

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7672342号
(P7672342)

(45)発行日 令和7年5月7日(2025.5.7)

(24)登録日 令和7年4月24日(2025.4.24)

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 K 40/31 (2025.01)	A 6 1 K 40/31	Z N A	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1	
請求項の数 32 (全62頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2021-559096(P2021-559096)	(73)特許権者	597148884 ネクター セラピューティクス アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 5 8 サンフランシスコ ミッション ベイ ブールバード サウス 4 5 5
(86)(22)出願日	令和2年4月4日(2020.4.4)	(73)特許権者	522176001 フレッド ハッチンソン キャンサー セ ンター アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 9 シアトル フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0
(65)公表番号	特表2022-526408(P2022-526408 A)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(43)公表日	令和4年5月24日(2022.5.24)	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86)国際出願番号	PCT/US2020/026778		
(87)国際公開番号	WO2020/206395		
(87)国際公開日	令和2年10月8日(2020.10.8)		
審査請求日	令和5年3月28日(2023.3.28)		
(31)優先権主張番号	62/830,212		
(32)優先日	平成31年4月5日(2019.4.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/898,473		
(32)優先日	令和1年9月10日(2019.9.10)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

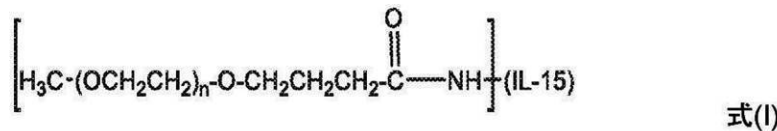
(54)【発明の名称】 細胞免疫療法を増強するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌を有する対象を治療する方法における使用のための組み合わせ物であって、前記組み合わせ物が、キメラ抗原受容体を発現するように改変されているT細胞(CAR-T細胞)を含む養子細胞免疫療法組成物、および構造:

【化6】



(式中、IL-15は、インターロイキン-15部分であり、(n)は、約150~約3,000の整数であり、~NH~は、IL-15部分のアミノ基を表す)

を有するインターロイキン-15(IL-15)受容体作動薬を含み、前記方法が、
(i)前記養子細胞免疫療法組成物を、前記対象に投与することと、
(ii)前記IL-15受容体作動薬を前記対象に投与することと
を含む組み合わせ物。

【請求項2】

前記養子細胞免疫療法組成物が、CD19指向性キメラ抗原受容体を発現するように改変されているCAR-T細胞を含む、請求項1に記載の組み合わせ物。

【請求項 3】

ステップ (i) 及びステップ (i i) が、連続的にいずれかの順序で、又は実質的に同時に行われる、請求項 1 又は請求項 2 に記載の組み合わせ物。

【請求項 4】

ステップ (i) がステップ (i i) の前に行われる、請求項 1 又は請求項 2 に記載の組み合わせ物。

【請求項 5】

ステップ (i i) がステップ (i) の前に行われる、請求項 1 又は請求項 2 に記載の組み合わせ物。

【請求項 6】

ステップ (i) 及び (i i) の両方が実質的に同時に行われる、請求項 1 又は請求項 2 に記載の組み合わせ物。

10

【請求項 7】

ステップ (i) 及び (i i) が両方とも同日に行われる、請求項 1 又は請求項 2 に記載の組み合わせ物。

【請求項 8】

ステップ (i i) が、
 (a) ステップ (i) の後、1 ~ 7 日目のいずれか 1 日に実施される、又は
 (b) ステップ (i) の後、8 ~ 14 日目のいずれか 1 日に実施される、又は
 (c) ステップ (i) の後、7 日目又は 14 日目に実施される、
 請求項 4 に記載の組み合わせ物。

20

【請求項 9】

前記方法が、治療過程中的、キメラ抗原受容体を発現するように改変されている T 細胞を含む前記養子細胞免疫療法組成物の、前記対象への単回投与を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 10】

前記方法が、治療過程中的、前記 IL - 15 受容体作動薬の前記対象への複数回投与を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 11】

前記養子細胞免疫療法組成物が注入によって投与される、及び / 又は前記 IL - 15 受容体作動薬が注入によって投与される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

30

【請求項 12】

前記対象が、ヒトである、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 13】

前記癌が、血液癌である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 14】

前記癌が、固形腫瘍である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 15】

前記癌が、リンパ腫又は白血病である、請求項 13 に記載の組み合わせ物。

40

【請求項 16】

前記癌が、B 細胞リンパ腫である、請求項 15 に記載の組み合わせ物。

【請求項 17】

前記 IL - 15 受容体作動薬が、式 (I) の構造 (式中、(n) は、約 795 ~ 約 1068 の範囲である) を有する、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 18】

(n) が、約 840 ~ 約 1023 の範囲である、請求項 17 に記載の組み合わせ物。

【請求項 19】

平均すると、(n) が、約 907 の値を有する、請求項 17 に記載の組み合わせ物。

【請求項 20】

50

前記方法のために前記組み合わせ物を使用すると治療に対する有益な応答が、ステップ (i) 又はステップ (i i) のいずれかのみに従い投与が行われる場合に観察される治療に対する応答を超えて促進されることを特徴とする、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 21】

治療に対する前記有益な応答が、適切な動物モデルにおける投与に基づく、請求項 20 に記載の組み合わせ物。

【請求項 22】

前記モデルが、インビボ異種移植 B 細胞リンパ腫モデルである、請求項 21 に記載の組み合わせ物。

【請求項 23】

前記治療に対する有益な応答が、腫瘍細胞注射後、45 日目に評価される場合の、骨髄又は腫瘍組織における腫瘍体積 (すなわち、腫瘍負荷の低下) 及び CAR - T 細胞の総数の変化 (パーセント) から選択される、請求項 21 又は 22 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 24】

前記養子細胞免疫療法組成物が、CD - 19 指向性の遺伝子改変された自家 T 細胞を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 25】

前記方法が、ステップ (i) において約 10^7 ~ 約 10^9 細胞 / kg の CAR - T 細胞を前記対象に投与することを含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 26】

前記方法が、約 0.2×10^6 細胞 / kg ~ 約 6.0×10^8 細胞 / kg、少なくとも約 2.0×10^6 細胞 / kg ~ 約 2.0×10^8 細胞 / kg、少なくとも約 0.2×10^6 細胞 / kg ~ 約 5.0×10^6 細胞 / kg、少なくとも約 0.1×10^8 細胞 / kg ~ 約 2.5×10^8 細胞 / kg、又は少なくとも約 0.6×10^8 細胞 / kg ~ 約 6.0×10^8 細胞 / kg から選択される量の CAR - T 細胞を前記対象に投与することを含む、請求項 25 に記載の組み合わせ物。

【請求項 27】

前記方法が、約 0.10 ~ $50 \mu\text{g} / \text{kg}$ の前記 IL - 15 受容体作動薬を前記対象に投与することを含む、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 28】

前記方法が、約 0.25 ~ $25 \mu\text{g} / \text{kg}$ の前記 IL - 15 受容体作動薬を前記対象に投与することを含む、請求項 27 に記載の組み合わせ物。

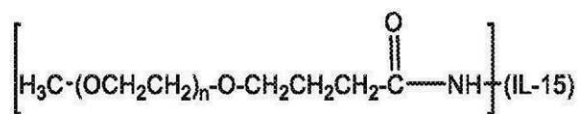
【請求項 29】

前記方法が、約 0.25 ~ $15 \mu\text{g} / \text{kg}$ の前記 IL - 15 受容体作動薬を前記対象に投与することを含む、請求項 28 に記載の組み合わせ物。

【請求項 30】

癌を有する対象を治療する方法における使用のための組み合わせ物であって、前記組み合わせ物が、キメラ抗原受容体を発現するように改変されている T 細胞 (CAR - T 細胞) を含む養子細胞免疫療法組成物、および構造：

【化 6 A】



式(I)

(式中、IL - 15 は、インターロイキン - 15 部分であり、(n) は、約 150 ~ 約 3,000 の整数であり、~ NH ~ は、IL - 15 部分のアミノ基を表す)

を有する IL - 15 受容体作動薬を含み、

10

20

30

40

50

前記方法が、

(i) 前記対象への前記養子細胞免疫療法組成物の単回投与、及び

(i i) ステップ (i) の後の 1 ~ 14 日目のいずれか 1 日の前記対象への前記 I L - 15 受容体作動薬の初回投与、それに続く、治療過程を通した 21 日ごとの前記 I L - 15 受容体作動薬の投与

を含む、組み合わせ物。

【請求項 31】

前記治療過程が、1 ~ 24 サイクルの前記 I L - 15 受容体作動薬の投与、又は 3 ~ 20 サイクルの前記 I L - 15 受容体作動薬の投与、又は 4 ~ 15 サイクルの前記 I L - 15 受容体作動薬の投与を含む、請求項 30 に記載の組み合わせ物。

10

【請求項 32】

養子細胞免疫療法組成物を対象に投与することによって、癌を有する対象を治療する方法における使用のための前記養子細胞免疫療法組成物であって、前記養子細胞免疫療法組成物が、キメラ抗原受容体を発現するように改変されている T 細胞 (C A R - T 細胞) を含み、前記養子細胞免疫療法組成物が、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の養子細胞免疫療法組成物であり、前記方法は、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項において記載される方法によって、前記 I L - 15 受容体作動薬を前記対象に投与し、それによって、前記養子細胞免疫療法組成物単独の投与を含む前記対象の治療よりも増強される、治療に対する応答を提供することをさらに含む、養子細胞免疫療法組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国特許法第 119 条 (e) のもと、2019 年 4 月 5 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 830, 212 号明細書、2019 年 6 月 14 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 861, 858 号明細書、2019 年 9 月 10 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 898, 473 号明細書、及び 2019 年 12 月 6 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 944, 955 号明細書の優先権の利益を主張するものであり、これらの仮特許出願の内容は参照により本明細書にそれぞれ援用される。

【0002】

30

本願は、(特に)免疫療法の分野に関し、キメラ抗原受容体 (C A R) 改変 T 細胞とインターロイキン - 15 受容体作動薬とを個人に投与することによる、癌などの状態を有する個人の治療を含む。

【背景技術】

【0003】

新規治療法は、癌治療改善のために継続的に開発されている。癌治療の最も有望な領域の 1 つは、癌免疫学 (即ち癌免疫療法) である。癌免疫療法は、癌と戦うための患者自身の免疫系を誘導するために免疫反応を調整するように設計された多様な一連の治療ストラテジーを指す。現在の免疫療法的アプローチの中でも、(A C T と呼ばれる) 養子細胞移植療法は、ある種のタイプの癌患者を治療することにおいて有望であることが示されてきた。養子細胞療法は、単純なワクチン接種により達成され得るよりも多数の腫瘍反応性エフェクター T 細胞を得るための腫瘍特異的なリンパ球の単離及びエクスピボ増殖を含む。患者の免疫系に腫瘍細胞の殺傷を開始させるために癌患者に腫瘍特異的な T 細胞を点滴する。養子細胞移植は、特に転移性黒色腫において有効な臨床転帰を示している (D u d l e y , M . E . , J . R . W u n d e r l i c h e t a l . , J C l i n O n c o l 23 (10) : 2346 - 2357 (2005) ; D u d l e y , M . E . , J . C . Y a n g e t a l . , J C l i n O n c o l 26 (32) : 5233 - 5239 (2008)) 。養子細胞移植は、養子 T 細胞療法で一般的であるように自家性であってもよいし、又は同種異系であってもよい。

40

【0004】

50

養子T細胞療法の一形態は、CAR T細胞療法（キメラ抗原受容体改変T細胞療法）である。CARは、リンパ球の特異性及び機能を再プログラムすることができる種類の合成受容体である（Sadelaian, M., et al., Nature, 545, 25 May 2017, p. 423 - 431）。CAR T細胞療法は、T細胞の特異性を、腫瘍細胞表面上に発現される標的腫瘍関連抗原（TAA）に対して方向付け直す、人工受容体を発現するように形質導入された、エクスピボで遺伝子操作されたT細胞を使用する（June, C.H., et al., Sci Transl Med 2015; 7(280): 280 ps 7）。特異的な主要組織適合複合体（MHC）という観点からその同族の抗原を認識する、天然に存在するT細胞及びT細胞受容体操作されたT細胞とは異なり、CAR T細胞による抗原認識は、MHC非依存性であり、それによって、この免疫療法の細胞ベースの様式の適応性を拡大させる。第一世代のCAR T細胞は、モノクローナル抗体の単鎖可変領域（scFv）、T細胞受容体膜貫通ドメイン、及びCD3ゼータ（CD3）鎖の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいた。後の反復は、1つ以上の共刺激ドメイン、及び/又は制御可能なオン-オフスイッチも利用していた。CAR T細胞療法は、改良された特異性及び安全性プロフィールを有する遺伝子操作されたT細胞を提供するために、時間と共に進歩してきた。

10

【0005】

CAR T細胞に基づく治療法は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫を治療するために米国において承認されているが、すべての患者がCAR T細胞に応答するとは限らず、また、応答の持続性は、限られたままである。CAR T細胞療法についてのさらなる課題は、移植された細胞の不十分な生存である。再発又は難治性の大細胞型B細胞リンパ腫では、ほぼ60%の患者が、再発する又は失敗して進行し、失敗後の予後は悪い（Nair, J., et al., Best Practice & Research Clinical Haematology 31(2018)293 - 298）。成功裏のCAR T細胞療法の転帰、すなわち、6か月での完全寛解率を伴う好都合な持続性の応答は、CAR T細胞の長期の残存性に、少なくともある程度依存する。リンパ腫を有する患者を治療することにおけるCAR T細胞療法の第II相試験についての臨床転帰は、治療に最初に応答した多くの患者について、顕著な有効性を報告しているが、応答の持続性は、限られたままである（Shah, N., et al., Frontiers in Oncology, 9(March 2019) Art. 146）。さらに、CAR T細胞療法後に報告されている急性毒性には、サイトカイン放出症候群（CRS）及び神経毒性（CAR関連の脳症症候群と称される）が含まれる（Neelapu, S.S., et al., Nat Rev Clin Oncol 2018; 15(10): 47 - 62）。他のそれほど頻度は高くないが観察される有害副作用には、血球貪食性リンパ組織球症（HLH）/マクロファージ活性化症候群（MAS）、アナフィラキシー及び腫瘍崩壊症候群が含まれる。

20

30

有効なCAR T細胞に基づく治療法を開発するのに、今までかなりの努力を費やしてきたが、現在の治療法の欠点の1つ以上に対処する、新規の且つより有効な免疫療法CAR T細胞戦略及び関連する治療レジメンを提供する必要性が、依然として存在する。

【先行技術文献】

40

【非特許文献】

【0006】

【文献】Dudley, M.E., J.R.Wunderlich et al., J Clin Oncol 23(10): 2346 - 2357 (2005)

【文献】Dudley, M.E., J.C.Yang et al., J Clin Oncol 26(32): 5233 - 5239 (2008)

【文献】Sadelaian, M., et al., Nature, 545, 25 May 2017, p. 423 - 431

【文献】June, C.H., et al., Sci Transl Med 2015; 7(280): 280 ps 7

50

【文献】Shah, N., et al., *Frontiers in Oncology*, 9 (March 2019) Art. 146

【文献】Neelapu, S.S., et al., *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15 (10: 47 - 62)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

したがって、本開示は、他の利点も有するが、中でも特に、より優れた残存性及び改良された有効性（以下により詳細に説明されることとなる）を有する、新規の且つ効率的な CAR T細胞に基づく免疫療法、例えばCAR T細胞集団を腫瘍を殺す形質に誘導する免疫療法を提供することによって、これらの欠点及び他の必要性に対処することに努める。

10

【0008】

第1の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書により詳細に記載されることとなる、長時間作用型IL-15受容体作動薬の投与と組み合わせた、癌を有する対象への養子細胞移植を含む方法である。本開示は、いずれかの順序で逐次的に投与される、又は実質的に同時に投与される、養子細胞療法の一つ以上のサイクル（例えば、CAR T細胞の注入によるもの）と、本明細書に記載した通りの長時間作用型IL-15受容体作動薬の投与とを含む組み合わせ治療レジメンが、いずれかの単一の免疫療法手法単独よりも増強される、好ましくは著しく増強される程度に、ある種の対象における癌を治療することにおいて特に有効であり得る、及び/又は移植された細胞の活性及び/又は数を増大、増強、又は延長する、又は癌細胞に対する測定可能な有益な応答（例えば、該当する場合、安定化、退縮、縮小、壊死など）をもたらすことができるという認識に、少なくとももある程度起因する。

20

【0009】

第2の態様では、本明細書で提供されるのは、キメラ抗原受容体（CAR T細胞）を発現するように改変されているT細胞を含む養子細胞免疫療法組成物を対象に投与することと；長時間作用型IL-15受容体作動薬を対象に投与することとを含む、癌を有する対象の治療のための組み合わせ免疫療法である。

【0010】

第3の態様では、提供されるのは、癌を有する対象を治療するための、養子細胞療法、例えばCAR T細胞療法の治療有効性を向上させる方法であって、キメラ抗原受容体を発現するように改変されているT細胞を含む養子細胞免疫療法組成物を癌を有する対象に提供することと；長時間作用型IL-15受容体作動薬を対象に投与する（ここでは、長時間作用型IL-15受容体作動薬の投与が、養子細胞療法に対する対象の応答を向上させるのに有効である）こととを含む方法である。

30

【0011】

以下の実施形態は、上に記載した態様のそれぞれに等しく適用されることが意図され、また、該当する場合、他に指示されない限り、単独と組み合わせの両方を考慮すべきである。

【0012】

いくつかの実施形態では、養子細胞移植は、CD19指向性キメラ抗原受容体を発現するように改変されているT細胞を含む養子細胞免疫療法組成物を投与することを含む。

40

【0013】

一つ以上のさらなる実施形態では、長時間作用型IL-15受容体作動薬は、ナチュラルキラー（NK）細胞を優先的に刺激する及び増殖させるのに有効である。さらに一つ以上の追加の実施形態では、長時間作用型IL-15受容体作動薬は、例えば抑制性の制御性T細胞（Treg）を実質的に誘発せずに、CD8+ T細胞生存及びメモリー形成を補助する。さらにいくつかのさらなる実施形態では、長時間作用型IL-15受容体作動薬は、IL-15受容体アルファ特異性を有する。いくつかのさらなる実施形態では、長時間作用型IL-15受容体作動薬は、前述の特徴、すなわち、(i) NK細胞を優先的

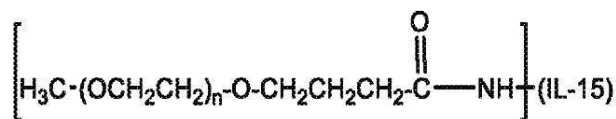
50

に刺激する及び増殖させるのに有効である、(i i) 例えば抑制性の制御性 T 細胞 (T r e g) を実質的に誘発せずに、C D 8 + T 細胞生存及びメモリー形成を補助する、並びに (i i i) I L - 1 5 受容体アルファ特異性を有することのうちの 1 つ以上を有する。

【 0 0 1 4 】

いくつかのさらなる実施形態では、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬は、構造：

【 化 1 】



式(I)

10

(式中、I L - 1 5 は、インターロイキン - 1 5 部分であり、(n) は、約 1 5 0 ~ 約 3 , 0 0 0 の整数であり、~ N H ~ は、I L - 1 5 部分のアミノ基を表す)

を有する。

【 0 0 1 5 】

式 (I) の長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬に関連する 1 つ以上の実施形態では、(n) は、約 7 9 5 ~ 約 1 0 6 8 の範囲である。いくつかの追加の実施形態では、(n) は、約 8 4 0 ~ 約 1 0 2 3 の範囲である。1 つ以上の特定の実施形態では、(n) は、平均すると、約 9 0 7 又は約 9 0 9 の値を有する。

【 0 0 1 6 】

20

明確性の目的で、投与すること (ここでは、用語「投与すること」は、養子細胞免疫療法組成物又は長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬の送達を指す場合に使用される) の順序に関して、養子細胞と長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬は、同時に又は連続的に、また、いかなる順序でも投与することができる。さらに、組み合わせのいずれかの構成要素の治療は、単一サイクルの治療法を含むこともできるし、複数サイクルを含むこともできる。すなわち、例えば C D 1 9 指向性 C A R T 細胞などのキメラ抗原受容体を発現するように改変されている T 細胞を含む養子細胞免疫療法組成物の投与と、長時間作用型 I L - 1 5 作動薬の投与とを含む治療法の最初のサイクルの後、追加のラウンドの治療法は、養子細胞移植、例えば、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬の投与と組み合わせた C A R T 細胞の投与、又は養子細胞療法、例えば、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬

30

の投与を伴わない C A R T 細胞療法、若しくは養子細胞移植 (例えば、C D 1 9 C A R T 細胞などの C A R T 細胞の投与) を伴わない長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬の投与を含むことができる。

【 0 0 1 7 】

1 つ以上の実施形態では、対象は、ヒト対象である。

【 0 0 1 8 】

1 つ以上の非限定的な実施形態では、癌は、血液癌などの液状癌、例えば再発又は難治性の悪性腫瘍である。

【 0 0 1 9 】

1 つ以上の関連する非限定的な実施形態では、癌は、リンパ腫又は白血病である。1 つ以上の関連する実施形態では、癌は、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫から選択される。

40

【 0 0 2 0 】

いくつかの追加の非限定的な実施形態では、癌は、B 細胞悪性腫瘍である。いくつかのさらなる実施形態では、癌は、B 細胞リンパ腫である。

【 0 0 2 1 】

さらにいくつかのさらなる実施形態では、癌は、多発性骨髄腫である。

【 0 0 2 2 】

1 つ以上の代替実施形態では、癌は、固形癌である。

【 0 0 2 3 】

本明細書で提供される方法のいくつかのさらなる実施形態では、この方法は、養子細胞

50

免疫療法組成物の投与又は長時間作用型IL-15受容体作動薬単独の投与に従って投与が実施される場合に認められる治療に対する応答よりも増強される、治療に対する有益な応答をもたらす。

【0024】

前述のものに関連するいくつかの実施形態では、治療に対する有益な応答は、好適な動物モデル、例えばインビボ異種移植(xenogenetic)B細胞リンパ腫モデルなどに基づくものである。

【0025】

追加の態様及び実施形態を、以下の説明及び特許請求の範囲において説明する。

【図面の簡単な説明】

10

【0026】

【図1】大腸菌(E.coli)からの例示的な組換え型ヒトIL-15のアミノ酸配列(配列番号1);大腸菌(E.coli)内での翻訳の開始のために、配列の最初にメチオニンを含む、例示的な組換え型ヒトIL-15(配列番号2)、すなわち、12.9kDaの分子量を有する、115個のアミノ酸を含有する単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖;及び例示的な前駆体型のIL-15(配列番号3)を提供する。

【図2】実施例に記載した通りに、健康なドナーから単離されたCD4及びCD8 T細胞を形質導入するために使用される、好適なCD19 CARレンチウイルスコンストラクトの例示である。

【図3-1】フローサイトメトリーによって測定される場合の、実施例2にさらに記載される、ヒトCD19 CAR T細胞によるIL-15Rの発現を示す。CD8 CAR T細胞による発現を、図3A(実線)に示し;CD4 CAR T細胞によるIL-15R発現を、図3B(実線)に示す。どちらの図も、FMO対照(灰色塗りつぶし)、及びアイソタイプ対照(破線)を含む。

20

【図3-2】フローサイトメトリーによって決定される場合の、実施例2にさらに記載される通りの、異なる濃度のMPBA-IL15()又はIL-15()での20分間の刺激後の、濃度(ng/mL)の対数に対する、CD8 CAR T細胞(図3C)又はCD4 CAR T細胞(図3D)についてのSTAT5のリン酸化(パーセント)を示すグラフである。

【図3-3】フローサイトメトリーによって決定される場合の、実施例2にさらに記載される通りの、CFSEで標識し、種々の濃度のMPBA-IL15()又はIL-15()と共に20分間インキュベートしたCD8 CAR T細胞(図3E)及びCD4 CAR T細胞(図3F)の増殖(分裂(%))を示すグラフである。

30

【図4】(図4A)CAR T細胞単独()で、並びに異なる投薬量のモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15(MPBA-IL15):0.030mg/kg(緑色)、0.10mg/kg(紫色)、及び0.30mg/kg()と組み合わせて治療される腫瘍を有するマウスについての、実施例3に記載される通りの、インビボ異種移植(xenogenetic)B細胞リンパ腫モデルにおいて評価される場合の、時間(CAR T細胞注入後の日数)に対する平均腫瘍輝度($p/s/cm^2/sr$)のグラフである。PBS対照は、円()として示される。(図4B)実施例3(研究A)に記載される通りの、前臨床マウスリンパ腫モデルにおけるCD19 CAR T細胞組み合わせ免疫療法の有効性を評価するための、実例となる治療プロトコルを示す。

