す。

【図4】（a）患者T細胞を $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ マウスに単独で、またはNK細胞と共に養子移入し、抗PD-1抗体での治療による免疫チェックポイント阻害剤関連自己免疫を誘導する実験モデル。（b）（a）に示すように、患者TおよびNK細胞注射後15日目の $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ マウスから単離した肝臓、皮膚、肺および結腸の組織病理学的好中球およびリンパ球浸潤スコア。

【図5】（a）患者由来細胞の注射なしで抗PD-1抗体で治療した $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ マウスの治療スキーム（陰性対照）。（b）（a）に示すように、治療開始後15日目に、 $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ マウスから単離した肝臓、肺、皮膚、および結腸の好中球浸潤スコア。（c）（a）に記載したように治療した $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ マウスの生存。

【図6-1】（a）治療スケジュール：示されているように、DSS（3%）、抗PD1およびECPでマウスを治療した。（b）示されているように、未治療、またはDSS（3%）、単独でもしくはECPと組み合わせた抗PD1で治療したマウスの重量曲線。

【図6-2】（c）群当たり5匹のマウスにおいて定量化した結腸長。パネルBに示すような群。（d）群当たり1匹のマウスの代表的な結腸。パネルBに示すような群。

【図6-3】（e）パネルBに示す群の結腸の代表的なHE染色切片。（f）パネルBに示す群の結腸の組織病理スコア。

【図7-1】（a）治療スケジュール：マウスにB16黒色腫細胞を静脈内に注射し、その後、示されるように抗PD1、プレドニゾロンまたはECPで治療した。

【図7-2】（b）B16黒色腫細胞を静脈内に注射し、その後抗PD1、プレドニゾロンまたはECPで治療したマウスの生存。

【実施例】

【0190】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明される。これらは本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、本明細書に記載の本発明のより大きな例示のために提供される本発明の態様の好ましい実施形態を表す。

【0191】

ここでは、イピリムマブ／ニボルマブ誘発性大腸炎を罹患している患者で、複数の免疫抑制薬に難治性であり、免疫調節ナチュラルキラー（NK）細胞の増殖と同時に体外循環式光化学療法（ECP）後に完全奏効を達成した患者を報告する。

【0192】

実施例の結果

29歳の男性患者は、転移性黒色腫をイピリムマブおよびニボルマブで治療された。2回投与後、患者は皮膚炎、甲状腺炎、肝炎、大腸炎を発症した。大腸炎は、生検で同定された肉眼的粘膜潰瘍ならびに上皮内アポトーシスおよび陰窩損失に基づいて診断された（図1a、b）。皮膚炎、甲状腺炎、および肝炎は、イピリムマブ／ニボルマブおよびコル

10

20

30

40

50

チコステロイド治療を中止した後に解消したが、患者は今後20週間以内に3回の大腸炎エピソードを経験した（CTC-AEIII-III°）。これらを、コルチコステロイド（ECPの合計23週間前）、インフリキシマブ（ECPの2回の単回投与18週間前および15週間前）、およびシクロスポリン（ECPの14週間前、図1aおよび表1）で治療した。

【0193】

持続的な反応がなかったため、患者はECPを受けた。その後の8ヶ月間に、2～4週間ごとに2サイクルのECPを連日で受けた。ECPは、寛容性が高く、完全奏効をもたらした（図1a）。免疫抑制は、症状のリバウンドを伴わずに漸減した。大腸内視鏡検査により大腸炎の継続的寛解を確認した（図1c）。免疫チェックポイント阻害剤治療は、irAEの最初の徴候時に中止され、再開されることはなかった。

【0194】

ECP治療前および治療中の複数の時点で、末梢血白血球コンパートメントを分析した。我々は、免疫調節表現型（図1f、g）を用いて、NK細胞（図1d～e、図2a～j）の4倍の増加を観察した。また、複数の炎症促進性サイトカインは、年齢適合した健康なドナーと比較して患者において低かった（図3a～e）。NK細胞が自己免疫を調節するという考え方を支持し、患者のNK細胞の養子移入は、ヒトT細胞および抗PD-1抗体治療によって引き起こされたマウスirAEモデルにおいて、用量依存的にirAEを防止した（図1hおよび図4a、b）。対照実験は、罹患率が患者由来のT細胞によって媒介されることを確認した（図5）。

【0195】

ECPは、移植片対宿主病（GVHD）⁴の治療のための確立された療法であり、GVHD患者のNK細胞の増加につながる⁵。irAE治療におけるECPの安全性および有効性に関するデータは、現在のところ不足している。この症例報告は、ECPが、保護NK細胞集団の増殖を通じて、難治性チェックポイント阻害剤関連大腸炎の効率的な療法であり得ることを示唆している。

