

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6616295号  
(P6616295)

(45) 発行日 令和1年12月4日 (2019. 12. 4)

(24) 登録日 令和1年11月15日 (2019. 11. 15)

(51) Int. Cl.	F 1
<b>C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)</b>	C 1 2 N 5/0783
A 6 1 K 35/17 (2015. 01)	A 6 1 K 35/17 Z
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 15/02 (2006. 01)	A 6 1 P 15/02

請求項の数 13 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2016-527005 (P2016-527005)	(73) 特許権者	510002280
(86) (22) 出願日	平成26年7月14日 (2014. 7. 14)		アメリカ合衆国
(65) 公表番号	特表2016-524914 (P2016-524914A)		アメリカ合衆国 メリーランド州 208
(43) 公表日	平成28年8月22日 (2016. 8. 22)		92-7660 ベトヘスダ エムエスシ
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/046478		ー7660 スイテ325 エクエクトイ
(87) 国際公開番号	W02015/009604		ブ ボウレバルド 6011 ナショナル
(87) 国際公開日	平成27年1月22日 (2015. 1. 22)		インスティテュート オブ ヘルス オ
審査請求日	平成29年7月13日 (2017. 7. 13)		フィス オブ テクノロジー トランスフ
(31) 優先権主張番号	61/846, 161		アー
(32) 優先日	平成25年7月15日 (2013. 7. 15)	(74) 代理人	100080791
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光宜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトパピローマウイルス抗原T細胞の調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトパピローマウイルス (HPV) 特異的T細胞集団を調製する方法であって、  
 HPV陽性腫瘍サンプルを複数のフラグメントに分割すること；  
 該複数のフラグメントを、1のみのサイトカインの存在下、別個に培養すること、ここで前記サイトカインは、インターロイキン (IL) -2、IL-7、IL-15又はIL-12である；  
 培養された複数のフラグメントからT細胞を得ること；  
 複数のフラグメントに由来する該T細胞を、特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方について別個に試験すること；  
 特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方を呈するT細胞を選択すること；並びに  
 選択されたT細胞の数を拡大して、HPV特異的T細胞集団を作製することを含む、方法。

【請求項 2】

選択されたT細胞の数を拡大することが、(i) 放射線照射された同種異系フィーダー細胞及び(ii) 放射線照射された自己フィーダー細胞の一方又は両方、並びに(iii) OKT3抗体及び(iv) インターロイキン (IL) -2の一方又は両方、を用いて細胞の数を拡大することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

サイトカインがIL-2である、請求項1又は2に記載の方法。

## 【請求項 4】

HPV特異的T細胞集団を調製する方法であって、

HPV陽性腫瘍サンプルを複数のフラグメントに分割すること；

該複数のフラグメントを、インターロイキン（IL）-2、IL-7、IL-15及びIL-12からなる群から選択される1以上のサイトカインの存在下、別個に培養すること；

培養された複数のフラグメントからT細胞を得ること；

複数のフラグメントに由来する該T細胞を、特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方について別個に試験すること；

特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方を呈するT細胞を選択すること；並びに

（i）OKT3抗体及び（ii）インターロイキン（IL）-2の一方又は両方を用いて、選択されたT細胞の数を拡大し、HPV特異的T細胞集団を作製することを含む、方法。

10

## 【請求項 5】

複数のフラグメントを別個に培養することが、複数のフラグメントを、1のみのサイトカインの存在下で培養することを含む、請求項4に記載の方法。

## 【請求項 6】

サイトカインがIL-2である、請求項5に記載の方法。

## 【請求項 7】

選択されたT細胞の数を拡大することが、放射線照射された同種異系フィーダー細胞及び放射線照射された自己フィーダー細胞の一方又は両方を用いることをさらに含む、請求項4～6のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 8】

HPV特異的T細胞集団が、HPV 16陽性癌細胞を認識する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

HPV特異的T細胞集団が、HPV 16 E6を認識する、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

HPV特異的T細胞集団が、HPV 16 E7を認識する、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

HPV特異的T細胞集団が、HPV 18陽性癌細胞を認識する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

HPV特異的T細胞集団が、HPV 18 E6を認識する、請求項1～7及び11のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

HPV特異的T細胞集団が、HPV 18 E7を認識する、請求項1～7及び11～12のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2013年7月15日出願の米国仮特許出願第61/846,161号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる）の利益を主張する。

## 【背景技術】

## 【0002】

発明の背景

いくつかのタイプの癌、例えば子宮頸癌などの主因は、ヒトパピローマウイルス（HPV

50

）感染である。化学療法などの治療法の進歩にもかかわらず、HPV関連癌を含む多くの癌の予後は不良である場合がある。従って、癌、特にHPV関連癌に対して、満たされていない更なる治療の必要性が存在する。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0003】

発明の簡単な要旨

本発明の一実施態様は、HPV特異的T細胞集団を調製する方法であって、HPV陽性腫瘍サンプルを複数（multiple）のフラグメントに分割すること；該複数のフラグメントを、1のみのサイトカインの存在下、別個に培養すること；培養された複数のフラグメントからT細胞を得ること；該T細胞を、特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方について試験すること；特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方を呈するT細胞を選択すること；並びに、選択されたT細胞の数を拡大（expanding）して、HPV特異的T細胞集団を作製することを含む、方法を提供する。

#### 【0004】

本発明の別の実施態様は、HPV特異的T細胞集団を調製する方法であって、HPV陽性腫瘍サンプルを複数のフラグメントに分割すること；該複数のフラグメントを別個に培養すること；培養された複数のフラグメントからT細胞を得ること；該T細胞を、特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方について試験すること；特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方を呈するT細胞を選択すること；並びに、（i）OKT3抗体及び（ii）インターロイキン（IL）-2の一方又は両方を用いて、選択されたT細胞の数を拡大し、HPV特異的T細胞集団を作製することを含む、方法を提供する。

#### 【0005】

本発明のさらに別の実施態様は、哺乳動物において癌を治療又は予防する方法であって、HPV陽性腫瘍サンプルを複数のフラグメントに分割すること；該複数のフラグメントを別個に培養すること；培養された複数のフラグメントからT細胞を得ること；該T細胞を、特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方について試験すること；特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方を呈するT細胞を選択すること；選択されたT細胞の数を拡大して、養子細胞療法（adoptive cell therapy）のためのHPV特異的T細胞集団を作製すること；並びに、数を拡大した該T細胞を、哺乳動物において癌を治療又は予防するのに有効な量で哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0006】

図面の各図の簡単な説明

【図1】図1Aは、ターゲットgp100ペプチドプール（影付きバー）又はHPV 18 E7ペプチドプール（影なしバー）との共培養時に、患者1由来の22の腫瘍フラグメント（F1～F22）から作製されたエフェクター腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、又はメラノーマTILにより分泌されるインターフェロンガンマ（IFN- $\gamma$ ）（pg/mL）を示すグラフである。図1Bは、ターゲット自己腫瘍細胞株（影なしバー）又は624細胞（メラノーマ細胞株）（影付きバー）との共培養時に、エフェクターメラノーマTIL、又は患者1由来の22の腫瘍フラグメント（F1～F22）から作製されたTILにより分泌されるIFN- $\gamma$ （pg/mL）を示すグラフである。

【図2】図2Aは、ターゲット自己腫瘍細胞（影付きバー）、自己組織由来の末梢血単核細胞（PBMC）（フォワードスラッシュ斜線付きバー）、全てのクラスI遺伝子座で適合（matched）する腫瘍細胞（バックスラッシュ斜線付きバー）、HLA不適合HeLa細胞（縦縞バー）、又はHLA不適合CaSki細胞（横縞バー）との共培養時に、患者1の腫瘍フラグメントF16、F17若しくはF22から作製されたエフェクターTIL、又は治療のために患者に与えられる細胞（「輸液バッグ（infusion bag）」）により分泌されるIFN- $\gamma$ （pg/mL）を示すグラフである。図2Bは、単独での培養時（腫瘍なし）、又はHLA-A、HLA-B若しくはHLA-Cに対するサイレンシングRNA、若しくは無関係のターゲットに対するRNA（非ターゲティング）

をトランスフェクトした自己腫瘍細胞との共培養時に、患者1由来のエフェクターTILにより分泌されるIFN- $\gamma$  (pg/mL)を示すグラフである。図2Cは、抗体を伴わずに(黒色バー)、抗HLA-A2抗体とともに(バックスラッシュ斜線付きバー)又は抗クラスII抗体とともに(フォワードスラッシュ斜線付きバー)、ターゲット細胞と共培養(エフェクター/ターゲット: 患者1 TIL/自己腫瘍細胞; DMF5/624細胞; 又はF15/HPV18E6<sub>121-135</sub>)した際に、エフェクターTILにより分泌されるIFN- $\gamma$  (pg/mL)を示すグラフである。白色バーは、単独で培養されたエフェクター細胞を示す。

【図3】図3は、gp100ペプチドプール(白色バー)、OKT3抗体(横縞バー)、又は以下をパルスした樹状細胞(DCs)(HPV 18 E7ペプチドプール(黒色バー)、HPV 18 E7ペプチドプール及びW6/32(細いフォワードスラッシュ斜線付きバー)、HPV 16 E7<sub>11-19</sub>(太いフォワードスラッシュ斜線付きバー)、HPV 16 E7<sub>11-19</sub>及びW6/32(格子縞バー)、HPV 16 E7<sub>11-19</sub>及びHB145(垂直交差線バー)、HPV 18 E6<sub>121-135</sub>(バックスラッシュ斜線付きバー)、HPV 18 E6<sub>121-135</sub>及びW6/32(斜交線バー)、又はHPV 18 E6<sub>121-135</sub>及びHB 145(白色輪郭線の黒色長方形のバー))との共培養時に、患者1の腫瘍フラグメントF16若しくはF22由来のエフェクターTIL; 治療のために患者に与えられる細胞(「輸液バッグ」); メラノーマTIL 1、2若しくは3(メラノーマ腫瘍から培養されたTIL); mE7 TCR(HPV 16 E7<sub>11-19</sub>に対するTCRを発現するよう形質導入されたT細胞); 又はF15 TIL(HPV 18 E6<sub>121-135</sub>に対して反応性であり、クラスII拘束性であり、従ってHB145でブロック可能である、別の患者由来のTIL)により分泌されるIFN- $\gamma$  (pg/mL)を示すグラフである。

【図4】図4A及び4Bは、gp100ペプチドプール(灰色バー)又はHPV 18 E7ペプチドプール(黒色バー)との共培養時に、患者1由来のF16腫瘍フラグメントからクローニングされたエフェクターTILクローン1~24(A)又はクローン24~48(B)により分泌されるIFN- $\gamma$  (pg/mL)を示すグラフである。

【図5】図5は、HPV 18 E6ペプチドプール(黒色バー)、HPV 18 E7ペプチドプール(灰色バー)又はgp100ペプチドプール(コントロール)をパルスした樹状細胞との共培養時に、患者12からの36の異なる腫瘍フラグメント(F1~F36)由来のエフェクターTIL、又はメラノーマTIL(DM5)(コントロール)により分泌されるIFN- $\gamma$  (pg/mL)を示すグラフである。

【図6】図6は、緑色蛍光タンパク質(GFP)(白色バー)若しくはHPV 18 E6(灰色バー)をコードするレンチウイルスベクターが形質導入されたDCs、又はgp100ペプチドプール(フォワードスラッシュ斜線付きバー)若しくはHPV 18 E6ペプチドプール(バックスラッシュ斜線付きバー)をパルスしたDCsとの共培養時に、患者12の腫瘍フラグメントF1から作製されたエフェクターTIL、又はメラノーマTIL 1、2若しくは3により分泌されるIFN- $\gamma$  (pg/mL)を示すグラフである。横縞バーは、OKT3抗体とともに培養されたTILを示す。

【図7】図7Aは、単独での培養時(灰色バー)、又はHPV18 E6ペプチドプール(黒色バー)との培養時に、クローン1、3、12及び20により分泌される腫瘍壊死因子(TNF) (pg/mL)を示すグラフである。図7Bは、単独での培養時(白色バー)、又はHPV18 E6ペプチドプール(灰色バー)若しくはHPV 18 E6ペプチドサブプール1(フォワードスラッシュ斜線付きバー)、サブプール2(バックスラッシュ斜線付きバー)、サブプール3(横縞バー)、サブプール4(縦縞バー)若しくはサブプール5(黒色バー)との培養時に、クローン3、12及び20により分泌されるTNF (pg/mL)を示すグラフである。図7Cは、単独での培養時(白色バー)、又はHPV18 E6ペプチド30(ドット柄バー)、ペプチド31(黒色バー)、ペプチド32(灰色バー)、ペプチド33(縦縞バー)、ペプチド34(フォワードスラッシュ斜線付きバー)、ペプチド35(バックスラッシュ斜線付きバー)、ペプチド36(方眼柄バー)若しくはペプチド37(ヘリングボーンバー)との培養時に、クローン3、12及び20により分泌されるTNF (pg/mL)を示すグラフである。

【図8】図8A~8Cは、自己PBMC(P12)、又はドナー1~6の1人に由来するPBMCとの共培養時に、クローン3(A)、12(B)及び20(C)により分泌されるTNF (pg/mL)を示すグラフである。

【図9】図9Aは、HPV 18 E6<sub>77-91</sub>(影なしバー)又はHPV 18 E6<sub>121-135</sub>ペプチド(影付き

10

20

30

40

50

バー)をパルスした、自己PBMC (P12)、又はDRB1\*15, DQB1\*06ドナーPBMC、DRB1\*15ドナーPBMC若しくはDQB1\*06ドナーPBMCとの共培養時に、患者12の腫瘍フラグメントF15のクローン3により分泌されるIFN- (pg/mL)を示すグラフである。図9Bは、HLA-DR (横縞バー)、HLA-DQ (バックスラッシュ斜線付きバー)若しくはHLA-DP (フォワードスラッシュ斜線付きバー)に対する抗体、pan-クラスI抗体 (黒色バー)、又はpan-クラスII抗体 (白色バー)とともに、HPV 18 E6<sub>121-135</sub>ペプチドをパルスしたPBMCと共培養した際の患者12の腫瘍フラグメントF15のクローン20により、又は624細胞と共培養されたmF5 T細胞 (抗MART-1 TCRを発現するよう形質導入されたもの)により分泌されるIFN- (pg/mL)を示すグラフである。

【図10】図10は、HPV 16 E6ペプチドプール (バックスラッシュ斜線付きバー)、HPV 16 E7ペプチドプール (フォワードスラッシュ斜線付きバー)又はgp100ペプチドプール (コントロール) (黒色バー)をパルスした樹状細胞との共培養時に、患者4からの24の異なる腫瘍フラグメント (F1~F24) 由来のエフェクターTIL、又はメラノーマTIL (コントロール)により分泌されるIFN- (pg/mL)を示すグラフである。アスタリスク (\*) は、患者に注入されるTILを示す。

【図11】図11Aは、HPV 16 E7ペプチドプールをパルスした (影付きバー) 又はいずれのペプチドもパルスしていない (影なしバー) 樹状細胞との共培養時に、患者4からのCD8陽性エフェクターTILクローンにより分泌されるIFN- (pg/mL)を示すグラフである。図11Bは、HPV 16 E7ペプチドプールをパルスした (影付きバー) 又はいずれのペプチドもパルスしていない (影なしバー) 樹状細胞との共培養時に、患者4からのCD4陽性エフェクターTILクローンにより分泌されるIFN- (pg/mL)を示すグラフである。図11Cは、HPV 16 E6ペプチドプールをパルスした (影付きバー) 又はいずれのペプチドもパルスしていない (影なしバー) 樹状細胞との共培養時に、患者4からのCD8陽性エフェクターTILクローンにより分泌されるIFN- (pg/mL)を示すグラフである。図11Dは、HPV 16 E6ペプチドプールをパルスした (影付きバー) 又はいずれのペプチドもパルスしていない (影なしバー) 樹状細胞との共培養時に、患者4からのCD4陽性エフェクターTILクローンにより分泌されるIFN- (pg/mL)を示すグラフである。

