(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-531446
(P2024-531446A)
(43)公表日　令和6年8月29日(2024.8.29)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	ＺＮＡ　４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/24 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/24	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*35/15 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/15	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全39頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-510734(P2024-510734)
(86)(22)出願日　令和4年8月23日(2022.8.23)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月29日(2024.3.29)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/073462
(87)国際公開番号　WO2023/025788
(87)国際公開日　令和5年3月2日(2023.3.2)
(31)優先権主張番号　21192853.6
(32)優先日　令和3年8月24日(2021.8.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

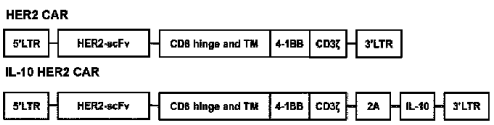
(71)出願人　512008613
エコール ポリテクニーク フェデラル デ ローザンヌ （イーピーエフエル）
スイス国，１０１５ ローザンヌ，イーピーエフエル イノベーション パーク ジェイ，イーピーエフエル－ティーティーオー
(74)代理人　100106002
弁理士　正林 真之
(74)代理人　100120891
弁理士　林 一好
(74)代理人　100165157
弁理士　芝 哲央
(74)代理人　100126000
弁理士　岩池 満

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　癌免疫療法の増強のためのＩＬ－１０発現細胞

(57)【要約】
本発明は、概して抗癌療法の分野に関し、特に癌、特に固形腫瘍を治療するための養子Ｔ細胞移植療法の使用に関する。より具体的には、本発明は、１種以上の組換え構築物を含む免疫細胞であって、少なくとも１種の組換え構築物がインターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする、免疫細胞に関する。
【選択図】図１（１）

Figure 1 a



【特許請求の範囲】
【請求項１】
インターロイキン－１０、その断片又は多様体を発現する免疫細胞であって、前記免疫細胞は１種以上の組換え構築物を含み、少なくとも１種の組換え構築物はインターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする、免疫細胞。
【請求項２】
第２の組換え構築物は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフをコードする請求項１に記載の免疫細胞。
【請求項３】
前記免疫細胞は、Ｔ細胞、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）－Ｔ細胞、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）－トランスジェニックＴ細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、ＮＫ細胞、ＮＫ－Ｔ細胞、ＣＡＲ－ＮＫ細胞、ＣＡＲ－ＮＫＴ細胞、ＴＣＲ－トランスジェニックＮＫ細胞、ＴＣＲ－トランスジェニックＮＫ－Ｔ細胞、樹状細胞、マクロファージ、ＣＡＲ－マクロファージ又はいずれかの合成の腫瘍特異的免疫細胞である請求項１又は請求項２に記載の免疫細胞。
【請求項４】
インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする前記構築物は、配列番号１の配列、又はその断片若しくは多様体を含むか又はコードする請求項１から請求項３のいずれか１項に記載の免疫細胞。
【請求項５】
インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする前記組換え構築物は、ＣＡＲ、ＴＣＲ、又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフをコードする前記第２の組換え構築物に連結されている請求項１から請求項４のいずれか１項に記載の免疫細胞。
【請求項６】
インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする前記組換え構築物は、自己切断ペプチド（例えばペプチド２Ａ）をコードする配列を介して、ＣＡＲ、ＴＣＲ又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフをコードする前記第２の組換え構築物に連結されている請求項５に記載の免疫細胞。
【請求項７】
前記ＣＡＲをコードする前記第２の組換え構築物は、抗体に由来する単鎖フラグメント多様体（ｓｃＦｖ）の細胞外抗原認識ドメインを含む請求項５又は請求項６に記載の免疫細胞。
【請求項８】
前記ＣＡＲをコードする前記第２の組換え構築物は、膜貫通領域のポリペプチドをコードする核酸を含む請求項５から請求項７のいずれか１項に記載の免疫細胞。
【請求項９】
前記ＣＡＲをコードする前記第２の組換え構築物は、ＣＤ３ζの細胞内Ｔ細胞活性化ドメインのポリペプチドをコードする核酸を含む請求項５から請求項８のいずれか１項に記載の免疫細胞。
【請求項１０】
前記ＣＡＲをコードする前記第２の組換え構築物は、４－１ＢＢ若しくはＣＤ２８又は４－１ＢＢ及びＣＤ２８細胞内領域の組み合わせを含む請求項５から請求項９のいずれか１項に記載の免疫細胞。
【請求項１１】
ｉ）抗体由来の前記単鎖フラグメント多様体（ｓｃＦｖ）の細胞外抗原認識ドメインは、ｃ－ＭＥＴ、ＣＤ７、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３８、ＣＤ１２３、ＣＤ１３３、ＣＤ１７１、ＣＤ７０、ＢＣＭＡ、ＣＥＡ、ＥＧＦＲ－ＶＩＩＩ、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、ＦＡＰ、ＧＤ２、ＧＰＣ３、ＨＥＲ２、ＩＬ－１３Ｒａ２、メソテリン、ＭＵＣ１、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、ＶＥＧＦＲ２、クローディン１８．２を含む群から選択される抗原を認識するか、又は

ｉｉ）前記ＴＣＲは、ｇｐ１００、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ３及びＴＲＰ－１、若しくはこれらの１つ以上の組み合わせを含む群から選択される抗原を認識する請求項５から請求項１０のいずれか１項に記載の免疫細胞。

【請求項１２】

前記インターロイキン－１０、その断片又は多様体は、好ましくは腫瘍微小環境において、前記免疫細胞によって分泌されるか又は膜結合される請求項１から請求項１１のいずれか１項に記載の免疫細胞。

【請求項１３】

インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする前記構築物は、Ｆｃ、ＨＳＡ、又は抗体融合タンパク質をコードする配列内に、又はその配列の外に含まれる請求項１から請求項１２のいずれか１項に記載の免疫細胞。

【請求項１４】

癌の予防及び／又は治療に使用するための請求項１から請求項１３のいずれか１項に記載の免疫細胞であって、前記癌は固体癌又は液体癌である免疫細胞。

【請求項１５】

前記固形癌は、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮癌、頭頸部癌、神経膠芽腫、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、腎臓癌、前立腺癌、胃癌、気管支癌、膵臓癌、膀胱癌、肝臓癌、脳腫瘍及び皮膚癌、特に黒色腫、又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む群から選択される請求項１４に記載の免疫細胞。

【請求項１６】

前記免疫細胞は自己由来、同種異系、又は異種性である請求項１から請求項１５のいずれか１項に記載の免疫細胞。

【請求項１７】

前記抗体由来の単鎖フラグメント多様体（ｓｃＦｖ）の前記細胞外抗原認識ドメインは、ＨＥＲ２、ＴＲＰ－１、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、及びＣＤ１９を含む群から選択される抗原を認識する請求項７又は請求項１１に記載の免疫細胞。

【請求項１８】

ＨＥＲ２を認識する前記ｓｃＦｖのアミノ酸配列は配列番号２、その断片又は多様体で示される請求項１７に記載の免疫細胞。

【請求項１９】

ＴＲＰ－１を認識する前記ｓｃＦｖのアミノ酸配列は配列番号３、その断片又は多様体で示される請求項１７に記載の免疫細胞。

【請求項２０】

ＥＧＦＲｖＩＩＩを認識する前記ｓｃＦｖのアミノ酸配列は配列番号４、その断片又は多様体で示される請求項１７に記載の免疫細胞。

【請求項２１】

ＣＤ１９を認識する前記ｓｃＦｖのアミノ酸配列は配列番号５、その断片又は多様体で示される請求項１７に記載の免疫細胞。

【請求項２２】

ＣＤ８膜貫通ドメイン及びヒンジのポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号６、その断片又は多様体で示される請求項８から請求項２１のいずれか１項に記載の免疫細胞。

【請求項２３】

前記ＣＤ３ζの細胞内Ｔ細胞活性化ドメインのポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号７、その断片又は多様体で示される請求項９から請求項２２のいずれか１項に記載の免疫細胞。

【請求項２４】

治療有効量のｉ）請求項１から請求項２３のいずれか１項に記載の免疫細胞、ｉｉ）請求項１から請求項２３のいずれか１項に記載の１種以上の組換え構築物をコードする核酸、及び／又はｉｉｉ）請求項１から請求項２３のいずれか１項に記載の１種以上の組換え構築物をコードする核酸配列を含むプラスミド若しくはベクターと、少なくとも１種の薬

学的に許容できる担体及び／又は希釈剤とを含む医薬組成物。
【請求項２５】
少なくとも１種の追加の治療剤又は療法をさらに含む請求項２４に記載の医薬組成物。
【請求項２６】
前記少なくとも１種の追加の治療剤又は療法は、癌、好ましくは固形癌を治療するのに有用な抗癌剤若しくは抗癌療法、及び／又は抗炎症剤である請求項２５に記載の医薬組成物。
【請求項２７】
前記抗癌療法は、放射線療法、化学療法、免疫チェックポイント阻害剤、免疫療法及びホルモン療法、又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む群から選択される請求項２６に記載の医薬組成物。
【請求項２８】
前記免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、及びＣＴＬＡ－４阻害剤、又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む群から選択される請求項２７に記載の医薬組成物。
【請求項２９】
対象における癌の治療及び／又は予防の方法であって、請求項２４から請求項２８のいずれか１項に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、方法。
【請求項３０】
対象における癌の治療及び／又は予防の方法であって、（ｉ）免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を前記対象から取り出して単離するか、又は免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を準備する工程と、（ｉｉ）前記Ｔ細胞を、インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする少なくとも１種の組換え構築物、及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフ若しくは抗原をコードする第２の組換え構築物を用いて遺伝子操作する工程と、（ｉｉｉ）操作されたＴ細胞のより大きい集団へとエキソビボで増殖させる工程と、（ｉｖ）患者又は対象に再導入する工程とを含む、方法。
【請求項３１】
対象における抗腫瘍活性を増強する方法であって、（ｉ）免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を前記対象から取り出して単離するか、又は免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を準備する工程と、（ｉｉ）前記Ｔ細胞を、インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする少なくとも１種の組換え構築物、及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフ若しくは抗原をコードする第２の組換え構築物を用いて遺伝子操作する工程と、（ｉｉｉ）操作されたＴ細胞のより大きい集団へとエキソビボで増殖させる工程と、（ｉｖ）患者又は対象に再導入する工程とを含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、概して抗癌療法の分野に関し、特に癌、特に固形腫瘍を治療するための養子Ｔ細胞移植療法の使用に関する。より具体的には、本発明は、１種以上の組換え構築物を含む免疫細胞であって、少なくとも１種の組換え構築物がインターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする、免疫細胞に関する。
【背景技術】
【０００２】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）トランスジェニック（遺伝子導入）Ｔ細胞（両方とも「養子Ｔ細胞移植」療法と呼ばれる）は、遺伝子操作されたＴ細胞に基づく養子移植免疫療法である。例えば、ＣＡＲ　Ｔ細胞は、臨床において、特に血液悪性腫瘍において有望な結果を示すが、固形腫瘍における進歩は限られている（Ｌｉｍ，Ｗ．Ａ．及びＪｕｎｅ，Ｃ．Ｈ．　Ｔｈｅ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ｏｆ　Ｅｎ

gineering Immune Cells to Treat Cancer. Cell 168、724－740（2017））。

【0003】

腫瘍微小環境（TME）におけるCAR T細胞は、T細胞「疲弊」として定義されるエフェクター機能及び増殖能の喪失を示すことが報告されており、T細胞「疲弊」は、固形腫瘍における持続的な抗原刺激及び他の代謝ストレスによって生じ得る（Schietinger, A.ら、Tumor－Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen－Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. Immunity 45、389－401（2016）；Vodnala, S. K.ら、T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism. Science 363、（2019））。

【0004】

疲弊したT細胞はミトコンドリア呼吸の抑制を呈し、このような代謝適合性（代謝フィットネス）の不良はT細胞疲弊を強化し、それらの抗腫瘍免疫応答を損なう可能性があることが報告されている。養子移植されたCAR T細胞の増殖期の間の代謝介入は、インビボ分化を調節し、抗腫瘍応答を改善することが示されている（Alizadeh, D.ら、IL15 Enhances CAR T Cell Antitumor Activity by Reducing mTORC1 Activity and Preserving Their Stem Cell Memory Phenotype. Cancer Immunol. Res. 7、759－772（2019））。

【0005】

しかしながら、このタイプの介入は最適以下の抗腫瘍効果しかもたらさなかった。これは、適用されたサイトカインが構成的に供給されないか、又はT細胞を疲弊から完全に救出する代謝リプログラミング能力が限られているかのいずれかによって引き起こされる可能性がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Lim, W. A.及びJune, C. H. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. Cell 168、724－740（2017）

【非特許文献2】Schietinger, A.ら、Tumor－Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen－Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. Immunity 45、389－401（2016）

【非特許文献3】Vodnala, S. K.ら、T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism. Science 363、（2019）

【非特許文献4】Alizadeh, D.ら、IL15 Enhances CAR T Cell Antitumor Activity by Reducing mTORC1 Activity and Preserving Their Stem Cell Memory Phenotype. Cancer Immunol. Res. 7、759－772（2019）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、TME内の免疫細胞の代謝適合性、増殖、及び生存を支持する操作プロセス、

並びに増強された抗腫瘍活性を有する有効な免疫細胞の開発が、依然として緊急に必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明は、インターロイキン－１０、その断片又は多様体を発現する免疫細胞であって、前記免疫細胞は１種以上の組換え構築物を含み、少なくとも１種の組換え構築物がインターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする、免疫細胞を提供する。

【０００９】

本発明の１種以上の組換え構築物をコードする核酸配列をコードする核酸配列がさらに提供される。

【００１０】

本発明の核酸配列を含むプラスミド又はベクターがさらに提供される。

【００１１】

ｉ）本発明の免疫細胞、ｉｉ）本発明の核酸、及び／又はｉｉｉ）本発明のプラスミド若しくはベクターと、少なくとも１種の薬学的に許容できる担体又は希釈剤とを含む医薬組成物がさらに提供される。

【００１２】

癌の治療及び／又は予防の方法であって、本発明の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む方法も提供される。

【００１３】

対象における癌の治療及び／又は予防の方法であって、（ｉ）免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を前記対象から取り出して単離するか、又は免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を準備する工程と、（ｉｉ）前記Ｔ細胞を、インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする少なくとも１種の組換え構築物、及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフ若しくは抗原をコードする第２の組換え構築物を用いて遺伝子操作する工程と、（ｉｉｉ）操作されたＴ細胞のより大きい集団へとエキソビボで増殖させる工程と、（ｉｖ）前記患者又は対象に再導入する工程とを含む方法も提供される。

【００１４】

対象における抗腫瘍活性を増強する方法であって、（ｉ）免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を前記対象から取り出して単離するか、又は免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を準備する工程と、（ｉｉ）前記Ｔ細胞を、インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする少なくとも１種の組換え構築物、及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフ若しくは抗原をコードする第２の組換え構築物を用いて遺伝子操作する工程と、（ｉｉｉ）操作されたＴ細胞のより大きい集団へとエキソビボで増殖させる工程と、（ｉｖ）前記患者又は対象に再導入する工程とを含む方法も提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１（１）】ＩＬ－１０を共発現するＨＥＲ２特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞（ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ）は、抗原刺激時にＣＡＲ　Ｔ細胞のＯＸＰＨＯＳを増強し、ＣＡＲ　Ｔ細胞増殖を促進する。（ａ）ＨＥＲ２指向性第２世代ＣＡＲ（ＨＥＲ２　ＣＡＲ）、及び２Ａエレメントの後にマウスＩＬ－１０を発現するように改変されたＨＥＲ２指向性第２世代ＣＡＲ（ＨＥＲ２　ＣＡＲ－ＩＬ－１０）の概略図。

【図１（２）】ＩＬ－１０を共発現するＨＥＲ２特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞（ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ）は、抗原刺激時にＣＡＲ　Ｔ細胞のＯＸＰＨＯＳを増強し、ＣＡＲ　Ｔ細胞増殖を促進する。（ｂ）ＨＥＲ２　ＣＡＲ又はＨＥＲ２　ＣＡＲ－ＩＬ－１０構築物による形質導入がレトロウイルスベクターによって行われた。ＣＡＲの発現レベルがフローサイトメトリによって分析された。ヒストグラム中の数字は、ＨＥＲ２　ＣＡＲ陽性染色細胞のパーセンテージを表す。同様の結果が１０回の独立した実験から得られた。