40

【図5】CAR T細胞(D0)を注入され、それに続いてMPBA-IL15(0.3mg/kg)の投与(-1日目、7日目、又は14日目に開始し、その後毎週)を受けた、リンパ腫細胞を有するマウスの血液中の、CD8 CAR T細胞(図5A)又はCD4 CAR T細胞(図5B)の数を示すグラフである。マウスを、毎週採血し、CD8及びCD4 CAR T細胞を、フローサイトメトリーによって特定した。プロットは、CAR T細胞投与後の日数に対する細胞数/ μl (血液)を提供する。研究群には、以下が含まれた:MPBA-IL15のみを注入された腫瘍を有するマウス()、CAR T細胞のみを注射された腫瘍を有するマウス()、-1日目()、7日目()、又は14

50

日目()に開始するMPBA-IL15と組み合わせてCAR T細胞で治療された腫瘍を有するマウス(実施例3に記載された通り、CAR T細胞注入後最大28日間)。

【図6】実施例3に記載される通りの、MPBA-IL15のみ()、CAR T細胞のみ()、又は-1日目()、7日目()、又は14日目()に開始し、その後毎週のMPBA-IL15と組み合わせたCAR T細胞の注入の後の、腫瘍を有するマウスにおけるインビボ異種移植B細胞リンパ腫モデルにおいて評価される場合の、時間(CAR T細胞注入後の日数)に対する平均腫瘍輝度($p/s/cm^2/sr$)を提供することによって腫瘍量(tumor burden)を評価するグラフである。

【図7-1】実施例3に記載される通りの、インビボ異種移植B細胞リンパ腫モデルにおいて評価される場合の、CAR T細胞のみ(青色線)、MPBA-IL15のみ(黒色線)、又はCAR T細胞の注入(0日目)の後の-1日目(紫色線)、7日目(赤色線)、又は14日目(緑色線)に開始するMPBA-IL15(0.3mg/kg)と組み合わせたCAR T細胞で治療された、腫瘍を有するマウスの生存率(パーセント)を示すグラフである。

【図7-2】実施例3(研究B)に記載される通りの、前臨床マウスリンパ腫モデルにおけるCD19 CAR T細胞組み合わせ免疫療法の有効性を評価するための、実例となる治療プロトコルを示す。

【図8-1】実施例3に記載される通りの、D0にCAR T細胞を注入された(CAR T細胞単独療法)、又はCAR T細胞の注入に加えてD7に開始するMPBA-IL15の毎週の注射を受けている、Rajiリンパ腫細胞を有するNSGマウスの骨髄からのCD8 CAR T細胞の、それぞれ、CAR T細胞の総数、Ki67発現、並びにPD1及びTIM3発現のプロットである。図8Aは、CAR T細胞のみ()の注入後の腫瘍を有するマウスの骨髄における、及びMPBA-IL15と組み合わせて()CAR T細胞療法を受けた腫瘍を有するマウスにおける、CD8 CAR T細胞の総数を示すグラフである。図8Bは、CAR T細胞単独療法()後の腫瘍を有するマウスの骨髄からの、及びMPBA-IL15と組み合わせて()CAR T細胞を受けた腫瘍を有するマウスからの、CD8 CAR T細胞におけるKi67発現($Ki67+(%)$)を示すグラフである。図8Cは、CAR T細胞の注入のみ()(単独療法)後の腫瘍を有するマウスの骨髄からの、及びMPBA-IL15と組み合わせて()CAR T細胞療法を受けた腫瘍を有するマウスからの、CD8 CAR T細胞におけるPD1及びTIM3発現($PD1+TIM3+(%)$)を示すグラフである。

【図8-2】同上。

【図9-1】実施例3に記載される通りの、D0にCAR T細胞を注入された(CAR T細胞単独療法)、又はD7に開始するMPBA-IL15の毎週の注射をさらに受けている、Rajiリンパ腫細胞を有するNSGマウスの骨髄からのCD4 CAR T細胞の、それぞれ、CAR T細胞の総数、Ki67発現、並びにPD1及びTIM3発現のプロットである。図9Aは、CAR T細胞のみ()の注入後の腫瘍を有するマウスの骨髄における、及びMPBA-IL15と組み合わせて()CAR T細胞療法を受けた腫瘍を有するマウスにおける、CD4 CAR T細胞の総数を示すグラフである。図9Bは、CAR T細胞単独療法()後の腫瘍を有するマウスの骨髄からの、及びMPBA-IL15と組み合わせて()CAR T細胞を受けた腫瘍を有するマウスからの、CD4 CAR T細胞におけるKi67発現($Ki67+(%)$)を示すグラフである。図9Cは、CAR T細胞の注入のみ()(単独療法)後の腫瘍を有するマウスの骨髄からの、及びMPBA-IL15と組み合わせて()CAR T細胞療法を受けた腫瘍を有するマウスからの、CD4 CAR T細胞におけるPD1及びTIM3発現($PD1+TIM3+(%)$)を示すグラフである。

【図9-2】同上。

【図10】MPBA-IL-15及びCAR T細胞で以前に治療され、D38にRaji腫瘍細胞を再負荷され、それに続いて腫瘍量を評価するために毎週のイメージングを行った、腫瘍のないマウスについての、代表的な時点についてのバイオルミネセンス画像を

10

20

30

40

50

提供する。この図は、マウスリンパ腫モデルにおいて評価された場合、例示的な長時間作用型IL-15受容体作動薬、すなわちMPBA-IL-15と、CAR T細胞とで以前に治療されたマウスが、Raji腫瘍再負荷を拒絶することができることを示す。

【図11】実施例4に記載される通りの、前臨床マウスリンパ腫モデルにおける、例示的な長時間作用型IL-15受容体作動薬、すなわちMPBA-IL15とのROR1 CAR T細胞組み合わせ免疫療法の有効性を評価するための、実例となる治療プロトコルを示す。

【図12-1】図12Aは、実施例4に記載されるマウスリンパ腫モデルにおける、種々の治療群のマウスについての腫瘍体積の変化（パーセント）のグラフである：対照T細胞（長方形）、対照T細胞とMPBA-IL15（ \square ）、ROR1 CAR T細胞（ \square ）、及びROR1 CAR T細胞とMPBA-IL15（ \square ）；図12Bは、ROR1 CAR T細胞単独療法で治療された個々のマウスについての感染後の週数に対する腫瘍体積の変化（パーセント）（群について18.5%退縮）のグラフである。図12Cは、ROR1 CAR T細胞とMPBA-IL-15の二重併用療法で治療された個々のマウスについての感染後の週数に対する腫瘍体積の変化（パーセント）（群について44.4%退縮）のグラフである。

【図12-2】同上。

【図13】図13Aは、それぞれ、実施例4に記載される治療群についての、脾臓及び腫瘍における生細胞の割合として表されるCD8 CAR T細胞頻度のプロットである：対照T細胞（黒色）、ROR1 CAR T細胞（赤色）、及びROR1 CAR T細胞とMPBA-IL15（青色）；図13Bは、それぞれ、実施例4に記載される種々の治療群についての、脾臓及び腫瘍における生細胞の割合として表される総CD8細胞頻度のプロットである。

【図14】MPBA-IL-15、すなわち実例となる長時間作用型IL-15作動薬が、ROR1 CAR T細胞の輸送及び肺における残存性を増強することを示す、ROR1肺モデルにおける種々の治療群のマウスからの肺組織の画像である。

【図15】実施例5に記載される通りの、インビトロでのMPBA-IL15での治療後のCD8 CAR T細胞におけるタンパク質発現を示す。図15Aは、照射済みK562-CD19+若しくはK562-CD19-細胞と共に同時培養され、且つ、MPBA-IL15で処理されていない、又は1ng/ml、10ng/ml、若しくは30ng/mlの濃度のMPBA-IL15で処理された、CD8 CAR T細胞におけるpg/mlでのIFNの発現を提供する。図15Bは、照射済みK562-CD19+若しくはK562-CD19-細胞と共に同時培養され、且つ、MPBA-IL15で処理されていない、又は1ng/ml、10ng/ml、若しくは30ng/mlの濃度のMPBA-IL15で処理された、CD8 CAR T細胞におけるpg/mlでのTNFの発現を提供する。

【図16-1】実施例5に記載される通りの、照射済みK562-CD19+若しくはK562-CD19-細胞と共に同時培養され、且つ、MPBA-IL15で処理されていない、又は1ng/ml、10ng/ml、若しくは30ng/mlの濃度のMPBA-IL15で処理された、CD8 CAR T細胞についてのCAR T細胞増殖（増殖（倍）として）を示す。

【図16-2】実施例5に記載される通りの、照射済みK562-CD19+若しくはK562-CD19-細胞と共に同時培養され、且つ、MPBA-IL15で処理されていない、又は1ng/ml、10ng/ml、若しくは30ng/mlの濃度のMPBA-IL15で処理された、CD8 CAR T細胞における、(bcl-2 MFIでの)bcl-2及び活性化された（カスパーゼ3+（%）としての）カスパーゼ3の発現をそれぞれ提供する。

【図17】実施例6に詳細に記載される通りの、CAR T細胞単独で又はMPBA-IL15と組み合わせて治療されたリンパ腫を有するマウスからのCAR T細胞におけるbcl-2発現を示す。CD8 CAR T細胞（図17A）とCD4 CAR T細胞（

10

20

30

40

50

図 17B) との両方について、注入後 D8 に決定される、CAR T 細胞における Bcl-2 発現を、ヒストグラムに示す (灰色 = CAR T 細胞のみで治療されたマウス; 赤色及び青色 = CAR T 細胞とモノ (メトキシPEG-N-ブタンアミド) インターロイキン-15 (MPBA-IL15) とを投与されたマウス)。

【図 18】また、実施例 6 に詳細に記載される通りの、CAR T 細胞単独で又は MPBA-IL15 と組み合わせて治療されたリンパ腫を有するマウスからの CAR T 細胞における bcl-2 発現を示す。CD8 CAR T 細胞 (図 18A) と CD4 CAR T 細胞 (図 18B) との両方について、注入後 D8 に決定される、CAR T 細胞における Bcl-2 発現を、棒グラフに示す (黒色 = CAR T 細胞のみのマウス、赤色 = CAR T 細胞とモノ (メトキシPEG-N-ブタンアミド) インターロイキン-15 (MPBA-IL15) とを投与されたマウス)。

10

【図 19】実施例 6 に記載される通りの、CAR T 細胞におけるメモリーマーカー CD45RA 及び CCR7 の発現を示す。図 19A は、CAR T 細胞のみを投与されたマウスの CD8 CAR T 細胞におけるタンパク質発現を示し; 図 19B は、CAR T 細胞とモノ (メトキシPEG-N-ブタンアミド) インターロイキン-15 (MPBA-IL15) を投与されたマウスの CD8 CAR T 細胞におけるタンパク質発現を示し; 図 19C は、CAR T 細胞のみを投与されたマウスの CD4 CAR T 細胞におけるタンパク質発現を示し; 図 19D は、CAR T 細胞とモノ (メトキシPEG-N-ブタンアミド) インターロイキン-15 (MPBA-IL15) を投与されたマウスの CD4 CAR T 細胞におけるタンパク質発現に関し、ここでは、発現データは、CD5RA-CCR7- (橙色)、CD5RA+CCR7- (緑色)、及び CD5RA-CCR7+ (赤色) について提供される。グラフは、平均値 ± SEM を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0027】

本明細書で使用されるとき、単数形「a」、「an」、及び「the」には、文脈上特に明確に指示されない限り複数の指示対象が含まれる。

【0028】

本開示のある特徴を記載し、及び特許請求するにあたり、特に記載のない限り以下に記載する定義に従い以下の用語を使用する。

【0029】

30

「PEG」又は「ポリエチレングリコール」は、本明細書で使用されるとき、任意の水溶性ポリ (エチレンオキシド) を包含することが意図される。特に指示されない限り、「PEG ポリマー」又はポリエチレングリコールは、実質的に全ての (好ましくは全ての) 単量体サブユニットがエチレンオキシドサブユニットであるものであり、しかしながらポリマーは、例えばコンジュゲーション用に、個別のエンドキャッピング部分又は官能基を含有してもよい。本開示で使用される PEG ポリマーは、1 つ以上の末端酸素が例えば合成変換中に置換されたか否かに応じて、以下の 2 つの構造のうち的一方を含み得る: 「-(CH₂CH₂O)_n-」又は「-(CH₂CH₂O)_{n-1}CH₂CH₂-」。PEG ポリマーについては、変数 (n) は典型的に約 3 ~ 4000 の範囲であり、末端基及び PEG 全体の構造は様々であり得る。PEG を含む例示的な又は好ましい分子は、1 つ以上の特定の PEG 構造及び / 又はリンカー、及び / 又は分子量範囲を含むことができる。

40

【0030】

PEG などの水溶性ポリマーの文脈における分子量は、数平均分子量又は重量平均分子量として表すことができる。他に指示されない限り、本明細書での分子量に対するすべての言及は、重量平均分子量を指す。数平均と重量平均、どちらの分子量決定も、ゲル浸透クロマトグラフィー又は他の液体クロマトグラフィー技術 (例えばゲル濾過クロマトグラフィー) を使用して測定することができる。最も一般的に用いられるものは、ゲル浸透クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーである。分子量を決定するための他の方法には、数平均分子量を決定するための束一的な特性 (例えば、凝固点降下、沸点上昇、若しくは浸透圧) の末端基分析若しくは測定、又は重量平均分子量を決定するための光

50

散乱技術、超遠心分離、MALDI TOF、若しくは粘度計の使用が含まれる。PEG ポリマーは、典型的には、多分散系である（すなわち、ポリマーの数平均分子量と重量平均分子量が等しくない）。IL - 15 などの標的分子への共有結合のために使用され、且つ本明細書に記載した通りのPEG ポリマーは、一般に、好ましくは約 1.2 未満、より好ましくは約 1.15 未満、さらに好ましくは約 1.10 未満、例えば約 1.05 未満、又は約 1.03 未満という低い多分散値を有する。

【0031】

「生理学的に切断可能な」又は「加水分解可能な」又は「分解可能な」結合は、生理学的条件下で、及び加水分解の何らかの適切な方法下で、一般的には水と反応する（即ち加水分解される）比較的不安定な結合である。水中で結合が加水分解する傾向は、所与の分子内の2個の原子を連結する一般的なタイプの連結だけでなく、これらの原子及び全体的な分子構造に連結される置換基にも依存し得る。加水分解に不安定な又は弱い結合としては、典型的に、限定はされないが、カルボン酸エステル、リン酸エステル、無水物、アセタール、ケタール、アシルオキシアルキルエーテル、イミン、オルトエステル、ペプチド、オリゴヌクレオチド、チオエステル、及びカーボネートが挙げられる。

10

【0032】

「酵素分解性の結合」は、1つ以上の酵素により分解を受ける結合を意味する。

【0033】

「安定な」結合 (linkage) 又は結合 (bond) は、水中で実質的に安定な化学結合、即ち、長期間にわたり生理学的条件下でいかなる認め得る程度の加水分解も受けない結合を指す。加水分解に安定な結合の例としては、限定はされないが、一般的に以下が挙げられる：炭素 - 炭素結合（例えば脂肪族鎖中の）、エーテル類、アミド類、アミン類など。概して、安定な結合は、生理学的条件下で1日約 1 ~ 2 % 未満の加水分解速度を呈するものである。代表的な化学結合の加水分解速度は、多くの標準的な化学テキストブックを参照することができる。

20

【0034】

用語「IL - 15 部分」は、本明細書で使用する場合、ヒト IL - 15 活性を有するペプチド又はタンパク質部分を指す。さらに、用語「IL - 15 部分」は、PEG 部分とのコンジュゲート形成前の IL - 15 部分と、例えば mPEG - ブタン酸スクシンイミジルなどの反応性の PEG 部分とのコンジュゲート形成（すなわち、共有結合）（例えば、反応）後の IL - 15 部分との両方を包含する。以下でさらに詳細に説明する通り、当業者は、所与の部分が IL - 15 活性を有するかどうかを決定することができる。配列番号 1 から 3 のいずれか 1 つに相当するアミノ酸配列を含むタンパク質、及び同様に、それと実質的に相同のいずれかのタンパク質又はポリペプチドは、例示的な IL - 15 部分である。本明細書で使用する場合、用語「IL - 15 部分」には、例えば部位特異的変異誘発によって計画的に又は突然変異を介して偶発的に改変されたペプチド及びタンパク質が含まれる。これらと共に含まれるのは、1 から 6 個の追加のグリコシル化部位を有する IL - 15 配列、ペプチド又はタンパク質のカルボキシ末端に少なくとも1つの追加のアミノ酸を有する配列（ここでは、追加のアミノ酸は、少なくとも1つのグリコシル化部位を含む）、及び少なくとも1つのグリコシル化部位を含むアミノ酸配列を有する配列である。この用語には、自然に、組換えによって、及び合成によって生成される IL - 15 部分が含まれることが意図される。長時間作用型 IL - 15 受容体作動薬に対する言及は、その薬学的に許容し得る塩形態を包含することが意図される。

30

40

【0035】

用語「実質的に相同の」又は「実質的に同一の」は、ある特定の対象配列、例えば変異配列が、基準配列と、（その正味の影響が、基準配列と対象配列との間の不都合な機能的相違点をもたらさない）1つ以上の置換、欠失、又は付加だけ異なることを意味する。本発明の目的では、ストリンジェント条件下での 95 パーセントを超える相同性（同一性）、等価な生物活性（必ずしも生物活性の強さが等価であるとは限らないが）、及び所与の配列に対する等価な発現特性を有する配列が、実質的に相同（同一）であるとみなされる

50

。相同性を決定する目的では、成熟配列のトランケーションは無視されるべきである。本明細書での使用のための例示的なIL-15ポリペプチドには、配列番号1と実質的に相同である配列が含まれる。配列番号2は、配列番号2が、配列の最初に、大腸菌(E. coli)内での翻訳に必要とされるメチオニンを有することを除いて、配列番号1とほとんど同一である。

【0036】

用語「断片」は、タンパク質又はポリペプチドの部分又は断片、例えばIL-15部分のアミノ酸配列を有し、且つタンパク質又はポリペプチド、例えばIL-15の生物活性、又は実質的に生物活性を有する、あらゆるタンパク質又はポリペプチドを意味する。断片には、タンパク質分解によって生成されるタンパク質又はポリペプチド、並びに当技術分野で慣例的な方法による化学合成によって生成されるタンパク質又はポリペプチドが含まれる。

10

【0037】

本明細書で使用されるとき、用語「癌を治療すること」は、絶対的な用語であることを意図するものではなく、例えば腫瘍サイズを縮小するか又は癌細胞数を減少させるか、癌を寛解状態にするか、又は癌細胞のサイズもしくは数の成長を防ぐことなどを含み得る。いくつかの状況において、本開示による治療は、予後の改善につながる。

【0038】

癌を有する対象を治療するための方法において、本明細書で使用する場合、表現「治療を必要とする対象」は、癌と診断されている個人又は対象を指す。

20

【0039】

本明細書で使用されるとき、用語「促進する」は、例えば応答促進の文脈では、ある一定のベースライン又は参照療法と比較した場合の、例えば本明細書中で開示されるような、対象の、又は腫瘍細胞の、治療への応答性の改善を指す。例えば、応答促進は、治療に対する応答性の何らかの1つ以上の指標に基づいた、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は98%又はそれを超える応答性の向上を含み得る。本明細書で使用されるとき、「促進する」は、例えばこのような比較に対するある種の基礎と比較した場合、治療に対して有利に応答する対象の数を促進することも指し得る。

30

【0040】

本明細書で使用される「難治性の」は、治療に応答しない疾患、例えば癌などを指す。難治性の癌は、治療の前又は治療の開始時に、治療に対して抵抗性であり得る、又は、難治性の癌は、治療中に抵抗性となる可能性もある。難治性の癌はまた、抵抗性の癌とも呼ばれる。

【0041】

本明細書で使用される「再発した」又は「再発する」は、改善又は応答性の期間の後の、例えば、治療法(例えば癌治療)の前治療後の、疾患(例えば、癌)、又は癌などの疾患の徴候及び症状の再出現を指す。

【0042】

本明細書で使用する場合、用語「CD19」は、白血病前駆細胞上で検出可能な抗原決定基である表面抗原分類19タンパク質を指す。ヒト及びマウスのアミノ酸及び核酸配列は、例えば、GenBank、UniProt、及びSwiss-Protなどの公開データベースにおいて参照することができる。本明細書で使用する場合、「CD19」には、変異、例えば、点変異、断片化、挿入、欠失、及び完全長野生型CD19のスプライスバリエーションを含むタンパク質が含まれる。CD19は、例えば、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球白血病、及び非ホジキンリンパ腫を含めた、大抵のB系列の癌上に発現される。

40

【0043】

表現「治療有効の」、「治療有効量」、「有効量」、又は「有効な量の」は、例えば長

50

時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬の投与の場合などに、所望される生理反応を促進するのに十分な量又は投薬量、すなわち、例えば C A R T 細胞を含む養子細胞免疫療法組成物の投与に対する増強された応答を促進するのに十分である量を指す。詳細な量は、例えば、治療されている特定の状態、患者集団、それぞれの患者の考慮事項、投与されることとなる治療用組成物及び特定の組み合わせの構成成分及び物質的特性、施されている特定の養子細胞移植療法（例えば、C A R T 細胞組成物中に含まれる細胞の特定の組成物、及び/又は C A R T 細胞によって発現されるキメラ抗原受容体）などの多数の因子に依存することとなり、また、当業者によって決定することができる。

【 0 0 4 4 】

「実質的に」又は「本質的に」は、ほとんど完全に、又は完全に、例えば、所与の量の 9 5 % 以上を意味する。

10

【 0 0 4 5 】

同様に、「約」又は「およそ」は、本明細書で使用する場合、所与の量のプラス又はマイナス 5 % 以内を意味する。

【 0 0 4 6 】

「任意の」又は「任意に」は、その後に記載される状況が、必ずしも生じなくてもよく、その結果、その説明には、状況が生じる場合と生じない場合が含まれることを意味する。

【 0 0 4 7 】

「薬学的に許容可能な賦形剤」又は「薬学的に許容可能な担体」は、本明細書に記載される組成物中に含まれ得る成分であって、対象に重大な有害毒性効果を引き起こさない成分を指す。

20

【 0 0 4 8 】

用語「患者」、又は「対象」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に提供されるとおりの化合物又は組成物又は併用の投与により予防又は治療することのできる病態、例えば癌に罹患している又はそれに罹り易い生物を指し、ヒト及び動物の両方が含まれる。対象には、限定されるものではないが、哺乳動物（例えばマウス、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど）が含まれ、好ましくはヒト（小児及び成人の対象を含む）である。

【 0 0 4 9 】

概要

例えば血液系腫瘍における、有効な抗腫瘍応答を誘発するための有望な治療法ではあるが、C A R T 細胞を用いる養子細胞療法後、患者はしばしば、治療に対する最初の好都合な応答後に再発する。例えば、残存性を改善すること、応答の持続性を改善すること、抵抗性に打ち勝つ又は対処すること、安全性を改善すること、及び/又は患者転帰（有効性）を改善することによって、現在の C A R T 細胞戦略に伴う欠点の少なくともいくつかに対処する試みにおいて、本明細書で提供されるのは、C D 1 9 指向性 C A R T 細胞などのキメラ抗原受容体を発現するように改変されている T 細胞を含む養子細胞免疫療法組成物と、本明細書に記載した通りの特徴を有する長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬とを、癌を有する対象に投与することを含む方法である。現在の C A R T 細胞免疫療法に伴う欠点を踏まえると、治療に対する持続性且つ有効な応答を提供するための、さらなる強化が必要とされる。したがって、本開示は、本開示から明らかとなるであろう、また

30

40

【 0 0 5 0 】

養子キメラ抗原受容体細胞移植療法及び組成物

本明細書で提供される治療方法は、人工の標的腫瘍関連抗原（T A A）結合ドメインを発現するように形質導入された、すなわち、癌特異的な免疫応答を刺激するための、エクスピボで増殖された、遺伝子操作された T 細胞を投与することを含む。本明細書中で提供される組成物及び方法は、特に、臨床及び研究の両方の適用で利用される。理論により縛

50

られるものではないが、養子細胞移植、例えばCAR T細胞移植及び本明細書中で提供されるような長時間作用型IL-15受容体作動薬の免疫活性化の相補的機序ゆえに、所望のT細胞反応を刺激するためにIL-15経路を介して（即ち、養子細胞移植と共に、長時間作用型IL-15受容体作動薬を投与することを介して）抗腫瘍薬の転帰の改善が達成され得ると考える。