【図12】図12A~Bは、養子細胞療法での治療前 (A) 及び治療から9ヶ月後 (B) における、患者4の胸部のコンピューター断層撮影 (CT) スキャンである。Aにおける矢印は、大動脈周囲 (paraaortic) リンパ節における癌病変 (cancerous lesion) を指す。図12C~Dは、養子細胞療法での治療前 (C) 及び治療から9ヶ月後 (D) における、患者4の胸部のCTスキャンである。Cにおける矢印は、左肺門リンパ節における癌病変を指す。図12E~Fは、養子細胞療法での治療前 (E) 及び治療から9ヶ月後 (F) における、患者4の骨盤のCTスキャンである。Eにおける矢印は、総腸骨リンパ節における癌病変を指す。

【図13】図13は、HPV 18 E6ペプチドプール (バックスラッシュ斜線付きバー)、HPV 18 E7ペプチドプール (フォワードスラッシュ斜線付きバー) 又はgp100ペプチドプール (コントロール) (黒色バー)をパルスした樹状細胞との共培養時に、患者8からの24の異なる腫瘍フラグメント由来のエフェクターTIL、又はメラノーマTIL (コントロール)により分泌されるIFN- (pg/mL)を示すグラフである。アスタリスク (\*) は、患者に注入されるTILを示す。

【図14】図14A~Bは、養子細胞療法での治療前 (A) 及び治療から2ヶ月後 (B) における、患者8の肝臓の磁気共鳴画像 (MRI) スキャンである。Aにおける矢印は、癌性の肝臓腫瘍 (cancerous liver mass) を指す。図14C~Dは、養子細胞療法での治療前 (C) 及び治療から2ヶ月後 (D) における、患者8の腹部のCTスキャンである。Cにおける矢印は、後腹膜リンパ節における癌病変を指す。図14E~Fは、養子細胞療法での治療前 (E) 及び治療から2ヶ月後 (F) における、患者8の腹部のCTスキャンである。Eにおける矢印は、癌性の腹壁腫瘍を指す。図14G~Hは、養子細胞療法での治療前 (G) 及び治療から2ヶ月後 (H) における、患者8の骨盤のCTスキャンである。Gにおける矢印は、癌性の左結腸周囲腫瘍 (left pericolic mass) を指す。

【図15】図15Aは、HPV-TIL注入後の時点 (月数) における、患者4の傍大動脈 (丸)、

左肺門 (left hilar) (四角)、右肺門 (right hilar) ( ) 及び総腸骨 ( ) の腫瘍サイズの測定値 (ベースラインからの変化%) を示すグラフである。図15Bは、HPV-TIL注入後の時点 (月数) における、患者8の腹壁 (丸)、傍大動脈 (四角)、左骨盤 ( ) 及び右尿管 ( ) の腫瘍サイズの測定値 (ベースラインからの変化%) を示すグラフである。

【図16】図16A~Dは、患者8の遅延ガドリニウム造影T1強調MRI像 (delayed gadolinium-enhanced T1-weighted MRI images) である。A及びCはそれぞれ、治療前の肝臓表面における腫瘍を示す。B及びDは、治療から11ヶ月後にいずれの腫瘍も存在しなかったことを示す。A及びCにおける矢印は、腫瘍の位置を示す。

【図17】図17Aは、治療後の時点 (日数) における、患者4で測定された血清サイトカインレベル (pg/ml) を示すグラフである。測定されたサイトカインには、インターロイキン (IL)-2 (黒丸)、IL-4 (四角)、IL-6 ( )、IL-13 ( )、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) (ダイヤモンド)、及び腫瘍壊死因子 (TNF-a) (白丸) が含まれる。患者に投与されたサイトカインに下線を付す。図17Bは、治療後の日数における、患者8で測定された血清サイトカインレベル (pg/ml) を示すグラフである。測定されたサイトカインには、IL-2 (黒丸)、IL-5 (黒四角)、IL-6 ( )、IL-8 ( )、G-CSF (ダイヤモンド)、単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) (白丸)、及びTNF-a (白四角) が含まれる。患者に投与されたサイトカインに下線を付す。

【図18】図18A~Dは、IFN-ガンマ分泌 (pg/ml) (A及びB) 及びELISPOTアッセイ (C及びD) により測定されるように、患者4 (A及びC) 又は患者8 (B及びD) に投与されるべきTIL (影付きバー) の、HPV E6、HPV E7、又はエプスタイン・パール・ウイルス (EBV) (コントロール) に対する反応性を示すグラフである。影なしバーは、同じ患者由来のEBV反応性T細胞 (コントロール) の反応性を表す。

【図19】図19A~Bは、TIL注入後の様々な時点 (日) における、患者4 (A) 及び患者8 (B) についてのリンパ球数 (細胞/mm<sup>3</sup>) を示すグラフである。計数された細胞には、CD8 T細胞 (四角)、CD4 T細胞 (丸)、NK細胞 ( )、及びB細胞 ( ) が含まれる。図19C~Dは、IFN-ガンマ (pg/ml) により測定されるように、TIL注入後の様々な時点 (月) における、患者4 (C) 又は患者8 (D) の末梢血において検出されたHPV反応性T細胞を示すグラフである。HPV E6 (灰色バー)、HPV E7 (黒色バー) 又はgp100 (コントロール) (影なしバー) に対する反応性を測定した。図19E~Fは、ELISPOTにより測定されるように、TIL注入後の様々な時点 (月) における、患者4 (E) 又は患者8 (F) の末梢血において検出されたHPV反応性T細胞の定量化を示すグラフである。HPV E6 (灰色バー)、HPV E7 (黒色バー) 又はgp100 (コントロール) (影なしバー) に対する反応性を測定した。

【図20】図20A~Jは、養子細胞療法での治療前 (A、C、E、G及びI) 及び治療から4ヶ月後 (B、D、F、H及びJ) における、転移性扁桃腺癌を有する患者13の磁気共鳴画像 (MRI) スキャンである。矢印は、肺及び右肺門における多発性 (multiple) 悪性腫瘍を指す。

【図21】図21A~Bは、養子細胞療法での治療前 (A) 及び治療から18ヶ月後 (B) における、患者4の胸部のCTスキャンである。Aにおける矢印は、大動脈周囲リンパ節における癌病変を指す。図21C~Dは、養子細胞療法での治療前 (C) 及び治療から18ヶ月後 (D) における、患者4の胸部のCTスキャンである。Cにおける矢印は、左肺門の病変及び気管分岐部の病変を指す。図21E~Fは、養子細胞療法での治療前 (E) 及び治療から18ヶ月後 (F) における、患者4の胸部のCTスキャンである。Eにおける矢印は、両側肺門の病変を指す。図21G~Hは、養子細胞療法での治療前 (G) 及び治療から18ヶ月後 (H) における、患者4の骨盤のCTスキャンである。Gにおける矢印は、総腸骨リンパ節における癌病変を指す。

【図22】図22A~Bは、養子細胞療法での治療前 (A) 及び治療から11ヶ月後 (B) における、患者8の腹部のCTスキャンである。Aにおける矢印は、後腹膜リンパ節における癌病変を指す。図22C~Dは、養子細胞療法での治療前 (C) 及び治療から11ヶ月後 (D) における、患者8の腹部のCTスキャンである。Cにおける矢印は、癌性の腹壁腫瘍及び後腹膜 (retroperitoneal) 腫瘍を指す。図22E~Fは、養子細胞療法での治療前 (E) 及び治療から11ヶ月後 (F) における、患者8の腹部のCTスキャンである。Eにおける矢印は、癌性の結腸傍

10

20

30

40

50

腫瘍 (paracolic mass) を指す。図22G~Hは、養子細胞療法での治療前 (G) 及び治療から11ヶ月後 (H) における、患者8の骨盤のCTスキャンである。Gにおける矢印は、癌性の左骨盤腫瘍を指す。Hにおける三角形は、尿管ステント (uretal stent) を指す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

発明の詳細な説明

ヒトパピローマウイルス (HPV) 特異的T細胞集団が、様々な適用のため、例えば養子細胞療法などのために調製され得ることを発見した。本発明の方法は、様々な病態 (conditions)、例えば癌などを治療するのに有用である細胞を作製し得る。

【0008】

本発明の方法は、多数の利点を提供する。例えば、本発明の方法は、有利には、臨床用途に適したグレード及びスケールで、HPV陽性癌由来のT細胞を作製し得る。さらに、本発明の方法は、有利には、恒常的 (constitutively) 及び特異的に癌細胞により発現され、正常細胞によっては発現されないHPV抗原E6及びE7を認識するT細胞を作製し得る。従って、特定の理論又はメカニズムに拘束されるものではないが、本発明の方法により作製されるT細胞は、有利には、正常な非癌性細胞の破壊を最小化又は排除し、それにより、毒性を低下させながら、例えば、最小化又は排除しながら、癌細胞の破壊を標的化すると考えられる。さらに、本発明の方法の一実施態様は、骨髄非破壊的な (nonmyeloablative) 化学療法を含むことから、本発明の方法は、有利には、全身照射 (TBI) を伴う治療にふさわしくない患者、例えば、治療前に既に骨髄破壊的な療法 (例えば、放射線療法) を受けている患者；併発状態を有する患者；及び  $2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>細胞/kg未満である患者などを治療するために使用され得る。さらに、癌を治療する本発明の方法は、有利には、他のタイプの治療 (例えば、化学療法単独、手術、又は放射線など) に応答しないHPV陽性癌を首尾よく治療又は予防し得る。

【0009】

本発明の一実施態様は、哺乳動物からHPV陽性腫瘍サンプルを得ることを含む。腫瘍サンプルは、任意の適切な様式 (例えば、生検又は外科的切除など) で哺乳動物から得られてよい。

【0010】

一実施態様において、当該方法は、腫瘍サンプルをHPV感染について試験することを含んでよい。HPVは任意のHPVサブタイプであってよい。好ましくは、HPVサブタイプは、HPV 16又はHPV 18である。試験は、HPV感染細胞により特異的に発現される任意のタンパク質 (例えば、抗原)、例えば、HPV 16 E6、HPV 16 E7、HPV 18 E6及びHPV 18 E7の任意の1つ以上の発現、HPV特異的タンパク質をコードする任意のRNAの発現、又はそれらの組み合わせについて試験することを含んでよい。HPV感染について試験することは、当分野で既知の任意の適切な様式で実施されてよい。例示的なHPV試験には、逆転写酵素 (RT) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に基づくジェノタイピング及びウエスタンブロットの任意の1つ以上が含まれてよい。腫瘍サンプルは、任意のHPVサブタイプの感染、例えば、HPV 16感染又はHPV 18感染などに対して陽性であってよい。

【0011】

本発明の一実施態様は、HPV陽性腫瘍サンプルを複数のフラグメントに分割することを含む。腫瘍サンプルは、任意の適切な数のフラグメント、例えば、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40又はそれ以上のフラグメントなどに分割されてよい。好ましくは、腫瘍サンプルは24のフラグメントに分割される。腫瘍サンプルは、任意の適切な様式で、例えば、機械的に (例えば、gentleMACS<sup>TM</sup> Dissociator, Miltenyi Biotec, Auburn, CAなどを用いて腫瘍を脱凝集 (disaggregating) させて) 又は酵素的に (例えば、コラゲナーゼ又はDNase)、分割されてよい。

【0012】

本発明の一実施態様は、複数のフラグメントを別個に培養することを含む。これに関して、フラグメントは、別個の容器中、例えば、別個のプレート、又はプレートの別個のウ

10

20

30

40

50

エル中などで培養されてよい。複数のフラグメントは、任意の適切な様式で培養されてよい。例えば、フラグメントは、米国特許出願公開公報第2012/0244133号に記載されるように、ガス透過性容器中で培養されてよい。本発明の一実施態様において、腫瘍フラグメントは、2以上のサイトカインの組み合わせの存在下で培養される。しかしながら、好ましい実施態様において、当該方法は、1のみのサイトカインの存在下で腫瘍フラグメントを培養することを含む。サイトカインは、任意の適切なサイトカイン、例えば、インターロイキン (IL) -2、IL-7、IL-15又はIL-12などであってよい。好ましくは、サイトカインはIL-2である。腫瘍フラグメントは、任意の適切な量のサイトカイン (例えば、約30 IU/mLから約6,000 IU/mL、好ましくは約6,000 IU/mL) 中で培養されてよい。好ましくは、当該方法は、約6,000 IU/mLのIL-2中で腫瘍フラグメントを培養することを含む。

10

**【0013】**

当該方法は、培養された複数のフラグメントからT細胞を得ることを含んでよい。当該方法は、T細胞をコンフルエンスまで (例えば、24ウェルプレート中、1 mLあたり約 $2 \times 10^6$ リンパ球)、例えば約12日間から約28日間など、培養することを含んでよい。

**【0014】**

当該方法は、T細胞を、特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方について試験することを含んでよい。特異的な自己HPV陽性腫瘍認識は、当分野で既知の任意の方法により、例えば、自己HPV陽性腫瘍細胞との共培養後にサイトカイン放出 (例えば、インターフェロン (IFN) - ) を測定することなどにより試験され得る。T細胞は、例えば、自己HPV陽性腫瘍細胞との共培養により、以下の1以上であるIFN- 放出がもたらされる場合に、HPV陽性腫瘍を認識すると考えられてよい: (i) T細胞を単独で培養した場合に測定されるIFN- 量 (バックグラウンド) の2倍; (ii) 少なくとも約200 pg/mL以上 (例えば、200 pg/mL以上、300 pg/mL以上、400 pg/mL以上、500 pg/mL以上、600 pg/mL以上、700 pg/mL以上、1000 pg/mL以上、5,000 pg/mL以上、7,000 pg/mL以上、10,000 pg/mL以上、又は20,000 pg/mL以上); 及び (iii) MHCクラスI抗体により、約40%超、約50%超又は約60%超ブロックされる。

20

**【0015】**

特異的なHPV抗原認識は、当分野で既知の任意の方法により、例えば、抗原陰性の抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞) であってHPV抗原のペプチドをパルスしたものとの共培養後にサイトカイン放出 (例えば、IFN- ) を測定することなどにより試験され得る。T細胞は、例えば、IFN- 放出が、以下の一方又は両方である場合に、HPV抗原を認識すると考えられてよい: (i) ネガティブコントロールペプチドをパルスした抗原提示細胞とT細胞を培養した場合に測定されるIFN- 量の2倍、及び (ii) 抗原陰性の抗原提示細胞に低濃度のHPV 16又はHPV 18ペプチド (例えば、約0.05 ng/mLから約5 ng/mL、0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL又は5 ng/mL) をパルスしたものとの共培養時に、少なくとも約200 pg/mL以上 (例えば、200 pg/mL以上、300 pg/mL以上、400 pg/mL以上、500 pg/mL以上、600 pg/mL以上、700 pg/mL以上、1000 pg/mL以上、5,000 pg/mL以上、7,000 pg/mL以上、10,000 pg/mL以上、又は20,000 pg/mL以上) のIFN- 。T細胞はまた、抗原陰性の抗原提示細胞により高濃度のHPVペプチドをパルスしたものとの共培養時にIFN- を分泌してもよい。

30

40

**【0016】**

HPV抗原は任意のHPV抗原であってよい。例えば、HPV抗原は、HPV 16 E6、HPV 16 E7、HPV 18 E6及びHPV 18 E7の任意の1以上であってよい。いくつかの実施態様において、T細胞集団は、1のみのHPV抗原を特異的に認識してよいが、いくつかの実施態様において、T細胞集団は、2以上のHPV抗原を特異的に認識してもよい。これに関して、T細胞集団は、それぞれが異なるHPV特異性を有する複数のT細胞を含んでよい。例えば、T細胞集団は、HPV 16 E6を特異的に認識するいくつかのT細胞と、HPV 16 E7を特異的に認識する他のT細胞とを含んでよく、或いは該集団は、HPV 18 E6を特異的に認識するいくつかのT細胞と、HPV 18 E7を特異的に認識する他のT細胞とを含んでよい。