【図１（３）】ＩＬ－１０を共発現するＨＥＲ２特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞（ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ）は、抗原刺激時にＣＡＲ　Ｔ細胞のＯＸＰＨＯＳを増強し、ＣＡＲ　Ｔ細胞増殖を促進する。（ｃ）ＣＡＲ　Ｔ細胞がマイトマイシンＣ処理ＭＣ３８－ＨＥＲ２（ＨＥＲ２発現ＭＣ３８結腸癌細胞）と３日間共培養された。培養上清が、ＩＬ－１０の濃度について酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）によって調べられた。（ｄ、ｅ）ＣＡＲ　Ｔ細胞が、細胞トラッカーＣＦＳＥで標識され、エフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比１：１で、示された期間、マイトマイシンＣ処理ＭＣ３８－ＨＥＲ２細胞と共培養された。（ｄ）異なる日の生存ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ又はＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔの絶対数。（ｅ）リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、アイソタイプ対照抗体、又は抗ＩＬ－１０　ｍＡｂの存在下でのＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ又はＩＬ－１０　ＨＥＲ２ＣＡＲ　Ｔ細胞分裂のパーセンテージ。データは平均±ＳＥＭを表す。少なくとも３回の独立した実験から同様の結果が得られた。

【図１（４）】ＩＬ－１０を共発現するＨＥＲ２特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞（ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ）は、抗原刺激時にＣＡＲ　Ｔ細胞のＯＸＰＨＯＳを増強し、ＣＡＲ　Ｔ細胞増殖を促進する。（ｆ）５：１のＥ：Ｔ比でＭＣ３８－ＨＥＲ２を用いて２４時間刺激されたＣＡＲ　Ｔ細胞の代表的な酸素消費速度（ＯＣＲ）トレース。（ｇ）（ｆ）のように処理された細胞の代表的な細胞外酸性化速度（ＥＣＡＲ）トレース。少なくとも３回の独立した実験から同様の結果が得られた。

【図１（５）】ＩＬ－１０を共発現するＨＥＲ２特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞（ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ）は、抗原刺激時にＣＡＲ　Ｔ細胞のＯＸＰＨＯＳを増強し、ＣＡＲ　Ｔ細胞増殖を促進する。（ｈ）（ｆ）からの基礎ＯＣＲの統計分析。（ｉ）（ｇ）からの基礎ＥＣＡＲの統計分析。データは平均±ＳＥＭを表す。少なくとも３回の独立した実験から同様の結果が得られた。

【図１（６）】ＩＬ－１０を共発現するＨＥＲ２特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞（ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ）は、抗原刺激時にＣＡＲ　Ｔ細胞のＯＸＰＨＯＳを増強し、ＣＡＲ　Ｔ細胞増殖を促進する。（ｊ）（ｆ）及び（ｇ）からのＯＣＲ／ＥＣＡＲの比。データは平均±ＳＥＭを表す。少なくとも３回の独立した実験から同様の結果が得られた。

【図２】ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ピルビン酸依存的にＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍活性を増強する。（ａ）標的としてＭＣ３８－ＨＥＲ２細胞を使用する細胞傷害性アッセイ。標的細胞は、示されたＥ／Ｔ比でＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞又はＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞と混合された。（ｂ、ｃ、ｄ）非形質導入対照Ｔ細胞（Ｃｔｒｌ　Ｔ）、０及び１４５ｎｇ／ｍＬのマウス組換えＩＬ－１０（ｍＩＬ－１０）の存在下におけるＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ、又はＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞とＭＣ３８－ＨＥＲ２細胞との、０．５：１のＥ：Ｔ比における４８時間の共培養物。（ｂ）ＭＣ３８－ＨＥＲ２腫瘍細胞死滅パーセンテージ、（ｃ）生存ＣＡＲ　Ｔ細胞数がフローサイトメトリによって分析された。（ｄ）共培養又は休止期における多機能性ＣＡＲ　Ｔ細胞の比率が、細胞内サイトカイン染色によって評価された。

【図３】ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ療法は、確立されたマウスＭＣ３８－ＨＥＲ２結腸腺癌を根絶する。Ｃ５７ＢＬ／６マウスがＭＣ３８－ＨＥＲ２細胞（３×10^5）を皮下接種され、それぞれ６日目に静脈内（ｉ．ｖ．）で、ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×10^6）、若しくはＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×10^6）の養子細胞移植を受け、又はＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×10^6）の養子細胞移植を受けたことに続いてｍＩＬ－１０（１μｇ）のｉ．ｖ．投与を受けた。各処置群の平均腫瘍増殖曲線（ａ）及び生存曲線（ｂ）が示されている。群中のマウスの総数のうち長期生存マウスの数が示されている。（ｃ）ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ単独療法の処置群からの生存マウスが、初代接種後９０日目にＭＣ３８－ＨＥＲ２（１×10^6）細胞を皮下再負荷（チャレンジ）された。ナイーブＷＴマウス（ｎ＝５）が、対照として、同じ数の腫瘍細胞を接種された。再負荷に対する生存曲線及び長期生存マウスの数が示されている。データは平均±ＳＥＭを表す。

【図４（１）】ＴＲＰ－１　ＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ療法は、マウスＢ１６Ｆ１０黒色腫

モデルにおいて生存を延長する。（ａ）ＴＲＰ－１指向性第２世代ＣＡＲ（ＴＲＰ－１ＣＡＲ）、及び２Ａエレメントの後にマウスＩＬ－１０を発現するように改変されたＴＲＰ－１指向性第２世代ＣＡＲ（ＩＬ－１０　ＴＲＰ－１　ＣＡＲ）の概略図。（ｂ）ＴＲＰ－１　ＣＡＲ又はＩＬ－１０　ＴＲＰ－１　ＣＡＲ構築物による形質導入がレトロウイルスベクターによって行われた。ＣＡＲの発現レベルがフローサイトメトリによって分析された。ヒストグラム中の数字は、ｃ－Ｍｙｃタグ陽性染色細胞のパーセンテージを表す。同様の結果が１０回の独立した実験から得られた。

【図４（２）】ＴＲＰ－１　ＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ療法は、マウスＢ１６Ｆ１０黒色腫モデルにおいて生存を延長する。（ｃ、ｄ）０及び１４５ｎｇ／ｍＬのマウス組換えＩＬ－１０（ｍＩＬ－１０）の存在下におけるＴＲＰ－１　ＣＡＲ　Ｔ、又はＩＬ－１０　ＴＲＰ－１　ＣＡＲ　Ｔ細胞とＢ１６Ｆ１０細胞との、０．５：１のＥ：Ｔ比における４８時間の共培養物。（ｃ）Ｂ１６Ｆ１０腫瘍細胞死滅パーセンテージがフローサイトメトリによって分析された。（ｄ）生存ＣＡＲ　Ｔ細胞数がフローサイトメトリによって分析された。データは平均±ＳＥＭを表す。

【図４（３）】ＴＲＰ－１　ＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ療法は、マウスＢ１６Ｆ１０黒色腫モデルにおいて生存を延長する。（ｅ、ｆ）Ｃ５７ＢＬ／６マウスがＢ１６Ｆ１０黒色腫細胞（３×10^5）を皮下接種され、それぞれ６日目にｉ．ｖ．で、ＴＲＰ－１　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×10^6）、ＩＬ－１０　ＴＲＰ－１　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×10^6）の養子細胞移植を受けた。各処置群の平均腫瘍増殖曲線（ｅ）及び各処置群の生存曲線（ｆ）が示されている。データは平均±ＳＥＭを表す。

【図５（１）】ＩＬ－１０　ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を用いた処置による、予め確立されたマウス４Ｔ１－Ｌｕｃ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ転移性乳癌モデルの完全退縮。（ａ）ＥＧＦＲｖＩＩＩ指向性第２世代ＣＡＲ（ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ）、及び２Ａエレメントの後にマウスＩＬ－１０を発現するように改変されたＥＧＦＲｖＩＩＩ指向性第２世代ＣＡＲ（ＩＬ－１０　ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ）の概略図。（ｂ）ＣＡＲの発現レベルがフローサイトメトリによって分析された。ヒストグラム中の数字は、ｃ－Ｍｙｃタグ陽性染色細胞のパーセンテージを表す。同様の結果が１０回の独立した実験から得られた。

【図５（２）】ＩＬ－１０　ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を用いた処置による、予め確立されたマウス４Ｔ１－Ｌｕｃ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ転移性乳癌モデルの完全退縮。（ｃ）ＣＡＲ　Ｔ細胞が、マイトマイシンＣ処理４Ｔ１－Ｌｕｃ－ＥＧＦＲｖＩＩＩと３日間共培養された。培養上清が、ＩＬ－１０の濃度についてＥＬＩＳＡによって調べられた。（ｄ、ｅ）Ｃｔｒｌ　Ｔ、０及び１４５ｎｇ／ｍＬのｍＩＬ－１０の存在下におけるＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ、又はＩＬ－１０　ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と、４Ｔ１－Ｌｕｃ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ細胞との、０．５：１のＥ：Ｔ比における４８時間共培養物。（ｄ）４Ｔ１－Ｌｕｃ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ腫瘍細胞死滅パーセンテージがフローサイトメトリによって分析された。（ｅ）生存ＣＡＲ　Ｔ細胞数がフローサイトメトリによって分析された。データは平均±ＳＥＭを表す。

【図５（３）】ＩＬ－１０　ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を用いた処置による、予め確立されたマウス４Ｔ１－Ｌｕｃ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ転移性乳癌モデルの完全退縮。（ｆ～ｈ）ＢＡＬＢ／ｃマウスが４Ｔ１－Ｌｕｃ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ細胞（５×10^4）をｉ．ｖ．注射され、それぞれ６日目にｉ．ｖ．で、ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×10^6）、若しくはＩＬ－１０　ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×10^6）の養子細胞移植を受け、又はＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×10^6）を受けたことに続いてｍＩＬ－１０（１μｇ）のｉ．ｖ．投与を受けた。（ｆ）異なる時間点でのマウス群の個々の平均放射輝度（ｐ／ｓ／ｃｍ２／ｓｒ）。（ｇ）各処置群の生存曲線及び群中のマウスの総数のうち長期生存マウスの数が示されている。（ｈ）フローサイトメトリによって定量された１５日目の血液中のＣＡＲ　Ｔ細胞の数。データは平均±ＳＥＭを表す。

【図６】ＩＬ－１０　Ｐｍｅｌ　ＴＣＲ　Ｔ療法は、マウスＢ１６Ｆ１０黒色腫モデルに

おいて生存を延長する。（ａ）ＩＬ－１０構築物による形質導入がレトロウイルスベクターによって行われた。ＩＬ－１０の発現レベルがＥＬＩＳＡによって分析された。（ｂ～ｆ）Ｃ５７ＢＬ／６マウスがＢ１６Ｆ１０黒色腫細胞（３×１０^{5}）を皮下接種され、それぞれ６日目にｉ．ｖ．でＰｍｅｌ　Ｔ細胞（１０×１０^{6}）又はＩＬ－１０　Ｐｍｅｌ　Ｔ細胞（１０×１０^{6}）の養子細胞移植を受けた。（ｂ～ｄ）ＰＢＳ対照群（ｂ）、Ｐｍｅｌ　Ｔ細胞療法（ｃ）及びＩＬ－１０　Ｐｍｅｌ　Ｔ細胞療法（ｄ）の個々の腫瘍増殖曲線。（ｅ、ｆ）各処置群の平均腫瘍増殖曲線（ｅ）及び生存曲線（ｆ）が示されている。データは平均±ＳＥＭを表す。

【図７（１）】ＩＬ－１０　ＣＤ１９ヒトＣＡＲ　Ｔのインビトロ特性評価。（ａ）ＣＤ１９指向性第２世代ＣＡＲ（ＣＤ１９　ＣＡＲ）、及びヒトＩＬ－１０を発現するように改変されたＣＤ１９指向性第２世代ＣＡＲ（ＩＬ－１０　ＣＤ１９　ＣＡＲ）の概略図。（ｂ）ＣＡＲの発現レベルがフローサイトメトリによって分析された。同様の結果が１０回の独立した実験から得られた。

【図７（２）】ＩＬ－１０　ＣＤ１９ヒトＣＡＲ　Ｔのインビトロ特性評価。（ｃ）分泌されたＩＬ－１０の濃度がＥＬＩＳＡによって検出された。（ｄ）Ｃｔｒｌ　Ｔ、ＣＤ１９　ＣＡＲ　Ｔ、又はＩＬ－１０　ＣＤ１９　ＣＡＲ　Ｔ細胞と標的腫瘍細胞との１：３２のＥ：Ｔ比における共培養物における腫瘍細胞死滅パーセンテージがＬＤＨアッセイによって分析された。（ｅ）平均腫瘍増殖曲線。ＮＳＧマウスがＰＡＮＣ１－ＣＤ１９ヒト類上皮癌細胞（２×１０^{6}）を接種され（ｓ．ｃ．）、８日目にｉ．ｖ．で、ＣＤ１９ｈＣＡＲ　Ｔ細胞（１×１０^{6}）又はＩＬ－１０　ＣＤ１９　ｈＣＡＲ　Ｔ細胞（１×１０^{6}）の養子細胞移植を受けた（ｎ＝９／群）。データは平均±ＳＥＭを表す。

【図８】ＩＬ－１０発現は、ＣＡＲ－Ｔ細胞のミトコンドリア適合性（ｆｉｔｎｅｓｓ）を維持する。Ｃ５７ＢＬ／６マウスがＭＣ３８－ＨＥＲ２腫瘍細胞（１×１０^{6}、ｓ．ｃ．）を接種され、５日目に照射により致死量以下のリンパ球を枯渇させられ、６日目にｉ．ｖ．で、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞（３×１０^{6}）、又はｉ．ｖ．投与されたＩＬ－１０（１μｇ）の存在下若しくは不存在下でのＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞（３×１０^{6}）の養子移植を受けた（ｎ＝５／群）。１４日目に、マウスが殺され、示された組織が処理された。ＣＡＲ－Ｔ細胞が、フローサイトメトリによるミトコンドリア表現型分析に供されるか、又は電子顕微鏡分析のために選別された。ＣＡＲ－Ｔ細胞のミトコンドリア質量（ｍａｓｓ）及び膜電位が、それぞれＭｉｔｏＴｒａｃｋｅｒ　Ｇｒｅｅｎ（ＭＧ）及びＭｉｔｏＴｒａｃｋｅｒ　Ｄｅｅｐ　Ｒｅｄ（ＭＤＲ）で染色することによって調べられた。ａ．　機能不全ミトコンドリアを有するＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞の頻度。ｂ．　示された処置群に由来する腫瘍浸潤性ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞におけるＭＤＲ／ＭＧの比率。ｃ．　示された処置群に由来する選別された腫瘍組織内ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞の代表的な電子顕微鏡画像。ｄ～ｆ．　（ｃ）に示される選別された腫瘍組織内ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞における、１細胞あたりのミトコンドリア数の定量（ｄ）、ミトコンドリアあたりのクリステ数（ｅ）、及びミトコンドリア領域あたりの総クリステ長さ（ｆ）。すべてのデータは平均±ｓ．ｅ．ｍ．を表し、対応のないスチューデント（Ｓｔｕｄｅｎｔ）のｔ検定（ｄ、ｅ、ｆ）又はチューキー（Ｔｕｋｅｙ）の多重比較検定を用いた一元配置ＡＮＯＶＡ（ａ、ｂ）によって分析される。

【図９】図５に記載されるＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞又はＩＬ－１０　ＴＲＰ－１　ＣＡＲ－Ｔ細胞の処置後の生存マウスが、初代腫瘍接種後９０日目に、それぞれＭＣ３８－ＨＥＲ２（１×１０^{6}）及びＢ１６Ｆ１０（１×１０^{5}）細胞をｓ．ｃ．再負荷された。ナイーブＷＴマウス（ｎ＝５／群）が、対照として、同じ数の腫瘍細胞を接種された。ａ．　実験タイムライン。ｂ、ｃ．　ＭＣ３８－ＨＥＲ２腫瘍モデル（ｂ）及びＢ１６Ｆ１０腫瘍モデル（ｃ）における第２の腫瘍負荷を拒絶する長期生存マウスの生存曲線及び数が示されている。

【図１０】ＩＬ－１０　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処置されたマウスは、幹細胞様の記憶を誘導した。Ｃ５７ＢＬ／６マウスがＭＣ３８－ＨＥＲ２細胞（１×１０^{6}、ｓ．ｃ．）を接種され、５日目に照射により致死量以下のリンパ球を枯渇させられ、６日目にｉ．ｖ．で、Ｉ