【0051】

あらゆる好適なキメラ抗原受容体T細胞（CAR T細胞）療法を、本明細書で提供される方法に使用することができ、この点に関しては開示は限定されない。例えば、Rosenberg, S., et al., *Adoptive Cell Transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*. 2008 Apr; 8(4): 299-308 及び Sadelain, M., et al., *Current Opinion in Immunology*, Vol 21(2), 215-223 (2009) を参照のこと；また、Kalos, M., et al., *Sci Transl Med* 2011; 3: 95ra73；及び Grupp SA, et al., *N Engl J Med* 2013; 368: 1509-1518 を参照のこと。当技術分野で公知のあらゆる好適なCAR T細胞を、本明細書に記載した方法及び治療法において使用することができるということを理解されたい。本明細書での使用のための好適なCAR T細胞及び治療法の非限定的な例は、例えば米国特許出願公開第2017/0209492号明細書、及び同第2019/091308号明細書に、また、米国特許第8,911,993号明細書；同第8,975,071号明細書；同第9,328,156号明細書；同第9,987,308号明細書、及び同第10,253,086号明細書に記載するものに含まれる。

【0052】

1つ以上の実施形態では、CAR T細胞は、腫瘍抗原と結合する抗原結合ドメインを含む。さらにいくつかのさらなる実施形態では、腫瘍抗原は、CD19、CD20、CD22、及びROR1、並びに前述のものの組み合わせからなる群から選択される。さらにいくつかのさらなる実施形態では、CAR T細胞は、CD19と結合する抗原結合ドメインを含むCD19標的化T細胞である。例えば、Turtle, C.J., et al., *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 12 May 2016 (オンライン) を参照のこと。先行する段落で提供される例示的な刊行物に加えて、さらなる実例となるCD19 CAR T細胞、例えば、定義されたCD4+:CD8+組成物のCD19 CAR T細胞が、例えばTurtle, C.J., *J. Clin Invest*. 2016; 126(6): 2133-2138に記載される。本明細書に記載される方法及び治療法に使用するのに適したさらなるCAR T細胞には、B細胞悪性腫瘍を治療するのに使用するための、例えば、CD19指向性チサゲンレクルセル（KYMRIAH（登録商標））及びCD19指向性アキシカブタゲンシロロイセル（YESCARTA（登録商標））（これらはどちらもU.S.FDAによって承認されている）が含まれる。さらにいくつかの他の実施形態では、CAR T細胞は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）、すなわち、例えば、優勢なBリンパ球及び上皮癌において、また非小細胞肺癌及びトリプルネガティブ乳癌の亜群において発現されるが、正常なB細胞では発現されない腫瘍関連分子を発現する。本明細書に記載した方法及び治療法に有用なROR1-特異的CAR T細胞は、例えばHudecek, M., *Clinical Cancer Research*, June 2013, 19(12), 3153-3164；Hudecek, M., et al., *Blood* 2010, 116: 4532-4541；及び Sprecht, J.M., et al., *Cancer Research*, 78(13 Supplement): CT131, July 2018に記載されている。いくつかの実施形態では、細胞コンストラクトが、ROR1の細胞外ドメインのIg/Fc部分を標的にし、また、4-1BB/CD3細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、ROR1 CAR T作製プロセスは、自家末梢血液リンパ球を利用し、CD4及びCD8亜群に分離し、これらを

10

20

30

40

50

抗CD3 / 抗CD28 ビーズ及びIL-2と共に独立に培養し、次いで、ROR1 CARをコードするレンチウイルスベクターを用いて形質導入する。さらにいくつかのさらなる実施形態では、CAR T細胞生成物は、CD4+及びCD8+ CAR T細胞の1:1比で配合される。

【0053】

CAR T細胞療法は一般に、癌、特にその腫瘍細胞が主題の腫瘍抗原を発現する癌を患う患者を治療するための、CAR T細胞の投与を含む。いくつかの実施形態では、CAR T細胞は、本明細書に記載した通りの又は当技術分野で公知の方法によって調製される。例えば、単離後に、宿主T細胞を、標的腫瘍関連抗原認識ドメインを発現するように形質導入し、増殖させ、対象に再注入する。点滴前に、例えば、内因性制御性T細胞を抑制し、点滴されたCAR T細胞にとって最適化された環境を提供するために、リンパ球を枯渇させる骨髄非破壊的化学療法(NMC)を使用して、患者のプレコンディショニングも行い得；或いは、シクロホスファミド又は何らかの他の適切なコンディショニング剤を使用し得る。このようなプレコンディショニングは、ホメオスタシス性のサイトカインに対して移植細胞と競合するTreg(制御性T細胞)及びリンフトサイト(Lymphocyte)を排除するか又は実質的に数を減少させるために有用である。宿主細胞は、リンパ節、例えば鼠径部、腸間膜、浅遠位腋窩(superficial distal auxiliary)など；骨髄；脾臓；又は末梢血などの種々の供給源から、並びに腫瘍、例えば腫瘍浸潤リンパ球から単離され得る。細胞は、同種異系であってもよいし、又は好ましくは自家であってもよい。エクスピボ刺激について、宿主細胞は、当技術分野で公知のように、無菌的に取り出され、何らかの適切な培地中で懸濁される。形質導入後、細胞を刺激し、種々のプロトコルを使用して、特に抗CD3、B7、抗CD28などの組み合わせのいずれかを使用して増殖させる。宿主T細胞のエクスピボ増殖のための適切なプロトコルは、“Focus on Adoptive T Cell Transfer Trials in Melanoma”, *Clinical and Developmental Immunology*, Vol 2010, Art. ID 260267に記載されている。

【0054】

例えば、CAR T細胞の養子細胞移植は、(i)ヒトなどの哺乳類対象から自家リンパ球を得ること、(ii)自家リンパ球を、標的腫瘍関連抗原(TAA)認識又は結合ドメインを発現するように遺伝子操作すること、(iii)遺伝子操作されたリンパ球を培養して、増殖されたCAR T細胞を産生すること、及び(iv)増殖されたCAR T細胞を対象(すなわち、患者)に投与することによって実施することができる。自家養子細胞療法はまた、(i)自家リンパ球を、TAA結合ドメインを発現するように遺伝子操作すること、(ii)遺伝子操作されたリンパ球を培養して、増殖されたCAR T細胞を産生すること；(iii)骨髄非破壊的リンパ球除去化学療法(NMC)を対象に施すこと；及び(iv)NMCを施した後に、増殖されたCAR T細胞を投与することによって実施することができる。自家細胞は、血液から得ることもできるし、自家抗原提示細胞及び腫瘍由来ペプチドを使用してクローニングすることもできる。

【0055】

CAR T細胞は、本明細書に記載した通りの又は当技術分野で公知のあらゆる手段によって調製することができる。CAR及び/又はCAR T細胞を生成するための方法は、本明細書に記載されており、また、その方法が参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第6,319,494号明細書；同第6,410,319号明細書；同第7,446,179号明細書；同第7,446,191号明細書；同第7,514,537号明細書；同第7,741,465号明細書；及び同第9,987,308号明細書；米国特許出願公開第2016/0185861号明細書、同第2017/0137783号明細書、及び同第2019/0091308号明細書、並びにPCT出願/国際公開第2010/065818号パンフレット、同第2010/025177号パンフレット、及び同第2007/059298号パンフレットにも記載されている。CAR T細胞を生成す

10

20

30

40

50

るためのさらなる方法は、参照によって本明細書に組み込まれる、Berger C. et al., J. Clinical Investigation, 118:1 294-308 (2008) 及び Wang et al. (Molecular Therapy - Oncolytics (2016) 3, 16015) によって記載されている。

【0056】

CAR T細胞は、CARの結合特異性に基づいて、抗原認識の方向を変えることができる。CARは、CAR T細胞が腫瘍細胞表面上のその同族の抗原に結合された場合に、腫瘍細胞が影響を受けて、その結果患者における腫瘍量が低下、漸減、又は除去されるように、あらゆるTAAを標的にすることを提供することができる。T細胞は、本明細書に記載した通りの又は当技術分野で公知のあらゆる方法を使用して、1つ以上のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作することができる。一実施形態では、単離されたT細胞は、CARコンストラクトをコードする発現ベクターを用いてT細胞を導入することによって、CARコンストラクトを発現するように遺伝子操作される。選択されたCARコンストラクトを発現するT細胞集団を形質導入するための方法は、当技術分野で公知であり、参照によって本明細書に組み込まれる Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012) に記載されている。

10

【0057】

一般に、CARは、腫瘍細胞上のTAAと結合する細胞外認識又は結合領域/ドメイン又は細胞外ドメイン(例えば、抗体の単鎖断片可変領域(scFV))、膜貫通ドメイン、及び腫瘍細胞を攻撃するためのT細胞活性化のためのシグナルを提供することができる任意の細胞内ドメインを含む。

20

【0058】

一般に、本明細書に記載されるCARは、癌又は腫瘍細胞の細胞表面上に発現される分子(例えばタンパク質)に誘導される。いくつかのTAAは、当技術分野で公知であり、非限定的な例としては、リン酸化タンパク質、膜貫通タンパク質、糖タンパク質、糖脂質、及び成長因子が挙げられる。所与の化合物が、本明細書に記載される抗原又は標的のいずれかに対するCAR認識領域としての使用に適しているかどうかを決定するためのアッセイは、当業者による慣例的な実験を介して決定することができる。本明細書に記載した通りの又は当技術分野で公知のあらゆるCARを、本明細書で使用される方法及び細胞及び養子細胞免疫療法組成物において使用することができる。例示的なCARとしては、米国特許第7,446,190号明細書;同第7,741,465号明細書;同第9,499,629号明細書;同第9,987,308号明細書;及び同第10,253,086号明細書に記載されているものが挙げられる。

30

【0059】

いくつかの実施形態では、CAR認識ドメインは、B細胞の細胞表面上に発現される抗原を標的にする。いくつかの実施形態では、CARは、抗CD19認識又は結合ドメインを含む。実例となるCD19-CARコンストラクトとしては、次のものが挙げられる:(i)CD19指向性キメラ抗原受容体(CTL019)レンチウイルスベクター(SCFv:FMC63に由来するCAR抗原認識部分;共刺激ドメイン:4-1BB)、Maude, S.L., et al. N Engl J Med 2014; 371(16):1507-1517;(ii)抗CD-19単鎖可変断片+TCRゼータ及びCD28シグナル伝達ドメインを組み込んだCD19指向性キメラ抗原受容体、レトロウイルスベクター(SCFv:FMC63に由来するCAR抗原認識部分:FMC63;共刺激ドメイン:CD28)、Lee, D.W. et al., Lancet 2015; 385(9967):517-528;マウスステップ細胞(step cell)ウイルスベースのスプライス-gagベクター、(iii)Kochenderfer J.N., et al., J Immunother 2009; 32(7):689-702に記載されている通りの、抗CD19 CARをコードするMSGV-FMC63-28Z;(iv)CD-1

40

50

9 特異的 CD 28 / CD 3 二重シグナリング CAR、19 - 28 z (Park , J H , et al . , Blood , 30 June 2016 , 127 (26) , p . 3312 - 3320 , Table 1 に記載されているものに加えて、Brentjens , R J . , et al . , Sci Trans Med , 20 Mar 2013 : 5 (177) : 177) 。

【 0060 】

ヒト CD 19 抗原は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する 95 kDa 糖タンパク質である。CD 19 は、正常及び腫瘍性 B 細胞に対する、また濾胞樹状細胞に対するバイオマーカーとして使用される。CD 19 は、プレ B 細胞発生の初期段階から、最終分化まで発現され、B リンパ球の発生及び機能を調節する。CD 19 の発現は、非ホジキンリンパ腫などの B 細胞リンパ腫を含めた大抵の B 細胞腫瘍上で高度に保存される。CD 19 はまた、B 細胞白血病、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症 (WM) を含めた大抵の型の白血病において発現される。B 細胞悪性腫瘍 (リンパ腫及び白血病) の大部分は、通常 ~ 高いレベルで CD 19 を発現する。いくつかの実施形態では、CAR は、抗 CD 19 結合部分を含む。いっそうさらなる実施形態では、限定はされないが、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症 (WM) を含めた B 細胞悪性腫瘍の治療において、長時間作用型 IL - 15 受容体作動薬と CD 19 指向性 CAR T 細胞との組み合わせが使用される。いくつかの好ましい実施形態では、CD 19 CAR T 細胞療法は、CD - 19 指向性の遺伝子改変された自家 T 細胞を含む。

【 0061 】

CD 19 CAR T 細胞療法の応答の持続性に対する障害は、腫瘍細胞表面からの標的抗原 CD 19 の下方調節と特定されている (Shah , et al . , Frontiers in Oncology (2019) Vol . 9 , Article 146) 。いくつかの実施形態では、CAR T 細胞療法は、CD 19 及び 1 つ以上の追加の TAA へのターゲティングを含む、マルチターゲットの CAR T 細胞療法である。いくつかの実施形態では、CAR T 細胞療法は、CD 19 認識又は結合ドメイン、並びに 1 つ以上の追加の TAA を発現する細胞集団の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態では、CAR T 細胞療法は、CD 20、CD 22、CD 38、CD 123、CD 70、又は CD 30 から選択される TAA へのターゲティングを含む。いくつかの実施形態では、CAR T 細胞療法は、各集団が異なる CAR を発現する、2 つ以上の細胞集団を含む。細胞集団は、混合物として投与することもできるし、逐次的に同時投与することもできる。好ましくは、マルチターゲットの CAR T 細胞療法は、抗 CD 19 CAR T 細胞、及び、CD 20、CD 22、CD 38、CD 123、CD 70、又は CD 30 から選択される 1 つ以上の追加の TAA に誘導される CAR T 細胞の投与を含む。いくつかの他の実施形態では、CAR T 細胞療法は、ROR 1 である TAA へのターゲティングを含む。

【 0062 】

いくつかの実施形態では、CAR は、1 つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含む。例示的な共刺激ドメインとしては、限定はされないが、CD 3 を伴う CD 28、CD 123、又は 4 - 1 BB が挙げられる。

【 0063 】

T 細胞などのリンパ球の増殖は、当技術分野で公知の多くの方法のいずれかにより遂行され得る。例えば、T 細胞は、フィーダーリンパ球及びインターロイキン - 2 (IL - 2)、IL - 7、IL - 15、IL - 21 又はそれらの組み合わせの存在下で非特異的な T 細胞受容体刺激を使用して増殖させ得る。非特異的な T 細胞受容体刺激物は、例えばマウスモノクローナル抗 CD 3 抗体 (例えば LS Bio , Seattle WA から入手可能) の刺激量を含み得る。或いは、T 細胞は、(エピトープなどのその抗原部分を含む) 1 つ以上の抗原によるインビトロでの末梢血単核細胞 (PBMC) の刺激により迅速に増殖させ得、これは、場合により、T 細胞増殖因子、例えばインターロイキン - 2 又はインタ

ーロイキン - 15 などの存在下でヒト白血球抗原 A 2 (H L A - A 2) 結合ペプチドなど、任意選択によりベクターから発現され得、インターロイキン - 2 が好ましい。インビトロ誘導性 T 細胞は、H L A - A 2 発現抗原提示細胞上に対してパルス処理される癌の同じ抗原での再刺激により迅速に増殖する。或いは、T 細胞は、照射済み自家リンパ球で、又は照射済み H L A - A 2 + 同種異系リンパ球及びインターロイキン - 2 で再刺激され得る。

【 0 0 6 4 】

増殖させた T 細胞の特異的な腫瘍反応性は、当技術分野で公知のいずれかの方法によって、例えば腫瘍細胞との同時培養後にサイトカイン (例えばインターフェロン - ガンマ) 放出を測定することによって、試験され得る。例えば、養子細胞移植は、細胞の迅速な増殖前に C D 8 + T 細胞に対して培養 T 細胞を濃縮することを含み得る。インターロイキン - 2 を含有する培地中での T 細胞の培養後、T 細胞では、C D 4 + 細胞を枯渇させ、例えば C D 8 マイクロビーズ分離を使用して C D 8 + 細胞について濃縮する。一部の実施形態において、自家 T 細胞の増殖及び活性化を促進する T 細胞増殖因子は、自家 T 細胞と同時に、又は自家 T 細胞に続いてのいずれかで対象に投与される。T 細胞増殖因子は、自家 T 細胞の増殖及び活性化を促進する何らかの適切な増殖因子であり得る。適切な T 細胞増殖因子の例としては、インターロイキン (I L) - 2、I L - 7、I L - 15、I L - 12 及び I L - 21 が挙げられ、これらは、単独で使用してもよいし、又は I L - 2 及び I L - 7、I L - 2 及び I L - 15、I L - 7 及び I L - 15、I L - 2、I L - 7 及び I L - 15、I L - 12 及び I L - 7、I L - 12 及び I L - 15 又は I L - 12 及び I L 2 など、種々の組み合わせで使用してもよい。

【 0 0 6 5 】

蛍光活性化細胞分類分析によって、及び H L A - A 2 - 8 8 8 黒色腫株ではなく H L A - A 2 + 5 2 6 黒色腫株のインビトロでの認識によって、C A R T 細胞中のキメラ抗原受容体の発現を非形質導入 (U n T d) 及び形質導入 (T d) 細胞において比較する (R o s e n b e r g , S . , e t a l . , N a t R e v . C a n c e r , 2 0 0 8 A p r ; 8 4 (4) : 2 9 9 - 3 0 8) 。 Q a s i m , W . , e t a l . , S c i . T r a n s l . M e d . 9 , e a a j 2 0 1 3 (2 0 1 7) に記載のものなど、ユニバーサルタイプの T 細胞も使用され得る。例えば、レンチウイルス形質導入と組み合わせて T A L E N 介在性細胞操作を使用してユニバーサル C A R 1 9 T 細胞を作製し、養子細胞療法で使用し得る。この細胞は、非ヒト白血球抗原適合ドナー細胞のレンチウイルス形質導入及び T 細胞受容体 鎖及び C D 5 2 遺伝子座の同時転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) 介在性遺伝子編入により作製される。

【 0 0 6 6 】

C A R T 細胞を投与する前に、治療法の有効性を向上させるために、患者の状態を、化学療法 (例えば、例えば米国特許第 9 , 8 5 5 , 2 9 8 号明細書に記載されている、シクロホスファミド及びフルダラビン) であらかじめ整えることができる。理論に関して制限されないが、化学療法であらかじめ状態を整えることにより、通常のリンパ球の除去によって C A R T 細胞の増殖のための空間を作り出すことができる、及び / 又はサイトカインシンク (s i n k) を排除して、C A R T 細胞増殖を促進する恒常性維持サイトカインの利用能を増大させることができる、及び / 又は制御性 T 細胞 (T r e g) 及び骨髓系由来サプレッサー細胞などの免疫抑制性細胞の数を減少させることができる (N a i r e t a l .) 。あらゆる好適な化学療法的方法を、当技術分野で公知の通りに使用することができるということを理解されたい。

【 0 0 6 7 】

次に、点滴により、例えば静脈内もしくは動脈内点滴又は他の適切な送達形態により、増殖させた細胞を宿主に投与し、これは、一般的には約 3 0 ~ 約 6 0 分間続くが、より短い又はより長い持続時間が利用され得る。投与の他の経路としては、腹腔内、くも膜下腔内及びリンパ内注射が挙げられる。場合により種々の薬学的に許容可能な添加物、結合剤、充填剤、担体、保存剤、安定化剤、乳化剤、緩衝液などのいずれかを含み得る適切な培地中で増殖させた細胞を提供する。希釈剤及び賦形剤としては、水、食塩水及びグルコ

10

20

30

40

50

ースが挙げられる。代表的な培地としては、例えば約 5.5 ~ 8.0 の正常 pH 範囲を有する Multiple Electrolytes Injection, Type 1, USP; ヒト血清又は胎児ウシ血清を含有する組織培養培地; 又は異種成分不含及び血清不含培地、例えば PRIME - XV T Cell Expansion X SFM (Irvine Scientific) などが挙げられるが限定されない。市販培地としては、例えば、RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、AIM V 細胞培養培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) 及び X - VIVO 15 (Lonza, Basel, Switzerland) が挙げられる。

【0068】

IL - 15 受容体作動薬

本明細書に記載される方法は、1つ以上の実施形態において、長時間作用型の IL - 15 受容体作動薬の投与を含む。化合物は、対象への投与後に、作動薬が、非改変形態の同じインターロイキン - 15 受容体作動薬部分の投与の場合よりも長い時間、インビボでの IL - 15 アゴニズムを呈する限り、本開示による長時間作用型 IL - 15 受容体作動薬であるとみなされる。化合物を放射標識し、その化合物をインビボで投与し、そのクリアランスを決定することを含むものなどの従来手法を使用して、化合物が長時間作用型 IL - 15 受容体作動薬である(すなわち、同じインビボ系で投与された非改変 IL - 15 よりも長いクリアランスを有する)かどうかを評価することができる。例えば、IL - 15 受容体作動薬の長時間作用性は、マウスにおける作動薬の投与後の様々な時点でのリンパ球における STAT5 リン酸化を測定するためのフローサイトメトリーを使用して決定することができる。参考として、シグナルは、IL - 15 ではおよそ 24 時間で消失するが、本明細書に記載される長時間作用型 IL - 15 作動薬については、それよりも長い期間持続する。

【0069】

長時間作用型の IL - 15 受容体作動薬は、薬学的に許容し得る塩の形態であり得、長時間作用型 IL - 15 受容体作動薬に対する言及は、薬学的に許容し得るその塩を包含することが意図される。典型的には、かかる塩は薬学的に許容可能な酸又は酸等価物との反応によって形成される。これに関連して用語「薬学的に許容可能な塩」は、概して、比較的非毒性の無機酸及び有機酸付加塩を指し得る。これらの塩は、投与媒体又は剤形製造過程においてインサイチューで、又は別途本明細書に記載されるとおりの長時間作用型インターロイキン - 15 受容体を好適な有機酸又は無機酸と反応させて、そのようにして形成された塩を単離することにより調製し得る。代表的な塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩 (naphthylate)、シュウ酸塩、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、及びラウリルスルホン酸塩などが挙げられる。(例えば、Berge et al. (1977) 「薬学的塩 (Pharmaceutical Salts)」, J. Pharm. Sci. 66: 1 - 19 を参照のこと)。従って、記載されるとおりの塩は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸などの無機酸に由来してもよく; 又は酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パルミチン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸 (salicylic)、スルファニル酸、2 - アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸 (isothiononic) などの有機酸から調製されてもよい。

【0070】

例示的な長時間作用型 IL - 15 受容体作動薬は、構造:

10

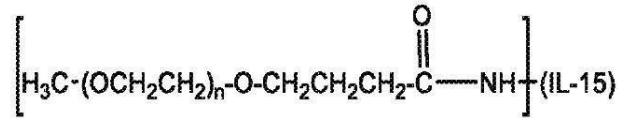
20

30

40

50

【化2】



式(I)

(式中、IL-15は、インターロイキン-15部分であり、(n)は、約150～約3,000の整数であり、~NH~は、IL-15部分のアミノ基を表す)

によって包含される。上述のIL-15受容体作動薬は、本明細書ではモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15(すなわち、MPBA-IL15)と称される。モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15の実例となる調製を、実施例1に示す。

10

【0071】

式(I)の長時間作用型IL-15受容体作動薬に関連する1つ以上の実施形態では、(n)は、約795～約1068の範囲である。いくつかの追加の実施形態では、(n)は、約840～約1023の範囲である。1つ以上の特定の実施形態では、(n)は、平均すると、約907又は約909の値を有し、その結果、ポリエチレングリコール鎖の平均分子量は、約40,000ダルトンである。

【0072】

モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15(MPBA-IL15)は、典型的には、主にモノPEG化IL-15(すなわち、IL-15のアミノ基に、すなわちIL-15のリジンに又はN末端アルファアミンに共有結合的に付着された単一のメトキシPEG-N-ブタンアミド部分を有する)の分類として調製され、微量のジペグ化及びそれ以上のペグ化IL-15種を伴う。モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15のさらなる特徴は、例えば、国際公開第2018/213341号パンフレットに記載されている。

20

【0073】

MPBA-IL15の実例となる組成物は、主としてモノPEG化種を含み、約10モル%未満のPEG二量体(すなわち、IL-15に付着した2つのメトキシPEG-N-ブタンアミド部分を有するもの)、及びさらに少ない量のIL-15に付着したそれ以上のPEG化種(すなわち、IL-15に付着した3つ以上のメトキシPEG-N-ブタンアミド部分を有するもの)を伴う。モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15の組成物は、一般に、(非改変IL-15(存在するならば)及び他のIL-15含有種、例えば、ジPEG化IL-15及びより大きいものを含めた、組成物中のすべてのインターロイキン-15種に基づいて)少なくとも約80モル%のモノPEG化IL-15種を有することとなる。MPBA-IL15の組成物は、好ましくは、約10モル%未満の他のIL-15種と共に、少なくとも約90モル%のモノPEG化IL-15種を有し得る。いくつかの実施形態では、MPBA-IL15組成物は、約5モル%未満のPEG二量体(IL-15に共有結合的に付着された2つのメトキシPEG-N-ブタンアミド部分を有するジPEG化IL-15)と、約5モル%未満の他のすべてのそれ以上のPEG化種を含む。1つ以上の実施形態では、MPBA-IL15組成物は、少なくとも約85モル%、90モル%、95モル%、98モル%、又は99モル%の式(I)のモノPEG化種を含む。