**【0017】**

50



当該方法は、特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方を呈するT細胞を選択することを含んでよい。本発明の一実施態様において、T細胞を特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方について試験することにより、HPVを認識するT細胞を含有するその培養物が同定されてよいが、HPV反応性T細胞を含有するその培養物はまた、他の非HPV腫瘍抗原に対して反応性である追加のT細胞を含有してもよい。従って、選択されるT細胞集団は、複数の特異性を有するポリクローナルT細胞を含んでよい。本発明の別の実施態様において、該試験により、HPVを認識するT細胞のみを含有する培養物が同定される。これに関して、選択されるT細胞集団は、HPV特異性のみを有するT細胞を含んでよい。

【0018】

10

当該方法は、選択されるT細胞の数を拡大して、HPV特異的T細胞集団を作製することをさらに含んでよい。急速拡大 (rapid expansion) により、約10日間から約14日間の期間、好ましくは約14日間の期間にわたって、少なくとも約100倍 (又は200-、300-、400-、500-、600-、700-、800-、900-倍若しくはそれ以上) の抗原特異的T細胞数の増加が提供される。より好ましくは、急速拡大により、約10日間から約14日間の期間、好ましくは約14日間の期間にわたって、少なくとも約1000倍 (又は1500-、2000-、2500-、3000-倍若しくはそれ以上) の増加が提供される。最も好ましくは、急速拡大により、約10日間から約14日間の期間、好ましくは約14日間の期間にわたって、少なくとも約1000倍から約3000倍の増加が提供される。

【0019】

20

T細胞の数の拡大は、例えば、米国特許第8,034,334号；米国特許第8,383,099号；米国特許出願公開公報第2012/0244133号；Dudley et al., J. Immunother., 26:332-42 (2003)；及びRiddell et al., J. Immunol. Methods, 128:189-201 (1990)などに記載されるように、当分野で既知であるようないくつかの方法のいずれかにより達成され得る。例えば、T細胞の数は、フィーダーリンパ球と、インターロイキン-2 (IL-2) 又はインターロイキン-15 (IL-15) のいずれか (IL-2が好ましい) との存在下、非特異的T細胞受容体刺激を用いて、急速拡大され得る。非特異的T細胞受容体刺激は、およそ30 ng/mLのOKT3 (マウスモノクローナル抗CD3抗体) (Ortho-McNeil, Raritan, N.J.から入手可能) を含み得る。或いは、T細胞の数は、T細胞増殖因子 (例えば、300 IU/mLのIL-2又はIL-15などであり、IL-2が好ましい) の存在下、任意選択でベクターから発現され得る癌抗原 (1以上であり、エピトープ (複数可) などのその抗原性部分、又は細胞を含む)、例えば、0.3  $\mu$ M MART-1:26-35 (27L) 又はgp100:209-217 (210M) などでのin vitro刺激により急速拡大され得る。in vitroで誘導されるT細胞の数は、抗原提示細胞上にパルスされた癌抗原と同一の抗原 (複数可) で再刺激することにより急速拡大されてよい。一実施態様において、T細胞の数は、米国特許出願公開公報第2012/0244133号に記載されるように、ガス透過性容器中で拡大される。

【0020】

30

本発明の一実施態様において、当該方法は、(i) 放射線照射 (irradiated) された同種異系フィーダー細胞及び(ii) 放射線照射された自己フィーダー細胞の一方又は両方、並びに(iii) OKT3抗体及び(iv) T細胞増殖因子 (例えば、IL-2又はIL-15であり、IL-2が好ましい) の一方又は両方を用いて、T細胞の数を拡大することを含む。当該方法は、(i) 放射線照射された同種異系フィーダー細胞及び(ii) 放射線照射された自己フィーダー細胞の一方又は両方、並びに(iii) OKT3抗体及び(iv) インターロイキン (IL) -2の一方又は両方を用いて、T細胞の数を拡大することを含んでよい。好ましくは、当該方法は、(i) 放射線照射された同種異系フィーダー細胞及び(ii) 放射線照射された自己フィーダー細胞の一方又は両方、並びに(iii) OKT3抗体及び(iv) インターロイキン (IL) -2の両方を用いて、T細胞の数を拡大することを含む。特に好ましい実施態様において、当該方法は、(i) 放射線照射された同種異系フィーダー細胞、(ii) OKT3抗体及び(iii) インターロイキン (IL) -2を用いて、T細胞の数を拡大することを含む。

40

【0021】

50

さらに別の実施態様において、当該方法は、放射線照射された同種異系フィーダー細胞及び放射線照射された自己フィーダー細胞の一方又は両方と任意選択で組み合わせ、(i) OKT3抗体及び(ii) インターロイキン(IL)-2の一方又は両方を用いて、選択されたT細胞の数を拡大し、HPV特異的T細胞集団を作製することを含む。これに関して、本発明の一実施態様は、HPV特異的T細胞集団を調製する方法であって、HPV陽性腫瘍サンプルを複数のフラグメントに分割すること；該複数のフラグメントを別個に培養すること；培養された複数のフラグメントからT細胞を得ること；該T細胞を、特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方について試験すること；特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方を呈するT細胞を選択すること；並びに、(i) OKT3抗体及び(ii) インターロイキン(IL)-2の一方又は両方を用いて、選択されたT細胞の数を拡大し、HPV特異的T細胞集団を作製することを含む、方法を提供する。腫瘍サンプルを分割すること、腫瘍フラグメントを培養すること、T細胞を得ること、T細胞を試験すること、T細胞を選択すること、及び選択されたT細胞の数を拡大することは、本発明の他の側面に関して本明細書に記載するように実施されてよい。

#### 【0022】

本発明の方法により作製される、数を拡大したT細胞の集団は、HPV陽性細胞、例えば、HPV陽性癌細胞などを特異的に認識してよい。T細胞により認識される細胞は、任意のHPVサブタイプ、例えば、HPV 16又はHPV 18などに対して陽性であってよい。代替的又は追加的に、本発明の方法により作製されるT細胞集団は、任意のHPV抗原、例えば、HPV 16 E6、HPV 16 E7、HPV 18 E6及びHPV 18 E7の任意の1つ以上などを特異的に認識してよい。いくつかの実施態様において、T細胞集団は、1のみのHPV抗原を特異的に認識してよいが、いくつかの実施態様において、T細胞集団は、2以上のHPV抗原を特異的に認識してもよい。これに関して、数を拡大したT細胞の集団は、それぞれが異なるHPV特異性を有する複数のT細胞を含んでよい。例えば、数を拡大したT細胞の集団は、HPV 16 E6を特異的に認識するいくつかのT細胞と、HPV 16 E7を特異的に認識する他のT細胞とを含んでよく、或いは該集団は、HPV 18 E6を特異的に認識するいくつかのT細胞と、HPV 18 E7を特異的に認識する他のT細胞とを含んでよい。本発明の方法により作製される、数を拡大したT細胞の集団が、HPV陽性細胞を特異的に認識する能力及びHPV抗原を特異的に認識する能力は、本発明の他の側面に関して本明細書に記載するように測定されてよい。

#### 【0023】

本発明の方法により作製されるT細胞集団は、HPV関連病態、例えば癌などを治療又は予防するのに有用であってよい。従って、本発明の別の実施態様は、哺乳動物において癌を治療又は予防する方法であって、本明細書に記載の本発明の方法のいずれかに従ってHPV特異的T細胞集団を調製すること、及び該T細胞集団を、哺乳動物において癌を治療又は予防するのに有効な量で哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。

#### 【0024】

本発明の別の実施態様は、哺乳動物において癌を治療又は予防する方法であって、HPV陽性腫瘍サンプルを複数のフラグメントに分割すること；該複数のフラグメントを別個に培養すること；培養された複数のフラグメントからT細胞を得ること；該T細胞を、特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方について試験すること；特異的な自己HPV陽性腫瘍認識及びHPV抗原認識の一方又は両方を呈するT細胞を選択すること；選択されたT細胞の数を拡大して、養子細胞療法のためのHPV特異的T細胞集団を作製すること；並びに、数を拡大した該T細胞を、哺乳動物において癌を治療又は予防するのに有効な量で哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。腫瘍サンプルを分割すること、腫瘍フラグメントを培養すること、T細胞を得ること、T細胞を試験すること、T細胞を選択すること、及び選択されたT細胞の数を拡大することは、本発明の他の側面に関して本明細書に記載するように実施されてよい。本発明の別の実施態様は、哺乳動物において病態(condition)を治療又は予防する方法であって、本明細書に記載の本発明の方法のいずれかに従ってHPV特異的T細胞集団を調製すること、及び該T細胞集団を、哺乳動物において該病態を治療又は予防するのに有効な量で哺乳動物に投与することを含み、ここで、

該病態が、癌、HPV 16感染、又はHPV陽性の前癌状態（pre malignancy）である、方法を提供する。

【0025】

本発明の一実施態様は、哺乳動物に、骨髓非破壊的なリンパ球枯渇化学療法（nonmyeloablative lymphodepleting chemotherapy）を投与することを含む。骨髓非破壊的なリンパ球枯渇化学療法は、任意の適切なかかる療法であり得、任意の適切な経路により投与され得る。骨髓非破壊的なリンパ球枯渇化学療法は、特に癌がHPV陽性癌（転移性であり得る）である場合に、シクロホスファミド及びフルダラビンの投与を含み得る。シクロホスファミド及びフルダラビンの好ましい投与経路は静脈内である。同様に、任意の適切な用量のシクロホスファミド及びフルダラビンが投与され得る。好ましくは、特に癌がHPV陽性癌である場合に、およそ60 mg/kgのシクロホスファミドが2日間投与され、その後、およそ25 mg/m<sup>2</sup>のフルダラビンが5日間投与される。本発明の一実施態様において、骨髓非破壊的なリンパ球枯渇化学療法は、T細胞を投与する前に投与される。

10

【0026】

本発明の一実施態様は、骨髓非破壊的なリンパ球枯渇化学療法を投与後、哺乳動物に、本明細書に記載の本発明の方法のいずれかにより調製されるHPV特異的T細胞集団を投与することを含む。

【0027】

T細胞は、当分野で既知であるような任意の適切な経路により投与され得る。好ましくは、T細胞は、動脈内又は静脈内注入として、好ましくは約30分間から約60分間持続させて、投与される。投与経路の他の例として、腹腔内、髄腔内、及びリンパ管内（intralymphatic）が挙げられる。

20

【0028】

同様に、任意の適切な用量のT細胞が投与され得る。好ましくは、特に癌がHPV陽性癌である場合に、約 $1.0 \times 10^{10}$  T細胞から約 $13.7 \times 10^{10}$  T細胞が投与され、平均およそ $5.0 \times 10^{10}$  T細胞である。或いは、約 $1.2 \times 10^{10}$ から約 $4.3 \times 10^{10}$  T細胞が投与される。

【0029】

本発明の一実施態様において、本明細書に記載の方法のいずれかは、HPV特異的T細胞集団を医薬上許容される担体と組み合わせることをさらに含んでよい。医薬上許容される担体は、養子細胞療法に適した任意の医薬上許容される担体であってよい。例えば、医薬上許容される担体は、任意の等張性の担体、例えば、生理食塩水（水中約0.90% w/vのNaCl、水中約300 mOsm/LのNaCl、又は水1リットルあたり約9.0 gのNaCl）、NORMOSOL R電解質溶液（Abbott, Chicago, IL）、PLASMA-LYTE A（Baxter, Deerfield, IL）、水中約5%のデキストロース、又は乳酸リンゲル液などを含んでよい。一実施態様において、医薬上許容される担体には、ヒト血清アルブメン（albumen）が補充される。

30

【0030】

本発明の一実施態様は、培養されたT細胞を、該細胞の急速拡大の前に、CD8<sup>+</sup> T細胞について濃縮（enriching）することを含む。T細胞を培養後、該T細胞を、例えばCD8マイクロビーズ分離（例えば、CliniMACS<sup>plus</sup> CD8マイクロビーズシステム（Miltenyi Biotec）を用いて）を用いて、CD4<sup>+</sup>細胞について枯渇させ、CD8<sup>+</sup>細胞について濃縮する。特定の理論に拘束されるものではないが、いくつかのT細胞培養物をCD8<sup>+</sup>濃縮することにより、バルク培養物では明白となり得なかったin vitro腫瘍認識が明らかとなり、他の培養物における腫瘍のin vitro認識の改善が明らかとなると考えられる。さらに、濃縮されたCD8<sup>+</sup> T細胞は、臨床スケールの急速拡大において、バルクT細胞よりも確実且つ予想どおりに振る舞うと考えられる。

40

【0031】

本発明の一実施態様は、培養されたT細胞を、該細胞の急速拡大の前に、CD4<sup>+</sup> T細胞について濃縮することを含む。T細胞を培養後、該T細胞を、例えばCD4マイクロビーズ分離（例えば、CliniMACS<sup>plus</sup> CD8マイクロビーズシステム（Miltenyi Biotec）を用いて）を用いて、CD8<sup>+</sup>細胞について枯渇させ、CD4<sup>+</sup>細胞について濃縮する。

50

## 【 0 0 3 2 】

一実施態様において、自己T細胞の増殖及び活性化を促進するT細胞増殖因子が、自己T細胞と同時に、又は自己T細胞に続いてのいずれかで、哺乳動物に投与される。T細胞増殖因子は、自己T細胞の増殖及び活性化を促進する任意の適切な増殖因子であり得る。適切なT細胞増殖因子の例として、インターロイキン（IL）-2、IL-7、IL-15及びIL-12が挙げられ、これらは単独で又は様々な組み合わせで、例えば、IL-2及びIL-7、IL-2及びIL-15、IL-7及びIL-15、IL-2、IL-7及びIL-15、IL-12及びIL-7、IL-12及びIL-15、又はIL-12及びIL-2などの組み合わせで使用され得る。IL-12が好ましいT細胞増殖因子である。

## 【 0 0 3 3 】

一実施態様において、自己T細胞は、自己T細胞の増殖及び活性化を促進するT細胞増殖因子を発現するよう改変（modified）される。適切なT細胞増殖因子には、例えば、上記のもののいずれかなどが含まれる。適切な改変方法は、当分野で既知である。例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4<sup>th</sup>ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2012; 及びAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994を参照。望ましくは、改変される自己T細胞は、T細胞増殖因子を高レベルで発現する。T細胞増殖因子コーディング配列（例えば、IL-12のものなど）は当分野で容易に入手可能であり、高レベル発現を促進する、T細胞増殖因子コーディング配列との動作可能な連結（operable linkage）であるプロモーターも同様である。

## 【 0 0 3 4 】

T細胞増殖因子は任意の適切な経路により投与され得る。2以上のT細胞増殖因子が投与される場合、それらは、同時に又は連続的に、任意の順序で、同一経路又は異なる経路により投与され得る。好ましくは、IL-2などのT細胞増殖因子は、ボラス注入（bolus injection）として静脈内投与される。T細胞増殖因子の投与量は、患者トレランス（tolerance）に基づいて選択されてよい。例えば、T細胞増殖因子は、1つ以上の限定的有害事象が生じるまで投与されてよい。望ましくは、IL-2などのT細胞増殖因子の投与量は、当業者に高いと考えられる量である。好ましくは、特に癌がHPV陽性癌である場合に、約720,000 IU/kgの用量のIL-2が、トレランスまで1日3回投与される。好ましくは、約5から約15用量のIL-2が投与され、平均およそ9用量である。

## 【 0 0 3 5 】

一実施態様において、自己T細胞は、HPV抗原（例えば、本明細書に記載のHPV抗原のいずれかなど）に対して抗原特異性を有するT細胞受容体（TCR）を発現するよう改変されてよい。適切な改変方法は当分野で既知である。例えば、Green and Sambrook、及びAusubel（上記）を参照。例えば、T細胞は、Heemskerk et al. Hum Gene Ther. 19: 496-510（2008）及びJohnson et al. Blood 114: 535-46（2009）に記載の形質導入技術を用いて、HPV抗原に対して抗原特異性を有するT細胞受容体（TCR）を発現するよう形質導入されてよい。

