

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6416131号
(P6416131)

(45) 発行日 平成30年10月31日(2018.10.31)

(24) 登録日 平成30年10月12日(2018.10.12)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/0783 (2010.01)
C 12 N 15/113 (2010.01)
C 12 N 15/24 (2006.01)
A 61 K 35/17 (2015.01)
A 61 P 35/00 (2006.01)

C 12 N 5/0783
C 12 N 15/113 Z
C 12 N 15/113 14 O Z
C 12 N 15/24
A 61 K 35/17

A 61 K 35/17 Z

請求項の数 30 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-560159 (P2015-560159)
(86) (22) 出願日 平成25年4月30日 (2013.4.30)
(65) 公表番号 特表2016-509839 (P2016-509839A)
(43) 公表日 平成28年4月4日 (2016.4.4)
(86) 國際出願番号 PCT/US2013/038799
(87) 國際公開番号 WO2014/133567
(87) 國際公開日 平成26年9月4日 (2014.9.4)
審査請求日 平成28年4月27日 (2016.4.27)
(31) 優先権主張番号 61/771,247
(32) 優先日 平成25年3月1日 (2013.3.1)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 510002280
アメリカ合衆国
アメリカ合衆国 メリーランド州 208
92-7660 ペトヘスダ エムエスシ
-7660 スイテ325 エクエクトイ
ブ ボウレバルド 6011 ナショナル
インスティテュート オブ ヘルス オ
フィス オブ テクノロジー トランسف
ラー
(74) 代理人 100080791
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 光宣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】濃縮された腫瘍反応性T細胞集団を腫瘍から作製する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を得る方法であって、前記方法は、
(a) 腫瘍サンプルからT細胞の混合集団を得ること；
(b) 前記混合集団から(i) 4-1BB⁺/PD-1⁺、(ii) 4-1BB⁺/LAG-3⁺、又は(iii) 4-1BB⁺/TIM-3⁺であるCD8⁺T細胞を特異的に選択すること；及び
(c) (b)において選択された前記細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を得ること、
を含む、方法。

10

【請求項2】

腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を含む医薬組成物を得る方法であって、前記方法は、

(a) 腫瘍サンプルからT細胞の混合集団を得ること；
(b) 前記混合集団から(i) 4-1BB⁺/PD-1⁺、(ii) 4-1BB⁺/LAG-3⁺、又は(iii) 4-1BB⁺/TIM-3⁺であるCD8⁺T細胞を特異的に選択すること；
(c) (b)において選択された前記細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を得ること；及び

(d) 腫瘍反応性T細胞について濃縮された前記細胞集団を医薬上許容される担体と組

20

み合わせて、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を含む医薬組成物を得ること
、
を含む、方法。

【請求項3】

(b)が、前記混合集団からTIM-3、LAG-3及びPD-1の2以上を発現する
CD8⁺T細胞を特異的に選択することを更に含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

(b)が、前記混合集団からLAG-3⁺/PD-1⁺またはTIM-3⁺/PD-1⁺で
あるCD8⁺T細胞を特異的に選択することを更に含む、請求項1または2に記載の方法
。

10

【請求項5】

(b)が、前記混合集団から(i)LAG-3⁺/PD-1⁺、(ii)LAG-3⁻/PD
-1⁺、及び/または(iii)LAG-3⁺/PD-1⁻であるCD8⁺T細胞を特異的に選
択することを更に含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項6】

(b)が、前記混合集団から(i)TIM-3⁺/PD-1⁺、(ii)TIM-3⁻/PD
-1⁺、または(iii)TIM-3⁺/PD-1⁻であるCD8⁺T細胞を特異的に選択する
ことを更に含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項7】

(b)が、前記混合集団から(i)TIM-3⁺/LAG-3⁺、(ii)TIM-3⁻/L
AG-3⁺、または(iii)TIM-3⁺/LAG-3⁻であるCD8⁺T細胞を特異的に選
択することを更に含む、請求項1または2に記載の方法。

20

【請求項8】

腫瘍反応性T細胞について濃縮された前記細胞集団が、自己腫瘍認識についてスクリー
ニングすることなく得られる、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

T細胞の前記混合集団が、(b)より前に非特異的に刺激されない、請求項1～8のい
ずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

(c)において得られた前記濃縮された細胞集団においてT細胞の数を増加させること
を更に含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項11】

TWS119、インターロイキン(IL-21)、IL-12、IL-15、IL-7、
形質転換成長因子(TGF) β 、及びAKTインヒビター(AKTi)のいずれか1以上の
存在下で、(c)において得られた前記濃縮された細胞集団を培養することを更に含む、
請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

(c)において得られた前記濃縮された細胞集団を、癌抗原及び/または自己腫瘍細胞
を用いて刺激することを更に含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