【0196】

ECPは、抗黒色腫効果をブロックすることなく、免疫媒介性有害事象を減少させる

上記の結果（図1～5）に基づいて、ECPは、抗黒色腫効果をブロックすることなく、免疫媒介性有害事象を減少させ、次いで、irAEのインビボモデルにおいてこれを試験することを目標とした。大腸炎を誘発するために、先の報告に従って（19）マウスを3% DSSおよび抗PD1で治療した（図6A）。治療は、大腸炎の発症と一致するマウスの体重を減少させ、体重減少は、ECP治療によって減少した（図6B）。ECP治療はまた、抗PD1のみで治療した群と比較して、結腸長を増加させた（図6C、D）。結腸長は、免疫療法誘発性大腸炎の重症度の代理パラメータであることが報告された（19）。減少した大腸炎重症度に一致して、我々は、抗PD1のみで治療した群と比較して、ECPで治療したマウスの結腸壁における好中球の浸潤の減少を観察した（図6E、F）。これらの所見は、ECPがマウスにおける抗PD1誘導性大腸炎を低下させることを示す。

【0197】

ECPの免疫調節性効果が抗腫瘍活性の喪失に関連しているかどうかを理解するために、次に、抗PD1単独で、またはグルココルチコイドプレドニゾンもしくはECPと組み合わせて、黒色腫を有するマウスを治療した（図7A）。我々は、プレドニゾンが、抗PD1のみで治療した群と比較して、黒色腫を有するマウスの生存を減少させることを観察した（図7B）。対照的に、抗PDおよびECPで治療した群は、抗PD1のみで治療した群と同等の転帰を有した（図7B）。これらの所見は、ECPが、抗PD1治療によって誘導される抗黒色腫応答に干渉しないことを示す。

【0198】

実施例の考察

メカニズムの考察：NK細胞は、抗炎症活性を含む様々な異種免疫学的機能を発揮する

10

20

30

40

50

。GVHDのマウスモデルでは、NK細胞の転写は、インタクトなTGF- β シグナル伝達に依存していた生存率を改善した⁶。別の前臨床GVHD研究において、NK細胞は、パーフォリンおよびFasリガンド媒介性の同種反応性T細胞増殖の減少およびT細胞アポトーシスの増加を誘導した⁷。c-Ki $t^{-/-}$ CD27 $^{-/-}$ CD11b $^{+}$ 集団を、移植片対白血病（GVL）効果を妨げることなくGVHDを制御することができる特定のエフェクターNK細胞サブセットとして同定した⁸。ヒトでは、GVH方向の同種異種HCTにおけるキラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）リガンドのミスマッチは、NK細胞によって媒介されたGVHDのリスクを低下させた⁹。

【0199】

ECPは、GVHDに対する効率的な治療である。広範囲の慢性GVHDに対するECP中のNK細胞の増加は、以前に観察されている¹⁰。急性GVHDを有する患者は、より強力なNKG2DおよびCD62L発現を有するCD56 bri NKサブセットのより高い頻度を有する¹¹。同研究では、慢性cGVHDを有する患者において、CD57およびCD11bのより高い発現を有するCD56 $^{-}$ CD16 $^{+}$ NK細胞が増加した。ECPは、NK細胞集団を、特化した抗ウイルスおよび抗白血病CD57 $^{+}$ NKG2C $^{+}$ CD56 dim サブセットの保護を伴う、より免疫調節表現型に移行させた¹¹。我々は、類いの機構が、irAEに対するNK細胞の保護効果に関与している可能性があるかと仮定する。患者におけるNK細胞コンパートメントを、年齢および性別に一致した健常対照のNK細胞コンパートメントと比較した場合、特にCD56 dim NK細胞において、CD16発現の下方調節を観察した。CD16は、FcR γ IIII、強力なサイトカイン産生を誘導することができる活性化NK細胞受容体である。以前の研究は、CD16の脱落が、自己免疫を予防するための免疫調節機構である可能性があることを示している¹²。CD16下方調節は、NK細胞応答を調節し、抗体およびT細胞依存性経路の両方の免疫恒常性の維持に寄与する¹³。この仮説を支持すると、GM-CSF、IFN- γ 、TNF、およびIL-2の発現は、対照群と比較して、患者のNK細胞において低かった。

【0200】

実施例で使用方法

ECP手順：

体外循環式光化学療法を、メトキシサレン（Uvadex（著作権））を投与して、Therakos CellEx光化学療法システム上で行った。2つの手順を連日で行い、各手順中に1500mlの血液を処理した。我々は、ドイツのフライブルクにあるAlbert Ludwigs Universityの倫理委員会の承認（プロトコル番号300/16）後、ヘルシンキ宣言に従って書面によるインフォームドコンセントの後、すべてのヒト試料を収集した。