## 【 0 0 3 6 】

本発明の方法に関して、癌は、以下のいずれかを含む任意の癌であり得る：急性リンパ球性癌（acute lymphocytic cancer）、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、骨癌、脳腫瘍、乳癌、肛門、肛門管又は肛門直腸（anorectum）の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、頸部、胆嚢又は胸膜の癌、鼻、鼻腔又は中耳の癌、口腔の癌、膣癌、外陰部の癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性癌（chronic myeloid cancer）、結腸癌、食道癌、子宮頸癌（cervical cancer）、消化管カルチノイド腫瘍、グリオーマ、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、肝臓癌、肺癌、悪性中皮腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、鼻咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、中咽頭癌、卵巣癌、陰茎癌、膵臓癌、腹膜、網（omentum）及び腸間膜の癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌、皮膚癌、小腸癌、軟部組織癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、尿管癌、並びに膀胱癌。好ましい癌は、子宮頸部、中咽頭、肛門、肛門管、肛門直腸、膣、外陰部又は陰茎の癌である。特に好ましい癌は、HPV陽性癌である。HPV陽性癌は、例えば、HPV 16陽性又はHPV 18陽性の癌などであってよい

。HPV感染と最も一般的に関連する癌は、子宮頸部、中咽頭、肛門、肛門管、肛門直腸、  
膺、外陰部及び陰茎の癌を含むが、本発明の方法は、他の解剖学的領域で生じるものを含  
む任意のHPV陽性癌を治療するために使用されてよい。

【0037】

本明細書で使用する場合、用語「哺乳動物」とは、任意の哺乳動物をいい、Rodentia目  
の哺乳動物（例えば、マウス及びハムスター）、及びLogomorpha目の哺乳動物（例えばウ  
サギ）を含むが、これらに限定されない。哺乳動物は、Carnivora目（Felines（ネコ）及  
びCanines（イヌ）を含む）由来であることが好ましい。哺乳動物は、Artiodactyla目（B  
ovines（ウシ）及びSwines（ブタ）を含む）由来、又はPerssodactyla目（Equines（ウマ  
）を含む）のものであることがより好ましい。哺乳動物は、Primates目、Ceboids若しく  
はSimoids（サル）のもの、又はAnthropoids目（ヒト及び類人猿）のものであることが最  
も好ましい。特に好ましい哺乳動物はヒトである。

10

【0038】

本明細書で使用する場合、用語「治療する」及び「予防する」並びにそれらの派生語は  
、100%又は完全な治療又は予防を必ずしも意味しない。むしろ、当業者が潜在的利益又  
は治療効果を有すると認識する、様々な程度の治療又は予防が存在する。これに関して、  
本発明の方法は、哺乳動物における癌の任意のレベルの治療又は予防の任意の量を提供し  
得る。さらに、本発明の方法により提供される治療又は予防は、治療又は予防される疾患  
（例えば、癌）の1つ以上の状態又は症状の治療又は予防を含み得る。例えば、本発明の  
方法により提供される治療又は予防は、腫瘍の退縮を促進することを含み得る。また、本  
明細書の目的のために、「予防」は、疾患、又はその症状若しくは状態の発症を遅延させ  
ることを包含し得る。

20

【0039】

以下の実施例は、本発明をさらに説明するが、当然ながら、その範囲を限定するものと  
して決して解釈されるべきではない。

【実施例】

【0040】

実施例1

本実施例は、養子細胞療法のためのHPV陽性腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を調製する方法を  
実証する。

30

【0041】

患者は、臨床プロトコルに参加し、腫瘍切除の前に、国立癌研究所の治験審査委員会（  
Institutional Review Board of the National Cancer Institute）によって承認された  
インフォームドコンセントにサインした。腫瘍を患者から切除した。逆転写酵素（RT）ポ  
リメラーゼ連鎖反応（PCR）ジェノタイピングを用いて、HPV 16 E6、HPV 16 E7、HPV 18  
E6及びHPV 18 E7の発現について腫瘍を試験した。

【0042】

酵素消化物、及び鋭的剥離により得られた腫瘍フラグメント（1~2 mm<sup>3</sup>）を用いて、HP  
V 16 E6陽性、HPV E7陽性、HPV 18 E6陽性及びHPV E7陽性TILの複数（24）の独立培養物  
を設定した（set up）。コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ及びDNaseを含有する培地中、  
腫瘍フラグメントを一晩酵素消化することにより得られた単細胞浮遊液（5×10<sup>5</sup>/mL）を  
培養することにより、腫瘍消化物由来のTILを作製した。腫瘍フラグメント及び消化物の  
培養は、5% CO<sub>2</sub>の加湿37℃インキュベーター中、完全培地（CM）及びIL-2（6000 IU/mL、  
Chiron Corp., Emeryville, CA）の2 mLウェル中で開始した。CMは、グルタミン含有RPM  
I1640、それに加えて10%ヒトAB血清、25 mM HEPES、10 µg/mLゲンタマイシン及び5.5×  
10<sup>-5</sup>M 2-メルカプトエタノールを含んだ。開始から5日後、培地の半分をウェルからアス  
ピレートし、新鮮なCM及びIL-2と交換し、その後必要に応じて、2日から3日毎に培地交換  
した。これらの条件下、リンパ球は最初にウェル中の接着細胞を溶解し、次いで、増殖（  
multiply）及び成長（grow）し始めるだろう。

40

【0043】

50

TIL培養物は、典型的には開始から約12～28日後に、元の2-mLウェルのコンフルエントな増殖を達成し、接着腫瘍細胞を排除した。実際には、これは、それぞれ元の腫瘍フラグメント又は消化物ウェルから約 $4 \times 10^6$  リンパ球であった。単一の24ウェルプレート中、ウェルすべてをプールすることにより、およそ $5 \times 10^7$  TIL細胞を得た。

【0044】

TIL作製のために設計した培養物が、2-mLウェル中、コンフルエンスまで拡大した際に、それらをHPV特異的反応性について試験した。TILは、数多く（典型的には、腫瘍あたり24のグループ）設定したことから、各TIL培養物を個々にカウントすることは実現不可能であった。TIL特異性アッセイは、細胞あたりの活性よりむしろ体積あたりの活性を測定する。各ウェルを十分に混合し、100マイクロリットルのリンパ球（推定 $1 \times 10^5$ 細胞）を洗浄し、自己腫瘍消化物と、又はHPV 16及びHPV 18 E6及びE7 MACS PepTivatorペプチドプールをバルスした自己単球由来樹状細胞（DCs）と一晩共培養した。ペプチドプールは、E6又はE7（HPV 16又はHPV 18）の完全配列をカバーする、11アミノ酸がオーバーラップした15-merのペプチドを含んだ。ペプチドプールは75%超の純度で、低エンドトキシンであった。次いで、酵素結合免疫吸着アッセイ（enzyme-linked immunosorbent assay）（ELISA）により、IFN- $\gamma$ 放出を測定した。結果を表Aに示す。

【0045】

【表A】

表A

患者番号	癌の原発部位	HPVタイプ	ペプチド反応性 （腫瘍フラグメント の数） <sup>1</sup>	腫瘍消化物反応性 （腫瘍フラグメン トの数） <sup>2</sup>
1	子宮頸部（cervix）	HPV-18	E7（22）	はい（4）
2	扁桃腺	HPV-16	E7（5）	-
3	子宮頸部	HPV-18	E6（7）、E7（19）	はい（3）
4	子宮頸部	HPV-16	E6（18）、E7（23）	いいえ
5	子宮頸部	HPV-16	E6（1）	いいえ
6	不明（頸部）	HPV-16	E6（23）、E7（22）	-
7	子宮頸部	HPV-18	E6（1）、E7（5）	-
8	子宮頸部	HPV-18	E7（3）	-
9	子宮頸部	HPV-18	なし	いいえ
10	不明（骨盤）	HPV-16	E6（1）	はい（1）
11	子宮頸部	HPV-18	なし	いいえ
12	子宮頸部	HPV-18	E6、E7	-
13	肛門	HPV-16	なし	-
14	肛門	HPV-16	E6	-
15	子宮頸部	HPV-16	E6、E7	-

<sup>1</sup>>200 pg/mLであり、バックグラウンド（ネガティブコントロールペプチドプール）の2倍である少なくとも1つの腫瘍フラグメントとして定義される。

<sup>2</sup>>200 pg/mL IFN- $\gamma$ であり、バックグラウンド（TIL単独）の2倍であり、W6/32 MHCクラスI抗体で>50%ブロックングとして定義される。

「-」は未試験を示す。

【0046】

HPV反応性TIL数の急速拡大は、以前に記載されるように（Dudley et al., J. Immunother., 26: 332-42（2003）及びRiddell et al., J. Immunol. Methods, 128: 189-201（1990））、急速拡大プロトコル（Rapid Expansion Protocol）（REP）を用いて実施した。簡単に述べると、TIL細胞を、ガス透過性のG-REXフラスコにて、30 ng/mLの抗CD3抗体及び6000 IU/mLのIL-2を有する完全培地（CM）中、200倍過剰な、放射線照射（40 Gy）同種異系末梢血単核「フィーダー」細胞とともに培養した。6000 IU/mL IL-2を有するCMを用

いて、5日目に培地の半分を交換し、その後必要に応じて、細胞を分けた (split)。TIL は、平均3000倍超に拡大した。

【 0 0 4 7 】

#### 実施例2

本実施例は、患者1由来のTILの反応性を実証する。

【 0 0 4 8 】

患者1由来の22の異なる腫瘍フラグメント (F1~F22) から、実施例1に記載するようにTILを作製した。患者1由来のTIL、又はメラノーマTIL (コントロール) を、HPV 18 E7ペプチドプール又はgp100 ペプチドプール (コントロール) をパルスした樹状細胞と共培養し、IFN- $\gamma$  を測定した。結果を図1A~1Bに示す。図1A~1Bに示すように、患者1の腫瘍フラグメント22由来のTILは、自己腫瘍株を認識したが、HPV 18 E7ペプチドを認識しなかった。

10

【 0 0 4 9 】

患者1の腫瘍フラグメントF16、F17若しくはF22由来のTIL、又は治療のために患者に与えられる細胞 (「輸液バッグ」) を、自己腫瘍、自己組織由来の末梢血単核細胞 (PBMC)、全てのクラスI遺伝子座で適合する腫瘍細胞、HeLa細胞 (HLA不適合)、又はCaSki細胞 (HLA不適合) と共培養した。IFN- $\gamma$  を測定した。結果を図2Aに示す。図2Aに示すように、腫瘍フラグメントF16及びF22由来のTILは、自己腫瘍認識を示した。

【 0 0 5 0 】

自己腫瘍細胞に、HLA-A、HLA-B若しくはHLA-Cに対するサイレンシングRNA、又は無関係のRNA (非ターゲティング) をトランスフェクトし、患者1由来のTILと共培養した。IFN- $\gamma$  を測定した。結果を図2Bに示す。図2Bに示すように、患者1由来のTILの認識は、HLA-Aサイレンシングにより低下した。

20

【 0 0 5 1 】

エフェクター/ターゲット細胞 (患者1 TIL/自己腫瘍細胞; DMF5/624細胞; 又は患者12 (P12) F15/HPV18E6<sub>121-135</sub>) を単独で培養するか、又は抗体を伴わずに、抗HLA-A2抗体とともに若しくは抗クラスII抗体とともに共培養した。DMF5細胞は、MART-1に対するMHCクラスI拘束性TCRを発現するよう形質導入されたT細胞である。結果を図2Cに示す。図2Cに示すように、患者1由来のTILの認識は、HLA-A\*02ブロッキングによっては阻害されず、HLA-A\*01拘束性の腫瘍認識であることが示唆された。患者1のハプロタイプはHLA-A\*01, HLA-A\*02であった。

30

【 0 0 5 2 】

患者1の腫瘍フラグメントF16若しくはF22由来のTIL; 治療のために患者に与えられる細胞 (「輸液バッグ」); メラノーマTIL 1、2若しくは3 (メラノーマ腫瘍から培養されたTIL); mE7 TCR (HPV 16 E7<sub>11-19</sub>に対するTCRを発現するよう形質導入されたPBMC由来のT細胞); 又はF15 TIL (HPV 18 E6<sub>121-135</sub>に対して反応性であり、クラスII拘束性であり、従ってHB145でブロック可能である、別の患者由来のTIL) を、gp100ペプチドプール、OKT3抗体、又は以下をパルスしたDCs (HPV 18 E7ペプチドプール、HPV 18 E7ペプチドプール及びW6/32、HPV 16 E7<sub>11-19</sub>、HPV 16 E7<sub>11-19</sub>及びW6/32、HPV 16 E7<sub>11-19</sub>及びHB145、HPV 18 E6<sub>121-135</sub>、HPV 18 E6<sub>121-135</sub>及びW6/32、又はHPV 18 E6<sub>121-135</sub>及びHB 145) と共培養した。結果を図3に示す。図3に示すように、患者1の腫瘍フラグメントF16由来のTILは、HPV 18 E7ペプチドのクラスI拘束性の認識を示した。

40

【 0 0 5 3 】

#### 実施例3

本実施例は、HPV 18 E7反応性のCD8陽性T細胞を単離するために、患者1の腫瘍フラグメント16由来のTILのクローニングを実証する。

【 0 0 5 4 】

DCsにHPV 18 E7をロードし、患者1の腫瘍フラグメント16 (F16) 由来のTILと共培養した。蛍光活性化セルソーティング (FACS) を用いて、4-1BB陽性細胞についてTILをソートした。ソートした細胞を、ウェルあたり2つの細胞で96ウェルプレートにて培養した。gp1

50

00ペプチドプール又はHPV 18 E7ペプチドプールに対する腫瘍反応性についてクローンをスクリーニングした。結果を図4A及び4Bに示す。図4A及び4Bに示すように、4-1BBベースのFACSソーティングを用いた、腫瘍フラグメントF16からのCD8陽性T細胞クローニングにより、E7 ペプチドプール反応性を有する2つのクローン（12及び21）の単離がもたらされた。

【0055】

#### 実施例4

本実施例は、患者12由来の実施例1で作製されるTILの反応性を実証する。

【0056】

患者12由来の36の異なる腫瘍フラグメント（F1～F36）から、実施例1に記載するようにTILを作製した。患者12由来のTIL、又はメラノーマTIL（コントロール）を、HPV 18 E6ペプチドプール、HPV 18 E7ペプチドプール又はgp100ペプチドプール（コントロール）をパルスした樹状細胞と共培養し、IFN- $\gamma$ を測定した。結果を図5に示す。図5に示すように、患者12からのF1及びF15腫瘍フラグメント由来のTILが、最も高レベルのIFN- $\gamma$ 産生を示した。

【0057】

自己DCsに、HPV 18 E6レンチウイルスベクター、又は緑色蛍光タンパク質（GFP）レンチウイルスベクターを形質導入した。他の自己細胞に、gp100ペプチドプール又はHPV 18 E6ペプチドプールをパルスした。形質導入された細胞を、患者12の腫瘍フラグメントF1由来のTIL、又はメラノーマTIL 1、2若しくは3と共培養した。結果を図6に示す。図6に示すように、患者12の腫瘍フラグメントF1から作製されたTILは、HPV 18 E6が形質導入されたDCsを認識し、TILが、天然にプロセッシングされ提示される抗原を標的とすることが示唆された。

【0058】

#### 実施例5

本実施例は、HPV 18 E6反応性のCD8陽性T細胞を単離するために、患者12の腫瘍フラグメント1及び15由来のTILクローンの反応性を実証する。

【0059】

DCsにHPV 18 E6をロードし、患者12の腫瘍フラグメント1及び15由来のTILと共培養した。FACSを用いて、4-1BB陽性細胞についてTILをソートした。細胞を、CD4陽性及びCD8陽性集団へとさらにソートした。ソートした細胞を、ウェルあたり2つの細胞で96ウェルプレートにて培養した。HPV 18 E6ペプチドプールに対する腫瘍反応性についてクローンをスクリーニングした。F1由来のCD4陽性細胞の480ウェルのうち14が増殖（grew）し、2が反応性であった。F1由来のCD8陽性細胞の912ウェルのうち33が増殖し、反応性のものはなかった。F15由来のCD4陽性細胞の470ウェルのうち163が増殖し、32が反応性であった。F15由来のCD8陽性細胞の960ウェルのうち41が増殖し、反応性のものはなかった。

