

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-554217

(P2022-554217A)

(43)公表日 令和4年12月28日(2022.12.28)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z	4 B 0 6 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/4184(2006.01)	A 6 1 K 31/4184	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全57頁) 最終頁に続く		

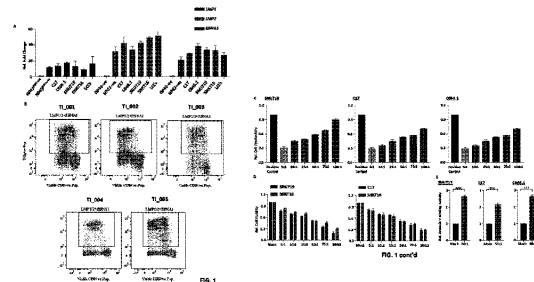
(21)出願番号	特願2022-524247(P2022-524247)	(71)出願人	504200892
(86)(22)出願日	令和2年10月23日(2020.10.23)		ザ・カウンスル・オヴ・ザ・クイーンズ
(85)翻訳文提出日	令和4年6月27日(2022.6.27)		ランド・インスティテュート・オヴ・メ
(86)国際出願番号	PCT/AU2020/051147		ディカル・リサーチ
(87)国際公開番号	WO2021/077175		オーストラリア国 4 0 0 6 クイーンズ
(87)国際公開日	令和3年4月29日(2021.4.29)		ランド州 ハーストン ハーストン ロード
(31)優先権主張番号	2019903995		3 0 0
(32)優先日	令和1年10月23日(2019.10.23)	(74)代理人	100107456
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)		弁理士 池田 成人
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100162352
			弁理士 酒巻 順一郎
		(74)代理人	100123995
			弁理士 野田 雅一
		(72)発明者	カンナ, ラジヴ
			オーストラリア連邦, 4 0 0 6 クイーンズ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 養子免疫療法

(57)【要約】

EBV関連障害の治療における第1のEBVエピトープを認識する同種T細胞の第1の集団及び第2のEBVエピトープを認識する第2の同種集団の使用が本明細書で開示される。EBV関連疾患を治療するためのさらなる治療剤、例えば、免疫療法剤、MAPK、BET又はMEK経路阻害剤と組み合わせた、EBV抗原を認識する同種T細胞の使用も開示される。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象における E B V 関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法であって、

(a) E B V 抗原の第 1 のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の第 1 の集団を前記対象に投与するステップ；及び

(b) 前記 E B V 抗原又はさらなる E B V 抗原の第 2 のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の第 2 の集団を前記対象に投与するステップ

を含み、

それによって前記対象における前記 E B V 関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法。

10

【請求項 2】

対象における E B V 関連疾患、障害又は状態を治療又は予防するための医薬組成物であって、

前記 E B V 抗原の第 1 のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の第 1 の集団と；

E B V 抗原又はさらなる E B V 抗原の第 2 のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の第 2 の集団と；

任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤及び／又は賦形剤とを含む、組成物。

【請求項 3】

同種 T 細胞の前記第 1 の集団及び E B V 関連疾患、障害又は状態の細胞が両方とも、第 1 の M H C タンパク質をコードする第 1 のヒト白血球抗原 (H L A) 対立遺伝子を含むか、又は第 1 の M H C タンパク質をコードする第 1 のヒト白血球抗原 (H L A) 対立遺伝子によって拘束される、請求項 1 に記載の方法又は請求項 2 に記載の組成物。

20

【請求項 4】

前記第 1 の M H C タンパク質が、前記 E B V 関連疾患、障害又は状態の細胞に前記 E B V 抗原の前記第 1 のエピトープを提示する、請求項 3 に記載の方法又は組成物。

【請求項 5】

同種 T 細胞の前記第 2 の集団及び前記 E B V 関連疾患、障害又は状態の細胞が両方とも、第 2 の M H C タンパク質をコードする第 2 の H L A 対立遺伝子を含むか、又は第 2 の M H C タンパク質をコードする第 2 の H L A 対立遺伝子によって拘束される、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法又は組成物。

30

【請求項 6】

前記第 2 の M H C タンパク質が、前記 E B V 関連疾患、障害又は状態の細胞に前記 E B V 抗原又は前記さらなる E B V 抗原の前記第 2 のエピトープを提示する、請求項 5 に記載の方法又は組成物。

【請求項 7】

同種 T 細胞の前記第 2 の集団が、同種 T 細胞の前記第 1 の集団の投与の前、同時及び／又は後に投与される、請求項 1 及び 3 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

同種 T 細胞の前記第 1 及び／又は前記第 2 の集団をインビトロで生成する最初のステップをさらに含む、請求項 1 及び 3 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 9】

治療剤を前記対象に投与するさらなるステップを含む、請求項 1 及び 3 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記治療剤が、免疫療法剤、M A P K 経路阻害剤、B E T 阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 2 に記載の医薬組成物を、免疫療法剤、M A P K 経路阻害剤、B E T 阻害剤、又はそれらの組合せと一緒に含む、薬学的組合せ。

50

【請求項 1 2】

対象における E B V 関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法であって、

(a) E B V 抗原のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の集団を前記対象に投与するステップ；並びに

(b) 免疫療法剤、M A P K 経路阻害剤、B E T 阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤を前記対象に投与するステップ

を含み、

それによって前記対象における前記 E B V 関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法。

【請求項 1 3】

対象における E B V 関連疾患、障害又は状態を治療又は予防するための医薬組成物であって、

E B V 抗原のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の集団と；

免疫療法剤、M A P K 経路阻害剤、B E T 阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤と；

任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤及び／又は賦形剤とを含む、組成物。

【請求項 1 4】

同種 T 細胞の前記集団及び前記 E B V 関連疾患、障害又は状態の細胞が両方とも、M H C タンパク質をコードするヒト白血球抗原 (H L A) 対立遺伝子を含むか、又は M H C タンパク質をコードするヒト白血球抗原 (H L A) 対立遺伝子によって拘束される、請求項 1 2 に記載の方法又は請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記 M H C タンパク質が、前記 E B V 関連疾患、障害又は状態の細胞に前記 E B V 抗原の前記エピトープを提示する、請求項 1 4 に記載の方法又は組成物。

【請求項 1 5】

前記免疫療法剤が、P D 1 阻害剤（例えば、抗 P D 1 抗体）、P D - L 1 阻害剤（例えば、抗 P D - L 1 抗体）、C T L A 4 阻害剤（例えば、抗 C T L A 4 抗体）、L A G 3 阻害剤（例えば、抗 L A G 3 抗体）、T I M 3 阻害剤（例えば、抗 T I M 3 抗体）、又は C D 9 6 阻害剤（例えば、抗 C D 9 6 抗体）などの免疫チェックポイント阻害剤であるか、又はこれを含む、請求項 1 0 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の方法、組合せ、又は組成物。

【請求項 1 6】

前記免疫チェックポイント阻害剤が抗 P D 1 抗体であるか、又は抗 P D 1 抗体を含む、請求項 1 5 に記載の方法又は組成物。

【請求項 1 7】

前記抗 P D 1 抗体が、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、又はセミプリマブから選択される、請求項 1 6 に記載の方法又は組成物。

【請求項 1 9】

前記免疫チェックポイント阻害剤が抗 P D - L 1 抗体であるか、又は抗 P D - L 1 抗体を含む、請求項 1 5 に記載の方法又は組成物。

【請求項 2 0】

前記抗 P D 1 抗体が、アテゾリズマブ、アベルマブ、又はデュルバルマブから選択される、請求項 1 9 に記載の方法又は組成物。

【請求項 2 1】

前記 M A P K 経路阻害剤が M E K 1 / 2 阻害剤であるか、又は M E K 1 / 2 阻害剤を含む、請求項 1 0 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法、組合せ、又は組成物。

【請求項 2 2】

前記 M E K 1 / 2 阻害剤が、セルメタニブ及び／又はトレマチニブから選択される、請求項 2 1 に記載の方法又は組成物。

【請求項 2 3】

10

20

30

40

50

前記 B E T 阻害剤が J Q 1 である、請求項 1 0 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法、組合せ、又は組成物。

【請求項 2 4】

同種 T 細胞の前記集団が、前記治療剤の投与の前、同時及び／又は後に投与される、請求項 1 2 及び 1 4 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

同種 T 細胞の前記集団をインビトロで生成する最初のステップをさらに含む、請求項 1 2 及び 1 4 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 E B V 抗原及び／又は前記さらなる E B V 抗原が、E B N A 1、E B N A 2、E B N A 3 A、E B N A 3 B、E B N A 3 C、L M P 1、L M P 2 及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法又は組成物。

10

【請求項 2 7】

前記 E B V 抗原及び／又は前記さらなる E B V 抗原が、E B N A 1、L M P 1 及び／若しくは L M P 2 であるか、又は E B N A 1、L M P 1 及び／若しくは L M P 2 を含む、請求項 2 6 に記載の方法又は組成物。

【請求項 2 8】

前記 E B V 関連疾患、障害又は状態が E B V 関連がんであるか、又は E B V 関連がんを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法又は組成物。

【請求項 2 3】

20

前記 E B V 関連がんが、上咽頭癌、N K T 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、移植後リンパ増殖性疾患、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、胃がん、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 2 2 に記載の方法又は組成物。

【請求項 2 4】

対象における E B V 関連疾患、障害又は状態の治療又は予防のための医薬品の製造における、E B V 抗原の第 1 のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の第 1 の集団の使用であって、

同種 T 細胞の前記第 1 の集団が、(a) 前記 E B V 抗原若しくはさらなる E B V 抗原の第 2 のエピトープを結合若しくは認識する同種 T 細胞の第 2 の集団；並びに／又は (b) 免疫療法剤、M A P K 経路阻害剤、B E T 阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤と組み合わせて投与される、使用。

30

【請求項 2 5】

対象における E B V 関連疾患、障害又は状態の治療又は予防において使用するための、E B V 抗原の第 1 のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の第 1 の集団であって、

(a) 前記 E B V 抗原若しくはさらなる E B V 抗原の第 2 のエピトープを結合若しくは認識する同種 T 細胞の第 2 の集団；並びに／又は (b) 免疫療法剤、M A P K 経路阻害剤、B E T 阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤と組み合わせて投与される、同種 T 細胞の第 1 の集団。

【請求項 2 6】

対象における E B V 関連がん又は腫瘍を治療又は予防する方法であって、

40

(a) E B V 抗原のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の集団を前記対象に投与するステップ；並びに

(b) 免疫療法剤、M A P K 経路阻害剤、B E T 阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤を前記対象に投与するステップ
を含み、

それによって前記対象における前記 E B V 関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法。

【請求項 2 7】

対象における E B V 関連がん又は腫瘍を治療又は予防するための医薬組成物であって、E B V 抗原のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の集団と；

50

免疫療法剤、MAPK経路阻害剤、BET阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤と；

任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤及び／又は賦形剤とを含む、組成物。

【請求項 28】

同種T細胞の前記集団及び前記EBV関連疾患、障害又は状態の細胞が両方とも、MHCタンパク質をコードするヒト白血球抗原（HLA）対立遺伝子を含むか、又はMHCタンパク質をコードするヒト白血球抗原（HLA）対立遺伝子によって拘束される、請求項26に記載の方法又は請求項27に記載の組成物。

【請求項 29】

前記MHCタンパク質が、がん細胞又は腫瘍細胞に前記EBV抗原の前記エピトープを提示する、請求項28に記載の方法又は組成物。

【請求項 30】

前記免疫療法剤が、PD1阻害剤（例えば、抗PD1抗体）、PD-L1阻害剤（例えば、抗PD-L1抗体）、CTLA4阻害剤（例えば、抗CTLA4抗体）、LAG3阻害剤（例えば、抗LAG3抗体）、TIM3阻害剤（例えば、抗TIM3抗体）、又はCD96阻害剤（例えば、抗CD96抗体）などの免疫チェックポイント阻害剤であるか、又はこれを含む、請求項26～29のいずれか一項に記載の方法、組合せ、又は組成物。

【請求項 31】

前記免疫チェックポイント阻害剤が抗PD1抗体であるか、又は抗PD1抗体を含む、請求項30に記載の方法又は組成物。

【請求項 32】

前記抗PD1抗体が、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、又はセミプリマブから選択される、請求項31に記載の方法又は組成物。

【請求項 33】

前記免疫チェックポイント阻害剤が抗PD-L1抗体であるか、又は抗PD-L1抗体を含む、請求項30に記載の方法又は組成物。

【請求項 34】

前記抗PD1抗体が、アテゾリズマブ、アベルマブ、又はデュルバルマブから選択される、請求項33に記載の方法又は組成物。

【請求項 35】

前記MAPK経路阻害剤がMEK1／2阻害剤であるか、又はMEK1／2阻害剤を含む、請求項26～29のいずれか一項に記載の方法、組合せ、又は組成物。

【請求項 36】

前記MEK1／2阻害剤が、セルメタニブ及び／又はトレマチニブから選択される、請求項35に記載の方法又は組成物。

【請求項 37】

前記BET阻害剤がJQ1である、請求項26～29のいずれか一項に記載の方法又は組成物。

【請求項 38】

同種T細胞の前記集団が、前記治療剤の投与の前、同時及び／又は後に投与される、請求項26及び28～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

同種T細胞の前記集団をインビトロで生成する最初のステップをさらに含む、請求項26及び28～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記EBV抗原及び／又は前記さらなるEBV抗原が、EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3B、EBNA3C、LMP1、LMP2及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項26～39のいずれか一項に記載の方法又は組成物。

【請求項 41】

10

20

30

40

50

前記EBV抗原及び／又は前記さらなるEBV抗原が、EBNA1、LMP1及び／若しくはLMP2であるか、又はEBNA1、LMP1及び／若しくはLMP2を含む、請求項40に記載の方法又は組成物。

【請求項42】

前記がん又は腫瘍が、上咽頭癌、NK細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、移植後リンパ増殖性疾患、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、胃がん、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項26～41のいずれか一項に記載の方法又は組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

【関連出願】

【0001】本出願は、2019年10月23日に出願された「養子免疫療法」と題するオーストラリア仮出願第2019903995号の優先権を主張するものであり、その全内容は参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

【技術分野】

【0002】本発明は、一般的には、治療用組成物、及び養子免疫療法の方法の分野に関する。より詳細には、本発明は、エプスタイン-バーウイルス（EBV）関連疾患、障害又は状態、例えばがんを有する対象における養子免疫療法の方法に関する。

20

【発明の背景】

【0003】

【0003】養子免疫療法又は細胞免疫療法は、がん、感染合併症及び自己免疫疾患を治療するための強力なツールとして登場した[1]。クリニックにおけるT細胞療法の最初の成功は、患者由来腫瘍浸潤細胞（TIL）のインビトロでの拡大の先駆けで、進行期のメラノーマ患者に注入し戻したSteven Rosenbergのグループによって示された[2]。それ以来、T細胞エフェクター機能は、薬剤耐性細菌及び真菌感染症[3]、HIV[4]、CMV[5]及びBKV[6]を含むウイルス感染症；それと並んで血液悪性腫瘍並びに造血幹細胞移植（HSCT）及び固形臓器移植（SOT）患者におけるEBV関連移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）[7]の治療に対する臨床的成功を示すことが知られている。しかし、固形がんに対する有効な及び持続した臨床反応を得る上で、これらの療法の影響は依然として重大な課題である。

30

【0004】

【0004】がんに対する有効な養子細胞移入（ACT）反応に関連する作用機序は、悪性細胞で発現されるHLA分子によって提示される腫瘍関連抗原（TAA）を認識するT細胞の能力を中心に展開する[1]。TAAは、細胞増殖で重要な役割を果たす分子的因子、体細胞変異から生じるネオアンチゲン、及び免疫特権部位に位置するがん精巣／生殖系抗原（CTA）を含む。腫瘍浸潤リンパ球又は末梢血単核細胞由来のインビトロで拡大T細胞は、広範に使用されている。この手法は、ウイルス関連がん及び移植患者の疾患の治療に対して多くの注目を集めている。特に、養子T細胞療法は、エプスタイン-バーウイルス（EBV）関連移植後リンパ腫（PTLD）に対して顕著な臨床反応を示している[7]。EBVは、広範なヒト悪性腫瘍と関連していることが知られる強力なヒト遍在性Bリンパ球向性発癌性ヘルペスウイルスである。

40

【0005】

【0005】健康な個体では、EBV感染症は、ウイルス感染B細胞で発現されるEBNA3-6抗原を主に認識する機能性CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球（CTL）及びCD4⁺Tリンパ球を介して免疫学的に制御される[8、9]。しかし、その遍在する性質及び説得力のある細胞形質転換能により、EBV感染症は、バーキットリンパ腫（BL）、ホジキンリンパ腫（HL）、ナチュラルキラー又はT（NK/T）細胞リンパ腫、移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、上咽頭癌（NPC）及び胃癌（GC）などのB細胞及び上皮

50

細胞起源の両方の多数の悪性腫瘍と関連している〔10〕。今日まで、放射線及び／又は化学療法は、依然としてEBV関連悪性腫瘍の療法的治療の中心である。EBV特異的自己T細胞免疫療法を使用して数多くの試験が現在進行している〔7〕。しかし、患者への投与の前に自己CTLを製造し、自己CTLの安全性をテストするのに必要とされる期間が、ACTのためのEBV特異的T細胞の生成の主要な制約の一つとなっている。

【0006】

〔発明の概要〕

〔0006〕本発明は、EBV抗原のエピトープを結合又は認識する同種EBV特異的T細胞を対象に投与することによって、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態、例えばEBV関連がんを治療又は予防する方法に広く関する。

10

【0007】

〔0007〕第1の態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法であって：

〔0008〕(a) EBV抗原の第1のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第1の集団を対象に投与するステップ；及び

〔0009〕(b) EBV抗原又はさらなるEBV抗原の第2のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第2の集団を対象に投与するステップを含み、

〔0010〕それによって対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する、方法を提供する。

20

【0008】

〔0011〕いくつかの実施形態では、本態様の方法は、同種T細胞の第1及び／又は第2の集団をインビトロで生成する最初のステップをさらに含む。

【0009】

〔0012〕適切には、本方法は、治療剤を対象に投与するさらなるステップを含む。一実施形態では、治療剤は、免疫療法剤、MEK1／2阻害剤などのMAPK経路阻害剤、BET阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される。この点に関して、免疫療法剤は適切には、PD1阻害剤、PDL1阻害剤、CTLA4阻害剤、LAG3阻害剤、TIM3阻害剤又はCD96阻害剤などの免疫チェックポイント阻害剤であるか、又はこれを含む。いくつかの特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤はPD1抗体であるか、又は抗PD1抗体を含む。

30

【0010】

〔0013〕第2の態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防するための医薬組成物であって：

〔0014〕EBV抗原の第1のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第1の集団と；

〔0015〕EBV抗原又はさらなるEBV抗原の第2のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第2の集団と；

〔0016〕任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤及び／又は賦形剤とを含む、組成物にある。

40

【0011】

〔0017〕上述の態様に関して、同種T細胞の第1の集団及びEBV関連疾患、障害又は状態の細胞は、適切には両方とも、第1のMHCタンパク質をコードする第1のヒト白血球抗原(HLA)対立遺伝子を含むか、又は第1のMHCタンパク質をコードする第1のヒト白血球抗原(HLA)対立遺伝子によって拘束される。この点に関して、第1のMHCタンパク質は、EBV関連疾患、障害又は状態の細胞にEBV抗原の第1のエピトープを提示し得る。

【0012】

〔0018〕第1及び第2の態様に関して、同種T細胞の第2の集団及びEBV関連疾患、障害又は状態の細胞は両方とも、第2のMHCタンパク質をコードする第2のHLA対立

50

遺伝子を含むか、又は第2のMHCタンパク質をコードする第2のHLA対立遺伝子によって拘束される。この目的のために、第2のMHCタンパク質は、EBV関連疾患、障害又は状態の細胞にEBV抗原又はさらなるEBV抗原の第2のエピトープを適切に提示する。

【0013】

【0019】上述の態様のいくつかの実施形態では、同種T細胞の第2の集団は、同種T細胞の第1の集団の投与の前、投与と同時に及び／又は投与の後に投与される。

【0014】

【0020】第3の態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法であって：

【0021】(a) EBV抗原のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の集団を対象に投与するステップ；並びに

【0022】(b) 免疫療法剤、MAPK経路阻害剤、BET阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤を対象に投与するステップを含み、

【0023】それによって対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する、方法にある。

【0015】

【0024】適切には、同種T細胞の集団は、治療剤の投与の前、投与と同時に及び／又は投与の後に投与される。

【0016】

【0025】いくつかの実施形態では、本方法は、同種T細胞の集団をインビトロで生成する最初のステップをさらに含む。

【0017】

【0026】第4の態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防するための医薬組成物であって：

【0027】EBV抗原のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の集団と；

【0028】免疫療法剤、MAPK経路阻害剤、BET阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤と；

【0029】任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤及び／又は賦形剤とを含む、組成物を提供する。

【0018】

【0030】第3及び第4の態様に関して、同種T細胞の集団及びEBV関連疾患、障害又は状態の細胞は、適切には両方とも、第1のMHCタンパク質をコードする第1のヒト白血球抗原(HLA)対立遺伝子を含むか、又は第1のMHCタンパク質をコードする第1のヒト白血球抗原(HLA)対立遺伝子によって拘束される。いくつかの実施形態では、MHCタンパク質は、EBV関連疾患、障害又は状態の細胞にEBV抗原のエピトープを提示する。

【0019】

【0031】適切には第3及び第4の態様に関して、免疫療法剤は、PD1阻害剤、PDL1阻害剤、CTLA4阻害剤、LAG3阻害剤、TIM3阻害剤又はCD96阻害剤などの免疫チェックポイント阻害剤であるか、又はこれを含む。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤はPD1抗体であるか、又は抗PD1抗体を含む。いくつかの実施形態では、MAPK経路阻害剤はMEK1／2阻害剤であるか、又はMEK1／2阻害剤を含む。

【0020】

【0032】第5の態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態の治療又は予防のための医薬品の製造におけるEBV抗原の第1のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第1の集団の使用であって；同種T細胞の第1の集団が：(a) EBV抗原若しくはさらなるEBV抗原の第2のエピトープを結合若しくは認識する同種T細胞

10

20

30

40

50

の第2の集団；並びに／又は（b）免疫療法剤、MAPK経路阻害剤、BET阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤と組み合わせて投与される、使用に関する。

【0021】

【0033】第6の態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態の治療又は予防において使用するための、EBV抗原の第1のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第1の集団であって；（a）EBV抗原若しくはさらなるEBV抗原の第2のエピトープを結合若しくは認識する同種T細胞の第2の集団；並びに／又は（b）免疫療法剤、MAPK経路阻害剤、BET阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤と組み合わせて投与される、同種T細胞の第1の集団を提供する。

10

【0022】

【0034】上述の態様に関して、EBV抗原及び／又はさらなるEBV抗原は、EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3B、EBNA3C、LMP1、LMP2及びそれらの任意の組合せからなる群から適切に選択される。一実施形態では、EBV抗原及び／又はさらなるEBV抗原は、EBNA1、LMP1及び／若しくはLMP2であるか、又はEBNA1、LMP1及び／若しくはLMP2を含む。

【0023】

【0035】適切には上記の態様に関して、EBV関連疾患、障害又は状態はEBV関連がんであるか、又はEBV関連がんを含む。ある特定の実施形態では、EBV関連がんは、上咽頭癌、NK細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、移植後リンパ増殖性疾患、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、胃がん、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