【0201】

IrAEのマウスモデル

T細胞を、製造業者の指示に従ってPan T細胞単離キット（Miltenyi Biotec）で陰性選択を使用して、患者の末梢血から単離した。NK細胞を、NK細胞単離キット、ヒト（Miltenyi Biotec）を製造業者の指示に従って使用して、患者の末梢血から単離した。Rag2 $^{-/-}$ IL2rg $^{-/-}$ マウスに、 4×10^4 または 4×10^5 個のNK細胞の有無にかかわらず、 3×10^5 個のT細胞を静脈内に注入した。注入後1日目～22日目まで、マウスを週2回、8mg/kg体重抗PD-1抗体（クローンJ43）で、および週1回、1mg/kg体重LPSで治療し、いずれも腹腔内注入によって適用した（図4a）。ヒトT細胞注射後15日目に収集した皮膚、肝臓、結腸および肺の切片をヘマトキシリン-エオシンで染色し、経験豊富な病理学者によりリンパ球および好中球浸潤、陰窩膿瘍、ならびにアポトーシス細胞^{14, 15}を含むヒトirAEの組織病理的特徴付けに基づいてスコア付けされた。すべての動物試験は、ドイツのフライブルクにあるAlbert-Ludwigs Universityの実験動物の使用とケアに関する大学の施設レビュー委員会によって承認されていた（プロトコル承認番号：G17-049、X13-07J、X15-10A）。

【0202】

フローサイトメトリー

ECP療法中およびECP療法後のリンパ球系列集団のモニタリングのために、患者の末梢血リンパ球を単離し、日常診断の一部として、CD45、CD19、CD3、CD4、CD8、CD16、CD56、およびHLA-DRに対する抗体の標準パネルで染色した。データをFlowJo (V10) で補償し、リンパ球をエクスポートし、R環境を使用した¹⁷。tSNEおよびFlowSOMクラスタリングを、前述のように行った¹⁶。

【0203】

多パラメータNK細胞表現型およびサイトカイン分析のために、末梢血リンパ球を、密度勾配培地 (Lymphoprep、STEMCELL Technologies) を製造業者の指示に従って使用して単離した。解凍した末梢血リンパ球を表S2に列挙した抗体で染色した。Zombie Aqua Fixable Viabilityキット (Biolegend) を、生/死の識別のために使用した。サイトカインの産生のために、細胞を、GolgiPlug (BD Biosciences) の存在下で4時間、50 ng/mlのPMA (Axon Lab) および500 mg/mlのイオノマイシン (Sigma) で刺激した。BD Cytotfix/Cytopermキット (BD Biosciences) を製造業者のプロトコルに従って使用して、細胞内染色を行った。Auroraフローサイトメーター (Cytex) 上でデータを取得、FlowJo (FlowJo V10.6.1, LLC) ソフトウェアを使用して補償した。図に指定された細胞集団をエクスポートし、R環境を使用して解析した¹⁷。データを、記載されるように、FlowSOMクラスタリングのために処理した¹⁶。次元数縮小のために、UMAPパッケージを使用した¹⁸。

【0204】

統計

統計解析は、GraphPad Prism Lab Software V7.0を用いて行った。2つの群の比較は、両側の対応のない学生t検定によって実施した。生存期間の差 (カプラン・マイヤー生存期間曲線) は、マンテル・コックス (ログランク) 検定を使用して評価した。別途示されない場合、データは、平均値±SEMとして提示される。P値<0.05は、有意であるとみなした。

【0205】

実施例の表

【表1】

表1. 疾患および治療の経過。

エピソード	ECP前の時点 (週)	最大下痢重症度 (CTC-AE)	エピソードの初期での治療	エピソード中に追加された新しい治療
1	20	3	メチルプレドニゾン 0.3 mg/kg BW (以前に自己免疫肝炎に与えられた)	メチルプレドニゾン 2 mg/kg BW インフリキシマブ 5 mg/kg BW
2	16	3	メチルプレドニゾン 0.1 mg/kg BW	プレドニゾン 1 mg/kg BW インフリキシマブ 5 mg/kg BW シクロスポリンA 3 mg/kg BW
3	2	3	シクロスポリンA 1.25 mg/kg BW プレドニゾン 7.5 mg abs	ECP

【0206】

患者は、ECP開始の20週間前に最初の大腸炎のエピソードを有していた。その時点

で、患者は以前の免疫チェックポイント阻害剤関連肝炎、甲状腺炎、および皮膚炎のためにステロイドで3週間治療を受けていた。ステロイドの漸減中に大腸炎を発症した。したがって、ステロイド投与量を増加させ、応答が不十分であったため、インフリキシマブ $5 \text{ mg} / \text{kg BW}$ を1回投与した。症状は、治まった。ステロイドの漸減時に、患者は、ECP開始の16週間前に2回目の大腸炎のエピソードを経験した。患者は、増加した用量のメチルプレドニゾロンおよび2回目の用量のインフリキシマブで治療された。下痢はこの療法に難治性であり、その結果としてシクロスポリンAが添加された。症状は、再び治まった。シクロスポリンA用量が減少するにつれて、患者は大腸炎の第3のエピソードを有した。ここで、ECP治療を開始した。ECP開始から2週間後、患者は正常な排便頻度を有していた。ECP開始から8週間後にシクロスポリンA治療を中止して、ECP開始から12週間後にコルチコステロイド治療を中止したところ、何らかの症状のリバウンドはなかった。ECPを合計32週間実施した。最後のECPから11ヶ月のフォローアップで、患者は、irAEおよび黒色腫の両方の徴候に関して完全寛解を維持した。