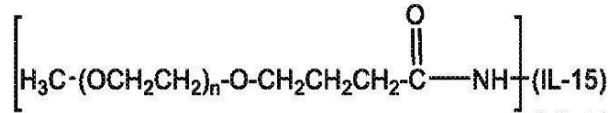
30

40

【0074】

例えば、いくつかの好ましい実施形態では、長時間作用型IL-15受容体作動薬組成物は、集合的に考えられる場合、式：

【化3】



2、3、又は3よりも大きい

式(II)

(式中、nの値は、すべての実施形態について先に記載された通りである)によって包含される、(組成物中のIL-15含有分子の)多くとも約20モルパーセント(モル%)の長時間作用型IL-15受容体作動薬を含む、又は式(II)に従って集合的に考えられる場合、(組成物中のIL-15含有分子の)多くとも約15モルパーセント(モル%)の長時間作用型IL-15受容体作動薬を含む、又は式(II)に従って集合的に考えられる場合、(組成物中のIL-15含有分子の)多くとも約10モルパーセントの長時間作用型IL-15受容体作動薬を含有する。

10

【0075】

いくつかの実施形態では、MPBA-IL15組成物は、約0.1~15、0.1~10、0.1~5、0.1~1、1~20、1~15、1~10、1~5、5~20、5~15、5~10、10~20、10~15、又は約15~20モル%の式(II)の化合物を含む。

【0076】

いくつかの追加の実施形態では、長時間作用型IL-15受容体作動薬組成物は、集合的に考えられる場合、(組成物中のIL-15含有分子の)多くとも約1~5モル%の遊離のIL-15タンパク質を含む。

20

【0077】

上の式に関して、「n」は、(OCH₂CH₂)単量体サブユニットの平均数に相当する。MPBA-IL15は、例えば約6600ダルトン~約132,000ダルトンの平均分子量を有する適切に活性化されたmPEG-ブタン酸エステル試薬を使用して、調製することができる。例えば、MPBA-IL15は、例えば、10kD、15kD、20kD、25kD、30kD、45kD、50kD、又は60kDから選択される平均分子量を有する適切に活性化されたmPEG-ブタン酸エステル試薬を使用して調製することができる。活性化されたポリマー試薬は、IL-15のアミノ基(例えば、リジン又はN末端)と反応した場合、IL-15部分とポリエチレングリコール部分との間の安定なアミド結合を形成するのに有効である。

30

【0078】

1つ以上の実施形態では、nは、約10,000ダルトン(ここではnは約227である)、又は約15,000ダルトン(ここではnは約340である)、又は約20,000ダルトン(ここではnは約454である)、又は約25,000ダルトン(ここではnは約568である)、又は約30,000ダルトン(ここではnは約681である)、又は約40,000ダルトン(ここではnは約909である)、又は約50,000ダルトン(ここではnは約1136である)、又は約60,000ダルトン(ここではnは、約1364である)以上からなる群から選択される重量平均分子量を有するポリエチレングリコール部分に相当する値を有する整数である。

40

【0079】

MPBA-IL15を調製するために使用される、実例となるPEG試薬は、典型的には、約1.1未満、例えば、約1.05の多分散値を有することとなる。したがって、約40,000ダルトンの名目上の平均重量を有するmPEG-ブタン酸スクシンイミジルなどのPEG試薬の場合、PEG試薬(及び得られるIL-15コンジュゲート)は、約35キロダルトン~約47キロダルトン、又は約37キロダルトン~約45キロダルトン(41kD±4kDa)の分子量範囲の、共有結合的に付着されたPEG部分を有することとなる。いくつかの好ましい実施形態では、mPEGブタン酸活性化するエステル試薬

50

は、約40キログラムの名目上の平均分子量を有する、すなわち、ここでは、平均すると、nは約907~909である。

【0080】

IL-15部分を考慮する場合、用語「IL-15部分」は、コンジュゲート形成前のIL-15部分と、コンジュゲート形成後のIL-15部分を指す。しかし、元々のIL-15部分が、ポリエチレングリコール部分に付着される時に、ポリマーに対する結合と関連する1つ以上の共有結合の存在に起因して（例えばMPBA-IL15の調製中に形成されるアミド結合の場合に）、IL-15部分がわずかに変化することが理解されよう。

【0081】

IL-15部分は、非組換え方法及び組換え方法から得ることができ、本開示は、この点に関して限定されない。さらに、IL-15部分は、ヒト起源、動物起源（昆虫を含めて）、真菌起源（酵母を含めて）、及び植物起源から得ることができる。

10

【0082】

IL-15部分は、例えばGrabstein et al. (Grabstein et al. (1994) Science 264:965-968) によって記載されている手順に従って得ることができる。IL-15部分はまた、例えばImmuneX Corporationに対する欧州特許第0772624 B2号明細書に記載されているものなどの組換え方法を使用して調製することもできる。或いは、IL-15部分は、例えばGenScript USA Inc. (Piscataway NJ) 及びPeprrotech (Rocky Hill, NJ) から市販品として購入することができる。

20

【0083】

より具体的には、IL-15部分は、細菌[例えば、大腸菌(E. coli)、例えば、Fischer et al. (1995) Biotechnol. Appl. Biotechnol. 21(3):295-311を参照のこと]、哺乳類[例えば、Kronman et al. (1992) Gene 121:295-304を参照のこと]、酵母[例えば、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)、例えば、Morel et al. (1997) Biochem. J. 328(1):121-129を参照のこと]、及び植物[例えば、Moret et al. (2001) Biotechnol. Bioeng. 75(3):259-266を参照のこと]発現系において発現させることができる。発現は、外来性の発現を介して（宿主細胞が、所望される遺伝暗号を天然に含有する場合）、又は内在性の発現を介して起こり得る。

30

【0084】

IL-15部分の調製及び/又は精製のさらなる方法は、PCT出願/米国特許出願公開第2018/032817号明細書に記載されている。

【0085】

IL-15活性を有するタンパク質を発現させるために使用される系に依存して、IL-15部分は、非グリコシル化又はグリコシル化であり得、いずれかを使用することができる。すなわち、IL-15部分を非グリコシル化することもできるし、IL-15部分をグリコシル化することもできる。1つ以上の実施形態では、IL-15部分は、非グリコシル化である。

40

【0086】

IL-15部分は、アミノ酸の側鎖内の原子へのポリマーの容易な付着を提供するために、好都合なことに、例えば、リジン、システイン及び/又はアルギニンなどの1つ以上のアミノ酸残基を含む及び/又は置換するように改変することができる。IL-15部分の置換の例は、米国特許第6,177,079号に記載されている。さらに、IL-15部分は、天然に存在しないアミノ酸残基を含むように改変することができる。アミノ酸残基及び天然に存在しないアミノ酸残基を付加するための技術は、当業者に周知である。

【0087】

例示的なIL-15部分は、本明細書に、並びに文献に、例えば、米国特許出願公開第2006/0104945号明細書、Pettit et al. (1997) J. Bio

50

1. Chem. 272(4): 2312-2318, Wong et al., (2013) OncoImmunology 2(11), e26442: 1-3、及びPCT出願/国際公開第2018/213341号パンフレットに記載されている。好ましいIL-15部分には、配列番号1から3及びそれと実質的に相同の配列からなる群から選択される配列を含むアミノ酸配列を有するものが含まれる。好ましいIL-15部分は、配列番号1に相当するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、IL-15部分は、配列番号1~3のいずれか1つとの少なくとも約85%又は少なくとも約90%の同一性を有する機能相同体である。いくつかの実施形態では、IL-15部分は、配列番号1~3のいずれか1つとの少なくとも約95%、98%、又は99%の同一性を有する機能相同体である。

10

【0088】

ある種の場合には、IL-15部分は、該当するペプチドの単一の発現が、別の単位に組織化される、「単量体」形態となる。他の場合には、IL-15部分は、2つの単量体形態のタンパク質が、互いに会合される、「二量体」(例えば、組換え型IL-15の二量体)の形態となる。

【0089】

さらに、を、IL-15部分として使用することができる。例示的な前駆形態のIL-15は、配列番号3の配列を有する。

【0090】

前述の配列のいずれかの切断型、ハイブリッドバリエーション、及びペプチドミメティックも、IL-15部分として働くことができる。少なくともある程度のIL-15活性を維持する前述のもののいずれかの生物学的に活性な断片、欠失バリエーション、置換バリエーション、又は付加バリエーションも、IL-15部分として働くことができる。

20

【0091】

あらゆる所与のペプチド、タンパク質部分、又はコンジュゲートについて、そのペプチド、タンパク質部分、又はコンジュゲートが、ある程度のIL-15活性を有するかどうかを決定することが可能である。インビトロでのIL-15活性を決定するための様々な方法が、当技術分野で記載されている。例示的な手法は、pSTATアッセイに基づいている。簡単に言うと、IL-15依存性CTL-2細胞が、IL-15活性を有する被験物質に曝露されるならば、チロシン残基694(Tyr694)でのSTAT5のリン酸化を含むシグナルカスケードの開始が起こり、これを、定量的に測定することができる。アッセイプロトコル及びキットは公知であり、例えば、MSD Phospho(Tyr694)/Total STATa,b Whole Cell Lysate Kit (Meso Scal Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD)が挙げられる。例えば、この手法を使用して、5分又は10分の少なくとも1つで、多くとも約300 ng/mL(より好ましくは多くとも約150 ng/mL)のpSTAT5 EC₅₀値を呈する、提案されるIL-15部分が、典型的には、本開示に関する「IL-15部分」であるとみなされる。しかし、使用されるIL-15部分は、より強力である(例えば、5分又は10分の少なくとも1つで150 ng/mL未満の、例えば、5分又は10分の少なくとも1つで、約1 ng/mL未満、いっそう好ましくは0.5 ng/mL未満のpSTAT5 EC₅₀値を有する)ことが好ましい。

30

40

【0092】

IL-15機能を評価するために、電位測定法、分光光度法、クロマトグラフィー、及び放射測定方法論を含めた、当技術分野で公知他の方法論も使用することができる。例えば、そのようなさらなる型のアッセイについては、Ring et al. (2012) Nat. Immunol. 13(12): 1187-1195を参照のこと。

【0093】

先に記載した通り、IL-15部分上のアミノ基は、式(I)によって包含されるIL-15受容体作動薬を提供するための、mPEG-ブタン酸スクシンイミジル試薬との反応のための付着の部位を提供する。本明細書に提供される例示的なIL-15アミノ酸配

50

列を考慮すれば、それぞれがコンジュゲート形成のために利用可能であり得る。 - アミノ酸を有する7つのリジン残基が存在することは明らかである。さらに、メチオニンのN末端アミンも、PEG部分に対する付着点として働くことができる。ポリエチレングリコール部分は、リジン又はN末端アミン位置のいずれか1つ以上に付着することができるということを理解されたい。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール部分付着部位は、 $Ly s^{10}$ 及び $Ly s^{11}$ （例として配列番号2に示す通りのナンバリングを使用する）又は配列番号1を使用して $Ly s^{11}$ 及び $Ly s^{12}$ の1つ以上にある。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール部分は、N末端アミンに付着される。リジン部位のいずれか（例えば配列番号1の $Ly s^{37}$ 又は $Ly s^{42}$ ）が、PEG部分のための付着部位として適切であり得るということを理解されたい。いくつかの実施形態では、MPBA - IL15は、位置異性体の混合物を含み、ここでは、ポリエチレングリコール部分の共有結合は、主にN末端にある（すなわち、位置異性体を集めたものの中で、N末端に付着したPEG部分を有する異性体は、他の位置異性体と比較した場合に、最も多い量で存在する。

10

【0094】

MPBA - IL15は、すべてのIL - 15受容体サブユニット（IL - 15、及びサブユニット）への結合を介する、毎日の投薬の必要なしに、持続されるIL - 15生物活性を提供する免疫療法薬である。より具体的には、MPBA - IL15は、IL - 15受容体とインターロイキン - 2（IL - 2）/IL - 15サブユニットに結合し、NK細胞とCD8 +メモリーT細胞との両方に対する薬力学的（PD）効果を含めた、IL - 15生物学の全範囲を維持し、その一方で、ポリエチレングリコール部分が分子の流体力学的体積を拡大し、これが、非改変rhIL - 15と比較して有効な半減期を延長する働きをする。

20

【0095】

げっ歯類及び非ヒト霊長類における前臨床研究では、MPBA - IL15は、CAR T細胞療法と組み合わせた場合に、本発明者らによって特に好都合であるとみなされる特徴を有することが示されている。例えば、MPBA - IL - 15は、(i)NK細胞増殖を刺激及び拡大する、(ii)抑制性の制御性T細胞を実質的に誘発せずに、CD8 T細胞生存及びメモリー形成を補助する、(iii)長期の免疫記憶の形成を増強し、さらに、IL - Rへの受容体結合を保持するが、非改変IL - 15よりも低い親和性を有することが示されている。

30

【0096】

本明細書で提供される方法に使用するのに適している可能性がある追加のIL - 15受容体作動薬としては、例えば、N - 803（以前はALT - 803、変異IL - 15 / IL - 15R融合タンパク質、例えば、Han, K., et al., Cytokine, 2011; 56(3): 804 - 810; Zhu, X., et al., J Immunol. 2009; 183(6): 3598 - 3607、及びXu, W., et al., Cancer Res. 2013; 73(10): 3075 - 3086を参照のこと）、NIZ985（ヘテロ二量体IL - 15、IL - 15 / 可溶性IL - 15R二量体、例えば、AACR; Cancer Res 2019; 79(13 Suppl)を参照のこと）、AM0015（ポリエチレングリコール修飾IL - 15、例えば、国際公開第2017 / 112528号パンフレットを参照のこと）、及びOXS - 3550（単鎖、抗CD16及び抗CD33抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域と改変形態のIL - 15からなる三重特異性scFv組換え融合タンパク質コンジュゲート、CAS Registry No. 2094086 - 30 - 1, UNI: E5GE91Q5FX）などの分子が挙げられる。

40

【0097】

方法

長時間作用型IL - 15受容体作動薬、MPBA - IL15の少なくとも1つ以上の特徴に基づいて、一態様では、本明細書で提供されるのは、腫瘍細胞を標的にするキメラ抗原受容体を発現するように遺伝的に形質転換されている自家又は同種間の（好ましくは自

50

家の)抗腫瘍T細胞、例えば先に記載した通りの及び抗腫瘍活性を有するCD19 CAR T細胞、を含む養子細胞免疫療法組成物を投与することによって、MPBA-IL15の投与前に癌患者における免疫応答を誘導し、それと共に/それに続いて長時間作用型IL-15受容体作動薬、すなわちMPBA-IL15の投与を行い、それによって治療効果の増強を達成するのに有効な方法である。好ましい実施形態では、T細胞免疫療法は、CD19指向性の遺伝子改変された自家T細胞を含む。実例となる養子細胞免疫療法組成物は、癌に関連する抗原(例えばCD19)に誘導される抗体の細胞外可変ドメイン、ヒンジ及び膜貫通ドメイン、及びT細胞又は他の受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン(共刺激ドメインなど)を含むキメラ抗原受容体を発現するように改変された腫瘍反応性のT細胞を含む。例えば、腫瘍反応性のT細胞は、CD19分子に誘導される単鎖抗体に由来するキメラ抗原受容体で改変することができる。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、CARで改変された細胞傷害性腫瘍細胞、例えば、CD19 CARで改変されたCD8+Tリンパ球を含み、さらに、他の種類のTリンパ球(例えば、ヘルパーTリンパ球)、例えば、癌に関連する抗原(例えばCD19)に誘導されるキメラ抗原受容体を有するように遺伝子改変されているCD4+又は他のT細胞を含むことができ、本開示は、この点に関して(すなわち、CAR T細胞、例えばCD19指向性CAR T細胞を含む養子細胞免疫療法組成物の特定の構成に)限定されない。本明細書で提供される方法に使用するのに適した代表的なCAR T細胞組成物は、先行するセクションに記載されている。

10

【0098】

いくつかの実施形態では、養子細胞免疫療法組成物中に含まれる細胞は、最初にその培養培地から回収し、続いて洗浄し、治療有効量での投与に適した媒体及び容器系に細胞を濃縮することによって配合される。好適な注入媒体は、例えば、特に、通常の生理食塩水、RPMI 1640(ThermoFisher)、AIM V無血清培地(ThermoFisher)、及びX-VIVO(商標)培地(Lonza Walkersville)、5%デキストロス水溶液、又は乳酸リンゲル液などの、あらゆる等張性の媒体調合物であり得る。

20

【0099】

CAR T細胞、例えばCD19 CAR T細胞を含む養子細胞免疫療法組成物は、典型的には、治療有効量で、すなわち、対象に免疫を与えるのに有効な量で投与される。免疫は、リンパ球応答が誘導される腫瘍又は癌に伴う1つ以上の身体症状を和らげることを意味する。養子細胞免疫療法組成物は、典型的には、注入によって投与され、各注入は、少なくとも2個の細胞から少なくとも $10^6 \sim 10^{10}$ 個の細胞/kg、好ましくは少なくとも $10^7 \sim 10^9$ 個の範囲の細胞/kg、又は好ましくは少なくとも $10^6 \sim 10^8$ 個の範囲の細胞/kgを含む。いくつかの具体的な、ただし非限定的な実施形態では、各注入は、少なくとも約 0.2×10^6 細胞/kg \sim 約 6.0×10^8 細胞/kg、少なくとも約 2.0×10^6 細胞/kg \sim 約 2.0×10^8 細胞/kg、少なくとも約 0.2×10^6 細胞/kg \sim 約 5.0×10^6 細胞/kg、少なくとも約 0.1×10^8 細胞/kg \sim 約 2.5×10^8 細胞/kg、又は少なくとも約 0.6×10^8 細胞/kg \sim 約 6.0×10^8 細胞/kgを含む。細胞は、単回注入によって、又は複数回注入によって投与することができる。いくつかの特定の実施形態では、細胞は、単回投与注入として投与される。別の個体は応答性が異なるので、注入される細胞の数、並びに注入の回数、及び複数回注入が施される時間範囲は、慣例的な調査によって決定される場合に、医療従事者によって決定することができる。いくつかの実施形態では、T細胞免疫療法の施与に、リンパ球除去化学療法レジメンの施与、例えば、(典型的には静脈内への)シクロホスファミド及び(典型的には静脈内への)フルダラピンの投与が先行する。

30

40

【0100】

本明細書に記載される方法によれば、長時間作用型IL-15受容体作動薬は、CAR T細胞免疫療法の結果を増強するのに有効な量で投与される。確認のために、長時間作用型IL-15受容体作動薬、MPBA-IL15に関して、活性化の量及び程度は広く変動する可能性があり、養子細胞免疫療法組成物の投与と組み合わせた場合にやはり有効で

50

あり得る。すなわち、十分に長い期間、最小限の I L - 1 5 受容体作動薬活性のみを呈する量の M P B A - I L 1 5 は、C A R T 細胞療法と組み合わせて投与される場合に限り、やはり長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬であり得、本明細書に記載した方法は、臨床的に意味のある応答を可能にする。ある種の場合には、(例えば)相乗的相互作用及び応答のおかげで、C A R T 細胞療法、例えば、C D 1 9 C A R T 細胞療法を伴う場合、最小限の I L - 1 5 受容体作動薬活性のみが必要とされる可能性がある。投与される長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬の片方又は両方の治療量及び C A R T 細胞の数は、単独で投与される場合のいずれかの構成成分の治療有効量よりも低い可能性があるということを理解されたい。

【 0 1 0 1 】

本明細書に記載する通り、本開示の一態様は、(特に)養子細胞免疫療法組成物と長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬のいずれか又は両方での治療に応答性である状態(癌など)を患う患者を治療するのに有用である方法を提供する。例えば、患者は、個々の薬剤単独、並びに組み合わせに応答性であり得るが、組み合わせに対して、より応答性である。さらなる例としては、患者は、個々の免疫療法薬の1つに対して非応答性であり得るが、組み合わせに対して応答性である。いっそうさらなる例としては、患者は、個々の薬剤単独のいずれかに対して非応答性であり得るが、組み合わせに対して応答性である。

【 0 1 0 2 】

長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬、M P B A - I L 1 5 は、当技術分野で公知のあらゆる好適な手段によって投与することができる。いくつかの実施形態では、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬は、非経口的に投与される。本明細書で使用する場合、用語「非経口」には、皮下、静脈内、動脈内、腫瘍内、リンパ内、腹腔内、心臓内、髄腔内、及び筋肉内注射、並びに注入が含まれる。

【 0 1 0 3 】

M P B A - I L 1 5 は、投与又はさらなる使用に適した組成物を形成するために、1つ以上の好適な賦形剤又は希釈剤と組み合わせることができる。長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬は、1種以上の薬学的に許容し得る賦形剤を任意に伴う単回投与組成物に含まれ得る。好適な薬学的に許容し得る賦形剤としては、例えば、Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th ed., Rowe, R. C., Ed., Pharmaceutical Press, 2012に記載されているものが挙げられる。そのような例示的な製剤は、M P G A - I L 1 5 を、リン酸緩衝液及びトレハロース(6.8のpH)を含む溶液に入れたものを含む。例えば、例示的な製剤は、M P B A - I L 1 5 を、リン酸カリウム緩衝液、トレハロース、及びポリソルベート20(約6のpH)の溶液中に配合したものを含む。

【 0 1 0 4 】

非経口投与のための好適な製剤型としては、特に、すぐに注射可能な液剤、使用前に溶媒と組み合わせるための乾燥粉末、すぐに注射可能な懸濁液、使用前にビヒクルと組み合わせるための乾燥不溶性組成物、及び投与前に希釈するための乳濁液及び液体濃縮物が挙げられる。いくつかの特定の実施形態では、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬は、静脈内投与に適した製剤で提供され、静脈内投与される。いくつかの他の実施形態では、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬は、皮下投与に適した製剤で提供され、皮下投与される。いくつかの追加の実施形態では、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬は、腫瘍内に投与される。肺内、鼻腔、頬側、直腸内、舌下、及び経皮などの、他の投与様式も企図される。

【 0 1 0 5 】

一般に、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬の治療有効量は、投与されるタンパク質(I L - 1 5 等価物)の用量に基づいて、約5mcg(µg)~約10mgの範囲となる。所与の用量を、例えば、臨床医が、適切なエンドポイント(例えば、治癒、退縮、部分退縮、その他)が達成されたと決定するまで周期的に投与することができる。

【 0 1 0 6 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、治療有効用量の長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬、M P B A - I L 1 5 は、約 0 . 1 0 ~ 7 0 m c g / k g (マイクログラム / キログラム、 μ g / k g (I L - 1 5 等価物)) の範囲である。他の実施形態では、治療有効用量は、約 0 . 1 0 m c g / k g ~ 約 5 0 m c g / k g、又は約 0 . 3 0 ~ 約 4 5 m c g / k g、又は約 0 . 2 5 m c g / k g ~ 約 0 . 1 m g / k g、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 0 . 1 m g / k g / 日、又は約 0 . 0 3 m g / k g ~ 約 0 . 1 m g / k g / 日の範囲である。他の実施形態では、治療有効用量は、約 1 ~ 1 0 m c g / k g、約 0 . 0 3 m g / k g ~ 約 0 . 1 m g / k g の範囲である。いくつかの具体的な、ただし非限定的な実施形態では、治療有効用量は、約 0 . 2 5 m c g / k g、0 . 3 m c g / k g、0 . 5 m c g / k g、1 m c g / k g、2 m c g / k g、3 m c g / k g、5 m c g / k g、6 m c g / k g、7 m c g / k g、1 0 m c g / k g、1 5 m c g / k g、2 0 m c g / k g、2 5 m c g / k g、0 . 0 1 m g / k g、0 . 0 3 m g / k g、0 . 0 5 m g / k g、又は 0 . 1 m g / k g である。

【 0 1 0 7 】

さらにいくつかのさらなる実施形態では、治療有効用量の長時間作用型 I L - 1 5 R 作動薬は、約 0 . 2 5 ~ 2 5 μ g / k g の範囲である。他の実施形態では、治療有効用量は、(例えば 1 日あたり) 約 0 . 2 5 μ g / k g ~ 約 0 . 1 m g / k g、約 1 . 0 μ g / k g ~ 約 2 0 μ g / k g、約 1 . 0 μ g / k g ~ 約 1 5 μ g / k g、約 1 . 0 μ g / k g ~ 約 1 0 μ g / k g、約 1 . 0 μ g / k g ~ 約 5 . 0 μ g / k g、約 1 μ g / k g ~ 約 1 . 5 μ g / k g、約 1 . 5 μ g / k g ~ 約 2 0 μ g / k g、約 1 . 5 μ g / k g ~ 約 1 5 μ g / k g、約 1 . 5 μ g / k g ~ 約 1 0 μ g / k g、約 1 . 5 μ g / k g ~ 約 5 . 0 μ g / k g、約 5 . 0 μ g / k g ~ 約 2 0 μ g / k g、約 5 . 0 μ g / k g ~ 約 1 5 μ g / k g、約 5 . 0 μ g / k g ~ 約 1 0 μ g / k g、約 1 0 約 1 . 5 μ g / k g ~ 約 2 0 μ g / k g、約 1 0 μ g / k g ~ 約 2 0 μ g / k g、約 1 0 μ g / k g ~ 約 1 5 μ g / k g、約 1 5 μ g / k g ~ 約 2 0 μ g / k g、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 0 . 1 m g / k g / 日、又は約 0 . 0 3 m g / k g ~ 約 0 . 1 m g / k g / 日の範囲である。他の実施形態では、治療有効用量は、約 1 ~ 1 0 μ c g / k g、約 0 . 0 3 m g / k g ~ 約 0 . 1 m g / k g の範囲である。いくつかの具体的な、ただし非限定的な実施形態では、治療有効用量は、約 0 . 2 5 μ g / k g、0 . 3 μ g / k g、0 . 5 μ g / k g、1 μ g / k g、1 . 5 μ g / k g、2 μ g / k g、3 μ g / k g、5 μ g / k g、6 μ g / k g、7 μ g / k g、1 0 μ g / k g、1 5 μ g / k g、2 0 μ g / k g、2 5 μ g / k g、0 . 0 1 m g / k g、0 . 0 3 m g / k g、0 . 0 5 m g / k g、又は 0 . 1 m g / k g / 日である。