20

【0024】

【0036】適切には、本発明の上述の態様の対象は哺乳動物である。

【0025】

【0037】好ましくは、対象はヒトである。

【0026】

【0038】本明細書全体を通して、別段の指示がない限り「含む（comprise）」、「含む（comprises）」及び「含む（comprising）」は、述べられた整数又は整数の群が1つ又は複数の他の述べられていない整数又は整数の群を含み得るように、排他的というより包含的に使用される。

30

【0027】

【0039】また、不定冠詞「a」及び「an」は、単数不定冠詞として又はさもなければ、不定冠詞が指す1つより多い若しくは単一より多い対象を排除するものとして読み取られるべきではないことも理解されるであろう。例えば、「a」タンパク質は、1つのタンパク質、1つ若しくは複数のタンパク質、又は複数のタンパク質を含む。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1A B】複数のがんをインビトロで認識及び排除する上での同種「既製品」EBV特異的T細胞の有効性を示す図である。（A）NP43（EBV）がん細胞と比較した、各EBV関連がん細胞株の示されたEBV関連遺伝子の転写レベルでの相対的倍率発現の統計的表示。ハウスキーピング遺伝子、HPRT1及び18S RNAがローディング対照として使用された。（B）以前に記載されているように[1]、示された同種EBV特異的エフェクターAdE1-LMPpolyトランスフェクトT細胞の生CD8+集団で観察された、LMP1/2及びEBNA1特異的ペプチドの存在下のIFN-γの発現を表すFACSプロット。（C）様々なエフェクター対標的細胞比（5：1～100：1）にわたるT細胞由来細胞傷害性の用量依存的増加を強調する、示されたEBV関連がん細胞株のLDH放出アッセイによって測定された細胞傷害性の統計的表示。HLA適合T細胞の細胞傷害性が、陽性対照（界面活性剤溶解対照）と比較したがん細胞のT細胞治療の24時間後のLDH放出の相対的倍率変化として表されている。（D）様々なエフェクター

40

50

対標的細胞比（5：1～100：1）にわたる、異なる起源の複数のEBV関連がん細胞株の細胞増殖を用量依存的に抑制する上でのHLA適合T細胞の影響を強調する、MTSアッセイによって測定された細胞生存率の統計的表示。SNKT16（HLA）はTI__001及びTI__002の両方で治療され、その細胞生存率が細胞生存率SNU719（HLA）及びC17（HLA）とそれぞれ比較された。各がん細胞の細胞生存率は、mock（PBS）治療対照と比較したT細胞治療24時間後の生細胞の相対的倍率変化として表されている。（E）HLA適合T細胞の存在下の、示されたEBV関連がん細胞株のアネキシンV結合アッセイによって測定された細胞死の統計的表示（50：1エフェクター対標的細胞比）。各がん細胞の細胞死は、細胞治療の48時間後のmock（PBS）治療と比較したT細胞治療試料におけるアネキシンV結合の相対的倍率変化として表されている。エラーバーは3つの独立した実験からの±SEMを表す。

10

【図1CE】複数のがんをインビトロで認識及び排除する上での同種「既製品」EBV特異的T細胞の有効性を示す図である。（A）NP43（EBV）がん細胞と比較した、各EBV関連がん細胞株の示されたEBV関連遺伝子の転写レベルでの相対的倍率発現の統計的表示。ハウスキーピング遺伝子、HPRT1及び18s RNAがローディング対照として使用された。（B）以前に記載されているように[1]、示された同種EBV特異的エフェクターAdE1-LMPpolyトランスフェクトT細胞の生CD8+集団で観察された、LMP1/2及びEBNA1特異的ペプチドの存在下のIFN-γの発現を表すFACSプロット。（C）様々なエフェクター対標的細胞比（5：1～100：1）にわたるT細胞由来細胞傷害性の用量依存的増加を強調する、示されたEBV関連がん細胞株のLDH放出アッセイによって測定された細胞傷害性の統計的表示。HLA適合T細胞の細胞傷害性が、陽性対照（界面活性剤溶解対照）と比較したがん細胞のT細胞治療の24時間後のLDH放出の相対的倍率変化として表されている。（D）様々なエフェクター対標的細胞比（5：1～100：1）にわたる、異なる起源の複数のEBV関連がん細胞株の細胞増殖を用量依存的に抑制する上でのHLA適合T細胞の影響を強調する、MTSアッセイによって測定された細胞生存率の統計的表示。SNKT16（HLA）はTI__001及びTI__002の両方で治療され、その細胞生存率が細胞生存率SNU719（HLA）及びC17（HLA）とそれぞれ比較された。各がん細胞の細胞生存率は、mock（PBS）治療対照と比較したT細胞治療24時間後の生細胞の相対的倍率変化として表されている。（E）HLA適合T細胞の存在下の、示されたEBV関連がん細胞株のアネキシンV結合アッセイによって測定された細胞死の統計的表示（50：1エフェクター対標的細胞比）。各がん細胞の細胞死は、細胞治療の48時間後のmock（PBS）治療と比較したT細胞治療試料におけるアネキシンV結合の相対的倍率変化として表されている。エラーバーは3つの独立した実験からの±SEMを表す。

20

30

【図2A】インビトロでのEBV関連がん細胞エフェクターT細胞の特徴の表現型決定を示す図である。（A）mock（PBS）及びHLA適合T細胞治療の24時間後の示された生EBV関連がん細胞株の（i）Ki67+集団のパーセンテージ；（ii）活性カスパーゼ3+集団のパーセンテージ；並びに（iii）BCL2+集団のパーセンテージを比較する統計的表示。SNU719及びC17は、それぞれTI__001及びTI__002 T細胞で治療され、一方でSNKT16は両方のT細胞で治療された。SNU719及びC17はいずれもCD45-集団としてゲーティングされ、一方でSNKT16は、T細胞集団と区別するためにCD45+ CD3+ CD56+集団としてゲーティングされた。（B）（A）に記載されているように各EBV関連がん細胞株を治療するのに使用された生T細胞の（i）CD8+集団のパーセンテージ；（ii）Ki67+集団のパーセンテージ；（iii）GnzB+（グランザイムB）集団のパーセンテージ；（iv）GnzK+（グランザイムK）集団のパーセンテージ；（iii）Perf+（パーフォリン）集団のパーセンテージを比較する統計的表示。エラーバーは3つの独立した実験からの±SEMを表す。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された：**p<0.01、及び***p<0.001。

40

【図2B】インビトロでのEBV関連がん細胞エフェクターT細胞の特徴の表現型決定を

50

示す図である。(A) mock (PBS) 及びHLA適合T細胞治療の24時間後の示された生EBV関連がん細胞株の(i) Ki67+集団のパーセンテージ；(ii) 活性カスパーゼ3+集団のパーセンテージ；並びに(iii) BCL2+集団のパーセンテージを比較する統計的表示。SNU719及びC17は、それぞれTI_001及びTI_002 T細胞で治療され、一方でSNKT16は両方のT細胞で治療された。SNU719及びC17はいずれもCD45-集団としてゲーティングされ、一方でSNKT16は、T細胞集団と区別するためにCD45+ CD3+ CD56+集団としてゲーティングされた。(B) (A)に記載されているように各EBV関連がん細胞株を治療するのに使用された生T細胞の(i) CD8+集団のパーセンテージ；(ii) Ki67+集団のパーセンテージ；(iii) GnzB+ (グランザイムB) 集団のパーセンテージ；(iv) GnzK+ (グランザイムK) 集団のパーセンテージ；(iii) Perf+ (パーフォリン) 集団のパーセンテージを比較する統計的表示。エラーバーは3つの独立した実験からの±SEMを表す。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された：** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ 。

【図3AD】インビボでの固形がんに対する同種EBV特異的細胞傷害性T細胞の治療有効性の評価を示す図である。(A) C17及び(B) C666.1由来腫瘍異種移植片で観察されたT細胞の単回投薬；並びに(C) C17及び(D) C666.1由来腫瘍異種移植片で観察された96時間間隔でのT細胞療法の2回投薬（黒い矢印によって示された）後に観察された、T細胞療法後の腫瘍増殖及び生存パーセントの統計的表示。C17はTI_002で治療され、一方でC666.1はTI_004で治療された。腫瘍サイズ（面積、mm²）はデジタルキャリパーを使用して測定され、各コホートの平均腫瘍サイズが表示された。各細胞株由来異種移植片の腫瘍増殖は、 $n \geq 4$ マウス/群からの平均腫瘍面積±SEMとして表される。マウスの生存が示された期間にわたりモニターされ、データの統計的有意性がログランク検定によって分析された：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ 。

【図4AB】「スイッチ抗原」療法の評価は、インビボでのEBV特異的細胞傷害性T細胞の有効性の改善をもたらすことを示す図である。(A) mock (PBS) 治療対照群と比較した、(i) 腫瘍増殖；(ii) 腫瘍増殖の倫理的限界での腫瘍重量(gm)；(iii) T細胞治療（それぞれ96時間間隔で2回投薬）群で観察されたT細胞療法後の生存パーセントを示すSNU719由来異種移植片の統計的表示。(B) mock (PBS) 治療対照群と比較した、(i) 腫瘍増殖；(ii) 腫瘍増殖の倫理的限界での腫瘍重量(gm)；(iii) T細胞治療（3回投薬）群で観察されたT細胞療法後の生存パーセントを示すSNU719由来異種移植片の統計的表示。赤い矢印は、TI_001の3回連続用量の投与（それぞれ96時間間隔で）を示し、一方で緑の矢印は、TI_001の2回用量後に投与された3回目の投与のTI_004へのスイッチングを示す。各細胞株由来異種移植片の腫瘍増殖は、 $n \geq 5$ マウス/群からの平均腫瘍面積±SEMとして表される。腫瘍重量のデータの統計的有意性は、マン-ホイットニー-t検定によって分析された。マウス生存が示された期間にわたりモニターされ、データの統計的有意性がログランク検定によって分析された：*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.0001$ 。

【図5AB】インビボでのリンパ性悪性腫瘍に対する同種EBV特異的細胞傷害性T細胞の治療有効性の評価を示す図である。(A) 照射後のCD34+細胞を使用する、NRGマウスでの12週間にわたるヒト免疫系の再構成スケジュール、及び移植片対宿主病(GVHD)に関するマウスモニタリングを示す模式図。模式図はまた、EBVウイルスが再構成後に投与され(QIMR-WIL株)、EBVインキュベーションのために2週間モニターされたことも示している。HLA適合T細胞はEBV感染後の示された日（赤い矢印によって強調されている）に投与され、マウスはT細胞療法の2週間後に殺された。(B) 各群の生(i) CD45+；(ii) CD45+ CD3+；及び(iii) CD45+ CD19+集団のパーセンテージの存在によって示される、12週間にわたるヒト免疫系の再構成を強調する統計的表示。(C) 各治療群間のCB33A CD34+臍

帯血細胞で再構成された $n = 3$ マウスの脾臓におけるリンパ性悪性腫瘍のサイズ及び存在を示す脾臓の肉眼形態。G1は、TI__005の3回連続用量の投与（それぞれ96時間間隔で）を表し、一方でG2は、TI__005の2回用量後に投与された3回目の投与のTI__002へのスイッチングを示す。（D）各治療群間の脾臓重量（gm）を比較する統計的表示。（E）各治療群間のCB03 CD34+ 臍帯血細胞で再構成された $n = 3$ マウスの脾臓におけるリンパ性悪性腫瘍のサイズ及び存在を示す脾臓の肉眼形態。（C）に示された戦略により、G1はTI__002で治療され、一方でG2はTI__003で治療された。（F）各治療群間の脾臓重量（gm）を比較する統計的表示。腫瘍重量のデータの統計的有意性が一元配置ANOVAによって分析された： $** p < 0.01$ 、及び $** p < 0.001$ 。

10

【図5CF】インビボでのリンパ性悪性腫瘍に対する同種EBV特異的細胞傷害性T細胞の治療有効性の評価を示す図である。（A）照射後のCD34+細胞を使用する、NRGマウスでの12週間にわたるヒト免疫系の再構成スケジュール、及び移植片対宿主病（GVHD）に関するマウスモニタリングを示す模式図。模式図はまた、EBVウイルスが再構成後に投与され（QIMR-WIL株）、EBVインキュベーションのために2週間モニターされたことも示している。HLA適合T細胞はEBV感染後の示された日（赤い矢印によって強調されている）に投与され、マウスはT細胞療法の2週間後に殺された。（B）各群の生（i）CD45+；（ii）CD45+ CD3+；及び（iii）CD45+ CD19+集団のパーセンテージの存在によって示される、12週間にわたるヒト免疫系の再構成を強調する統計的表示。（C）各治療群間のCB33A CD34+ 臍帯血細胞で再構成された $n = 3$ マウスの脾臓におけるリンパ性悪性腫瘍のサイズ及び存在を示す脾臓の肉眼形態。G1は、TI__005の3回連続用量の投与（それぞれ96時間間隔で）を表し、一方でG2は、TI__005の2回用量後に投与された3回目の投与のTI__002へのスイッチングを示す。（D）各治療群間の脾臓重量（gm）を比較する統計的表示。（E）各治療群間のCB03 CD34+ 臍帯血細胞で再構成された $n = 3$ マウスの脾臓におけるリンパ性悪性腫瘍のサイズ及び存在を示す脾臓の肉眼形態。（C）に示された戦略により、G1はTI__002で治療され、一方でG2はTI__003で治療された。（F）各治療群間の脾臓重量（gm）を比較する統計的表示。腫瘍重量のデータの統計的有意性が一元配置ANOVAによって分析された： $** p < 0.01$ 、及び $** p < 0.001$ 。

20

30

【図6A】インビボでの同種EBV特異的細胞傷害性T細胞の治療有効性に対するPD1阻害の影響を示す図である。（A）NanoString Immune機能パネルを使用して行われた、腫瘍浸潤（TIL）CD8+細胞から単離されたRNAで観察された326個の遺伝子の遺伝子シグネチャーを表すヒートマップ。TILは、腫瘍サイズが 40 mm^2 に達したTI__001治療の単回投与後5日後に、6匹の独立したマウス（LT5-10）由来のSNU719由来腫瘍異種移植片から単離された。TILで観察された遺伝子発現は、非刺激（LT11）及びEBV-pepmix刺激（LT12）と比較された。（B）生TIL（（A）に記載された）の（i）CD3+CD8+集団のパーセンテージ；（ii）CD8+PD1+集団のパーセンテージ；（iii）CD8+LAG3+集団のパーセンテージ；及び（iv）CD8+ TIM3+集団のパーセンテージを比較する、並びに非刺激T細胞（T細胞療法）と比較された統計的表示。エラーバーは3つの独立した実験からの $\pm \text{SEM}$ を表す。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された。（C）腫瘍増殖；（D）腫瘍増殖の倫理的限界での腫瘍重量（gm）；（E）mock（PBS）治療対照群と比較した、各治療群で観察されたT細胞療法、抗PD1療法、並びにT細胞及び抗PD1療法の併用後の生存パーセントを示すSNU719由来異種移植片の統計的表示。腫瘍重量のデータの統計的有意性が一元配置ANOVAによって分析された。マウス生存が示された期間にわたりモニターされ、データの統計的有意性がロジック検定によって分析された： ns 非有意、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ 、及び $**** p < 0.0001$ 。

40

【図6BE】インビボでの同種EBV特異的細胞傷害性T細胞の治療有効性に対するPD

50

1 阻害の影響を示す図である。(A) NanoString Immune 機能パネルを使用して行われた、腫瘍浸潤 (TIL) CD8+細胞から単離されたRNAで観察された326個の遺伝子の遺伝子シグネチャーを表すヒートマップ。TILは、腫瘍サイズが40mm²に達したTI_001治療の単回投与後5日後に、6匹の独立したマウス (LT5-10) 由来のSNU719由来腫瘍異種移植片から単離された。TILで観察された遺伝子発現は、非刺激 (LT11) 及びEBV-pepmix刺激 (LT12) と比較された。(B) 生TIL ((A) に記載された) の (i) CD3+CD8+集団のパーセンテージ; (ii) CD8+PD1+集団のパーセンテージ; (iii) CD8+LAG3+集団のパーセンテージ; 及び (iv) CD8+TIM3+集団のパーセンテージを比較する、並びに非刺激T細胞 (T細胞療法) と比較された統計的表示。エラーバーは3つの独立した実験からの±SEMを表す。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された。(C) 腫瘍増殖; (D) 腫瘍増殖の倫理的限界での腫瘍重量 (gm); (E) mock (PBS) 治療対照群と比較した、各治療群で観察されたT細胞療法、抗PD1療法、並びにT細胞及び抗PD1療法の併用後の生存パーセントを示すSNU719由来異種移植片の統計的表示。腫瘍重量のデータの統計的有意性が一元配置ANOVAによって分析された。マウス生存が示された期間にわたりモニターされ、データの統計的有意性がログランク検定によって分析された: ns 非有意、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、及び**** $p < 0.0001$ 。

10

【図7AB】MEK1/2阻害剤とEBV特異的T細胞との併用を示す図である。(A) SNU719細胞とのインキュベーションの48時間後の細胞増殖を個別に及び併用で抑制する上での、HLA適合EBV特異的T細胞及びMEK1/2阻害剤 (AZD6244及びトラメチニブ) の影響を強調する、MTSアッセイによって測定された細胞生存率の統計的表示。(B) SNU719細胞とのインキュベーションの48時間後に観察された細胞死のレベルを強調する、個別治療及び併用治療としてのEBV特異的T細胞及びMEK1/2阻害剤の存在下で観察された、アネキシンV結合アッセイによって測定された細胞死の統計的表示。(C) 増殖曲線は、Xcellenceを使用して、個別及び併用でのHLA適合EBV特異的T細胞及びMEK1/2阻害剤の存在下で観察された細胞死の割合を強調する。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された: * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。

20

【図7C】MEK1/2阻害剤とEBV特異的T細胞との併用を示す図である。(A) SNU719細胞とのインキュベーションの48時間後の細胞増殖を個別に及び併用で抑制する上での、HLA適合EBV特異的T細胞及びMEK1/2阻害剤 (AZD6244及びトラメチニブ) の影響を強調する、MTSアッセイによって測定された細胞生存率の統計的表示。(B) SNU719細胞とのインキュベーションの48時間後に観察された細胞死のレベルを強調する、個別治療及び併用治療としてのEBV特異的T細胞及びMEK1/2阻害剤の存在下で観察された、アネキシンV結合アッセイによって測定された細胞死の統計的表示。(C) 増殖曲線は、Xcellenceを使用して、個別及び併用でのHLA適合EBV特異的T細胞及びMEK1/2阻害剤の存在下で観察された細胞死の割合を強調する。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された: * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。

30

【図8AB】JQ1とEBV特異的T細胞との併用を示す図である。(A) SNU719細胞とのインキュベーションの48時間後の細胞増殖を個別に及び併用で抑制する上での、HLA適合EBV特異的T細胞及びJQ1の影響を強調する、MTSアッセイによって測定された細胞生存率の統計的表示。(B) SNU719細胞とのインキュベーションの48時間後に観察された細胞死のレベルを強調する、個別治療及び併用治療としてのEBV特異的T細胞及びJQ1の存在下で観察された、アネキシンV結合アッセイによって測定された細胞死の統計的表示。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された: ns 非有意、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。

40

【図9】MEK1/2阻害剤のIC₅₀値の決定を示す図である。示された細胞株が、セ

50

ルマチニブ (selumatinib) (左のパネル) 及びトラメチニブ (右のパネル) $0.1 \mu\text{M} \sim 5 \mu\text{M}$ と 48 時間インキュベートされた後で MTS アッセイを使用して行われた細胞生存率の表示。データは 3 つの独立した実験からの平均 $\pm$ SD として表される。

【図 10】MEK1/2 阻害剤と HLA 適合同種 EBV 特異的 T 細胞との併用を示す図である。示された (A) C17; (B) C666.1; (C) SNU719 及び (D) YCCLE1 とのインキュベーションの 48 時間後の細胞増殖を個別に及び併用で抑制する上での、エフェクター対標的比 25:1 での HLA 適合 EBV 特異的 T 細胞、並びに $1 \mu\text{M}$ の濃度の MEK1/2 阻害剤セルマチニブ (上のパネル) 及びトラメチニブ (下のパネル) の効果を強調する、MTS アッセイによって測定された細胞生存率。データは 3 つの独立した実験からの平均 $\pm$ SD として表される。P 値は一元配置 ANOVA を使用して算出された: ns = 非有意、* = $p < 0.05$ 、** = $p < 0.01$ 、*** = $p < 0.001$ 及び **** = $p < 0.0001$ 。

10

【図 11 A C】MEK1/2 阻害剤及び HLA 適合同種 EBV 特異的 T 細胞の二重併用の影響を示す図である。(A) 細胞増殖曲線は、Xcelllegence を使用して測定された、個別及び併用での HLA 適合 EBV 特異的 T 細胞 (エフェクター対標的比 25:1) 及びセルマチニブ ($1 \mu\text{M}$) の存在下で観察された、SNU719 (上のパネル) 及び C666.1 (下のパネル) の細胞増殖の割合を強調する。フローサイトメトリーを使用して行われた、SNU719 発現 (上のパネル) 及び C666.1 (下のパネル) の (B) Ki67 に基づく細胞増殖、並びに (C) 活性カスパーゼ-3 に基づく細胞死に対する個別及び二重併用の効果。データは 3 つの独立した実験からの平均 $\pm$ SD として表される。P 値は一元配置 ANOVA を使用して算出された: ns = 非有意、* $p < 0.05$ 、* $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び **** $p < 0.0001$ 。

20

【図 12 A C】MEK1/2 阻害剤と HLA 不適合同種特異的 T 細胞との併用を示す図である。SNU719 (上のパネル) 及び C666.1 (下のパネル) とのインキュベーションの 48 時間後の細胞増殖を個別に及び併用で抑制する上での、エフェクター対標的比 25:1 の HLA 不適合特異的 T 細胞、並びに $1 \mu\text{M}$ の濃度の MEK1/2 阻害剤 (A) セルマチニブ及び (B) トラメチニブの効果を強調する、MTS アッセイによって測定された細胞生存率。(C) SNU719 (上のパネル) 及び C666.1 (下のパネル) とインキュベートされた場合の、HLA 適合及び HLA 不適合 EBV 特異的 T 細胞 (エフェクター対標的比 25:1 の) 単独、並びにセルマチニブ及びトラメチニブ ($1 \mu\text{M}$) と併用した HLA 適合及び HLA 不適合 EBV 特異的 T 細胞の効果を比較する、MTS アッセイによって測定された細胞生存率。データは 3 つの独立した実験からの平均 $\pm$ SD として表される。P 値は一元配置 ANOVA を使用して算出された: ns = 非有意、* = $p < 0.05$ 、** = $p < 0.01$ 、*** = $p < 0.001$ 及び **** = $p < 0.0001$ 。

30

【図 13 A D】がん細胞内因性経路に対する MEK1/2 阻害剤及び HLA 適合同種 EBV 特異的 T 細胞の二重併用の影響の表現型決定を示す図である。フローサイトメトリーを使用して行われた、(A) pERK1/2; (B) MHC クラス I; (C) pSTAT3; 及び (D) MYC の発現時の SNU719 (上のパネル) 及び C666.1 (下のパネル) におけるセルマチニブ ($1 \mu\text{M}$) 及び HLA 適合 EBV 特異的 T 細胞 (エフェクター対標的比 25:1) の個別及び二重併用の 16 時間後のがん細胞表現型の表示。データは 3 つの独立した実験からの平均 $\pm$ SD として表される。P 値は一元配置 ANOVA を使用して算出された: ns = 非有意、* = $p < 0.05$ 、** = $p < 0.01$ 、*** = $p < 0.001$ 及び **** = $p < 0.0001$ 。