Ｌ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞（３×１０^{6}）、又はｉ．ｖ．投与されたＩＬ－１０（１μｇ）の存在下若しくは不存在下でのＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞（３×１０^{6}）の養子移植を受けた（ｎ＝５／群）。１８日目に、フローサイトメトリによる脾臓及び末梢血中のＣＡＲ－Ｔ細胞の表現型分析のためにマウスは殺された。ａ、ｂ．　脾臓中の総ＣＡＲ－Ｔ細胞のうちのＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４$^{-}$の平均頻度（ａ）及びＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４$^{-}$　ＣＡＲ－Ｔ細胞のうちのＳｃａ－１$^{+}$ＣＤ１２２$^{+}$の平均頻度（ｂ）。ｃ．　脾臓におけるＣＡＲ－Ｔ細胞中のＳｃａ－１発現の代表的なフローサイトメトリプロット及び平均ＭＦＩ。ｄ．　脾臓及び血液（ｅ）中のＣＡＲ－Ｔ細胞の表現型を示す代表的なフローサイトメトリプロット。脾臓（ｄ）及び血液（ｅ）における総ＣＡＲ－Ｔ細胞のうちＩＬ－７Ｒα^{+}ＫＬＲＧ－１$^{-}$の頻度。すべてのデータは平均±ｓ．ｅ．ｍ．を表し、チューキーの多重比較検定を用いた一元配置ＡＮＯＶＡによって分析される（ａ～ｅ）。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

本明細書に記載される方法及び材料と類似又は等価な方法及び材料を本発明の実施又は試験で使用することができるが、好適な方法及び材料が以下に記載されている。本明細書中で言及されるすべての公開公報、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。本明細書で論じられる公開公報及び出願は、本願の出願日前のそれらの開示についてのみ提供される。本明細書中の記載には、本発明が、先行発明であるという理由からそのような刊行物に先行する権利がないということを認めるものと解釈されるものは何もない。加えて、それらの材料、方法及び例は、説明のためだけのものであり、限定することは意図されていない。

【００１７】

矛盾する場合、定義を含めて本明細書が優先することになる。特段の記載がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明の主題が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で使用する場合、本発明の理解を容易にするために、以下の定義が与えられる。

【００１８】

用語「ｃｏｍｐｒｉｓｅ／ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ（…を含む）」は、ｉｎｃｌｕｄｅ／ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ（…を含む）の意味で一般に使用され、つまり１種以上の特徴又は構成要素の存在を許容する。用語「ｃｏｍｐｒｉｓｅ」及び「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」は、より限定的なものである「ｃｏｎｓｉｓｔ（からなる）」及び「ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ（からなる）」、並びに「ｃｏｎｓｉｓｔ／ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ（本質的に…からなる）」もそれぞれ包含する。

【００１９】

本明細書及び請求項で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、文脈と明らかに矛盾する場合を除いて複数の指示対象を含む。

【００２０】

本明細書で使用される場合、「少なくとも１つ（１種）」とは、「１つ（１種）以上」、「２つ（２種）以上」、「３つ（３種）以上」等を意味する。例えば、少なくとも１つ（１種）は、１種以上の構築物を意味し、１種の構築物、２種の構築物、３種の構築物等を指す。

【００２１】

本明細書で使用する場合、用語「対象」／「必要とする対象」、又は「患者」／「必要とする患者」は当該技術分野で十分に認識されており、本明細書中では、イヌ、ネコ、ラット、マウス、サル、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ラクダ、最も好ましくはヒトを含む哺乳動物を指すために互換的に使用される。ある場合には、上記対象は、処置の必要がある対象若しくは疾患又は障害を抱える対象である。しかしながら、他の態様では、上記対象は、健康な対象であることができる。この用語は、特定の年齢も性別も表さない。従って、雄であろうと雌であろうと、成人及び新生の対象が包含されることが意図されている。好ましくは、対象はヒト、最も好ましくは、癌に罹患するリスクのあるヒトである

。
【００２２】
本発明によれば、癌は固形又は液体の癌である。１つの態様では、癌は固形癌である。好ましくは、固形癌は、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮癌、頭頸部癌、神経膠芽腫、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、腎臓癌、前立腺癌、胃癌、気管支癌、膵臓癌、膀胱癌、肝臓癌、脳腫瘍及び皮膚癌、特に黒色腫、又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む非限定的な群から選択される。
【００２３】
用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用され、任意の種類のデオキシリボヌクレオチド（例えばＤＮＡ、ｃＤＮＡ、．．．）若しくはリボヌクレオチド（例えばＲＮＡ、ｍＲＮＡ、．．．）のポリマー、又はデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの組み合わせ（例えばＤＮＡ／ＲＮＡ）のポリマーで、直鎖状又は環状の立体構造の、一本鎖又は二本鎖の形態のものを指す。これらの用語は、ポリマーの長さに関して限定的に解釈されるものではなく、天然ヌクレオチドの公知の類似体、並びに塩基、糖及び／又はリン酸部分が修飾されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート骨格）を包含することができる。一般的に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対形成の特異性を持つ。すなわち、Ａの類似体はＴと塩基対形成する。
【００２４】
用語「ベクター」は、本明細書で使用される場合、ウイルスベクター、又はプラスミド若しくは他のビヒクル等の核酸（ＤＮＡ若しくはＲＮＡ）分子を指し、これらは本発明の１種以上の異種核酸配列を含有し、好ましくは、異なる宿主細胞間での移動（導入）及び／又は増幅目的のために設計される。
【００２５】
用語「発現ベクター」、「遺伝子導入ベクター」及び「遺伝子療法ベクター」は、本発明の１種以上の核酸を、好ましくはプロモーターの制御下で細胞内に組み込んで発現させるのに有効な任意のベクターを指す。クローニングベクター又は発現ベクターは、プロモーターに加えて、例えば、調節エレメント（要素）や転写後調節エレメント等の追加エレメントを含んでいてもよい。
【００２６】
本明細書で使用される場合、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）は、ＩＬ－１０ファミリーサイトカインのメンバーを指す。ＩＬ－１０は、制御されない炎症応答によって引き起こされる組織損傷を低減するので、概して免疫抑制性であると考えられる。「ＩＬ－１０、その断片又は多様体」は、好ましくは天然ヒトＩＬ－１０、並びにＭｕｍｍら、２０１１、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ、２０、７８１－７９６；Ｇｕｏら、２０１２，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ．、８３、１５２－１５６（２０１２）；Ｚｈｅｎｇら、１９９７、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５８、４５０７－１３；Ｑｉａｏら、２０１９、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ３５、９０１－９１５；Ｇｕｏら、２０２１、Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２２、７４６－７５６に記載されるようなＩＬ－１０の断片及び多様体の配列を含む配列を含み、上記の文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。１つの態様では、上記ＩＬ－１０配列は配列番号１で示されるヒトＩＬ－１０アミノ酸配列である。
【００２７】
用語「多様体」（バリアント）は、ＩＬ－１０に関する場合、ＩＬ－１０の、好ましくは本発明のヒトＩＬ－１０配列の１種以上の生物学的に活性な誘導体を意味する。一般に、「多様体」という用語は、天然配列を有し、天然分子と比較して１つ以上の付加、置換（一般に、本質的に保存的）及び／又は欠失を有するが、その修飾がその生物学的活性を破壊せず、参照分子と「実質的に相同」である範囲にある分子を指す（Ｇｏｒｂｙら、Ｓｃｉ．Ｓｉｇｎａｌ． １３、ｅａｂｃ０６５３、２０２０；Ｓａｘｔｏｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ３７１、ｅａｂｃ８４３３、２０２１）。一般に、このような多様体の配列は、参照配列に対して高度の配列相同性又は同一性、例えば、２つの配列がアラインメントさ

れる場合、２５％超、一般に５０％超～７０％、さらにより具体的には８０％又は８５％以上、例えば少なくとも９０％又は９５％以上の配列相同性又は配列同一性を有する。Ｓｐｅｎｃｅｒ，Ｊｕｌｉｅｔ Ｖらは、ＩＬ－１０のスプライシング形態が、ｈＩＬ－１０に対してわずか２７％の配列同一性しか有さないにもかかわらず、生物学的活性又は特性を保持することを報告した（Ｓｐｅｎｃｅｒ，Ｊｕｌｉｅｔ Ｖら、「Ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ ｂｙ ｃｍｖＩＬ－１０ ｂｕｔ ｎｏｔ ＬＡｃｍｖＩＬ－１０」、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ 第３７４巻、１（２００８）：１６４－９．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｖｉｒｏｌ．２００７．１１．０３１。この文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【００２８】

本明細書で使用される場合、本発明のＩＬ－１０、好ましくはヒトＩＬ－１０の「断片」は、それぞれのポリペプチド配列又は核酸配列よりも短いヌクレオチド長を含有する配列を指す。好ましくは、この配列又は断片は、それぞれのポリペプチド配列又は核酸配列よりも９０％短い、好ましくは６０％短い、特に３０％短いヌクレオチド長を含有する。

【００２９】

ＣＡＲ操作Ｔ細胞を用いて腫瘍を治療するための新規かつ効率的なアプローチの開発に焦点を当てているうちに、本発明者らは、驚くべきことに、ＣＡＲ Ｔを発現する代謝操作ＩＬ－１０が、ＣＡＲ Ｔ細胞の運命（ｆａｔｅ）を疲弊から離れて記憶様状態へと向け直し、処置されたマウスの大部分において、確立された固形腫瘍の根絶及び持続的な治癒をもたらすことを示した。これらの有望な結果は、ＩＬ－１０を発現するＣＡＲ Ｔ又はいずれかの他の操作された免疫細胞が臨床における養子細胞療法の有効性を増強する大きい可能性を証明した。

【００３０】

本発明は、１つの態様では、インターロイキン－１０、その断片又は多様体を発現する免疫細胞又は免疫細胞の集団を提供する。１つの態様では、この免疫細胞は単離された免疫細胞である。

【００３１】

本明細書で使用される場合、用語「免疫細胞」は、組換え（操作されたもの）であろうとなかろうと、リンパ球、好中球、及び単球／マクロファージとして分類される任意のタイプの免疫細胞を含む。好ましい態様において、免疫細胞は、Ｔ細胞、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）－Ｔ細胞、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）－トランスジェニックＴ細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、ＮＫ細胞、ＮＫ－Ｔ細胞、ＣＡＲ－ＮＫ細胞、ＣＡＲ－ＮＫＴ細胞、ＴＣＲ－トランスジェニックＮＫ細胞、ＴＣＲ－トランスジェニックＮＫ－Ｔ細胞、樹状細胞、マクロファージ、ＣＡＲ－マクロファージ又はいずれかの合成の腫瘍特異的免疫細胞を含む非限定的な群から選択される。免疫細胞の免疫細胞集団は、

・自己由来、すなわち患者自身の免疫細胞を使用するか、

・同種異系、すなわちドナー血液、臍帯血若しくは多能性幹細胞（遺伝子操作されてもよいｉＰＳＣ等）から得られるか、又は

・異種性

であることができる。

【００３２】

後者２つの場合において、アロ拒絶反応を減少させる戦略も考慮されるべきであるが、その戦略は当業者にとって自明である。

【００３３】

好ましくは、上記免疫細胞は、１種以上の組換え構築物を含み、少なくとも１種の組換え構築物がインターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする。

【００３４】

１つの態様では、インターロイキン－１０、その断片若しくは多様体をコードする構築物は、配列番号１のアミノ酸配列、若しくはその断片若しくは多様体を含むか又はコードする。

【００３５】
１つの態様では、インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする組換え構築物は、ＣＡＲ、ＴＣＲ、又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフをコードする第２の組換え構築物に連結されている。
【００３６】
同じく好ましくは、第２の組換え構築物は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフをコードする。合成の腫瘍標的化モチーフの非限定的な例は、例えば、Ｌｉｕ Ｒ、Ｌｉ Ｘ、Ｘｉａｏ Ｗ、ＬａｍＫＳの表２及び表３に列挙される腫瘍標的化ペプチド（コンビナトリアルライブラリーからの腫瘍標的化ペプチド［Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ． ２０１８年３月９日において公開された補正］を含み、これらの表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【００３７】
当業者は、腫瘍標的化モチーフ、例えば腫瘍標的化ペプチド等は、例えばファージディスプレイライブラリーから、インビトロ（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）、インビボ（ｉｎ ｖｉｖｏ）又はエキソビボ（ｅｘ ｖｉｖｏ）の選択アプローチから選択されるスクリーニングアプローチを介して検出することができるということを知っている（例えばＬｉｕ Ｒ、Ｌｉ Ｘ、Ｘｉａｏ Ｗ、Ｌａｍ ＫＳの図１を参照）。癌関連タンパク質、特定の癌細胞株、患者組織、及び腫瘍異種移植マウスモデルが、スクリーニングプローブとして使用することができる。
【００３８】
好ましくは、上記連結は、自己切断ペプチドをコードする配列を介する（例えば、ペプチド２Ａ（例えば、Ｔａｋａｈａｓｈｉ，Ｋ．及びＹａｍａｎａｋａ，Ｓ． Ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ｍｏｕｓｅ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ａｎｄ ａｄｕｌｔ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｃｕｌｔｕｒｅｓ ｂｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｆａｃｔｏｒｓ． Ｃｅｌｌ １２６、６６３－６７６を参照。この文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、又は配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）配列）。例えば、自己切断ペプチドが切断されると、ＩＬ－１０、その断片又は多様体は、好ましくは腫瘍微小環境において、免疫細胞によって、又は免疫細胞上で分泌されるか又は膜結合される。
【００３９】
１つの態様では、組換え構築物は、単鎖フラグメント多様体（ｓｉｎｇｌｅ－ｃｈａｉｎ Ｆｒａｇｍｅｎｔ ｖａｒｉａｎｔ、ｓｃＦｖ）の細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通領域、細胞内Ｔ細胞活性化ドメイン及び／又は細胞内領域のポリペプチドをコードするＣＡＲをコードする核酸を含む。
【００４０】
単鎖フラグメント多様体（ｓｃＦｖ）の細胞外抗原認識ドメインは、好ましくは、抗体又はリガンド又は受容体に由来する。いくつかの例では、細胞外ドメインはヒンジ部分を含む。種々のヒンジ、例えばＣＤ８ヒンジを本発明に従って用いることができる。
【００４１】
通常、抗体に由来する単鎖フラグメント多様体（ｓｃＦｖ）の細胞外抗原認識ドメインは、ｃ－ＭＥＴ、ＴＲＰ－１、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＢＣＭＡ、ＣＤ１３３、ＣＤ１７１、ＣＤ７０、ＣＥＡ、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲ－ｖＩＩＩ、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、ＦＡＰ、ＧＤ２、ＧＰＣ３、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＩＬ－１３Ｒａ２、メソテリン、ＭＵＣ１、クローディン１８．２、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、及びＶＥＧＦＲ２又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む非限定的な群から選択される抗原を認識する。好ましい態様において、本発明のＣＡＲにおける細胞外抗原認識ドメインは、例えばヒンジに連結された、ＨＥＲ２を認識するＣＤ８若しくはＣＤ２８膜貫通ドメインｓｃＦｖ（配列番号２）、ＴＲＰ－１を認識するＣＤ８若しくはＣＤ２８膜貫通ドメインｓｃＦｖ（配列番号３）、ＥＧＦＲ－ｖＩＩＩを認識するＣＤ８若しくはＣＤ２８膜貫通ドメインｓｃＦｖ（配列

番号４）又はＣＤ１９を認識するＣＤ８若しくはＣＤ２８膜貫通ドメインｓｃＦｖ（配列番号５）である。

【００４２】

膜貫通領域及びヒンジは、通常、ＣＡＲの細胞外ドメインに融合される。膜貫通領域及びヒンジは、同様に、ＣＡＲの細胞内ドメインに融合することもできる。場合によっては、膜貫通ドメインは、そのようなドメインが同じ又は異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合することを回避して受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、選択することができ、又はアミノ酸置換によって修飾することができる。膜貫通ドメインは、天然源又は合成源のいずれに由来してもよい。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質又は膜貫通タンパク質に由来してもよい。本発明において特に有用な膜貫通領域は、ＣＤ２８、ＣＤ２８Ｔ、ＯＸ－４０、４－１ＢＢ／ＣＤ１３７、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ４０、プログラム死－１（ｐｒｏｇｒａｍｍｅｄ　ｄｅａｔｈ－１、ＰＤ－１）、誘導性Ｔ細胞共刺激因子（ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ　Ｔ　ｃｅｌｌ　ｃｏｓｔｉｍｕｌａｔｏｒ、ＩＣＯＳ）、リンパ球機能関連抗原－１（ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ａｎｔｉｇｅｎ－１、ＬＦＡ－１、ＣＤｌ－ｌａ／ＣＤ１８）、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ２４７、ＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３）、ＬＩＧＨＴ、（ＴＮＦＳＦ１４）、ＮＫＧ２Ｃ、Ｉｇα（ＣＤ７９ａ）、ＤＡＰ－１０、Ｆｃγ受容体、ＭＨＣクラス１分子、ＴＮＦ受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｉｃ　Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ）（ＳＬＡＭタンパク質）、活性化ＮＫ細胞受容体、ＢＴＬＡ、Ｔｏｌｌリガンド受容体、ＩＣＡＭ－１、Ｂ７－Ｈ３、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＧＩＴＲ、ＢＡＦＦＲ、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＫＩＲＤＳ２、ＳＬＡＭＦ７、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４６、ＣＤ１９、ＣＤ４、ＣＤ８α、ＣＤ８β、ＩＬ－２Ｒβ、ＩＬ－２Ｒγ、ＩＬ－７Ｒα、ＩＴＧＡ４、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＴＧＡ４、ＩＡ４、ＣＤ４９Ｄ、ＩＴＧＡ６、ＶＬＡ－６、ＣＤ４９ｆ、ＩＴＧＡＤ、ＣＤｌ　ｌｄ、ＩＴＧＡＥ、ＣＤ１０３、ＩＴＧＡＬ、ＣＤｌ　ｌａ、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＡＭ、ＣＤｌ　ｌｂ、ＩＴＧＡＸ、ＣＤｌ　ｌｃ、ＩＴＧＢｌ、ＣＤ２９、ＩＴＧＢ２、ＣＤ１８、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＢ７、ＮＫＧ２Ｄ、ＴＮＦＲ２、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴ　ＡＭ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＰＳＧＬ１、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ６９、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙｌ０８）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＬＴＢＲ、ＬＡＴ、ＧＡＤＳ、ＳＬＰ－７６、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＣＤ１９ａ、ＣＤ８３と特異的に結合するリガンド、又はこれらのいずれかの組み合わせに由来してもよい（これらを含んでもよく、又はこれらに対応してもよい）。