【 0 1 0 8 】

養子細胞免疫療法組成物の投与の場合のように、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬の用量は、例えば、対象の年齢、体重、及び全身状態、並びに治療される状態の重症度、個別の養子細胞免疫療法組成物、及び医療従事者の判断に応じて変わることとなる。

【 0 1 0 9 】

1 つ以上の実施形態において、養子細胞移植は、長時間作用型の I L - 1 5 受容体作動薬の投与前に行われる。例えば、C A R T 細胞の養子細胞移植に基づく細胞点滴は、M P B A - I L 1 5 の投与前、1 時間まで、2 時間まで、3 時間まで、4 時間まで、5 時間まで、6 時間まで、7 時間まで、8 時間まで、9 時間まで、1 0 時間まで、1 1 時間まで、1 2 時間まで、1 日まで、2 日まで、3 日まで、4 日まで、5 日まで、6 日まで、7 日まで、8 日まで、9 日まで、1 0 日まで、1 1 日まで、1 2 日まで、1 3 日まで、1 4 日まで、1 5 日まで、1 6 日まで、1 7 日まで、1 8 日まで、1 9 日まで、2 0 日まで、2 1 日まで、2 2 日まで、2 3 日まで、2 4 日まで、2 5 日まで、2 6 日まで、2 7 日まで、2 8 日まで、2 9 日まで、1 か月まで、3 か月まで、6 か月まで、又は何らかのそれらの組み合わせですぐに行われ得る。

【 0 1 1 0 】

或いは、いくつかの実施形態では、養子細胞移植は、長時間作用型の I L - 1 5 受容体作動薬の投与後に実施される。例えば、C A R T 細胞の養子細胞移植に基づく細胞注入

10

20

30

40

50

は、MPBA-IL15の投与後、すぐに、1時間までに、2時間までに、3時間までに、4時間までに、5時間までに、6時間までに、7時間までに、8時間までに、9時間までに、10時間までに、11時間までに、12時間までに、1日までに、2日までに、3日までに、4日までに、5日までに、6日までに、7日までに、8日までに、9日までに、10日までに、11日までに、12日までに、13日までに、14日までに、15日までに、16日までに、17日までに、18日までに、19日までに、20日までに、21日までに、22日までに、23日までに、24日までに、25日までに、26日までに、27日までに、28日までに、29日までに、1か月までに、3か月までに、6か月までに、又はそのいずれかの組み合わせで行うことができる。

【0111】

癌を有する対象の治療に関して本明細書で使用する場合、用語「治療」、「治療する」、及び「治療すること」は、たとえ癌が実際に除去されないとしても、癌の1つ以上の症状を軽減させる、減速させる、停止させる、若しくは逆行させるための、又は癌の進行を遅延させるための組み合わせの投与などの、対象が患っている癌に対する全範囲の介入を含むことが意図される。治療には、例えば、症状の重症度、症状の数、又は再発の頻度の低下、例えば、腫瘍成長の抑制、腫瘍成長の阻止、又は既存の腫瘍の退縮が含まれ得る。

【0112】

例えば、癌又は癌関連疾患の改善は、完全奏功又は部分奏効と特徴付けることができる。「完全奏功」は、以前のあらゆるX線検査、骨髄、及び脳脊髄液(CSF)の異常、又はモノクローナルタンパク質測定値の異常の正常化を伴い、臨床的に検出可能な疾患がないことを指す。「部分奏効」は、新たな病変の非存在下での、すべての測定可能な腫瘍量(すなわち、対象に存在する悪性T細胞の数、又は腫瘍塊の測定される容積、又は異常なモノクローナルタンパク質の量)の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%低下を指す。用語「治療」は、完全奏功と部分奏効の両方を企図する。

【0113】

養子細胞免疫療法組成物の注入及び長時間作用型のIL-15受容体作動薬の投与の頻度及びスケジュールに関しては、当業者が、適切な頻度を決定することができるであろう。例えば臨床医は、治療サイクルにおいて、CAR-T細胞の養子細胞移植と同時に又は好ましくは養子細胞移植後のいずれかでの長時間作用型のIL-15受容体作動薬の投与と併用して養子細胞移植を行い得る。例えば一部の治療モダリティにおいて、長時間作用型のIL-15受容体作動薬をCAR-T細胞の養子細胞移植の約7日以内に(例えば1、2、3、4、5、6又は7日目のいずれか1日に)投与する。一部の例において、長時間作用型のIL-15受容体作動薬、すなわちMPBA-IL15を養子細胞移植の4日以内、例えば1、2、3又は4日目のいずれか1日に投与する。MPBA-IL15の長時間作用性質に基づき、IL-15受容体は、典型的には、比較的低頻度で(例えば3週間に1回、2週間に1回、8~10日に1回、週に1回など)投与する。

【0114】

治療過程に関連する例示的な時間の長さには、約1週間;約2週間;約3週間;約4週間;約5週間;約6週間;約7週間;約8週間;約9週間;約10週間;約11週間;約12週間;約13週間;約14週間;約15週間;約16週間;約17週間;約18週間;約19週間;約20週間;約21週間;約22週間;約23週間;約24週間;約7ヵ月;約8ヵ月;約9ヵ月;約10ヵ月;約11ヵ月;約12ヵ月;約13ヵ月;約14ヵ月;約15ヵ月;約16ヵ月;約17ヵ月;約18ヵ月;約19ヵ月;約20ヵ月;約21ヵ月;約22ヵ月;約23ヵ月;約24ヵ月;約30ヵ月;約3年;約4年;約5年が含まれる。一般的には、患者に1ラウンドの養子細胞移植、例えば、CD19 CAR-T細胞が提供され、続いて1回以上、長時間作用型のIL-15受容体作動薬、MPBA-IL15が投与されるが、一部の例においては、養子細胞移植の1回以上のさらなるサイクルが行われ得る。

【0115】

10

20

30

40

50

本明細書に記載される治療方法は、典型的には、患者ケアを監督する臨床医がその治療方法を有効である、即ち患者が治療に応答していると見なす限り継続される。治療方法が有効であることの指標となる非限定的なパラメータには、以下の1つ以上が含まれ得る：腫瘍縮小（重量及び/又は容積及び/又は外観の点で）；個別の腫瘍コロニーの数の減少；癌細胞の数の減少；腫瘍消失；無進行生存；好適な腫瘍マーカーによる適切な応答（該当する場合）、NK（ナチュラルキラー）細胞数の増加、T細胞数の増加、メモリーT細胞数の増加、セントラルメモリーT細胞数の増加、制御性T細胞、例えばCD4 + Treg、CD25 + Treg、及びFoxP3 + Tregの数の低下。

【0116】

先に記載した通り、養子細胞組成物（例えば、CAR T細胞を含む）と長時間作用型のIL-15受容体作動薬は、別々に投与することができる。或いは、初回用量として、又は治療過程全体にわたり、又は投与レジメンの様々な段階において、養子細胞移植及び長時間作用型のIL-15受容体作動薬の投与の提供が同時であることが所望される場合（及びCAT T細胞及び長時間作用型のIL-15受容体作動薬が、一緒に、及びある所与の製剤中で適合する）、単回剤形/製剤の点滴（例えば両方の免疫学的成分を含有する静脈内製剤の静脈内投与）により同時投与を達成し得る。

【0117】

本明細書に記載した方法及び組成物を、癌などの、本明細書に提供される方法によって治療（remedy）又は予防することができるあらゆる状態を患う患者を治療するために使用することができる。例えば、これらの方法は、例えば、その他の状態の中でも特に、固形腫瘍、血液系腫瘍（液状癌）、又は黒色腫の治療に有用である。例示的な状態は、癌、例えば、黒色腫、腎臓癌、非小細胞肺癌（non-small cell lung breast cancer）（例えばトリプルネガティブ乳癌）、膀胱癌、頭頸部癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵癌、脳癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、脳癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫及び白血病などである。

【0118】

一部の特定の実施形態において、癌は固形癌である。

【0119】

また一部のさらなる実施形態において、癌は、例えば、乳癌、卵巣癌、結腸癌、前立腺癌、骨癌、結直腸癌、胃癌、リンパ腫、悪性黒色腫、肝臓癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、甲状腺癌、腎臓癌、胆管癌、脳癌、子宮頸癌、上顎洞癌、膀胱癌、食道癌及び副腎皮質癌から選択される。

【0120】

また1つ以上のさらなる実施形態において、癌は、黒色腫、腎臓癌、非小細胞肺癌、乳癌、膀胱癌、頭頸部癌及び結腸癌から選択される。

【0121】

1つ以上の特定の実施形態において、乳癌はトリプルネガティブ乳癌である。トリプルネガティブ乳癌は、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体及びERBB2（HER2）遺伝子増幅を欠く非常に悪性度の高い腫瘍である。

【0122】

いくつかの他の実施形態では、癌は、リンパ腫又は白血病である。

【0123】

いくつかのさらなる実施形態では、癌は、限定はされないが、非ホジキンリンパ腫（N

H L)、急性リンパ芽球性白血病 (A L L)、慢性リンパ性白血病 (C L L)、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症 (W M) から選択される B 細胞悪性腫瘍であり、患者集団は、小児患者と成人患者の両方を包含する。

【 0 1 2 4 】

本方法は、例えば長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬、M P B A - I L 1 5 の投与によって対象の応答を向上させることによって、C A R T 細胞、例えば C D 1 9 C A R T 細胞の養子細胞移植の治療有効性を増強するのに有用である。応答の増強は、治療中、単一ラウンドの治療後、2 ~ 3 サイクルの治療後など、あらゆる好適な時点で、また、例えば、いくつかの好適な方法 (腫瘍の縮小 (部分奏効) を含む)、すなわち、腫瘍サイズ又は体積、腫瘍の消失、癌細胞の数の減少、疾患進行の低下 (癌が進行していないこと) の評価、及び適切な場合、1 つ以上の腫瘍検査マーカーの分析のいずれかによって、評価することができる。比較は、ヒト患者において、又は癌の好適なマウスモデルなどの好適な動物モデルにおいて行うことができる。

10

【 0 1 2 5 】

さらに一部の別の実施形態において、本明細書に提供される方法、キット、組成物、及び組み合わせは、対象における T 細胞及び / 又は N K 細胞活性及び / 又は増殖を刺激するために有効である。一部の実施形態において、本方法は、例えば対応する癌の癌マウスモデルにおいて評価する場合、対象における C D 8 + T 細胞の数の増加に有効である。さらに一部の他の実施形態において、本方法は、例えば対応する癌のマウスモデルにおいて評価する場合、対象における N K 細胞数を増加させるために有効である。

20

【 0 1 2 6 】

C A R - T 細胞を特徴付ける及びモニタリングし、限定はされないが N K 細胞、C D 8 + T 細胞、及び C D 8 + メモリー細胞を含めた免疫細胞集団の数及び活性化に対する、治療法の効果を評価するために、血液試料を、治療前と治療中の両方で、対象から収集することができる。遺伝子改変された C D 1 9 指向性 C A R - T 細胞の特徴付け及び持続的モニタリングは、治療前及び治療中に定量ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) によって、末梢血液において実施することができ、C A R - T 細胞の形質も、フローサイトメトリーによって評価することができる。血液試料はまた、治療法に応答するサイトカインレベルの変化を決定するために及び遺伝子発現の変化をプロファイルするために、治療前及び治療中に収集することができる。さらに、全血試料又は P B M C を収集し、他の免疫機能の評価のために使用することができる。

30

【 0 1 2 7 】

可能な場合、腫瘍細胞及び免疫系活性化の特徴付けのために、治療前、治療中、及び治療後に、新鮮な骨髄生検材料を収集することができる。評価には、腫瘍微小環境における腫瘍特異的なタンパク質マーカー及び免疫細胞集団の変化の評価が含まれ得る。骨髄における遺伝子改変された C D 1 9 C A R - T 細胞の特徴付け及びモニタリングは、長時間作用型 I L - 1 5 受容体作動薬、例えば M P B A - I L 1 5 の投与での治療前及び治療後に、定量ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) によって実施され得る。

【 0 1 2 8 】

腫瘍生検材料収集も行うことができる。生検は、好ましくは、以前に放射線に曝露されていない病変に実施するべきである。生検材料は、生検に適した他の病変が存在しないのでなければ、非標的病変から得ることができる。治療前と治療後の腫瘍組織生検材料は、好ましくは、可能であれば同じ病変から採取されるべきである。さらに、生検材料は、対照生検としての役割を果たすために、遠く離れた非注射病変から採取することができる。腫瘍組織生検を使用して、マーカーのパネル (限定はされないが、C D 3、C D 4、C D 8、及び C D 5 6 が含まれる) を使用する免疫組織化学 (I H C) 及び / 又はフローサイトメトリーを用いて、浸潤している免疫細胞集団を特徴付けることができる。

40

【 0 1 2 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組み合わせ免疫療法は、多くの A C T に基づく治療法とは対照的に、腫瘍部位での又は血液内の、外因的に送達される C A R

50

T細胞の程度及び残存性（すなわち維持）を増大し、それによって抗腫瘍有効性の増大を提供するのに有効である。

【0130】

本明細書において参照される全ての論文、書籍、特許、特許公報及び他の刊行物は、全体として参照により援用される。本明細書の教示と参照によって援用される技術との間に不一致が生じた場合、その教示の意味及び本明細書の定義が（特に本明細書に添付される特許請求の範囲で用いられる用語に関して）優先するものとする。例えば、本願及び参照によって援用される刊行物が同じ用語を別様に定義する場合、定義が載せられている文書の教示の範囲内でその用語の定義が維持されるものとする。

【実施例】

【0131】

前述の説明並びに以下の例は例示を意図するもので、本開示の範囲を限定する意図はないことが理解されるべきである。本開示が関係する技術分野の当業者には、本発明の範囲内の他の態様、利点及び変形例が明らかであろう。

【0132】

材料及び方法

CAR T細胞：CD19/4-1BB/CD3 CARを発現するヒトCD19 CAR T細胞を、以前に記載されている通りに、健康なドナーから産生した。例えば、Turtle, C. J., et al. J. Clin Invest. 2016; 126(6): 2123-2138及び米国特許第9,987,308号明細書を参照のこと。簡単に言うと、CD4 T細胞及びCD8 T細胞を単離し、CD19 CARレンチウイルスベクター（図2）を用いて別々に形質導入し、形質導入された細胞を選別し、次いで、LCL（リンパ芽球様B細胞株細胞を用いて14~16日間増殖させた；細胞を、15日目に分析した。

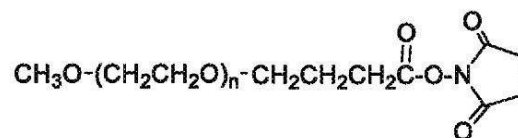
【0133】

従来の技術を使用して調製された、組換え型IL-15（「rIL-15」）配列番号1（図1に提供した通り）を、以下の実施例で使用したが、あらゆる好適なIL-15部分を同様に用いることができる。配列番号1、すなわち大腸菌（E. coli）封入体から発現及び精製される非グリコシル化組換え型ヒトIL-15は、115個のアミノ酸を含有し、2つのジスルフィド架橋を有し、約12.9kDaの分子量を有する。rIL-15配列には、天然の分泌されるヒトIL-15には存在しないN末端に追加されたメチオニンが含まれる。

【0134】

反応性の線状ポリマー試薬、mPEG-ブタン酸スクシンイミジル、40kDa（「mPEG-SBA」）、CAS No. 187848-51-7は、次の構造

【化4】



（式中、nは、約40キロダルトンの名目上の平均分子量を有するポリマーを提供するためのモノマーサブユニットの平均数に相当する、すなわち、ここでは、平均すると、nは約907~909である）

を有する。PEG試薬は、約1.1未満、例えば、約1.05の多分散値を有し、その結果、名目上の平均分子量は、約37キロダルトン~約45キロダルトン（41kDa±4kDa）の範囲である。mPEG-SBAは、典型的には、白色ないしオフホワイトの粉末の形状である。使用に適した追加のmPEG-ブタン酸スクシンイミジル試薬としては、例えば、約10kD、15kD、20kD、25kD、30kD、45kD、50kD、又

10

20

30

40

50

は60kDの重量平均分子量を有するものが挙げられる。この活性化型のポリマー試薬は、IL-15のアミノ基（例えば、リジン又はN末端）と反応した場合に、IL-15部分とポリエチレングリコール部分との間の安定なアミド結合を形成するのに有効である。

【0135】

モノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15は、例えば、下の実施例1に記載されている通りに調製することができる。モノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15（本明細書ではMPBA-IL15と称され得る）は、IL-15のリジンに又はN末端アルファアミンに共有結合的に付着された単一のmPEG-N-ブタンアミド部分を有する、主にモノPEG化されたIL-15の分類であり、微量のジペグ化及びそれ以上のペグ化IL-15種を伴う（CAS Registry No. 2361317-09-9）。モノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15の追加の特徴は、例えば、国際公開第2018/213341号パンフレット（その内容が参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されている。

10

【0136】

効力バイオアッセイ：MPBA-IL15の効力を、pSTAT5/全STAT5マルチプレックスアッセイ（Meso Scale Discovery, MD）を使用して、CTL2細胞、すなわちIL-15サブユニットを発現するマウスTリンパ球細胞株における、STAT5のリン酸化によって決定した。CTL2細胞上の受容体結合後、下流の細胞シグナル伝達が、リン酸化を介してSTAT5を活性化して、遺伝子発現を促進して細胞増殖を誘発する。効力アッセイについては、リガンド結合時の受容体の下流のSTAT5シグナル伝達分子のリン酸化を評価して、短時間での生物学的反応を測定した。

20

【0137】

参照材料、アッセイ対照、及び試験試料を、アッセイ培地を使用して10倍の最終濃度に段階希釈し、次いで、37℃/5% CO₂での10分のインキュベーションのために、一定数の細胞に適用した。リン酸化STAT5/全STAT5マルチプレックスアッセイ（Meso Scale Discovery, MD）を使用して、リン酸化及び全STAT5を測定した。4パラメータモデルを使用する非線形回帰分析によって、用量依存性のリン酸化タンパク質反応曲線（%）を作成した。平行線検定（PLA）ソフトウェアを使用して、回帰の平行性、有意性を評価し、同じプレート内の参照材料に対する試料の相対効力を算出した。

30

【0138】

逆相HPLCを使用して、214nmでの紫外線（UV）検出を使用する、HALO Protein C4分析用カラム、25℃の温度、1.0mL/分の流速を使用する且つ水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸（TFA）のリニアグラジエントを用いる逆相HPLCによってMPBA-IL15の純度を評価した。

【0139】

サイズ排除HPLCを使用して、0.5mL/分の流速で25℃で動作させるShodex Protein KW-803カラムを使用して、MPBA-IL15の相対純度を評価した。214nmでのUV検出を用いて、15mMリン酸ナトリウム、pH7.2（アセトニトリル中）を使用して、クロマトグラフィー溶離を実施した。

40

【0140】

イオン交換HPLCも使用して、1.0mL/分の流速で40℃で動作させるAgilent PL-SAXカラムを使用して酸性及び塩基性であるチャージバリエーションを分離することによって、MPBA-IL15の相対純度を評価した。溶離は、ビス-トリスプロパン（pH6.8）：イソプロピルアルコール及びビス-トリスプロパン（pH6.8）（NaClの溶液を含む）：イソプロピルアルコールのリニアグラジエント、及び214nmでのUV検出を使用して実施した。

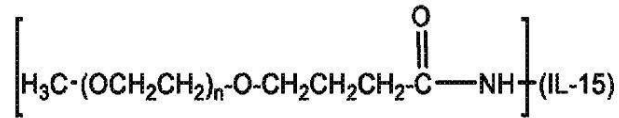
【0141】

実施例1

50

長時間作用型 I L - 15 受容体作動薬、モノ(メトキシ P E G - N - ブタンアミド) 40 K D インターロイキン - 15 の調製

【化 5】



調製 1 : r I L - 15 の 2 . 7 m l 溶液 (1 . 2 3 m g / m l 、 P B S 緩衝液中、p H 7 . 4) を、小さい反応バイアルに移した。300 μ l の p H 8 の 0 . 6 M ホウ酸緩衝液を添加して、p H を p H 8 に調整した。窒素中で - 20 で保管された m P E G - S B A 、 40 k D a (名目上の平均分子量) を、周囲温度に温めた。(I L - 15 のモル量に対して) 10 倍過剰の m P E G - S B A - 40 K を、2 m M H C l に溶解して、10 % P E G 試薬液を形成した。この 10 % P E G 試薬液を、I L - 15 溶液に迅速に添加し、十分に混合した。m P E G - S B A - 40 K の添加後、反応混合物の p H を決定し、従来の技術を使用して p H 8 に調整した。m P E G - S B A - 40 K の I L - 15 への(すなわち、安定なアミド結合の形成を介する)カップリングを可能にするために、反応溶液を、S l o w S p e e d L a b R o t a t o r に 1 . 5 時間乗せて、室温でのコンジュゲート形成を促進させた。反応は、グリシンの溶液の添加によって停止させた。

【0142】

この反応は、40 % モノ - コンジュゲート(すなわち、I L - 15 に付着した単一の P E G 部分を有する)、24 % ジ - コンジュゲート(I L - 15 に付着した 2 つの P E G を有する)、及び 6 % トリ - コンジュゲート(I L - 15 に付着した 3 つの P E G を有する)種をもたらした。およそ 30 % 未反応の I L - 15 が、反応混合物中に残存していたが、反応条件は最適化されなかった。

【0143】

モノ - コンジュゲートを、Q S e p h a r o s e H i g h P e r f o r m a n c e カラム、及び溶出相としてのリン酸ナトリウム緩衝液を使用するアニオン交換クロマトグラフィーによって分離/単離した。精製されたモノ - m P E G - S B A 40 K - I L - 15 コンジュゲート(本明細書では、モノ - m P E G - ブタンアミド - 40 K - I L - 15 又はモノ(メトキシ P E G - N - ブタンアミド) 40 k D インターロイキン - 15、又はモノ - m P E G 40 K - C 4 - アミド - I L - 15 と称される)を、H P L C 及び S D S - P A G E によって特徴付けた。残りの実施例については、精製されたモノ - m P E G - S B A 40 K - I L - 15 を、コンジュゲート 1 と称する。

【0144】

S D S ゲルによって示される通り、精製されたコンジュゲートが、高レベルの純度を有することが決定され、検出可能な量の未反応の I L - 15 は存在しなかった。H P L C プロットに基づくと、精製されたモノ - m P E G - S B A - 40 K - I L - 15 組成物は、約 10 % (モル量) 未満のジ - 又はより高いレベルのコンジュゲートを含有していた。

【0145】

この合成手法を使用して、異なる名目上の平均分子量を有する(例えば、それぞれ、約 10 キロダルトン、15 キロダルトン、20 キロダルトン、25 キロダルトン、30 キロダルトン、45 キロダルトン、50 キロダルトン、60 キロダルトンなどの名目上の平均分子量を有する) m P E G - S B A を使用して、モノ - m P E G - S B A - 10 K - I L - 15、モノ - m P E G - S B A - 15 K - I L - 15、モノ - m P E G - S B A - 20 K - I L - 15、モノ - m P E G - S B A - 25 K - I L - 15、モノ - m P E G - S B A - 30 K - I L - 15 ; モノ - m P E G - S B A - 45 K - I L - 15 ; モノ - m P E G - S B A - 50 K - I L - 15 ; 及びモノ - m P E G - S B A - 60 K - I L - 15 などのコンジュゲートを調製する。

【0146】

10

20

30

40

50

調製 2 : r I L - 1 5 を緩衝液 (5 0 m M リン酸ナトリウム、 1 0 0 m M 塩化ナトリウム、 1 0 % スクロース、 p H 7 . 4) に入れたおよそ 2 m g / m l の溶液を、 2 つの異なる反応容器のそれぞれに移した (本明細書では、 組成物 1 及び組成物 2 と称される) 。 p H を 8 . 0 に調整するために、 p H 8 のホウ酸緩衝液 (0 . 4 M 又は 0 . 6 M) を添加した。 2 m M H C l で希釈された、 (I L - 1 5 のモル量に対して) 1 0 倍過剰の m P E G - S B A - 4 0 K (m P E G - S B A 、 4 0 k D a) を、 I L - 1 5 溶液のそれぞれに添加し、十分に混合した。 m P E G - S B A - 4 0 K の添加後、反応混合物の p H は、 p H 8 であると決定された、又は必要であれば追加のホウ酸緩衝液の使用によって調整された。反応物中の r I L - 1 5 の最終濃度は、必要であれば追加の希釈剤 (組成物 1 については 5 0 m M リン酸ナトリウム、 1 0 0 m M 塩化ナトリウム、 1 0 % スクロース (p H 7 . 4) を含有する緩衝液が使用され、組成物 2 については水が使用された) を使用して、 1 g / L を目標とした。 m P E G - S B A - 4 0 K の I L - 1 5 への (すなわち、主として安定なアミド結合の形成を介する) カップリングを可能にするために、反応溶液を、組成物 1 又は組成物 2 について、それぞれ 4 5 又は 6 0 分間混合して、室温でのコンジュゲート形成を促進させた。反応は、 3 0 分間の、 p H 8 . 0 の、 (反応物に最初に添加された P E G のモル量に対して) 7 1 倍過剰のグリシンの溶液の添加によって停止させた。組成物 1 については、 p H を、 0 . 2 M リン酸を使用して、滴定によって p H 7 . 0 に調整した。

10

【 0 1 4 7 】

得られた組成物を、逆相 H P L C (R P - H P L C) 、 S D S - P A G E 、 及びイオン交換 H P L C (I E X - H P L C) によって特徴付けた。 R P - H P L C 分析の結果を、下の表 1 A に提供する。

20

【 0 1 4 8 】

【表 1 A】

表 1A.