40

【図 14】JQ1 阻害剤の IC₅₀ 値の決定を示す図である。示された細胞株が、JQ1 $0.5 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ と 48 時間インキュベートされた後で MTS アッセイを使用して行われた細胞生存率の表示。データは 3 つの独立した実験からの平均 $\pm$ SD として表される。

【図 15 A D】JQ1 阻害剤及び HLA 適合同種 EBV 特異的 T 細胞の二重併用の影響を示す図である。示された (A) 胃がん細胞 (SNU719、YCCLE1 (上のパネル)) 及び鼻咽頭がん細胞 (C17、C666.1 (下のパネル)) とのインキュベーション

50

の48時間後の細胞増殖を個別に及び併用で抑制する上での、エフェクター対標的比25:1のHLA適合EBV特異的T細胞及びJQ1 (2.5 μ M)の影響を強調する、MTSアッセイによって測定された細胞生存率。Xcellenceを使用して測定された、個別及び併用での(B)HLA適合EBV特異的T細胞(エフェクター対標的比25:1)及びJQ1 (2.5 μ M)の存在下で観察された、SNU719(上のパネル)及びC666.1(下のパネル)の細胞増殖の割合を強調する細胞増殖曲線。フローサイトメトリーを使用して行われた、SNU719発現(上のパネル)及びC666.1(下のパネル)の(C)Ki67に基づく細胞増殖、及び(D)活性カスパーゼ-3に基づく細胞死に対する個別及び二重併用の効果。データは3つの独立した実験からの平均 $\pm$ SDとして表される。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された: ns=非有意、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。

10

【図16AB】JQ1阻害剤とHLA不適合同種特異的T細胞との併用を示す図である。(A)SNU719(上のパネル)及びC666.1(下のパネル)とのインキュベーションの48時間後の細胞増殖を個別に及び併用で抑制する上での、エフェクター対標的比25:1のHLA不適合特異的T細胞及び2.5 μ Mの濃度のJQ1阻害剤の影響を強調する、MTSアッセイによって測定された細胞生存率。(B)SNU719(上のパネル)及びC666.1(下のパネル)とインキュベートされた場合の、HLA適合及びHLA不適合EBV特異的T細胞(エフェクター対標的比25:1の)単独、並びにJQ1阻害剤(2.5 μ M)と併用したHLA適合及びHLA不適合EBV特異的T細胞の効果を比較する、MTSアッセイによって測定された細胞生存率。データは3つの独立した実験からの平均 $\pm$ SDとして表される。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された: ns=非有意、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。

20

【図17AD】がん細胞内因性経路に対するJQ1阻害剤及びHLA適合同種EBV特異的T細胞の二重併用の影響の表現型決定を示す図である。フローサイトメトリーを使用して行われた、(A)MYC; (B)pERK1/2; (C)pAKT; 及び(D)pSTAT3の発現時のSNU719(上のパネル)及びC666.1(下のパネル)におけるJQ1 (2.5 μ M)及びHLA適合EBV特異的T細胞(エフェクター対標的比25:1)の個別及び二重併用の16時間後のがん細胞表現型の表示。データは3つの独立した実験からの平均 $\pm$ SDとして表される。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された: ns=非有意、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。

30

【図18AC】免疫制御分子に対するJQ1阻害剤及びHLA適合同種EBV特異的T細胞の二重併用の影響の表現型決定を示す図である。フローサイトメトリーを使用して行われた、(A)MHCクラスI; (B)PD-L1; 及び(C)CD47の発現時のSNU719(上のパネル)及びC666.1(下のパネル)におけるJQ1 (2.5 μ M)及びHLA適合EBV特異的T細胞(エフェクター対標的比25:1)の個別及び二重併用の16時間後のがん細胞表現型の表示。データは3つの独立した実験からの平均 $\pm$ SDとして表される。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された: ns=非有意、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。

40

【図19AE】インビボでのセルマチニブ及び同種EBV特異的細胞傷害性T細胞の二重併用の治療有効性の評価を示す図である。(A)NRGマウスにおけるEBV陽性SNU719異種移植片の成長に対するセルマチニブ及び同種T細胞(TIG-001)の二重併用の影響が評価された。腫瘍担持マウスは、HLA適合T細胞(黒い矢印によって示されたマウス1匹につき1回あたり 2×10^7 T細胞)及びセルマチニブ(12.5 mg/Kg)の個別又は併用のどちらかでの2回投与により、連続14日間経口治療された。各異種移植片の増殖は、 $n = 9$ マウス/群からの平均腫瘍面積 $\pm$ SDとして表されている。(B)示された治療群のマウスから単離された腫瘍の肉眼形態。(C)示された治療群のマウスからの(B)に記載された腫瘍重量の表示。データは1群あたり $n = 3$ マウスからの平均 $\pm$ SDとして表される。P値は一元配置ANOVAを使用して算出された。(D)

50

フローサイトメトリーを使用してCD45、CD3及びCD8発現によって決定される、個別治療同種T細胞（TIG-001）及びセルマチニブと併用した同種T細胞（TIG-001）で観察された腫瘍浸潤物の生存パーセンテージの表示。P値はスチューデントt検定を使用して算出された。（E）個別治療並びにセルマチニブ及び同種T細胞の併用治療後の、（A）に記載されているEBV関連腫瘍を担持するマウスのカプラン-マイヤー全生存分析。動物の生存（n=6マウス/群）が示された期間にわたりモニターされ、統計的有意性がログランク検定によって分析された：ns=非有意、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。

【発明の詳細な説明】

【0029】

10

【0059】本発明は、「既製品」同種EBV特異的T細胞による養子免疫療法が、一連のEBV関連がん又はEBV陽性がんを治療又は予防することができるという驚くべき発見についてある程度予測される。この治療効果は、異なるEBV抗原エピトープに特異的なEBV特異的T細胞集団の組合せが使用される場合、特に有効であることが示されている。さらに、本発明者らは、同種EBV特異的T細胞並びに免疫チェックポイント阻害剤、MEK1/2阻害剤及び／又はBET阻害剤の併用が、EBV関連疾患、障害又は状態に対するそのような養子T細胞療法の有効性を有意に改善し得ることを示した。

【0030】

【0060】したがって、幅広い形態で、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法であって、EBV抗原のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の集団を対象に投与して、それによって対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防するステップを含む、方法に関する。

20

【0031】

【0061】一態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法であって：

【0062】（a）EBV抗原の第1のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第1の集団の治療有効量を対象に投与するステップ；及び

【0063】（b）EBV抗原又はさらなるEBV抗原の第2のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第2の集団の治療有効量を対象に投与するステップを含み、

30

【0064】それによって対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する、方法に関する。

【0032】

【0065】関連する態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防するための医薬組成物であって：

【0066】EBV抗原の第1のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第1の集団と；

【0067】EBV抗原又はさらなるEBV抗原の第2のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の第2の集団と；

【0068】任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤及び／又は賦形剤とを含む、組成物を提供する。

40

【0033】

【0069】後に続く記載は、2つの上述の態様に等しく当てはまる。

【0034】

【0070】エプスタイン-バーウイルス又はEBVは一般的なヒト病原体であり、ヒトにおける1つ或いは複数の疾患、障害若しくは状態の原因となり得るか、又はヒトにおける1つ或いは複数の疾患、障害若しくは状態と関連し得る。故に、上述の方法のある特定の実施形態は、ヒトにおけるEBV感染症によって引き起こされるか、又はヒトにおけるEBV感染症と関連する1つ又は複数の疾患、障害又は状態、例えばEBV関連がんを予防及び／又は治療することに関する。EBVは主に、上皮細胞及びBリンパ球を通じてヒト

50

宿主に感染し、次いでヒト宿主において長期潜伏感染を確立し得る。EBVの一次感染は、世界中の伝染性単核球症（IM）の症例の90%超の原因となり、EBV感染B細胞の拡大により主に小児及び若年成人に感染する。EBVはまた、バーキットリンパ腫及びホジキンリンパ腫、胃癌及び上咽頭癌、HIV感染個体におけるリンパ腫、並びに移植後リンパ増殖性障害（PTLD）を含むいくつかのがんとも関連している。EBVはまた、自己免疫疾患、特に多発性硬化症に関与していることも見出されている。

【0035】

【0071】本発明の文脈では、「EBV関連疾患、障害又は状態」とは、エプスタインバーウイルスによる感染症から生じるか、又は該感染症に関連した任意の臨床病理を意味する。この目的のために、EBV関連疾患、障害又は状態は、EBVによって直接又は間接的に引き起こされる任意の疾患、並びに患者をEBVによる感染症に罹りやすくする疾患を意味し得る。前者のカテゴリに入る疾患の例には、伝染性単核球症、上咽頭癌、及びバーキットリンパ腫が挙げられる。後者のカテゴリの疾患（すなわち、患者をEBV感染症のリスクにさらす疾患）には、後天性免疫不全症候群並びに、一般的に、臓器移植及び特定のがん療法を受ける患者など、免疫抑制又は免疫系の機能低下の状態をもたらす任意の状態が挙げられる。1つの特定の実施形態では、EBV関連疾患、障害又は状態は、適切には多発性硬化症であるか、又は多発性硬化症を含む。

【0036】

【0072】用語「EBV陽性細胞」は、潜伏形態などでEBV又は1つ若しくは複数のEBVタンパク質を発現する、がん細胞を含むそれらの細胞を指す。

【0037】

【0073】好ましい実施形態では、EBV関連疾患、障害又は状態は、EBV関連及び／又は陽性がんであるか、若しくはEBV関連及び／又は陽性がんを含む。本明細書で使用される場合、及び別段の指定がない限り、用語「EBV関連がん」又は「EBV陽性がん」は、エプスタインバーウイルス（EBV）に関連しているがんを指す。ある特定の実施形態では、EBV陽性がんは、約30%超、約40%超、約50%超、約60%超、約70%超、又は約80%超がEBVウイルスを含有又は発現するがんである。

【0038】

【0074】本明細書で一般的に使用される場合、用語「がん」、「腫瘍」、「悪性の」及び「悪性腫瘍」は、発癌、腫瘍マーカーの発現、腫瘍抑制因子発現若しくは活性の喪失、及び／又は異常な（*aberrant*又は*abnormal*）細胞表面マーカー発現と関連した1つ又は複数の遺伝子変異又は他の遺伝子変化を含む異常な（*aberrant*又は*abnormal*）分子表現型をしばしば伴う異常な（*aberrant*又は*abnormal*）細胞増殖、分化及び／又は遊走を特徴とする、疾患若しくは状態、又は疾患若しくは状態と関連した細胞又は組織を指す。

【0039】

【0075】がんには、限定するものではないが、肉腫、癌腫、リンパ腫、白血病及び芽腫などの全ての主要ながん形態を含む、http://www.cancer.gov/cancertopics/alphabetical/NCI_Cancer_Indexにリストされているような任意の侵襲性がん若しくは潜在的侵襲性がん、腫瘍又は他の悪性腫瘍が挙げられ得る。これらには、限定するものではないが、乳がん、肺腺癌を含む肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、子宮がん及び前立腺がんを含む生殖器系のがん、脳及び神経系のがん、頭頸部がん、結腸がん、結腸直腸がん及び胃がんを含む胃腸がん、肝臓がん、腎臓がん、メラノーマ及び皮膚癌などの皮膚がん、リンパ系がん及び骨髄単球性がんを含む血液細胞がん、膵臓がん及び下垂体がんなどの内分泌系のがん、骨がん及び軟部組織がんを含む筋骨格がんが挙げられ得る。特定の実施形態では、がんは、固形がん又は白血病若しくは液体がんである。適切には、がんは、本明細書で先に記載されたものなど、1つ又は複数のEBV抗原を発現、例えば過剰発現する。

【0040】

【0076】特定の実施形態では、EBV関連がんは、上咽頭癌、NKT細胞リンパ腫、ホ

ジキンリンパ腫、移植後リンパ増殖性疾患、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、胃がん、耳下腺癌、乳癌、平滑筋肉腫及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される。特定の実施形態では、EBV関連がんは移植後リンパ増殖性疾患ではない。

【0041】

[0077]本明細書で使用される場合、「単離された」とは、その天然の状態から取り除かれているか、又はさもなければヒトの操作に供されている物質を意味する。単離された物質は、その天然の状態で該物質に通常付随する成分を実質的若しくは本質的に含まなくてもよく、又はその天然の状態で該物質に通常付随する成分と一緒に人工的状态となるように操作されてもよい。単離された物質は、組換え、化学合成、濃縮、精製又は部分的精製形態であってもよい。

10

【0042】

[0078]本明細書で使用される場合、「治療 (treating)」、「治療する (treat)」又は「治療 (treatment)」は、EBV関連疾患、障害又は状態の症状又は病理学的徴候が発生し始めた後で、これを少なくとも部分的に改善、排除又は低減する療法的介入を指す。治療は、対象にとって有益であることが絶対である必要はない。

【0043】

[0079]本明細書で使用される場合、「予防 (preventing)」、「予防する (prevent)」又は「予防 (prevention)」は、症状又は病理学的徴候を少なくとも部分的に予防及び／又は低減するために、EBV若しくはその分子成分による感染、又はEBV若しくはその分子成分への曝露の前、及び／又はEBV関連疾患、障害若しくは状態の症状若しくは病理学的徴候の発症前に開始される一連の行動を指す。そのような予防は、対象にとって有益であることが絶対又は完全である必要はないと理解されるべきである。

20

【0044】

[0080]用語「治療有効量」は、その薬剤で治療を受けている対象において所望の効果を達成するのに十分な、EBV特異的同種T細胞又は治療剤などの明示された薬剤の量を言う。例えば、これは、EBV関連がん、がん転移及び再発を含む、EBV関連疾患、障害又は状態を低減、緩和及び／又は予防するのに必要な、同種T細胞の第1の集団、同種T細胞の第2の集団及び／又は本明細書に記載された治療剤を含む組成物の量であってもよい。いくつかの実施形態では、「治療有効量」は、EBV関連疾患、障害又は状態の症状を低減又は排除するのに十分である。他の実施形態では、「治療有効量」は、所望の生物学的効果を達成するのに十分な量、例えば、EBV関連がん増殖、再発及び／又は転移を減少させるか又は予防するのに有効な量である。

30

【0045】

[0081]理想的には、薬剤の治療有効量は、実質的な細胞傷害性効果を対象にもたらすことなく所望の結果を誘導するのに十分な量である。EBV関連疾患、障害又は状態を低減、緩和及び／又は予防するのに有用な薬剤の有効量は、治療を受けている対象、任意の関連疾患、障害及び／又は状態のタイプ及び重症度（例えば、EBV関連疾患、障害又は状態のタイプ）、並びに治療用組成物の投与の様式に依存することになる。

40

【0046】

[0082]本態様の方法は、上に列挙されたものに加えて、がん治療などの1つ又は複数のさらなる治療を含み得ることが理解されるであろう。そのような治療には、限定するものではないが、薬物療法、化学療法、抗体、核酸及び他の生体分子療法、放射線療法、外科手術、栄養療法、リラクゼーション又は瞑想療法、並びに他の自然又はホリスティック療法が挙げられ得る。一般的に、薬物、生体分子（例えば、抗体、siRNAなどの阻害性核酸）又は化学療法剤は、本明細書では「抗がん治療剤」又は「抗がん剤」と呼ばれる。

【0047】

50

【0083】「投与 (administering)」又は「投与 (administration)」とは、本明細書に開示された同種 T 細胞及び／又は治療剤若しくは組成物の、特定の選択された経路による動物対象への導入を意味する。

【0048】

【0084】同種 T 細胞及び／又は治療剤、若しくは同種 T 細胞及び／又は治療剤を含む組成物の投与は、限定するものではないが、静脈内、筋肉内、腹腔内、頭蓋内、経皮、経口、鼻内、肛門及び眼内を含む任意の公知の非経口、局所又は経腸経路によってもよい。

【0049】

【0085】剤形には、錠剤、分散剤、懸濁液、注射剤、溶液、シロップ、トローチ、カプセル、坐剤、エアロゾル、経皮パッチ等が挙げられる。これらの剤形は、この目的のために特別に設計された注入型若しくは埋込型制御放出装置、又はこの様式でさらに作動するように修正された埋込物の他の形態も含み得る。治療剤の制御放出は、例えば、アクリル樹脂、ワックス、高級脂肪族アルコール、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、並びにヒドロキシプロピルメチルセルロースなどの特定のセルロース誘導体を含む疎水性ポリマーで治療剤をコーティングすることによって達成され得る。さらに、制御放出は、他のポリマーマトリックス、リボソーム及び／又はミクロスフェアを使用することによって達成され得る。

【0050】

【0086】経口又は非経口投与に適した本発明の組成物は、各々が 1 つ若しくは複数の本発明の治療剤の所定量を含有するカプセル、小袋若しくは錠剤などの個別の単位として、粉末若しくは顆粒として、又は水性液体、非水性液体中の溶液若しくは懸濁液、水中油型エマルジョン若しくは油中水型液体エマルジョンとして提示されてもよい。そのような組成物は、任意の薬学的方法によって調製することができるが、全ての方法は、1 つ又は複数の必要成分を構成する担体と上述したような 1 つ又は複数の薬剤を会合させるステップを含む。一般に、組成物は、本発明の薬剤を液体担体若しくは微粉固体担体又は両方と均一及び緊密に混合し、次いで、必要ならば、所望の体裁に製品を成形して調製される。

【0051】

【0087】本明細書に記載された同種 T 細胞、治療剤及び組成物は、投与製剤と適合する様式、及び薬学的に有効であるような量で投与され得る。患者に投与される用量は、本発明の文脈では、適当な期間にわたって患者に有益な応答をもたらすのに十分であるべきである。投与されるべき薬剤（複数可）の量は、対象の年齢、性別、体重及び全身の健康状態、開業医の判断に依存するであろう要因を含め、治療される対象に依存し得る。

【0052】

【0088】ある特定の実施形態では、本明細書に記載の EBV 関連疾患、障害又は状態を治療する方法は、同種 T 細胞の第 1 及び／若しくは第 2 の集団並びに又は治療剤を、少なくとも 2 回（例えば、2、3、4、5、6 回等）対象に投与することを含む。そのような用量は、定期的に、例えば必要に応じて毎日、毎週、隔週、毎月等、投与することができる。

【0053】

【0089】本発明の 1 つの特定の幅広い適用は、本明細書で先に記載されたものなどの EBV 関連疾患、障害又は状態を有する対象において、細胞免疫療法又は養子免疫療法を行う方法であって、本明細書に記載された同種 T 細胞及び任意選択で薬学的に許容できる担体、希釈剤又は賦形剤の治療有効量を対象に投与するステップを含む、方法の提供である。

【0054】

【0090】用語「細胞免疫療法」又は「養子免疫療法」は、がん又は感染症の治療のための免疫担当細胞、例えば T 細胞の導入を意味する（例えば、June, C. H. 編、2001、In: Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore; Vonderheide ら、20

10

20

30

40

50

03、Immun. Research 27:1~15頁を参照のこと)。この目的のために、養子免疫療法は、組織又は系、例えば免疫系の生物学的機能を、自己又は同種細胞、例えばT細胞を用いて交換、修復、又は増強することを典型的には目的とした戦略であることが理解されるであろう。

【0055】

[0091]本明細書で使用される場合、用語「同種」は、同じ種に属する個体に由来するが遺伝的に異なり、それ故に一般的には免疫学的に不適合である細胞又は組織、例えばT細胞を指す。故に、用語「同種細胞」は、抗原的には異なるが、それでも同じ種に属する細胞タイプを指す。典型的には、用語「同種」は、ドナーから同じ種のレシピエントへ移植される細胞、例えばT細胞を定義するのに使用される。

10

【0056】

[0092]本明細書で使用される場合、用語「T細胞」(すなわち、Tリンパ球)は、哺乳動物(例えば、ヒト)由来の胸腺細胞、未成熟T細胞、成熟T細胞等を含む、T細胞系統内の全ての細胞を含むことが意図される。ヘルパーT細胞、制御性T細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞及びメモリーT細胞などの様々なT細胞集団は、それらのサイトカインプロファイル及びそれらの機能に基づき定義することができる。好ましくは、T細胞は、CD4又はCD8のどちらか、ただし両方ではない、及びT細胞受容体を発現する成熟T細胞である。T細胞受容体(TCR)は、MHC又はHLA分子に結合した抗原ペプチドを認識することに関与する、T細胞の表面で見出される分子であることが理解されるであろう。適切には、同種T細胞は、CD4+ヘルパーT細胞及び/又はCD8+細胞傷害性T細胞を含む。この点に関して、本明細書に記載された同種T細胞は、CD4+ヘルパーT細胞/CD8+細胞傷害性T細胞の混合集団中にあってもよい。

20

【0057】

[0093]本発明によれば、EBV特異的T細胞を含む同種T細胞の集団、例えば同種T細胞の第1及び/又は第2の集団は、ヒト患者に投与される。ヒト患者に投与される同種T細胞の集団は、EBV関連疾患、障害又は状態のEBV陽性細胞と共有されるHLA対立遺伝子によって適切には拘束される。1つの特定の実施形態では、同種T細胞の第1の集団及びEBV関連疾患、障害又は状態の細胞は両方とも、第1のMHCタンパク質をコードする第1のヒト白血球抗原(HLA)対立遺伝子を共有するか、又は該HLA対立遺伝子によって拘束される。別の実施形態では、同種T細胞の第2の集団及びEBV関連疾患、障害又は状態の細胞は両方とも、第2のMHCタンパク質をコードする第2のHLA対立遺伝子を含むか、又は該HLA対立遺伝子によって拘束される。いくつかの実施形態では、このHLA対立遺伝子拘束性は、EBV関連疾患、障害又は状態の細胞、例えばがん細胞のHLA割り当てを確認し、そのような細胞のHLA対立遺伝子によって拘束されるEBV特異的T細胞(又は同種T細胞の集団が由来するT細胞株)を含む同種T細胞の集団を選択することによって確保される。HLA割り当て(すなわち、HLA遺伝子座タイプ)は、当技術分野で公知の任意の方法によって確認する(すなわち、タイピングする)ことができる。HLA割り当てを確認するための非限定的な例示的方法は、本明細書に参考により組み込まれるASHI Laboratory Manual, Edition 4.2(2003)に見出すことができる。

30

40

【0058】

[0094]ある特定の実施形態では、同種T細胞の第1及び/又は第2の集団は、1つ又は複数の(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つのHLA対立遺伝子)HLA対立遺伝子(例えば、HLA-A対立遺伝子、HLA-B対立遺伝子、HLA-C対立遺伝子、及び/又はHLA-DR対立遺伝子)をEBV関連疾患、障害又は状態のEBV陽性細胞と共有する。この点に関して、同種T細胞の第1及び第2の集団は、同じHLA対立遺伝子のうちの1つ又は複数のEBV関連疾患、障害又は状態の細胞と共有し得ることが想定される。実際に、特定の実施形態では、同種T細胞の第1の集団は、1つ又は複数のHLA対立遺伝子(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つのHLA対立遺伝子)を同種T細胞の第2の集団と共有する。理想的には、同種T細胞

50

胞の第1の集団は、EBV関連疾患、障害又は状態の細胞と共有される、また、同種T細胞の第2の集団のそれらのHLA対立遺伝子、例えば第2のHLA対立遺伝子とは共有されない（すなわち、異なる）1つ又は複数のHLA対立遺伝子、例えば第1のHLA対立遺伝子を適切には含む。同様に、同種T細胞の第2の集団は、EBV関連疾患、障害又は状態の細胞と共有される、また、同種T細胞の第1の集団によって含まれるそれらのHLA対立遺伝子、例えば第1のHLA対立遺伝子とは共有されない（すなわち、異なる）1つ又は複数のHLA対立遺伝子、例えば第2のHLA対立遺伝子を適切には含む。この目的のために、同種T細胞の第1及び第2の集団は、HLA対立遺伝子の同じ又は同一の相補体を好ましくは持たないか又は含まない。さらに、同種T細胞の第1の集団は適切には、第2のエピトープを認識しないか若しくは結合しない、及び／又は同種T細胞の第2の集団は適切には、第1のエピトープを認識しないか若しくは結合しない。