ＣＤ１９ａ。

【００４３】

任意選択で、短いリンカーが、ＣＡＲの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインのいずれか又はいくつかの間の連結を形成してもよい。

好ましい態様では、本発明のＣＡＲにおける膜貫通ドメイン及びヒンジは、ＣＤ８膜貫通ドメイン及びヒンジである。１つの態様では、ＣＤ８膜貫通ドメイン及びヒンジは、配列番号６、その断片又は多様体のアミノ酸配列の膜貫通部分及びヒンジを含む。

【００４４】

細胞内Ｔ細胞活性化ドメインは、抗原結合分子がその標的に結合するとＴ細胞を活性化することができる。細胞内ドメインは、典型的には、本明細書に記載される１種以上の共刺激分子をさらに含むことが理解されるであろう。

【００４５】

さらなる態様では、Ｔ細胞活性化ドメインは、配列番号７、その断片又は多様体のアミ

ノ酸配列のＣＤ３、好ましくはＣＤ３ゼータ、より好ましくはＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）を含む。

【００４６】

本明細書で使用される「共刺激分子」は、増殖、活性化、分化等を含むがこれらに限定されないＴ細胞応答を媒介するシグナルを提供する分子を指す。共刺激分子は、本明細書に記載される活性化分子によって提供される一次シグナルに加えてシグナルを提供することができる。

【００４７】

本発明の操作されたＴ細胞の細胞内（細胞質）領域は、免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも１つの活性化を提供することができる。Ｔ細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性又はヘルパー活性を指してもよい。

【００４８】

適切な細胞内領域としては、限定されないが、ＣＤ２８、ＣＤ２８Ｔ、ＯＸ－４０、４－１ＢＢ／ＣＤ１３７、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ４０、プログラム死－１（ＰＤ－１）、誘導性Ｔ細胞共刺激因子（ＩＣＯＳ）、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１、ＣＤｌ－ｌａ／ＣＤ１８）、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ２４７、ＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３）、ＬＩＧＨＴ、（ＴＮＦＳＦ１４）、ＮＫＧ２Ｃ、Ｉｇα（ＣＤ７９ａ）、ＤＡＰ－１０、Ｆｃγ受容体、ＭＨＣクラス１分子、ＴＮＦ受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（ＳＬＡＭタンパク質）、活性化ＮＫ細胞受容体、ＢＴＬＡ、Ｔｏｌｌリガンド受容体、ＩＣＡＭ－１、Ｂ７－Ｈ３、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＧＩＴＲ、ＢＡＦＦＲ、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＫＩＲＤＳ２、ＳＬＡＭＦ７、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４６、ＣＤ１９、ＣＤ４、ＣＤ８α、ＣＤ８β、ＩＬ－２Ｒβ、ＩＬ－２Ｒγ、ＩＬ－７Ｒα、ＩＴＧＡ４、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＴＧＡ４、ＩＡ４、ＣＤ４９Ｄ、ＩＴＧＡ６、ＶＬＡ－６、ＣＤ４９ｆ、ＩＴＧＡＤ、ＣＤｌ　ｌｄ、ＩＴＧＡＥ、ＣＤ１０３、ＩＴＧＡＬ、ＣＤｌ　ｌａ、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＡＭ、ＣＤｌ　ｌｂ、ＩＴＧＡＸ、ＣＤｌ　ｌｃ、ＩＴＧＢｌ、ＣＤ２９、ＩＴＧＢ２、ＣＤ１８、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＢ７、ＮＫＧ２Ｄ、ＴＮＦＲ２、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴ　ＡＭ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＰＳＧＬ１、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ６９、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙｌ０８）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＬＴＢＲ、ＬＡＴ、ＧＡＤＳ、ＳＬＰ－７６、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＣＤ１９ａ、ＣＤ８３と特異的に結合するリガンド、又はこれらのいずれかの組み合わせに由来する（又は対応する）シグナル伝達ドメインが挙げられる（すなわち、これらを含む）ことが理解されるであろう。

【００４９】

組み合わせの例は、４－１ＢＢ及びＣＤ２８細胞内領域を含む。

【００５０】

好ましい態様では、ＣＡＲの細胞内ドメインは４－１ＢＢ細胞内領域を含む。

【００５１】

本発明に係る例示的なＣＡＲ構築物は、図１ａ、図４ａ、及び図７ａに示されるとおりである。

【００５２】

第２の組換え構築物がトランスジェニックＴＣＲをコードする場合、このＴＣＲは、好ましくは、ｇｐ１００、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ３及びＴＲＰ－１、又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む非限定的な群から選択される抗原を認識する。

【００５３】

１つの態様では、インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする構築物は、Ｆｃ、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、又は抗体融合タンパク質をコードする配列内に

含まれる。

【００５４】

本発明の一態様では、本明細書に記載される免疫細胞又は免疫細胞の集団は、癌の予防及び／又は治療に使用するためのものである。癌は、固体癌又は液体癌のいずれかであることができる。

【００５５】

好ましくは、癌は、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮癌、頭頸部癌、神経膠芽腫、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、腎臓癌、前立腺癌、胃癌、気管支癌、膵臓癌、膀胱癌、肝臓癌、脳腫瘍、リンパ腫及び皮膚癌、特に黒色腫、又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む非限定的な群から選択される固形癌である。より好ましくは、固形癌は、リンパ腫、乳癌、胃癌及び黒色腫を含む群から選択される。

【００５６】

本発明はさらに、本明細書中に開示される配列番号を含む、本明細書中に記載される１種以上の組換え構築物をコードする核酸配列を提供する。

【００５７】

本発明はさらに、本明細書中に開示される配列番号を含む、本明細書中に記載される１種以上の組換え構築物をコードする核酸配列を含むプラスミド又はベクターを提供する。

【００５８】

当該技術分野で公知の任意のベクターが、本発明に適切である可能性がある。いくつかの態様では、ベクターはウイルスベクターである。いくつかの態様では、ベクターは、レトロウイルスベクター（ｐＭＳＧＶ等）、ＤＮＡベクター、マウス白血病ウイルスベクター、ＳＦＧベクター、ＲＮＡベクター、アデノウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、エプスタイン・バーウイルスベクター、パポーバウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルス随伴ベクター（ＡＡＶ）、レンチウイルスベクター（ｐＧＡＲ等）、又はこれらのいずれかの組み合わせである。

【００５９】

本発明は、組成物及び医薬組成物も企図する。

本発明の一態様では、本発明の医薬組成物は、治療有効量のｉ）本明細書に記載される免疫細胞若しくは免疫細胞の集団、ｉｉ）本明細書に記載される核酸、及び／又はｉｉｉ）本明細書に記載されるプラスミド若しくはベクターと、少なくとも１種の薬学的に許容できる担体及び／又は希釈剤とを含む。

【００６０】

本明細書で使用される用語「治療有効量」は、健全な医学的判断の範囲内で、治療するべき症状及び／又は状態を有意に良い方向に変更するのに十分な高さでありながら、重篤な副作用を回避するのに十分な低さである（合理的なリスク／効果比である）、免疫細胞、核酸、プラスミド又はベクターの量を意味する。

【００６１】

本明細書に記載される免疫細胞、核酸、プラスミド又はベクターの治療有効量は、患者又は対象の種類、種、年齢、体重、性別及び医学的状態；治療すべき状態又は疾患（例えば、癌）の重症度；投与経路；患者又は対象の腎機能及び肝機能を含む様々な因子に従って選択される。当業者は、例えば癌等の疾患の進行を予防、対抗又は阻止するために必要な当該免疫細胞、核酸、プラスミド又はベクターの有効量を容易に決定し、処方することができる。

【００６２】

「薬学的に許容できる担体又は希釈剤」は、一般的に安全で、非毒性で、望ましい医薬組成物を調製するのに有用な担体又は希釈剤を意味し、ヒトの医薬用途に許容できる担体又は希釈剤が含まれる。

【００６３】

本発明の免疫細胞又は免疫細胞の集団は、単独で、又は医薬組成物として投与されても

よい。本発明の医薬組成物は、本明細書に記載される免疫細胞又は細胞集団、例えばＴ細胞を、１種以上の薬学的又は生理学的に許容できる担体又は希釈剤と組み合わせて含んでもよい。このような組成物は、緩衝液、例えば中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水等；炭水化物、例えばグルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトール；タンパク質；ポリペプチド又はアミノ酸、例えばグリシン；抗酸化剤；キレート剤、例えばＥＤＴＡ又はグルタチオン；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；及び保存剤を含んでもよい。本発明の組成物は、好ましくは静脈内投与用に製剤化される。

【００６４】

当該医薬組成物（溶液、懸濁液等）は、以下のうちの１種以上を含んでもよい：滅菌希釈剤、例えば注射用水、食塩水、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張塩化ナトリウム、不揮発性油、例えば溶媒又は懸濁媒体として機能しうる合成のモノグリセリド又はジグリセリド、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミンテトラ酢酸；緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩、及び張度の調整のための薬剤、例えば塩化ナトリウム又はデキストロース。非経口調製物は、ガラス製又はプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ又は複数回用量バイアルに封入することができる。注射用医薬組成物は、好ましくは無菌である。

【００６５】

本発明の医薬組成物は、少なくとも１種の追加の治療剤又は療法をさらに含むことができる。様々な他の追加の治療剤が、本明細書に記載される組成物と併せて使用されてもよい。

１つの態様では、上記少なくとも１種の追加の治療剤又は療法は、癌、好ましくは固形癌を治療するのに有用な抗癌剤又は抗癌療法である。好ましくは、この１種以上の抗癌療法は、放射線療法、化学療法、免疫チェックポイント阻害剤、免疫療法及びホルモン療法、又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む群から選択されるであろう。

【００６６】

好ましくは、免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、及びＣＴＬＡ－４阻害剤、又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む群から選択される。

【００６７】

例えば、潜在的に有用な追加の治療剤には、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（オプジーボ）（登録商標））、ペムブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（キイトルーダ）（登録商標））、ペムブロリズマブ、ピディリズマブ、及びアテゾリズマブ等のＰＤ－１阻害剤が含まれる。

【００６８】

例えば、潜在的に有用な追加の治療剤には、アテゾリズマブ、アベルマブ、ＡＭＰ－２２４、ＭＥＤＩ－０６８０、ＲＧ－７４４６、ＧＸ－Ｐ２、デュルバルマブ、ＫＹ－１００３、ＫＤ－０３３、ＭＳＢ－００１０７１８Ｃ、ＴＳＲ－０４２、ＡＬＮ－ＰＤＬ、ＳＴＩ－Ａ１０１４、ＣＸ－０７２、及びＢＭＳ－９３６５５９等のＰＤ－Ｌ１阻害剤が含まれる。

【００６９】

ＣＴＬＡ－４阻害剤の非限定的な例としては、イピリムマブ（Ｙｅｒｖｏｙ（ヤーボイ））（ＢＭＳ－７３４０１６、ＭＤＸ－０１０、ＭＤＸ－１０１としても知られる）及びトレメリムマブ（以前はチシリムマブ、ＣＰ－６７５，２０６）が挙げられる。

【００７０】

本発明の化学療法は、ＤＮＡを損傷し、かつ／又は細胞が増殖するのを妨げる薬剤、例えば遺伝子毒素、に関することができる。

【００７１】

遺伝子毒素は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、ＤＮＡカッター、ＤＮＡバインダ、トポイ

ソメラーゼ毒及び紡錘体毒を含む群から選択することができる。アルキル化剤の例は、ロムスチン、カルムスチン、ストレプトゾシン、メクロレタミン、メルファラン、ウラシルナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、シクロスファミド、イホスファミド、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、チオテパ、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、トリエチレンメラミン、ブスルファン、ピポブロマン、ミトタン及び他のプラチン誘導体である。

【００７２】

ＤＮＡカッターの例はブレオマイシンである。

【００７３】

トポイソメラーゼ毒は、トポテカン、イリノテカン、カンプトテシンナトリウム塩、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、テニポシド、アドリアマイシン及びエトポシドを含む群から選択することができる。

【００７４】

ＤＮＡバインダの例は、ダクチノマイシン及びミトラマイシンであるが、紡錘体毒は、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ナベルビン、パクリタキセル及びドセタキセルを含む群から選択することができる。

【００７５】

本発明の化学療法は、以下の化合物から選択される代謝拮抗物質に関することができる：メトトレキサート、トリメトレキサート、ペントスタチン、シタラビン、ａｒａ－ＣＭＰ、フルダラビンリン酸塩、ヒドロキシ尿素、フルオロウラシル、フロクスウリジン、クロロデオキシアデノシン、ゲムシタビン、チオグアニン及び６－メルカプトプリン。

【００７６】

放射線療法は、腫瘍を縮小させ、癌細胞を死滅させるための高エネルギー放射線の使用を指す。放射線療法の例としては、限定されないが、外部放射線療法及び内部放射線療法（密封小線源療法とも呼ばれる）が挙げられる。

【００７７】

外部放射線療法は最も一般的であり、典型的には、直接又は間接の電離放射線のビームを腫瘍又は癌の部位に向けることを含む。放射線ビーム、光子、コバルト又は微粒子療法は、腫瘍又は癌の部位に集中されるが、正常な健康な組織の曝露を回避することはほとんど不可能である。外部放射線療法のためのエネルギー源は、直接又は間接の電離放射線（例えば、ｘ線、γ線及び粒子線又はこれらの組み合わせ）を含む群から選択される。

【００７８】

内部放射線療法は、体内、腫瘍部位又はその近傍に放射線放出源、例えば、ビーズ、ワイヤー、ペレット、カプセル等を埋め込むことを含む。内部放射線療法のためのエネルギー源は、ヨウ素（ヨウ素１２５又はヨウ素１３１）、ストロンチウム８９、リン、パラジウム、セシウム、インジウム、リン酸塩、又はコバルトの放射性同位体、及びこれらの組み合わせを含む放射性同位体の群から選択される。そのような埋め込み物は、治療後に除去するか、又は体内に不活性のままにすることができる。内部放射線療法の種類には、間質密封小線源療法及び腔内密封小線源療法（高線量率、低線量率、パルス線量率）が含まれるが、これらに限定されない。

【００７９】

現在あまり一般的でない形態の内部放射線療法は、放射性物質に結合した腫瘍特異的抗体が患者又は対象に投与される放射性免疫療法による等の放射性同位体の生物学的担体を含む。抗体は腫瘍抗原に結合し、これにより放射線の線量を関連組織に効果的に投与する。