【表2-1】

表2. ヒト細胞によるフローサイトメトリーに使用される抗体。

抗原	蛍光色素	クローン	製造業者
CD16	BUV495	3G	BD
CD14	BUV563	M5E2	BD
CD45RO	BUV615	UCHL1	BD
CD3	BUV661	UCHT1	BD
CD45	BUV805	HI-30	BD
NKp46	BV421	9E2	Biolegend
CD56	BV480	NCAM16.2	BD
CD8	BV570	RPA-T8	Biolegend
CD4	BV711	OKT4	Biolegend
CD4	APC-Cy7	RPA-T4	BD
CD94	BV786	HP-3D9	BD
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1	Biolegend
TIGIT	PE	MBSA43	eBioscience
CD62L	PE-Cy5	DREG-56	BD
KLRG1	PE-Cy7	13F12F2	ThermoScientific
NKG2D	APC	1D11	Biolegend
NKG2C	AF488	134591	R&D
CD19	BUV737	SJ25C1	BD
CD19	APC-Vio770	REA675	Miltenyi
IL-2	BV711	MQ1-17H12	Biolegend
TNF	BV785	Mab11	Biolegend

【表 2 - 2】

IFN ガンマ	PE-Cy7	4S.B3	eBioscience
GM-CSF	PE	BVD2-21C11	BD

【0207】

参考文献

1. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015;373:23-34.
2. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2017;377:1345-56.
3. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015;372:2006-17.
4. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease-Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*;2017;377:2167-79.
5. Ni M, Wang L, Yang M, et al. Shaping of CD56 (bri) Natural Killer Cells in Patients With Steroid-Refractory/Resistant Acute Graft-vs.-Host Disease via Extracorporeal Photopheresis. *Front Immunol* 2019;10:547.
6. Asai O, Longo DL, Tian ZG, et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1998;101:1835-42.
7. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood* 2010;115:4293-301.
8. Meinhardt K, Kroeger I, Bauer R, et al. Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft-versus-leukemia-and reducing graft-versus-host-effects. *Oncoimmunology* 2015;4:e981483.
9. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.
10. Alcindor T, Gorgun G, Miller KB, et al. Im

10

20

30

40

50

munomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2001;98:1622-5.

11. Ni M, Wang L, Yang M, et al. Shaping of CD56 (bri) Natural Killer Cells in Patients With Steroid-Refractory/Resistant Acute Graft-vs.-Host Disease via Extracorporeal Photopheresis. *Front Immunol* 2019;10:547.

10

12. Romee R, Foley B, Lenvik T, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood* 2013;121:3599-608.

13. Goodier MR, Lusa C, Sherratt S, Rodriguez-Galan A, Behrens R, Riley EM. Sustained Immune Complex-Mediated Reduction in CD16

Expression after Vaccination Regulates NK Cell Function. *Front Immunol* 2016;7:384.

20

14. Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, et al. Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 2006;24:2283-9.

15. Johncilla M, Misdraji J, Pratt DS, et al. Ipilimumab-associated Hepatitis: Clinicopathologic Characterization in a Series of 11 Cases. *Am J Surg Pathol* 2015;39:1075-84.

16. Brummelman J, Haftmann C, Nunez NG, et al. Development, application and computational analysis of high-dimensional fluorescent antibody panels for single-cell flow cytometry. *Nat Protoc* 2019;14:1946-69.

30

17. Team RDC. A language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing 2010.

18. McInnes L, Healy J, Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *arXiv* 6, 03426v0 3422 (2018).

40

19. Perez-Ruiz E, Minute L, Otano I, Alvarez M, et al. Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. *Nature*. 2019 May;569(7756):428-432.

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

ーチェックポイント阻害剤療法を受け、かつ免疫関連有害事象 (irAE) の症状を発症する疑いがあるか、または発症した、対象の血液試料に由来する試料の提供のステップ

50

と、

- －前記試料に光増感剤を添加するステップと、
- －前記試料を照射に供するステップと、を含む、方法。

(項目 2)

前記試料に光増感剤を添加し、前記試料を照射に供することにより、前記試料中の免疫調節NK細胞を生成するか、または（その形成を）誘導する、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記光増感剤が、8-メトキシプソラレンであり、かつ／または前記照射が、UVA照射である、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4)

前記対象が、irAEの症状を示すか、またはirAEに罹患している、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5)

前記対象においてirAEの症状および／もしくは徴候が生じた後に、前記チェックポイント阻害剤療法が中止された、または前記チェックポイント阻害剤療法が中止された後にirAEの症状および／もしくは徴候が生じた、かつ／または前記チェックポイント阻害剤療法が中止された後にirAEの症状および／もしくは徴候が維持された、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6)

前記irAEが、自己免疫疾患の症状を含み、かつ／または自己免疫反応によって引き起こされる、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記irAEが、自己免疫大腸炎を含む、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

前記対象が、悪性黒色腫またはチェックポイント阻害剤療法によって治療可能な別のがんなどのがん罹患している、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