10

【0059】

【0095】本明細書で使用される場合、用語「主要組織適合遺伝子複合体」（MHC）は、免疫系の一部として機能して抗原及び他のペプチド断片を結合し、それらをTCRなどの抗原認識分子による認識のために細胞表面に提示する抗原提示分子、タンパク質又はポリペプチドを指す。MHCは、ヒトMHCに関して使用される場合、用語「ヒト白血球抗原」（HLA）と互換的に使用され得る；故に、MHCは、限定されるものではないが、あらゆるそのバリエーション、アイソフォーム、アイソタイプ、及び他の生物学的同等物に加えて、古典的MHC対立遺伝子又は本明細書に開示された遺伝子を含む全てのHLAサブタイプ：HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-DM、HLA-DO、HLA-DP、HLA-DQ、及びHLA-DRを指す。MHCクラスI（MHC-I）及びMHCクラスII（MHC-II）分子は異なる抗原処理経路を利用する。一般に、細胞内抗原に由来するペプチドは、事実上全ての細胞で発現されるMHCクラスI分子によってCD8+ T細胞に提示されるが、細胞外抗原由来ペプチドは、MHC-II分子によってCD4+ T細胞に提示される。しかし、この一般的原理に対するいくつかの例外が観察されている。

20

【0060】

【0096】本明細書に開示されたある特定の実施形態では、特定のEBV特異的抗原、ペプチド、及び／又はエピトープは、EBV関連疾患、障害又は状態の細胞に適当なMHCクラスI又はIIタンパク質という状況下では、抗原-MHC複合体中で同定及び提示される。例として、第1のMHCタンパク質は適切には、同種T細胞の第1の集団による認識のためにEBV関連疾患、障害又は状態の細胞にEBV抗原の第1のエピトープを提示するが、第2のMHCタンパク質は、同種T細胞の第2の集団による認識のために、EBV関連疾患、障害又は状態の細胞にEBV抗原又はさらなるEBV抗原の第2のエピトープを提示することができる。上記の観点から、EBV抗原の特定のセットには、どのHLA/MHC対立遺伝子が特定の対象及び／又はEBV関連疾患、障害若しくは状態に適しているかを決定するために、本明細書に記載された同種T細胞の遺伝子構造が評価され得る。

30

【0061】

【0097】適切には、EBV抗原及び／又はさらなるEBV抗原は、当技術分野で公知のいずれのものであってもよい。例示的なEBV抗原には、タンパク質EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3B、EBNA3C、LMP1及びLMP2が挙げられる。特定の実施形態では、EBV抗原及び／又はさらなるEBV抗原は、EBNA1、LMP1及び／若しくはLMP2であるか、又はEBNA1、LMP1及び／若しくはLMP2を含む。

40

【0062】

【0098】本明細書に記載された同種T細胞は適切には、EBV抗原及び／又はさらなるEBV抗原に対する抗原特異性を有する。語句「抗原特異性を有する」及び「抗原特異的応答を誘発する」は本明細書で使用される場合、抗原への同種T細胞の結合が免疫応答を誘発するように、同種T細胞が抗原に特異的に結合し、抗原を免疫学的に認識できること

50

を意味する。特定の理論又は機構に縛られることなくEBV関連疾患、障害又は状態のEBV陽性細胞に対する抗原特異的応答を誘発することによって、本明細書に記載されたEBV特異的同種T細胞は、以下のいずれかのうちの1つ又は複数を提供することができると考えられる：EBV陽性細胞、例えばEBV陽性がん細胞の標的化及び破壊、がん細胞の低減又は排除、免疫細胞の腫瘍部位（複数可）への浸潤の促進、並びに抗がん応答の増強／拡大。

【0063】

【0099】本明細書で一般的に使用される場合、「エピトープ」は、タンパク質のアミノ酸の連続又は不連続配列を含む抗原タンパク質断片であり、エピトープは、免疫系の要素、例えば抗体又は他の抗原受容体、例えばMHCタンパク質によって認識又は結合され得る。ほとんどのEBV抗原が、複数のエピトープ又は抗原決定基を有し得ることが当業者によって理解されるであろう。

【0064】

【0100】上記の観点から、第1のエピトープは、EBVタンパク質の抗原タンパク質断片であってもよいが、第2のエピトープは適切には、第1のエピトープが由来する同じEBVタンパク質とは異なる抗原タンパク質断片、又はさらなるEBVタンパク質である。

【0101】本明細書で使用される場合「タンパク質」は、アミノ酸ポリマーであり、アミノ酸には、D-アミノ酸、L-アミノ酸、天然及び／又は非天然アミノ酸が挙げられ得る。本明細書で典型的に使用される場合、「ペプチド」は、60個以下の連続したアミノ酸を含むタンパク質である。本明細書で典型的に使用される場合、「ポリペプチド」は、60個を超える連続したアミノ酸を含むタンパク質である。用語「タンパク質」はまた、限定するものではないが、糖タンパク質及びリポタンパク質などのタンパク質含有分子を包含することも理解されるべきである。

【0065】

【0102】いくつかの実施形態では、本明細書に記載された同種T細胞及び／又は治療剤（これらの併用を含む）は、薬学的に許容できる担体、希釈剤又は賦形剤を含む組成物の形態で対象に投与されてもよい。

【0066】

【0103】薬学的に許容できる担体、希釈剤及び／又は賦形剤には、全身投与において安全に使用することができる任意の固体、半固体、ゲル又は液体の充填剤、希釈剤又はカプセル化物質が挙げられ得ることが理解されるであろう。特定の投与経路に応じて、担体、希釈剤及び／又は賦形剤は、限定するものではないが、糖、デンプン、セルロース並びにその誘導体、麦芽、ゼラチン、タルク、硫酸カルシウム、植物油、合成油、ポリオール、アルギニン酸、等張食塩水、パイロジェンフリー水、湿潤剤又は乳化剤、バルク剤、流動促進剤、コーティング剤（例えば、腸溶コーティング剤）、皮膚軟化薬、結合剤、充填剤、崩壊剤、滑沢剤、pH緩衝剤（例えばリン酸緩衝液）及び／又は香味剤を含む群から選択することができる。組成物は、錠剤、分散剤、懸濁液、注射溶液、シロップ、トローチ、カプセル、坐剤、エアロゾル、経皮パッチ等を含む任意の1つ又は複数の剤形でヒトに投与することができる。

【0067】

【0104】薬学的に許容できる担体、希釈剤及び賦形剤を記載する有用な参考文献は、参照により本明細書に組み込まれるRemington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N. J. USA, 1991)である。

【0068】

【0105】特定の実施形態では、同種T細胞の第2の集団は、同種T細胞の第1の集団の投与の(i)前；(ii)後；又は(iii)同時に投与される。一実施形態では、同種T細胞の第1の集団の投与、及び同種T細胞の第2の集団の投与（連続投与又は同時投与のいずれか）は、他方の非存在下での同種T細胞の第1の集団又は同種T細胞の第2の集団のいずれかの投与からのそのような治療又は予防を超えるEBV関連疾患、障害又は状

態の治療又は予防をもたらす。

【0069】

[0106] 特定の実施形態では、上記の方法は、同種T細胞の第1及び／又は第2の集団をインビトロで生成する最初のステップをさらに含む。ヒト患者に投与されるEBV特異的T細胞を含む同種T細胞の第1及び第2の集団は、当技術分野で公知の方法によって生成され得るか、又は当技術分野で公知の方法によって生成された凍結保存T細胞株（各T細胞株がEBV特異的T細胞を含む）の既存のバンク（収集）から選択され得、並びに投与の前に解凍及び好ましくは拡大され得る。

【0070】

[0107] ある特定の実施形態では、同種T細胞の集団をインビトロで生成するステップは、EBV特異的T細胞を産生するように同種T細胞を1つ又は複数のEBV抗原に感作させ（すなわち、刺激する）ことを含む。同種T細胞の集団をインビトロで生成するのに使用される同種T細胞は、当技術分野で公知の任意の方法によって同種T細胞のドナーから単離することができる。特定の実施形態では、同種T細胞は、同種T細胞のドナーのPBMCから分離された末梢血リンパ球から濃縮される。

【0071】

[0108] 特定の実施形態では、同種T細胞を感作させるステップは、樹状細胞、サイトカイン活性化単球、又は末梢血単核細胞などの抗原提示細胞を、1つ又は複数のEBV抗原に由来する少なくとも1つの免疫原性ペプチドで負荷又は形質転換することを含む。この目的のために、抗原提示細胞は、例えば、1つ又は複数のEBV抗原に由来するオーバーラッピングペプチドを含むポリトープのプール又は該ポリトープで負荷又は形質転換され得る。1つの特定の実施形態では、同種T細胞の集団をインビトロで生成するステップは、末梢血単核細胞を使用して同種T細胞を感作させることを含む。

【0072】

[0109] 適切には、上述の方法は、治療剤を対象に投与するさらなるステップを含む。同様に、上記の組成物は治療剤をさらに含んでもよい。本明細書で使用される場合、用語「治療剤」は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態などの望ましくない状態又は疾患を撮像するか、影響を与えるか、治療するか、対処するか、予防するか又は改善するのに使用される化合物又は分子を指す。

【0073】

[0110] 治療剤は、当技術分野で公知のいずれのものであってもよい。いくつかの実施形態では、治療剤は、抗がん治療若しくは抗がん剤であるか、又は抗がん治療若しくは抗がん剤を含む。一般的に、薬物、生体分子（例えば、抗体、阻害性核酸、例えばsiRNA）又は化学療法剤は、本明細書では「抗がん治療剤（anti-cancer therapeutic agent）」と呼ばれる。単なる例として、これらには：化学療法剤、例えば、限定するものではないが、パクリタキセル、ドキソルビシン、メトトレキサート、イリノテカン、ダカルバジン、テモゾロミド及びシスプラチン；生物療法剤又は免疫療法剤、例えば、限定するものではないが、抗PD-1抗体（例えば、ニボルマブ）及び抗CTLA4抗体（例えば、イピリムマブ）；並びに／又は分子標的剤、例えばMAPK経路（すなわち、Ras-Raf-MEK-ERKシグナル伝達）阻害剤及びBET阻害剤が挙げられ得る。

【0074】

[0111] 特定の実施形態では、治療剤は、免疫療法剤、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）経路阻害剤、BET阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0075】

[0112] 用語「免疫療法剤」は本明細書で使用される場合、対象における免疫応答を誘導、増強、又は抑制することができる任意の薬剤を指す。ある特定の実施形態では、免疫療法剤は、免疫チェックポイントモジュレーターであってもよい。本明細書で使用される場合、用語「免疫チェックポイントモジュレーター」は、T細胞活性化又は機能を制御す

10

20

30

40

50

る1つ又は複数の免疫チェックポイントタンパク質を完全に又は部分的に低減するか、阻害するか、妨げるか、又は調節することができる分子を指す。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターは免疫チェックポイント阻害剤である。

【0076】

【0113】免疫チェックポイントタンパク質の非限定的な例には、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原（CTLA；例えば、CTLA4）並びにそのリガンドCD80及びCD86；プログラム細胞死タンパク質（PD、例えば、PD-1）並びにそのリガンド及びPDL2；インドールアミン-ピロール2，3-ジオキシゲナーゼ-1（IDO1）；T細胞膜タンパク質（TIM、例えば、TIM3）；アデノシンA2a受容体（A2aR）；リンパ球活性化遺伝子（LAG、例えば、LAG3）；キラー免疫グロブリン受容体（KIR）；CD96等が挙げられる。これらのタンパク質は、典型的には、共刺激性又は阻害性T細胞応答に関与することが理解されるであろう。免疫チェックポイントタンパク質は、自己寛容並びに生理的免疫応答の持続時間及び大きさを広範に制御し、維持することができる。

10

【0077】

【0114】ある特定の実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーター（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）は、免疫チェックポイントタンパク質に結合するか、又は免疫チェックポイントタンパク質の生物学的活性を阻害する小分子、抗体、組換え結合タンパク質、又はペプチドであってもよい。

【0078】

20

【0115】免疫チェックポイントモジュレーター（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）の非限定的な例には、CTLA4阻害剤（例えば、イピリムマブ）、PD1阻害剤（例えば、ニボルマブ）、PDL1阻害剤（例えば、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ）、LAG3阻害剤、KIR阻害剤、B7-H3リガンド、B7-H4リガンド、CD96阻害剤及びTIM3阻害剤が挙げられる。特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗PD1抗体、抗PDL1抗体、抗CTLA4抗体、抗LAG3抗体、抗TIM3抗体、抗CD96抗体及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0079】

【0116】1つの特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、PD1阻害剤であるか、又はPD1阻害剤を含み、より具体的には抗PD1抗体であるか、又は抗PD1抗体を含む。例示的なPD1阻害剤及び抗PD1抗体には、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、センプリマブ、スパルタリズマブ、カムレリズマブ、シンチリマブ、チスレリズマブ、トリパリマブ、AMP-224及びAMP-514が挙げられる。

30

【0080】

【0117】本明細書で使用される場合、「抗体」は、免疫グロブリンタンパク質（その断片を含む）であるか、又は免疫グロブリンタンパク質（その断片を含む）を含む。用語「免疫グロブリン」は、免疫グロブリンアイソタイプIgA、IgD、IgM、IgG及びIgE並びにその抗原結合断片を含む、哺乳動物免疫グロブリン遺伝子複合体の任意の抗原結合タンパク質産物を含む。用語「免疫グロブリン」に含まれるのは、天然に存在するか又はヒト介入（例えば、組換えDNA技術）によって産生されるかにかかわらず、組換え、キメラである若しくはヒト化された免疫グロブリン、又はさもなければ変更された若しくはバリエーションアミノ酸残基、配列及び／又はグリコシル化を含む免疫グロブリンである。

40

【0081】

【0118】本発明はまた、抗体断片、例えばFc、Fab若しくはF(ab)2断片又は一本鎖Fv抗体（scFv）もその範囲内に含む。本発明はまた、複数のscFvを含む多価組換え抗体断片、いわゆるダイアボディ、トリアボディ及び／又はテトラボディ、並びに二量体化活性化デミボディ（例えば、国際公開第2007/062466号）を含むことも企図される。例として、そのような抗体は、Holligerら、1993 Proc Natl Acad Sci USA 90:6444~6448頁；又はKip

50

r i y a n o v、2009 Methods Mol Biol 562:177~93
頁に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる方法に従って調製することができる。

【0082】

[0119]一般的に、抗体及び抗体断片は、ポリクローナル又はモノクローナルであってもよい。また、抗体は、抗体又は抗体断片をコードする核酸を適当な宿主細胞で発現させることによって、組換え合成抗体又は抗体断片として産生され得ることも理解されるであろう。ファージディスプレイ方法を含む、組換え抗体発現及び選択法の非限定的な例は、Coliganら、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGYの第17章及びZuberbuhlerら、2009、Protein Engineering、Design & Selection 22 169頁に提供されている。

10

【0083】

[0120]本明細書で使用される場合、用語「MAPK阻害剤」は、対象に投与すると、対象の1つ又は複数の細胞、例えばがん細胞でMAPK経路の阻害をもたらす任意の化合物又は化学物質を指す。MAPK阻害剤には、限定されるものではないが、低分子量の阻害剤、抗体又は抗体断片、アンチセンス構築物、低分子阻害性RNA (small inhibitory RNA) (すなわち、dsRNAによるRNA干渉; RNAi)、及びリボザイムが挙げられる。いくつかの実施形態では、MAPK阻害剤は低分子有機分子である。MAPK阻害剤には、例えば、RAS阻害剤、RAF阻害剤、MEK阻害剤、ERK阻害剤、JNK阻害剤及び／又はp38阻害剤が挙げられる。

20

【0084】

[0121]MAPK経路阻害剤は、Ras (すなわち、HRas、KRas及び／又はNRas)、Raf (すなわち、A-Raf、B-Raf及び／又はC-Raf)、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ (すなわち、MEK1/2) 及び／又は細胞外シグナル制御キナーゼ (すなわち、ERK1/2) (それらの変異体バリエーションを含む) 機能及び／又はシグナル伝達の特異的阻害剤を含む、当技術分野で公知のいずれのものであってもよい。例として、そのようなMAPK経路阻害剤は、以下の中から選択されてもよい：

[0122]i) MEK阻害剤：AZD6244、R04987655、R05126766、TAK-733、MSC1936369B (AS703026)、GSK1120212、BAY86-9766、GDC-0973、GDC-0623、PD325901、ARRY-438162、CM040、E6201、ARRY300；

30

[0123]ii) Raf及び／又はBRaf選択的阻害剤：PLX4032、GSK2118436、ソラフェニブ (BAY-43-9006)、BMS-908662 (XL-281)、RAF265、RG-7256 (R05212054、PLX3603)、R05126766、ARQ-736、E-3810、DCC-2036；

[0124]iii) ERK阻害剤：ウリキセルチニブ (BVD-523)、SCH772984、DEL-22379、MK-8353 (SCH900353)、AZD0364、VX-11e、CC-90003；

[0125]iv) Ras阻害剤：MCI-062、サリラシブ、BAY293、ARS-1620。

40

【0085】

[0126]BET阻害剤は、当技術分野で公知のいずれのものであってもよいことが想定される。本明細書で使用される場合、用語「BET阻害剤」は、BETに結合し、BETの生物学的活性を阻害及び／又は低減する化合物を指す。いくつかの実施形態では、BET阻害剤は、BETの生物学的活性を実質的又は完全に阻害する。いくつかの実施形態では、生物学的活性は、クロマチン (例えば、DNAに関連するヒストン) 及び／又は別のアセチル化タンパク質へのBETの結合である。適切には、BET阻害剤は、BRD2、BRD3、BRD4、及びBRDTのうちの1つ又は複数に阻害する。BET阻害剤には、プロモドメイン含有タンパク質のモジュレーター、例えば、米国公開第2014/03

50

36190号に開示されたベンズイミダゾール誘導体が挙げられる。例示的なBET阻害剤には、I-BET 151 (GSK1210151A)、I-BET 762 (GSK525762)、OTX-015、TEN-010、CPI-203、CPI-0610、オリノン (olinone)、RVX-208、LY294002、AZD5153、MT-1及びMS645が挙げられる。

【0086】

【0127】別の態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法であって：

【0128】(a) EBV抗原のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の集団を対象に投与するステップ；並びに

【0129】(b) 治療剤が、免疫療法剤、MAPK経路阻害剤、BET阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤を対象に投与するステップを含み、

【0130】それによって対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防する方法に関する。

【0087】

【0131】関連する態様では、本発明は、対象におけるEBV関連疾患、障害又は状態を治療又は予防するための医薬組成物であって：

【0132】EBV抗原のエピトープを結合又は認識する同種T細胞の集団と；

【0133】免疫療法剤、MAPK経路阻害剤、BET阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤と；

【0134】任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤及び／又は賦形剤とを含む、組成物にある。

【0088】

【0135】「薬学的に許容できる担体」とは、生物学的に又は他の点で望ましくなくはない物質からなる薬学的ビヒクルを意味する。すなわち、該物質は、任意の又は実質的な有害反応を引き起こすことなく、選択された活性剤と共に対象に投与することができる。担体には、賦形剤及び他の添加物、例えば希釈剤、界面活性剤、着色剤、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝剤、保存料、トランスフェクション剤等が挙げられ得る。

【0089】

【0136】同様に、本明細書で提供される化合物の「薬学的に許容できる」塩、エステル、アミド、プロドラッグ又は誘導体は、生物学的に又は他の点で望ましくなくはない塩、エステル、アミド、プロドラッグ又は誘導体である。

【0090】

【0137】後続く記載は、2つの上述の態様に等しく当てはまる。

【0091】

【0138】適切には、同種T細胞の集団及びEBV関連疾患、障害又は状態の細胞は、MHCタンパク質をコードするヒト白血球抗原 (HLA) 対立遺伝子を共有する。特定の実施形態では、MHCタンパク質は、EBV関連疾患、障害又は状態の細胞にEBV抗原のエピトープを提示する。

【0092】

【0139】免疫療法剤、MAPK経路阻害剤及び／又はBET阻害剤は、上に記載されたものなどの当技術分野で公知のいずれのものであってもよい。特定の実施形態では、MAPK経路阻害剤は、MEK1／2阻害剤であるか、又はMEK1／2阻害剤を含む。別の実施形態では、免疫療法剤は、抗PD1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤であるか、又はこれを含む。

【0093】

【0140】適切には、同種T細胞の集団は、治療剤の投与の前、同時及び／又は後に投与される。したがって、ある特定の実施形態では、対象は治療剤を投与され、その後に同種T細胞を投与される。代替の実施形態では、個体は同種T細胞を投与され、その後に治

10

20

30

40

50

療剤を投与される。さらなる代わりの実施形態では、同種 T 細胞は治療剤と同時に投与される。

【0094】

【0141】1つの実施形態では、本態様の方法は、例えば上に記載されたそれらの方法によって、同種 T 細胞の集団をインビトロで生成する最初のステップをさらに含む。

【0095】

【0142】適切には、EBV 抗原及び／又はさらなる EBV 抗原は、EBNA 1、EBNA 2、EBNA 3 A、EBNA 3 B、EBNA 3 C、LMP 1、LMP 2 及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される。より具体的には、EBV 抗原及び／又はさらなる EBV 抗原は適切には、EBNA 1、LMP 1 及び／若しくは LMP 2 であるか、又は EBNA 1、LMP 1 及び／若しくは LMP 2 を含む。

10

【0096】

【0143】適切には、EBV 関連疾患、障害又は状態は、上に記載されたものなどの EBV 関連がんであるか、又はこれを含む。1つの実施形態では、EBV 関連がんは、上咽頭癌、NK T 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、移植後リンパ増殖性疾患、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、胃がん、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0097】

【0144】さらに別の態様では、本発明は、対象における EBV 関連疾患、障害又は状態の治療又は予防のための医薬品の製造における、EBV 抗原の第 1 のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の第 1 の集団、例えば本明細書に記載されたものなどの使用に関し；同種 T 細胞の第 1 の集団は：(a) EBV 抗原若しくはさらなる EBV 抗原の第 2 のエピトープを結合若しくは認識する同種 T 細胞の第 2 の集団、例えば本明細書に記載されたものなど；並びに／又は (b) 治療剤が、免疫療法剤、MAPK 経路阻害剤、BET 阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤、例えば本明細書に記載されたものなどと組み合わせて投与される。

20

【0098】

【0145】最後の態様では、本発明は、対象における EBV 関連疾患、障害又は状態の治療又は予防において使用するための、EBV 抗原の第 1 のエピトープを結合又は認識する同種 T 細胞の第 1 の集団、例えば本明細書に記載されたものなどを提供し；同種 T 細胞の第 1 の集団は：(a) EBV 抗原若しくはさらなる EBV 抗原の第 2 のエピトープを結合若しくは認識する同種 T 細胞の第 2 の集団、例えば本明細書に記載されたものなど；並びに／又は (b) 治療剤が、免疫療法剤、MAPK 経路阻害剤、BET 阻害剤及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤、例えば本明細書に記載されたものなどと組み合わせて投与される。

30

【0099】

【0146】上述の態様に関して、用語「対象」は、限定されるものではないが、ヒト、パフォーマンス動物（ウマ、ラクダ、グレイハウンドなど）、家畜（ウシ、ヒツジ、ウマなど）及びコンパニオンアニマル（ネコ及びイヌ）を含む哺乳動物を含む。1つの特定の実施形態では、対象はヒトである。