【0060】

CD4ソートした細胞はまた、HPV 18 E6ペプチドプール（E6タンパク質全体にまたがる（spanning）プール）、ペプチドなし、HPV 18 E6タンパク質のサブプール、又はHPV 18 E6ペプチドプールのペプチド30～37との共培養時の腫瘍壊死因子（TNF）分泌により測定されるように、反応性について試験した。各サブプールは、初期ペプチドプールの一部を含有した。結果を図7A～7Cに示す。図7A～7Cに示すように、患者12由来の腫瘍フラグメントF1のクローン3、12及び20は、HPV 18 E6に対して反応性であった。作製されたCD4陽性T細胞クローンは、11アミノ酸がオーバーラップした2つの連続15-mersを認識した。ペプチドは、エピトープHPV 18 E6<sub>125-135</sub>を共有した。

【0061】

#### 実施例6

本実施例は、患者12のF15腫瘍フラグメントから作製されたクローンが、HLA-DRB1\*15拘束性の様式で、HPV 18 E6<sub>121-135</sub>を認識することを実証する。

【0062】

10

20

30

40

50



クローン3、12及び20を、表Bに記載するハプロタイプを有するドナーPBMCと共培養した。ドナーPBMCにHPV 18 E6<sub>121-135</sub>をパルスした。

【 0 0 6 3 】

【表 B】

表B

	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
ドナー1	13:02	15:01	06	06	04:02	03:01
ドナー2	03:01	04:01	02	03:02	04:02	02:01
ドナー3	13:01	15	06	06	02:01	03:01
ドナー4	03	07:01	02:01	02:02	04:01	01:01
ドナー5	01:02	14	05:01	05:03	04:01	0501
ドナー6	01:01	13:02	05:01	06	5:02	9:01
患者12	03	15:01	02	06:02	04:01	09

【 0 0 6 4 】

TNF 分泌を測定した。結果を図8A～8Cに示す。図8A～8Cに示すように、患者12のF15フラグメントから作製されたクローンは、HLA-DRB1\*15及びHLA-DQB1\*06の両方で適合するPBMC上にパルスされたHPV 18 E6<sub>121-135</sub>を認識したが、HLA-DQB1\*06のみが適合するPBMCを認識せず、HLA-DRB1\*15拘束性であることが示唆された。HLA-DRB1\*15のフェノタイプアル頻度は、25パーセントである。

【 0 0 6 5 】

患者12の腫瘍フラグメントF15のクローン3由来のTILを、HPV 18 E6<sub>77-91</sub>又はHPV 18 E6<sub>121-135</sub>をパルスした、自己PBMC又はドナーPBMCと共培養した。結果を図9Aに示す。図9Aに示すように、患者12の腫瘍フラグメントF15のクローン3由来のTILは、DRB1\*15のみが適合するPBMCを認識したが、DRB1\*06のみでは認識しなかった。

【 0 0 6 6 】

患者12の腫瘍フラグメントF15のクローン20由来のTILを、HLA-DR、HLA-DQ若しくはHLA-DPに対する抗体、pan-クラスI抗体、又はpan-クラスII抗体の存在下、HPV 18 E6<sub>121-135</sub>と共培養した。pan-クラスI及びII抗体は、それぞれ、T細胞がMHCクラスI又はクラスII分子と結合することをブロックする。結果を図9Bに示す。図9Bに示すように、患者12の腫瘍フラグメントF15のクローン20由来のTILによるコグネイト (cognate) ペプチドの認識は、HLA-DRに対するブロッキング抗体により阻害された。図9A及び9Bに示すように、患者12の腫瘍フラグメントF15由来のTILは、DRB1\*15拘束性の様式で、HPV 18 E6<sub>121-135</sub>を認識する。

【 0 0 6 7 】

実施例7

本実施例は、患者4及び8由来のTILの反応性を実証する。

【 0 0 6 8 】

患者4又は患者8由来の24の異なる腫瘍フラグメント (F1～F24) から、実施例1に記載するようにTILを作製した。患者4由来のTIL、又はメラノーマTIL (コントロール) を、HPV 16 E6ペプチドプール、HPV 16 E7ペプチドプール又はgp100ペプチドプール (コントロール) をパルスした自己DCsと共培養し、IFN- $\gamma$  を測定した。結果を図10に示す。図10に示すように、それらの腫瘍フラグメントの中で、F4、F5、F14、F19及びF22腫瘍フラグメント由来のTILが、HPV 16 E6及びE7ペプチドプールをパルスした自己DCsに対する反応性を示した。

【 0 0 6 9 】

患者8由来のTIL又はメラノーマTIL (コントロール) を、HPV 18 E6ペプチドプール、HPV 18 E7ペプチドプール又はgp100ペプチドプール (コントロール) をパルスした自己DCsと共培養し、IFN- $\gamma$  を測定した。結果を図13に示す。図13に示すように、HPV 18 E7ペプチドプールをパルスした自己DCsに対する反応性を示すTILが作製された。

## 【 0 0 7 0 】

## 実施例8

本実施例は、HPV反応性のCD4及びCD8陽性T細胞を単離するために、患者4の腫瘍フラグメント由来のTILのクローニングを実証する。

## 【 0 0 7 1 】

DCsにHPV 16 E6又はHPV 16 E7をロードし、患者4の腫瘍フラグメント由来のTILと共培養した。HPV 16 E6及びHPV 16 E7反応性のTILを、FACSを用いて、4-1BB陽性細胞について別個にソートした。実施例1に記載するように細胞の数を拡大した。細胞を、FACSにより、4-1BB陽性細胞へとさらにソートした。ソートした細胞を、ウェルあたり2つの細胞で96ウェルプレートにて培養した。細胞を、CD4陽性及びCD8陽性集団へとさらにソートした。HPV 16 E6又はE7ペプチドプールに対する腫瘍反応性についてクローンをスクリーニングした。

10

## 【 0 0 7 2 】

結果を図11A～11Dに示す。図11A～11Dに示すように、HPV 16 E6及びE7に対する反応性を有するCD8陽性及びCD4陽性T細胞クローンが作製された。

## 【 0 0 7 3 】

## 実施例9

本実施例は、抗HPV T細胞を用いた養子細胞療法が癌を治療することを実証する。

## 【 0 0 7 4 】

研究のための組み入れ基準 (Inclusion Criteria) は、(1) 再発性 / 難治性若しくは転移性の子宮頸癌 (cervical cancer)、又は任意の部位からのハイリスクHPV陽性癌、及び(2) 白金を用いた事前化学療法 (化学放射線療法を含む)、を含んだ。

20

## 【 0 0 7 5 】

腫瘍を患者から切除した。実施例1に記載するように、腫瘍からTILを得て、増殖させ、TIL数を拡大し、数を拡大した該TILをHPV反応性についてスクリーニングした。

## 【 0 0 7 6 】

患者は、-7日目及び-6日目における静脈内 (IV) へのシクロホスファミド (60 mg/kg/日)、及び-5日目から-1日目までにおけるIVへのフルダラビン (25 mg/m<sup>2</sup>/日) の、骨髄非破壊的なリンパ球枯渇前処置レジメンを受けた。

## 【 0 0 7 7 】

0日目にTILを患者に静脈内投与した。0日目から4日目まで、高用量のアルデスロイキン (aldesleukin) (インターロイキン (IL) -2) (720,000 IU/kg) を患者に静脈内投与した。

30

## 【 0 0 7 8 】

患者は、初期治療レジメンの完了 (アルデスロイキン投与の最終日と定義される) から4から6週間後に、腫瘍な完全な評価を受けた。患者が、安定している疾患又は腫瘍の縮小を有した場合、完全な評価の繰り返しを、およそ3～4ヶ月間は毎月、次いでオフスタディ基準が満たされるまで3～4ヶ月毎に実施した。全ての測定可能病変であって、全ての病変臓器を代表する最大10までの病変を標的病変として同定し、ベースライン時に記録及び測定した。他の全ての病変 (又は疾患部位) を非標的病変として同定し、これもまたベースライン時に記録した。病変を、表C (標的病変) 及び表D (非標的病変) に記載するように、固形がんの治療効果判定のためのガイドライン (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) guideline) (バージョン1.0) に従って評価した。

40

## 【 0 0 7 9 】

## 【表C】

表C

完全奏功 (CR)	全ての標的病変の消失。
部分奏功 (PR)	ベースライン最長径 (LD) 和を基準として、標的病変のLD和が少なくとも30%減少。
進行 (PD)	治療を開始してから記録される最小のLD和を基準として、標的病変のLD和が少なくとも20%増加、又は1つ以上の新病変の出現。
安定疾患 (SD)	最小のLD和を基準として、PRの条件を満たすのに十分な縮小がなく、PDの条件を満たすのに十分な増大がない。

10

【0080】

## 【表D】

表D

完全奏功 (CR)	全ての非標的病変の消失、且つ腫瘍マーカーレベルの正常化。
非完全奏功	1つ以上の非標的病変の残存。
進行 (PD)	1つ以上の新病変の出現。既存の非標的病変の明らかな進行。

【0081】

11人の患者を治療した。結果を表Eに要約する。

20

【0082】

【表 E - 1】

表E

患者	性別	年齢	原発部位	組織学	疾患部位	事前全身療法	TIL部位	細胞 (x10 <sup>9</sup> )	IL-2 用量	レスポンス (月単位の 持続期間)*
1	F	30	子宮頸部	腺- 扁平上皮	肺、門、後腹膜、 腸骨、陰断端 (vaginal cuff)	シスプラチン	肺	101	7	NR
2	M	54	扁桃腺	扁平上皮	頸部、軟部組織	ドセタキセル、 シスプラチン、 5-フルオロウラシル (FU) 、セツキシマブ	頸部軟部組織	89	1	NR
3	F	53	子宮頸部	扁平上皮	肺、肝臓、骨盤	シスプラチン、 パクリタキセル、 カルボプラチン、 トポテカン、 イキサベピロシ、 フェーズI	肺	126	3	PR (2)
4	F	35	子宮頸部	扁平上皮	縦隔、門、肺	シスプラチン、 ゲムシタビン、 トポテカン、 パクリタキセル	傍気管リンパ 節	152	2	PR (9+)
5	F	55	子宮頸部	扁平上皮	腋窩、腹壁	カルボプラチン、5-FU、 イリノテカン	腋窩リンパ節 (LN)		7	NR
6	M	60	不明 (頸部)	扁平上皮	肝臓、頸部、骨、 胸壁、後腹膜、 門脈周囲	カルボプラチン、 シスプラチン、 カベシタビン	肝臓	150	6	NR
7	F	44	子宮頸部	扁平上皮	縦隔、鎖骨上、脳	シスプラチン	大動脈肺動脈 (AP) 窓LN	90	5	NR

10

20

30

40

【 補 表 - 2 】

患者	性別	年齢	原発部位	組織学	疾患部位	事前全身療法	TIL部位	細胞 ( $\times 10^9$ )	IL-2 用量	レスポンス (月単位の 持続期間)*
8	F	37	子宮頸部	腺	腹腔内、後腹膜、 腹壁、肝臓表面	シスプラチン	右上腹部 (RU Q) 腹腔内	75	8	PR (2+)
9	F	59	子宮頸部	腺	腹壁、肺	シスプラチン、 カルボプラチン、 パクリタキセル、 ベバシズマブ	肺	33	8	保留
10	F	58	不明 (骨盤)	扁平上皮	縦隔、門、肺	シスプラチン、5-FU、 カルボプラチン、 パクリタキセル、 セツキシマブ、 イリノテカン	AP窓LN	32	2	保留
11	F	31	子宮頸部	腺- 扁平上皮	肝周囲、骨盤	シスプラチン、 パクリタキセル	盲腸周囲腹腔 内			

NR=レスポンスなし

【 0 0 8 3 】

10

20

30

40

50

表Eに示すように、結果が利用可能であった8人の患者のうち、HPV反応性TILを用いた養子細胞療法により、3人の客観的応答者（objective responders）（OR）がもたらされ、それらはすべて部分奏功者（partial responders）（PR）であった。2つの部分奏功は、治療から2ヶ月後において持続し（患者3及び4）、1つの部分奏功（患者8）は、治療から9ヶ月後において持続する。

【0084】

患者4の胸部及び骨盤のコンピューター断層撮影（CT）スキャンを、治療前及び治療から9ヶ月後に実施した。結果を図12A～Fに示す。図12A～Bに示すように、大動脈周囲リンパ節における癌病変は、治療から9ヶ月後に100%縮小した。図12C～Dに示すように、左肺門リンパ節における癌病変も治療から9ヶ月後に100%縮小した。図12E～Fに示すように、総腸骨リンパ節における癌病変も治療から9ヶ月後に100%縮小した。

10

【0085】

患者8の肝臓の磁気共鳴画像（MRI）スキャンを、治療前及び治療から2ヶ月後に実施した。結果を図14A～14Bに示す。図14A～Bに示すように、肝臓における癌性の腫瘍は、治療から2ヶ月後に100%縮小した。患者8の腹部及び骨盤のCTスキャンも、治療前及び治療から2ヶ月後に実施した。結果を図14C～Hに示す。図14C～Dに示すように、後腹膜リンパ節における癌病変も100%縮小した。図14E～Fに示すように、腹壁における癌性の腫瘍も100%縮小した。さらに、図14G～Hに示すように、癌性の左結腸周囲腫瘍は、劇的に縮小した。

【0086】

20

実施例10

本実施例は、実施例9に記載の結果が得られてから9ヶ月後に得られた、実施例9に記載の臨床研究のアップデートされた結果を提供する。本実施例は、抗HPV T細胞を用いた養子細胞療法が癌を治療することを実証する。

【0087】

方法：HPV E6-及びE7-反応性について選択された腫瘍浸潤リンパ球（TIL）（HPV-TIL）を用いて転移性HPV+ 癌を治療するための臨床試験を、実施例9に記載するように実施した。HPV-TIL注入は、実施例9に記載するように、先に骨髄非破壊的なコンディショニングを行い、続いて高用量のアルデスロイキンボーラス投与（bolus aldesleukin）を行った。ELISPOT、IFN-ガンマ産生及びCD137発現アッセイによりHPV反応性を評価した。

30

【0088】

結果：9人の子宮頸癌患者を当該研究で治療した。患者は、単回注入として、中央値にして $81 \times 10^9$  T細胞（33から $152 \times 10^9$ の範囲）を受けた。注入された細胞は、6/8患者において、ハイリスクHPV E6及び/又はE7に対する反応性を有した。いずれのHPV反応性も有さない2人の患者は、治療に応答しなかった。HPV反応性を有する6人の患者のうち3人は、RECISTにより客観的な腫瘍縮小効果（objective tumor responses）（1 PR及び2 CR）を実証した。1人の患者は、39%の最良効果（best response）を有した。広範な転移を有する2人の患者は、治療から18ヶ月後及び11ヶ月後において持続する、完全な腫瘍縮小効果を有した。完全奏功を有する患者の1人は、化学療法抵抗性のHPV-16+ 扁平上皮癌を有し（実施例9の患者4）、もう1人は、化学放射線療法抵抗性のHPV-18+ 腺癌（実施例9の患者8）を有した。患者はともに、治療後の、HPV反応性T細胞での長期にわたる再増殖（repopulation）を実証した。HPV特異的T細胞の頻度の増加が、1人の患者では13ヶ月後に、もう1人の患者では6ヶ月後に検出可能であった。治療に応答しない、HPV反応性TILを有する2人の患者は、HPV反応性T細胞での再増殖を示さなかった。

40

【0089】

6人の非子宮頸癌患者も当該研究で治療した。1人の患者は、転移性扁桃腺癌の客観的な臨床反応、すなわち部分奏功を示し、治療から4ヶ月後において持続した（図20A～J）。