【００８０】

放射線療法を施す方法は当業者に周知である。

【００８１】

様々な他の追加の治療剤が、本明細書に記載される組成物と併せて使用されてもよい。

【００８２】

本発明と組み合わせて使用するのに適した追加の治療剤としては、イブルチニブ（Ｉｍｂｒｕｖｉｃａ（イムブルビカ）（登録商標））、オファツムマブ（Ａｒｚｅｒｒａ（アーゼラ）（登録商標））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（リツキサン）（登録商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（アバスチン）（登録商標））、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（ハーセプチン）（登録商標））、トラスツズマブエムタンシン（ＫＡＤＣＹＬＡ（カドサイラ）（登録商標））、イマチニブ（Ｇｌｅｅｖｅｃ（グリベック）（登録商標））、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（アービタックス）（登録商標））、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（ベクティビックス）（登録商標））、カツマキソマブ、イブリツモマブ、オファツムマブ、トシツモマブ、ブレンツキシマブ、アレムツズマブ、ゲムツズマブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、バンデタニブ、アファチニブ、ラパチニブ、ネラチニブ、アキシチニブ、マシチニブ、パゾパニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、トセラニブ、レスタウルチニブ、アキシチニブ、セジラニブ、レンバチニブ、ニンテダニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブ、セマキサニブ（ｓｅｍａｘａｎｉｂ）、ソラフェニブ、スニチニブ、チボザニブ、トセラニブ、バンデタニブ、エヌトレクチニブ、カボザンチニブ、イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、ポナチニブ、ラドチニブ（ｒａｄｏｔｉｎｉｂ）、ボスチニブ、レスタウルチニブ、ルキソリチニブ、パクリチニブ、コビメチニブ、セルメチニブ、トラメチニブ、ビニメチニブ、アレクチニブ、セリチニブ、クリゾチニブ、アフリベルセプト、アディポチド（ａｄｉｐｏｔｉｄｅ）、デニロイキンジフチトクス、ｍＴＯＲ阻害剤、例えばエベロリムス及びテムシロリムス、ヘッジホッグ阻害剤、例えばソニデギブ及びビスモデギブ、ＣＤＫ阻害剤、例えばＣＤＫ阻害剤（パルボシクリブ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８３】

さらなる態様では、追加の治療剤は抗炎症剤であってもよい。抗炎症剤又は抗炎症薬としては、ステロイド及びグルココルチコイド（ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン酢酸エステル、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロンを含む）、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤＳ）、例えばアスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗ＴＮＦ薬、シクロホスファミド及びミコフェノール酸が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なＮＳＡＩＤとしては、イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、Ｃｏｘ－２阻害剤、及びシアリレートが挙げられる。例示的な鎮痛剤としては、アセトアミノフェン、オキシコドン、トラマドール又はプロポキシフェン塩酸塩が挙げられる。例示的なグルココルチコイドとしては、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、又はプレドニゾンが挙げられる。例示的な生体応答修飾物質としては、細胞表面マーカー（例えば、ＣＤ４、ＣＤ５等）に対する分子、サイトカイン阻害剤、例えば、ＴＮＦアンタゴニスト（例えば、エタネルセプト（ＥＮＢＲＥＬ（エンブレル）（登録商標））、アダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（ヒュミラ）（登録商標））及びインフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（レミケード）（登録商標））、ケモカイン阻害剤及び接着分子阻害剤が挙げられる。生体応答修飾物質には、モノクローナル抗体及び分子の組換え形態が含まれる。例示的なＤＭＡＲＤとしては、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシラミン、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、金製剤（経口（オーラノフィン）及び筋肉内）及びミノサイクリンが挙げられる。

【００８４】

本発明は、癌の治療及び／又は予防の方法をさらに企図する。

【００８５】

用語「治療」又は「治療する」は、

（ｉ）疾患を阻害すること、すなわち臨床症状の進行を停止すること、及び／又は

（ｉｉ）疾患を軽減すること、すなわち臨床症状の退行を引き起こすこと

を目的として、本開示の組成物、医薬組成物、治療剤、化合物等を対象に投与することを

意味する。
【００８６】
本明細書で使用される場合、用語「予防」又は「予防する」は、疾患を予防すること、すなわち疾患の臨床症状を発症させないことを目的として、本開示の組成物、医薬組成物、治療剤、化合物等を対象に投与することを意味する。
【００８７】
本発明の文脈では、疾患は、癌、好ましくは本明細書に開示される固形腫瘍である。
【００８８】
１つの態様では、患者又は対象における癌の治療及び／又は予防の方法は、（ｉ）免疫細胞、好ましくは天然（ｎａｔｉｖｅ）Ｔ細胞を前記患者又は対象から取り出して単離する工程と、（ｉｉ）前記Ｔ細胞を、インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする１種の組換え構築物、及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフ若しくは抗原をコードする第２の組換え構築物を用いて遺伝子操作する工程と、（ｉｉｉ）操作されたＴ細胞のより大きい集団へとエキソビボで増殖させる工程と、（ｉｖ）前記操作されたＴ細胞を前記患者又は対象に再導入する工程とを含む。操作されたＴ細胞が患者又は対象に再導入された後、それらは、本明細書に記載される腫瘍標的化モチーフ又は抗原を発現する細胞に対する免疫応答を媒介する。この免疫応答には、Ｔ細胞によるＩＬ－１０、その断片又は多様体、及び他のサイトカインの分泌、腫瘍標的化モチーフ又は抗原を認識するＴ細胞のクローン増殖、並びに標的陽性細胞のＴ細胞媒介性特異的死滅が含まれる。
【００８９】
１つの態様では、当該癌の治療及び／又は予防の方法は、（ｉ）免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を患者若しくは対象から取り出して単離するか、又は免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を準備する工程と、（ｉｉ）前記Ｔ細胞を、インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする少なくとも１種の組換え構築物、及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフ若しくは抗原をコードする第２の組換え構築物を用いて遺伝子操作する工程と、（ｉｉｉ）操作されたＴ細胞のより大きい集団へとエキソビボで増殖させる工程と、（ｉｖ）前記患者又は対象に再導入する工程とを含む。
【００９０】
１つの態様では、当該対象における癌の治療及び／又は予防の方法は、本発明の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む。
【００９１】
１つの態様では、上記の治療及び／又は予防の方法は、少なくとも１種の追加の治療剤又は療法、好ましくは抗癌剤又は抗癌療法、より好ましくは治療有効量又は治療有効用量の抗癌剤又は抗癌療法を投与することをさらに含むことができる。上記１種以上の抗癌剤又は抗癌療法は、上記のとおり、放射線療法、化学療法、免疫チェックポイント阻害剤、免疫療法及びホルモン療法、又はこれらの１つ以上の組み合わせを含む非限定的な群から選択される。
【００９２】
種々の公知の技術を、本発明に係るポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、抗原結合分子、免疫細胞、組成物等の作製に利用することができる。
【００９３】
本明細書に記載される免疫細胞のインビトロ操作又は遺伝子改変の前に、細胞は、対象から得て単離されてもよい。いくつかの態様では、免疫細胞はＴ細胞を含む。Ｔ細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含む、いくつかの供給源から得ることができる。特定の態様では、Ｔ細胞は、ＦＩＣＯＬＬ（商標）分離等の当業者に公知の任意の数の技法を使用して、対象から収集された血液の単位から得ることができる。細胞は、好ましくは、アフェレーシスによって個体の循環血液から得ることができる。アフェレーシス産

物は、典型的には、Ｔ細胞を含むリンパ球、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、及び血小板を含有する。特定の実施形態では、アフェレーシスによって収集された細胞は、血漿画分を除去するために洗浄され、その後の処理のために適切な緩衝液又は培地に入れられてもよい。この細胞はＰＢＳで洗浄されてもよい。理解されるように、洗浄工程が使用されてもよい。洗浄後、細胞は、種々の生体適合性緩衝液、又は緩衝液を含む若しくは含まない他の食塩水に再懸濁されてもよい。特定の態様では、アフェレーシス試料の望ましくない成分が除去されてもよい。

【００９４】

特定の態様では、Ｔ細胞は、赤血球を溶解し、例えばＰＥＲＣＯＬＬ（商標）勾配による遠心分離を使用して、単球を枯渇させることによってＰＢＭＣから単離される。ＣＤ２８$^+$、ＣＤ４$^+$、ＣＤ８$^+$、ＣＤ４５ＲＡ$^+$、及びＣＤ４５ＲＯ$^+$Ｔ細胞等のＴ細胞の特定の亜集団は、当該技術分野で公知の正の又は負の選択技術によってさらに単離することができる。例えば、負の選択によるＴ細胞集団の濃縮（富化）は、負に選択される細胞に特有の表面マーカーに対する抗体の組み合わせを用いて達成することができる。本発明で使用するための１つの方法は、負の磁気免疫付着（ｎｅｇａｔｉｖｅ ｍａｇｎｅｔｉｃ ｉｍｍｕｎｏａｄｈｅｒｅｎｃｅ）、又は負に選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用するフローサイトメトリによる細胞選別及び／又は選択である。例えば、負の選択によってＣＤ４$^+$細胞を濃縮するためには、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、ＣＤ１４、ＣＤ２０、ＣＤ１１Ｂ、ＣＤ１６、ＨＬＡ－ＤＲ、及びＣＤ８に対する抗体を含む。フローサイトメトリ及び細胞選別も、本発明に使用するための目的の細胞集団を単離するために使用されてもよい。

【００９５】

ＰＢＭＣは、本明細書に記載される方法を使用して、免疫細胞（ＣＡＲ又はＴＣＲ等）による遺伝子改変に直接使用されてもよい。特定の態様では、ＰＢＭＣを単離した後、Ｔリンパ球をさらに単離することができ、細胞傷害性Ｔリンパ球及びヘルパーＴリンパ球の両方を、遺伝子改変及び／若しくは増殖の前又は後のいずれかに、ナイーブ、メモリー、及びエフェクターＴ細胞の亜集団に選別することができる。

【００９６】

いくつかの態様では、ＣＤ８$^+$細胞は、ナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、及びエフェクター細胞のそれぞれに関連する細胞表面抗原を特定することによって、これらのタイプのＣＤ８$^+$細胞にさらに選別される。

【００９７】

本明細書に記載される免疫細胞は、公知の方法を用いて単離後に遺伝子改変することができ、又は当該免疫細胞は、遺伝子改変される前に、インビトロで、活性化及び増殖することができるし（例えば、ＴＩＬ細胞）、又は前駆細胞の場合、分化させることができる。別の実施形態では、Ｔ細胞等の免疫細胞は、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体により遺伝子改変され（例えば、ＣＡＲをコードする１種以上のヌクレオチド配列を含むウイルスベクターで形質導入され）、次いで、インビトロで活性化され、かつ／又は増殖させられる。Ｔ細胞を活性化し増殖させる方法は当該技術分野で公知であり、例えば、米国特許第６，９０５，８７４号明細書；米国特許第６，８６７，０４１号明細書；米国特許第６，７９７，５１４号明細書；及びＰＣＴ国際公開第２０１２／０７９０００号パンフレットに記載されており、これらの内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一般に、このような方法は、ＰＢＭＣ又は単離されたＴ細胞を、適切なサイトカイン、例えばＩＬ－２を有する培養培地中で、一般に、ビーズ又は他の表面に付着した、刺激分子及び共刺激分子、例えば抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体と接触させること含む。他の態様において、Ｔ細胞は、米国特許第６，０４０，１７７号明細書；米国特許第５，８２７，６４２号明細書；及び国際公開第２０１２１２９５１４号パンフレットに記載されるもの等の方法を使用して、フィーダー細胞並びに適切な抗体及びサイトカインを用いて増殖のために活性化及び刺激されてもよく、上記の文献の内容の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【００９８】
本発明の構築物及び操作された免疫細胞を作製するための特定の方法は、例えば、ＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／１４５２０号に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【００９９】
ＰＢＭＣは、ＮＫ細胞又はＮＫＴ細胞等の他の細胞傷害性リンパ球をさらに含むことができることが理解されよう。本明細書に開示される本発明の組換え構築物を担持する発現ベクターは、ヒトドナーＴ細胞、ＮＫ細胞又はＮＫＴ細胞の集団に導入することができる。この発現ベクターを担持する首尾よく形質導入されたＴ細胞は、フローサイトメトリを用いて選別して、ＣＤ３陽性Ｔ細胞を単離し、次いで、抗ＣＤ３抗体及びＩＬ－２又は本明細書の他の箇所に記載されるような当該技術分野で公知の他の方法を用いた細胞活性化に加えて、これらのＣＡＲ発現Ｔ細胞の数を増加させるためにさらに増殖させることができる。標準的な手順は、ヒト対象に使用するための保存及び／又は調製のためのＣＡＲを発現するＴ細胞の凍結保存のために使用される。１つの態様では、Ｔ細胞のインビトロ形質導入、培養及び／又は増殖は、ウシ胎児血清及びウシ胎仔血清等の非ヒト動物由来産物の不存在下で行われる。
【０１００】
本発明のポリヌクレオチドのクローニングのために、当該ベクターは、宿主細胞（自己由来、同種異系又は異種性）に導入されて、ベクター自体の複製が可能にされ、これによりその中に含有されるポリヌクレオチドのコピーが増幅されてもよい。本発明のクローニングベクターは、概して、複製起点、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、及び選択マーカーを含むがこれらに限定されない配列成分を含有してもよい。これらのエレメントは、当業者によって適宜選択されてもよい。例えば、複製起点は、宿主細胞におけるベクターの自律複製を促進するように選択されてもよい。
【０１０１】
用語「自己由来」は、後に再導入される個体と同じ個体に由来する任意の物質を指す。
用語「同種異系」は、ある個体に由来し、次いで、同じ種の別の個体に導入される任意の物質を指し、例えば、同種異系Ｔ細胞移植が挙げられる。
【０１０２】
特定の態様では、本開示は、本明細書で提供されるベクターを含有する単離された宿主細胞を提供する。当該ベクターを含む宿主細胞は、ベクターに含まれるポリヌクレオチドの発現又はクローニングに有用であってもよい。適切な宿主細胞としては、腫瘍溶解性ウイルス、原核細胞、真菌細胞、酵母細胞、又は哺乳動物細胞等の高等真核細胞を挙げることができるが、これらに限定されない。この目的に適した原核細胞としては、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物、例えば腸内細菌科、例えばエシェリキア（大腸菌類、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、例えば、大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）、エルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）、プロテウス（Ｐｒｏｔｅｕｓ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、例えば、サルモネラ・ティフィムリウム（ネズミチフス菌、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、セラチア（セラチア菌、Ｓｅｒｒａｔｉａ）、例えば、セラチア・マルセセンス（霊菌、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ）、及び赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）、並びにバチルス（桿菌）、例えばＢ．スブチリス（枯草菌、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）及びＢ．リケニフォルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、例えばＰ．エルギノーサ（緑膿菌、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、及びストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）が挙げられるが、これらに限定されない。
【０１０３】
ベクターは、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介送達、リン酸カルシウム沈殿法、カチオン性脂質媒介送達、リポソーム媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、微粒子銃、受容体媒介遺伝子送達、ポリリジン、ヒストン、キトサン、及びペプチドによって媒

介される送達を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において公知の任意の適切な方法を使用して宿主細胞に導入することができる。目的のベクターの発現のための細胞のトランスフェクション及び形質転換のための標準的な方法は、当該技術分野において周知である。

【０１０４】

対象における抗腫瘍活性を増強する方法であって、（ｉ）免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を前記対象から取り出して単離するか、又は免疫細胞、好ましくは天然Ｔ細胞を準備する工程と、（ｉｉ）前記Ｔ細胞を、インターロイキン－１０、その断片又は多様体をコードする少なくとも１種の組換え構築物、及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はいずれかの他の合成の腫瘍標的化モチーフ若しくは抗原をコードする第２の組換え構築物を用いて遺伝子操作する工程と、（ｉｉｉ）操作されたＴ細胞のより大きい集団へとエキソビボで増殖させる工程と、（ｉｖ）前記患者又は対象に再導入する工程とを含む方法も企図される。

【０１０５】

本発明に係る１つ以上の方法を実施するためのキットも企図される。

【０１０６】

１つ以上の容器中に本発明の組成物又は医薬組成物を含むキットがさらに企図される。組成物は、液体形態であってもよいし、又は凍結されてもよい。組成物に適した容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックを含む様々な材料から形成することができる。当該キットは、処方についての情報又は指示、薬物の量、組成等を含んでもよい説明書をさらに含んでもよい。