40

【0100】

【0147】好ましい実施形態が詳細に記載され、実際的に実施され得るように、以下の非限定的な例を参照のこと。

【実施例】

【0101】

実施例 1

【0148】同種「既製品」T 細胞療法は、移植レシピエントにおける感染合併症を治療するための強力なツールとして登場した。これらの同種抗原特異的 T 細胞は、多様な HLA 適用範囲を提供する健康なドナーの大規模パネルから採取された末梢血リンパ球から拡大され、凍結保存され得、必要としている HLA 適合移植患者に投与され得る。この実施例

50

では、本発明者らは、複数のがんの治療のための治療ツールとしての同種EBV特異的T細胞の前臨床評価を提供する。さらに、本発明者らは、同種抗原特異的T細胞及びPD1／PD-L1軸をブロックする抗体の併用が、EBVがんに対する養子T細胞療法の有効性を有意に改善することも示した。

【0102】

材料及び方法

細胞培養

【0149】この試験で使用したEBV関連細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC、マナッサス、バージニア、USA）から購入し、ATCCの推奨に従って培養し、維持した。試験で使用した各EBV関連細胞株及びそれらの各HLAを表1にリストする。これらの細胞株の培養物を、37℃、20%酸素レベル及び5%CO₂でインキュベートして維持した。全ての組織培養プラスチックウェアは、Corning（登録商標）ストーン スタッフォードシャー、UK（フラスコ及びプレート）及びCostar（登録商標）ワシントンDC、USA（プラスチックピペット）から購入した。全ての細胞株をマイコプラズマ感染症について定期的にテストし、QIMR Berghofer Medical Research Instituteの科学的業務によるショートタンデムリピート（STR）プロファイリングを使用して認証した。

【0103】

RNA抽出及び定量的リアルタイムPCR

【0150】RNAを、QIAGEN RNeasy（登録商標）キット（バレンシア、CA、USA）を使用して製造の指示に従って各細胞株から抽出した。1×10⁶細胞の各細胞株をプレーティングし、トリプシン-EDTA（Sigma Aldrich（登録商標））を使用して回収し、洗浄し（PBS、2回）、その後、適当な容量のRLT緩衝液、4℃（キットで供給された）を添加し、製造者によって示されたようにその後のステップを行った。RNA抽出後、iScript（商標）cDNAキット（Bio-Rad Laboratories Inc）で提供されたDNase酵素を使用して、DNase消化ステップを行った。RNAの質及び量を、ND-1000分光光度計（Thermo-Scientific）を使用して入手した。逆転写を、製造者の指示に従ってiScript（商標）Reverse Transcriptase（Bio-Rad Laboratories Inc.）を使用して行った。使用したサイクル条件は：25℃で5分間プライミング、46℃で20分間逆転写、及び95℃で1分間逆転写酵素活性化であった。qRT-PCRを、Biorad CFX384 Touch（商標）リアルタイムPCR検出システムを使用して384ウェルプレートで行った。プライマーは、それぞれの刊行物から得たEBV関連遺伝子LMP1、LMP2及びEBNA1からなった。総容量10μL中のマスターミックスの組成は：Sybrグリーン5μL、各プライマー1mM、希釈cDNA 1μL、及びH₂O 3μLを、二重に行った3つの生物学的複製物について含む。使用したサイクル条件は：95℃、5分間、続いて以下を40サイクル：95℃、10秒間、60℃、10秒間、及び72℃5秒間、並びに72℃、5分間の最終伸長ステップであった。C_t値の算出は、添付のBiorad CFX384ソフトウェア、バージョン1.5.0.39を使用して行い、その後、値を18sRNA及びHPRTに正規化して、ΔΔC_t方法を使用して算出を行った。生体cDNA試料分析ごとに、逆転写酵素で処理しないcDNA溶液を含有する陰性対照を使用してゲノムDNA混入がないようにした。それと並んで、H₂Oのみを含有する通常の陰性対照を各プライマーセットに含めた。プライマーは、LMP1：FP-5'-CAGTCAGGCAAGCCTATGA3'、RP-5'-CTGGTTCCGGTGGAGATGA3'；LMP2：5'-AGCTGTAACCTGTGGTTTCCATGAC-3'、RP-5'-GCCCCCTGGCGAAGAG-3'；EBNA1：FP-5'-TACAGGACCTGGAAATGGCC-3'、RP-5'-TCTTTGAGGTCCACTGCCG-3'；HPRT1：FP-5'-CCTGGCGTCTCGTGATTAGTGAT-3'、RP-5'-AGACGTTTCAGTCCCTGTCCATAA-3'；18sRNA：5'-C

G A A A G C A T T T A C C A A G G A C - 3'、R P - 5' - T T A T T G T G T C T G G A C C T G G - 3' からなった。

【0104】

T細胞の生成

【0151】LMP／EBNA1特異的「既製品」T細胞バンクを生成するために、末梢血単核細胞（PBMC）を血清陽性ドナーの静脈血100～300mLから回収し、幅広いHLAスペクトルをカバーした。トランケートgly／ala欠失EBNA1遺伝子に融合した16個のHLA拘束性LMP1及び2エピトープのポリエピトープからなるAdE1-LMPpolyベクター【11、12】を次いで使用して、PBMCの30%を感染させた（10：1のMOI）。これらのトランスフェクトPBMCを次いで照射し、残りのPBMCと2週間共培養した。培養物に新鮮な増殖培地及び120IU／mLの組換えIL-2を3～4日ごとに補充した（Komtur Pharmaceuticals）。拡大T細胞を、注入のための放出の前に抗原特異性及び微生物汚染についてテストした。HLA適合EBV関連がん細胞株を標的にするのに使用した各T細胞を、表1にリストする。

【0105】

細胞内サイトカインアッセイ

【0152】AdE1-LMPpolyベクタートランスフェクトT細胞産物におけるLMP1及び2並びにEBNA1特異性の頻度を解析するために、該T細胞産物を、GolgiPlug（BD Biosciences）の存在下、LMP1及び2若しくはEBNA1由来の明確なエピトープのプール、又はEBNA1タンパク質全体を包含するペプチドの重複セット（全てミモトープ由来、GenScript又はJPT Technologies）で4時間刺激した。マルチパラメトリック解析のために、GolgiPlug及びGolgiStop（BD Biosciences）の存在下、上記にリストしたペプチド及び抗CD107a-FITC（BD Biosciences）で細胞を4時間刺激した。細胞を次いで洗浄し、抗CD8-PerCP-Cy5.5（eBioscience）及び抗CD4-PE-Cy7（BD Biosciences）で染色し、固定し、Cytifix／CytoPerm（BD Biosciences）で透過処理し、再び洗浄し、及び抗IFN-γ-AF700で染色した（全てBD Biosciences製）【11】。さらに洗浄後、細胞をPBSに再懸濁し、FACS Divaソフトウェアを備えたBD LSR Fortessa（BD Biosciences）を使用して取得した。取得後及びBoolean解析を、FlowJoソフトウェア（TreeStar）を使用して行った。

【0106】

細胞生存率アッセイ

【0153】細胞生存率アッセイを、CellTiter 96（登録商標）Aqueousワン細胞生存率アッセイ試薬（one cell viability assay reagent）（Promega、WI、USA）を使用して、EBV関連がん細胞株ごとに3つの生物学的複製物について三重に行った。簡単には、がん細胞（標的細胞）を、総培地容量200μLで96ウェル組織培養プレート（BD Falcon（商標））に1ウェルあたり5000細胞の密度でプレーティングした。エフェクターAdE1-LMPpolyトランスフェクトT細胞を、37℃及び50%CO₂で10%FCS及び組換えIL-2 120IU／mLを含むRPMI-1640で新たに解凍した。プレーティング及び37℃及び50%CO₂でのインキュベーションの24時間後、5：1～100：1のエフェクター対標的（E：T）の勾配比でエフェクターT細胞を標的細胞に混合した。E：T比（E_T）ごとに使用したT細胞（T₀）の正確な数を、PBS処理標的細胞（E_s）及び単独培地（M₀）と一緒に対照として独立に使用した。37℃及び50%CO₂でのインキュベーションの24時間後、MTSを各ウェルに添加し（培地に1：100希釈）、1時間インキュベートし、その後プレートを室温で5分間、1,200×gで遠心分離し、490nmの光学密度の混合物の吸光度を、マイクロプレートリーダーに

10

20

30

40

50

より測定した。相対的細胞生存率を、以下の式を使用して算出した。

【0107】

【数1】

$$\text{相対的細胞生存率} = \frac{(E_T - M_0) - (T_0 - M_0)}{(E_S - M_0)}$$

10

【0108】

細胞傷害性アッセイ

【0154】細胞傷害性アッセイを、C y t o T o x 96（登録商標）N o n r a d i o a c t i v e C y t o t o x i c A s s a y K i t（P r o m e g a、W I、U S A）を使用して、E B V 関連がん細胞株ごとに3つの生物学的複製物について三重に行った【14】。簡単には、がん細胞（標的細胞）を、総培地容量200μLで96ウェル組織培養プレートに1ウェルあたり5000細胞の密度でプレーティングし、細胞生存率アッセイのものに類似した条件を、以前に記載されているように維持した。それと並んで、本発明者らは、標的細胞の正確な数（E_M）も播種した。エフェクター及び標的細胞を37℃で混合した24時間後、10×溶解剤をE_Mウェルに添加し、37℃及び50%CO₂で45分間インキュベートした。標的細胞の完全な溶解後、プレートを室温で5分間、1,200×gで遠心分離し、各ウェルの50μL上清を別のプレートに移した。アッセイ緩衝液を基質ミックスと混合し、各ウェルに等分した。停止溶液により停止させた後、490nmの光学密度の混合物の吸光度を、マイクロプレートリーダーにより測定した。実験ウェル及び対照ウェルにおける相対的溶解を次のように算出した。

20

【0109】

【数2】

$$\text{相対的細胞傷害性} = \frac{(E_T - M_0) - (T_0 - M_0)}{(E_T - M_0) - (E_S - M_0)}$$

30

【0110】

がん細胞表現型の多色プロファイリング

【0155】各E B V 関連がん細胞を、1ウェルあたり1×10⁵細胞の密度でプレーティングし、24時間後、50：1のエフェクター対標的（E：T）でT細胞と混合し、37℃及び50%CO₂で24時間インキュベートした。がん細胞に対するT細胞の影響を評価するために、細胞を次いで以下の抗体と4℃でインキュベートした：ヒト抗CD45-V500、抗CD3-AF700、抗Ki67-BV421、抗BCL2-FITC及び抗活性カスパーゼ3-BV605。F A C S D i v a ソフトウェアを備えたB D L S R F o r t e s s a（B D B i o s c i e n c e s）を使用して細胞を取得し、F l o w J o ソフトウェア（T r e e S t a r）を使用して取得後解析を行った。

40

【0111】

A d E 1 - L M P p o l y トランスフェクトT細胞表現型の多色プロファイリング

【0156】エフェクターA d E 1 - L M P p o l y トランスフェクトT細胞を新たに解凍し、50：1のエフェクター対標的（E：T）で標的細胞（1×10⁵）に混合し、37℃及び50%CO₂、24時間インキュベートした。表面表現型の評価のために、細胞を次いで、以下の抗体パネルと4℃でインキュベートした：（i）ヒト抗CD45-V50

50

0、抗CD3-AF700、抗CD4-PECy7及び抗CD8-PerCPCy5.5；(ii)ヒト抗CD45-V450、抗CD4-AF700、抗CD8-PerCPCy5.5、抗CD14-eFluor450、抗CD19-eFluor450；抗PD-1-BV786；(iii)MHC-クラスI抗体(クローン W6/32)(自家製、マウスで産生)、LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain(Thermo Fisher Scientific、MA)。細胞内分析のために、細胞をTF固定/透過処理緩衝液(BD Biosciences)で処理し、次いで以下の抗体を含むPerm/Washの存在下で染色した：(i)抗パーフォリン-BV421、抗グランザイムB-AF700及び抗グランザイムK-FITC。FACS Divaソフトウェアを備えたBD LSR Fortessa(BD Biosciences)を使用して細胞を取得し、FlowJoソフトウェア(TreeStar)を使用して取得後解析を行った。

10

【0112】

動物飼育施設

[0157]全ての動物実験は、QIMR Berghofer Medical Research Institute、Animal Ethics Committee(第A0707-606M)によって承認され、科学的目的のための動物のケア及び使用に関する豪州規範に厳密に従って行った。全ての実験動物は混合(129SV/EX C57BL/6)株で維持し、OptiMICE(登録商標)ケージング(センテニアル、コロラド、USA)でQueensland Institute of Medical Research Animal Facilityに25℃、12時間明暗サイクルで収容した。乾燥顆粒食は放射線照射によって滅菌した。マウスは餌及び滅菌水を自由に摂取した。

20

【0113】

同種EBV特異的T細胞の治療有効性のインビボ評価

[0158]7～8週齢の合計12～24匹のメスNOD/SCIDマウス(実験に応じて)をこの試験では使用した。マウスに0.8Gyコバルト60を照射し、4時間後、 5×10^6 細胞の各EBV関連がん細胞を29ゲージ針で皮下注射した。マウスを、腫瘍増殖、体重及び身体スコアについて週3回モニターした。腫瘍が触知可能となったら、マウスを各群に無作為化し、PBS又は 20×10^6 腫瘍HLA適合同種EBV特異的T細胞のそれぞれの投与量で治療した。これらのマウスの腫瘍サイズを、Vernierキャリパーを使用して週3回測定した。腫瘍面積を算出するために、以前に記載されているように[13]、二次元キャリパー測定に基づき以下の式を使用した：腫瘍面積 = $B \times S$ (B = 最大腫瘍測定値、及び S = 最小主要測定値)。

30

【0114】

ヒト化マウスモデルにおける同種EBV特異的T細胞の治療有効性のインビボ評価

[0159]新鮮なヒトCD34+臍帯血細胞を、書面による親の同意を得た後で健康な満期新生児から得、製造者の指示に従って免疫磁気ビーズを使用して濃縮した(CD34+選択キット、Miltenyi Biotec、ベルギッシュグラートバッハ、ドイツ)。7～8週齢のメスNRGマウスに、275cGyを3～4時間空けて2回照射し、その後マウスに、マウス1匹あたり 5×10^4 CD34+細胞(治療に使用されるAdE1-LMPpolyトランスフェクトT細胞に適合するHLA)を29ゲージ針で静脈内注射した。マウスを、体重、身体スコア、及び移植片対宿主病(GVHD)を含む有害反応について週2回モニターした。さらに、尾静脈採血を4、8、10及び12週目に行い、その間、 $100 \mu\text{L}$ ～ $200 \mu\text{L}$ の血液を、ヒト免疫系の再構成をモニターするときに各マウスからEDTAチューブに回収した。ヒトCD34+臍帯血細胞からの再構成を評価するために、ヒト抗CD45-V500、マウス抗CD45-V450、抗CD3-APC、抗CD4-AF700、抗CD8-PerCPCy5.5、抗CD8-PerCPCy5.5、抗CD14-FITC、抗CD19-PECy5、抗CD23-BV786、及び抗CD56-BV650を使用して表面表現型決定を行った。再構成の第12週目

40

50

に、ヒト化NRGマウスに、EBV B95-8を100 μ L PBS中10⁶ EBV粒子の用量で29ゲージ針を使用して非麻酔条件下、静脈内注射した。EBV感染症後13日目に、マウスを、PBS又は20 $\times$ 10⁶腫瘍HLA適合T細胞又はスイッチしたAdE1-LMPpolyトランスフェクトT細胞のそれぞれの投与量で治療した。リンパ性悪性腫瘍を治療するのに使用した各臍帯血細胞のHLA及び対応するT細胞を、表1にリストする。T細胞治療後14日間マウスをモニターし、その後 殺し、その脾臓を腫瘍量について分析した。

【0115】

免疫組織化学的検査

[0160]組織学的検査のために、組織を回収し、洗浄後(PBS、3回)、PBS中4%ホルムアルデヒドで固定し、処理の前に70%エタノールで保存した。組織を次いでパラフィンブロックに包埋し、5 μ m厚切片を染色のために調製した。組織をパラフィンに包埋し、4 μ m切片を、Sakura Tissue-Tek(登録商標)TEC(商標)(Sakura Finetek、東京、日本)を使用してSuperfrostプラススライドにマウントした。QIMR Berghofer Medical Research Institute所内施設の助けを借りて免疫組織化学検査を行った。1LMQ(pH6.0)緩衝液中、2.94gクエン酸三ナトリウムを使用して抗原回収を行い、マイクロ波処理した。組織切片を、0.2%Triton X-100/PBSで5分間、続いて0.05% Triton X-100/PBSで10分間透過処理した。組織切片を3%(vol/vol)H₂O₂で処理し、その後、2%BSA中抗CD3(1:40 Dako M7254)抗体、続いて二次抗体(VEMP7402)Dako EnVision(商標)(Agilent, system ウォキシヨー、WI、USA)を使用して免疫染色し、ヘマトキシリンで対比染色した。スライドをAperio(登録商標)Scanscope(登録商標)XT(Aperio(登録商標)、Vista、USA)で20X又は40X対物を使用してスキャンした。

【0116】

NanoString及び浸潤プロファイリングを使用した遺伝子シグネチャープロファイル

[0161]8週齢の合計6匹のメスNOD/SCIDマウスに0.8 Gyコバルト60を照射し、4時間後、5 $\times$ 10⁶細胞のSNU719を29ゲージ針で皮下注射した。腫瘍サイズが40mm²に達したら、マウスを20 $\times$ 10⁶ TI_001 T細胞で治療した。5日後、腫瘍を回収し、FACSを使用して、T細胞をヒト抗CD45-V500、マウス抗CD45-V450、抗CD3-APC、抗CD4-PE及び抗CD8-PerCP-Cy5.5を使用して生CD8+集団について選別した。上記したようにQiagen RNAeasyキットを使用して、個々のマウスの選別された生CD8+集団からRNAを単離した。カスタム化した326-NanoString Immune遺伝子発現パネルを使用して遺伝子発現解析を行った。1マウス試料あたり50ngの総RNAを最終容量5 μ lで使用し、カスタム遺伝子発現コードセットからの蛍光バーコードでタグ付けした5'レポータープローブと一緒に3'ビオチン化捕捉プローブと混合した。プローブ及び標的転写物を65℃で12~16時間ハイブリダイズした。ハイブリダイズした試料を、推奨された製造者プロトコルを使用してNanoString nCounter調製ステーションでランし、過剰な捕捉及びレポータープローブを除去し、転写物特異的三重複合体をストレプトアビジン被覆カートリッジに固定化した。nCounter Digital Analyzerで試料を最大スキャン解像度でスキャンした。nSolver Analysis Software及びnCounter Advanced Analysisモジュールを使用してデータを処理した。GeNormアルゴリズムによって選択されたハウスキーピング遺伝子の幾何平均を使用して、遺伝子発現解析データを正規化した。

【0117】

統計解析

[0162] GRAPH PAD PRISM v6.0 (GraphPad Software、ラホヤ、CA、USA) を使用して、スチューデント t 検定、又はボンフェローニ事後検定若しくはマン・ホイットニー U 検定による一元配置若しくは二元配置 ANOVA (図の説明に明示) を行い、P 値を図の説明に示されているように算出した。アスタリクスは有意差を示す (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び *** $p < 0.0001$)、ns = 非有意。

【0118】

結果

同種「既製品」EBV 特異的 T 細胞による複数のがんのインビトロ認識

[0163] NPC、胃がん、NK T リンパ腫及び B L C L を含む複数の EBV 関連悪性腫瘍における EBV コード遺伝子 (LMP1、LMP2 及び EBNA1) の発現を評価するために、本発明者らは qRT-PCR を使用し、これらの遺伝子各々の転写レベルを分析した。本発明者らは、全ての EBV 関連悪性腫瘍において、LMP1 と比較した場合、LMP2 及び EBNA1 がより高いレベルで一貫して発現されることを観察した (図 1A)。本発明者らは、LMP1、LMP2 及び / 又は EBNA1 に特異的な同種「既製品」EBV 特異的 T 細胞に対するこれらの EBV 陽性がん細胞の感受性を評価した (図 1B; 表 2)。図 1C ~ D に示されたデータは、胃がん (SNU719)、NPC (C17 及び C661) 及び NK T リンパ腫 (SNKT16) 細胞が同種 HLA 適合 EBV 特異的 T 細胞によって様々なエフェクター対標的比で効率的に認識されたことを示している。さらに、アネキシン V 結合アッセイも、mock 治療対照と比べて標的細胞死を示すアネキシン V 結合能の増加を示した (図 1D ~ E)。

【0119】

[0164] 実験の次のセットでは、本発明者らは、EBV 関連がん細胞の表現型変化に対する同種 EBV 特異的 T 細胞の影響を分析した。本発明者らは、Ki67 染色によって示される、HLA 適合同種 EBV 特異的 T 細胞の存在下で 24 時間後の胃がん、SNU719 細胞及び NPC、C17 細胞の両方の増殖率の有意な低下 ($p < 0.001$) を観察した (図 2A)。さらに、本発明者らは、BCL2 染色での有意な低下 ($p < 0.01$) に加えて、活性カスパーゼ 3 染色の有意な増加 ($p < 0.001$) も観察した。これは、EBV 特異的 T 細胞によって誘導された細胞死の増加を示唆するものである (図 2A)。本発明者らは、同種 EBV 特異的 T 細胞に対する EBV 関連がん細胞の影響も調査した。本発明者らは、EBV 関連がん細胞の存在下で CD8⁺ T 細胞集団の有意な増加を観察した ($p < 0.01$) (図 2B)。このデータと一致して、本発明者らは、EBV 陽性がん細胞に曝露された場合、CD8⁺ T 細胞での Ki67 発現の有意な増加を観察した (図 2B)。さらに、これらの T 細胞は、GzmB、GzmK 及び Perforin 染色の有意に増加した発現によって示される高レベルのエフェクター機能も示した (図 2B)。総じて、これらのデータは、同種 EBV 特異的 T 細胞が、HLA 適合した複数のタイプの EBV 関連がん細胞をインビトロで効率的に認識できることを示している。

【0120】

同種 EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞のインビボでの治療有効性の評価

[0165] 同種 EBV 特異的 T 細胞による複数の EBV 関連がんの効率的な認識をインビトロで確立したことから、本発明者らは次に、これらのエフェクター細胞の治療有効性をインビボで評価した。実験の第 1 のセットでは、免疫不全 NOD-SCID マウスに、照射後、EBV 関連 NPC 腫瘍、C17 及び C666.1 を接種した (皮下)。各動物の腫瘍が 25 mm^2 に達したとき、これらの動物を HLA 適合同種 EBV 特異的 T 細胞で治療した。これらの動物を、同種 HLA 適合 EBV 特異的 T 細胞の単回又は 2 回注入 (各注入 / 動物につき 2×10^7 T 細胞) のどちらかで治療し、腫瘍成長についてモニターした。図 3 に示されたデータは、同種 HLA A2 / B40 拘束性又は HLA A11 / B58 拘束性 LMP2 特異的 T 細胞 (2×10^7 T 細胞) の単回注入は、腫瘍成長を有意に低減するのに十分であり、また、腫瘍担持マウスの全生存も改善したことを示している (図 3A 及び B)。これらの動物を同種 EBV 特異的 T 細胞の 2 回注入で治療した場合、腫瘍量