前記対象が、ステロイド、コルチコステロイド、シクロスポリン、および／もしくは抗TNF抗体（例えば、インフリキシマブ）などの免疫抑制薬を受けている、かつ／または免疫抑制薬に対して難治性である、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 10)

前記チェックポイント阻害剤療法が、抗CTLA4抗体および抗PD-1抗体のうちの少なくとも1つの投与を含む、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 11)

- －対象の単離された血液試料に由来する試料の提供のステップと、
- －光増感剤を前記試料に添加するステップと、
- －前記試料を照射に供するステップと、を含む方法から得られた、免疫調節NK細胞。

(項目 12)

前記血液試料が、チェックポイント阻害剤療法を受け、かつ免疫関連有害事象(irAE)の症状を発症する疑いがあるか、または発症した、対象に由来する、先行項目のいずれか一項に記載の免疫調節NK細胞。

(項目 13)

チェックポイント阻害剤療法を受けた対象における免疫関連有害事象(irAE)の治療および／または予防における使用のための免疫調節NK細胞。

(項目 14)

前記免疫調節NK細胞が、ヒト対象の血液試料に由来する試料に光増感剤を添加し、前記試料を照射に供することによって生成されている、先行項目のいずれか一項に記載の使用のための免疫調節NK細胞。

(項目 15)

前記NK細胞が、前記対象に対して自己由来であり、かつ／または前記NK細胞は、チ

10

20

30

40

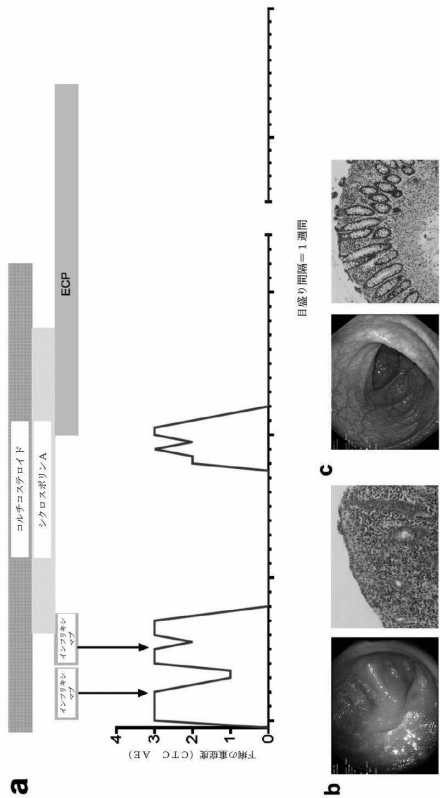
50

エックポイント阻害剤療法が進行中である間に、前記対象に投与される、項目 1 3 または 1 4 に記載の使用のための免疫調節 N K 細胞。

【図面】

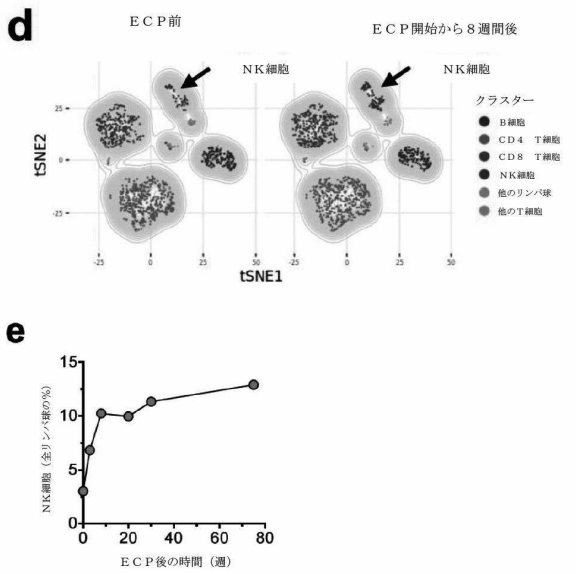
【図 1 - 1】

【図 1】



【図 1 - 2】

【図 1】 (続き)



