

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-517454
(P2021-517454A)

(43) 公表日 令和3年7月26日(2021.7.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z 4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T 4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-541437 (P2020-541437)
 (86) (22) 出願日 平成31年1月24日 (2019.1.24)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年9月14日 (2020.9.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2019/051806
 (87) 国際公開番号 WO2019/145453
 (87) 国際公開日 令和1年8月1日 (2019.8.1)
 (31) 優先権主張番号 18153782.0
 (32) 優先日 平成30年1月28日 (2018.1.28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 503083421
 ユニベルシテ ドゥ ジュネーブ
 スイス国, 1 2 1 1 ジュネーブ 4, リ
 ュ デュ ジェネラル デュフル, 2 4
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 デ スメット、ティボー
 フランス共和国、プレブサン - モエン
 、ルートゥ ベルビュー 3 3 0、ピラ
 8
 (72) 発明者 ライス、バルター
 スイス連邦、ベッシー、シュマン デュ
 クレ - デ - ラ - ネージュ、2
 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療のためのアルギナーゼ抑制

(57) 【要約】

本発明は、血液腫瘍および固形腫瘍を含む癌を治療する方法に関する。一実施形態では、方法は、免疫細胞、特に癌に罹患している患者のT細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現を障害することを含む。アルギナーゼ発現は、アルギナーゼをコードする遺伝子の変異(欠失または切断を含む)によって、RNA干渉によって、またはアルギナーゼ阻害剤の投与によって障害される。好ましい実施形態では、T細胞は、CAR(キメラ抗原受容体)療法の枠内で改変される。本発明はまた、障害されたアルギナーゼ活性と、ネガティブ免疫チェックポイント調節因子(PDL1-PD1およびB7-CTL A 4 阻害経路)の抗体媒介性遮断とを組み合わせた治療方法を提供する。

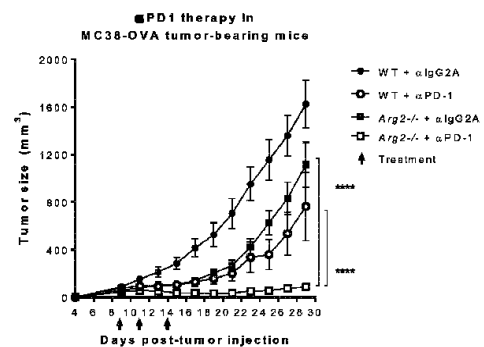


Figure 4A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

養子細胞移入により癌を治療するために、アルギナーゼ活性および/または発現が構成的または誘導的に障害された免疫細胞。

【請求項 2】

前記障害されたアルギナーゼ活性および/または発現が、障害されたアルギナーゼ 2 活性および/または発現である、請求項 1 に記載の免疫細胞。

【請求項 3】

白血病、リンパ腫および/または固形腫瘍からなる群から選択される 1 つ以上の癌を治療するための、請求項 1 または請求項 2 に記載の免疫細胞。

10

【請求項 4】

前記アルギナーゼ活性が、例えば、

- ・前記アルギナーゼをコードする遺伝子を変異させるか、切断するか、欠失させること、
 - ・前記アルギナーゼをコードする前記遺伝子の転写因子をコードする遺伝子を投与するか、変異させるか、切断するか、欠失させること、
 - ・前記アルギナーゼをコードする mRNA に結合することができるヌクレオチド配列をコードするか含むヌクレオチド配列を投与すること
- によって、前記アルギナーゼの発現を障害することによって障害される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の免疫細胞。

20

【請求項 5】

前記アルギナーゼ活性が、前記アルギナーゼ活性および/または発現を障害するためのエキスピボ処理に前記細胞を曝すことによって障害される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の免疫細胞。

【請求項 6】

前記障害されたアルギナーゼ活性が、前記アルギナーゼをコードする mRNA に結合することができる核酸分子を前記免疫細胞にエキスピボで投与すること、またはそのような核酸分子をコードするベクターを投与することに起因する、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の免疫細胞。

【請求項 7】

T 細胞、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞)、自然リンパ球系細胞および樹状細胞から選択される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の免疫細胞。

30

【請求項 8】

CD3⁺T 細胞および/または CD4⁺T 細胞および/または CD8⁺T 細胞から選択される、請求項 7 に記載の免疫細胞。

【請求項 9】

キメラ抗原受容体 (CAR) および/またはトランスジェニック T 細胞受容体をさらに含み、前記 CAR が、リンカーを介して T 細胞シグナル伝達ドメイン、好ましくは CD3 シグナル伝達ドメインに融合された抗原結合ドメインを好ましくは含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の免疫細胞。

40

【請求項 10】

ネガティブ免疫チェックポイント調節因子を標的とするおよび/またはネガティブ免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する癌治療と組み合わせた、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の免疫細胞。

【請求項 11】

前記癌治療が、免疫チェックポイント調節因子 PD-L1 / PD1、CTLA4、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (B7x / B7S1 / VTCN1)、HHLA2 (B7H7 / B7-H5)、VISTA (PD1H、DD1、c10orf54、Gi24、Dies1、SISP1)、VSIG、LAG-3、TIGIT、CD96、CD39、CD73、アデノシン A2 受容体、CD47、ブチロフィリン (BTN) および/また

50

はTIM-3 (T細胞-免疫グロブリン-ムチンドメイン3)を標的とする、請求項10に記載の免疫細胞。

【請求項12】

前記癌治療が、PD1、PD-L1、CTLA4、B7-H3、B7-H4、HHLA2、VISTA、VSIG、LAG-3、TIGIT、CD96、CD39、CD73、アデノシンA2受容体、CD47、ブチロフィリン(BTN)および/またはTIM-3の群から選択される1つ以上に特異的に結合する抗体を含む、請求項10および/または11に記載の免疫細胞。

【請求項13】

単離および/または精製されている、請求項1から12のいずれか一項に記載の免疫細胞。

10

【請求項14】

特に養子細胞移入のための抗癌治療を調製する方法であって、

- ・免疫細胞を提供すること、および
- ・前記免疫細胞のアルギナーゼ活性および/または発現をエクスピボで障害することを含む方法。

【請求項15】

養子細胞移入のための免疫細胞の抗癌活性を改善する方法であって、前記免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現をエクスピボで障害することを含む方法。

【請求項16】

個体から、例えば治療される対象から以前に採取されている、請求項1から13のいずれか一項に記載の免疫細胞。

20

【請求項17】

免疫細胞の抗癌活性を改善する方法であって、前記免疫細胞のアルギナーゼ活性および/または発現をエクスピボで障害することを含む方法。

【請求項18】

養子細胞移入により癌を治療する方法であって、それを必要とする対象に、アルギナーゼ活性および/または発現が障害された免疫細胞を投与することを含む方法。

【請求項19】

前記免疫細胞を投与する前に、前記免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現をエクスピボで障害することを含む、請求項18に記載の方法。

30

【請求項20】

請求項1から13および16のいずれか一項に記載の免疫細胞を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の治療、特に癌の免疫療法および/または養子細胞移入療法の分野で使用するための免疫細胞、キット、方法および組成物に関する。本発明はまた、細胞、キットおよび組成物を製造する方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

免疫系は、悪性新生物の発生を抑制し、腫瘍進行を阻害し、腫瘍排除を促進する上で基本的な役割を果たす。免疫監視機構から逃れるために、腫瘍は多様な回避機構を備える傾向がある。免疫回避戦略には、抗炎症性サイトカインの産生、調節性T細胞(Treg)および骨髄由来抑制細胞(MDSC)を含む阻害細胞の動員、ネガティブT細胞共刺激分子の発現、ならびに免疫抑制性代謝経路(immunosuppressive metabolic pathway)の活性化が含まれる。そのような回避機構を阻害することによって腫瘍を標的とした免疫応答を増強することは、重要な治療的有望性を有する戦略である。ネガティブ免疫チェックポイント調節因子の抗体媒介性遮断は、特に、今までのところ最も有望かつ成功している免疫療法アプローチの一つである。このよう

50

な免疫チェックポイント経路は、通常、過剰なT細胞応答を停止または抑制することによって免疫病理を予防または緩和する。腫瘍細胞は、この機構を利用して、T細胞による攻撃を防ぐ。治療的介入によってこれらの「ブレーキ」を解放すると、効果的な抗腫瘍免疫応答を回復させることができる。しかし、PD L 1 PD 1およびB7 CTL A 4 阻害経路を妨害することにより得られた前例のない成功にも関わらず、現在のチェックポイント遮断療法は、あらゆる患者に対して効果的な抗腫瘍免疫応答を誘導しないか、あらゆるタイプの癌に対して活性ではないか、部分的な効果を有するにとどまるか、腫瘍がチェックポイント遮断に対する耐性を生じる。

【0003】

癌免疫療法の別の形態は、患者の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)をエキスビボで増殖させ、腫瘍抗原に应答する活性化Tリンパ球集団を再注入するか、患者の末梢血Tリンパ球を除去し、既知の腫瘍抗原を標的とするトランスジェニックT細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)を発現させるエキスビボ遺伝子改変を行った後、患者に再注入して癌細胞を破壊する形態の養子細胞療法を介して、患者の免疫細胞を利用して癌を根絶することからなる。CAR T細胞免疫療法は血液腫瘍では前例のない成功を示してきたが、CAR T細胞を使用した固形腫瘍の治療は、一つには免疫抑制腫瘍微小環境のために、これまでほとんど成功していない。さらに、インビトロ製造中のCAR T細胞の過度の消耗または分化を防ぐためにかなりの注意が必要である。

10

【0004】

したがって、単独で、または既存の治療と組み合わせ、強力な抗腫瘍応答を誘導することを目的とした新しい戦略の開発に対する満たされていない必要性がある。特に、他の補完療法とともに、様々な免疫療法剤を含む相乗的治療の組合せは、今後、成功につながる抗癌治療の基礎を構成する可能性がある。

20

【0005】

さらに研究するのに値する一つの治療戦略が、抗腫瘍免疫応答を阻害することによって腫瘍増殖を促進する代謝経路を妨げることである。これらの中で、増加しつつある証拠は、L-アルギニン代謝の治療的操作が抗腫瘍免疫応答の増強に役立つ可能性があることを示唆している。L-アルギニンは、特定の細胞、特にT細胞およびマクロファージなど、免疫系の特定の細胞によって細胞外環境から吸収される必要がある準必須アミノ酸である。これらの細胞の最適な機能のためには、十分なL-アルギニン利用能が不可欠である。T細胞の場合、L-アルギニンの枯渇により、CD3-鎖の発現が低下し、T細胞受容体(TCR)-CD3複合体を介したシグナル伝達が損なわれ、抗原特異的T細胞の活性化、増殖および細胞毒性が抑制される。

30

【0006】

L-アルギニンは、アルギナーゼ(ARG)および一酸化窒素シンターゼ(NOS)の基質である。NOSによるL-アルギニン異化はNOおよび他の反応性窒素中間体の産生をもたらす、これは、病原体に対するマクロファージの細胞毒性活性に寄与する重要な機構である。ARGはL-アルギニンを尿素およびL-オルニチンに変換するが、この反応は尿素サイクルによる肝臓のアンモニアの解毒に果たすその役割のために最もよく知られている。L-オルニチンはさらにポリアミンおよびプロリンに処理される。ARG酵素およびNOS酵素の発現は、腫瘍細胞自体、またはマクロファージおよび骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)などの腫瘍浸潤細胞のいずれかにおいて、腫瘍内で増加することが見出されている。腫瘍微小環境(TME)では、NOS媒介性NO産生が腫瘍の血管新生および転移を促進するのに対して、ARGを介したプロリン利用能およびポリアミン合成の増加は、腫瘍細胞増殖を促進する。さらに、腫瘍内のARGおよびNOSの発現により誘導されるL-アルギニンの枯渇は、上記機構により抗腫瘍T細胞応答を損なう免疫抑制微小環境の生成に寄与する。

40

【0007】

哺乳類は、2つの異なる遺伝子によってコードされる2つのARG酵素、アルギナーゼ1(ARG1)およびアルギナーゼ2(ARG2)を有する。2つの酵素は同じ生

50

学反応を触媒し、それらの触媒部位で100%の相同性を示し、現在利用可能なARG阻害剤によって両方とも阻害される。ARG1とARG2とは、それらの細胞内局在および発現パターンに関して異なる。ARG1は、主に肝臓に発現する細胞質酵素であるが、いくつかの非肝臓組織および細胞型にも発現する。ARG2は、ミトコンドリアに位置し、多様な組織で広範囲な発現を示す。