(c)において得られた前記濃縮された集団の細胞にIL-12、IL-7、IL-1
5、IL-2、IL-21、mir155、及び抗PD-1 siRNAのいずれか1以上
をコードするスクレオチド配列を形質導入またはトランسفエクトすることを更に含む、
請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項14】

請求項1～13のいずれか1項に記載の方法によって得られた腫瘍反応性T細胞につい
て濃縮された細胞集団であって、単離され、または精製された細胞集団。

【請求項15】

- (a) CD8⁺/LAG-3⁺/PD-1⁺T細胞、
- (b) CD8⁺/LAG-3⁻/PD-1⁺T細胞、

50

- (c) CD8⁺ / LAG - 3⁺ / PD - 1⁻ T 細胞、
- (d) CD8⁺ / TIM - 3⁺ / PD - 1⁺ T 細胞、
- (e) CD8⁺ / TIM - 3⁻ / PD - 1⁺ T 細胞、
- (f) CD8⁺ / TIM - 3⁺ / PD - 1⁻ T 細胞、
- (g) CD8⁺ / TIM - 3⁺ / LAG - 3⁺ T 細胞、
- (h) CD8⁺ / TIM - 3⁻ / LAG - 3⁺ T 細胞、及び
- (i) CD8⁺ / TIM - 3⁺ / LAG - 3⁻ T 細胞、

のいずれか 1 以上を含む、請求項 1_4 に記載の単離され、または精製された細胞集団であって、前記細胞集団が、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮される、細胞集団。

【請求項 1_6】

- (a) CD8⁺ / LAG - 3⁺ / PD - 1⁺ T 細胞、
- (b) CD8⁺ / LAG - 3⁻ / PD - 1⁺ T 細胞、
- (c) CD8⁺ / LAG - 3⁺ / PD - 1⁻ T 細胞、
- (d) CD8⁺ / TIM - 3⁺ / PD - 1⁺ T 細胞、
- (e) CD8⁺ / TIM - 3⁻ / PD - 1⁺ T 細胞、
- (f) CD8⁺ / TIM - 3⁺ / PD - 1⁻ T 細胞、
- (g) CD8⁺ / TIM - 3⁺ / LAG - 3⁺ T 細胞、
- (h) CD8⁺ / TIM - 3⁻ / LAG - 3⁺ T 細胞、または
- (i) CD8⁺ / TIM - 3⁺ / LAG - 3⁻ T 細胞、

を含む、請求項 1_4 に記載の単離され、または精製された細胞集団。

【請求項 1_7】

- (a) CD8⁺ / LAG - 3⁺ / PD - 1⁺ T 細胞、または
- (b) CD8⁺ / TIM - 3⁺ / PD - 1⁺ T 細胞、

を含む、請求項 1_4 に記載の単離され、または精製された細胞集団。

【請求項 1_8】

腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を哺乳動物に投与するための組成物であつて、

- (a) 腫瘍サンプルから T 細胞の混合集団を得ること；
- (b) 前記混合集団から (i) 4 - 1 BB⁺ / PD - 1⁺、(ii) 4 - 1 BB⁺ / LAG - 3⁺、又は (iii) 4 - 1 BB⁺ / TIM - 3⁺ である CD8⁺ T 細胞を特異的に選択すること；及び
- (c) (b) において選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を得ること、

を含む方法によって得られる腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を含む、組成物。

【請求項 1_9】

(b) が、前記混合集団から TIM - 3、LAG - 3 及び PD - 1 の 2 以上を発現する CD8⁺ T 細胞を特異的に選択することを更に含む、請求項 1_8 に記載の組成物。

【請求項 2_0】

(b) が、前記混合集団から LAG - 3⁺ / PD - 1⁺ または TIM - 3⁺ / PD - 1⁺ である CD8⁺ T 細胞を特異的に選択することを更に含む、請求項 1_8 に記載の組成物。

【請求項 2_1】

(b) が、前記混合集団から (i) LAG - 3⁺ / PD - 1⁺、(ii) LAG - 3⁻ / PD - 1⁺、及び / または (iii) LAG - 3⁺ / PD - 1⁻ である CD8⁺ T 細胞を特異的に選択することを更に含む、請求項 1_8 に記載の組成物。

【請求項 2_2】

(b) が、前記混合集団から (i) TIM - 3⁺ / PD - 1⁺、(ii) TIM - 3⁻ / PD - 1⁺、または (iii) TIM - 3⁺ / PD - 1⁻ である CD8⁺ T 細胞を特異的に選択することを更に含む、請求項 1_8 に記載の組成物。