10

20

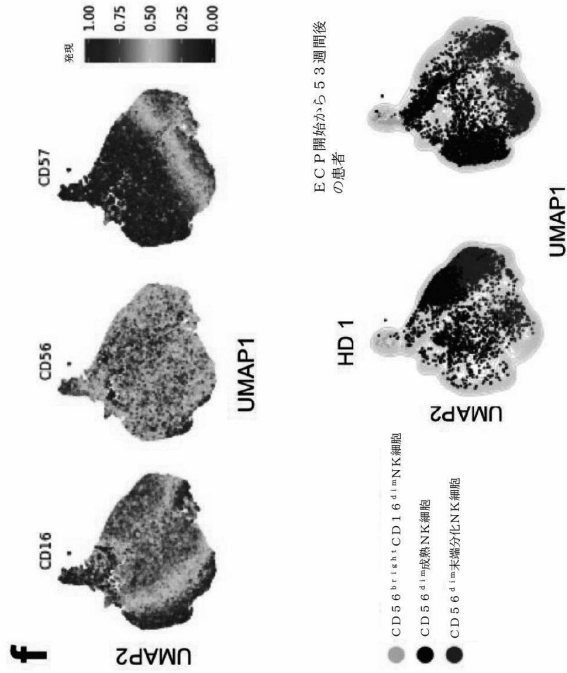
30

40

50

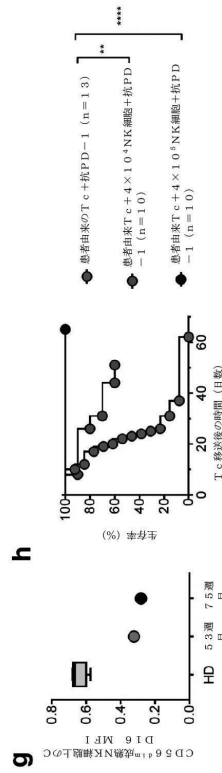
【図 1 - 3】

【図 1】 (続き)



【図 1 - 4】

【図 1】 (続き)

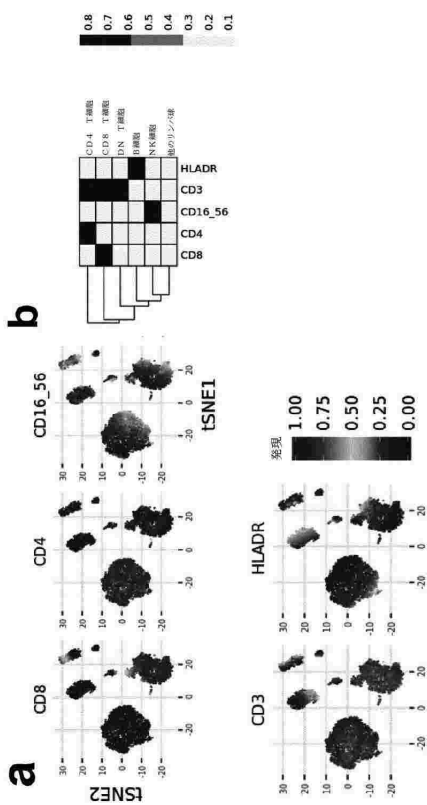


10

20

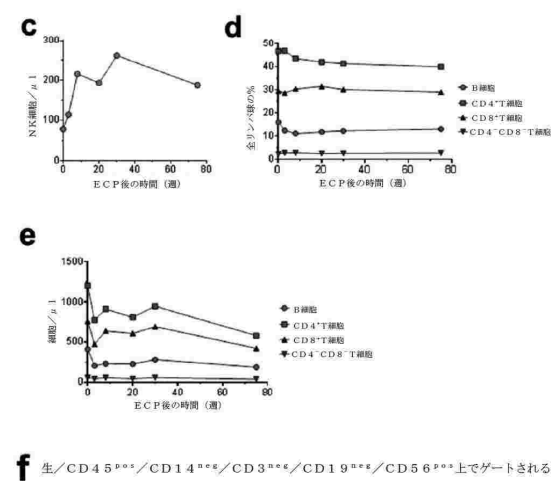
【図 2 - 1】

【図 2】



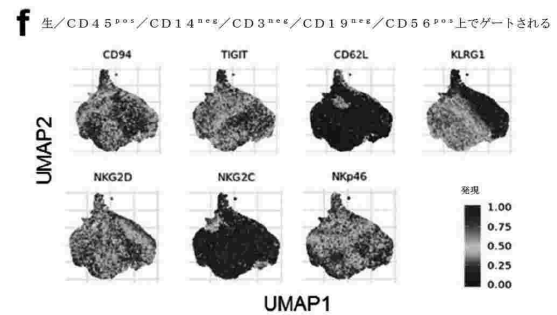
【図 2 - 2】

【図 2】 (続き)