【0008】

Dunand - Sauthier I.らによる刊行物「Repression of arginase-2 expression in dendritic cells by microRNA-155 is critical for promoting T cell proliferation」、J Immunol. 193: 1690 - 1700 (2014)では、ARG2は樹状細胞(DC)に発現する主要なアルギナーゼであることが見出され、その対応するmRNAはDC成熟の間miR155によって抑制されることが示された。活性化されたmiR155欠乏DCでは、ARG2の発現および活性の異常に高いレベルが観察された。逆に、miR155の過剰発現は、DC内のARG2発現を阻害した。miR155が様々な細胞型で様々な遺伝子を制御することはよく知られているが、miR155がT細胞を含む他の細胞型でARG2発現も制御するかどうかは報告されていない。

10

【0009】

国際公開第2014059248号パンフレットは、対象から単離されたT細胞に、miR155転写物をコードする核酸分子をエクスピボで導入することにより、T細胞媒介免疫を増大させる方法を教示している。米国特許第2015/275209号明細書は同様に、抗原特異的T細胞受容体(TCR)、およびマイクロRNA分子をコードする外因性核酸を含む単離または精製されたCD8+T細胞を教示している。国際公開第2014059248号パンフレットも米国特許第2015/275209号明細書も、T細胞内のmiR-155の活性様式を開示していない。Gracias D.らによる刊行物「MicroRNA-155 controls CD8+ T cell responses by regulating interferon signaling」、Nat Immunol. 14: 593 - 602 (2013)では、miR155がCD8+T細胞内で845遺伝子の発現を調節することが見出され、その大部分が2倍未満の差次的発現を示したことから、miR155が個々の標的に対してロバスタな効果を有するのではなく、多数の転写物に中程度に影響を及ぼすことが示唆された。Graciasらは、その発現がmiR155により調節される845遺伝子の中でARG2を同定していない。したがって、これらの参考文献は、T細胞ではARG2がmiR155の標的となり得ること、およびT細胞ではmiR155の効果がARG2阻害を介して媒介されることを示唆していない。

20

30

【0010】

いくつかの特許文献は、アルギナーゼ阻害剤に関する。欧州特許第2768491B1号明細書は、心血管障害、性障害、創傷治癒障害、消化管障害、自己免疫障害、免疫障害、感染症、肺障害、線維性障害および溶血性障害などの多くの症状を治療するための小分子アルギナーゼ阻害剤を開示している。欧州特許第2083812B1号明細書は、アレルギー性喘息および非アレルギー性喘息ならびにアレルギー性鼻炎を治療するための6-ポロノ-L-ノルロイシン(ABH)などの小分子アルギナーゼ阻害剤を開示している。国際公開第2007/111626号パンフレットは、ARG2をサイレンシングするためのsiRNAを含め、治療またはアテローム性動脈硬化症のためのARG2活性の調節を開示している。米国特許第9789169号明細書は、免疫系を調節すること、特に移植臓器の拒絶を予防することを目的として、血漿アルギニンレベルを枯渇させるための組換えARG1タンパク質を開示している。

40

【0011】

本発明の目的は、好ましくは造血器新生物および/または固形腫瘍に対して有効である、癌の治療を提供することである。

50

【 0 0 1 2 】

本発明の目的は、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞および/またはトランスジェニックT細胞受容体T細胞に基づく治療の効果、および/または免疫チェックポイント調節因子との相互作用および/または免疫チェックポイント調節因子の遮断に基づく治療の効果を改善することである。例えば、既存の癌治療または既存の治療概念を改善する方法を提供することが目的である。

【 0 0 1 3 】

本発明の目的は、免疫療法剤を含む他の癌治療と相乗的に使用され得る癌の治療を提供することである。

【 0 0 1 4 】

本発明の目的は、癌を標的とした免疫応答を促進することにより癌を治療することである。特に、本発明の目的は、癌細胞が癌を標的とした免疫応答を回避するために利用する機構を阻害することである。

10

【 0 0 1 5 】

本発明は、上記の必要性および目的に対処する。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 6 】

注目すべきことに、本発明者らは、アルギナーゼ活性および/または発現が障害された免疫細胞の方が、固形腫瘍を含む癌の治療に対する効果が高いことを示す実験を行った。

【 0 0 1 7 】

一態様では、本発明は、固形腫瘍を含む癌を治療するために、アルギナーゼ活性および/または発現が障害された免疫細胞を提供する。

20

【 0 0 1 8 】

一態様では、本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫細胞を提供し、該免疫細胞ではさらに、アルギナーゼ活性および/または発現が障害されている。

【 0 0 1 9 】

一態様では、本発明は、アルギナーゼ活性および/または発現が障害された腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を提供する。好ましくは、該TILは、癌に罹患しているヒトまたは動物から単離されている。

【 0 0 2 0 】

一態様では、本発明は、養子細胞移入により癌を治療するために、構成的または誘導的に障害されたアルギナーゼ活性および/または発現を示す免疫細胞を提供する。

30

【 0 0 2 1 】

一態様では、本発明は、癌を治療する方法を提供し、方法は、免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現を障害することを含む。

【 0 0 2 2 】

一態様では、本発明は、癌を治療する方法であって、それを必要とする対象に、アルギナーゼ活性および/または発現が障害された免疫細胞を投与することを含む方法を提供する。好ましくは、方法は、養子細胞移入により癌を治療する方法である。

【 0 0 2 3 】

一態様では、本発明は、癌を治療する方法であって、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を投与することを含む方法を提供し、該TILではさらに、アルギナーゼ活性および/または発現が障害されている。

40

【 0 0 2 4 】

一態様では、本発明は、癌を治療する方法を提供し、方法は、CARを発現する免疫細胞を投与することを含み、該免疫細胞では、アルギナーゼ活性および/または発現が障害されている。

【 0 0 2 5 】

一態様では、本発明は、癌を治療する方法を提供し、方法は、CARおよび/またはTILを発現する細胞を提供すること、該細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現を

50

低下させるように好ましくはインビトロおよび/またはエクスピボで該細胞を処理すること、およびそれを必要とする対象、好ましくは癌に罹患している対象に該細胞を投与することを含む。

【0026】

一態様では、本発明は、免疫細胞の抗癌活性を改善する方法を提供し、方法は、該免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現を障害すること、好ましくはエクスピボで該免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現を障害することを含む。

【0027】

一態様では、本発明は、養子細胞移入のための免疫細胞の抗癌活性を改善する方法を提供し、方法は、好ましくはエクスピボで該免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現を障害することを含む。

10

【0028】

一態様では、本発明は、特に養子細胞移入のための抗癌治療を調製および/または製造する方法を提供し、方法は、免疫細胞を提供すること、およびエクスピボで該免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現を障害することを含む。

【0029】

一態様では、本発明は、癌を治療するための免疫細胞内のアルギナーゼ活性を低下させることができる作用物質を提供する。

【0030】

一態様では、本発明は、癌を治療するためのキットを提供し、キットは、免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現を障害するのに適した作用物質を含む。

20

【0031】

一態様では、本発明は、アルギナーゼ活性および/または発現が障害された免疫細胞と、PD L 1 - P D 1 および B 7 - C T L A 4 阻害経路などの免疫抑制経路を遮断する作用物質とを投与することを含む併用治療を提供する。好ましくは、該作用物質は、抗体 (A b)、例えば、抗 P D 1 A b または抗 C T L A 4 A b である。

【0032】

一態様では、本発明は、免疫細胞、特に本発明の免疫細胞を含む組成物を提供する。

【0033】

一態様では、本発明は、腫瘍および/または癌に罹患している対象の腫瘍のサイズおよび/または体積を減少させるために、アルギナーゼ活性および/または発現が障害された免疫細胞を提供する。一態様では、本発明は、癌に罹患している対象の生存率および/または生存時間を増加させるために、アルギナーゼ活性および/または発現が障害された免疫細胞を提供する。

30

【0034】

一態様では、本発明は、癌のための治療を生み出す方法であって、単離された免疫細胞を提供すること、およびアルギナーゼ活性および/または発現が障害されるように該免疫細胞を処理することを含む方法を提供する。

【0035】

本発明のさらなる態様および好ましい実施形態は、本明細書中以下および添付の特許請求の範囲で定義される。本発明のさらなる特徴および利点は、以下に与えられる好ましい実施形態の説明から当業者に明らかになるであろう。

40

【0036】

図では、本発明の実施形態および/または例を例示する目的のために実験セクションの結果が示されている。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1A】 B 1 6 - O V A 腫瘍細胞または M C 3 8 - O V A 腫瘍細胞を移植した W T マウスおよび A r g 2^{-/-} マウスにおける腫瘍増殖を示す。図は、A r g 2^{-/-} マウスでは腫瘍増殖が障害されたことを示している。

50

【図1B】B16-OVA腫瘍細胞またはMC38-OVA腫瘍細胞を移植したWTマウスおよびArg2^{-/-}マウスにおける腫瘍増殖を示す。図は、Arg2^{-/-}マウスでは腫瘍増殖が障害されたことを示している。

【図2A】図1Aおよび図1Bについて記載されたマウスにおける抗腫瘍免疫を示す。図は、Arg2^{-/-}マウスでは抗腫瘍免疫が増強されたことを示している。

【図2B】図1Aおよび図1Bについて記載されたマウスにおける抗腫瘍免疫を示す。図は、Arg2^{-/-}マウスでは抗腫瘍免疫が増強されたことを示している。

【図3A】CD8⁺T細胞を枯渇させたか（白丸および白四角）枯渇させなかった（黒丸および黒四角）WT（丸）マウスおよびArg2^{-/-}（四角）マウスにおけるMC38-OVA腫瘍増殖を示す。これらの実験では、CD8⁺細胞枯渇により腫瘍増殖が増加した。

【図3B】図3Aに記載された、CD8⁺細胞を枯渇させたマウスの動物生存率の低下を示す。

【図4A】それぞれ、腫瘍注射後9日目、11日目および14日目（矢印）に、抗PD1 Abまたはアイソタイプ対照Abを投与した（図4A：白丸および白四角）または投与していない（図4A：黒丸および黒四角）WT（図4A：丸）マウスおよびArg2^{-/-}（図4A：四角）マウスにおけるMC38-OVA腫瘍増殖、腫瘍クリアランスおよび動物生存率を示す。結果は、腫瘍サイズ（図4A：白四角）、腫瘍クリアランスおよび生存率に対する抗PD1 Ab治療とArg2欠乏との強力な組合せ効果を示している。

【図4B】それぞれ、腫瘍注射後9日目、11日目および14日目（矢印）に、抗PD1 Abまたはアイソタイプ対照Abを投与した（図4A：白丸および白四角）または投与していない（図4A：黒丸および黒四角）WT（図4A：丸）マウスおよびArg2^{-/-}（図4A：四角）マウスにおけるMC38-OVA腫瘍増殖、腫瘍クリアランスおよび動物生存率を示す。結果は、腫瘍サイズ（図4A：白四角）、腫瘍クリアランスおよび生存率に対する抗PD1 Ab治療とArg2欠乏との強力な組合せ効果を示している。

【図4C】それぞれ、腫瘍注射後9日目、11日目および14日目（矢印）に、抗PD1 Abまたはアイソタイプ対照Abを投与した（図4A：白丸および白四角）または投与していない（図4A：黒丸および黒四角）WT（図4A：丸）マウスおよびArg2^{-/-}（図4A：四角）マウスにおけるMC38-OVA腫瘍増殖、腫瘍クリアランスおよび動物生存率を示す。結果は、腫瘍サイズ（図4A：白四角）、腫瘍クリアランスおよび生存率に対する抗PD1 Ab治療とArg2欠乏との強力な組合せ効果を示している。

【図5】WTマウスまたはArg2^{-/-}マウス由来の骨髓（BM）細胞を全4種の対の組合せで用いて、致死量未満の放射線を照射したWTマウスまたはArg2^{-/-}マウスを再構成することによって作製されたキメラマウスにおけるMC38-OVA腫瘍増殖を示す。結果は、腫瘍増殖の減少が、主にBM由来細胞のArg2欠乏によるものであることを示している。その結果、Arg2^{-/-}マウス由来のBM細胞を投与されたマウス（白丸および白四角）では、腫瘍サイズが小さくなる。