【０１０７】

当業者は、本明細書に記載される発明が、癌を治療するためのＩＬ－１０発現免疫細胞（ＣＡＲ　Ｔ又はＴＣＲ　Ｔ等）移植療法の使用に限定されないということを理解するであろう。ＩＬ－１０発現ＣＡＲ　Ｔ細胞は、抗腫瘍免疫を増強するＩＬ－１０の腫瘍標的送達のための１つの例示的戦略と考えることができるので、他の戦略、例えば幹細胞（Ｌｉｕ，Ｌ．ら、Ｍｅｃｈａｎｏｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｔｏ ｔａｒｇｅｔ ｃａｎｃｅｒ ｍｅｔａｓｔａｓｅｓ ｔｈｒｏｕｇｈ ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ ｃｕｅｓ．Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．９、ｅａａｎ２９６６（２０１７））、血液血小板（Ｗａｎｇ，Ｃ．ら、Ｉｎ ｓｉｔｕ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｌａｔｅｌｅｔｓ ｗｉｔｈ ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｆｏｒ ｐｏｓｔ－ｓｕｒｇｉｃａｌ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．Ｎａｔ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１、（２０１７））、腫瘍溶解性ウイルス（Ｒｉｖａｄｅｎｅｉｒａ，Ｄ．Ｂ．ら、Ｏｎｃｏｌｙｔｉｃ Ｖｉｒｕｓｅｓ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｔｏ Ｅｎｆｏｒｃｅ Ｌｅｐｔｉｎ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｒｅｐｒｏｇｒａｍ Ｔｕｍｏｒ－Ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｎｇ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ ａｎｄ Ｐｒｏｍｏｔｅ Ｔｕｍｏｒ Ｃｌｅａｒａｎｃｅ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ５１、５４８－５６０．ｅ４（２０１９））、ｍＲＮＡ（癌ワクチン、例えばＳａｈｉｎ，Ｕ．ら、Ｐｅｒｓｏｎａｌｉｚｅｄ ＲＮＡ ｍｕｔａｎｏｍｅ ｖａｃｃｉｎｅｓ ｍｏｂｉｌｉｚｅ ｐｏｌｙ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｉｍｍｕｎｉｔｙ ａｇａｉｎｓｔ ｃａｎｃｅｒ．Ｎａｔｕｒｅ ５４７、２２２－２２６（２０１７）参照）又はナノテクノロジー（Ｔａｎｇ，Ｌ．ら、Ｅｎｈａｎｃｉｎｇ Ｔ ｃｅｌｌ ｔｈｅｒａｐｙ ｔｈｒｏｕｇｈ ＴＣＲ－ｓｉｇｎａｌｉｎｇ－ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３６、７０７－７１６（２０１８））によるＩＬ－１０の腫瘍標的送達も、本明細書に記載される抗腫瘍免疫を増強するために包含されるということを予想することができる。

【０１０８】

本明細書に記載される発明は、具体的に記載されるもの以外の変形及び修正を受けてもよい。本発明は、その精神又は本質的特徴から逸脱しない範囲で、すべてのそのような変

形及び修正を含むことを理解されたい。本発明は、個々に又は集合的に、本明細書において言及され又は示される工程、特徴、組成物及び化合物のすべて、並びに上記工程若しくは特徴の任意の及びすべての組み合わせ又は任意の２つ以上をも含む。それゆえ、本開示は、すべての態様において、例示されたものであり限定的ではないとみなされるべきであり、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によって示され、均等物の意味及び範囲内に入るすべての変更は、その中に包含されることが意図される。様々な参考文献が本明細書にわたって引用され、その各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。上記の説明は、以下の実施例を参照してより完全に理解されるであろう。

【実施例】

【０１０９】

ＨＥＲ２を標的とするＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ細胞

本発明者らはまず、異所性ＩＬ－１０発現を有するＣＡＲ　Ｔが代謝適合性を調節し、それらの抗腫瘍活性を改善するか否かを調べた。ＨＥＲ２　ＣＡＲ及びＩＬ－１０遺伝子断片を２Ａ自己切断ペプチドを用いて融合させてレトロウイルスベクターｐＭＳＧＶにすることにより、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ構築物を作製した（図１ａ）。ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　ＴにおけるＨＥＲ２　ＣＡＲの細胞表面発現は、従来のＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞におけるものとほぼ同等であった（図１ｂ）。ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲによって産生されたＩＬ－１０レベルをＥＬＩＳＡによって測定した（図１ｃ）。ＩＬ－１０は、抗原刺激時にＣＤ８　Ｔ細胞の増殖を増強することが公知であるので（Ｇｕｏ，Ｙ．ら、Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ　ｏｆ　ｔｅｒｍｉｎａｌｌｙ　ｅｘｈａｕｓｔｅｄ　ＣＤ８＋　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ｂｙ　ＩＬ－１０　ｅｎｈａｎｃｅｓ　ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｒ　ｉｍｍｕｎｉｔｙ．　Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　２２、７４６－７５６（２０２１））、本発明者らは、抗原刺激を受けたときのＣＡＲ　Ｔ細胞の絶対数及び細胞分裂数を調べた。マイトマイシン処理したＭＣ３８－ＨＥＲ２マウス結腸癌細胞と共培養した場合、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞の数及び細胞分裂は、ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞の数及び細胞分裂と比較して有意に高かった（図１ｄ、ｅ）。ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞の増強された分裂は、抗ＩＬ－１０抗体によって完全に減弱され（図１ｅ）、これは、ＩＬ－１０がＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞の増殖の改善に必須であることを示した。ＭＣ３８－ＨＥＲ２細胞の共培養系において、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞の基礎酸素消費速度（ＯＣＲ）は上昇したが、細胞外酸性化速度（ＥＣＡＲ）は、ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して変化しないままであった（図１ｆ～ｉ）。他方、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ｍＩＬ－１０の存在下でＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔと同等の基礎ＯＣＲを示した。ｍＩＬ－１０の存在下でのＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ及びＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔの両方のＯＣＲ対ＥＡＣＲの比は顕著に増加し（図１ｊ）、これは、ＩＬ－１０シグナル伝達がＣＡＲ　Ｔ細胞の酸化的リン酸化（ＯＸＰＨＯＳ）を能動的に促進することを示唆した。代謝リプログラミングの結果として、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔの腫瘍溶解能は大幅に増強され（図２ａ）、一方、ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗原特異的増殖能力、殺傷効率及び多機能性は、インビボシナリオを模倣した共培養環境（Ｅ：Ｔ比０．５：１で４８時間）では、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔの群において大幅に増強された（図２ｂ～ｄ）。

これらのデータは、本発明のＩＬ－１０　ＣＡＲ　ＴがＯＸＰＨＯＳを増加させることによってＣＡＲ　Ｔ細胞代謝をリプログラミングして細胞増殖を促進することができるということを裏付け、これは、本発明のＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔが代謝介入を通してＴＭＥにおける腫瘍浸潤性ＣＡＲ　Ｔ細胞の増殖も促進できるであろうということを示す。

【０１１０】

様々な試薬によるＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞におけるＯＸＰＨＯＳの増強又は解糖代謝の阻害は、ＴＭＥにおけるＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞増殖、記憶発達、及び抗腫瘍機能を促進した（Ｓｕｋｕｍａｒ，Ｍ．ら、Ｉｎｈｉｂｉｔｉｎｇ　ｇｌｙｃｏｌｙｔｉｃ　ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ　ｅｎｈａｎｃｅｓ　ＣＤ８＋　Ｔ　ｃｅｌｌ　ｍｅｍｏｒｙ　ａｎｄ　ａｎｔｉｔｕｍｏｒ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ．　Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．　１２３、４４７９－４４８

８（２０１３））。ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞の観察した代謝調節機能に基づいて、本発明者らは次に、固形腫瘍に対する有効性を増強するためにＣＡＲ　Ｔ細胞のインビボ代謝介入が達成されることが可能か否かを調べた。

【０１１１】

ＭＣ３８－ＨＥＲ２腫瘍が予め確立された治療設定において、リンパ球枯渇前処理（４Ｇｙ）を伴うＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×１０^{6}）単独療法の養子移植は、処置マウスの８０％において完全な腫瘍退縮及び持続的な治癒を一貫して誘導した（図３ａ～ｂ）。対照的に、ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ単独療法は、腫瘍増殖阻害に対して最小限の効果しか有さなかった。ｍＩＬ－１０の静脈内投与を伴うＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔの養子移植は、腫瘍増殖を一過性に制御しただけで、腫瘍退縮を誘導することができなかった。さらには、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したすべての長期生存マウスは、治療の停止の２ヶ月後にＭＣ３８－ＨＥＲ２細胞の再負荷を拒絶し、抗腫瘍免疫記憶の誘導を示した（図３ｃ）。

【０１１２】

ＴＲＰ－１を標的とするＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ細胞

ＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ細胞療法の堅牢性を試験するために、次に、本発明者らは、免疫原性が低く、攻撃性が高いマウスＢ１６Ｆ１０黒色腫モデルも制御できるか否かを評価した。次に、ＴＲＰ－１を標的とするＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ細胞を生成し、フローサイトメトリによってＣＡＲの発現を確認した（図４ａ、ｂ）。ＩＬ－１０　ＴＲＰ－１　ＣＡＲ　Ｔ細胞のインビトロ細胞増殖及び抗腫瘍活性は、従来のＴＲＰ－１　ＣＡＲ　Ｔ細胞のものよりも優れていた（図４ｃ、ｄ）。Ｂ１６Ｆ１０マウス黒色腫を有するマウスを、ＣＡＲ　Ｔ細胞移植前に照射（４Ｇｙ）によってリンパ球枯渇させた。ＩＬ－１０　ＴＲＰ－１　ＣＡＲ　Ｔは、大部分の腫瘍保有マウスにおいて顕著な腫瘍退縮及び最終的に消失をもたらしたが、ＴＲＰ－１　ＣＡＲ　Ｔは、持続的な治療効果を伴わない一過性の腫瘍増殖阻害のみを示した（図４ｅ）。加えて、ＩＬ－１０　ＴＲＰ－１　ＣＡＲ　Ｔ療法で処置したマウスの６０％が長期生存を示した（図４ｆ）。

【０１１３】

ＥＧＦＲｖＩＩＩを標的とするＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ細胞

次に、本発明者らは、介入のＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔを、高度に攻撃的で転移性の４Ｔ１－Ｌｕｃ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ（ＥＧＦＲｖＩＩＩ及びルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）で安定にトランスフェクトされた）マウス乳癌モデルにさらに拡張した。本発明者らは、ＥＧＦＲｖＩＩＩを標的とするＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ細胞を調製した。ＣＡＲの発現及びＩＬ－１０産生を、それぞれフローサイトメトリ及びＥＬＩＳＡによって確認した（図５ａ～ｃ）。ＩＬ－１０　ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のインビトロ細胞増殖及び抗腫瘍活性は、ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のものと比較して有意に改善された（図５ｄ、ｅ）。ＢＡＬＢ／ｃマウスに４Ｔ１－Ｌｕｃ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ腫瘍細胞（５×１０^{4}）をｉ．ｖ．注射して肺転移を発症させた。マウスへのｍＩＬ－１０投与あり又はなしでのＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（３×１０^{6}）の移植は、一過性の腫瘍阻害をもたらした（図５ｆ）。注目すべきことに、ＩＬ－１０　ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は腫瘍を完全に根絶し、処置マウスの１００％において持続的な治癒をもたらした（図５ｇ）。強力な抗腫瘍効力と一致して、ＩＬ－１０　ＥＧＦＲｖＩＩＩ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、循環中に著しく高い密度のＣＡＲ　Ｔ細胞を誘導した（図５ｈ）。

【０１１４】

これらの結果は、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔが、改善されたインビボ増殖、増強された機能性を示し、最終的にＩＬ－１０発現ＣＡＲ　Ｔ細胞の優れた有効性に寄与することを示した。

【０１１５】

ＩＬ－１０　ＴＣＲ　Ｔ（Ｐｍｅｌ）細胞

ＩＬ－１０発現Ｔ細胞戦略を、高度に攻撃的なＢ１６Ｆ１０マウス黒色腫腫瘍モデルに対する腫瘍特異的Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）トランスジェニックＴ細胞（ＴＣＲ　Ｔ）にさ

らに拡張するために、本発明者らは、ＩＬ－１０発現Ｐｍｅｌ　Ｔ細胞（ＩＬ－１０　Ｐｍｅｌ　Ｔ）をこれまでの記載と同様に調製し、ＩＬ－１０産生の発現をＥＬＩＳＡによって確認した（図６ａ）。Ｂ１６Ｆ１０マウス黒色腫を有するマウスは、ＰＢＳ対照、Ｐｍｅｌ　Ｔ又はＩＬ－１０　Ｐｍｅｌ　Ｔ細胞の養子移植を受けた。ＩＬ－１０Ｐ　ｍｅｌ　Ｔ細胞は、ほとんどの腫瘍保有マウスにおいて顕著な腫瘍退縮をもたらしたが、Ｐｍｅｌ　Ｔ細胞は、わずかな腫瘍増殖阻害しか示さなかった（図６ｂ～ｅ）。加えて、ＩＬ－１０発現Ｐｍｅｌ　Ｔ細胞で処置したマウスは、Ｐｍｅｌ　Ｔ細胞で処置したマウスと比較して改善された生存を示した（図６ｆ）。同様に、このＩＬ－１０発現ＴＣＲ　Ｔ細胞戦略も、固形腫瘍に対するＴＩＬの養子移植療法の有効性の増強のために使用できよう。

【０１１６】

ＣＤ１９を標的とするヒトＩＬ－１０　ＣＡＲ　Ｔ細胞

最後に、このＩＬ－１０発現ＣＡＲ　Ｔ戦略をヒトＣＡＲ　Ｔに拡張した。ＣＤ１９　ＣＡＲ及びヒトＩＬ－１０遺伝子断片を２Ａ自己切断ペプチドを用いて融合させてレンチウイルスベクターにすることにより、ＩＬ－１０　ＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を作製した（図７ａ）。ＩＬ－１０　ＣＤ１９　ＣＡＲ　ＴにおけるＣＤ１９　ＣＡＲの細胞表面発現は、従来のＣＤ１９　ＣＡＲ　Ｔ細胞におけるものよりもわずかに高かった（図７ｂ）。ＩＬ－１０　ＣＤ１９　ＣＡＲによって産生されたＩＬ－１０レベルをＥＬＩＳＡによって測定した（図７ｃ）。従って、ＩＬ－１０　ＣＤ１９　ＣＡＲ　Ｔの腫瘍溶解能も増強され（図７ｄ）、マウスＣＡＲ　Ｔで観察された結果と一致した。さらには、確立されたＰＡＮＣ１－ＣＤ１９ヒト膵臓腫瘍を有する免疫欠損ＮＳＧマウスにおいて、ＩＬ－１０発現ＣＤ１９　ｈＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したすべてのマウスは、再発なしで完全寛解を示し（図７ｅ）、これは、ＩＬ－１０発現ヒトＣＡＲ　Ｔ細胞が、異種移植モデルにおいて固形腫瘍に対して優れた抗腫瘍能力を有することを示唆している。

【０１１７】

ＩＬ－１０発現ＣＡＲ－Ｔ細胞は、ミトコンドリア適合性を維持する

ミトコンドリア適合性の障害は、Ｔ細胞の疲弊を強化することが示されている。興味深いことに、本発明者らは、ＩＬ－１０発現が、腫瘍浸潤ＣＡＲ－Ｔ細胞におけるミトコンドリア適合性を維持し、ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞単独（２７．４％）又は外因性ＩＬ－１０と組み合わせたＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞（２１．７％）と比較して、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞における機能不全ミトコンドリアの頻度が実質的に低下する（４．８％）ことを見出した（図８ａ）。ＩＬ－１０発現は、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞におけるＭＤＲ対ＭＧの比も増加させた（図８ｂ）。ミトコンドリア超微細構造のＥＭイメージング分析は、従来のＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞と比較して、腫瘍浸潤ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞における、管形状を有する濃縮ミトコンドリア、十分に構造化されたクリステ、増加したクリステ数、及びミトコンドリアあたりのクリステの拡大した長さのさらなる証拠を提供した（図８ｃ～ｆ）。

【０１１８】

ＣＡＲ－Ｔ細胞におけるＩＬ－１０発現は、持続的な抗腫瘍免疫を誘導し、幹細胞性を促進する

ＩＬ－１０を発現するＣＡＲ－Ｔ細胞が抗腫瘍免疫記憶を発達させるか否かを調べるために、本発明者らは、養子ＣＡＲ－Ｔ細胞移植の３ヶ月後に生存マウスに再負荷した。印象的なことに、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞又はＩＬ－１０　ＴＲＰ－１　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処置した長期生存マウスの１００％が、元の腫瘍細胞の第２の負荷を拒絶した（図９ａ～ｃ）。この堅牢な免疫記憶応答が動機付けとなって、本発明者らは、リンパ組織及び循環におけるＩＬ－１０発現ＣＡＲ－Ｔ細胞の記憶表現型を調べた。処置の１２日後のＣＡＲ－Ｔ細胞（最初に移植したＣＡＲ－Ｔ細胞はすべてＣＤ４４ｈｉであった）のフローサイトメトリ分析は、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞が脾臓及び末梢血においてＴｓｃｍ表現型を有する集団（ＣＤ６２ＬｈｉＣＤ４４ｌｏ及び幹細胞抗原－１（Ｓｃａ－１）$^{+}$ＣＤ１２２$^{+}$によって定義される）に富む（ｅｎｒｉｃｈｅｄ）こと