【0090】

結果を表F～Gに示す。

【0091】

50

【表 F】

表F

HPV-TIL 子宮頸癌コホート							
患者	年齢	組織学	HPVタイプ	疾患部位	事前全身療法	TIL部位	細胞 ( $\times 10^9$ )
1	30	腺- 扁平上皮	HPV-18	肺、門、後腹膜、腸 骨、臍断端	シスプラチン	肺	101
3	53	扁平上皮	HPV-18	肺、肝臓、骨盤	シスプラチン、パクリタキセル、 カルボプラチン、トボテカン、 イキサベピロン、フェーズI	肺	126
4	35	扁平上皮	HPV-16	縦隔、門、肺、 腸骨	シスプラチン、ゲムシタジン、 トボテカン、パクリタキセル	傍気管 リンパ節	152
5	55	扁平上皮	HPV-16	腋窩、腹壁	カルボプラチン、5-FU、 イリノテカン	腋窩LN	81
7	44	扁平上皮	HPV-18	縦隔、鎖骨上、脳	シスプラチン	AP窓LN	90
8	37	腺	HPV-18	結腸傍 (paracolic) 、後腹膜、腹壁、 肝臓表面	シスプラチン	RUQ腹腔内	75
9	59	腺	HPV-18	腹壁、肺	シスプラチン、カルボプラチン、 パクリタキセル、ベバシズマブ	肺	33
11	31	腺- 扁平上皮	HPV-18	肝周囲、骨盤	シスプラチン、パクリタキセル	盲腸周囲	46
12	37	腺	HPV-18	骨盤、後腹膜、 腋窩、縦隔、肺	カルボプラチン、パクリタキセル 、イピリムマブ	鎖骨上LN	70

\*細胞注入から月単位で測定。

【表 G】

表G

HPV-TIL非子宮頸癌コホート										
患者	性別	年齢	原発部位	組織学	疾患部位	事前全身療法	TIL部位	細胞 (x10 <sup>9</sup> )	IL-2 用量	レスポンス (月単位の 持続期間)*
頭頸部										
2	M	54	扁桃腺	扁平上皮	頸部、軟部組織	ドセタキセル、シスプラチン、5-FU、セツキシマブ	頸部 軟部組織	89	1	PD
6	M	60	不明 (頸部)	扁平上皮	肝臓、頸部、骨、 胸壁、後腹膜、 門脈周囲	カルボプラチン、シスプラチン、 カペシタビン	肝臓	150	6	PD
13	M	60	扁桃腺	扁平上皮	肺、門	ドセタキセル、シスプラチン、 ペバシズマブ、セツキシマブ、 ゲムシタビン	肺	131	5	PR (4+)
肛門										
10	F	58	不明 (AINを有 する骨盤)	扁平上皮	縦隔、門、肺	シスプラチン、5-FU、 カルボプラチン、パクリタキセル、 セツキシマブ、イリノテカン	AP窓LN	32	2	PD
14	F	49	肛門	扁平上皮	縦隔、後腹膜、骨盤	5-FU、マイトマイシン、 シスプラチン、カルボプラチン、 蛋白結合パクリタキセル	頸部LN	69	3	PD
15	F	58	肛門	扁平上皮	肝臓、後腹膜、骨盤	5-FU、マイトマイシン、シスプラチン	肝臓	48	6	PD
*細胞注入から月単位で測定。										

【0093】

これらのデータは、HPV-TILが転移性子宮頸癌の永続的な完全退縮を媒介できること、及び細胞療法が上皮性悪性腫瘍の完全退縮を媒介できることを示す。これらのデータはまた、HPV-TILが転移性扁桃腺癌の退縮を媒介できることも示す。

10

20

30

40

50



## 【0094】

## 実施例11

本実施例は、抗HPV T細胞を用いた養子細胞療法による実施例10で得られた完全な腫瘍縮小効果をさらに説明する。

## 【0095】

## 方法

HPV-TILの作製：以前に記載されるように (Dudley et al., J. Immunother., 26 (4) : 332-42 (2003))、切除腫瘍の2 mmのフラグメントから腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を増殖させた。リンパ球アウトグロース (outgrowth) の2週間から3週間後に、培養物をフローサイトメトリーにより細胞構成について評価し、以下のHPVオンコプロテイン反応性の評価セクションに記載するように、インターフェロン (IFN) -ガンマ産生アッセイによりHPVタイプ特異的E6及びE7に対する反応性について評価した。CD3、CD4、CD8及びCD56に対して特異的な蛍光抗体 (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー分析を実施した。HPVオンコプロテインに対する反応性、急速増殖、高T細胞純度、及び高頻度のCD8+ T細胞に基づき、更なる拡大のために培養物を選択した。治療のために使用される細胞数への拡大は、G-REXガス透過性フラスコを用いた急速拡大プロトコルにより達成された (Dudley et al., J. Immunother., 26 (4) : 332-42 (2003) ; Jin et al., J. Immunother., 35 (3) : 283-92 (2012))。注入産物は、生細胞数、T細胞純度 (フローサイトメトリー)、能力 (potency) (IFN- 産生)、無菌性 (微生物学的研究)、及び腫瘍細胞の不存在 (細胞病理学) について証明された。

## 【0096】

患者の治療：患者は、転移性子宮頸癌及び測定可能な疾患を有した。初回化学放射線療法又は転移性セッティングのいずれかにおいて、白金剤を用いた事前の治療を必要とした。コンディショニングレジメンは、IVへのシクロホスファミド60 mg/kgを2日間毎日、それに続いて、IVへのフルダラビン25 mg/m<sup>2</sup>を5日間毎日、からなった。20分から30分間にわたって細胞をIV投与した。IVへのアルデスロイキン720,000 IU/kg/用量を、細胞注入から24時間以内に開始し、毒性のため又は最大15用量のために中止するまで、8時間毎に継続した。フィルグラスチムを細胞注入の翌日に開始し、好中球数が回復するまで継続した。

## 【0097】

腫瘍縮小効果 (tumor responses) : コンディショニングレジメン開始前4週間以内に、ベースラインイメージング研究を得た。フォローアップイメージングは、治療から6週間後、3つの評価のために毎月、3つの評価のために3ヶ月毎に、次いで2つの評価のために6ヶ月毎に得た。

## 【0098】

HPVオンコプロテイン反応性の評価：HPV反応性は、T細胞 (40,000から100,000細胞) を、E6、E7、gp100、又はEBNA1及びBZLF1にわたるペプチドプール (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (1 µM) をロードした自己の未熟樹状細胞 (40,000細胞) と共培養することにより決定した。ペプチドプールは、11アミノ酸がオーバーラップした15-merのペプチドを含んだ。樹状細胞は、末梢血単核細胞 (PBMC) の接着フラクションから、又は磁気ビーズ単離 (Miltenyi Biotec) を用いてPBMCから単離されたCD14+細胞から、10% ヒト血清並びに1000 IU/ml GM-CSF及び500 IU/ml IL-4を添加したDMEM中で5日から6日間培養することにより作製した。抗EBVコントロールT細胞は、10% ヒト血清及び3000 IU/ml IL-2を添加したAIM-V/RPMI培地中で、EBNA1及びBZLF1ペプチドプール (10 µg/mL) とともにPBMCを培養することにより、治療前に作製した。IFN- 産生アッセイについて、上清中のIFN- 濃度は、一晚共培養後に決定した (R&D Systems (Minneapolis, MN) 又は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA))。

## 【0099】

ELISPOT (Mabtech (Cincinnati, OH)) 分析を、製造者の説明書に従って実施した。簡単に述べると、捕捉抗体 (クローン1-D1K, Mabtech) でプレコーティングされたELIIPブ

レート (Millipore (Billerica, MA) のWAIPSWU) に10,000個のエフェクター細胞及び40,000個のターゲット細胞を播種した。16時間から18時間のインキュベーション後、ビオチン化抗IFN- $\gamma$ 抗体 (7-B6-1 biotin, Mabtech) を室温で2時間添加することにより、IFN- $\gamma$ 分泌を検出した。ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (Mabtech) とともに1時間インキュベーション後、基質試薬 (5-ブromo-4-クロロ-3'-インドリルホスフェート p-トルイジン/ニトロブルーテトラゾリウムクロリド (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine/ nitro-blue tetrazolium chloride), Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Gaithersburg, MD)) を添加して、スポット形成をさせた。スポット形成は、水道水ですすぐことにより停止させた。ImmunoSpot自動リーダー (Cellular Technology, Ltd. (Shaker Heights, OH)) を用いてスポットをカウントした。E6又はE7に対するELISPOT応答は、ネガティブコントロールの2倍を超え、且つ10スポット/ウェルより多い場合に陽性と定義した。

#### 【0100】

CD137上方制御アッセイを、20時間から24時間の共培養後、フローサイトメトリー分析により実施した (Wolfl et al., Blood, 110 (1) : 201-10 (2007))。細胞をCD137、CD4、CD8及びCD3に対する蛍光抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA) で標識した。それらをヨウ化プロピジウム (BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey) で対比染色した後、BD FACSCanto IIセルアナライザー (BD Biosciences) を用いてデータ収集した。FlowJoソフトウェアMacバージョン10 (TreeStar, Ashland, OR) を用いてデータを分析した。

#### 【0101】

免疫組織化学：免疫組織化学染色を、NCIのLaboratory of Pathologyにて、標準的な手順に従って、ホルマリン固定パラフィン包埋転移性腫瘍の4  $\mu$ M切片に対して実施した。脱パラフィン、再水和及び抗原賦活化 (antigen retrieval) の後、腫瘍切片を、1:80希釈の抗ヒトCD4クローン1F6 (Novocastra, Wetzlar, Germany) とともに2時間、1:50希釈の抗ヒトCD8クローンCD8/144B (Dako Corp., Glostrup, Denmark) とともに2時間、又は1:200希釈の抗ヒトp16クローンJC8 (Santa Cruz, Dallas, Texas) とともに32分間、インキュベートした。CD4染色スライドは、AutostainerLink 48 (Dako Corp.) で染色し、EnVision Flex+ 検出システム (Dako Corp.) を用いて可視化した。CD8及びp16染色スライドは、Ventana Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) で染色し、Ultravi

#### 【0102】

末梢血からのリンパ球サブセットの決定：手動の鑑別決定 (manual differential determination) を用いた全血球計算は、Clinical Center Hematology Laboratoryにより実施された。T、B及びNK細胞に対するリンパ球フェノタイピングは、標準化された基準を用いて、NIH Immunology Flow Cytometry Laboratoryにより実施された。

#### 【0103】

リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) : RNeasyキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、新鮮腫瘍組織の2 mmのフラグメントからRNAを単離した。qScriptcDNAスーパーミックス (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD) を用いて、逆転写ファーストストランドDNA合成を実施した。カスタムメイドのTaqmanプライマー及びプローブ配列 (Applied Biosciences, Foster City, CA) を、HPV16-E6、HPV16-E7、HPV18-E6及びHPV18-E7のために使用した。容易に入手可能なグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プライマー-プローブセットを用いて、オンコプロテイン発現レベルを標準化した (Hs02758991\_g1, Applied Biosciences, Foster City, CA)。7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosciences) にてRT-PCRを実施した。

#### 【0104】

血清サイトカインレベルの分析：HPV-TILでの治療前及び治療後に採取した患者の血清中、17のサイトカインレベル (IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、I

10

20

30

40

50

L-12p70、IL-13、IL-17、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球単球コロニー刺激因子（GM-CSF）、IFN- $\gamma$ 、単球走化性タンパク質（MCP）-1、マクロファージ炎症性タンパク質（MIP）-1 $\alpha$ 、及び腫瘍壊死因子（TNF）- $\alpha$ を、Bio-PlexPro Human Cytokine 17-plex Assay（Bio-Rad Laboratories）を用いて、製造者の説明書に従って測定した。Bio-Plex200システム（Bio-Rad）によりサイトカインレベルを得た。

#### 【0105】

##### ケースレポート

患者4は、HPV-TILでの治療14ヶ月前に、ステージ3Bの低分化子宮頸部扁平上皮癌と診断された。患者は、最初に、シスプラチン、ビンクリスチン及びブレオマイシンで治療され、それに続いて、ゲムシタビン＋シスプラチンを用いた化学放射線療法、及び小線源療法で治療された。2ヶ月後、傍気管リンパ節（バイオプシーにより確認）、気管分岐部リンパ節及び両側肺門リンパ節に転移性癌が検出された。患者は、疾患の進行前に、トポテカン及びパクリタキセルを4サイクル受け、次いで、実施例9及び10に記載の臨床試験を施行された。HPV-TILは、切除した傍気管リンパ節から調製した。患者は、リンパ球枯渇化学療法を受け、それに続いて、 $152 \times 10^9$  HPV-TILの単回静脈内注入、及び2用量のアルデスロイキンを受けた。アルデスロイキンの投薬は、患者の疲労のために中止した。患者は、細胞注入から12日後、血液学的回復後に病院から退院した。

#### 【0106】

患者8は、HPV-TILでの治療17ヶ月前に、ステージIB2の子宮頸部腺癌と診断された。原発腫瘍は、シスプラチンを用いた化学放射線療法、それに続いて小線源療法で治療された。5ヶ月後、患者は、化学放射線療法抵抗性の原発腫瘍（バイオプシーにより確認）を有することが注目された。救済手術により、傍大動脈及び腸骨リンパ節転移、並びに残存する骨盤の疾患（residual pelvic disease）が同定された。該患者の癌は、更に後腹膜リンパ節及び肝臓表面を侵すように進行し、右側水腎尿管症及び両側性肺動脈塞栓を発症し、尿管ステント及び抗凝固療法を必要とした。次いで、本実施例に記載のプロトコルに従って、2つの腹膜小結節（peritoneal nodules）から作製されたHPV-TILを用いて患者を治療した。患者は、リンパ球枯渇化学療法を受け、それに続いて、 $75 \times 10^9$  HPV-TIL細胞及び8用量のアルデスロイキンを受けた。アルデスロイキンの投薬は、肺水腫に続発する低酸素症のために中止し、酸素補給を必要とし、利尿で解決された。細胞注入から11日後に、病院から退院した。

#### 【0107】

##### 完全な臨床的反応

患者はともに、治療前に播種性の進行性疾患を有した（図12A～F；図14A～H；図15A～B；図16A～D；図21A～H；及び図22A～H）。患者4は、傍大動脈縦隔リンパ節、両側肺門（bilateral lung hila）リンパ節、気管分岐部リンパ節、及び腸骨リンパ節を侵す転移性腫瘍を有した（図15A；図12A～F；及び図21A～H）。患者8は、少なくとも7つの部位を侵す転移性癌を有した：肝臓表面上の2つの腫瘍、傍大動脈及び大動静脈（aortocaval）のリンパ節、腹壁、左骨盤における結腸周囲腫瘍、並びに右尿管を塞ぐ小結節（図15B；図14A～H；図16A～D；及び図22A～H）。患者はそれぞれ、単回注入T細胞で治療され、数ヶ月にわたって生じる腫瘍退縮がもたらされた（図15A～B）。患者はともに、客観的な完全腫瘍縮小効果を生じ、治療から18ヶ月後及び11ヶ月後において持続した（図21A～H（患者4）及び図22A～H（患者8））。右尿管を塞ぐ腫瘍の退縮後、以前に留置された尿管ステントを患者8から除去した（図22G及びH）。いずれの患者も追加の治療を受けなかった。患者はともに、フルタイムの雇用に復帰した。

#### 【0108】

##### HPV-TILの毒性

細胞注入と関連する急性毒性は存在しなかった。自己免疫の有害事象は生じなかった。患者はともに、発熱と関連する一過性の血清サイトカインの上昇を呈したが（図17A～B）、いずれの患者も重篤なサイトカイン放出症候群は発症しなかった。凍結保存された血清中のサイトカインレベルを決定した。試験は以下のサイトカインについて行った：IL-1

10

20

30

40

50

、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12 (p70)、IL-13、IL-17、G-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、IFN- $\gamma$ 、MCP-1、マクロファージ炎症性タンパク質1ベータ (MIP-1 $\beta$ ) 及びTNF- $\alpha$ 。2の連続測定においてベースラインの2倍超のレベルを有するサイトカインを示す。アルデスロイキンは、細胞注入から8時間毎に投薬された (患者4は2用量を受け、患者8は8用量を受けた)。G-CSFは、細胞注入翌日から開始して毎日投与され、好中球数が回復するまで継続された (患者4は11用量を受け、患者8は9用量を受けた)。