	成分	平均面積 (%)
組成物 1	IL-15	0.57
	モノ-PEG 化 IL-15	82.66
	RRT1=ピーク T1 (特徴付けられていない)	8.05
	RRT2=ピーク T2 (特徴付けられていない)	5.17
	RRT3=ピーク T3 (特徴付けられていない)	3.57
組成物 2	IL-15	0.36
	モノ-PEG 化 IL-15	92.17
	RRT1=ピーク T1 (特徴付けられていない)	2.26
	RRT2=ピーク T2 (特徴付けられていない)	3.28
	RRT3=ピーク T3 (特徴付けられていない)	1.93

30

40

RRT は、相対保持時間である。

【 0 1 4 9 】

50

S E C - H P L C 分析の結果を、下の表 1 B に提供する。

【 0 1 5 0 】

【表 1 B】

表 1B.

	成分	平均面積(%)
組成物 1	HMW 種 (トリ-PEG 化以上の IL-15「ハイマー」)	5.56
	ジ-mPEG IL-15 (ジ-PEG 化 IL-15)	15.46
	モノ-mPEG IL-15 (単量体)	78.98
組成物 2	HMW mPEG 種	5.25
	ジ-mPEG IL-15	6.62
	モノ-mPEG IL-15	88.14

HMW=インターロイキン-15 に共有結合的に付着した 3 つ以上の PEG を有する高分子量 mPEG-IL-15 コンジュゲート。

【 0 1 5 1 】

I E X - H P L C 分析の結果を、下の表 1 B に提供する。

【 0 1 5 2 】

【表 1 C】

表 1C.

		平均面積(%)
組成物 1	塩基性領域	10.20
	主ピーク	68.53
	酸性領域	21.29
組成物 2	塩基性領域	10.43
	主ピーク	56.32
	酸性領域	33.26

【 0 1 5 3 】

調製された組成物は、主として m P E G - S B A - 4 0 K モノ P E G 化種を含んでおり、約 1 0 モル%未満の P E G 二量体 (すなわち、I L - 1 5 に付着した 2 つの P E G 部分を有するもの)、及びさらに少ない量の I L - 1 5 に付着したそれ以上の P E G 種 (すなわち、3 つ以上の P E G 部分を有するもの) を伴っていた。他に記述される、モノ (メトキシ P E G - N - ブタンアミド) インターロイキン - 1 5 の組成物は、一般に、(非改変 I L - 1 5 及び他の I L - 1 5 含有種、例えば、ジ P E G 化 I L - 1 5 及びより大きいものを含めた、得られる組成物中のすべてのインターロイキン - 1 5 種に基づいて) 少なくとも約 8 0 モル%のモノ P E G 化 I L - 1 5 種を有することとなり、好ましくは、約 1 0 モル%未満の他の I L - 1 5 種と共に、少なくとも約 9 0 モル%のモノ P E G 化 I L - 1 5 種を有し得る。いくつかの実施形態では、モノ (メトキシ P E G - N - ブタンアミド) インターロイキン - 1 5 組成物は、約 5 モル%未満の P E G 二量体 (I L - 1 5 に付着した 2 つのメトキシ P E G - N - ブタンアミド部分を有するジ P E G 化 I L - 1 5) と、約 5 モル%未満の他のすべてのそれ以上の P E G 化種を含む。

【0154】

モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15の2つのさらなる合成物を、調製及び分析した。分析結果の概要を、下で表1Dに提供する。

【0155】

MPBA-IL15を、(タンパク質ベースで)1mg/mLの濃度のMPBA-IL15(10mMリン酸カリウム中)、260mMのトレハロース、及び0.02w/v%ポリソルベート20(6.8のpH)を含有する溶液として、さらなる使用のために配合することができる。

【0156】

【表1D】

10

表1D.

方法	分析物		ロット1	ロット2
RP-HPLC	主ピーク	≥ 85 %	98	97
	Di-PEG	報告結果 (%)	2	2.8
	遊離の rhIL15	報告結果 (%)	<1	0.57
SEC-HPLC	主ピーク	≥ 90 %	98	100
	Di-PEG	報告結果 (%)	2	<3
	HMW	報告結果 (%)	ND	ND
IEX-HPLC	主ピーク	≥ 60 %	78	79
	塩基性領域	報告結果 (%)	12	12.0
	酸性領域	報告結果 (%)	10	8.7
遊離の PEG RP-HPLC/ ELSD	≤5 % wt/wt		0.9%	2% (1.57%)

20

30

略語: NT=未試験; Di-PEG=ジPEG化種; HMW=より大きい分子量; ND=未検出;
LOQ=定量下限; NTU=比濁法濁度単位

【0157】

実施例2

CAR T細胞のリン酸化及び増殖に関するモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15のインビトロ研究

モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15のヒトCD19 CAR T細胞に対するインビトロでの効果を、下に記載した通りに調査した。

40

【0158】

インビトロ研究のために、CAR T細胞を、CD19抗原と共に又は伴わずに、モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15(0~100ng/mL)と共にインキュベートした。STAT5リン酸化及びCFSE希釈を、フローサイトメトリーによって評価した。

【0159】

IL15R 発現を、CD8 CAR T細胞については図3A(CD8、緑色実線、右端)に示す通り、またCD4 CAR T細胞については図3B(CD4、青色実線、右端)に示す通り、フローサイトメトリーによって測定した。各図において示されるのはまた

50

、FMO（灰色 - 塗りつぶし）及びアイソタイプ（破線）対照である。CD8及びCD4 CAR T細胞は、IL-15R を発現する。

【0160】

CD8 CAR T細胞と CD4 CAR T細胞の両方についての、モノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15（MPBA-IL15）に反応するSTAT5の用量依存性のリン酸化を、それぞれ図3C及び3Dに示す。CAR T細胞は、種々の濃度のMPBA-IL15又はIL-15で20分間刺激した。STAT-5リン酸化アッセイにおける、IL-15又はモノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15に反応する、CD8及びCD4 CAR T細胞についてのEC50値（ng/ml）を、下にまとめて示す：

【0161】

【表2】

表2.

STAT-5リン酸化	EC50, ng/ml MPBA-IL15	EC50, ng/ml IL-15
CD8 CAR T細胞	0.96	0.13
CD4 CAR T細胞	0.84	0.16

【0162】

CFSEで標識し、種々の濃度のMPBA-IL15又はIL-15と共に4日間インキュベートしたCAR T細胞の増殖をまた、フローサイトメトリーによって分析した。結果を、図3E（CD8 CAR T細胞）及び3F（CD4 CAR T細胞）に示す。EC50値を、下にまとめて示す。

【0163】

【表3】

表3.

増殖	EC50, ng/ml MPBA-IL15	EC50, ng/ml IL-15
CD8 CAR T細胞	36.82	2.76
CD4 CAR T細胞	48.78	4.88

【0164】

図3C、D、E、及びFについては、四角はIL-15に相当し、円はMPBA-IL15に相当する。

【0165】

上に記載した通り、インビトロで、モノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15は、STAT5リン酸化、及びCD8 CD19 CAR T細胞とCD4 CD19 CAR T細胞との両方の抗原依存性の増殖を、用量依存的に誘発する。

【0166】

実施例3

前臨床マウスリンパ腫モデルにおけるCD19 CAR T細胞免疫療法の有効性に関するモノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15の研究

モノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15（例えば、上の実施例1に記載されているものは、IL-15R に対する結合親和性を保持し、クリア

10

20

30

40

50

ランス低下を呈し、薬力学的反応の持続を提供する。インビボ異種移植 B 細胞リンパ腫モデルにおける、モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15 のヒト CD19 CAR T 細胞に対する効果を、下に記載した通りの実験で調査した。

【0167】

一般的方法：インビボ研究のために、NSG マウスは、-7 日目(D-7)に静脈内に、ホタルルシフェラーゼを発現するように安定に形質導入された 5×10^5 個の Raji リンパ腫細胞を、それに続いて、D0 に、単独の又は D-1、7、若しくは 14 に開始して毎週投与されるモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15 (0.03、0.10、若しくは 0.30 mg/kg、静脈内注入)と組み合わせた、治療量以下の用量の (0.8×10^6) の CAR T 細胞 (1:1 CD4:CD8) の注入を受けた。腫瘍のないマウスは、D38 に、Raji 細胞を再負荷した。腫瘍を、マウスのバイオルミネセンスイメージングによって、毎週評価した。結果を、図 10 に示す。

10

【0168】

図 4A (種々の治療群についての、CAR T 細胞投与後の日数に対する平均腫瘍輝度) に示す通り、CAR T 細胞と組み合わせた 0.10 mg/kg 及び 0.30 mg/kg のモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15 での治療は、CAR T 細胞療法単独と比較した場合の、NSG マウスにおける腫瘍量の低下及び Raji リンパ腫の根絶をもたらす。この研究(研究 A)では、Raji を有する NSG マウスは、D0 に治療量以下の用量の CAR T 細胞、それに続いて、D6 に開始してその後毎週(D13、D20、D27、D33、など)の 0.030、0.10、又は 0.30 mg/kg のモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15 を受けた。治療レジメンを、図 4B に示す。

20

【0169】

さらなる研究(研究 B)では、Raji を有する NSG マウスは、D0 に CAR T 細胞注入を受け; 0.30 mg/kg のモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15 を、D-1、D7、又は D14 に、また、その後毎週投与した(5 マウス/群)。図 7B を参照のこと。マウスを、毎週採血し、CD8 及び CD4 CAR T 細胞を、フローサイトメトリーによって特定した(それぞれ図 5A 及び 5B)。腫瘍量は、図 6 に示す通りの毎週の生物発光イメージング(CAR T 細胞投与後の日数に対する平均腫瘍輝度)及び生存率(図 7A)によって評価した。

30

【0170】

この前臨床研究の結果は、CAR T 細胞と組み合わせたモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15 が、血液中の CAR T 細胞増加をもたらし、腫瘍量を低下させ、Raji リンパ腫を有する NSG マウスの生存率を増大させたことをさらに示した。

【0171】

研究 A の 0.30 mg/kg モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15 投薬群のマウスについては、CAR T 細胞注入後、D8、11、14、21、及び 28 に、マウスを安楽死させた。骨髄及び CAR T 細胞から単細胞懸濁液を作製し; CD8 CAR T 細胞及び CD4 CAR T 細胞懸濁液について、それぞれ、総細胞数(図 8A、9A)、Ki67 発現(図 8B、9B)、PD1 及び TIM3 発現(図 8C、9C)を、フローサイトメトリーによって評価した。グラフは、平均値 \pm SEM を示す。

40

【0172】

図 8A 及び 9A に示す通り、例示的な組み合わせ免疫療法で治療したマウスは、骨髄における CAR T 細胞の絶対数が増大した。MPBA-IL-15 と組み合わせた CAR T 細胞療法は、Raji を有するマウスの骨髄における CAR T 細胞の蓄積増大及び増殖、並びに PD1 及び TIM3 の延長される二重発現の減少をもたらした(図 8C、9C)。

【0173】

50

D - 1、7、又は14に開始するモノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15のインビボの注入は、血液中のピークCAR T細胞数を増大させた。Raji細胞は、CAR T細胞とD7のモノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15を受けているマウスでは、D14までに骨髄から排除された(特に、0.30mg/kg投薬群を参照のこと)が、CAR T細胞のみを受けているマウスでは排除されなかった。モノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15と共にCAR T細胞を受けているマウスでは、CAR T細胞又はモノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15のみと比較して、優れたモノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15用量依存性の腫瘍制御及び生存が認められた。決して制限的であることが意図されないが、この実験設定に基づく、この前臨床モデルにおける組み合わせ療法の利益は、モノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15の投与がおよそD7までに開始された場合に、より大きいように思われた。モノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15で治療されたマウスにおける残留CAR T細胞は、CAR T細胞注入の5週後よりも後に投与されたRaji腫瘍細胞の再負荷を拒絶した。

【0174】

このリンパ腫モデルでは、モノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15投与は、投与されたCD19 CAR T細胞の抗腫瘍有効性及び動態を向上させることが判明した。より具体的には、CAR T細胞単独と比較して優れた有効性を示し、CAR T細胞とモノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15との組み合わせは、腫瘍量を有意に低下させ、また、腫瘍制御の持続を発揮し、またある種の場合には、NSGマウスにおけるRajiリンパ腫を根絶した。対照的に、CAR T細胞単独療法群では、腫瘍進行が観察された。図4Aを参照のこと。

【0175】

より具体的には、モノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15(0.03mg/kg)/CAR T細胞で治療されたマウスの100%は、腫瘍注射の70日後に生存していたが、それと比較して、ビヒクル対照を受けているマウスは一匹も、14日目まで生存しておらず、CAR T細胞単独で治療されたマウスは一匹も、59日目まで生存していなかった。結果を、図4A(バイオルミネセンスイメージングの結果)に、また、0.30mg/kg用量のMPBA - IL15で治療されたマウスについて図7A(生存)に示す。さらに、モノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15とCAR T細胞で以前に治療されたマウスは、Raji腫瘍再負荷を拒絶することができ、これは、CAR T細胞残存及び潜在的に長期のメモリーCAR T形成を裏付けていた；際立った結果を、図10に示し、これは、MPBA - IL - 15などの長時間作用型インターロイキン - 15作動薬が、CAR - T細胞療法と組み合わせで投与された場合に、腫瘍量を有意に低下させるだけでなく、Raji - リンパ腫も根絶能力を示す。

【0176】

実施例4

前臨床マウスROR1肺腫瘍モデルにおけるROR1 CAR T細胞 免疫療法の有効性に関するモノ(メトキシPEG - N - ブタンアミド)インターロイキン - 15の研究

Kras^{LSL-G12D}/+p53^{f/f}マウス(n=5~6/群)のコホートに、 3×10^4 pfuのCre - ffLuc - hROR1レンチウイルスを気管内感染させて、ROR1+肺腫瘍の発生を誘発した。感染の12週及び15週後に、マウスを、リンパ球除去(lymphodepletion)のために100mg/kgシクロホスファミドで治療し、 6×10^6 個のROR1 CAR T細胞又は対照T細胞(1:1比のCD8:CD4)を静脈内に養子移植した。ROR1(受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1)は、非小細胞肺癌(NSCLC)及びトリプルネガティブ乳癌(TNBC)の亜群を含めた多数の悪性腫瘍において発現される。マウスは、移植されたT細胞の生着を補助するために、8日間、1日おきに、 5×10^4 IUのIL - 2を腹腔内に受けた。T細胞移

10

20

30

40

50

植の日に開始して、マウスの亜群を、7日ごとに静脈内への0.33 mg/kg MPBA-IL15で治療した。前臨床治療プロトコルを、図11に示す。

【0177】

腫瘍量は、肺全体にわたる連続する1mm画像を取得し、すべての画像にわたって腫瘍面積を合計して腫瘍体積を定量化することによって、数量化した。感染の17週後に、すべてのマウスを安楽死させ、肺全体を、フローサイトメトリー及び免疫組織化学によって分析した。循環血液中の肺腫瘍浸潤細胞を混入細胞と区別するために、マウスには、安楽死の5分前に、PEを結合させた抗CD45抗体を静脈内注射して、循環血液中のすべての免疫細胞を標識し、PE⁻細胞を非血管性の肺実質細胞と決定することを可能にした。肺を、腫瘍へのCD8a及びCD8浸潤について、IHC染色によって分析した；染色は、HALOソフトウェアを使用して数量化した

10

【0178】

結果を、図12A（種々の治療群のマウスについての腫瘍体積の変化(%)：対照T細胞（長方形）、対照T細胞とMPBA-IL15（ ）、ROR1 CAR T細胞（ ）、及びROR1 CAR T細胞とMPBA-IL15（ ））；図12B（ROR1 CAR T細胞単独療法で治療された個々のマウスについての感染後の週数に対する腫瘍体積の変化(パーセント)（群について18.5%退縮）；図12C（ROR1 CAR T細胞とMPBA-IL-15の二重併用療法で治療された個々のマウスについての感染後の週数に対する腫瘍体積の変化(パーセント)（群について44.4%退縮）；図13A（それぞれ、種々の治療群についての、脾臓及び腫瘍における生細胞の割合として表されるCD8 CAR T細胞頻度）、図13B（それぞれ、種々の治療群についての、脾臓及び腫瘍における生細胞の割合として表されるCD8細胞頻度）、及び図14A、B、C、及びD（この前臨床ROR1肺癌モデルにおける肺において、MPBA-IL-15、すなわち実例となる長時間作用型IL-15作動薬が、ROR1 CAR T細胞輸送を増強することを示す、IHC染色）に示す。

20

【0179】

前述の実施例は、MPBA-IL15の投与が、癌を有する対象の治療におけるCD19 CAR T細胞の抗腫瘍有効性及び動態を有意に向上させる、また、ROR1 CAR T細胞の輸送及び癌性肺組織における残存性を増強することを示す；したがって、本開示は、MPBA-IL15などの長時間作用型IL-15作動薬と組み合わせてCAR T細胞療法を施すことによって、癌を有する患者を治療するための、新規の且つ比類なく好都合な免疫療法手法を提供する。

30

【0180】

実施例5

モノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15でインビトロで治療されたCD8 CAR T細胞における、CAR-T細胞数及び細胞内タンパク質発現
CD8 CAR T細胞は、健康なドナーから産生した。15日目に、CAR T細胞を、照射済みK562-CD19+又はK562-CD19-細胞と共に同時培養した。細胞は、処理しなかった、又は、（1 ng/ml、10 ng/ml、若しくは30 ng/mlの濃度の）モノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15で処理した。IFN γ 及びTNF α 産生は、同時培養の24時間後にLuminexによって分析した。CAR T細胞数、並びにbcl-2及び活性化されたカスパーゼ3の細胞内発現を、5日の同時培養後に決定した。bcl-2及び活性化されたカスパーゼ3の発現を、フローサイトメトリーによって決定した。結果を、図15A、15B、及び図16A-Cに示す。

40

【0181】

図15Aは、照射済みK562-CD19+若しくはK562-CD19-細胞と共に同時培養され、且つ、MPBA-IL15で処理されていない、又は1 ng/ml、10 ng/ml、若しくは30 ng/mlの濃度のMPBA-IL15で処理された、CD8 CAR T細胞におけるpg/mlでのIFN γ の発現を提供する。

50

【0182】

図15Bは、照射済みK562-CD19+若しくはK562-CD19-細胞と共に同時培養され、且つ、MPBA-IL15で処理されていない、又は1ng/ml、10ng/ml、若しくは30ng/mlの濃度のMPBA-IL15で処理された、CD8CAR T細胞におけるpg/mlでのTNFの発現を提供する。

【0183】

図16Aは、照射済みK562-CD19+若しくはK562-CD19-細胞と共に同時培養され、且つ、MPBA-IL15で処理されていない、又は1ng/ml、10ng/ml、若しくは30ng/mlの濃度のMPBA-IL15で処理された、CD8CAR T細胞についてのCAR T細胞増殖(増殖(倍)として)を示す。

10

【0184】

図16B及び16Cは、照射済みK562-CD19+若しくはK562-CD19-細胞と共に同時培養され、且つ、MPBA-IL15で処理されていない、又は1ng/ml、10ng/ml、若しくは30ng/mlの濃度のMPBA-IL15で処理された、CD8CAR T細胞における、(bcl-2 MFIでの)bcl-2及び活性化された(カスパーゼ3+(%)としての)カスパーゼ3の発現をそれぞれ提供する。

【0185】

これらの結果から、モノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15でのインビトロでのCAR T細胞の処理が、抗原特異的CD8CAR T細胞産生及び増殖を増大させ、また、生存を増強することがわかる。

20

【0186】

実施例6

前臨床マウスリンパ腫モデルにおける、CAR T細胞とモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15との組み合わせの投与後のCAR T細胞におけるタンパク質発現

NSGマウスは、D-7にRajiリンパ腫細胞を、D0にCAR-T細胞を、また、D7に開始する上の実施例3により詳細に記載された通りのモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15(0.3mg/kg)の毎週の注射を受けた。マウスを、CAR T細胞注入後、D8、11、14、21、及び28に安楽死させた。単細胞懸濁液を、骨髄(マウスあたり2本の大腿骨及び2本の脛骨)から作製した。タンパク質発現(bcl-2、CD45RA、及びCCR7)を、フローサイトメトリーによって分析した。

30

【0187】

CD8CAR T細胞(図17A)とCD4CAR T細胞(図17B)との両方について、注入後D8に決定される、CAR T細胞におけるBcl-2発現を、ヒストグラムに示す(灰色=CAR T細胞のみのマウス、赤色及び青色=CAR T細胞とモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15(MPBA-IL15)とを投与されたマウス)。

【0188】

CD8CAR T細胞(図18A)とCD4CAR T細胞(図18B)との両方について、注入後D8に決定される、CAR T細胞におけるBcl-2発現をまた、棒グラフに示す(黒色=CAR T細胞のみのマウス、赤色=CAR T細胞とモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15(MPBA-IL15)とを投与されたマウス)。

40

【0189】

CAR T細胞におけるメモリーマーカーCD45RA及びCCR7の発現を、図19A~19Dに示し、ここでは、図19Aは、CAR T細胞のみを投与されたマウスのCD8CAR T細胞におけるタンパク質発現に関し;図19Bは、CAR T細胞とモノ(メトキシPEG-N-ブタンアミド)インターロイキン-15(MPBA-IL15)を投与されたマウスのCD8CAR T細胞におけるタンパク質発現に関し、図19Cは

50

、CAR-T細胞のみを投与されたマウスのCD4⁺ CAR-T細胞におけるタンパク質発現に関し；図19Dは、CAR-T細胞とモノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15（MPBA-IL15）を投与されたマウスのCD4⁺ CAR-T細胞におけるタンパク質発現に関し、ここでは、発現データは、CD5RA⁺CCR7⁻（橙色）、CD5RA⁺CCR7⁺（緑色）、及びCD5RA⁻CCR7⁺（赤色）について提供される。グラフは、平均値±SEMを示す。

【0190】

モノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15（MPBA-IL15）で処理されたCAR-T細胞、及びCAR-T細胞療法とMPBA-IL15との組み合わせで治療されたマウスから回収されたCAR-T細胞は、bc1-2の発現の増大にある程度起因する可能性があるインビトロとインビボの両方での増殖及び生存率の増大を示す。

10

【0191】

実施例7

臨床研究

B細胞非ホジキンリンパ腫を有する患者における、CD19指向性CAR-T療法と組み合わせたモノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15の、第1b/2相の非盲検の多施設の用量漸増及び用量拡大研究

これは、びまん性リンパ球性B細胞リンパ腫（DLBCL）を有する患者における、CD19⁺CAR-Tと組み合わせたモノ（メトキシPEG-N-ブタンアミド）インターロイキン-15（MPBA-IL15）の、第1b/2相の非盲検の多施設の用量漸増及び用量拡大研究である。この研究は、スクリーニング期間、治療期間、治療終了（eot）期間、及び長期の追跡調査機関に分割される。