【図6A】OTI WTマウスから単離されたT細胞のインビトロ活性化（図6A）および増殖（図6B）と、二重ホモ接合体Arg2^{-/-}OTIマウス由来のものとをそれぞれ比較する。結果は、Arg2^{-/-}OTI T細胞が、Arg2^{+/+}OTI T細胞と比較して、活性化および増殖の増加を示すことを示している。

【図6B】OTI WTマウスから単離されたT細胞のインビトロ活性化（図6A）および増殖（図6B）と、二重ホモ接合体Arg2^{-/-}OTIマウス由来のものとをそれぞれ比較する。結果は、Arg2^{-/-}OTI T細胞が、Arg2^{+/+}OTI T細胞と比較して、活性化および増殖の増加を示すことを示している。

【図7A】本発明の実施形態による細胞療法に使用されるインビボ系の作製を示す。

【図7B】図7Aに示されるように処置されたマウスにおける腫瘍増殖を示す。Arg2^{-/-}OTI T細胞を投与されたWTマウスは、有意に遅い腫瘍増殖を示す。

【図7C】図7Aに示されるように処置されたマウスの動物生存率を示す。Arg2^{-/-}OTI T細胞を投与されたWTマウスは、顕著に増加した生存率を示す。

10

20

30

40

50

【図 8 A】MC38-OVA 担持 WT レシピエントでは、Arg2 欠乏養子移入 CD8 + T 細胞の方が、多くの IFN (図 8 A) を産生し、消耗しにくくなり (図 8 B)、長く持続する (図 8 C) ことを示す。

【図 8 B】MC38-OVA 担持 WT レシピエントでは、Arg2 欠乏養子移入 CD8 + T 細胞の方が、多くの IFN (図 8 A) を産生し、消耗しにくくなり (図 8 B)、長く持続する (図 8 C) ことを示す。

【図 8 C】MC38-OVA 担持 WT レシピエントでは、Arg2 欠乏養子移入 CD8 + T 細胞の方が、多くの IFN (図 8 A) を産生し、消耗しにくくなり (図 8 B)、長く持続する (図 8 C) ことを示す。

【図 9 A】腹腔内注射による T 細胞移入後 8 日目、11 日目および 14 日目 (矢印) に、WT OTI T 細胞 (図 9 A : 丸) または Arg2 欠乏 OTI T 細胞 (図 9 A : 四角) を投与し、抗 PD1 Ab または アイソタイプ対照 Ab を投与したか (図 9 A : 黒丸および黒四角) 投与していない (図 9 A : 白丸および白四角) WT マウスにおける d60 の MC-38-OVA 腫瘍体積、生存率および腫瘍クリアランスをそれぞれ示す。結果は、腫瘍体積、生存率および腫瘍クリアランスに対する、養子 CD8 + T 細胞における抗 PD1 Ab 処置と Arg2 欠乏との強力な組合せ効果を示している。

【図 9 B】腹腔内注射による T 細胞移入後 8 日目、11 日目および 14 日目 (矢印) に、WT OTI T 細胞 (図 9 A : 丸) または Arg2 欠乏 OTI T 細胞 (図 9 A : 四角) を投与し、抗 PD1 Ab または アイソタイプ対照 Ab を投与したか (図 9 A : 黒丸および黒四角) 投与していない (図 9 A : 白丸および白四角) WT マウスにおける d60 の MC-38-OVA 腫瘍体積、生存率および腫瘍クリアランスをそれぞれ示す。結果は、腫瘍体積、生存率および腫瘍クリアランスに対する、養子 CD8 + T 細胞における抗 PD1 Ab 処置と Arg2 欠乏との強力な組合せ効果を示している。

【図 9 C】腹腔内注射による T 細胞移入後 8 日目、11 日目および 14 日目 (矢印) に、WT OTI T 細胞 (図 9 A : 丸) または Arg2 欠乏 OTI T 細胞 (図 9 A : 四角) を投与し、抗 PD1 Ab または アイソタイプ対照 Ab を投与したか (図 9 A : 黒丸および黒四角) 投与していない (図 9 A : 白丸および白四角) WT マウスにおける d60 の MC-38-OVA 腫瘍体積、生存率および腫瘍クリアランスをそれぞれ示す。結果は、腫瘍体積、生存率および腫瘍クリアランスに対する、養子 CD8 + T 細胞における抗 PD1 Ab 処置と Arg2 欠乏との強力な組合せ効果を示している。

【図 10 A】ARG 阻害がインビトロでヒト T 細胞活性化を増加させることを示す。PBMc から精製したヒト T 細胞を未処理のままにするか (-)、抗 CD3 Ab および抗 CD28 Ab を用いてインビトロで活性化し (+)、ARG 阻害剤の存在下または非存在下で 96 ウェルプレート内の RPMI 中で培養し、活性化 24 時間後の活性化 (CD69 染色) を評価した。図は、示された ARG 阻害剤の存在下での CD4 + T 細胞 (図 10 A) および CD8 + T 細胞 (図 10 B) 内の CD69 + 細胞の頻度の増加を示している。

【図 10 B】ARG 阻害がインビトロでヒト T 細胞活性化を増加させることを示す。PBMc から精製したヒト T 細胞を未処理のままにするか (-)、抗 CD3 Ab および抗 CD28 Ab を用いてインビトロで活性化し (+)、ARG 阻害剤の存在下または非存在下で 96 ウェルプレート内の RPMI 中で培養し、活性化 24 時間後の活性化 (CD69 染色) を評価した。図は、示された ARG 阻害剤の存在下での CD4 + T 細胞 (図 10 A) および CD8 + T 細胞 (図 10 B) 内の CD69 + 細胞の頻度の増加を示している。

【発明を実施するための形態】

【0038】

以下、本発明を説明するために、本発明の範囲を限定することを意図することなく、本発明の好ましい実施形態を説明する。

【0039】

いくつかの態様では、本発明は、癌を治療するために、アルギナーゼ活性および/または発現が障害された免疫細胞に関する。細胞は、好ましくは癌免疫療法に使用される。

【0040】

10

20

30

40

50

「障害されたアルギナーゼ活性および/または発現」という表現での用語「障害された」は、例えば、本明細書に開示されるように、該障害されたアルギナーゼ活性および/または発現を有するように、処理、改変および/または操作されていない対応する野生型免疫細胞と比較して低下したアルギナーゼ活性および/または発現を意味することを意図する。好ましい実施形態では、該アルギナーゼ活性および/または発現は、アルギナーゼの活性および/または発現が検出されない程度まで障害される。好ましくは、該アルギナーゼ活性は完全に存在しない。

【0041】

「障害されたアルギナーゼ活性および/または発現」という表現は、アルギナーゼをコードするmRNAの転写および/または翻訳が障害されたことによりアルギナーゼ活性が低下する状況を包含する。さらに、本明細書では、障害されたアルギナーゼ「活性」および/または「発現」が一緒に言及されることが多いが、障害されたアルギナーゼ発現は障害されたアルギナーゼ活性をもたらすため、「障害されたアルギナーゼ活性」という表現が、アルギナーゼ発現の低下によりそのような活性が障害される状況を包含することが理解される。好ましい実施形態では、免疫細胞の活性アルギナーゼ産生能は、好ましくは、免疫細胞の遺伝子発現プロセス（転写、RNAスプライシング、翻訳、翻訳後修飾などのプロセスを含む）、特にアルギナーゼをコードする1つ以上の遺伝子の発現に対する技術的干渉によって障害される。

10

【0042】

該アルギナーゼは、アルギナーゼ1（ARG1）および/またはアルギナーゼ2（ARG2）であり得る。好ましい実施形態では、該障害されたアルギナーゼ活性および/または発現は、障害されたアルギナーゼ2（ARG2）活性および/または発現である。上記のように、ARG1とARG2とは、それらの細胞内局在および発現パターンに関して異なる。ARG2は、ミトコンドリアに位置し、多様な組織で広範囲な発現を示す。一実施形態では、ARG1およびARG2の両方の活性が障害される。

20

【0043】

好ましい実施形態では、該免疫細胞は、T細胞、TIL、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、自然リンパ球系細胞（ILC）および樹状細胞から選択される。例えば、該ILCは、ILC-1細胞およびILC-2細胞から選択され得る。好ましい実施形態では、該免疫細胞は、好ましくはCD3⁺T細胞および/またはCD4⁺T細胞および/またはCD8⁺T細胞から選択されるT細胞である。アルギナーゼ活性および/または発現が障害された2つ以上の異なるタイプの免疫細胞を含む組合せも使用され得る。

30

【0044】

一実施形態では、該免疫細胞は樹状細胞である。別の実施形態では、該免疫細胞は樹状細胞ではなく、および/または樹状細胞を除外する。

【0045】

本明細書の目的のために、用語「含む（comprising）」およびその様々な文法形式は、「とりわけ含む（includes amongst other）」を意味することを意図する。これは、「のみからなる（consists only of）」を意味することは意図されない。

40

【0046】

好ましい実施形態では、免疫細胞は、それを必要とする対象、特に癌に罹患している対象に投与するためのものである。一実施形態では、本発明は、癌を治療するための細胞療法に関する。好ましくは、該免疫細胞は、養子細胞移入（ACT）によって、またはACTによる治療の枠内で投与される。ACTとは、自家癌免疫療法などの癌免疫療法の治療法である。用語「養子」は一般に、ACTが患者への細胞の移入であることを表すと理解されている。細胞は、例えば、その患者または別の個体に由来し得る。好ましい実施形態では、ACTとは、細胞の効果を高めるか、問題の症状、一般に癌を治療しやすくするように、一般に遺伝的に、および/または発現タンパク質に関して、選択、操作および/または改変された細胞の移入を指す。

50

【0047】

好ましい実施形態では、該免疫細胞は単離および/または精製される。

【0048】

該免疫細胞は、治療される患者である個体に由来し得る。その場合、自家免疫療法を指す。言い換えれば、患者の免疫細胞の機能および特徴は、患者が罹患している癌と戦うこれらの能力を改善するために改善される。

【0049】

一実施形態では、該免疫細胞は患者の腫瘍から得られる。このようにして、TILを得ることができる。

【0050】

別の実施形態では、免疫細胞はドナーから採取される。この場合、同種免疫療法を指し得る。

【0051】

さらに別の実施形態では、該免疫細胞は、幹細胞および/または前駆体免疫細胞 (precursor immune cell) から得られる。

【0052】

免疫細胞が患者および/またはドナーに由来する場合、本発明の方法は、該患者からもしくは該ドナーから、特に患者もしくはドナーの血液から、または例えばTILの場合ドナーの腫瘍から、該免疫細胞を採取および/または抽出することを含み得る。

【0053】

別の実施形態では、該細胞は、個体から、例えば治療される対象から、またはドナーから、以前に採取および/または抽出されている。

【0054】

免疫細胞がドナーに由来する場合、それらは好ましくは、患者の健康な組織を攻撃しないように選択または改変される。例えば、ドナーの免疫細胞は、好ましくは患者と適合性がある。例えば、ドナーは、患者の家族の一員であってよい。

【0055】

ドナーが家族の一員であるかどうかを含むいくつかの実施形態では、ドナーの細胞は、免疫細胞が健康な患者組織を攻撃するのを防ぐために、不活性化された天然T細胞受容体(免疫細胞がT細胞である場合)を有する。細胞は、例えば、天然T細胞受容体を発現しないように、またはその不活性化形態を発現するように改変および/または操作されることが好ましい。

【0056】

示されるように、いくつかの実施形態では、免疫細胞は、幹細胞、例えば多能性幹細胞に由来し得る。したがって、免疫細胞は、好ましくは既製の細胞から調製され、本明細書に従ってさらに操作される。例えば、免疫細胞は、人工胸腺オルガノイド(ATO)系に基づいて得ることができる。ATO系は、胸腺環境を人工的に模倣してヒトT細胞の発生を繰り返すインビトロモデルである。ATO系は、様々な供給源由来の造血幹細胞、ならびに胚性幹細胞および人工多能性幹細胞のような多能性幹細胞を使用して、正常なT細胞の効率的な分化と正の選択とを支援する。この技術はまた、その後の遺伝子工学に柔軟性を提供して、例えば、治療的使用のために同種異系間で操作された既製のT細胞製品を生産する。そのような技術は、例えば、国際公開第2016/187459号パンフレットおよび国際公開第2017/075389号パンフレットに開示されている。