【0109】

アルデスロイキンは、プロトコルデザインによりトレランスまで投薬され、患者4は疲労のために、患者8は呼吸困難のために中止した。グレード3及びグレード4の有害事象を表Hに列記する。最も一般的な毒性は、血液学的であり、リンパ球枯渇コンディショニングレジメン (シクロホスファミド及びフルダラビン) の予想される作用であった。

【0110】

【表H】

表H

毒性	患者4	患者8
貧血	X	X
好中球減少症	X	X
リンパ球減少症	X	X
白血球減少症	X	X
血小板減少症	X	X
発熱性好中球減少症	X	X
感染症		X
疲労	X	
嘔気／嘔吐	X	X
失神†		X
下部消化管 (GI) 出血*		X
血尿*		X
低リン血症	X	

†治療から15日後、病因不明の単回エピソード。

\*放射線性膀胱炎及び大腸炎と関連。

【0111】

腫瘍抗原発現及びT細胞浸潤

HPV-TILの作製のために切除された転移性腫瘍は、患者4由来の扁平上皮癌及び患者8由来の腺癌であった。悪性細胞は、ハイリスクHPV感染の高感度指標であるp16INK4Aを発現した。HPVタイプ、並びにHPV-TILの標的抗原であるE6及びE7の発現レベルを、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により各患者腫瘍について決定した。患者4はHPV-16+の癌を有し、患者8はHPV-18+の癌を有した。両方の患者由来の腫瘍におけるT細胞浸潤は、患者4ではCD8+細胞が、患者8ではCD4+細胞が多数を示す混合組成を示した。CD4+及びCD8+ T細胞はともに、切除腫瘍から増殖した。注入されるHPV-TILは、患者4では19%のCD4+及び79%のCD8+ T細胞から構成され、患者8では15%のCD4+及び87%のCD8+ T細胞から構成された。

【0112】

HPV-TILによるHPVオンコプロテインの標的化

患者4に投与されるHPV-TILは、インターフェロン (IFN)- $\gamma$  産生及びELISPOTアッセイにより実証されるように、E6及びE7オンコプロテインの両方に対して反応性であった (図18A及びC)。ELISPOTアッセイにより、注入細胞の5%、及び7%超が、それぞれ、E6又はE7に対する応答を示した (図18C及びD)。E6応答は、CD8+ T細胞媒介性であり、E7応答は

、CD4+及びCD8+ T細胞媒介性であった。CD137上方制御アッセイにより測定されるように、合計で注入細胞の14%がHPV反応性を示した。患者8について、HPV-TILはE7に対して反応性であり（図18B）、ELISPOTアッセイにより、T細胞の4%が抗原に応答した（図18D）。この応答は、CD4+ T細胞により主に媒介された。

#### 【0113】

オンコプロテイン反応性T細胞での再増殖

HPV-TIL注入に続いて、末梢血CD4+及びCD8+ T細胞が急速に増加したが、NK及びB細胞はしなかった（図19A～B）。注入T細胞の数の拡大は、IFN- $\gamma$  産生、ELISPOT、及びCD137上方制御アッセイにより測定されるように、HPVオンコプロテインに対する末梢血T細胞反応性の確立及び持続と関連した（図19C～F）。患者はともに、治療前には、たとえ存在するとしても、E6又はE7に対する反応性を殆ど有さなかった。治療の後、患者4は、E6及びE7のロバストなT細胞認識を獲得した。患者8については、この認識は弱かったが、それにもかかわらず検出可能であり、注入T細胞と一致して、E7のみに対して向けられた。治療から1ヶ月後、患者4の末梢血T細胞の12%が、オンコプロテイン反応性であった（E6に対して7%及びE7に対して5%）（図19E）。これらの抗原に対する反応性は、細胞注入から4ヶ月後及び13ヶ月後において持続され、末梢血T細胞の1%がオンコプロテイン認識を示した（図19E）。患者8は、治療から1ヶ月後において、0.4%のHPV反応性T細胞を示した（図19F）。この反応性は、治療から3ヶ月後及び6ヶ月後において、低レベルにもかかわらず持続された（図19D及びF）。注入HPV-TILにおけるT細胞サブセットの反応性と一致して、患者で再増殖（repopulated）したHPV特異的T細胞は、主に、患者4についてはE6及びE7反応性CD8+ T細胞であり、患者8についてはE7反応性CD4+ T細胞であった。

#### 【0114】

実施例12

本実施例は、実施例10及び11に記載の結果が得られてから4ヶ月後に得られた、実施例10及び11に記載の臨床研究からの、患者4及び8のアップデートされた結果を提供する。本実施例は、抗HPV T細胞を用いた養子細胞療法が癌を治療することを実証する。

#### 【0115】

実施例10及び11に記載するように治療された患者4及び8の客観的な完全腫瘍縮小効果は、それぞれ、治療から22ヶ月後及び15ヶ月後において持続した。

#### 【0116】

刊行物、特許出願及び特許を含む、本明細書に引用した全ての参考文献は、それぞれの参考文献が参照によって組み込まれることが個々に且つ具体的に示され、その全体が本明細書に記載されているのと同程度まで、参照によって本明細書に組み込まれる。

#### 【0117】

本発明の説明に関して（特に、以下の特許請求の範囲に関して）、用語「a」及び「an」及び「the」及び「少なくとも1つ（at least one）」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書に特記がないか文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方をカバーすると解釈すべきである。1つ以上の事項の列挙の後での用語「少なくとも1つ」の使用（例えば、「A及びBの少なくとも1つ」）は、本明細書に特記がないか文脈と明らかに矛盾しない限り、列挙した事項から選択される1つの事項（A又はB）、又は列挙した事項のうち2つ以上の任意の組み合わせ（A及びB）を意味すると解釈されるべきである。用語「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」及び「含有する（containing）」は、特記のない限り、オープンエンドの用語（すなわち、「～を含むがそれらに限定されない」を意味する）と解釈すべきである。本明細書中の値の範囲の記述は、本明細書に特記のない限り、その範囲内に入る各個別の値に個々に言及する省略方法として働くことのみを意図しており、各個別の値は、それが本明細書に個々に記述されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に特記がないか文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施できる。本明細書で提供される任意の及び全ての例又は例示的用語（例えば、「など（such as）」）の使用は、本発明をよりよく説明することのみを意図しており、特段特許請求されない限り

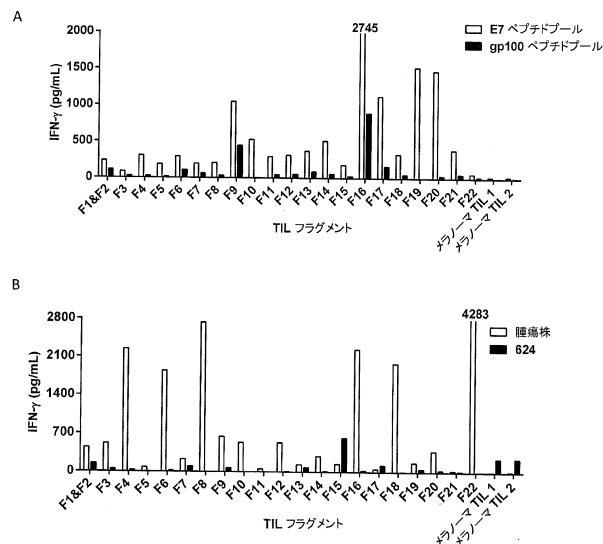
、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書の全ての用語は、特許請求されていない任意の要素を本発明の実施に必須のものとして示していると解釈すべきではない。

【 0 1 1 8 】

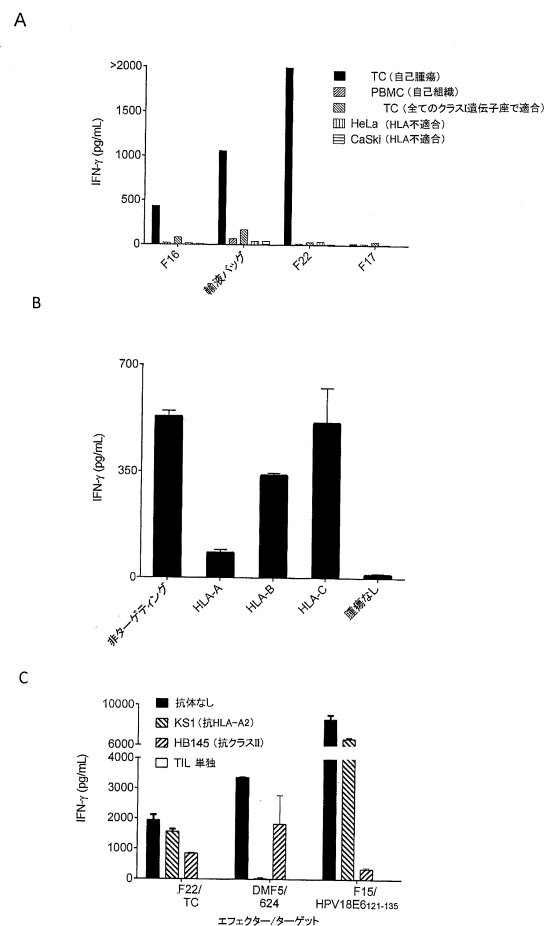
発明を実施するために本発明者らが知る最良の形態を含む、本発明の好ましい実施態様が本明細書に記載される。これらの好ましい実施態様のバリエーションは、上述の説明を読めば当業者に明らかとなり得る。本発明者らは、当業者がかかるバリエーションを適宜使用することを予期しており、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されたのとは異なる方法で本発明が実施されることを意図している。従って、本発明は、適用法によって許容されるとおり、本明細書に添付した特許請求の範囲に記載される主題の全ての改変及び等価物を含む。さらに、その全ての可能なバリエーションでの上記要素の任意の組み合わせが、本明細書に特記がないか文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明によって包含される。