20

【0192】

投与群1のMPBA-IL-15開始用量は、1.5µg/kgとなる。患者は、サイクル1の第1日に開始する21日サイクルにおいて、IV MPBA-IL-15を受けることとなる。

【0193】

MPBA-IL-15薬物生成物は、無菌の白色ないしオフホワイトの凍結乾燥粉末として提供される。MPBA-IL-15薬物生成物は、およそ1.0mg/mLの組換え型ヒトIL-15（rhIL-15）と共に、10mMリン酸カリウム、260mMトレハロース、0.02%（w/v）ポリソルベート20（pH6.8）中で製剤化される。MPBA-IL-15薬物生成物の各バイアルは、1.1mgのrhIL-15等価物含有する。これには、再構成後の1.0mgという量を主張するラベルの一定の抜き取り（withdrawal）を保証するための0.1mgの超過分が含まれる。

30

【0194】

治療の期間

用量漸増（第1b相）：安全性選択基準を満たす、市販品として入手可能な2種のCD19指向性のキメラ抗原受容体T細胞（CD19 CAR-T、Kymriah（商標）（チサゲンレクルユーセル）又はYescarta（登録商標）（アキシカブタゲンシロロイセル））療法のうちの1つを受けている患者は、静脈内（IV）MPBA-IL-15を受けることとなる。用量漸増中、MPBA-IL-15は、CD19 CAR-T注入の単回投与のおよそ14日又は7日後（割り当てられたコホートに応じて）、患者に与えられることとなる。MPBA-IL-15での治療は、21日ごとに（すなわち、3週ごとに[q3w]）最大8サイクル（6か月）、又は、疾患進行のエビデンス、許容し難い毒性、患者の撤回、研究者の裁量、若しくは治験依頼者（Sponsor）の研究を停止する決定までとなる。研究者の判断に基づいて臨床的利益を示している患者は、メディカルモニター（Medical Monitor）の承認を得て治療を継続することができる。

40

【0195】

50

用量拡大（第2相）：CD19 CAR-T生成物のいずれかを伴うMPBA-IL-15の第2相推奨用量（RP2D）の決定後、RP2D用量を、第2相中の拡大コホートにおいて、さらに検討することとなる。MPBA-IL-15での治療は、21日ごとに（すなわち、3週ごとに）最大8サイクル（6か月）、又は、疾患進行のエビデンス、許容し難い毒性、患者の撤回、研究者の裁量、若しくは治験依頼者の研究を停止する決定までとなる。研究者の判断に基づいて臨床的利益を示している患者は、メディカルモニターの承認を得て治療を継続することができる。

【0196】

主要目的：

第1b相：

(i) CD19 CAR-T療法後のMPBA-IL-15の安全性及び忍容性を評価すること。

(ii) CD19 CAR-T投与後のMPBA-IL-15の最大耐用量（MTD）又はRP2D及び最適な投薬期間を規定すること。

【0197】

第2相：

Lugano分類（Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. J Clin Oncol. 2014; 32(27): 3059.）に基づいて、6か月での完全奏効率（CRR）を評価することによって、CD19 CAR-T療法後のMPBA-IL-15の有効性を評価すること。

【0198】

副次的目的：

第1b相及び第2相：

(i) CD19 CAR-T療法と組み合わせたMPBA-IL-15の全奏効率（ORR）を評価すること

(ii) CD19 CAR-T療法と組み合わせたMPBA-IL-15の無増悪生存期間（PFS）を評価すること

(iii) CD19 CAR-T療法と組み合わせたMPBA-IL-15の全生存（OS）を評価すること（第2相のみ）

(iv) CD19 CAR-T療法と組み合わせたMPBA-IL-15の奏効期間（DOR）を評価すること

(v) CD19 CAR-T療法と組み合わせたNKTR-255の薬物動態（PK）を特徴付けること

(vi) CD19 CAR-T療法と組み合わせたNKTR-255の薬力学的（PD）効果を特徴付けること

(vii) 養子移植されたT細胞のインビボでの残存の期間及び残存しているT細胞の形質を含めた、CD19 CAR-T細胞のPD効果を評価すること

(viii) MPBA-IL-15の免疫原性を評価すること

【0199】

探索的目的：

(i) CD19 CAR-T療法と組み合わせたMPBA-IL-15の無イベント生存（EFS）を評価すること

(ii) 腫瘍及び血液における抗腫瘍活性と免疫細胞との関連を評価すること

(iii) 養子移植されたT細胞の骨髄又は他の腫瘍部位への輸送、及びインビボでの機能を評価すること

(iv) サイトカインレベル及び免疫細胞集団のベースラインからの変化を特徴付けること

10

20

30

40

50

【0200】

研究集団：びまん性リンパ球性B細胞リンパ腫（DLBCL）（非特異型）、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBCL；Yescartaのみ）、高悪性度B細胞リンパ腫、及び濾胞性リンパ腫から生じるDLBCLを含めた2系列以上の全身療法後の、再発/難治性（R/R）B細胞非ホジキンリンパ腫（B-NHL）を治療するためにCD19 CAR-T細胞を受けている18歳以上の年齢の成人。

【0201】

患者の人数（計画）：

第1b相：およそ55人の患者が登録されることとなる

第2相：およそ60人の患者が登録されることとなる

10

【0202】

研究施設の数：

第1b相：およそ5つの北米施設

第2相：およそ5つの北米施設

【0203】

研究デザイン：

この研究は、用量漸増（第1b相）及び用量拡大（第2相）部分からなる、第1b/2相の非盲検の多施設研究である。

【0204】

第1b相（用量漸増）

20

安全性選択基準を満たす、US FDAによって承認されたCD19 CAR-T細胞（Yescarta又はKymriah）を受けている患者は、CD19 CAR-T注入の単独治療のおよそ14日又は7日後（割り当てられたコホートに応じて）を開始するIV MPBA-IL-15 q3wを受けることとなる。用量漸増（第1b相）中、最大5コホートの少なくとも3人の患者がそれぞれ、CD19 CAR-T細胞注入後に、漸増用量のMPBA-IL-15を与えられることとなる。CD19 CAR-Tを伴うMPBA-IL-15についての試料用量漸増計画を、下の表に提供する。それぞれの漸増MPBA-IL-15用量コホートの最初の患者（前哨の（sentinel）患者）が、MPBA-IL-15の最初の投与の後21日間、安全性及び忍容性についてモニタリングされた後に、同じコホート内のその他の患者が投与されることとなる。

30

【0205】

40

50

【表 4】

表 4. MPBA-IL-15(第 1b 相)についての用量レベル例*

MPBA-IL-15 用量レベル	MPBA-IL-15 用量
用量レベル-2	0.375 $\mu\text{g}/\text{kg}$
用量レベル-1	0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$
<u>用量レベル 1</u> **(開始用量)	<u>1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$</u>
用量レベル 2	3 $\mu\text{g}/\text{kg}$
用量レベル 3	4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
用量レベル 4	6 $\mu\text{g}/\text{kg}$
用量レベル 5***	9 $\mu\text{g}/\text{kg}$

q3w: 3 週ごと

*コホート 1 用量を除いて、後続のコホートについての用量レベルは、臨床所見に基づいて調整することができる。用量漸増は、前の MPBA-IL-15 の用量の 2 倍を超えないこととなる。

**開始用量で用量制限毒性が認められる場合、MPBA-IL-15 を、用量レベル-1 に示す通り、漸減させることができる。

***追加のコホート(1 つ又は複数)又は用量レベルは、安全性/PK データの再検討、及び治験依頼者メディカルモニターと治験責任医師との合意の後に登録することができる。

【0206】

MPBA-IL-15 は、最初は Yescarta 療法で開始する、逐次的組み合わせで試験されることとなる。この研究は、Yescarta 注入の 14 日後に投与される、1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IV の MPBA-IL-15 開始用量で開始することとなる(コホート A)。Yescarta の 14 日(±3 日)後に投与される MPBA-IL-15 の 3 つの用量レベル(コホート A)において安全性及び忍容性を確立した後、次のコホート、Kymriah(14 日後 CAR-T 注入;コホート B)及び Yescarta(7 日後 CAR-T 注入、コホート C)が、確認された安全な用量レベルで、並行して開始されることとなる。試験される用量は、7 日レジメンが、開始用量レベルで認められる安全性又は忍容性の問題点を有する場合、直前に試験された用量に漸減させることができる。7 日レジメンは、14 日レジメンでのそれぞれ個々の生成物の認められる安全性及び忍容性に基づくこととなる。用量漸増は、MTD 又は RP2D が確立されるまで、もっぱら 7 日レジメンで MPBA-IL-15 のみを継続することとなる。7 日レジメンが耐容性を示さないことが判明する場合、14 日レジメンにおける MPBA-IL-15 用量漸増を再び始めることができる。

【0207】

用量レベル選択に関する及び MTD の決定に関する研究の漸増期の間、過剰投与制御を伴う漸増(escalation with overdose control)(EWOC)原理(Neuenschwander B, Branson M, Gsponer T. Critical aspects of the Bayesian approach to phase I cancer trials. Stat Med. 2008 Jun 15; 27(13): 2420-39)を用いる 2 パラメータのベイズロジスティック回帰モデル(BLRM)が使用されることとなる。MTD は、少なくとも 6 人の患

10

20

30

40

50

者が、ある用量で評価され、且つその用量について、標的とされる毒性の事後確率が少なくとも70%である場合に断定されることとなる。MTDは、セクション5.8に概要を示す基準に基づいて決定されることとなる。MTDをさらに調査するために、追加のコホートを開設することもできる。

【0208】

CD19 CAR-Tと組み合わせたMPBA-IL-15のRP2Dは、用量漸増からの最終の推奨を超えない用量で選択されることとなり、また、MPBA-IL-15の安全性、PK、PD、及び最適な生物学的反応についてのすべての利用可能なデータの再検討に基づくこととなる。RP2Dを精緻化するために、追加のRP2D患者を登録することができ、また、RP2Dを決定するために、選択されたRP2Dで投与される最低6人の患者（用量漸増からのあらゆる患者を含めて）が必要とされることとなる。

10

【0209】

第1b相中の用量漸増に関する追加の規則は、以下である：

- 患者内の用量漸増は許可されないこととなる。
- 漸増用量のMPBA-IL-15を用いる新しいコホートへの登録は、以前のコホートにおける最後の患者の最初のMPBA-IL-15投与以降、用量制限毒性(DLT)時間枠が経過するまで開始できない。DLT時間枠は、MPBA-IL-15投与後21日である。

- より高い用量への漸増は、その用量でのFIH研究における経験が存在する場合にのみ行われることとなる(MPBA-IL-15-002)。

20

- 用量漸増コホートについては、次のコホートへの用量漸増を開設(open)する前に、治験依頼者メディカルモニター及び安全性審査委員会(Safety Review Committee)(SRC)が、安全性を共同で評価することとなる。

- 所与のコホートについてのMPBA-IL-15の用量レベルは、試験された以前の用量レベルで認められた毒性の重症度、期間、及び頻度に応じて低下させることができる。

【0210】

CD19 CAR-T注入の後にMPBA-IL-15のRP2Dを断定する決定は、安全性、PK、PD、又は最適な生体反応に基づいて、MTDに到達させることのない、あらゆる所与の用量レベル又は開始日で行うことができる。

【0211】

第2相(用量拡大)

この研究の第2相では、それぞれ個々のCD19 CAR-T生成物についてRP2Dが確立されてから、用量拡大コホートへの登録が開始されることとなる。具体的なCD19 CAR-T生成物の選択及び第2相についてのスケジュールについての決定は、第1b相におけるCAR-T注入後のMPBA-IL-15の安全性、PK、PD、及び最適な生物学的反応に関するすべての利用可能なデータの再検討に基づくこととなる。患者は、CD19 CAR-T注入の14又は7日後に、第1b相で決定されたRP2D及びスケジュールで、IV MPBA-IL-15を受けることとなる。MPBA-IL-15での治療は、最大8サイクル(6か月)の間、21日ごとに(すなわち、3週ごとに)繰り返されることとなる。

40

【0212】

主要な適格基準

適格性は、CD19 CAR-T細胞作製のための白血球除去前1か月以内に決定されることとなる。集中的なブリッジング化学療法又は放射線療法が施される場合、適格基準は、リンパ球除去の前に再評価されるべきである。

- ・ 男性又は女性の患者、インフォームドコンセント・フォーム(ICF)に署名する日に18歳
- ・ 商品としてのCD19 CAR-T細胞療法に対して適格である
- ・ DLBCL(非特異型)、PMBCL(Yescartaのみ)、高悪性度B細胞リンパ腫；及び濾胞性リンパ腫から生じるDLBCLを含めた、B-NHLの確定診断

50

・アントラサイクリンを含めた2系列以上の療法後に、検出可能な疾患と定義される、且つ自家造血幹細胞移植 (ASCT) の失敗を有する又はASCTに不適格である若しくはASCTに同意していない、再発/難治性 (R/R) 疾患

・少なくとも1方向において 1.5 cm と正確に測定することができる、Lugano分類 (Cheson, 2014、同上) による、測定可能なフルオロデオキシグルコース (FDG) 親和性の結節性及び/又は節外性疾患

・平均余命 > 30 日

・以下と定義される、許容し得る臓器機能：

○グレード 1 の呼吸困難及び酸素飽和度 92% (室内気にて) と定義される、適切な肺機能。これらのパラメータが満たされない場合、治療する医師の裁量で、肺機能検査 (PFT) でのFEV1 予測値の 50% 及び予測値の 40% の一酸化炭素肺拡散能 (DLCO; 補正済み) を有する患者が、適格となる。

○心臓病専門医によって左室駆出率 (LVEF) 45% 、又はLVEF $40 \sim 44\%$ 、及びクリアランス (clearance) と定義される、適切な心機能

○以下と定義される、適切な腎機能：

- $1.5 \times$ 正常値上限 (ULN) の血清クレアチニン、又はeGFR $60\text{ mL} / \text{分} / 1.73\text{ m}^2$

○以下と定義される適切な肝機能

- アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) 及びアラニンアミノ基転移酵素 (ALT) $3 \times \text{ULN}$

- ビリルビン $2.0\text{ mg} / \text{dL}$ (ジルベール・モイレングラハト症候群を有する患者を除く) ; その総ビリルビンが $3.0 \times \text{ULN}$ であり、且つ直接ビリルビン $1.5 \times \text{ULN}$ であるならば、ジルベール・モイレングラハト症候群を有する患者を含めることができる

○以下と定義される適切な骨髄貯蔵 (輸血を伴わない) :

- 絶対好中球数 (ANC) $> 1000 / \text{mm}^3$

- 絶対リンパ球数 (ALC) $300 / \text{mm}^3$

- 血小板 $50,000 / \text{mm}^3$

ヘモグロビン $> 8.0\text{ g} / \text{dL}$

【0213】

初回及び後続のMPBA-IL-15投与前に評価される安全性適格性

患者は、次の基準を満たす場合、MPBA-IL-15注入について適格となる：

1. CD19 CAR-T注入を受けた

2. MPBA-IL-15注入の日にグレード 1 サイトカイン放出症候群 (CRS) (体温 38.0) が持続していない

3. MPBA-IL-15注入の前96時間以内にグレード4 CRSがない

4. MPBA-IL-15注入の日にグレード 2 の神経毒性が持続していない

5. MPBA-IL-15注入の前のあらゆる時点での > 48 時間の期間の以前のグレード 3 の神経毒性がない

6. MPBA-IL-15注入の前48時間以内のトシリズマブ及び/又はデキサメタゾンでの介入がない

7. 活動性の、重篤な、及びコントロールされていない感染症がない

8. 研究者の評価による禁忌がない

9. 患者が、MPBA-IL-15のすべての投与の前に、適切な臓器機能を有する：

a) AST及びALTレベル $3 \times \text{ULN}$;

b) 総ビリルビンレベル $3 \times \text{ULN}$

c) eGFR $> 30\text{ mL} / \text{分}$

d) DLCO $> 40\%$

e) LVEF $> 45\%$

【0214】

10

20

30

40

50

試験生成物、用量、及び投与様式

再構成されたMPBA-IL-15は、21日ごとに(すなわちq3w)、IV投与されることとなる。再構成されたMPBA-IL-15は、注射用の市販品として入手可能な又は0.9%の通常の生理食塩水で、さらに希釈されるべきである。最終の希釈された溶液は、30±5分かけて注入されることとなる。

【0215】

MPBA-IL-15開始用量は、1.5µg/kg(21日ごと)となる。

【0216】

安全性

安全性の評価は、次のものの継続的な再検討によって行われることとなる：

- ・重篤AE(SAE)及び免疫介在性AE(immAE)を含めた有害事象(AE)の発生率
- ・臨床検査(血液及び尿採取)
- ・バイタルサイン
- ・心電図(ECG)
- ・理学的検査
- ・併用薬物療法

DLT - 第1b相のみ

【0217】

薬物動態

MPBA-IL-15 PK分析のための血液試料は、すべての患者から収集されることとなる。連続的なPK試料は、MPBA-IL-15の各サイクル後の複数の計画された採取時点で収集されることとなる。MPBA-IL-15の血漿中濃度は、確認された方法を使用して、各PK試料について測定されることとなる。最高血中濃度(C_{max})、濃度時間曲線下面積(AUC)、クリアランス(CL)、分布容積(V_d)、及び半減期(t_{1/2})などの薬物動態パラメータは、可能であれば、血漿中濃度-時間データから推定されることとなる。

【0218】

バイオマーカー

CD19 CAR-Tと組み合わせたMPBA-IL-15の、全身及び腫瘍組織に基づく(血液及び骨髄)PD効果が検討されることとなる。

【0219】

遺伝子改変されたCD19 CAR-T細胞の特徴付け並びにモニタリングは、NKTR255での治療前及び治療中に定量ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)及びフローサイトメトリーによって、末梢血液並びに骨髄試料において実施されることとなる。限定はされないが、NK細胞、CD8+T細胞、及びCD8+メモリー細胞を含めた免疫細胞集団の数及び活性化に対するMPBA-IL-15の効果を評価するために、全身PD分析のための血液試料が、すべての患者から、治療前及び治療中に収集されることとなる。血液試料はまた、MPBA-IL-15に应答する、サイトカインレベルの変化を決定するために及び遺伝子発現の変化をプロファイリングするために、治療前及び治療中に収集されることとなる。

【0220】

可能な場合、腫瘍細胞及び免疫系活性化の特徴付けのために、イベントのスケジュール(Schedule of Events)に従って、治療前、治療中、及び治療後に、新鮮な骨髄生検材料が収集されることとなる。評価には、腫瘍微小環境における腫瘍特異的なタンパク質マーカー及び免疫細胞集団の変化の評価が含まれることとなる。入手可能なならば、保存された腫瘍組織試料が収集されることとなり、同様に分析することができる。

【0221】

有効性：

ベースライン評価のためのスクリーニング中に、また、測定可能な疾患の適格性を確立するために、全身(頭蓋底から大腿中央)の18F-FDG-陽電子放出断層撮影(PE

10

20

30

40

50

T) / コンピュータ断層撮影 (CT) が行われることとなる (SUV_{max})。Lugano 分類 (Cheson, 2014、同上) による有効性評価のためのその後の FDG-PET/CT は、第 4 週、第 3 か月 (サイクル 5 の直前) に、その後、対象が研究を中断するまで 12 週ごとに、また、可能であれば疾患進行時に、実施されることとなる。腫瘍生検材料は、可能であれば、ほぼベースライン時点で、CD19 CAR-T 注入後最初の 4 週中に、及び第 14 週に ; また、治療終了 (EOT) 時に研究者の裁量で、得られることとなる。

【0222】

統計的方法 :

安全性 :

安全性評価には、AE、臨床検査、バイタルサイン、理学的検査、及び ECG (中央判定) が含まれることとなる。DLT の発生率は、各用量漸増コホートについて評価されることとなる。すべてのグレード 3 の治療下で発現した有害事象 (TEAE) は、研究の第 1 b 相及び第 2 相において、各用量コホートについて、別々に、器官別大分類及び基本語によって概要を示されることとなる。TEAE は、発生率、重症度、及び研究薬物との関連性によって概要を示されることとなる。免疫介在性 AE (imAE) は、別に概要を示されることとなる。

10

【0223】

グレード 3 の臨床検査及びバイタルサイン異常は、研究の第 1 b 相及び第 2 相において、各用量コホートについて、記述によって概要を示されることとなる。

20

【0224】

有効性 :

6 か月での CRR、及び ORR の有効性評価は、厳密な方法に基づいて、95% 信頼区間 (CI) を伴って算出されることとなる。PFS、DOR、及び OS の分析のために、カプラン・マイヤー法が使用されることとなる。独立審査委員会 (independent review committee) (IRC) 評価に基づく 6 か月での CRR は、主要有効性評価項目となり、改変された治療企図解析対象集団を使用して概要を示されることとなる。研究者の評価に基づく 6 か月での CRR も評価されることとなる。

【0225】

すべての有効性評価項目についての一次解析は、この研究の用量拡大パートからの患者、並びにこの研究の用量漸増パートからの RP2D で治療される患者に基づくこととなる。

30

【0226】

薬物動態及びバイオマーカー :

薬物動態パラメータは、記述統計を用いて、表にする及び概要を示されることとなる。バイオマーカーについての記述的概要は、各観察時に推測されることとなる。投与前から各観察時までのバイオマーカーの変化も、記述的概要を使用して評価されることとなる。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

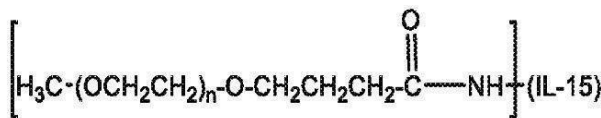
癌を有する対象を治療するための方法であって、

(i) キメラ抗原受容体 (CAR-T 細胞) を発現するように改変されている T 細胞を含む養子細胞免疫療法組成物を、対象に投与することと、

40

(ii) 構造 :

【化 6】



式(I)

(式中、IL-15 は、インターロイキン-15 部分であり、(n) は、約 150 ~ 約 3,000 の整数であり、~NH~ は、IL-15 部分のアミノ基を表す)

50

を有する I L - 1 5 受容体作動薬を対象に投与することとを含む方法。

(項目 2)

前記養子細胞免疫療法組成物が、C D 1 9 指向性キメラ抗原受容体を発現するように改変されている C A R T 細胞を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

ステップ (i) 及びステップ (i i) が、連続的にいずれかの順序で、又は実質的に同時に行われる、項目 1 又は項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

ステップ (i) がステップ (i i) の前に行われる、項目 1 又は項目 2 に記載の方法。

(項目 5)

ステップ (i i) がステップ (i) の前に行われる、項目 1 又は項目 2 に記載の方法。

(項目 6)

ステップ (i) 及び (i i) の両方が実質的に同時に行われる、項目 1 又は項目 2 に記載の方法。

(項目 7)

ステップ (i) 及び (i i) が両方とも同日に行われる、項目 1 又は項目 2 に記載の方法。

(項目 8)

ステップ (i i) が、

(a) ステップ (i) の後、1 ~ 7 日目のいずれか 1 日 (例えば、ステップ (i) の後、1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、5 日目、6 日目、7 日目) に実施される、又は

(b) ステップ (i) の後、8 ~ 1 4 日目のいずれか 1 日 (例えば、ステップ (i) の後、8 日目、9 日目、1 0 日目、1 1 日目、1 2 日目、1 3 日目、1 4 日目) に実施される、又は

(c) ステップ (i) の後、7 日目又は 1 4 日目に実施される、

項目 4 に記載の方法。

(項目 9)

治療過程中的、キメラ抗原受容体を発現するように改変されている T 細胞を含む養子細胞免疫療法組成物の、対象への単回投与を含む、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0)

治療過程中的、I L - 1 5 受容体作動薬の対象への複数回投与を含む、項目 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1)

前記養子細胞免疫療法組成物が注入によって投与される、及び / 又は前記 I L - 1 5 受容体作動薬が注入によって投与される、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2)

前記対象が、ヒトである、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3)

前記癌が、血液癌である、項目 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 4)

前記癌が、固形腫瘍である、項目 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5)

前記癌が、リンパ腫又は白血病である、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記癌が、B 細胞リンパ腫である、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記 I L - 1 5 受容体作動薬が、式 (I) の構造 (式中、(n) は、約 7 9 5 ~ 約 1 0 6 8 の範囲である) を有する、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 8)

10

20

30

40

50

(n)が、約840~約1023の範囲である、項目17に記載の方法。

(項目19)

平均すると、(n)が、約907の値を有する(例えば、前記分子のポリ(エチレン)グリコール部分が、約40,000ダルトンの重量平均分子量を有する)、項目17に記載の方法。

(項目20)

結果として、ステップ(i)又はステップ(ii)のいずれかのみに従い投与が行われる場合に観察される治療に対する応答を超えて促進される有益な応答治療が得られる、項目1~19のいずれか一項に記載の方法。

(項目21)

治療に対する前記有益な応答が適切な動物モデルに基づく、項目20に記載の方法。

(項目22)