【0057】

本発明によれば、免疫細胞は、アルギナーゼ活性および/または発現が障害されている。該免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現は、任意の好適な方法で障害され得る。一実施形態では、該アルギナーゼ活性は、該アルギナーゼ活性および/または発現を障害するための処理および/または操作に該免疫細胞を曝すことによって障害される。好ましくは、該処理はエクスピゴ処理である。例えば、細胞は、患者またはドナーなどの個体から抽出された後、処理に曝される。

10

20

30

40

50

【0058】

いくつかの実施形態では、本発明は、アルギナーゼ阻害剤に細胞を曝露し、それによりアルギナーゼを直接遮断することを包含する。例えば、阻害剤は、例えば、活性部位などのタンパク質の関連部分と共有結合的に反応することにより、アルギナーゼを恒久的に不活性化することができる。アルギナーゼ阻害剤は、例えば、本出願の導入部で引用された文献に以前に開示されている。

【0059】

好ましくは、該細胞は、遺伝的手段によって、および/または遺伝子またはその発現のレベルで改変されて、アルギナーゼ発現を遺伝的に防ぐ。

【0060】

好ましい実施形態では、該アルギナーゼ活性は、例えば、

- ・該アルギナーゼをコードする遺伝子を変異させるか、切断するか、欠失させること、
- ・該アルギナーゼをコードする該遺伝子の転写因子をコードする遺伝子を投与するか、変異させるか、切断するか、欠失させること、
- ・該アルギナーゼをコードするmRNAに結合することができるヌクレオチド配列をコードするか含むヌクレオチド配列を投与すること

によって、該アルギナーゼの発現を障害することによって障害される。例えば、この工程は、該アルギナーゼをコードするmRNAをコードするか該mRNAに結合するヌクレオチド配列を含む核酸分子を投与することを含み得る。

【0061】

本明細書の目的のために、用語「変異 (mutation)」、および「変異させる (mutating)」などのその様々な文法形式によって、遺伝子の切断および欠失が包含される。用語「変異」はさらに、例えば、点変異、点欠失 (遺伝子のコード領域内の単一ヌクレオチドの欠失)、および遺伝子のコード領域内のヌクレオチドのストレッチの挿入または欠失を包含する。したがって、さらに一般には、用語「変異」は、変異を有しない細胞内の発現とは異なる遺伝子発現をもたらす任意の遺伝的变化を包含する。明確にするという唯一の理由から、一部の變異は遺伝子発現の変化をもたらさない可能性があり、そのようなサイレント変異はアルギナーゼ発現を障害するのに適した変異とは一般に考えられていないことが言及される。

【0062】

例えば、細胞は、アルギナーゼ、特にアルギナーゼ2をコードする単数または複数の遺伝子が欠失するように改変され得る。例えば、細胞は、アルギナーゼ1および/または2に関してダブルノックアウトになるように (Arg1^{-/-} および/または Arg2^{-/-}) 処理され得る。アルギナーゼをコードする遺伝子、または転写因子など、アルギナーゼ発現の制御に他の方法で関与する遺伝子の変異は、例えば、部位特異的変異誘発によって行われ得る。Kunkel法、カセット変異誘発またはPCR部位特異的変異誘発など、部位特異的変異誘発のための多数の方法が利用可能である。一実施形態では、例えば、CRISPR/Cas9技術を使用することによる遺伝子編集によって、アルギナーゼをコードする遺伝子、または転写因子が改変され得る。

【0063】

アルギナーゼ発現は、アルギナーゼ遺伝子のリプレッサータンパク質の発現を促進することにより、例えば、細胞に挿入された際にそのようなリプレッサータンパク質を産生するように構築されたベクターを用いて免疫細胞をトランスフェクトすることにより、または遺伝子編集技術によって好適なリプレッサーをコードする遺伝子を挿入することにより、障害され得る。

【0064】

好ましい実施形態では、該アルギナーゼ発現は、RNA干渉 (RNAi) によって低下される。一実施形態では、該障害されたアルギナーゼ活性は、該アルギナーゼをコードするmRNAに結合することができる核酸分子を該免疫細胞に投与すること、またはそのような核酸分子をコードするベクターもしくは発現系を投与することに起因する。該核酸分

10

20

30

40

50

子または該ベクターの投与は、好ましくはエキスピボであり、すなわち、単離された細胞、例えば、個体から抽出された細胞に対するものである。

【0065】

一実施形態では、本発明の方法は、遺伝子発現を阻害するRNAを投与または転写するか、アルギナーゼのmRNAを中和することを含む。例えば、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA (miRNA) または低分子ヘアピン型RNA (shRNA) は、細胞、またはそのような干渉RNAから選択されるいずれか1つをコードするベクターに投与され得る。これらの分子は、細胞内に干渉RNAを送達することができるか、細胞に移入された際にそのような干渉RNAを転写することができる好適な送達系および/またはベクターによって細胞に送達され得る。

10

【0066】

一実施形態では、本発明の方法は、遺伝子発現を特異的に阻害するかアルギナーゼのmRNAを中和するRNAなどの核酸分子を投与または転写することを含む。例えば、特に調整された低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA (miRNA) または低分子ヘアピン型RNA (shRNA) は、細胞、またはそのような阻害性RNAから選択されるいずれか1つをコードするベクターに投与され得る。これらの分子は、細胞内に阻害性RNAを送達することができるか、細胞に移入された際にそのような阻害性RNAを転写することができる好適な送達系および/またはベクターによって細胞に送達され得る。

【0067】

一実施形態では、特に該免疫細胞では、他のタンパク質をコードする他のmRNA分子にではなく、アルギナーゼをコードするmRNAのみに対して、および/または他のタンパク質の発現を調節するRNA分子にではなく、アルギナーゼ発現を調節するRNA分子のみに対して、干渉および/または阻害核酸分子の相補的塩基対形成によって、特異性が提供される。

20

【0068】

一実施形態では、該阻害性および/または干渉核酸分子、好ましくはRNAは、マイクロRNA - 155ではなく、および/またはマイクロRNA - 155を含まない。

【0069】

他の実施形態では、例えば、アルギナーゼ発現および/またはアルギナーゼのmRNAの中和が非特異的に阻害される、および/または妨げられる場合、該阻害性および/または干渉核酸分子は、マイクロRNA - 155を含んでもよく、および/またはマイクロRNA - 155から本質的になってもよい。

30

【0070】

好ましい実施形態では、細胞内で阻害性および/または干渉RNAを直接発現および/または転写するベクターが使用される。そのようなベクターは、長期的な遺伝子特異的サイレンシングを可能にする。例えば、アルギナーゼ1またはアルギナーゼ2をサイレンシングするためのそのようなベクターは、例えば、siRNA、shRNAプラスミドおよびshRNAレンチウイルス製品を含むRNAi遺伝子サイレンサーの完全なラインを提供するSanta Cruz Biotechnology, Inc., USAから商業的に入手することができる。したがって、干渉RNAをコードするプラスミドまたはベクターが投与され得るか、例えば、好適な送達ビヒクルを使用して細胞に干渉RNAが直接導入され得る。別の例によれば、ウイルス粒子を使用して、shRNAをコードするプラスミドを投与してもよい。ヒトアルギナーゼ2 mRNAに特異的な例示的なsiRNA分子の配列は、例えば、GenBankのアクセッション番号NM_001172で開示されているアルギナーゼ2のRNA配列またはDNA配列から得ることができる。siRNA分子はまた、Setty BA, et al. Hypoxic Proliferation of Osteosarcoma Cells Depends on Arginase II, Cell. Physiol. Biochem. 39(2), 802-813 (2016) に開示されている。

40

【0071】

50

本発明によれば、アルギナーゼ活性および/または発現の低下は、構成的であり得るか、誘導可能であり得る。いくつかの実施形態では、アルギナーゼ活性の低下は誘導可能であり、すなわち、例えば、養子細胞移入のための細胞の改変を行うスタッフによって制御され得る外部因子によって誘発され得る。アルギナーゼ発現の低下は、例えば、干渉RNAをコードするベクター上に好適なプロモーターが存在することにより誘導可能になり得る。プロモーターに基づいて、プロモーターが活性化されて初めて遺伝子サイレンシングが起こる。プロモーターは、例えば、細胞に、または細胞を投与した患者に別個に投与され得る特定の小分子によって活性化可能であるように、例えば選択され得る。

【0072】

一方、構成的に活性化プロモーターを使用することにより、サイレンシングRNAが構成的に発現し、アルギナーゼ発現が構成的に障害され得る。

10

【0073】

さらに、アルギナーゼ活性の低下は一過性または安定であり得る。アルギナーゼ発現の一過性または安定な障害は、干渉RNAの選択と細胞の処理方法とによって決定され得る。例えば、適切なsiRNAを用いて細胞を直接トランスフェクトすることにより、アルギナーゼ発現が一過性にサイレンシングされ得る。プロモーターの制御下で干渉RNAをコードするベクターを用いてトランスフェクションすることにより、細胞内でアルギナーゼ発現が（誘導可能にまたは構成的に）安定にサイレンシングされ得る。

【0074】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、癌を治療するためのさらに有利な特徴および/または機能を含む。好ましくは、細胞は、癌治療機能が改善されるようにさらに改変される。上で詳述したようにアルギナーゼ活性を障害すると同時に免疫細胞をさらに改変してもよいが、例えば、同じ免疫細胞を使用して、別個の前または後の工程で免疫細胞をさらに改変してもよい。本発明はまた、癌治療機能を改善するために他の免疫細胞が独立して操作されることを包含し、これらの他の細胞は、本発明による治療では、本発明の免疫細胞と同時に、または本発明の免疫細胞に連続して投与される。

20

【0075】

一実施形態では、免疫細胞は腫瘍浸潤リンパ球(TIL)であり、および/または方法はTILを投与することを含む。好ましくは、該TILは腫瘍浸潤T細胞である。好ましくは、該TILは、構成的または誘導的に障害されたアルギナーゼ活性を示す。好ましくは、該TILは、それを必要とする対象、特に癌に罹患している対象に投与される。好ましくは、該TILは、該対象から以前に単離および/または精製されている。好ましくは、方法は、例えば、該TILを単離および/または精製した後、および/または該TILを投与する前に、好ましくはエキスピボで該TIL内のアルギナーゼ活性を障害することを含む。

30

【0076】

一実施形態では、免疫細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)および/またはトランスジェニックT細胞受容体(TCR)を含有および/または発現する。一実施形態では、該CARは、リンカーを介してT細胞シグナル伝達ドメイン、特にCD3(ゼータ)シグナル伝達ドメインに融合された抗原結合ドメインを含む。抗原結合ドメインは、好ましくは、抗体の1つ以上の可変ドメインを含む。好ましくは、該リンカーは膜貫通ドメインを含む。抗原結合ドメインは、CAR細胞の表面に発現すると、この細胞の細胞外側にあるのに対して、シグナル伝達ドメインはこの細胞の細胞内側にある。

40

【0077】

CARの設計および機能に応じて、適切な細胞内ドメインを選択してもよい。細胞外ドメインが、癌細胞上の標的を認識する(それに結合する)ように選択される場合、細胞内ドメインは、好ましくは、細胞外ドメインの結合時に免疫細胞を活性化するように選択される。典型的には、CAR T細胞では、CARの結合は一般に、例えば、T細胞の増殖およびサイトカインの産生をもたらす。CD19などの標的部位にCAR T細胞が結合すると、例えば、癌細胞にアポトーシスを誘導することによって、癌細胞が直接殺傷され

50

得る。したがって、細胞外ドメインの結合から得られる特異的効果は、適切な細胞内ドメインの選択によって制御される。典型的には、CAR免疫細胞は、CD3を含むシグナル伝達ドメイン、および場合により追加のシグナル伝達ドメインを含む。ただし、本発明は、この免疫細胞によって発現され得る、CARの細胞内ドメインまたは細胞外ドメインに関して限定されない。当業者は、標的とされる特定の癌細胞に応じて、および結合によって誘発されることが望まれる免疫応答に応じて、適切なドメインを選択することができる。

【0078】

例えば、抗原結合ドメインは、B細胞抗原CD19に特異的であり得る。白血病およびリンパ腫などの血液癌に対する現在の養子細胞移入療法（アキシカブタゲンシロロイセル、チサゲンレクロイセル）は、CARの抗体可変ドメインがCD19に特異的であるCAR T細胞に基づいている。