を示した（図１０ａ及びｂ）。脾臓におけるＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞は、ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞単独と比較して約３．２倍高い頻度のＣＤ６２ＬｈｉＣＤ４４ｌｏ　Ｔ細胞を示し、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞のＣＤ６２ＬｈｉＣＤ４４ｌｏ　Ｔ細胞の大部分（約７１．２％）はＳｃａ－１＋ＣＤ１２２＋Ｔｓｃｍであった（図１０ａ及びｂ）。加えて、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞は、ＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞単独又はＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞＋外因性ＩＬ－１０と比較して、Ｓｃａ－１の実質的に増加した発現を示した（図１０ｃ）。この知見は、ＩＬ－１０　ＨＥＲ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、脾臓及び血液においてそれぞれＨＥＲ２　ＣＡＲ－Ｔ細胞よりも約３．７倍及び２．６倍高い割合のＩＬ－７Ｒα＋ＫＬＲＧ１長寿命記憶前駆体Ｔ細胞から構成されるという観察結果によってさらに確認された（図１０ｄ及びｅ）。加えて、本発明者らは、ＣＤ１９　ｈＣＡＲ－Ｔ細胞と比較して、ＩＬ－１０　ＣＤ１９　ｈＣＡＲ－Ｔ細胞の処置がＴｓｃｍに関して富化されるようであることを観察した。要するに、これらの結果は、ＩＬ－１０シグナル伝達が、長期抗腫瘍免疫に寄与するマウス及びヒトのＴｓｃｍ　ＣＡＲ－Ｔ細胞の形成を誘導しうることを示唆する。

【０１１９】

配列

【化１】

配列番号 1 - ヒトIL-10

アミノ酸配列

SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGC
QALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQV
KNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

配列番号 2 - HER2 scFv

アミノ酸配列

DYKDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP
SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVELKRATPSHNSHQVPSA
GGPTANSGEVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTV
TVSS

配列番号 3 - TRP-1 scFv

アミノ酸配列

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKTSGFNIKDYFLHWVRQRPDQGLEWIGWINPDNGNTVYDP
KFQGTASLTADTSSNTVYLQLSGLTSEDTAVYFCTRRDYTYEKAALDYWGQGASVIVSSGGG
GSGGGGSGGGGSDIQMSQSPASLSASVGETVTITCRASGNIYNYLAWYQQKQGKSPHLLVYD
AKTLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKISSLQTEDSGNYYCQHFWSLPFTFGSGTKLEIKRA

配列番号 4 - EGFRvIII scFv

アミノ酸配列

EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTNYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNNLAWYQQKPGKAPKRLIYAASNLQ
SGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIK

配列番号 5 - CD19 scFv

アミノ酸配列

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEV
KLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALK
SRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

【化２】

配列番号 6 - CD8 膜貫通ドメイン及びヒンジ

アミノ酸配列

TTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLI
ITLICYHRSR

配列番号 7 - CD3ζ

アミノ酸配列

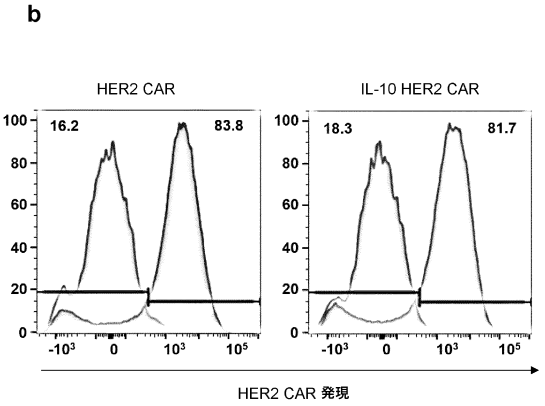
RAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQQRRRNPQEGVYNA
LQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR

【図面】

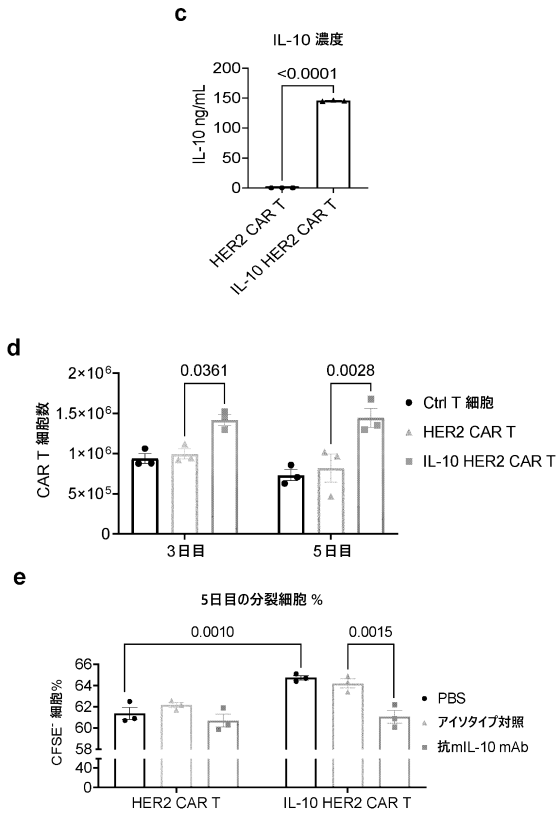
【図１（１）】



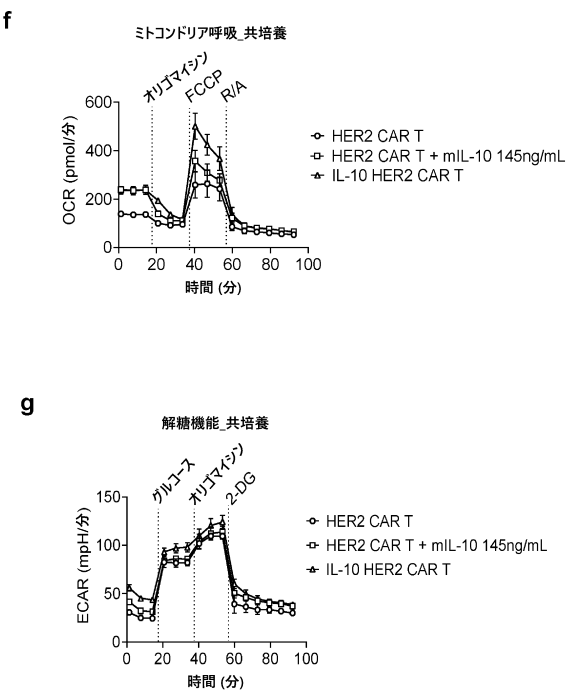
【図１（２）】



【図１（３）】



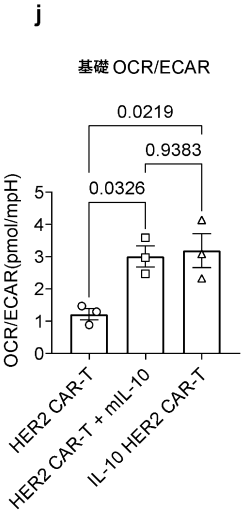
【図１（４）】



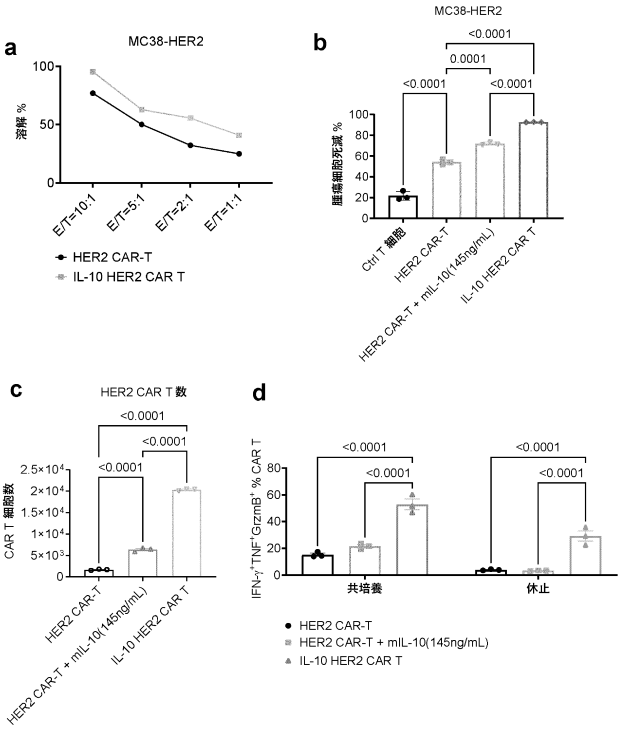
【図１（５）】



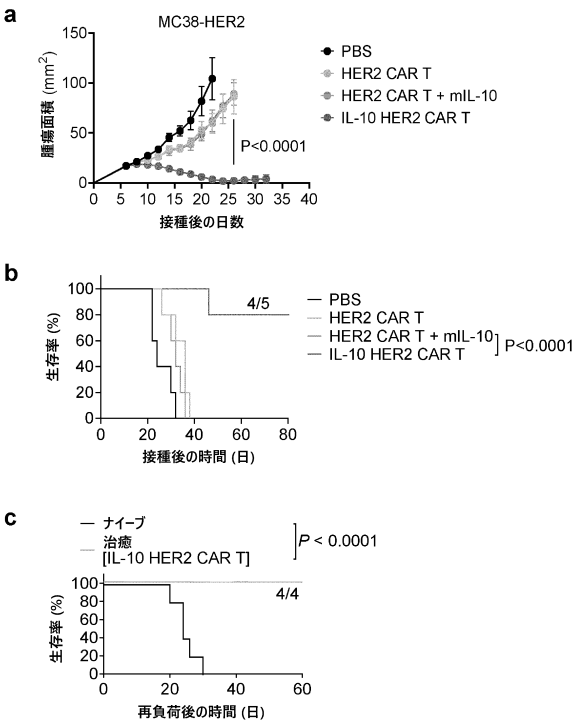
【図１（６）】



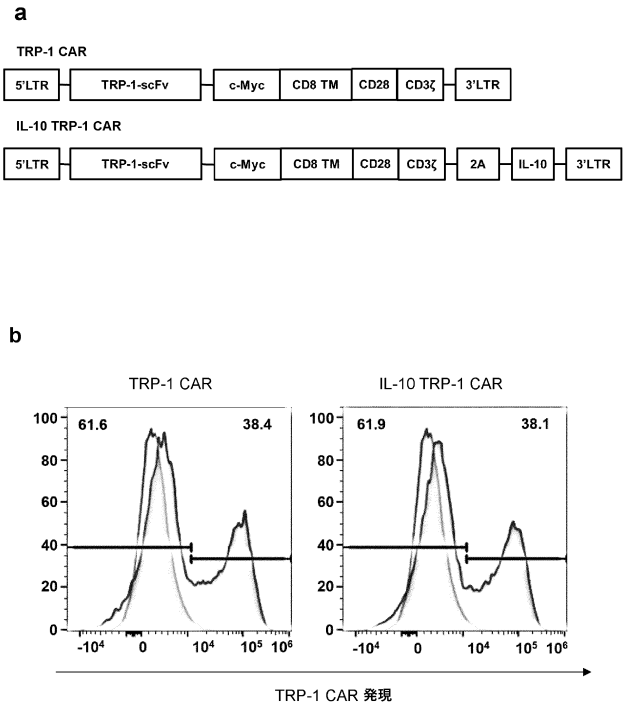
【図２】


a
MC38-HER2
溶解 %
E/T=10:1
E/T=5:1
E/T=2:1
E/T=1:1
HER2 CAR-T
IL-10 HER2 CAR T
b
MC38-HER2
腫瘍細胞死滅 %
<0.0001
0.0001
Ctrl T 細胞
HER2 CAR-T
HER2 CAR-T + mIL-10(145ng/mL)
IL-10 HER2 CAR T
c
HER2 CAR T 数
CAR T 細胞数
d
IFN-γ+TNF+GrzmB+ % CAR T
共培養
休止
HER2 CAR-T
HER2 CAR-T + mIL-10(145ng/mL)
IL-10 HER2 CAR T

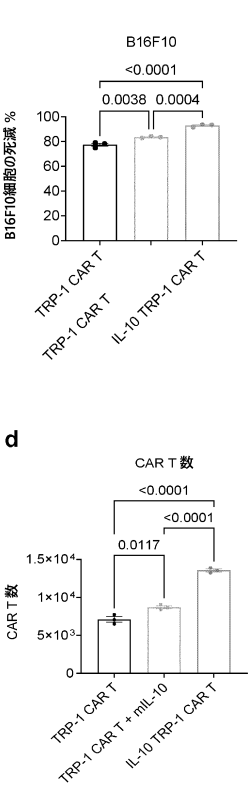
【図３】


a
MC38-HER2
腫瘍面積 (mm²)
PBS
HER2 CAR T
HER2 CAR T + mIL-10
IL-10 HER2 CAR T
P<0.0001
接種後の日数
b
生存率 (%)
4/5
PBS
HER2 CAR T
HER2 CAR T + mIL-10
IL-10 HER2 CAR T
P<0.0001
接種後の時間 (日)
c
ナイーブ
治癒 [IL-10 HER2 CAR T]
P < 0.0001
4/4
生存率 (%)
再負荷後の時間 (日)

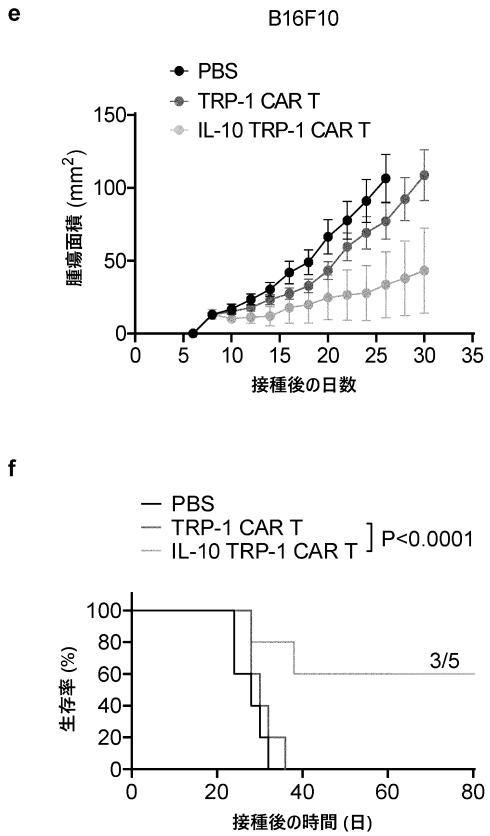
【図４（１）】


a
TRP-1 CAR
5'LTR
TRP-1-scFv
c-Myc
CD8 TM
CD28
CD3ζ
3'LTR
IL-10 TRP-1 CAR
2A
IL-10
b
TRP-1 CAR
IL-10 TRP-1 CAR
61.6
38.4
61.9
38.1
TRP-1 CAR 発現

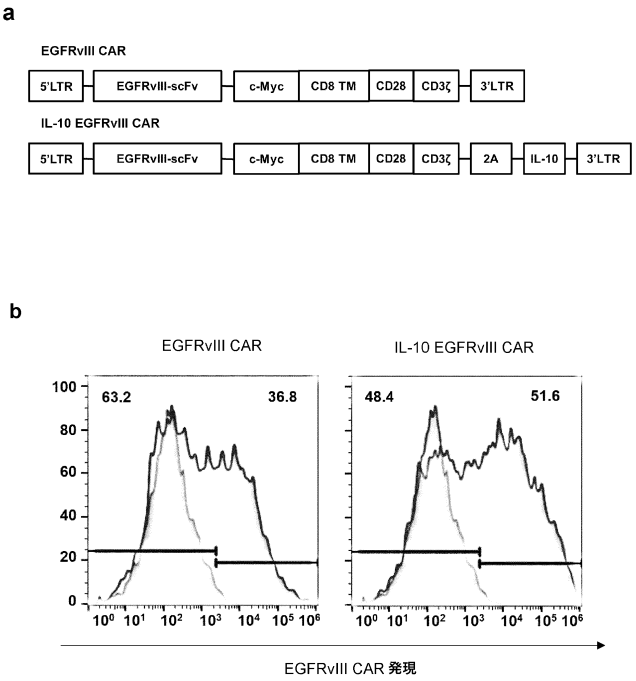
【図４（２）】


c
B16F10
<0.0001
0.0038
0.0004
B16F10細胞の死滅 %
TRP-1 CAR T
IL-10 TRP-1 CAR T
d
CAR T 数
<0.0001
0.0117
CAR T 数
TRP-1 CAR T
TRP-1 CAR T + mIL-10
IL-10 TRP-1 CAR T