及び全生存のさらなる改善が観察された（図 3 C 及び D）。

【0121】

【0166】実験の次のセットでは、本発明者らは、治療有効性分析を胃がんにも拡大した。これらの実験では、免疫不全 NOD-SCID マウスに EBV 関連胃がん、SNU719 を接種し、各動物の腫瘍が 25 mm^2 に達したとき、HLA A24 拘束性同種 LMP2 特異的 T 細胞で治療した。NPC 腫瘍モデルで得られたデータと一致して、これらの動物を HLA 適合同種 LMP2 特異的 T 細胞で治療した場合、腫瘍量の有意な低下及び全生存の改善が観察された（図 4 A）。興味深いことに、本発明者らは、1 回目の T 細胞注入後、腫瘍成長が有意に低減したのに対し、2 回目の T 細胞注入後、この治療利益はあまり顕著ではないことに気づいた。この現象について考えられる説明として、臨床転帰に悪影響をもたらす、免疫抑制的腫瘍微小環境の存在 [16、17] 又は免疫逃避をもたらす HLA 喪失 [18] に起因することが考えられる。故に、本発明者らは、EBV 関連腫瘍が、CD8+ T 細胞に対する EBV エピトープの提示を妨げ得る HLA 発現の変更又は EBV 遺伝子発現の調節によって、同種 EBV 特異的 T 細胞の治療的影響を無効にするという仮説を立てた。この仮説を調査するために、本発明者らは、胃がん（SNU719）を担持する 2 つのマウス群を確立し、同じ HLA 適合同種 EBV 特異的 T 細胞（HLA A24 拘束性 LMP2 特異的 T 細胞）の 3 回連続投与を使用して、1 つのマウス群（G1）を治療した。同時に、本発明者らは、別の群（G2）も、同じ HLA-A24 拘束性同種 EBV 特異的 T 細胞の 2 回連続投与により、ただし、3 回目の投与を異なる T 細胞株（HLA B7 拘束性、EBNA1 特異的）にスイッチングして治療した（図 4 B）。本発明者らは、T 細胞の 3 回目の投与量の注入後、G1 と比べて、G2 群が腫瘍成長の有意な低下及び全生存の改善を示すことを観察した（図 4 B）。興味深いことに、G2 群の動物と比較した場合、G1 群は、第 3 回注入後の腫瘍増殖に対する最小の影響、及びはるかに高い腫瘍量を示した（図 4 B）。総じて、これらのデータは、同種 HLA 適合 T 細胞が腫瘍成長を効率的にブロックし、EBV 関連上皮腫瘍を担持するマウスの全生存を改善できることを明白に示している。

【0122】

同種 EBV 特異的 T 細胞養子免疫療法は EBV 関連リンパ性悪性腫瘍の成長を有効に阻害する

【0167】以前に言及されているように、EBV は、PTLD などの免疫低下患者におけるリンパ増殖性疾患（LPD）、AIDS 関連リンパ腫、並びに他の悪性リンパ腫、すなわちホジキンリンパ腫及びバーキットリンパ腫を含む複数の疾患に病因的に関与している [19-22]。同種 EBV 特異的 T 細胞の潜在的な治療有効性をさらに立証するために、本発明者らは、機能的に再構成されたヒト免疫系を有するヒト化マウスモデルを利用した。ヒト免疫系の再構成は、NOD-Rag1^{null} IL2rg^{null}（NRG と呼ぶ）マウスでの臍帯血由来 CD34+ 幹細胞の静脈内投与を使用して確立し、これらの動物を、図 5 A 及び B に概説されているように定期的にモニターした。12 週間後、これらのマウスを EBV（QIMR-WIL 株）に感染させ、EBV-LPD の発症後、HLA 適合同種 EBV 特異的 T 細胞で養子治療した。実験の 2 つの独立したセットを行った。第 1 のセットでは、EBV-LPD 担持 NRG マウスを 3 群に分け（各群に 6 匹）、mock 治療するか、又は T 細胞療法を注入した（G1 及び G2 と呼ぶ）。G1 群の動物は、HLA A2 及び A24 拘束性同種 LMP1 及び LMP2 特異的 T 細胞（ 2×10^7 T 細胞/回）の 3 回投与で治療し、一方、G2 群の動物には、HLA A2 及び A24 拘束性同種 LMP1 及び LMP2 特異的 T 細胞（ 2×10^7 T 細胞/回）の 2 回投与、並びに HLA A2、B40 及び Cw3 拘束性 LMP1、LMP2 及び EBNA1 特異的 T 細胞（ 2×10^7 T 細胞）の単回投与を与えた。図 5 C ~ D に示されたデータは、治療マウスと比べた場合、G1 群の動物が腫瘍量の有意な低下を示したことを示している。しかし、2 つの異なる同種 EBV 特異的 T 細胞の併用で治療した G2 群の動物は、mock 治療動物及び G1 動物と比較した場合、腫瘍量の有意な低下を示した。これらの観察を独立実験の第 2 セットでさらに確認し、同種 EBV 特異的 T 細胞で治療した動物も有意に低い腫瘍量を

示した（図 5 E～F）。これらのデータは、同種 H L A 適合 E B V 特異的 T 細胞が、腫瘍成長を効率的にブロックし、マウス E B V 関連リンパ性悪性腫瘍を担持するマウスの全生存を改善できることをさらに示している。

【 0 1 2 3 】

P D 1 / P D - L 1 軸のブロックは同種 E B V 特異的 T 細胞の治療有効性を増大する

[0168] 養子導入同種 E B V 特異的 T 細胞及び腫瘍細胞のインビボでの相互作用をさらに描くために、本発明者らは S N U 7 1 9 腫瘍から浸潤 T 細胞を単離し、N a n o S t r i n g 技術を使用して転写シグネチャーを分析した。さらに、本発明者らは、特異抗体を使用していくつかのチェックポイント分子の発現も確認した。図 6 A に示されたデータは、T 細胞療法産物及び精製腫瘍浸潤ヒト T 細胞における遺伝子発現のヒートマップを示す。この分析は、エフェクター細胞機能及びエフェクター機能と関連する転写因子に關与するいくつかの細胞遺伝子が、腫瘍浸潤ヒトリンパ球において下方制御されることを示した。対照的に、いくつかのチェックポイント分子の発現は、これらの T 細胞において上方制御された。これらのチェックポイント分子の発現を確認するために、本発明者らは、腫瘍浸潤ヒトリンパ球を特異抗体で染色し、腫瘍担持マウスに投与した T 細胞療法とそれらの発現を比較した。この分析は N a n o S t r i n g 発現を確認し、腫瘍浸潤ヒトリンパ球が高レベルの P D - 1、L A G 3 及び T I M 3 を発現することを示した（図 6 B）。

10

【 0 1 2 4 】

[0169] これらの観察に基づき、本発明者らは、チェックポイント阻害剤及び T 細胞療法の併用が、E B V 関連腫瘍に対するより良い治療利益を提供し得るという仮説を立てた。上方制御された P D 1 / P D - L 1 軸が、適応免疫耐性を獲得する上でがん細胞に影響を与えるかどうか、本発明者らの仮説をテストするために、本発明者らは、抗 P D 1 抗体（ニボルマブ）を同種 E B V 特異的 T 細胞と組み合わせて使用して、P D 1 をインビボでブロックした。具体的には、ニボルマブを T 細胞注入の 2 4 時間後に投与し、本発明者らは、併用群が、単独療法及び m o c k 治療群と比較して、S N U 7 1 9 胃がん成長の有意な低下を示した（ $p < 0.0001$ ）ことを観察した（図 6 C）。さらに、本発明者らは、単独療法群と比較した場合、併用群で観察された腫瘍重量の低下によって示される、腫瘍サイズの有意な低下を観察した（図 6 D）。重要なことには、本発明者らは、単独療法又は m o c k 治療群と比較して、併用群が療法後の生存を有意に改善する（ $p < 0.0001$ ）ことを観察した（図 6 E）。特に、併用群は、T 細胞のみの治療群と比較して約 2 倍（ $p < 0.01$ ）良好な生存を示した（図 6 E）。総じて、これらのデータは、P D 1 / P D - L 1 シグナル伝達経路の阻害が同種 E B V 特異的 C D 8 + T 細胞の増大をインビボで可能にすることから、該経路はがん細胞を排除する上で同種 C D 8 + T 細胞の運命をネガティブに決定づけることを強調するものである。

20

30

【 0 1 2 5 】

40

50

【表 1】

表 1

試験での治療に使用した EBV 関連がん細胞及び同種 EBV 特異的 T 細胞のリスト

がん細胞又は臍帯血	がん細胞又は臍帯血の HLA タイピング	使用した T 細胞
SNU719	A*24:02, 24:02; B*07:02,52:01; C*07:02, 12:02	TI_001 及び TI_004
C17	A*02:01, 26:01; B*44:02, 51:01; C*05:01, 14:02	TI_002
C666.1	B*58:02; C*03:04	TI_003
SNKT16	A*02:01, 24:02; B*48:01 ,52:01; C*08:03, 12:02	TI_001 及び TI_002
CB33A	A*02:01, 03:01; B*40:01, 44:02; C*03:04, 05:01	TI_005 及び TI_002
CBO3	A*02:01, 03:01; B*44:02, 58:01; C*05:01, 07:18	TI_001 及び TI_003

【 0 1 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2

試験で使用した各同種 EBV 特異的 T 細胞の HLA 及び抗原認識

同種 EBV 特異的 T 細胞バッチコード	T 細胞ドナーの HLA タイピング	EBV 抗原特異性(HLA 拘束性)
TI_001	A*11:01, 24:02; B*40:01, 40:01; C*03:04, 03:04	LMP2 (A*11:01,24:02) 及び EBNA1 (C*03:04)
TI_002	A*02:01, 02:01; B*40:01, 40:01; C*03:04, 03:04	LMP1 (A*02:01); LMP2 (A*02:01, B*40:01); EBNA1 (*03:04)
TI_003	A*11:01, 33:03; B*40:01, 58:01; C*03:02, 03:04	LMP1(58:01); LMP2 (B*40:01,58:01)
TI_004	A*03:01, 03:01; B*07:02, 07:02; C*07:01, 07:02	EBNA1(B*07:02)
TI_005	A*02:01, 23:01; B*41:02, 44:02; C*05:01, 17:01	LMP1 (A*02:01); LMP2 (A*02:01, 23:01)

10

20

30

【0127】

実施例 2

MEK1 / 2 及び BET 阻害と EBV 特異的 T 細胞との二重併用の有効性

【0170】腫瘍増殖及び維持に不可欠な分子経路又は生化学経路を阻害する標的療法は、腫瘍の免疫構成 (immune contexture) に影響を与える上で極めて重要であることを証明することができた。最近、複数の研究が、標的療法は特定の免疫細胞集団、すなわち細胞傷害性 T リンパ球及び Treg の機能の減弱など、免疫応答も調節し得ることを示した [23]。標的療法は、樹状細胞による抗原腫瘍提示を増大し、免疫媒介性破壊への腫瘍細胞のより良好な感作を可能にすることと並んで、T 細胞プライミングに

40

【0128】

【0171】特に興味深いのは、IL-8 及び VEGF の産生を上方制御し、今度は T 細胞機能及び動員に対する抑制効果を誘導することが知られている、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) 経路である [24]。最近の研究は、MEK1 / 2 阻害が、ナイーブ (ただし抗原経験していない) エフェクター T 細胞活性化を選択的にブロックすることを示した [25]。さらに、独立研究は、BRA F 阻害剤が、腫瘍抗原発現及

50

び提示の上方制御を介して免疫感作能力を有すること；MAPK上方制御がメラニン細胞分化抗原（MAD）の上方制御をもたらすメラノーマの場合の例を示した〔26、27〕。マウスモデルに基づく最近の試験は、三重併用が、同系BRA F V 6 0 0 E 駆動メラノーママウスモデルにおいて腫瘍へのT細胞浸潤を増加させ、インビボでの細胞傷害性を改善し、完全な腫瘍退縮をもたらしたことから、トラメチニブ（MEK阻害剤）と組み合わせたpme l - 1 A C T 及びBRA F 阻害剤ダブラフェニブの有効性の改善を示した〔28〕。さらに、Kangらは、トラメチニブが、ヒトHNSCC 細胞株におけるMHCクラスI発現をSTT3依存的に増強し、より良好なCD8+ T細胞浸潤を可能にすることを示した〔29〕。

【0129】

〔0172〕独立して、小分子エピジェネティック修飾因子を使用したDNAのエピジェネティック修飾も、免疫遺伝子シグネチャーを変更し、影響抗原プロセッシング、提示及び免疫回避に影響を与えることができる〔30、31〕。近年、Kagoyaらは、プロドメイン及び余剰末端（bromodomain and extra-terminal）（BET）モチーフタンパク質阻害剤、JQ1が、CD8+ T細胞の幹細胞様メモリー及びセントラルメモリーの機能的特性を維持することを示した〔32〕。BATFはエフェクターメモリー表現型へのT細胞の分化プロセスを指示することから、BRD4（BETタンパク質）は機能的に、CD8+ T細胞におけるBATF（転写因子）発現を直接制御する。そのため、JQ1治療CD8+ T細胞は、メラノーマに対するマウス適応T細胞モデルにおいて抗腫瘍効果の増強を示した〔32〕。さらに、JQ1は、複数のがん

【0130】

結果

MEK1／2阻害剤とEBV特異的T細胞との併用

〔0173〕本発明者らは、個別治療として、又はエフェクター対標的比としてEBV特異的T細胞と組み合わせて（25：1）、それぞれ0.5 μM及び1.0 μMの濃度のMEK1／2阻害剤（AZD6244（又はセルメタニブ（selumetinib））及びトレマチニブ（trametinib））でSNU719細胞（胃がん細胞）を治療した。本発明者らは、SNU719の細胞生存率が、個別治療と比べて、MEK1／2阻害剤及びEBV特異的T細胞の併用の存在下で有意に低下することを観察した（図7A）。同様に、本発明者らは、個別治療群と比較して、二重併用群がSNU719細胞の間にアネキシンVの有意に高い結合をもたらすことを観察した（図7B）。さらに、Xcelligenceを使用して、本発明者らは、MEK1／2阻害剤又はEBV特異的T細胞のどちらかの個別治療と比較して、二重併用がSNU719細胞の間に速い細胞死をもたらすことを観察した（図7C）。総じて、これらの結果は、インビトロでのMEK1／2阻害とEBV特異的T細胞との二重併用の有効性を強調するものである。

【0131】

JQ1阻害剤とEBV特異的T細胞との併用

〔0174〕本発明者らは、個別治療として、又はエフェクター対標的比としてEBV特異的T細胞と組み合わせて（25：1）、5.0 μMの濃度のJQ1阻害剤でSNU719細胞を治療した。本発明者らは、SNU719の細胞生存率が、個別治療と比べて、JQ1阻害剤及びEBV特異的T細胞の併用の存在下で有意に低下することを観察した（図8A）。同様に、本発明者らは、個別治療群と比較して、二重併用群がSNU719細胞の間にアネキシンVの有意に高い結合をもたらすことを観察した（図8B）。総じて、これらの結果は、インビトロでのBET阻害とEBV特異的T細胞との二重併用の有効性を強調するものである。

【0132】

実施例 3

[0175] E B V 関連固形がんにおける M A P K 経路の上方制御を決定するために、本発明者らはまず、鼻咽頭及び胃がん細胞株における M E K 1 / 2 阻害剤 (A Z D 6 2 4 4 又はセルメタニブ及びトレマチニブ) の I C ₅₀ 値を同定した (0 . 1 μ M ~ 5 μ M にわたる薬物濃度での) 。阻害剤は両方とも、M T S アッセイを使用した細胞生存率の約 5 0 % の低下 (I C ₅₀) を約 2 . 5 μ M の濃度で達成したことから、本発明者らは、N P C 4 3 (E B V -) 細胞株と比較して E B V 関連細胞株が、M A P K 経路への高い依存性を均一に示すことを観察した (図 9) 。次の実験セットでは、本発明者らは、E B V 関連固形がんに対する、同種 E B V 特異的 T 細胞と併用した M E K 1 / 2 阻害の影響を決定しようとした。そのため、本発明者らは、M E K 1 / 2 阻害剤 (セルメタニブ及びトレマチニブの両方) 及び E B V 特異的 T 細胞で個別に又は併用して各 E B V 関連細胞株 (胃がん及び鼻咽頭がん細胞株の両方) を治療した。本発明者らは、インビトロでの治療に関して、各 H L A 適合同種 E B V 特異的 T 細胞の 2 5 : 1 のエフェクター対標的比と一緒に、各 M E K 1 / 2 阻害剤 (1 μ M) のサブ I C ₅₀ 値 (又は I C ₂₅ 値) を選択している。本発明者らは、個別治療と比べて M E K 1 / 2 阻害剤及び E B V 特異的 T 細胞の併用の存在下、各鼻咽頭 (C 1 7 及び C 6 6 6 . 1) 及び胃がん細胞 (S N U 7 1 9 及び Y C C L E 1) の細胞生存率が有意に低下することを観察した (図 1 0) 。

10

[0 1 3 3]

[0176] さらに、E B V 関連がん細胞の細胞増殖に対する併用の影響を確認するために、本発明者らは、X c e l l e g e n c e を使用して個別及び二重併用で S N U 7 1 9 及び C 6 6 6 . 1 細胞をチャレンジした。本発明者らは、M E K 1 / 2 阻害剤 (セルメタニブ) 又は H L A 適合 E B V 特異的 T 細胞どちらかの個別治療と比較して、二重併用が S N U 7 1 9 及び C 6 6 6 . 1 細胞のより速い細胞死をもたらすことを観察した (図 1 1 A) 。本発明者らは、インビトロでの個別及び二重治療の 1 6 時間後、フローサイトメトリーを使用して S N U 7 1 9 及び C 6 6 6 . 1 細胞の表現型特徴付けも行った。本発明者らは、個別治療と比較して二重治療が、細胞増殖の有意な喪失をもたらした (K i 6 7 + 染色によって示された) 、活性カスパーゼ 3 染色によって示される有意な細胞死を引き起こすことを観察した (図 1 1 B ~ C) 。

20

[0 1 3 4]

[0177] 次に、本発明者らは併用の特異性を決定しようとし、そのため本発明者らは、個別及び併用での M E K 1 / 2 阻害剤 (セルメタニブ及びトレマチニブの両方) と一緒に H L A 不適合同種 T 細胞で、S N U 7 1 9 及び C 6 6 6 . 1 細胞をチャレンジした。本発明者らは、H L A 不適合同種 T 細胞が、個別では E B V 関連がん細胞の細胞生存率に有意な影響を与えないことを観察した (図 1 2 A ~ B) 。興味深いことに、本発明者らは、D M S O 治療 (対照) ががん細胞と比較して、M E K 1 / 2 阻害剤及び H L A 不一致同種 T 細胞の二重併用の存在下でがん細胞の細胞生存率の有意な低下を観察した (図 1 2 A ~ B) 。しかし、二重併用の存在下で観察された細胞生存率の低下は、M E K 1 / 2 阻害剤単独の治療と比較して細胞生存率の有意な低下を示さなかった (図 1 2 A ~ B) 。このデータは、二重併用の存在下で観察された細胞生存率の低下が、M A P K 経路の阻害のみにより誘導され、H L A 不適合 T 細胞の追加は併用の有効性を増強しなかったことを強調するものである。この概念をさらに確認するために、本発明者らは、各 H L A 適合及び H L A 不適合 T 細胞単独及び M E K 1 / 2 阻害剤 (セルメタニブ及びトレマチニブの両方) との併用によってもたらされる、E B V 関連がん細胞 (S N U 7 1 9 及び C 6 6 6 . 1) の細胞生存率の低下を比較した。本発明者らは、単独では H L A 適合 T 細胞が、H L A 不適合 T 細胞と比較して有意な細胞死を誘導し、セルメタニブ又はトレマチニブどちらかの存在下では、この効果が有意に増幅されることを観察した (図 1 2 C) 。

30

40

[0 1 3 5]

[0178] 実験の次のセットでは、本発明者らは、がん細胞内因性経路に対する二重併用の効果を調査し、M E K 1 / 2 阻害と T 細胞治療との効果的併用の理論的根拠を説明しようとした。本発明者らは、M E K 1 / 2 阻害剤 (セルメタニブ) の存在が、治療の 1 6 時

50

間後にがん細胞における p E R K 1 / 2 の有意な低下をもたらすことを観察した (図 1 3 A)。その結果、本発明者らは、セルマチニブ単独及び各 H L A 適合 T 細胞と併用したセルマチニブの存在下で、M H C クラス I 発現の上方制御を観察した (図 1 3 B)。これらのがん細胞で M H C クラス I 発現が上方制御される機構を確認するために、本発明者らは、p S T A T 3 及び M Y C 発現に対する M E K 1 / 2 阻害の影響を調査した。本発明者らは、M H C クラス I 発現の駆動と関連することが示されている [29、35、36] サルマチニブ (s a l u m a t i n i b) の存在が、p S T A T 3 発現の上方制御をもたらすことを観察した (図 1 3 C)。さらに、本発明者らは、M E K 1 / 2 阻害が M Y C 発現の下方制御をもたらすことも観察した (図 1 3 D)。M Y C 発現の存在は、E B V 関連がんでの M H C クラス I 発現を下方制御することが示されており、それ故に M Y C 発現の間接的な阻害は、おそらくこれらのがんにおける M H C クラス I を助ける [37]。故に、M E K 1 / 2 経路の阻害は、S T A T 3 経路の上方制御及び M Y C の下方制御を介して M H C クラス I 発現の上方制御をもたらし、H L A 適合同種 T 細胞の存在下でより良好な治療適合性を可能にする。総じて、これらの結果は、インビトロでの M E K 1 / 2 阻害と E B V 特異的 T 細胞の二重併用の有効性を強調するものである。

10

20

30

40

50

【0136】

[0179]同様に、本発明者らは、鼻咽頭及び胃がん細胞株における J Q 1 阻害剤の I C₅₀ 値をまず決定して (0.5 μ M ~ 10 μ M にわたる薬物濃度での)、該阻害剤を使用して M Y C 依存性がん内因性経路を標的にした。本発明者らは、E B V 関連細胞株の間では N P C 4 3 (E B V⁺) 細胞株と比較して、J Q 1 阻害剤が細胞生存率の約 50% の低下 (I C₅₀) を約 2.5 μ M の濃度で示すことを観察した (図 1 4)。同種 E B V 特異的 T 細胞と併用した J Q 1 阻害剤の、E B V 関連がん細胞に対する影響を特徴付けるために、本発明者らは、各 H L A 適合同種 E B V 特異的 T 細胞の 25 : 1 のエフェクター対標的比と一緒に、I C₂₅ 値 J Q 1 (2.5 μ M) をインビトロで使用した。本発明者らは、各胃がん細胞 (S N U 7 1 9 及び Y C C L E 1) 及び鼻咽頭 (C 1 7 及び C 6 6 6 . 1) の細胞生存率が、個別治療と比べて J Q 1 阻害剤及び E B V 特異的 T 細胞の併用の存在下で有意に低下することを観察した (図 1 5 A)。さらに、X c e l l e g e n c e を使用して、本発明者らは、個別治療と比較して二重併用が、S N U 7 1 9 及び C 6 6 6 . 1 細胞のより速い細胞死をもたらすことを観察した (図 1 5 B)。本発明者らは、インビトロでの個別及び二重治療の 16 時間後、フローサイトメトリーを使用して S N U 7 1 9 及び C 6 6 6 . 1 細胞の表現型特徴付けも行った。本発明者らは、個別治療と比較して二重治療が、細胞増殖の有意な喪失をもたらした (K i 6 7⁺ 染色によって示された)、活性カスパーゼ 3 染色によって示される有意な細胞死を引き起こすことを観察した (図 1 5 B ~ C)。