10

【0079】

CARの抗体可変ドメインは、治療される癌に応じて、癌細胞の表面に発現する標的に特異的であることが好ましい。当技術分野では、以下の抗原結合ドメイン特異性が、CAR療法による対応する癌の治療について試験されている。以下に対して特異的な抗原結合ドメイン：特に腎癌に対するCAR細胞療法のための炭酸脱水酵素；上皮増殖因子受容体、特に神経膠芽腫を治療するための変異体EGFRvIII CAR；前立腺癌に対するCAR療法における前立腺特異抗原（PSMA）および/または前立腺幹細胞抗原（PSCA）；卵巣癌、卵管癌および原発性腹膜癌から選択されるいずれか1つの治療における卵巣腫瘍抗原ムチン16（MUC16）。

20

【0080】

本発明の実施形態によれば、免疫細胞は、好ましくは、上記の抗原の群から選択される特異性を有するCARなどの1つ以上のCARを発現するように操作される。

【0081】

一実施形態では、免疫細胞はCARを発現し、および/または方法は、CARを発現する免疫細胞を投与することを含む。好ましくは、癌CAR発現細胞は、構成的または誘導的に障害されたアルギナーゼ活性を示す。好ましくは、CAR発現細胞は、それを必要とする対象、特に癌に罹患している対象に投与される。好ましくは、該対象から以前に単離および/または精製された該免疫細胞、および方法は、該CARを発現するように、および/または患者または他のドナーから以前に単離された細胞と、該CARを発現するように以前に処理された該細胞とを提供するように、細胞を処理する工程を含む。一実施形態では、方法は、該CAR発現細胞内のアルギナーゼ活性を好ましくはエクスピボで障害することを含む。

30

【0082】

本発明に従って包含される免疫細胞の別の改変は、内部シグナル伝達ドメインのスイッチングである。

【0083】

一実施形態では、免疫細胞は、例えば、腫瘍微小環境によって誘発される阻害性IL-4シグナル伝達を低減、無効化および/または逆転させるように改変または不活性化されるIL-4受容体を含み、および/または発現する。例えば、IL-4受容体のシグナル伝達ドメインは、阻害性IL-4シグナル伝達を逆転させるように、IL-7受容体のシグナル伝達ドメインにスイッチングされ得る。

40

【0084】

一実施形態では、免疫細胞は2つのCARを発現する。第1のCARは、好ましくは、癌細胞によって発現されるPSCAなどの抗原に向けられる抗原結合ドメインを用いて、特定の癌細胞に対して免疫細胞を標的化する。第2のCARは、例えば、合成または外来化合物、例えば、小分子に結合することができる。化合物は、別個におよび/またはCAR細胞と一緒に患者に投与することができる。小分子は、投与されると第2のCARに結合する。免疫細胞が標的細胞と接触している場合、化合物との共刺激は、免疫細胞の効率

50

的および/または強力な活性化をもたらす。2つのCARを共発現するT細胞、リミツド(rimiducid)(ホモ二量体化活性を有する脂質透過性タクロリムスアナログ)に対する第2の結合は、現在、第I相試験で試験されている。

【0085】

一実施形態では、免疫細胞は、不活性なチェックポイントタンパク質を発現するように、または阻害性チェックポイントタンパク質を欠くように操作される。例示的な免疫チェックポイント調節因子は、PD-L1/PD1、CTLA4、B7-H3(CD276)、B7-H4(B7x/B7S1/VTCN1)、HHLA2(B7H7/B7-H5)、VISTA(PD1H、DD1、c10orf54、Gi24、Dies1、SISP1)、VSIG、LAG-3、TIGIT、CD96、CD39、CD73、アデノシンA2受容体、CD47、ブチロフィリン(BTN)および/またはTIM-3(T細胞-免疫グロブリン-ムチンドメイン)である。

10

【0086】

免疫細胞の一実施形態では、チェックポイントタンパク質のシグナル伝達ドメインを阻害する免疫応答は、共刺激ドメインにより不活性化されるか、共刺激ドメインと交換(置換)される。例えば、PD1(プログラム細胞死タンパク質1)の抑制性CD28ドメインは、不活性であるように変異され得るか、共刺激ドメイン、例えば、CD3シグナル伝達ドメインまたはCD137ドメインにスイッチングされ得る。

【0087】

免疫細胞の免疫チェックポイントタンパク質を不活性化することにより、または細胞内ドメインを刺激ドメインに形質転換することにより(例えば、細胞内ドメインの置換により)、腫瘍細胞および/または腫瘍微小環境の免疫抑制活性を回避することが可能である。

20

【0088】

一実施形態では、免疫細胞は、外部因子によって誘発されるとアポトーシスを誘導することができるタンパク質を組換え発現する。これは、例えば、患者に免疫細胞を投与した後認められる望ましくない副作用の場合に、本発明の免疫細胞を標的化された方法で破壊することを可能にする安全対策と考えられ得る。例えば、シグナル伝達ドメインは、細胞外ドメインに結合するとアポトーシスをもたらすような方法で提供されてもよい。細胞外ドメインは、本明細書の他の箇所に記載されているように、小分子などの人工化合物に結合していてもよい。

30

【0089】

免疫細胞は、適切なベクターを用いて細胞をトランスフェクトすることにより、または例えばCRISPR/Cas9技術などの遺伝子編集を使用してゲノムに受容体を発現するための遺伝子および/またはプロモーターを挿入することにより、CARおよび/またはトランスジェニックT細胞受容体を発現するように操作されてもよい。

【0090】

免疫細胞は、癌を治療するために、好ましくは、個体、例えば、癌治療を必要とする個体に投与される。個体は、好ましくは癌に罹患している患者である。免疫細胞は、任意の好適な方法で、好ましくは非経口的に投与され得る。好ましい実施形態では、免疫細胞は静脈内投与される。

40

【0091】

好ましい実施形態では、免疫細胞は、別の癌治療に加えて投与される。好ましくは、免疫細胞は、別の癌治療と組み合わせて使用される。他の癌治療は、同時におよび/または別個に投与され得る。さらに、他の癌治療は、別個の組成物の形態で別個に投与されてもよいが、単一の組成物に組み合わせられてもよい。

【0092】

好ましい実施形態では、免疫細胞は、ネガティブ免疫チェックポイント調節因子を標的とするおよび/またはネガティブ免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する癌治療と組み合わせて使用および/または投与される。免疫チェックポイント調節因子は、本

50

明細書の他の箇所に開示されている。一実施形態では、免疫細胞は、癌細胞によって発現され得る免疫チェックポイント調節因子に結合する細胞表面タンパク質、例えば受容体を発現し得る。例えば、上記のように、免疫細胞は免疫チェックポイント調節因子タンパク質に結合するCARを発現し得る。この実施形態によれば、免疫チェックポイント調節因子を遮断する実体は、非結合/遊離抗体の代わりに、免疫細胞上の細胞表面タンパク質の形態で発現され得る。

【0093】

別の実施形態では、該(他のまたは追加の)癌治療は、抗癌剤および/または分子、例えば免疫チェックポイント調節因子阻害剤を含む。好ましくは、該癌治療は、抗体、好ましくは免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する抗体を含む。好ましい実施形態では、該癌治療は、PD1、PD-L1、CTLA4、B7-H3、B7-H4、HHLA2、VISTA、VSI G、LAG-3、TIGIT、CD96、CD39、CD73、アデノシンA2受容体、CD47、ブチロフィリン(BTN)および/またはTIM-3の群から選択される1つ以上に特異的に結合する抗体を含む。

10

【0094】

いずれもPD-1に特異的に結合するニボルマブおよびペンプロリズマブなど、免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する抗体が市販されており、様々な異なる癌の治療に使用されている。

【0095】

そのような抗体は、一般に、免疫チェックポイント調節因子阻害剤と呼ばれ得る。本発明者らは、本発明のアルギナーゼが障害された免疫細胞が、免疫チェックポイント調節因子阻害剤を含む治療と組み合わせられると、相乗的な抗癌活性をもたらすことを観察した。一実施形態では、抗体は、癌細胞によって発現され、癌細胞の表面上に提供される免疫チェックポイント調節因子タンパク質に特異的に結合する。別の実施形態では、抗体は、タンパク質、例えば、本発明の免疫細胞の表面に発現する受容体に特異的に結合し、抗体は、免疫細胞のタンパク質が、癌細胞に発現する対応するタンパク質と接触するのを防ぐ。好ましい実施形態では、免疫チェックポイント調節因子阻害剤は、モノクローナル抗体である。

20

【0096】

好ましい実施形態では、免疫細胞は、癌を治療および/または予防する方法に使用される。一実施形態では、治療のために選択される癌は、白血病、リンパ腫および/または固形腫瘍を含む群から選択される。本発明者らの1つの驚くべき発見は、免疫細胞が血液癌(blood cancer)および/または血液癌(haematological cancer)を減少させるのに有効であるだけでなく、特に固形腫瘍のサイズおよび/または体積を減少させるのにも有効であることである。CAR T細胞に基づく現在使用されている養子細胞移入療法は、一般に固形腫瘍に対して十分な効果を得ることが困難なために血液癌の治療に使用されているため、これは驚くべきことである。現在のCAR T細胞療法では、固形腫瘍の治療には時に重大な副作用と毒性問題とが伴う。本発明者らは、毒性副作用のない養子細胞移入による固形腫瘍の治療を開示する。

30

【0097】

本発明は、癌を治療および/または予防する方法、免疫療法、細胞療法の方法、既存の免疫療法を改善する方法、癌の療法および予防に有用な免疫細胞を産生する方法、癌治療を調製および/または製造する方法、および/または免疫細胞の抗癌活性および/または効果を改善する方法を含むいくつかの方法に関する。本明細書に詳述されるように、免疫細胞は、好ましくは、改善された抗癌活性を有するように処理される。さらに具体的には、細胞は、好ましくは、固形腫瘍の細胞を含む癌細胞によって生成された免疫抑制環境では、増加した活性および/または生存率を有する。好ましくは、免疫細胞は、癌細胞の免疫抑制活性の少なくとも一部に対してある程度不活性であるままにすることにより、それらの抗癌活性および/または機能を保持する。

40

【0098】

50

好ましくは、免疫細胞は、処理および/または操作されて、改善された抗癌活性を示す。本明細書に詳述されるように、治療は、好ましくはアルギナーゼ活性を低下させる。細胞の処理は、好ましくはエキスピボおよび/またはインビトロで、すなわち、好ましくはヒトまたは動物の体外で行われる。一実施形態では、本発明の方法は、個体から未処理または野生型の免疫細胞を抽出および/または採取することを含む。一実施形態では、本発明の方法は、該免疫細胞を投与する前に、該免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現をエキスピボで障害することを含む。一実施形態では、方法は、患者に対する免疫細胞の投与を含む。

【0099】

本明細書の他の箇所に開示されるように、免疫細胞は、治療される患者に由来するか、ドナーに由来してもよいが、例えば、幹細胞から得られる培養物に由来してもよい。

10

【0100】

免疫細胞は、好ましくは医薬組成物の形態で提供される。好ましくは、組成物は、好適な賦形剤および/または担体、例えば、細胞が懸濁されている、ほぼ生理的および/または等張性の溶液から選択される溶液、例えば生理食塩水を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、例えば、治療される患者またはドナーから得られる血清を含み得る。

【0101】

本発明はまた、癌を治療する方法に使用するためのキットを提供する。キットは、好ましくは、免疫細胞内のアルギナーゼ活性および/または発現を障害するのに適した作用物質を含む。いくつかの実施形態では、キットは、免疫細胞に投与された際にRNA干渉を誘発することができる作用物質を含み、該RNAiは、アルギナーゼ発現を障害する。例えば、キットは、本明細書の他の箇所に開示されているような1つ以上の作用物質(silRNAベクターなど)を含む。いくつかの実施形態では、キットは、免疫細胞、例えば、アルギナーゼ活性が障害された既製の免疫細胞、例えば、Arg2^{-/-}免疫細胞を含む。

20

【0102】

本発明の好ましい実施形態のいくつかを上記で説明し、具体的に例示してきたが、本発明がそのような実施形態に限定されることは意図されていない。特許請求の範囲に記載されているように、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、様々な修正を行うことができる。以下に、本発明の例を開示する。これらの例は、例示のためだけのものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

30

【0103】

例

例1: Arg2^{-/-}マウスにおける腫瘍増殖の障害および抗腫瘍免疫の増強

本例では、Charles River Laboratories, Inc. から入手したArg2欠乏(ダブルノックアウト)マウスを使用した。第1のアプローチとして、WTマウスおよびArg2^{-/-}マウスの腫瘍増殖を比較した。2つの移植可能な腫瘍モデル、B16メラノーマモデルおよびMC38結腸癌モデルを使用した。両モデルでは、代理腫瘍抗原としてオボアルブミン(OVA)を発現する腫瘍変異体を使用した。

【0104】

第1の実験では、WTマウスまたはArg2^{-/-}マウスの背中に 0.5×10^6 のB16-OVA細胞またはMC38-OVA細胞を皮下注射し、腫瘍増殖を2週間モニタリングした。N=9であり、2つの独立した実験からデータをプールする。

40

【0105】

第2の実験では、第1の実験と同様に腫瘍細胞を移植した。腫瘍注射後11日目(B16-OVA)または13日目(MC38-OVA)に、高用量の細胞トレーサーバイオレット(CTV^{hi})により蛍光標識したOVAパルスWT脾細胞および低用量の細胞トレーサーバイオレット(CTV^{lo})により蛍光標識した非パルスWT脾細胞を静脈内注射した。24時間後、腫瘍を切除し、TdLNおよびndLNから得られた細胞懸濁液をフローサイトメトリーにより分析した。特異的インビボ殺傷を以下のように計算した: [1

50

- (% C T V ^{h i} T d L N / % C T V ^{l o} T d L N) / (% C T V ^{h i} n d L N / % C T V ^{l o} T d L N)] x 1 0 0 .