前記モデルが、インビボ異種移植B細胞リンパ腫モデルである、項目21に記載の方法。

(項目23)

前記治療に対する有益な応答が、腫瘍細胞注射後、45日目に評価される場合の、骨髄又は腫瘍組織における腫瘍体積(すなわち、腫瘍負荷の低下)及びCAR-T細胞の総数の変化(パーセント)から選択される、項目21又は22のいずれか一項に記載の方法。

(項目24)

前記養子細胞免疫療法組成物が、CD-19指向性の遺伝子改変された自家T細胞を含む、項目1~23のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

ステップ(i)において約 1.0^7 ~約 1.0^9 細胞/kgのCAR-T細胞を対象に投与することを含む、項目1~24のいずれか一項に記載の方法。

(項目26)

約 0.2×10^6 細胞/kg~約 6.0×10^8 細胞/kg、少なくとも約 2.0×10^6 細胞/kg~約 2.0×10^8 細胞/kg、少なくとも約 0.2×10^6 細胞/kg~約 5.0×10^6 細胞/kg、少なくとも約 0.1×10^8 細胞/kg~約 2.5×10^8 細胞/kg、又は少なくとも約 0.6×10^8 細胞/kg~約 6.0×10^8 細胞/kgから選択される量のCAR-T細胞を前記対象に投与することを含む、項目25に記載の方法。

(項目27)

約 0.10 ~ $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ の前記IL-15受容体作動薬を前記対象に投与することを含む、項目1~26のいずれか一項に記載の方法。

(項目28)

約 0.25 ~ $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ の前記IL-15受容体作動薬を前記対象に投与することを含む、項目27に記載の方法。

(項目29)

約 0.25 ~ $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ の前記IL-15受容体作動薬を前記対象に投与することを含む、項目28に記載の方法。

(項目30)

ステップ(i)において、養子細胞免疫療法組成物の単回投与、及びステップ(ii)において、ステップ(i)の後の1~14日目のいずれか1日のIL-15受容体作動薬の初回投与、それに続く、治療過程を通じた21日ごとのIL-15受容体作動薬の投与を含む、項目1~29のいずれか一項に記載の方法。

(項目31)

治療過程が、1~24サイクルのIL-15受容体作動薬の投与、又は3~20サイクルのIL-15受容体作動薬の投与、又は4~15サイクルのIL-15受容体作動薬の投与を含む、項目30に記載の方法。

(項目32)

キメラ抗原受容体(CAR-T細胞)を発現するように改変されているT細胞を含む養

10

20

30

40

50

子細胞免疫療法組成物であって、項目1～31のいずれか一項において提供される組成物及び方法を包含する養子細胞免疫療法組成物を対象に投与することによって、及び/又は項目1～31のいずれか一項において挙げられる方法によって、癌を有する対象を治療する方法であって、その改良は、項目1～31のいずれか一項において記述されるIL-15受容体作動薬を対象に投与し、それによって、養子細胞免疫療法組成物単独の(すなわち、IL-15受容体作動薬の非存在下での)投与を含む対象の治療よりも増強される、治療に対する応答を提供することをさらに含む、方法。

【図面】

【図1】

【図2】

10

配列表
 配列番号1(rhIL-15)
 10 20 30 40 50 60
 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLELQVI SLESGDASIH
 70 80 90 100 110
 DTVENLILIA NNSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

配列番号2
 -1 10 20 30 40 50 60
 M NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLELQVI SLESGDASIH
 70 80 90 100 110
 DTVENLILIA NNSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

配列番号3
 10 20 30 40 50 60
 MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG IHVFIILGCF S AGLPKTEANW VNVISD

図1

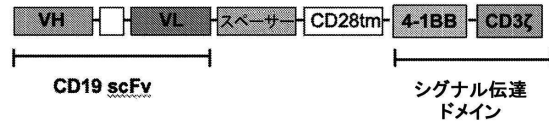


図2

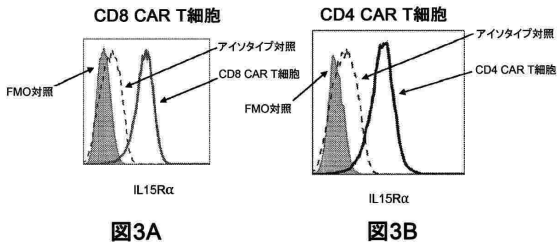
20

30

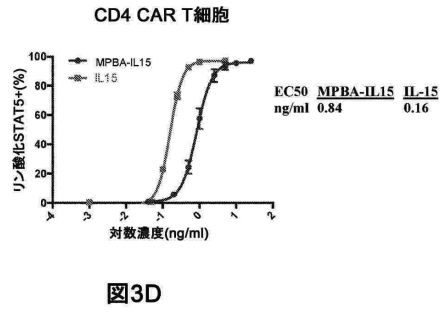
40

50

【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】



10

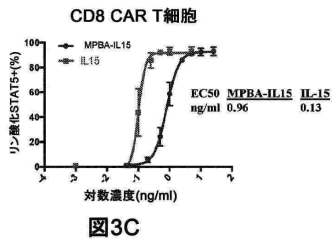


図3A

図3B

図3D

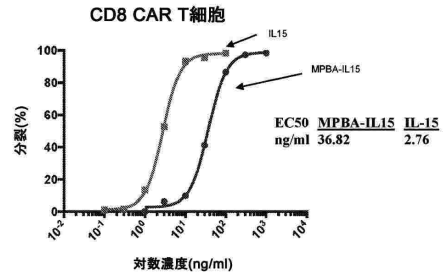


図3C

図3E

20

【 図 3 - 3 】

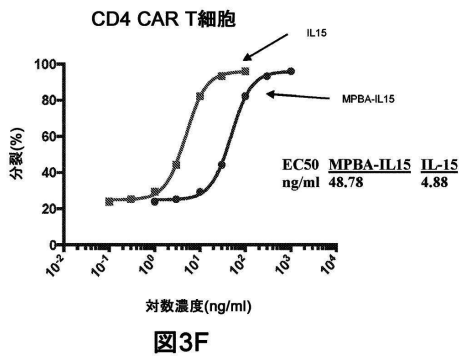
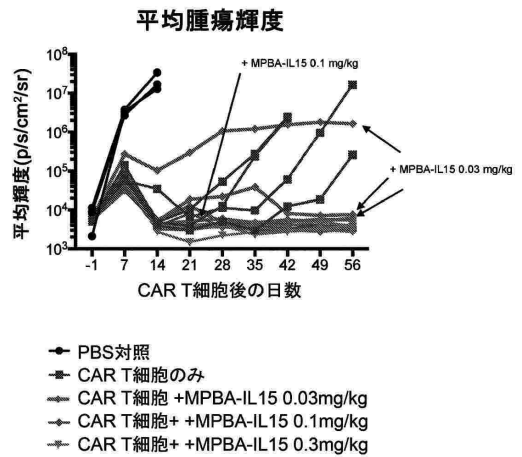


図3F

【 図 4 】



30

図4A

40

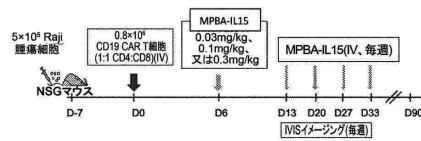


図4B

50

【 図 5 】

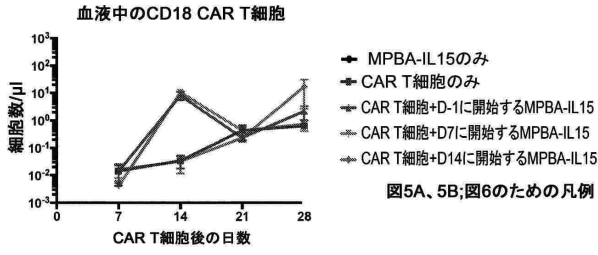


図5A

【 図 6 】

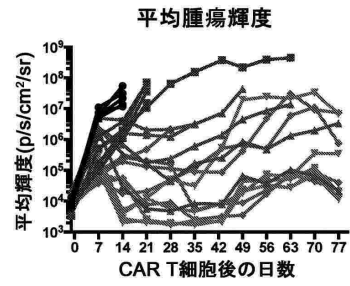


図6

10

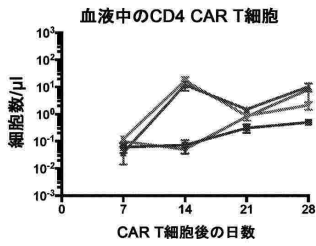


図5B

20

【 図 7 - 1 】

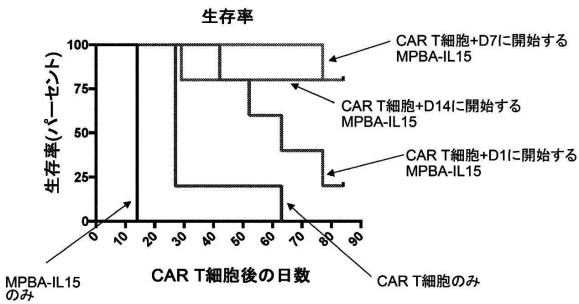


図7A

30

【 図 7 - 2 】

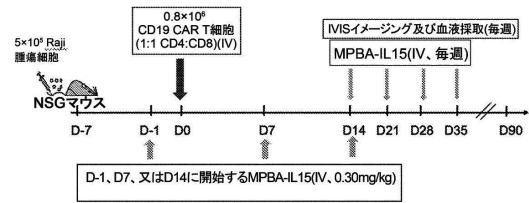


図7B

40

50

【 図 8 - 1 】

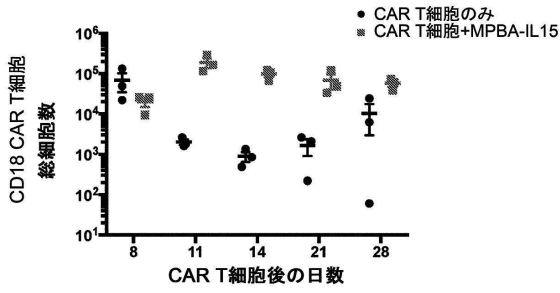


図8A

【 図 8 - 2 】

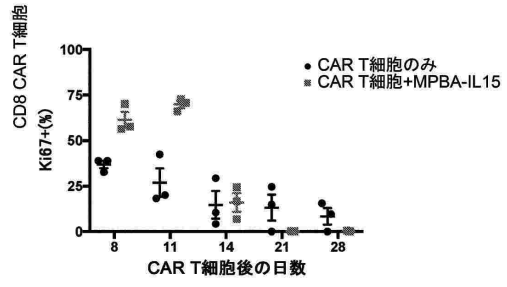


図8B

10

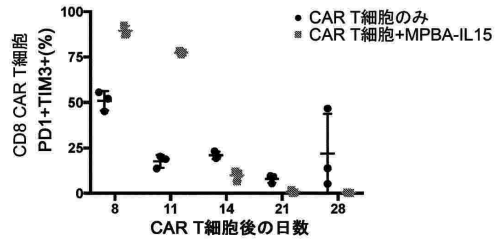


図8C

20

【 図 9 - 1 】

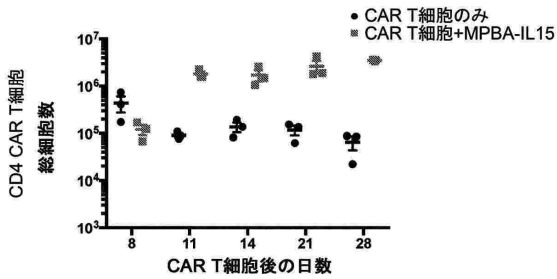


図9A

【 図 9 - 2 】

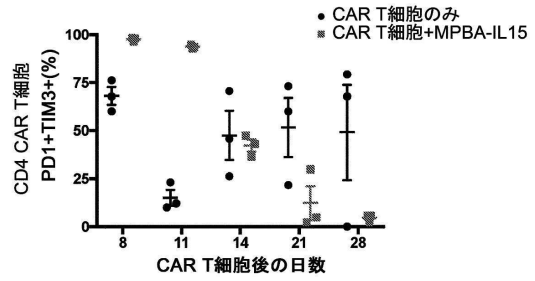


図9C

30

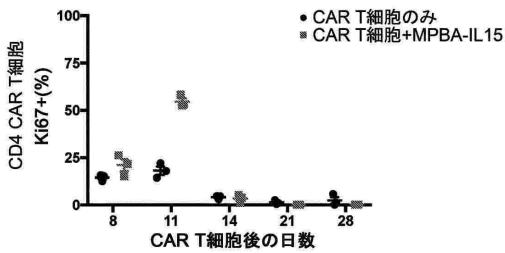


図9B

40

50

【 図 1 0 】

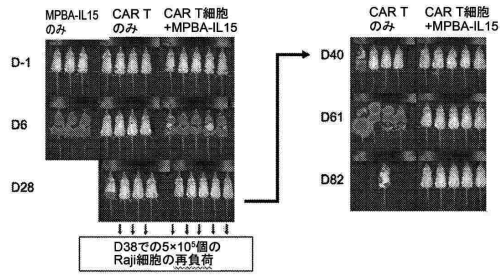


図10

【 図 1 1 】

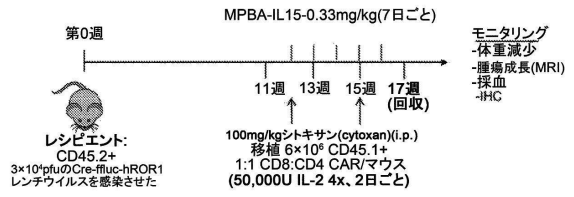


図11

10

【 図 1 2 - 1 】

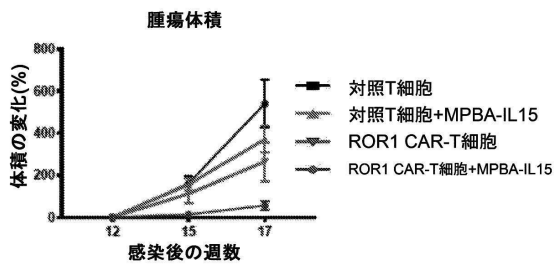


図12A

【 図 1 2 - 2 】

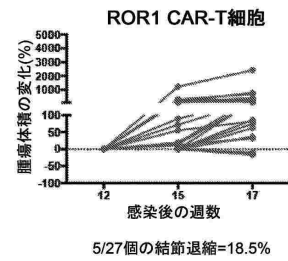


図12B

20

30

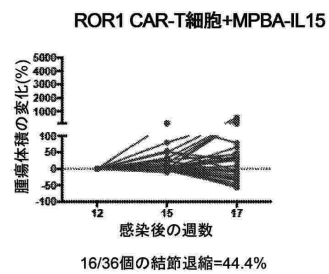


図12C

40

50

【 図 1 3 】

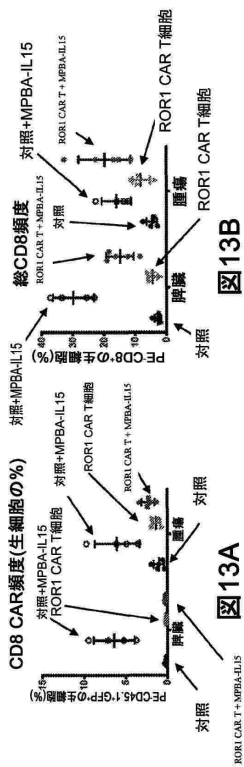


図13B

図13A

【 図 1 4 】

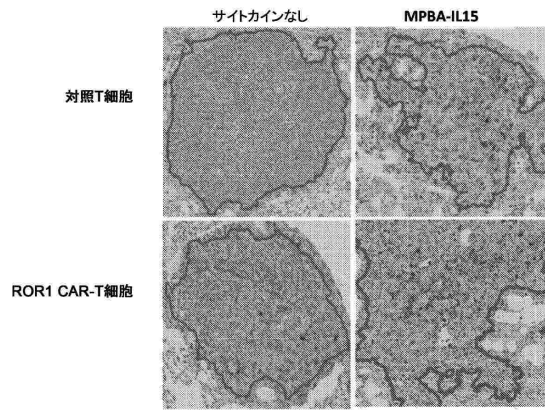


図14A、B(左上、右上)
図14C、D(左下、右下)

10

20

【 図 1 5 】

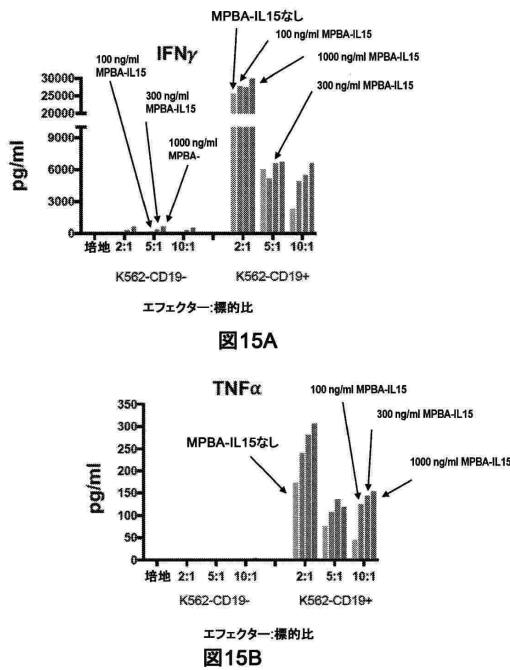


図15A

図15B

【 図 1 6 - 1 】

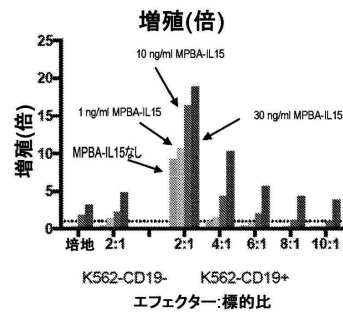


図16A

30

40

50

【 図 1 6 - 2 】

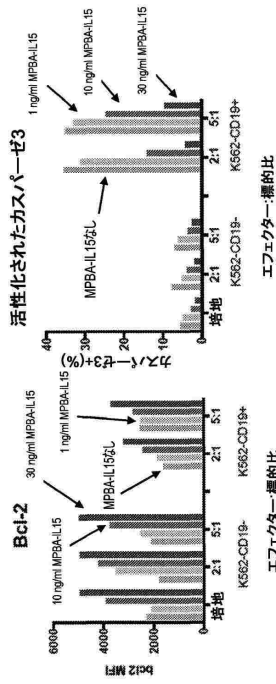


図16C

図16B

【 図 1 7 】

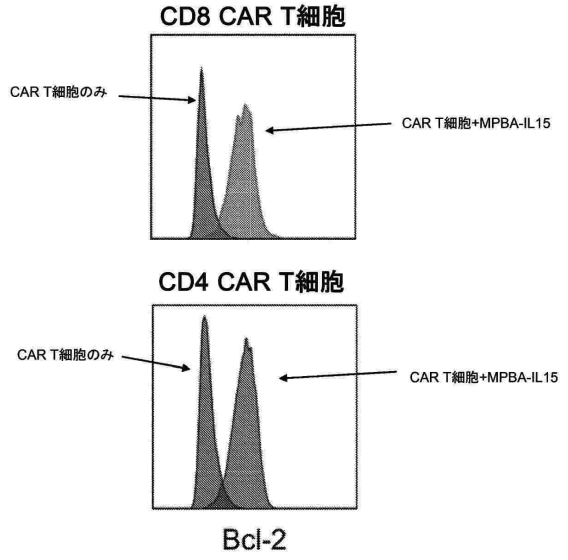


図17A(上)及び17B(下)

【 図 1 8 】

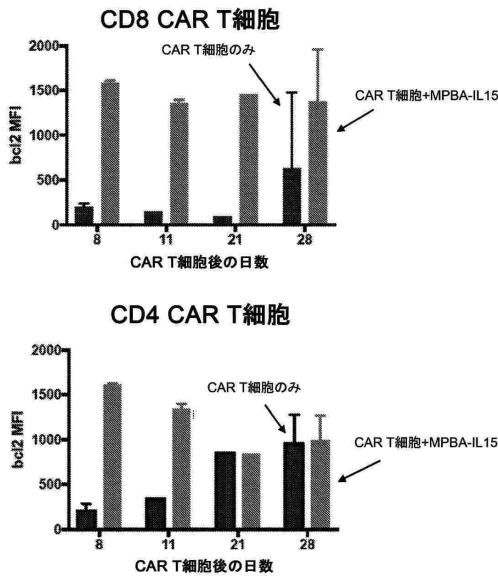


図18A(上)及び18B(下)

【 図 1 9 】

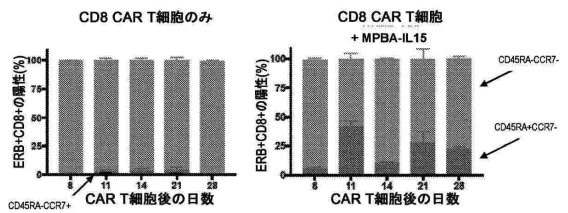


図19A

図19B

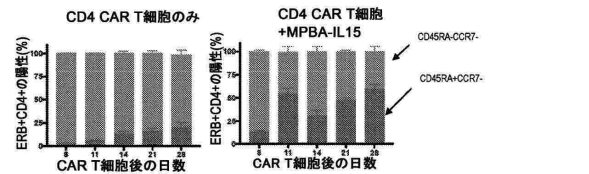


図19C

図19D

10

20

30

40

50

【配列表】

0007672342000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 0 7 K	14/54 (2006.01)	C 0 7 K	14/54
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/944,955

(32)優先日 令和1年12月6日(2019.12.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/861,858

(32)優先日 令和1年6月14日(2019.6.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 マルコンデス, アントニオ マリオ クエリード

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 3 0, ミルプレー, パラマウント ドライブ 3 2 0

(72)発明者 カーク, ピーター ベネディクト

イギリス国 オーエックス1 4 4 ジェイダブリュー オックスフォードシャー, オックスフォードシャー, アピンドン, ドレイトン, ハイ ストリート 5 5

(72)発明者 宮崎 宇広

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, キング ストリート 6 6 0, ナンバー 3 6 6

(72)発明者 タートル, キャメロン ジェイ.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 9, シアトル, 1 エスティー アベニュー, エヌ. 2 9 1 8

(72)発明者 リデル, スタンリー アール.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 7 5, サマミッシュ, 2 6 8 ティーエイチ プレイス エスイー 1 7 6 3

(72)発明者 チョウ, キャシー ケー.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 3, シアトル, フリモント アベニュー ノース 3 6 3 5, ナンバー 2 0 5

(72)発明者 フラゼル, ジーモン ペー.

ドイツ国 8 5 3 5 4 フライジング, ヨーゼフ - シュレヒト シュトラーセ 7

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 8 / 2 1 3 3 4 1 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 5 1 1 3 5 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 8 / 1 3 2 4 9 4 (WO, A 1)

中国特許出願公開第 1 0 8 7 2 8 4 5 9 (CN, A)

CHOU, C. et al., PS1208 EFFECTS OF NKTR-255, A POLYMER CONJUGATED HUMAN IL-15, ON EFFICACY OF CD19 CAR T CELL IMMUNOTHERAPY IN A PRECLINICAL LYMPHOMA MODEL, HemaSphere, 2019年06月, 3(S1):p550, DOI: 10.1097/01.HS9.0000563116.66927.0a

KOCHENDERFER, James N. et al. , Lymphoma Remissions Caused by Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells Are Associated With High Serum Interleukin-15 Levels , JCO , 2017年 , 35, 1803-1813 , DOI: 10.1200/JCO.2016.71.3024

HUANG, Wei et al. , Development of GD2-Specific Immunoliposomes for Immunotherapy of Neuroblastoma , Molecular Therapy , 2016年 , Volume 24, Supplement 1 , Page S157 , DOI: 10.1016/S1525-0016(16)33205-1

CAO, P. et al. , Application of deep IL-15 backpacks to human T cells demonstrates tunable loading with enhanced cell proliferation and antitumor activity , Cancer Res , 2018年 , 78 (13_Supplement): 3577 , DOI: 10.1158/1538-7445.AM2018-3577

KLEBANOFF, C. A. et al. , IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells , Proc Natl Acad Sci U S A. , 2004年 , 101(7):1969-74 , DOI: 10.1073/pnas.0307298101

ROYCHOWDHURY, S. et al. , Failed adoptive immunotherapy with tumor-specific T cells: reversal with low-dose interleukin 15 but not low-dose interleukin 2 , Cancer Res. , 2004年 , 64(21):8062-7 , DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1860

MILLER, J. S. et al. , Expansion and homing of adoptively transferred human natural killer cells in immunodeficient mice varies with product preparation and in vivo cytokine administration: implications for clinical therapy , Biol Blood Marrow Transplant. , 2014年 , 20(8):1252-7 , DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.05.004

HOYOS, Valentina et al. , Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety , Leukemia. Author manuscript; available in PMC 2010 Dec 1. , 2010年 , 24(6): 1160-1170 , DOI: 10.1038/leu.2010.75

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K

A 6 1 P

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)

P u b M e d