【0137】

[0180]次に、本発明者らは併用の特異性を決定しようとし、そのため本発明者らは、個別及び併用での J Q 1 阻害剤と一緒に H L A 不一致同種 T 細胞で S N U 7 1 9 及び C 6 6 6 . 1 細胞をチャレンジした。M E K 1 / 2 阻害剤を用いた本発明者らの以前のデータと一致して、本発明者らは、D M S O 治療 (対照) ががん細胞と比較して、J Q 1 阻害剤及び H L A 不一致同種 T 細胞の併用の存在下でがん細胞の細胞生存率の有意な低下を観察した (図 1 6 A)。しかし、二重併用の存在下で観察された細胞生存率の低下は、J Q 1 阻害剤単独の治療と比較して細胞生存率の有意な低下を示さなかった (図 1 6 A)。本発明者らは、単独では H L A 適合 T 細胞が、H L A 不適合 T 細胞と比較して有意な細胞死を誘導し、J Q 1 の存在下では、この効果が有意に増幅されることを観察した (図 1 6 B)。実験の次のセットでは、本発明者らは、J Q 1 阻害と T 細胞治療との効果的併用の理論的根拠を説明しようとした。本発明者らは、J Q 1 阻害剤の存在が、治療の 16 時間後になん細胞における M Y C 発現の有意な低下をもたらすことを観察した (図 1 7 A)。その結果、これは p E R K 1 / 2、p A K T 及び p S T A T 3 発現の下方制御を引き起こした (図 1 7 B ~ C)。さらに、本発明者らは、上記に論じられているように [37]、M Y C の下方制御がこれらのがんにおける M H C クラス I の増強をもたらすことも観察した (図

18A)。特に、本発明者らは、PD-L1及びCD47発現などの免疫制御分子の下方制御も観察した(図18B～C)。したがって、MYC発現の喪失は、免疫回避分子を下方制御するMHCクラスI発現を増強して細胞傷害性T細胞の有効性を増強し、併用を極めて有効にする。総じて、これらの結果は、インビトロでのJQ1阻害とEBV特異的T細胞との二重併用の有効性強調するものである。

【0138】

【0181】実験の次のセットでは、本発明者らは、インビボでHLA適合同種EBV特異的T細胞と併用した上記の小分子の効果を調査しようとした。本発明者らは、セルマチニブ及びHLA適合T細胞産物(TIG-001)の併用を使用して、メスNRGマウスでのSNU719由来異種移植片腫瘍モデルを治療した。異種移植片が約25mm²のサイズに達したら、本発明者らは、14日間経口投与した、個別及び1日投与量セルマチニブ(12.5mg/Kg)と併用でのTIG-001の2回注入(1注入あたり2×10⁷細胞)によりマウスを治療した。本発明者らは、二重併用が、個別治療と比較して腫瘍進行の有意な低下をもたらすことを観察した(図19A)。本発明者らは、対照が150mm²の倫理的サイズ限界に達したとき、各群から3匹のマウスを殺し、比較上、本発明者らは、二重併用群の腫瘍のサイズが個別治療と比べて有意により小さいことを観察した(図19B～C)。次に、本発明者らは、フローサイトメトリーを使用してこれらの腫瘍におけるヒト由来リンパ球の浸潤の表現型を決定した。本発明者らは、個別治療T細胞群と比較して、併用群が有意に多い数の生CD45+CD3+CD8+細胞を示すことを観察した(図19D)。本発明者らは、療法後これらの長期モニタリングも行い(各群からのマウスを、150mm²の倫理的サイズ限界まで腫瘍進行をモニターした)、個別治療群と比較して、二重併用群がより良好な生存率を示すことを観察した(図19E)。

【0139】

【0182】本明細書における任意の参考文献の引用は、そのような参考文献が本出願の「先行技術」として利用可能であることの承認として解釈されるべきではない。

【0140】

【0183】本明細書全体を通して、目的は、本発明を任意の1つの実施形態又は特徴の特定のコレクションに限定することなく、本発明の好ましい実施形態を記載することであった。当業者は、それ故に、本発明の範囲から逸脱することなく例示された本開示に照らして、様々な修正及び変更が特定の実施形態でなされ得ることを理解するであろう。全てのそのような修正及び変更は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【0141】

参考文献

- [1] C.S. Azimi, Q. Tang, K.T. Roybal, J.A. Bluestone, NextGen cell-based immunotherapies in cancer and other immune disorders, *Curr Opin Immunol*, 59(2019) 79-87.
- [2] M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, T.E. Shelton, J. Even, S.A. Rosenberg, Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients, *J Immunother*, 26 (2003) 332-342.
- [3] S.K. Parida, T. Poiret, L. Zhenjiang, Q. Meng, J. Heyckendorf, C. Lange, A.S. Ambati, M.V. Rao, D. Valentini, G. Ferrara, E. Rangelova, E. Dodo, A. Zumla, M. Maeurer, T-Cell Therapy: Options for Infectious Diseases, *Clin Infect Dis*, 61 Suppl 3 (2015) S217-224.
- [4] M. Hale, T. Mesojednik, G.S. Romano Ibarra, J. Sahni, A. Bernard, K. Sommer, A.M. Scharenberg, D.J. Rawlings, T.A. Wagner, Engineering HIV-Resistant, Anti-HIV Chimeric Antigen Receptor T Cells, *Mol Ther*, 25 (2017) 570-579.
- [5] C. Smith, G. Okern, S. Rehan, L. Beagley, S.K. Lee, T. Aarvak, K.W. Schjetne, R. Khanna, Ex vivo expansion of human T cells for adoptive imm

unotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement, *ClinTransl Immunology*, 4 (2015) e31.

[6] O.M. Pello, A.J. Innes, A. Bradshaw, S.A. Finn, S. Uddin, E. Bray, E.O. Iavarria, J.F. Apperley, J. Pavlu, BKV-specific T cells in the treatment of severe refractory haemorrhagic cystitis after HLA-haploidentical haematopoietic cell transplantation, *Eur J Haematol*, 98 (2017) 632-634.

[7] C. Smith, R. Khanna, Adoptive cellular immunotherapy for virus-associated cancers: a new paradigm in personalized medicine, *Immunol Cell Biol*, 95 (2017) 364-371.

[8] R. Khanna, S.R. Burrows, M.G. Kurilla, C.A. Jacob, I.S. Misko, T.B. Sculley, E. Kieff, D.J. Moss, Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development, *J Exp Med*, 176 (1992) 169-176.

[9] R.J. Murray, M.G. Kurilla, J.M. Brooks, W.A. Thomas, M. Rowe, E. Kieff, A.B. Rickinson, Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies, *J Exp Med*, 176 (1992) 157-168.

[10] M.P. Thompson, R. Kurzrock, Epstein-Barr virus and cancer, *Clin Cancer Res*, 10 (2004) 803-821.

[11] C. Smith, J. Tsang, L. Beagley, D. Chua, V. Lee, V. Li, D.J. Moss, W. Coman, K.H. Chan, J. Nicholls, D. Kwong, R. Khanna, Effective treatment of metastatic forms of Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma with a novel adenovirus-based adoptive immunotherapy, *Cancer Res*, 72 (2012) 1116-1125.

[12] C. Smith, L. Cooper, M. Burgess, M. Rist, N. Webb, E. Lambley, J. Tellingam, P. Marlton, J.F. Seymour, M. Gandhi, R. Khanna, Functional reversion of antigen-specific CD8⁺ T cells from patients with Hodgkin lymphoma following *in vitro* stimulation with recombinant polyepitope, *J Immunol*, 177 (2006) 4897-4906.

[13] M. Kalimutho, D. Sinha, J. Jeffery, K. Nones, S. Srihari, W.C. Fernando, P.H. Duijf, C. Vennin, P. Raninga, D. Nanayakkara, D. Mittal, J.M. Sahunus, S.R. Lakhani, J.A. Lopez, K.J. Spring, P. Timpson, B. Gabrielli, N. Waddell, K.K. Khanna, CEP55 is a determinant of cell fate during perturbed mitosis in breast cancer, *EMBO Mol Med*, (2018).

[14] S.M. Smith, M.B. Wunder, D.A. Norris, Y.G. Shellman, A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time, *PLoS One*, 6 (2011) e26908.

[15] M. Kalimutho, D. Sinha, J. Jeffery, K. Nones, S. Srihari, W.C. Fernando, P.H. Duijf, C. Vennin, P. Raninga, D. Nanayakkara, D. Mittal, J.M. Sahunus, S.R. Lakhani, J.A. Lopez, K.J. Spring, P. Timpson, B. Gabrielli, N. Waddell, K.K. Khanna, CEP55 is a determinant of cell fate during perturbed mitosis in breast cancer, *EMBO Mol Med*, 10 (2018).

[16] J. Leignadier, S. Favre, S.A. Luther, I.F. Luescher, CD8 engineered cytotoxic T cells reprogram melanoma tumor environment, *Oncoimmunology*, 5 (2016) e1086861.

[17] K.G. Anderson, I.M. Stromnes, P.D. Greenberg, Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies, *Cancer Cell*, 31 (2017) 311-325.

[18] J.A. Rodriguez, HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation, *Oncol Lett*,

10

20

30

40

50

14 (2017)4415-4427.

- [19] K.G. Lucas, Q. Sun, R.L. Burton, A. Tilden, W.P. Vaughan, M. Carabasi, D. Salzman, A. Ship, A phase I-II trial to examine the toxicity of CMV- and EBV-specific cytotoxic T lymphocytes when used for prophylaxis against EBV and CMV disease in recipients of CD34-selected/T cell-depleted stem cell transplants, *Hum Gene Ther*, 11 (2000) 1453-1463.
- [20] P. Comoli, S. Basso, M. Zecca, D. Pagliara, F. Baldanti, M.E. Bernardo, W. Barberi, A. Moretta, M. Labirio, M. Paulli, M. Furione, R. Maccario, F. Locatelli, Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation, *Am J Transplant*, 7 (2007) 1648-1655. 10
- [21] R. Khanna, S. Bell, M. Sherrett, A. Galbraith, S.R. Burrows, L. Rafter, B. Clarke, R. Slaughter, M.C. Falk, J. Douglas, T. Williams, D.J. Moss, Activation and adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, pp. 10391-10396.
- [22] B. Savoldo, J.A. Goss, M.M. Hammer, L. Zhang, T. Lopez, A.P. Gee, Y.F. Lin, R.E. Quiros-Tejeira, P. Reinke, S. Schubert, S. Gottschalk, M.J. Finnegold, M.K. Brenner, C.M. Rooney, H.E. Heslop, Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs), *Blood*, 108 (2006) 2942-2949. 20
- [23] M. Vanneman, G. Dranoff, Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment, *Nat Rev Cancer*, 12 (2012) 237-251.
- [24] C. Liu, W. Peng, C. Xu, Y. Lou, M. Zhang, J.A. Wargo, J.Q. Chen, H.S. Li, S.S. Watowich, Y. Yang, D. Tompkins, Frederick, Z.A. Cooper, R.M. Mbofung, M. Whittington, K.T. Flaherty, S.E. Woodman, M.A. Davies, L.G. Ravani, W.W. Overwijk, G. Lizee, P. Hwu, BRAF inhibition increases tumor infiltration by T cells and enhances the antitumor activity of adoptive immunotherapy in mice, *Clin Cancer Res*, 19 (2013) 393-403.
- [25] P.J.R. Ebert, J. Cheung, Y. Yang, E. McNamara, R. Hong, M. Moskalenko, S.E. Gould, H. Maecker, B.A. Irving, J.M. Kim, M. Belvin, I. Mellman, MAPK Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade, *Immunity*, 44 (2016) 609-621. 30
- [26] A. Boni, A.P. Cogdill, P. Dang, D. Udayakumar, C.N. Njauw, C.M. Sloss, C.R. Ferrone, K.T. Flaherty, D.P. Lawrence, D.E. Fisher, H. Tsao, J.A. Wargo, Selective BRAF V600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function, *Cancer Res*, 70 (2010) 5213-5219.
- [27] D.T. Frederick, A. Piris, A.P. Cogdill, Z.A. Cooper, C. Lezcano, C.R. Ferrone, D. Mitra, A. Boni, L.P. Newton, C. Liu, W. Peng, R.J. Sullivan, D.P. Lawrence, F.S. Hodi, W.W. Overwijk, G. Lizee, G.F. Murphy, P. Hwu, K.T. Flaherty, D.E. Fisher, J.A. Wargo, BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma, *Clin Cancer Res*, 19 (2013) 1225-1231. 40
- [28] S. Hu-Lieskovan, S. Mok, B. Hommet Moreno, J. Tsoi, L. Robert, L. Goedert, E.M. Pinheiro, R.C. Koya, T.G. Graeber, B. Comin-Anduix, A. Ribas, Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) melanoma, *Sci Transl Med*, 7 (2015) 279ra241.
- [29] S.H. Kang, B. Keam, Y.O. Ahn, H.R. Park, M. Kim, T.M. Kim, D.W. Ki 50

m, D.S. Heo, Inhibition of MEK with trametinib enhances the efficacy of anti-PD-L1 inhibitor by regulating anti-tumor immunity in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncoimmunology*, 8 (2019) e1515057.

[30] A.R. Karpf, D.A. Jones, Reactivating the expression of methylated silenced genes in human cancer, *Oncogene*, 21 (2002) 5496-5503.

[31] H.J. Kim, S.C. Bae, Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs, *Am J Transl Res*, 3 (2011) 166-179.

[32] Y. Kagoya, M. Nakatsugawa, Y. Yamashita, T. Ochi, T. Guo, M. Anczowski, K. Saso, M.O. Butler, C.H. Arrowsmith, N. Hirano, BET bromodomain inhibition enhances T cell persistence and function in adoptive immunotherapy models, *J Clin Invest*, 126 (2016) 3479-3494.

[33] J.E. Delmore, G.C. Issa, M.E. Lemieux, P.B. Rahl, J. Shi, H.M. Jacobs, E. Kastitis, T. Gilpatrick, R.M. Paranal, J. Qi, M. Chesi, A.C. Schinzel, M.R. McKeown, T.P. Heffernan, C.R. Vakoc, P.L. Bergsagel, I.M. Ghobrial, P.G. Richardson, R.A. Young, W.C. Hahn, K.C. Anderson, A.L. Kung, J.E. Bradner, C.S. Mitsiades, BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc, *Cell*, 146 (2011) 904-917.

[34] S.C. Casey, L. Tong, Y. Li, R. Do, S. Walz, K.N. Fitzgerald, A.M. Gouw, V. Baylot, I. Gutgemann, M. Eilers, D.W. Felsher, MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1, *Science*, 352 (2016) 227-231.

[35] M. Kalimutho, D. Sinha, D. Mittal, S. Srihari, D. Nanayakkara, S. Shafique, P. Raninga, P. Nag, K. Parsons, K.K. Khanna, Blockade of PDGFR beta circumvents resistance to MEK-JAK inhibition via intratumoral CD8 (+) T-cell infiltration in triple-negative breast cancer, *J Exp Clin Cancer Res*, 38 (2019) 85.

[36] D.E. Johnson, R.A. O'Keefe, J.R. Grandis, Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer, *Nat Rev Clin Oncol*, 15 (2018) 234-248.

[37] C.S. Tudor, C.W. Dawson, J. Eckhardt, G. Niedobitek, A.C. Buttner, B. Seliger, A. Hartmann, M. Buettner, c-Myc and EBV-LMP1: two opposing regulators of the HLA class I antigen presentation machinery in epithelial cells, *Br J Cancer*, 106 (2012) 1980-1988.