【 0 1 0 6 】

結果を図 1 A、図 1 B、図 2 A および図 2 B に示す (*、p < 0 . 0 5 ; * *、p < 0 . 0 1 ; * * * *、p < 0 . 0 0 0 1)。図 1 A および図 1 B に示すように、A r g 2 ^{- / -} マウスでは、B 1 6 - O V A 腫瘍および M C 3 8 - O V A 腫瘍の両方の増殖が有意に障害された。障害された腫瘍増殖は、腫瘍流入リンパ節内のインビボ O V A 特異的腫瘍細胞殺傷の増加と関連していた (図 2 A および図 2 B)。B 1 6 - O V A では、2 つの実験の代表が示されている。M C 3 8 - O V A では、2 つの独立した実験からデータをプールした。

10

【 0 1 0 7 】

その後の調査では、M C 3 8 - O V A モデルに主に焦点を当てた。

【 0 1 0 8 】

例 2 : 腫瘍増殖および動物生存率を制御するための C D 8 ⁺ T 細胞の寄与

A r g 2 ^{- / -} マウスの障害された M C 3 8 - O V A 増殖が C D 8 ⁺ T 細胞による増強された制御によるものであるかどうかを決定するために、C D 8 ⁺ T 細胞枯渇実験を行った。

【 0 1 0 9 】

W T マウスまたは A r g 2 ^{- / -} マウスの背中に、0 . 5 x 1 0 ⁶ の M C 3 8 - O V A 細胞を皮下注射し、腫瘍増殖および動物生存率を 4 週間モニタリングした。抗 C D 8 a ⁺ 枯渇 A b (C D 8 a) または I g G 2 a アイソタイプ対照 A b (I g G 2 A) の数回の腹腔内注射により、C D 8 ⁺ T 細胞枯渇を行った。

20

【 0 1 1 0 】

図 3 A および図 3 B に示すように、A r g 2 ^{- / -} マウスの腫瘍増殖の減少および動物生存率の増加はそれぞれ、C D 8 ⁺ T 細胞枯渇によって有意に回復し、C D 8 ⁺ T 細胞を介した免疫制御の重要な役割が示された。ただし、C D 8 ⁺ T 細胞枯渇 A r g 2 ^{- / -} マウスでの腫瘍増殖は、C D 8 ⁺ T 細胞枯渇 W T マウスに観察されたものまで完全には回復しなかったため、抗腫瘍 C D 8 ⁺ T 細胞応答は、作用する唯一の機構ではない。

【 0 1 1 1 】

例 3 : 腫瘍増殖阻害および動物生存率に対する抗 P D 1 療法と A r g 2 欠乏との相乗効果

30

M C 3 8 腫瘍は、T 細胞阻害性 P D L 1 - P D 1 チェックポイント軸を遮断する抗体による免疫療法に感受性である。P D L 1 - P D 1 遮断によって誘導される M C 3 8 腫瘍の増強された制御が、A r g 2 欠乏から生じる M C 3 8 腫瘍の増強された制御に関与する機構と協働するかどうかを決定するために、M C 3 8 - O V A 腫瘍を担持する W T マウスおよび A r g 2 ^{- / -} マウスを抗 P D 1 抗体により処置した。

【 0 1 1 2 】

W T マウスまたは A r g 2 ^{- / -} マウスの背中に 0 . 5 x 1 0 ⁶ の M C 3 8 - O V A 細胞を皮下注射した。腫瘍注射後 9 日目、1 1 日目および 1 4 日目 (緑色の矢印) に、マウスに抗 P D 1 (P D - 1) A b または I g G 2 a アイソタイプ対照 A b (I g G 2 A) を注射した。

40

【 0 1 1 3 】

図 4 A から分かるように (2 つの実験からプールしたデータ。* * * *、p < 0 . 0 0 0 1)、抗 P D 1 抗体により処置した W T マウスの腫瘍増殖は、未処置の A r g 2 ^{- / -} マウスの腫瘍増殖の減少と同様の程度まで減少した。重要なことに、抗 P D 1 抗体による A r g 2 ^{- / -} マウスの処置は、腫瘍増殖のほぼ完全な消失をもたらした。図 4 B に示すように、腫瘍は多くのマウスで実際に消失した。図 4 C は、抗 P D 1 抗体により処置した A r g 2 ^{- / -} マウスでは、動物生存率が大幅に増加したことを示している。したがって、抗 P D 1 療法および A r g 2 欠乏は、腫瘍増殖に対して強力な相乗効果を示す。

【 0 1 1 4 】

50

例4：BM由来細胞のArg2欠乏は腫瘍増殖の制御の改善に關与する

障害されたMC38-OVA増殖が、BM由来細胞または非造血起源の細胞のArg2欠乏の結果であるかどうかを決定するために、相互骨髓(BM)キメラマウスを作製した。WTマウスおよびArg2^{-/-}マウスに致死量未満の放射線を照射して、宿主BMを破壊した。次いで、WTマウスまたはArg2^{-/-}マウス由来のBM細胞を全4種の対の組合せで移植することによって、造血作用を再構成した。

【0115】

BMキメラマウスの背中に 0.5×10^6 のMC38-OVA細胞を皮下注射し、腫瘍増殖を4週間モニタリングした。N=マウス11匹。

【0116】

図5から分かるように(データは3つの独立した実験からプールしている。****、 $p < 0.0001$)、Arg2^{-/-}マウス由来のBM細胞を投与したキメラ(Arg2^{-/-}>WTおよびArg2^{-/-}>Arg2^{-/-})は、WTマウス由来のBM細胞を投与したキメラ(WT>WTおよびWT>Arg2^{-/-})と比較して、腫瘍増殖の大幅な減少を示した。これらの結果は、腫瘍増殖の減少が、主にBM由来細胞のArg2欠乏によるものであることを示している。

【0117】

例5：Arg2^{-/-}OTI細胞はインビトロで活性化および増殖の増強を示す

CD8⁺T細胞のArg2欠乏が腫瘍増殖の制御の改善に關与するかどうかを決定するために、交配によりOTIマウスにArg2変異を付与して、二重ホモ接合Arg2^{-/-}OTIマウスを得た。

【0118】

OTIマウスは、MHCクラスI拘束性OVA特異的TCRをコードする導入遺伝子を発現するため、OVA特異的CD8⁺T細胞のみを有する。これにより、Arg2^{+/+}およびArg2^{-/-}OVA特異的T細胞の機能的特性を比較することができた。

【0119】

交配させたマウスからWT OTI T細胞またはArg2^{-/-}OTI T細胞を単離し、インビトロで抗CD3 Abおよび抗CD28 Abを用いて活性化し、96ウェルプレート内のRPMI中で培養し、活性化後1日目、2日目および3日目に活性化(CD69染色)を評価した。活性化後4日目に、T細胞増殖(カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)希釈)を決定した。

【0120】

結果を図6Aおよび図6Bに示す(データは2つの独立した実験の代表である。**、 $p < 0.01$; ****、 $p < 0.0001$)。

【0121】

図6Aおよび図6Bに示すインビトロT細胞活性化アッセイでは、Arg2^{-/-}OTI細胞が、Arg2^{+/+}OTI細胞と比較して活性化および増殖の増加を示すことが実証された。

【0122】

例6：MC38-OVA腫瘍のOTI T細胞療法

WTバックグラウンドでのArg2^{+/+}OTI細胞およびArg2^{-/-}OTI細胞によるMC38-OVA腫瘍増殖および動物生存率の制御を比較するために、インビボ系を開発した。

【0123】

インビボ系の作製を図7Aに示す。最初に、Rag2^{-/-}マウス由来BMとArg2^{+/+}OTIマウスまたはArg2^{-/-}OTIマウス由来BM細胞との9:1混合物を用いて、放射線照射したWTマウスを再構成し、混合BMキメラを作製した。これらの混合BMキメラでは、Arg2^{-/-}OTI T細胞およびArg2^{+/+}OTI T細胞は、正常なArg2発現を示す環境で発達するため、それらの機能的特性の差は、Arg2発現の細胞固有の差に帰することができる。Arg2^{-/-}OTI BMおよびArg2

10

20

30

40

50

2⁺/+ OTI BMに由来するB細胞は、言うまでもなく、それらのArg2状態に関しても異なるであろうが、これは、ImmGenコンソーシアムデータの調査ではB細胞がArg2 mRNAを発現しないことが示されることから、いかなる影響も及ぼさないであろうことに留意されたい。

【0124】

MC38-OVA腫瘍を担持するWTマウスに養子移入されたArg2⁺/+ OTI T細胞およびArg2⁻/- OTI T細胞のドナーとして、混合BMキメラを使用した。さらに具体的には、混合BMキメラから、 0.5×10^6 のMC38-OVA腫瘍細胞を5日前に注射したWTレシピエントに、 10^6 の脾リンパ節およびリンパ節のArg2⁺/+ OTI T細胞またはArg2⁻/- OTI T細胞を移入した。

10

【0125】

次いで、OTI T細胞移入の1日後に、CpG-B+OVA1ペプチドを用いて腫瘍担持レシピエントを免疫し、腫瘍増殖をモニタリングした。

【0126】

結果を図7Bおよび図7Cに示す。OTI細胞を投与していないマウスまたはArg2⁺/+ OTI細胞を投与したマウスと比較して、Arg2⁻/- OTI T細胞を投与したマウスでは、腫瘍増殖が著しく減少し(図7B)、動物生存率が増加した(図7C)。この実験的セットアップは、WT環境でのMC38-OVA腫瘍の増殖を制御するには、Arg2⁺/+ OTI細胞よりもArg2⁻/- OTI T細胞の方が良好に態勢が整っていることを正式に実証した。

20

【0127】

例7: MC38-OVA腫瘍担持動物では、Arg2⁻/- OTI細胞の方が、IFN産生の増強を示し、消耗が少なく、長く持続する

Arg2欠乏がCD8⁺T細胞のエフェクター機能に及ぼす影響をインビボでさらに調査するために、MC38-OVA腫瘍担持WTマウスに、同数のナイーブOTI CD8⁺T細胞およびArg2⁻/- OTI CD8⁺T細胞を移入した。OTI移入の1日後に、CpG-B+OVA-1ペプチドを用いて腫瘍担持レシピエントを免疫し、免疫化の7日後に、フローサイトメトリーにより、流入LN(dLN)および腫瘍内のOTI細胞を分析した。dLNおよび腫瘍内のArg2⁻/- OTI細胞ではともに、IFN⁺細胞の頻度が高かった(図8A)。腫瘍内のArg2⁻/- OTI細胞では、PD-1発現のレベルが有意に低かった(図8B)。

30

【0128】

腫瘍特異的T細胞応答の時空ダイナミクスに対するArg2欠乏の影響を調査するために、MC38-OVA腫瘍担持マウスに同数のナイーブOTI CD8⁺T細胞およびArg2⁻/- OTI CD8⁺T細胞を移入し、OVA₂₅₇₋₂₆₄免疫化後の様々な時点で、dLNおよび腫瘍に対するフローサイトメトリーによって、宿主でのそれらの分布を評価した。CD45.1マーカーを使用して、OTI(CD45.1⁺/+)細胞とArg2⁻/- OTI(CD45.1⁺/-)細胞とを区別した。15日目までに、dLNおよび腫瘍ではともに、Arg2⁻/- OTI細胞の方がOTI WT細胞よりも著しく頻度が高く(図8C)、Arg2⁻/- OTI細胞の方が持続性の高い抗腫瘍応答を起すことが示唆された。