10

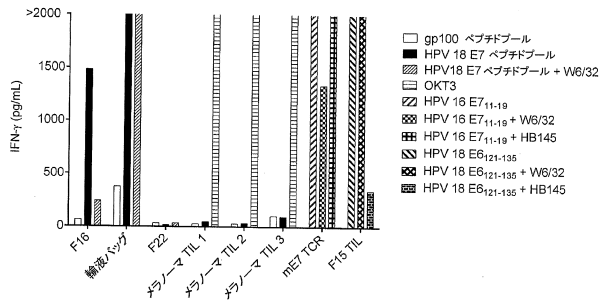
【 図 1 】



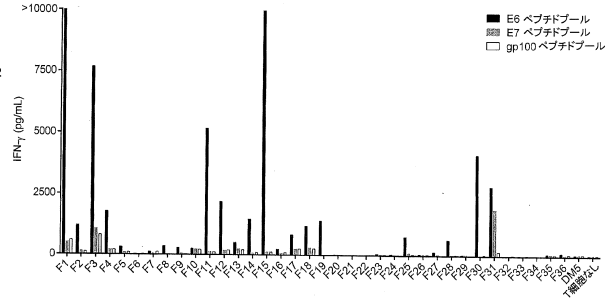
【 図 2 】



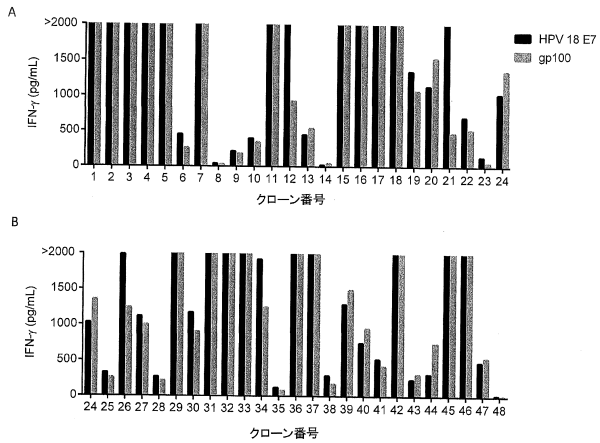
【図 3】



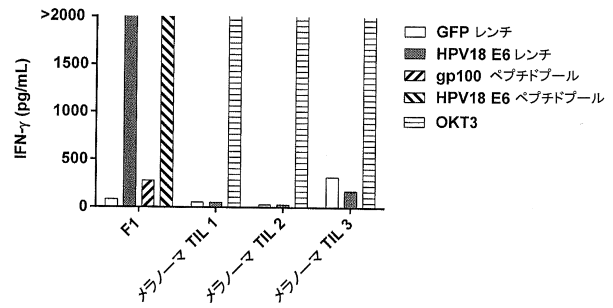
【図 5】



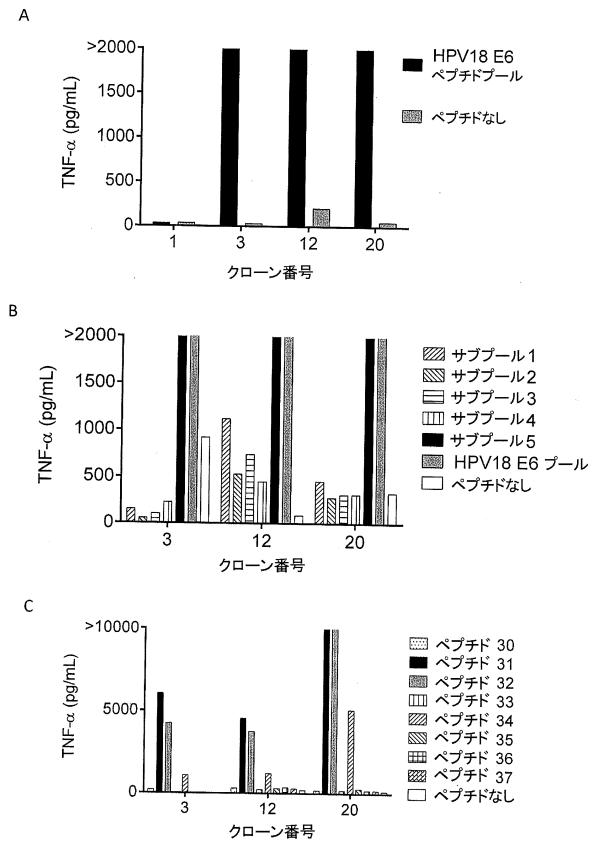
【図 4】



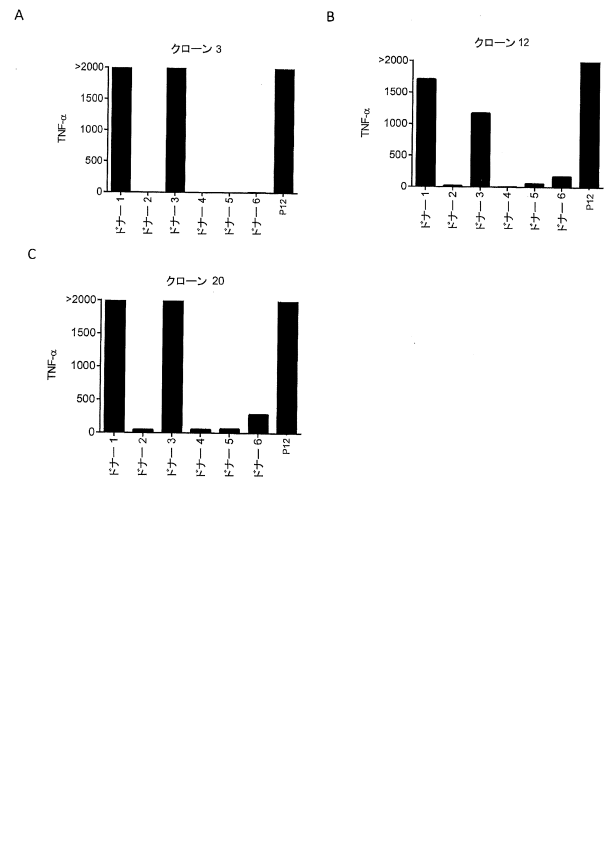
【図 6】



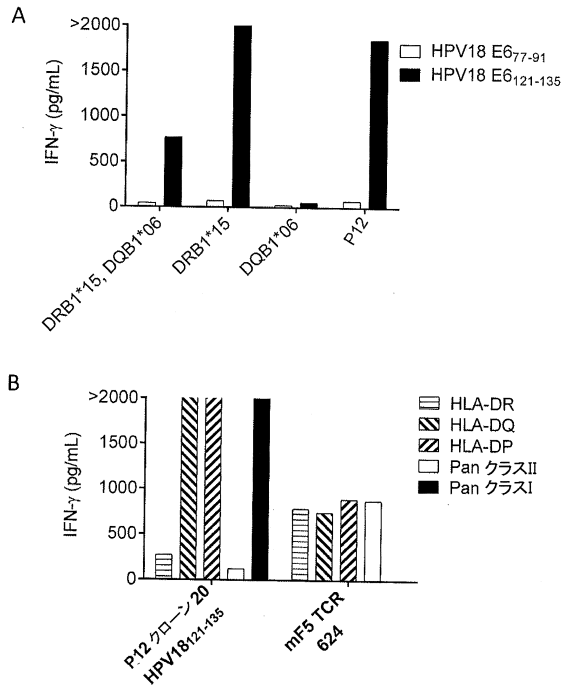
【図 7】



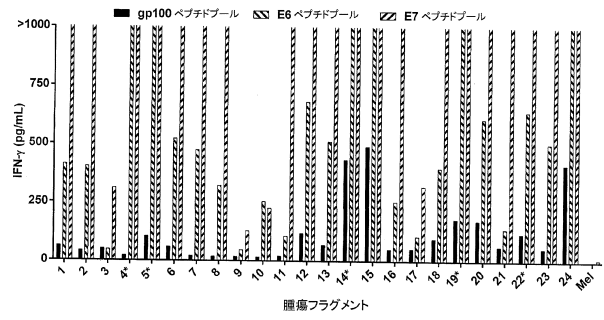
【図 8】



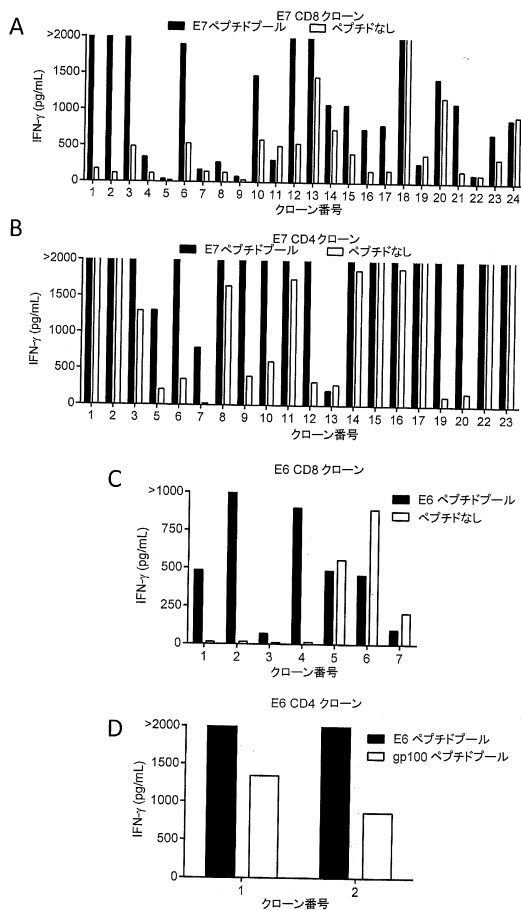
【図 9】



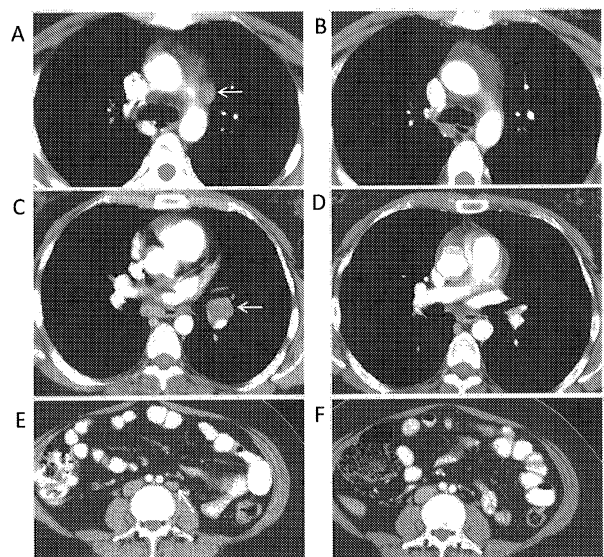
【図 10】



【図 11】

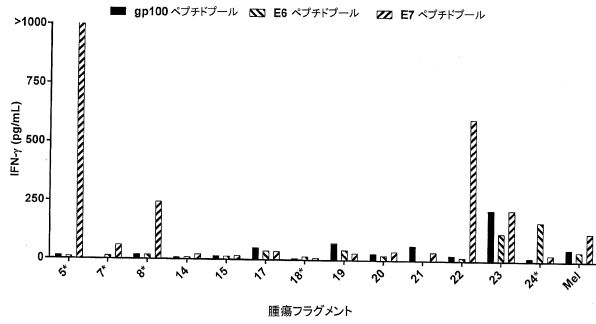


【図 12】

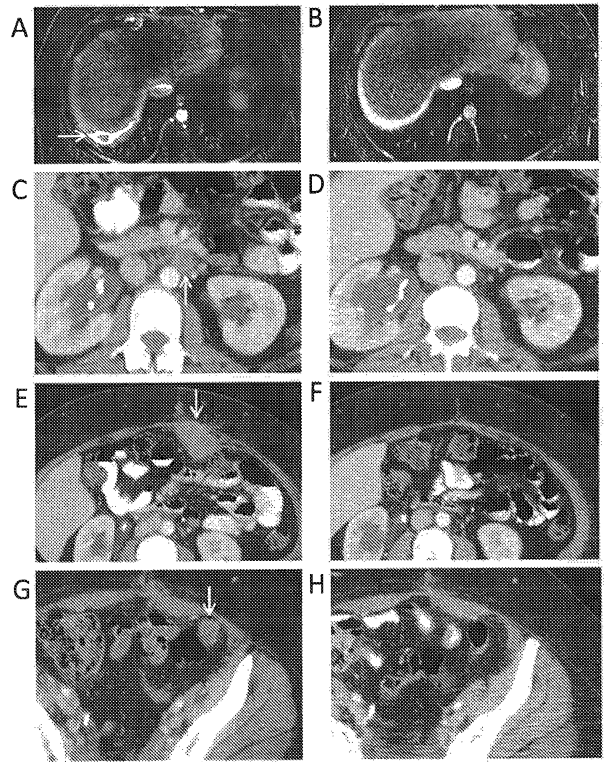




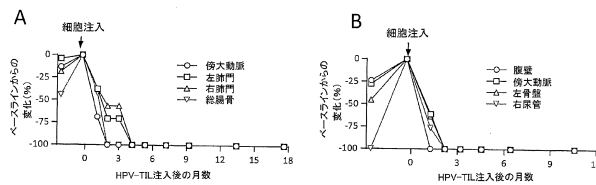
【図 13】



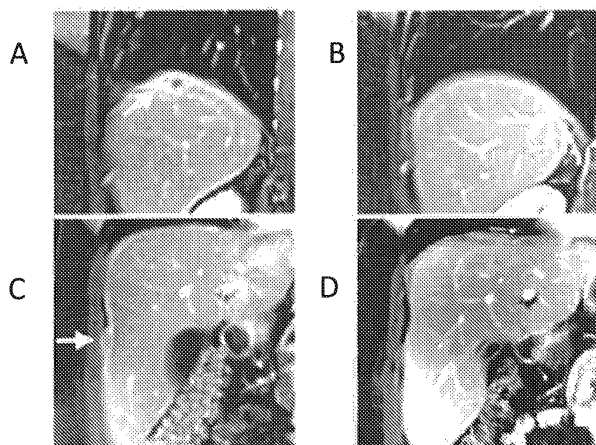
【図 14】



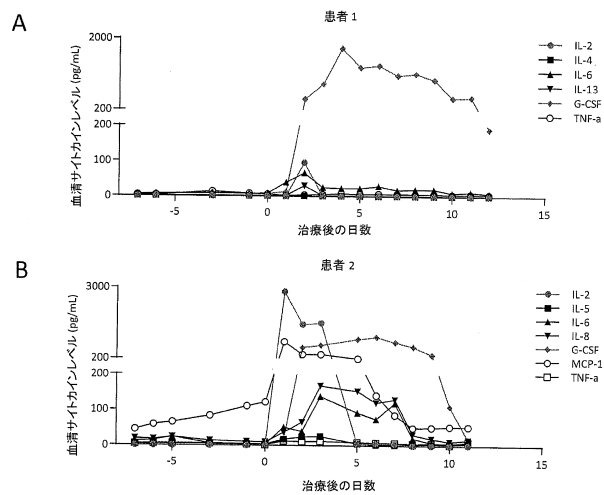
【図 15】



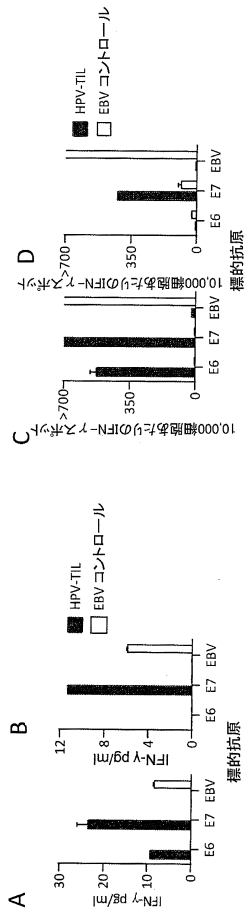
【図 16】



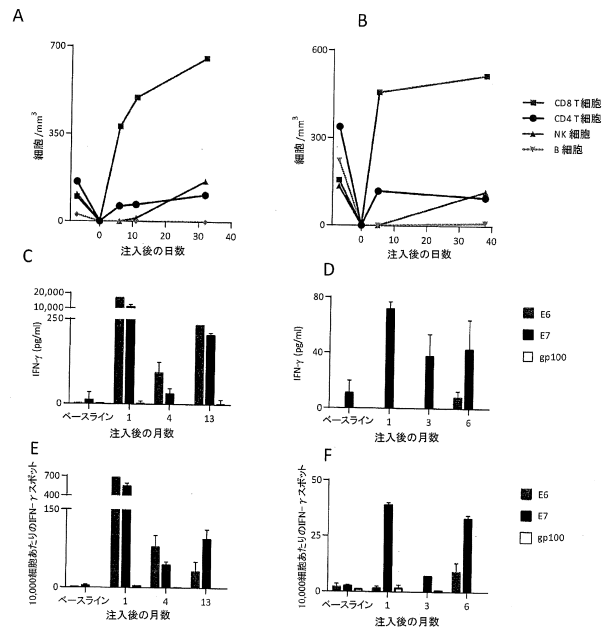
【図 17】



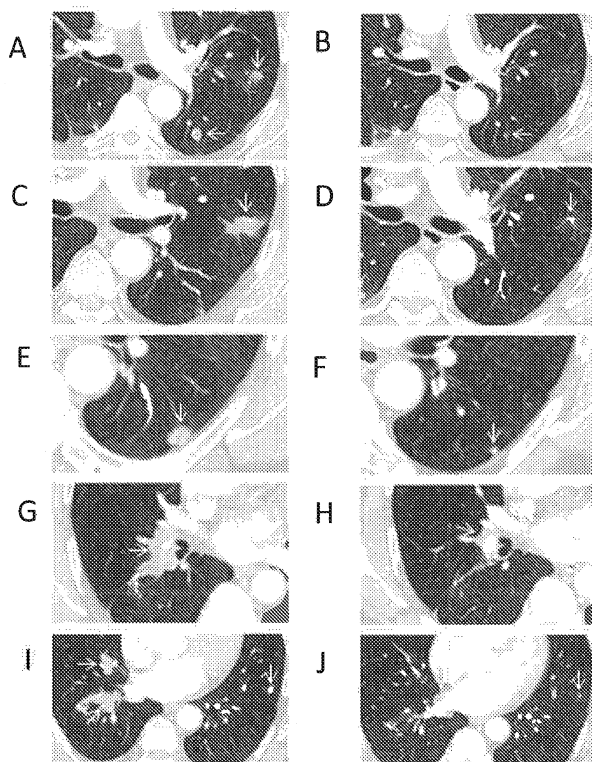
【図 18】



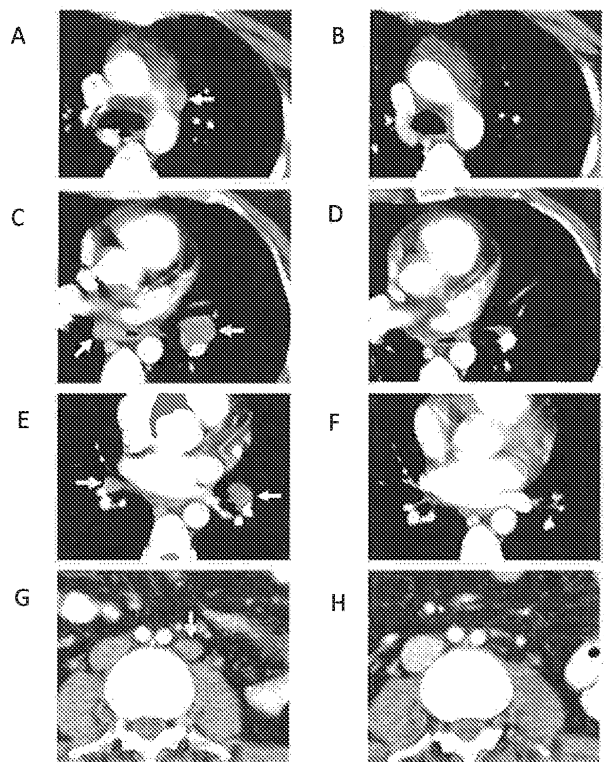
【図 19】



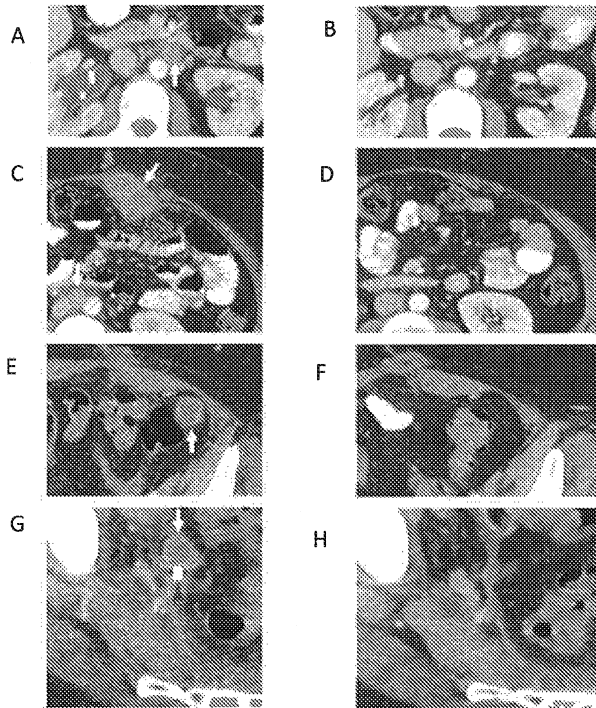
【図 20】



【図 21】



【図 22】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100117743

弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 ヒンリクス、クリスチャン エス.

アメリカ合衆国、メリーランド州 20817、ベセスダ、メルバーン ドライヴ 5814

(72)発明者 ローゼンバーグ、スティーヴン エイ.

アメリカ合衆国、メリーランド州 20854、ポトマック、アイアン ゲート ロード 10104

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0052530(US, A1)

Cancer Research, 1997年, Vol. 57, pp.2943-2950

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)