30

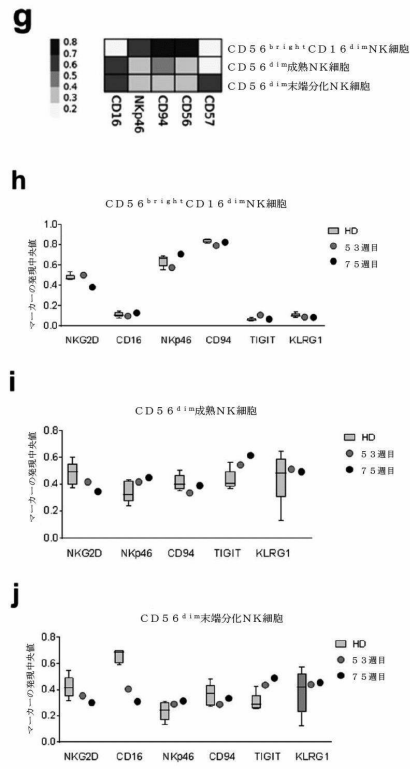
40



50

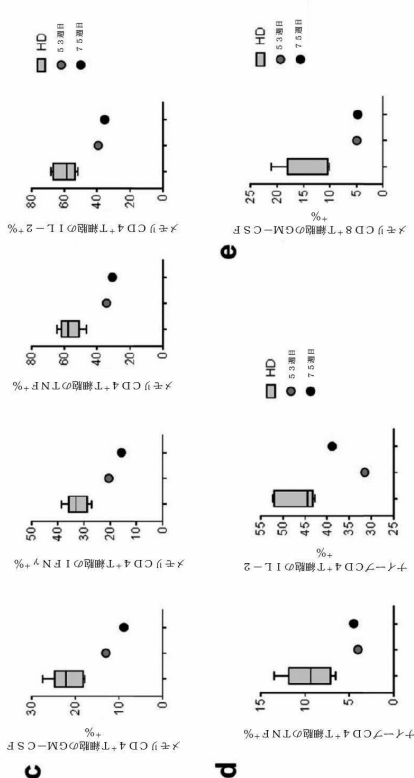
【図 2 - 3】

【図 2】 (続き)



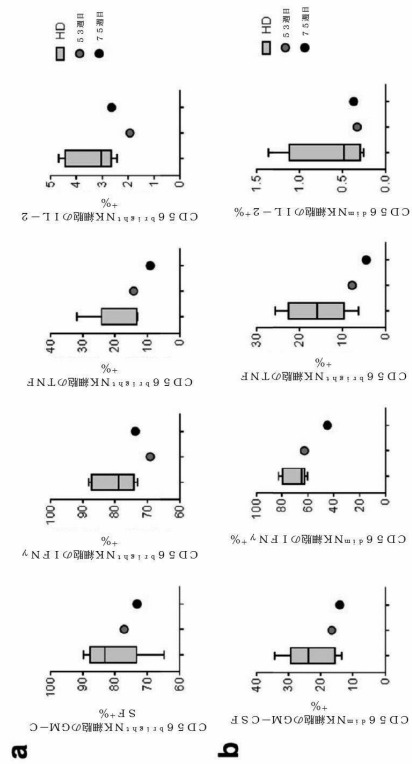
【図 3 - 2】

【図 3】 (続き)