40

【0129】

例8: T細胞固有のArg2欠乏はPD-1遮断と相乗作用する

WT MC38-OVA腫瘍担癌マウスを対象に、養子Arg2⁻/- OTI移入とPD1遮断とを組み合わせる利点を調査した。WTマウスにMC38-OVA腫瘍を負荷し、5日後、腫瘍が触知可能になった際に、ドナーがキメラマウスでないことを除いて、図7Aに示すように養子移入細胞をマウスに投与し、翌日免疫した。T細胞移入後8日目、11日目および14日目に、腹腔内注射によりマウスに200μgの関連抗体を投与した。この設定では、T細胞固有のArg2欠乏とPD1遮断との相乗効果を再び観察した。Arg2⁻/- OTI細胞または抗PD1抗体のみを投与されたマウスと比較して、併

50

用処置を受けたマウスの方が、腫瘍増殖の大幅な減少（図9A）、長期の生存期間（図9B）および増加した腫瘍クリアランスを示した（図9C）。

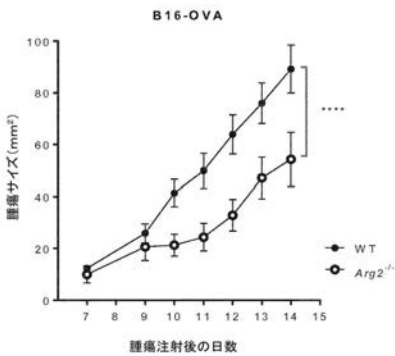
【0130】

例9：ARG阻害はインビトロでヒトT細胞活性化を増加させる

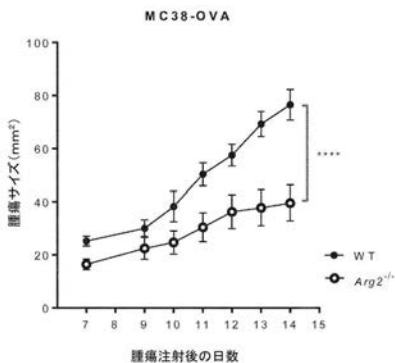
次に、ヒトCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞でのARG阻害が、それらのインビトロでの活性化に影響を与えるかどうかを決定した。PBM Cから精製したヒトT細胞を未処理のままにするか、抗CD3 Abおよび抗CD28 Abを用いてインビトロで活性化し、ARG阻害剤の存在下または非存在下で96ウェルプレート内のRPMI中で培養し、活性化24時間後の活性化（CD69染色）を評価した。ARG酵素機能の阻害により、CD4⁺T細胞（図10A）またはCD8⁺T細胞（図10B）内のCD69⁺細胞の頻度が増加し、ARG阻害によりインビトロでのヒトT細胞活性化が増加することが実証された。