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1 A B】

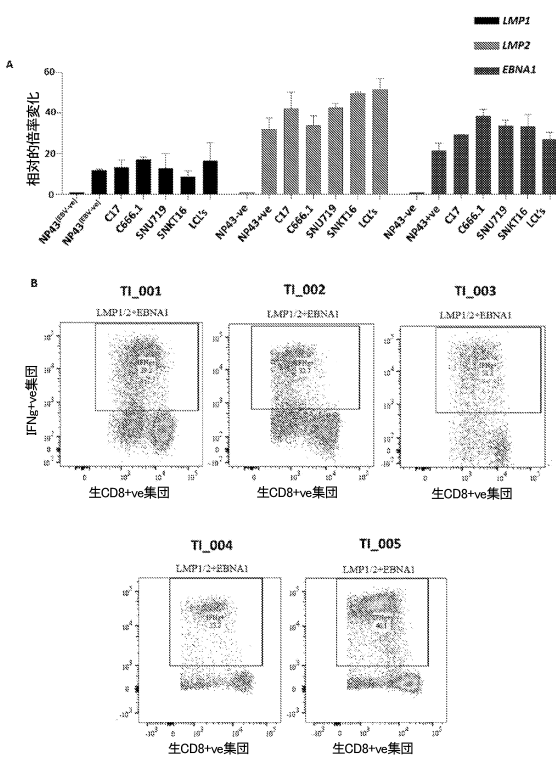


FIG. 1

【図 1 C E】

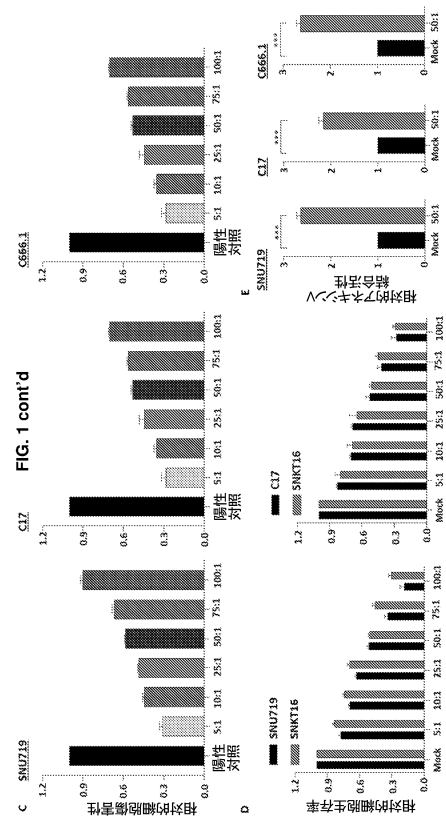


FIG. 1 cont'd

【図 2 A】

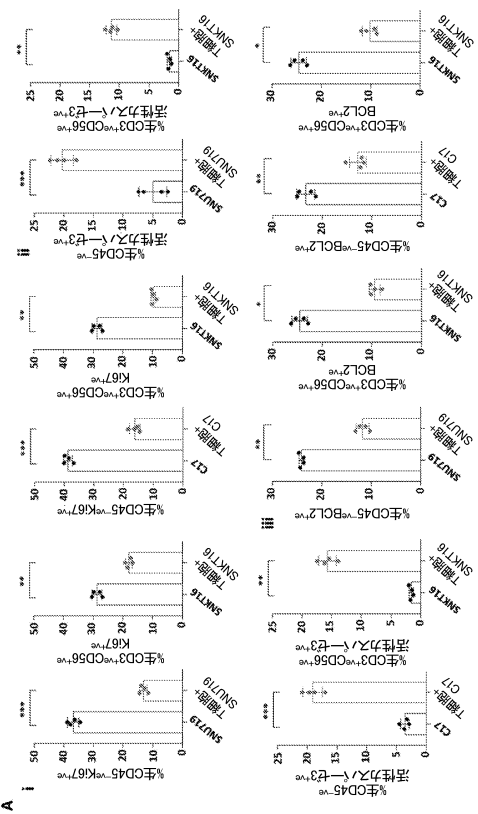


FIG. 2

【図 2 B】

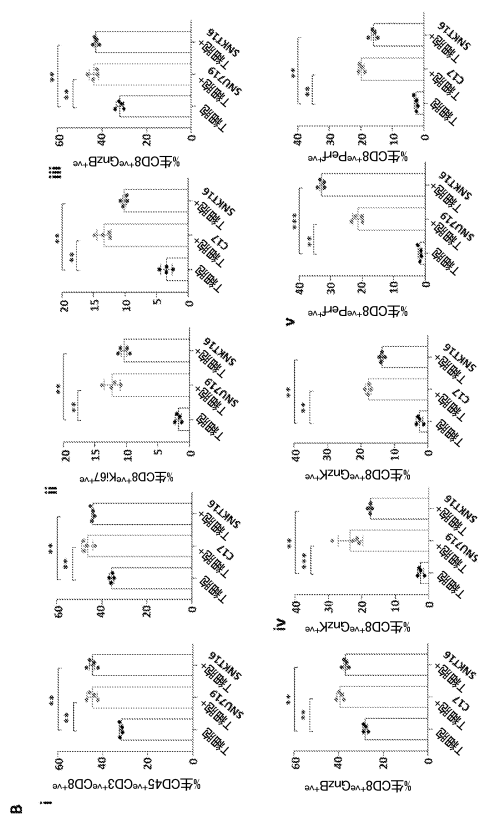


FIG. 2 cont'd

10

20

30

40

50

【図 3 A D】

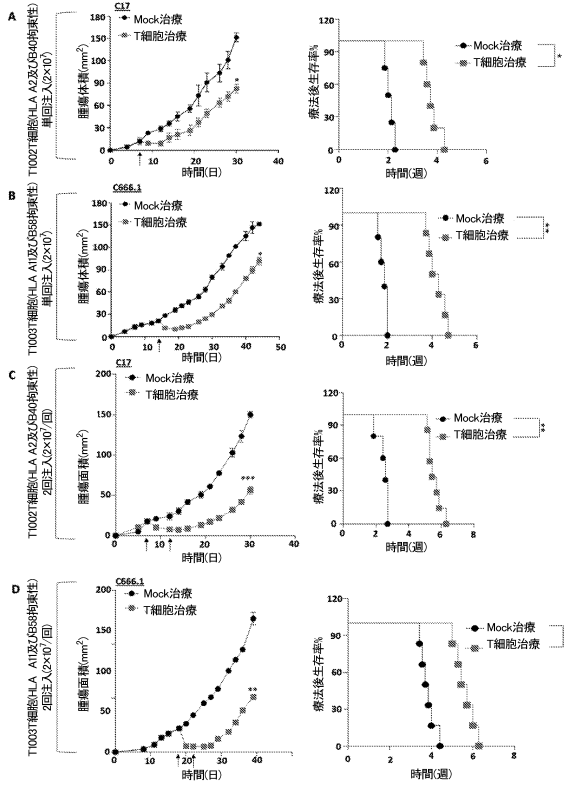


FIG. 3

【図 4 A B】

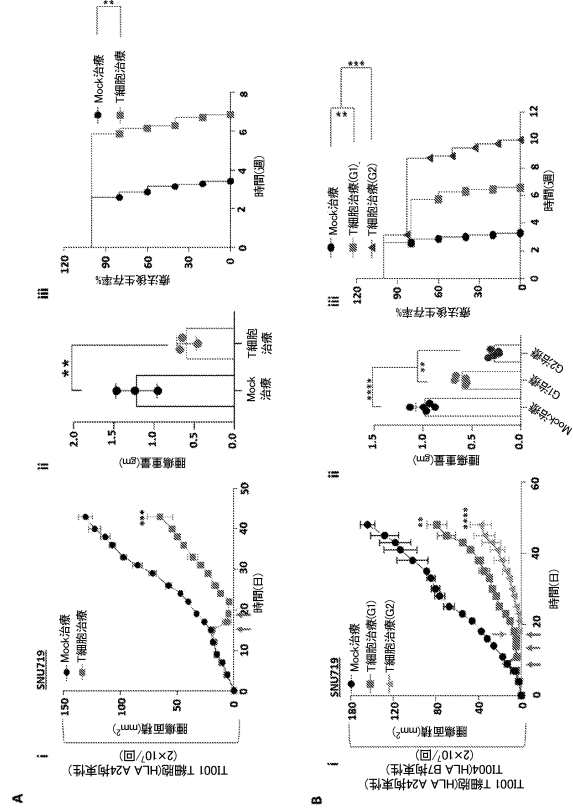


FIG. 4

【図 5 A B】

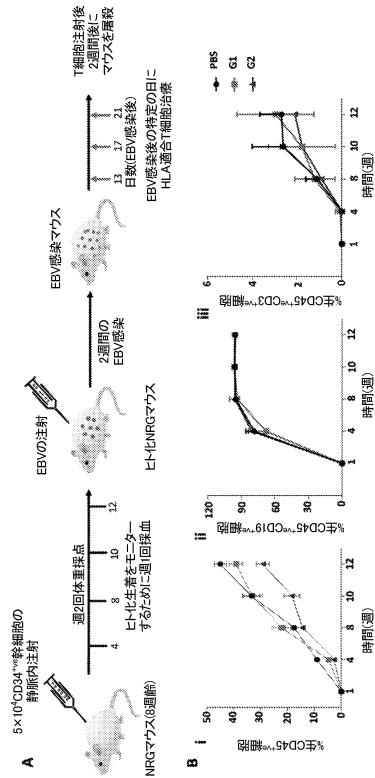


FIG. 5

【図 5 C F】

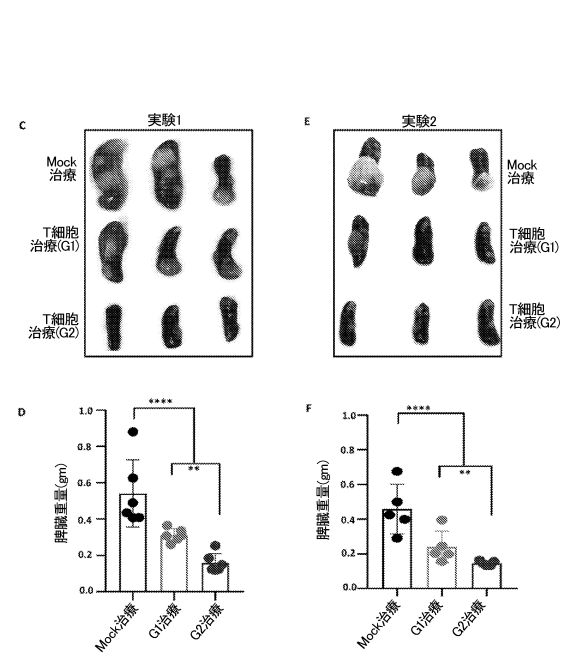


FIG. 5 cont'd

10

20

30

40

50

【図 6 A】

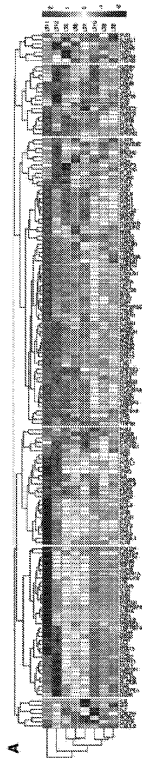


FIG. 6

【図 6 B E】

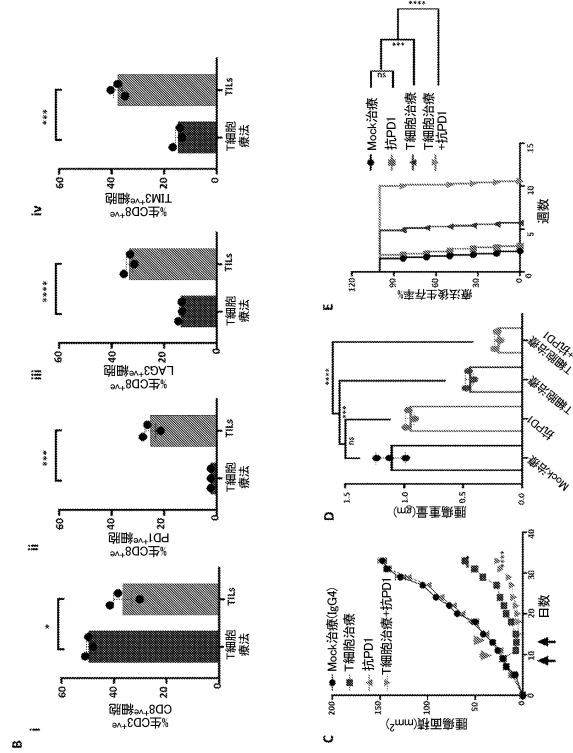


FIG. 6 cont'd

【図 7 A B】

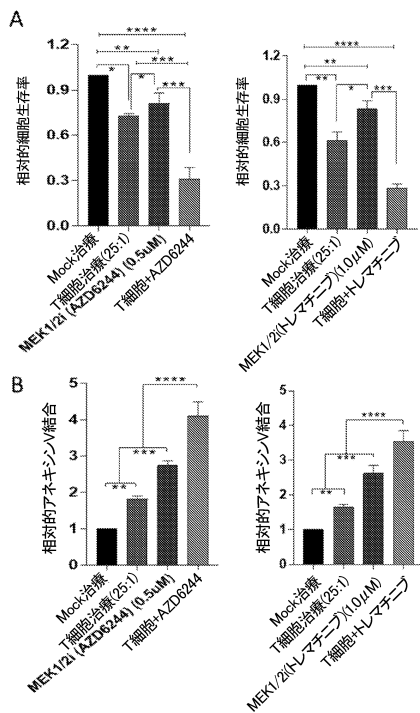


FIG. 7

【図 7 C】

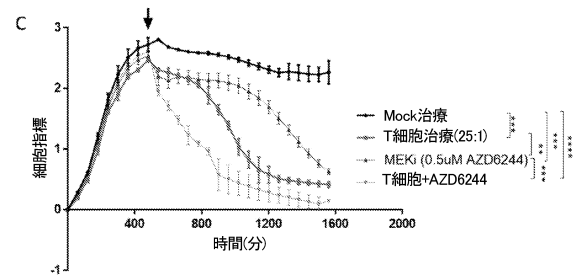


FIG. 7 cont'd

【図 8 A B】

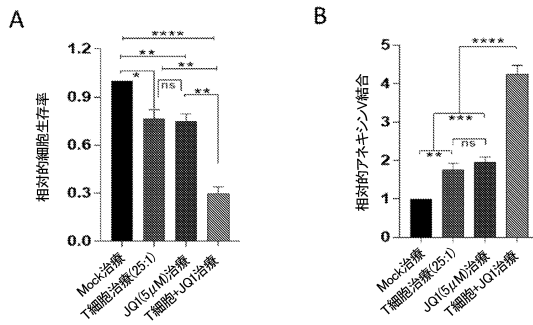


FIG. 8

【図 9】

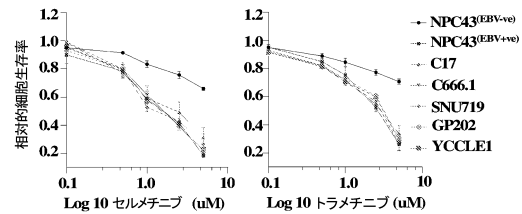


FIG. 9

10

20

【図 10】

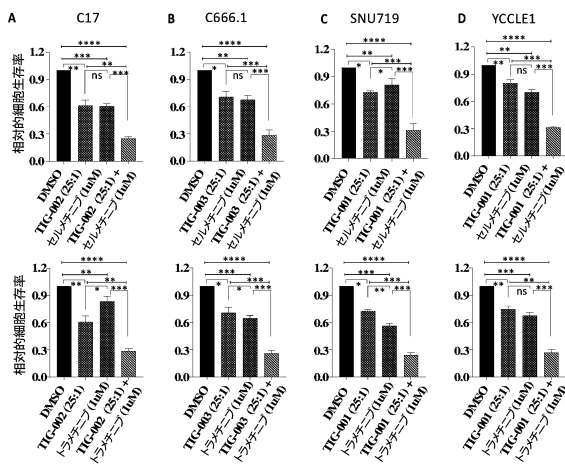


FIG. 10

【図 11 A C】

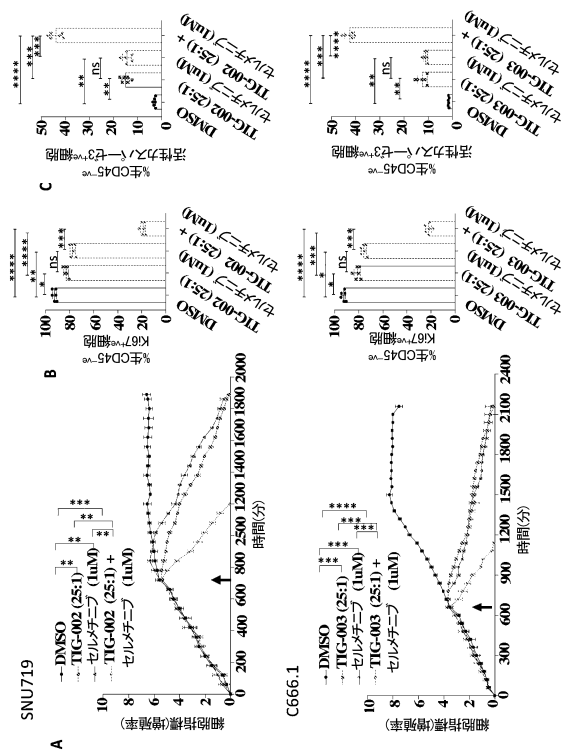


FIG. 11

30

40

50

【図 1 2 A C】

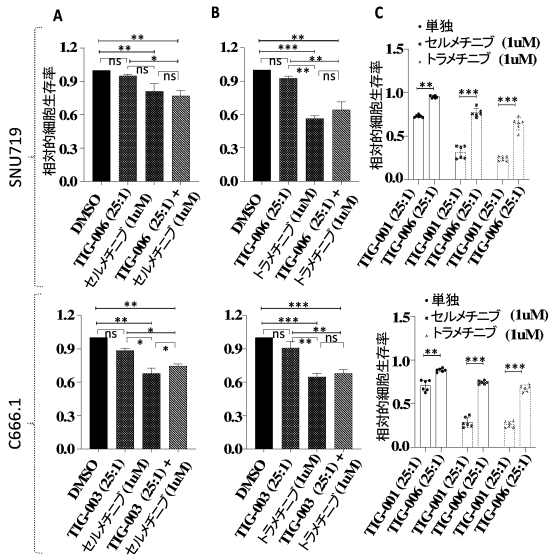


FIG. 12

【図 1 3 A D】

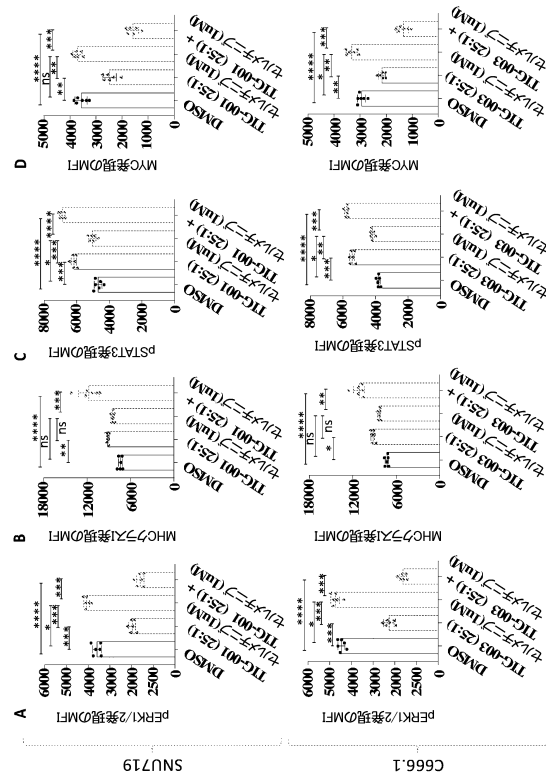


FIG. 13

【図 1 4】

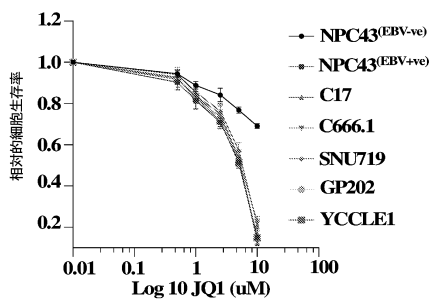


FIG. 14

【図 1 5 A D】

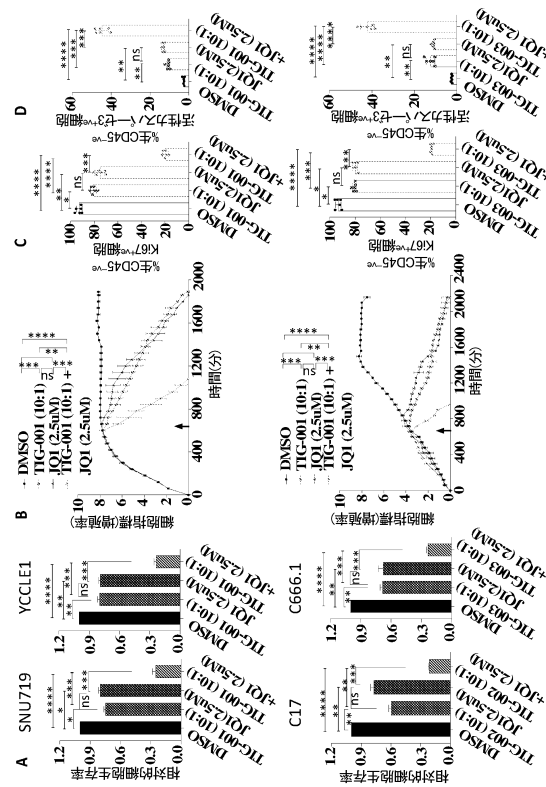


FIG. 15

【図 16 A B】

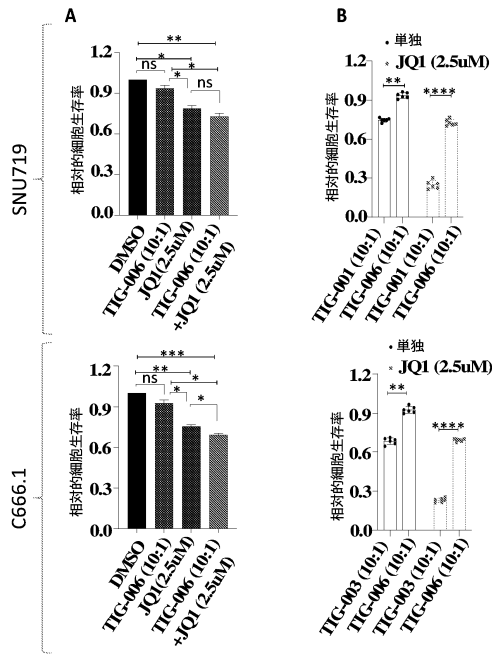


FIG. 16

【図 17 A D】

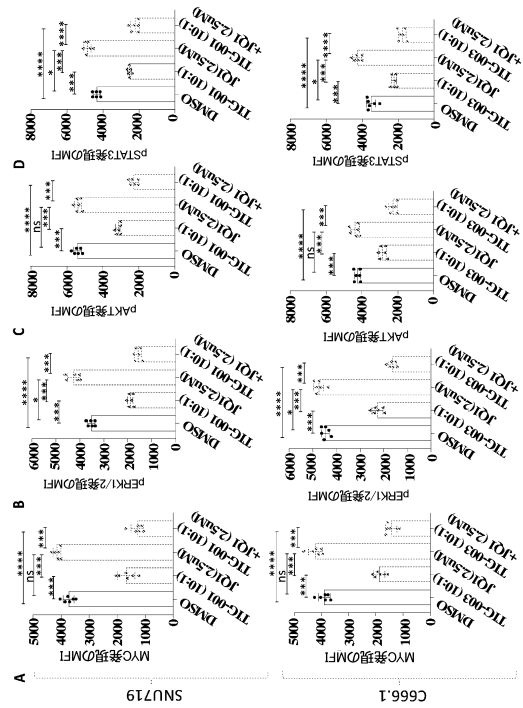


FIG. 17

【図 18 A C】

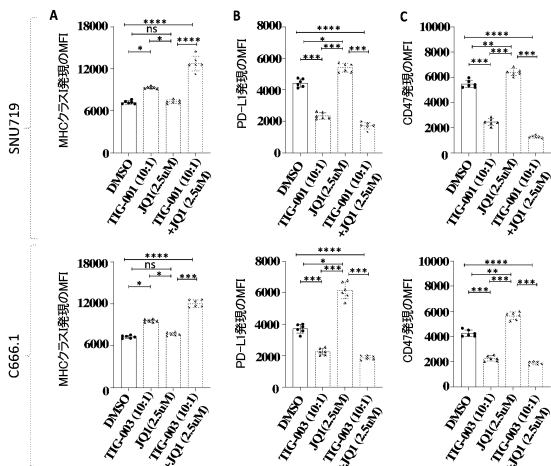


FIG. 18

【図 19 A E】

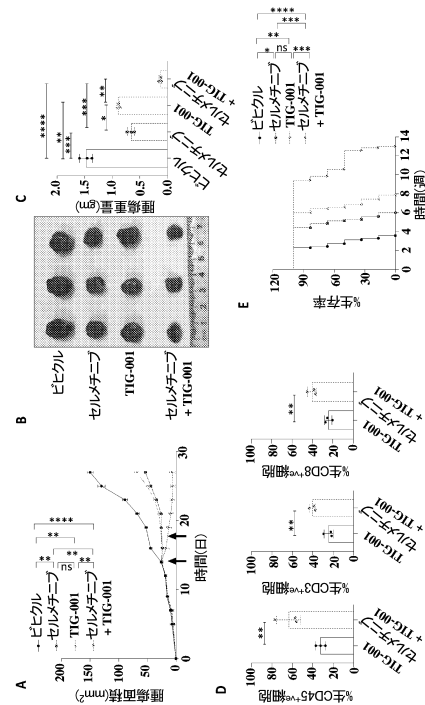


FIG. 19

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2020/051147
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0783 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01) A61K 39/245 (2006.01) A61P 31/22 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) A61K 31/551 (2006.01) A61K 31/4184 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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)		
EPOQUE (PATENW =WPIAP, EPODOC and all full text databases in English) and Medline STN - Embase, CAPLUS and Biosis databases.		
Keywords - EBV, Epstein Barr virus, allogeneic, adoptive cell transfer immune checkpoint inhibitor and such like, The Council of the Queensland Institute of Medical Research, Khanna Rajiv, Sinha Debottam.		
APPLICANT AND INVENTOR SEARCH: DATABASES: Patentscope, Auspat, Google, Google advanced patent search, Google scholar, Espacenet, PubMed.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" 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 24 December 2020		Date of mailing of the international search report 24 December 2020
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au		Authorised officer Johanna Lowery AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832968

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2020/051147
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/183153 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 17 November 2016 [0017]-[0018], [0024]-[0029], claims	1-48
X	WO 2019/178170 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 19 September 2019 Example-[00170]-[00178] especially, [0094]-[00101], [0089]-[0092]	1-48
X	WO 2019/136419 A2 (H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RESEARCH INSTITUTE INC.) 11 July 2019 p128-132	12-29, 31-48
X	DOUBROVINA, A. et al "Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation." Blood, Vol. 119, No. 11, page 2644-2656. 15 March 2012. Patient 8, page 2652, left hand column	1-48
X	EIZ-VESPER, B. et al "Adoptive T-cell immunotherapy from third-party donors: characterization of donors and set up of a T-cell donor registry." Frontiers in Immunology, Vol. 3, Article 410. Jan 2013. Published on 28 January 2013 Front. Immunol. doi: https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00410 Whole Document	1-48
X	ICHEVA, V. et al "Adoptive Transfer of Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 1-specific T Cells As Treatment for EBV Reactivation and Lymphoproliferative Disorders After Allogeneic Stem-Cell Transplantation." Journal of Clinical Oncology, Vol. 31, No. 1, page 39-48. 1 January 2013. Whole Document	1-48
X	Lulla P, Heslop HE. "Checkpoint inhibition and cellular immunotherapy in lymphoma". Hematology, Am Soc Hematol Educ Program. 2016(1):390-396. 2 Dec 2016. Whole Document	1-48
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2020/051147

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

10

20

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

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

See Supplemental Box for Details

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

30

Remark on Protest

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

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2020/051147
Supplemental Box	
Continuation of: Box III This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups: • Claims 1-11, 26-30 (in full) and 16-23 and 31 (in part) are directed to methods and compositions comprising a first and second population of allogeneic T-cells specific for different EBV antigens in the treatment of EBV associated disorders. The feature of the means to using 2 populations of EBV specific allogeneic T-cells is specific to this group of claims. • Claims 12-15, 24-25 and 32-42 (in full) and 16-23 and 31 (in part) are directed to a combination of a population of EBV specific allogeneic T-cells and a further therapeutic agent, and the use of this combination in treating EBV associated disease. The feature of the means to a combination of allogeneic EBV specific T-cells and a further therapeutic agent is specific to this group of claims. PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art. When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention. In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is the use of allogeneic T-cells in treating EBV associated diseases However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in: D1-D6 at least Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a posteriori</i>.	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2019)	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2020/051147	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2016/183153 A1	17 November 2016	WO 2016183153 A1	17 Nov 2016
		AR 104598 A1	02 Aug 2017
		AU 2016262484 A1	04 Jan 2018
		BR 112017024431 A2	24 Jul 2018
		CA 2984178 A1	17 Nov 2016
		CL 2017002846 A1	25 May 2018
		CN 107835690 A	23 Mar 2018
		EP 3294304 A1	21 Mar 2018
		EP 3294304 B1	29 Jan 2020
		HK 1244697 A1	17 Aug 2018
		JP 2018520095 A	26 Jul 2018
		KR 20180003575 A	09 Jan 2018
		MX 2017014257 A	20 Apr 2018
		PH 12017501993 A1	26 Mar 2018
		RU 2017143151 A	13 Jun 2019
		US 2018125891 A1	10 May 2018
		US 10568908 B2	25 Feb 2020
WO 2019/178170 A1	19 September 2019	WO 2019178170 A1	19 Sep 2019
WO 2019/136419 A2	11 July 2019	WO 2019136419 A2	11 Jul 2019
		AU 2019205422 A1	06 Aug 2020
		AU 2019207635 A1	06 Aug 2020
		BR 112020013910 A2	01 Dec 2020
		BR 112020013954 A2	01 Dec 2020
		CA 3087706 A1	11 Jul 2019
		CA 3088878 A1	18 Jul 2019
		CN 111867613 A	30 Oct 2020
		CN 112040957 A	04 Dec 2020
		EP 3737391 A2	18 Nov 2020
		EP 3737400 A1	18 Nov 2020
		US 2020345779 A1	05 Nov 2020
		WO 2019139888 A1	18 Jul 2019
		WO 2020102780 A1	22 May 2020

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2020/051147	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	31/551 (2006.01)	A 6 1 K	31/551
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10

4 H 0 4 5

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

ンズランド州, ハーストン, ハーストン ロード 3 0 0

(72)発明者 シンハ, デボッタム

オーストラリア連邦, 4 0 0 6 クイーンズランド州, ハーストン, ハーストン ロード 3 0 0

F ターム (参考)

4B065 AA94X AB01 AC20 BA02 CA44
 4C084 AA19 AA22 NA14 ZB26 ZB33 ZC75
 4C085 AA14 BB11 EE01 EE03
 4C086 AA01 AA02 BC39 CB26 MA02 MA03 MA04 NA14 ZB26 ZB33
 ZC75
 4C087 AA01 AA02 BB43 BB64 NA14 ZB26 ZB33 ZC75
 4H045 AA11 AA30 DA76 EA22 EA28