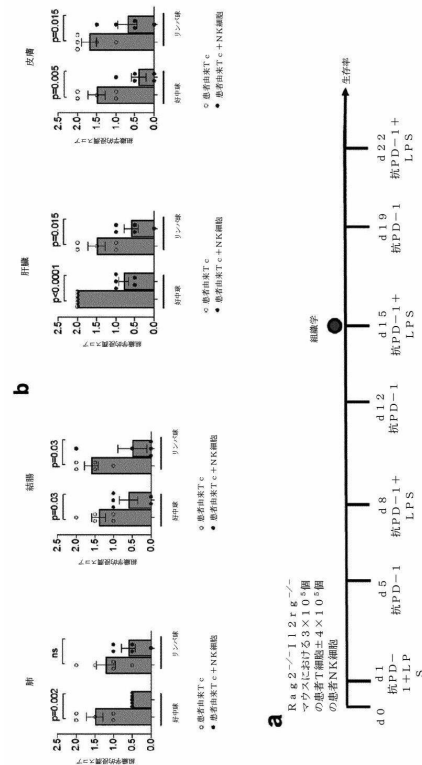
【図 3 - 1】

【図 3】



【図 4】

【図 4】



10

20

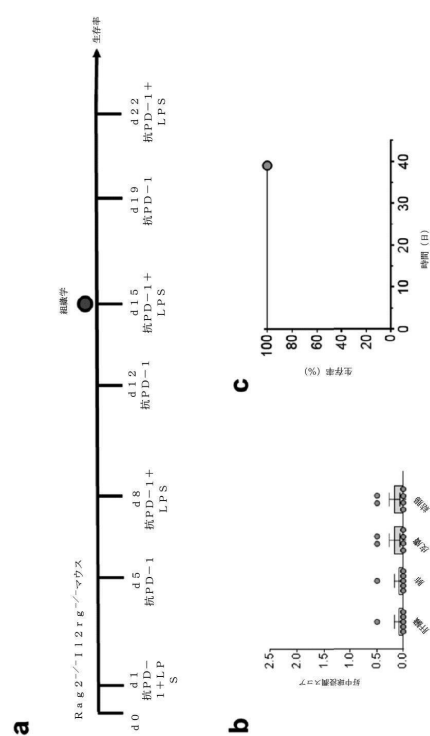
30

40

50

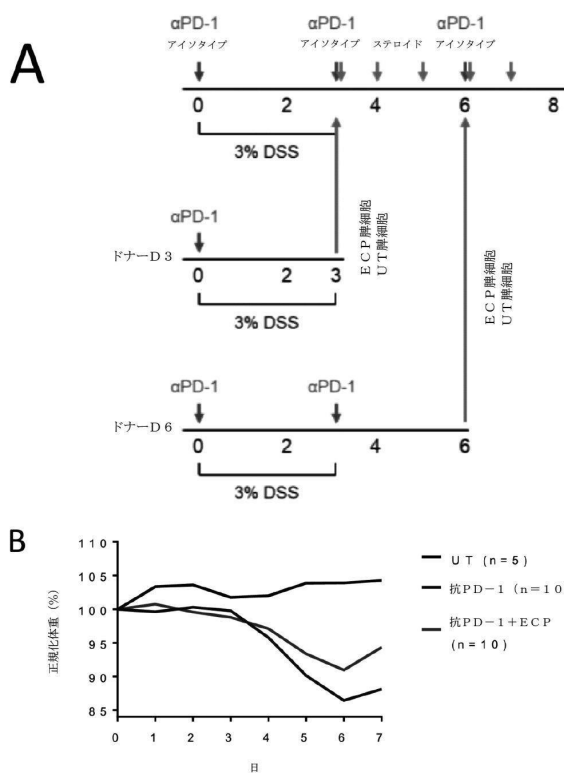
【図 5】

【図 5】



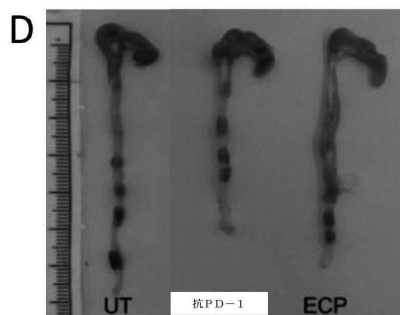
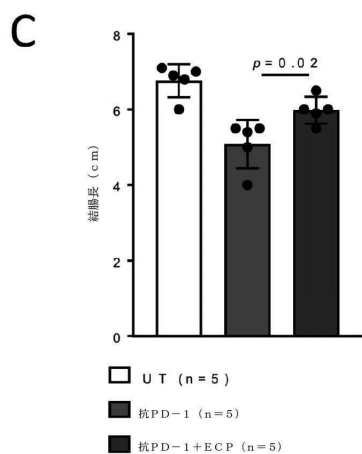
【図 6 - 1】

【図 6】



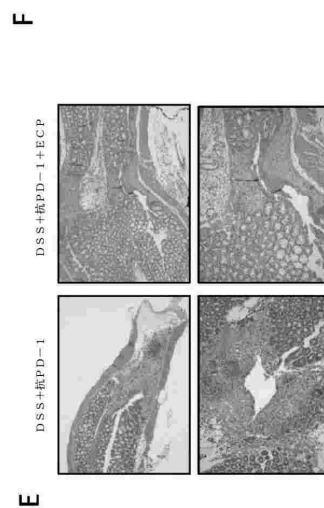
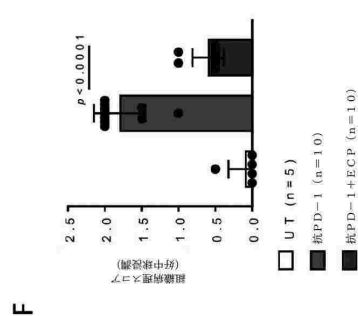
【図 6-2】

【図6】(続き)



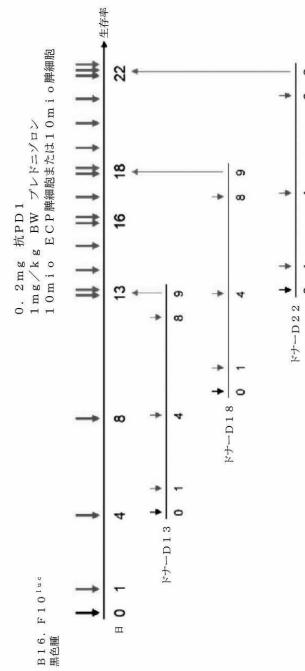
【図 6-3】

【図6】 (続き)



【図 7 - 1】

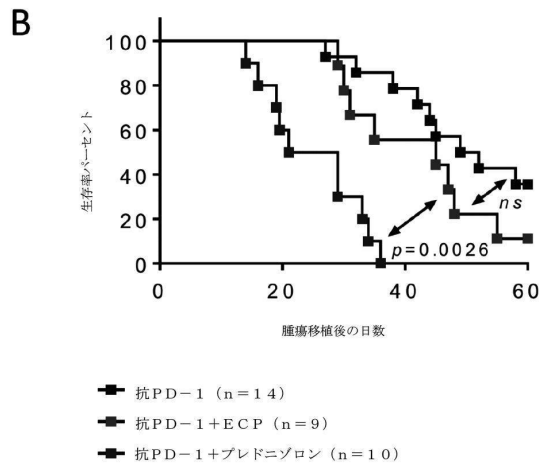
【図 7】



A

【図 7 - 2】

【図 7】 (続き)



B

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 1/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 1/00

(72)発明者 ダイスター, ユストウス

ドイツ国 7 9 1 0 6 フライブルク, テネンバッハー シュトラッセ 9

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献

Blood, 2018年, Vol. 132, Suppl. 1, pp. 606, DOI 10.1182/blood-2018-99-109918

British Journal of Dermatology, 2006年, 154, pp. 7-20, DOI 10.1111/j.1365-2133.2005.06857.x

Therapeutic Apheresis, 1997年, 1(1), pp.29-32

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 4 1 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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