10

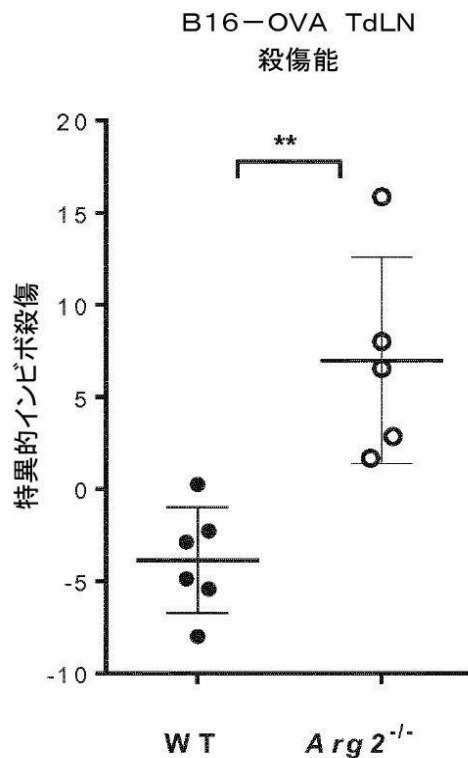
【図1A】



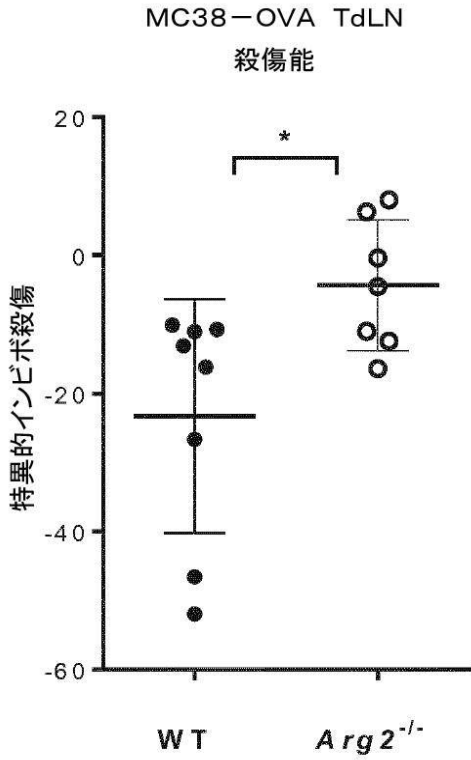
【図1B】



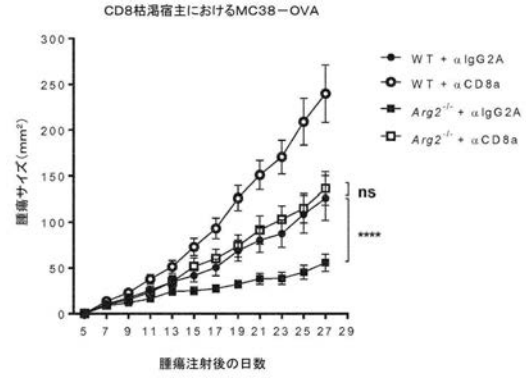
【図2A】



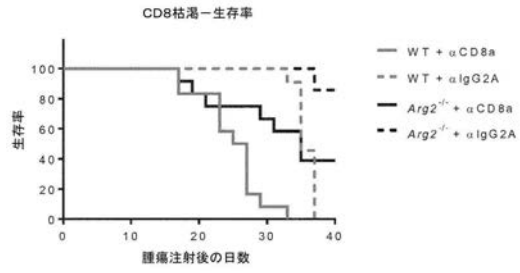
【 図 2 B 】



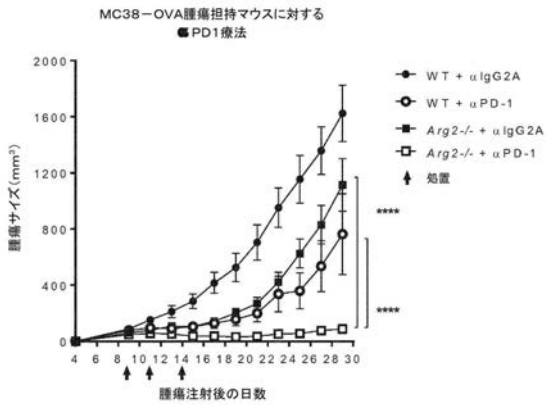
【 図 3 A 】



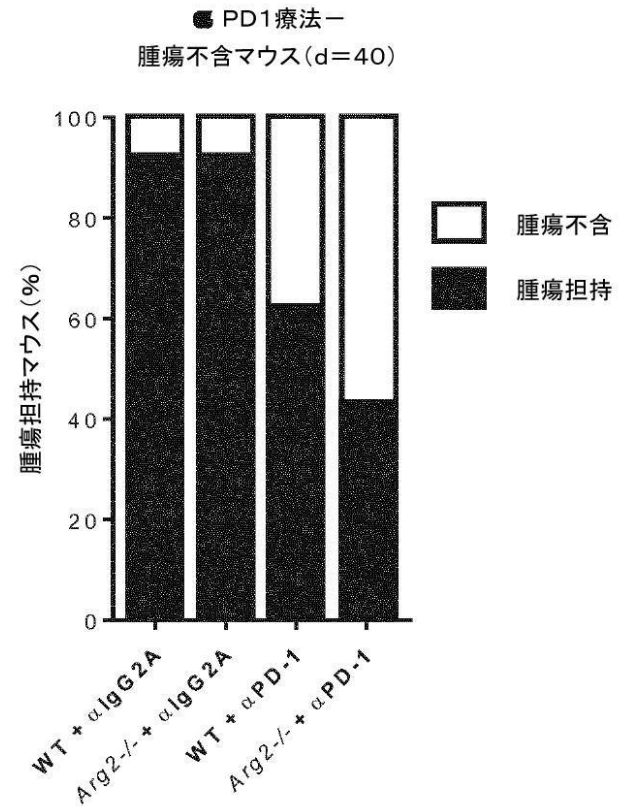
【 図 3 B 】



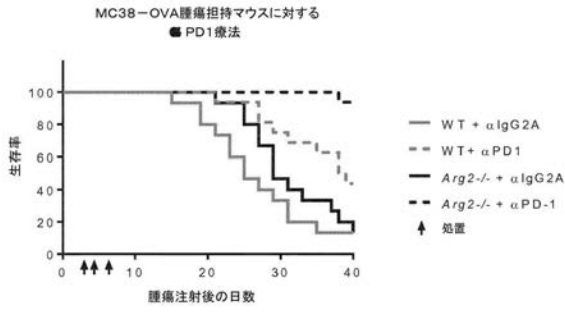
【 図 4 A 】



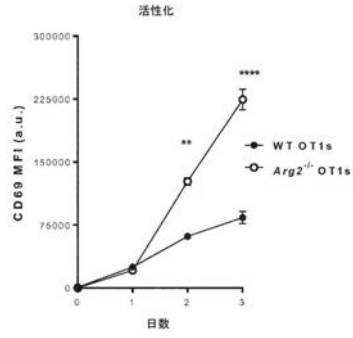
【 図 4 B 】



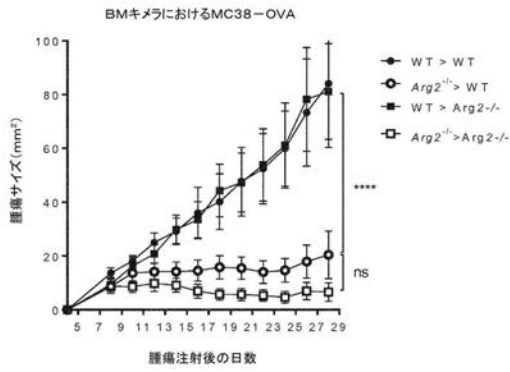
【 図 4 C 】



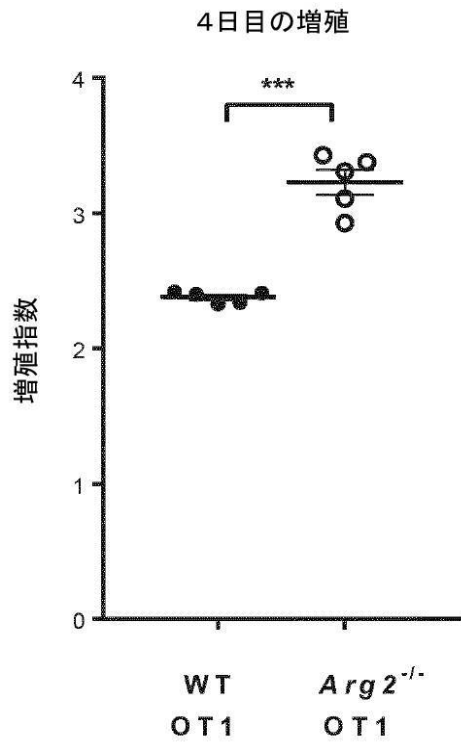
【 図 6 A 】



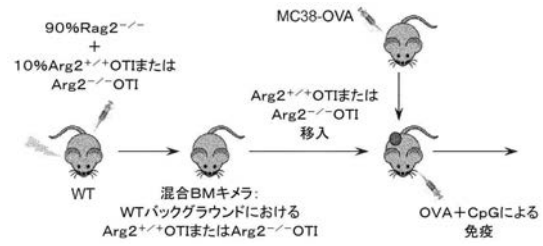
【 図 5 】



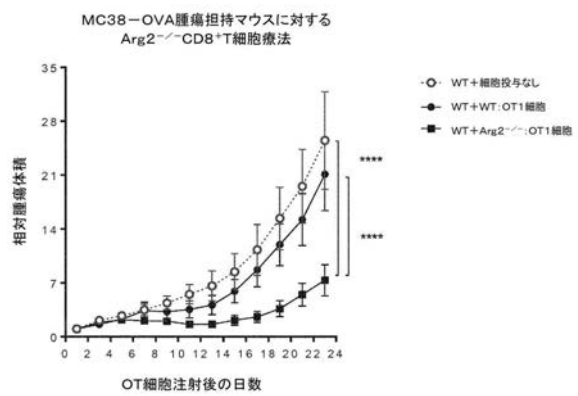
【 図 6 B 】



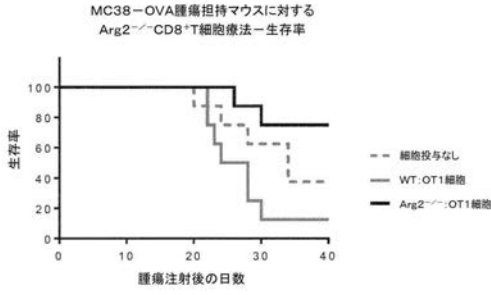
【 図 7 A 】



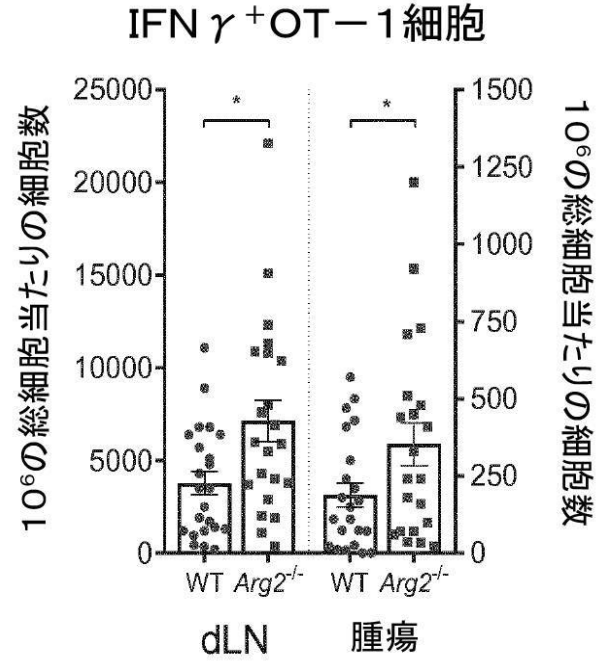
【 図 7 B 】



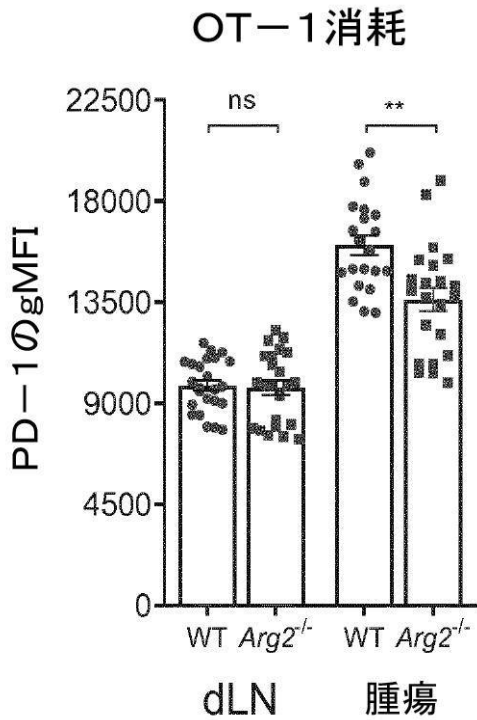
【図7C】



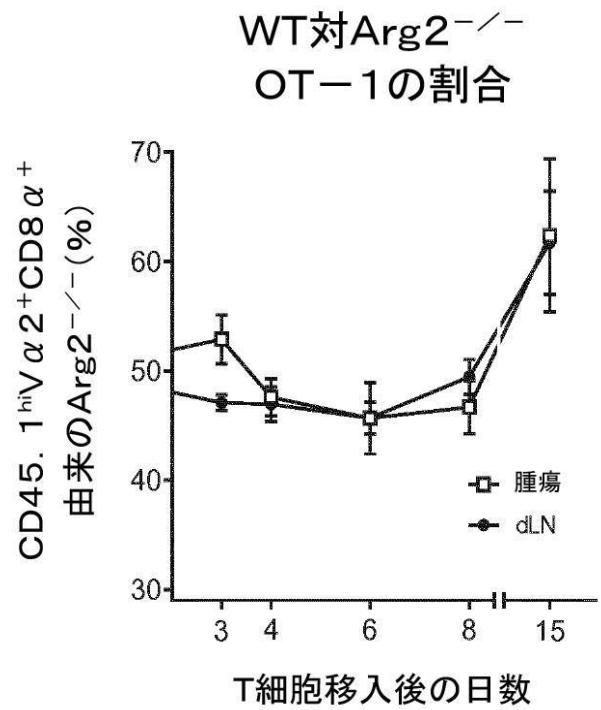
【図8A】



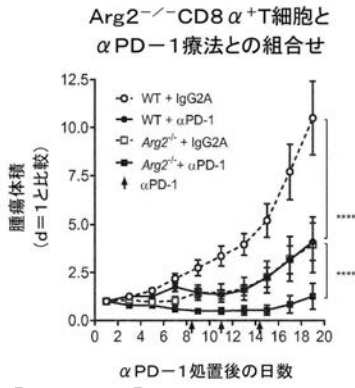
【図8B】



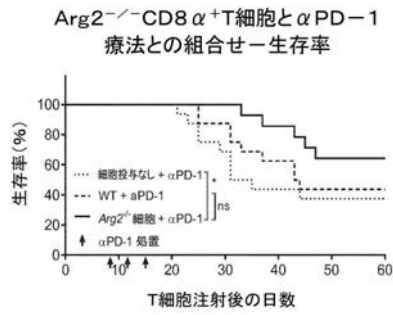
【図8C】



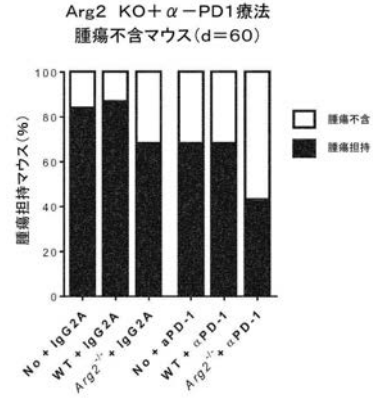
【 図 9 A 】



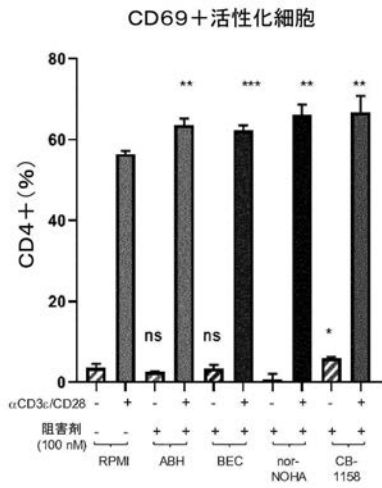
【 図 9 B 】



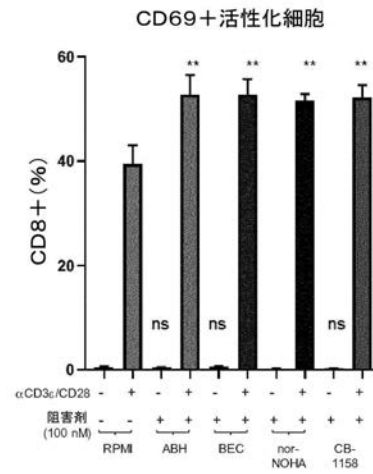
【 図 9 C 】



【 図 1 0 A 】



【 図 1 0 B 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/051806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/078 C12N5/10 A61K35/17 A61P35/00 ADD. A01K67/027 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/059248 A1 (PHILADELPHIA HEALTH & EDUCATIO [US]; BABRAHAM INST [GB]) 17 April 2014 (2014-04-17) cited in the application examples	1-9, 13-20
X	US 2015/275209 A1 (JI YUN [US] ET AL) 1 October 2015 (2015-10-01) cited in the application examples	1-9, 13-20
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 April 2019		30/04/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Teyssier, Bertrand

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2019/051806

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DUNAND-SAUTHIER I ET AL: "Repression of Arginase-2 Expression in Dendritic Cells by MicroRNA-155 Is Critical for Promoting T Cell Proliferation", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 193, no. 4, 9 July 2014 (2014-07-09), pages 1690-1700, XP055523168, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1301913 cited in the application	1-20
A	GRACIAS D T ET AL: "The microRNA miR-155 controls CD8+ T cell responses by regulating interferon signaling", NATURE IMMUNOLOGY, vol. 14, no. 6, 21 April 2013 (2013-04-21), pages 593-602, XP55580442, ISSN: 1529-2908, DOI: 10.1038/ni.2576	1-20
A	CA 2 431 080 A1 (O'BRIEN CATHERINE ADELE [CA]) 2 December 2004 (2004-12-02)	1-20
A	STEGGERDA S M ET AL: "Abstract B045: Arginase inhibitor CB-1158 elicits immune-mediated antitumor responses as a single agent and in combination with other immunotherapies", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 4, no. 11, Supplement 1, 1 November 2016 (2016-11-01), XP002786548, 2nd CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference; New York, USA, 25-28 September 2016 ISSN: 2326-6074	1-20
A	GRZYBOWSKI M M ET AL: "71P Novel dual arginase 1/2 inhibitor OATD-02 (OAT-1746) improves the efficacy of immune checkpoint inhibitors", ANNALS OF ONCOLOGY, vol. 28, no. Suppl. 11, December 2017 (2017-12), pages xi20-xi21, XP055523382, ESMO Immuno Oncology Congress; Geneva, Switzerland, 7-10 December 2017	1-20
A	ANTONIA S J ET AL: "Immunotherapy: Beyond Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 Therapies", ASCO EDUCATIONAL BOOK, vol. 36, 2016, pages e450-e458, XP055424216, ISSN: 1548-8748, DOI: 10.14694/EDBK_158712	10-12
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/051806

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	WO 2018/089490 A1 (CALITHERA BIOSCIENCES INC [US]; MAKKOUK AMANI [US] ET AL.) 17 May 2018 (2018-05-17) -----	1-20
X,P	DATABASE EMBASE [Online] ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 1 August 2018 (2018-08-01), MARTI-LINDEZ A ET AL: "Arg2 as a negative metabolic checkpoint for CD8+ T-cell immunometabolism in the anti-tumor immune response", XP002790540, Database accession no. EMB-626948249 abstract & SWISS MEDICAL WEEKLY, vol. 148, no. Supplement 231, 1 August 2018 (2018-08-01), pages 33S-34S, Joint Congress of the Swiss Society of Rheumatology and the Swiss Society for Allergology and Immunology; Interlaken, 30-31 August 2018 ISSN: 1424-3997 -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/051806

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014059248 A1	17-04-2014	US 2014120136 A1 WO 2014059248 A1	01-05-2014 17-04-2014
US 2015275209 A1	01-10-2015	US 2015275209 A1 WO 2014066137 A1	01-10-2015 01-05-2014
CA 2431080 A1	02-12-2004	NONE	
WO 2018089490 A1	17-05-2018	TW 201828959 A US 2018161349 A1 WO 2018089490 A1	16-08-2018 14-06-2018 17-05-2018

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	

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

(72) 発明者 マルティ リンデス、アドリア - アルノー
スイス連邦、ジュネーブ、アブニュ ウェント 4 6

(72) 発明者 デュナン - ソーティエ、イザベル
フランス共和国、ラ ロッシュ シュル フォロン、セアシュ . ドゥ シェ ジャナン、1 5 5

F ターム(参考) 4B065 AA90X AB01 BA02 CA44
4C085 AA13 AA14 BB01 CC23 EE03 GG01 GG02
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 CA04 CA12 MA02 MA66 NA05
NA14 ZB26