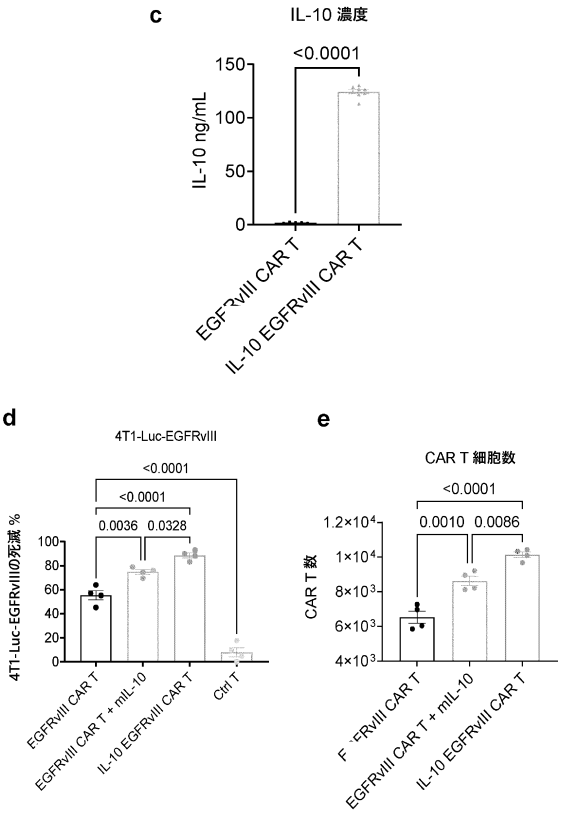
【図４（３）】



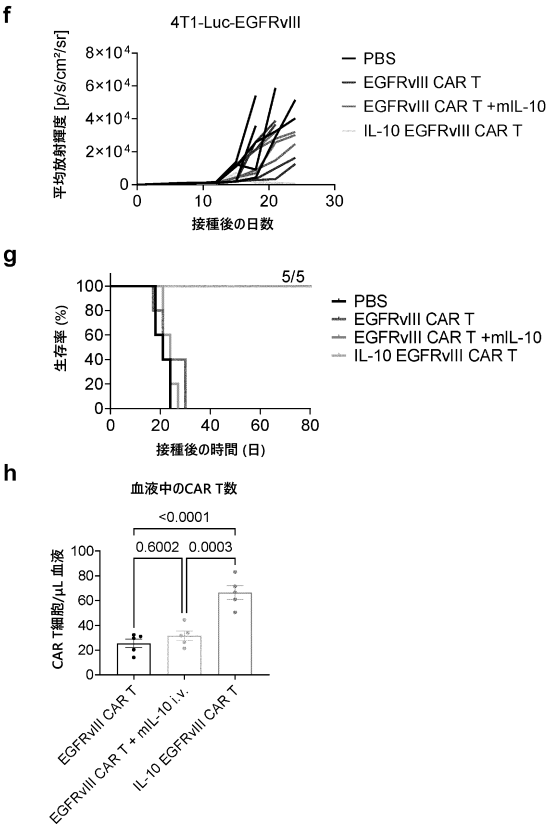
【図５（１）】



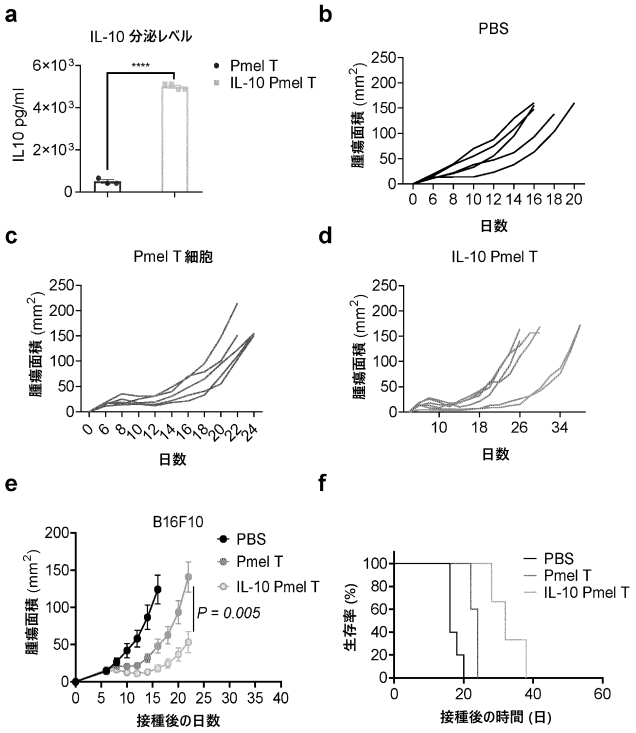
【図５（２）】



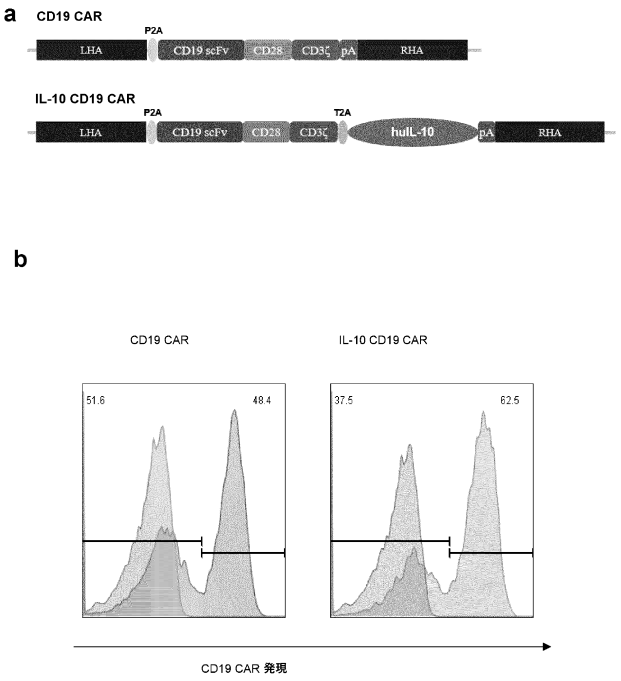
【図５（３）】



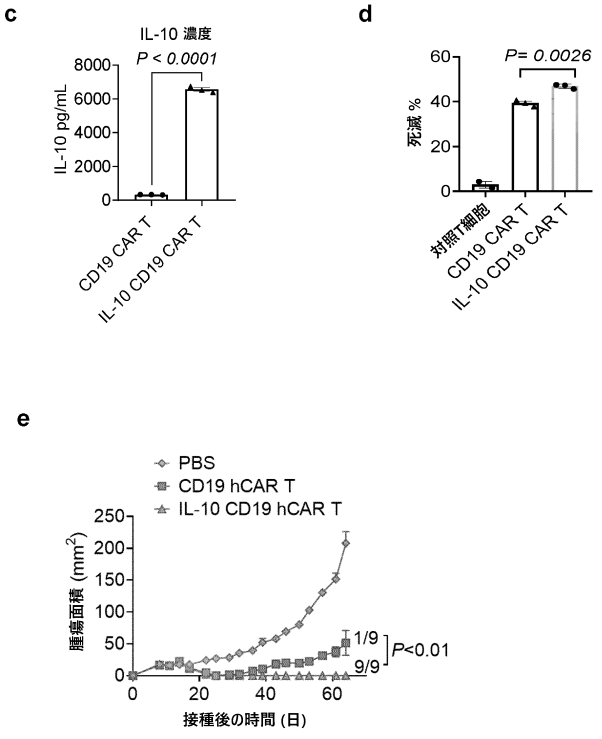
【図６】


a
IL-10 分泌レベル
IL10 pg/ml
Pmel T
IL-10 Pmel T
****
b
PBS
腫瘍面積 (mm²)
日数
c
Pmel T 細胞
腫瘍面積 (mm²)
日数
d
IL-10 Pmel T
腫瘍面積 (mm²)
日数
e
B16F10
PBS
Pmel T
IL-10 Pmel T
P = 0.005
腫瘍面積 (mm²)
接種後の日数
f
PBS
Pmel T
IL-10 Pmel T
生存率 (%)
接種後の時間 (日)

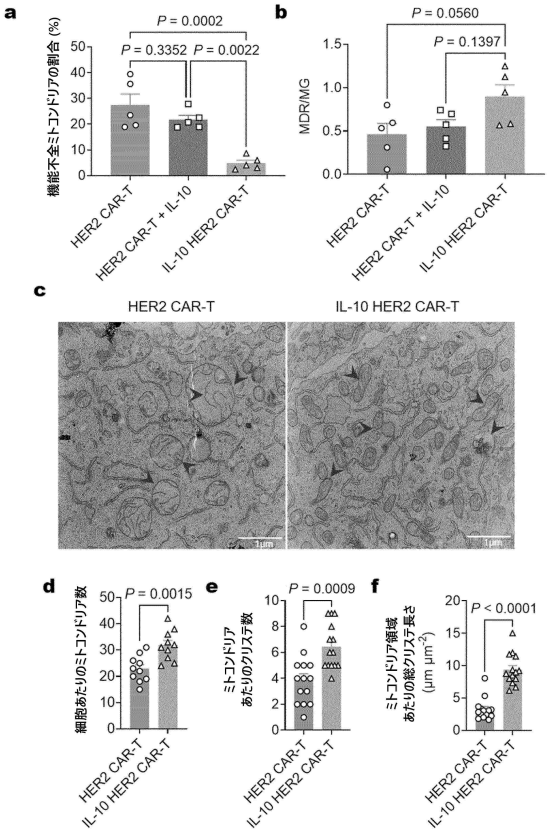
【図７（１）】


a
CD19 CAR
LHA
P2A
CD19 scFv
CD28
CD3ζ
pA
RHA
IL-10 CD19 CAR
T2A
huIL-10
b
CD19 CAR
IL-10 CD19 CAR
51.6
48.4
37.5
62.5
CD19 CAR 発現

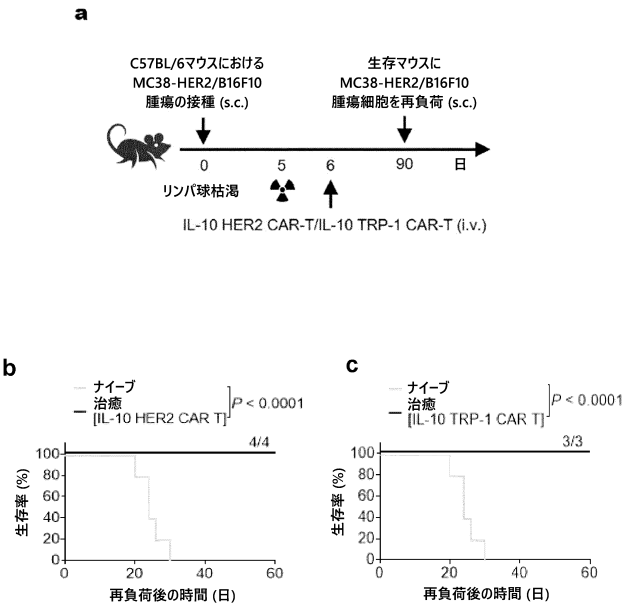
【図７（２）】


c
IL-10 濃度
P < 0.0001
IL-10 pg/mL
CD19 CAR T
IL-10 CD19 CAR T
d
P= 0.0026
死滅 %
対照T細胞
CD19 CAR T
IL-10 CD19 CAR T
e
PBS
CD19 hCAR T
IL-10 CD19 hCAR T
腫瘍面積 (mm²)
1/9
9/9
P<0.01
接種後の時間 (日)

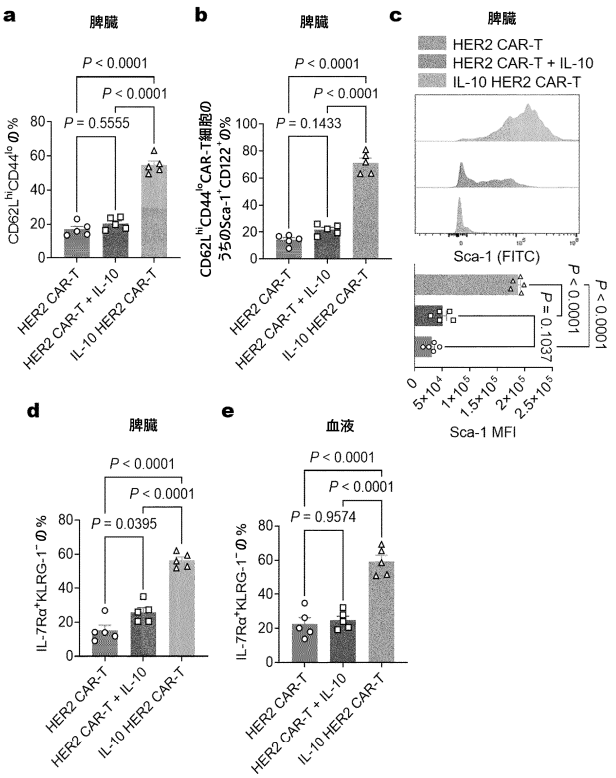
【図８】


a
P = 0.0002
P = 0.3352
P = 0.0022
機能不全ミトコンドリアの割合 (%)
HER2 CAR-T
HER2 CAR-T + IL-10
IL-10 HER2 CAR-T
b
P = 0.0560
P = 0.1397
MDR/MG
c
HER2 CAR-T
IL-10 HER2 CAR-T
d
P = 0.0015
細胞あたりのミトコンドリア数
e
P = 0.0009
ミトコンドリアあたりのクリステ数
f
P < 0.0001
ミトコンドリア領域あたりの総クリステ長さ (μm μm⁻²)

【図９】



【図１０】



【配列表】

<u>20245314460000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/073462

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/10 A61K35/14 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOHSENI Y R ET AL: "Chimeric antigen receptor-modified human regulatory T cells that constitutively express IL-10 maintain their phenotype and are potently suppressive", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 51, no. 10, 28 July 2021 (2021-07-28) , pages 2522-2530, XP055886483, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.202048934 the whole document -----	1-10,12, 13,16, 22-25
A	US 2018/207270 A1 (MUMM JOHN BRIAN [US] ET AL) 26 July 2018 (2018-07-26) claims -----	1-31
	-/--	

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 November 2022	24/01/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Teyssier, Bertrand

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/073462

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GORBY C ET AL: "Engineered IL-10 variants elicit potent immunomodulatory effects at low ligand doses", SCIENCE SIGNALING, vol. 13, no. 649, ABC0653, 15 September 2020 (2020-09-15), XP055886515, ISSN: 1945-0877, DOI: 10.1126/scisignal.abc0653 -& GORBY C ET AL: "Supplemental Materials for: Engineered IL-10 variants elicit potent immunomodulatory effects at low ligand doses", SCIENCE SIGNALING, vol. 13, no. 649, 15 September 2020 (2020-09-15), XP055887531, ISSN: 1945-0877, DOI: 10.1126/scisignal.abc0653	1-31
A	WO 2019/099483 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER [US]) 23 May 2019 (2019-05-23) examples	1-31
A	GUO Y ET AL: "Metabolic reprogramming of terminally exhausted CD8+ T cells by IL-10 enhances anti-tumor immunity", NATURE IMMULOGY, vol. 22, no. 6, 24 May 2021 (2021-05-24), pages 746-756, XP037465316, ISSN: 1529-2908, DOI: 10.1038/S41590-021-00940-2	1-31

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/073462

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

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

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/073462

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2018207270 A1	26-07-2018	AU 2016268403 A1	07-12-2017
		CA 2986755 A1	01-12-2016
		CN 107847583 A	27-03-2018
		EP 3302547 A1	11-04-2018
		HK 1246201 A1	07-09-2018
		HK 1248137 A1	12-10-2018
		IL 255774 A	28-02-2018
		JP 7121496 B2	18-08-2022
		JP 2018516913 A	28-06-2018
		KR 20180020141 A	27-02-2018
		US 2016361415 A1	15-12-2016
		US 2018207270 A1	26-07-2018
		US 2019099487 A1	04-04-2019
		WO 2016191587 A1	01-12-2016
		ZA 201707914 B	24-04-2019
WO 2019099483 A1	23-05-2019	AU 2018367452 A1	11-06-2020
		CA 3082570 A1	23-05-2019
		CN 111655270 A	11-09-2020
		EP 3710020 A1	23-09-2020
		JP 2021502829 A	04-02-2021
		US 2020330574 A1	22-10-2020
		WO 2019099483 A1	23-05-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｋ	*38/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/20		
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		
		Ｃ１２Ｎ	15/13		

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

(72)発明者　グオ ユーガン
中華人民共和国 チェジアン ３１００５８ ハンチョウ シーフー ディストリクト チウシー ビレッジ ４１ナンバー ルーム ３０２
(72)発明者　タン リー
スイス国 １１１２ エシシャン シュマン デ ジェネヴリエ ６
(72)発明者　チャオ ヤン
スイス国 １００４ ローザンヌ シュマン デ クロシュトン １

Ｆターム（参考）　4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084 AA02 AA13 AA19 BA41 BA44 CA53 DA12 MA02 MA17 MA23 MA66 NA14 ZB26 ZC75
4C085 AA13 AA14 BB31 CC22 CC23 EE01 EE03 GG02
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 CA04 CA12 MA02 MA17 MA23 MA66 NA14 ZB26 ZC75