【請求項 2_3】

10

20

30

40

50

(b) が、前記混合集団から (i) T I M - 3⁺ / L A G - 3⁺、(ii) T I M - 3⁻ / L A G - 3⁺、または (iii) T I M - 3⁺ / L A G - 3⁻ である C D 8⁺ T 細胞を特異的に選択することを更に含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 24】

腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された前記細胞集団が、自己腫瘍認識についてスクリーニングをすることなく得られる、請求項 18 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 25】

T 細胞の前記混合集団が、(b) より前に非特異的に刺激されない、請求項 18 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 26】

(c) において得られた前記濃縮された細胞集団において T 細胞の数を増加させることを更に含む、請求項 18 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 27】

T W S 1 1 9、インターロイキン (I L - 2 1)、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 7、形質転換成長因子 (TGF) ベータ、及び A K T インヒビター (AKTi) のいずれか 1 以上の存在下で、(c) において得られた前記濃縮された細胞集団を培養することを更に含む、請求項 18 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 28】

腫瘍抗原及び / または自己腫瘍 T 細胞を用いて、(c) において得られた前記濃縮された細胞集団を刺激することを更に含む、請求項 18 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 29】

I L - 1 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2、I L - 2 1、m i r 1 5 5、及び抗 P D - 1 s i R N A のいずれか 1 以上をコードするヌクレオチド配列を用いて、(c) において得られた前記濃縮された集団の前記細胞を形質導入またはトランسفェクトすることを更に含む、請求項 18 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 30】

癌の治療または予防のための組成物であって、請求項 1 及び 3 ~ 13 のいずれか 1 項に記載された方法によって得られた腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された前記細胞集団、請求項 2 ~ 13 のいずれか 1 項に記載された方法によって得られた前記医薬組成物、または請求項 18 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の前記組成物を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2013年3月1日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 7 7 1 , 2 4 7 号の利益を主張し、それは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明の背景

腫瘍反応性 T 細胞を用いる養子細胞療法 (Adoptive cell therapy, ACT) は、ある種の癌患者において明確な臨床反応を引き起こし得る。それにもかかわらず、癌及び他の病気の治療のための A C T の成功的な利用には、いくつかの障害が残っている。例えば、腫瘍から単離された T 細胞は、十分な腫瘍特異的反応性を示し得ない。従って、腫瘍から腫瘍反応性 T 細胞の集団を得る方法を改善する必要がある。

【発明の概要】

【0003】

本発明の概要

本発明の実施態様は、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮 (enriched) された細胞集団を得る方法を提供し、該方法は：(a) 腫瘍サンプルから T 細胞の混合集団 (bulk population) を得ること；(b) 混合集団から T I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B 及び P D - 1 の

10

20

30

40

50

いずれか 1 以上を発現する C D 8⁺ T 細胞を特異的に選択すること；及び (c) (b) において選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を得ること、を含む。

【 0 0 0 4 】

本発明の別の実施態様は、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を、哺乳動物へ投与する方法を提供し、該方法は：(a) 腫瘍サンプルから T 細胞の混合集団を得ること；(b) T I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B、及び P D - 1 のいずれか 1 以上を発現する C D 8⁺ T 細胞を、混合集団から特異的に選択すること；(c) (b) において選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を得ること；及び (d) 腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を哺乳動物へ投与すること、を含む。10

【 0 0 0 5 】

本発明のもう 1 つの実施態様は、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を含む医薬組成物を得る方法を提供し、該方法は：(a) 腫瘍サンプルから T 細胞の混合集団を得ること；(b) 混合集団から T I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B、及び P D - 1 のいずれか 1 以上を発現する C D 8⁺ T 細胞を特異的に選択すること；(c) (b) において選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を得ること；及び (d) 腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を医薬上許容される担体と組み合わせて、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を含む医薬組成物を得ることを含む。20

【 0 0 0 6 】

本発明の別の実施態様は、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団であって (a) 腫瘍サンプルから T 細胞の混合集団を得ること；(b) 混合集団から T I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B、及び P D - 1 のいずれか 1 以上を発現する C D 8⁺ T 細胞を特異的に選択すること；及び (c) (b) において選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を得ること、を含む方法によって得られ、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団の哺乳動物への投与に使用するための、細胞集団を提供する。

【 0 0 0 7 】

本発明の追加的な実施態様は、関連する細胞集団、及び癌を治療または予防する方法を提供する。30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 8 】

図面の見方の簡単な説明

【 0 0 0 9 】

【 図 1 A 】 図 1 A は、P D - 1、T I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B、O X 4 0、C D 2 5、C D 2 8、C D 2 7、または C D 7 0 を発現する、新鮮なメラノーマ腫瘍サンプルから単離された C D 3⁺ / C D 8⁺ 細胞の百分率を示すグラフである。各ドットは、1 の腫瘍を示す。

【 図 1 B 】 図 1 B は、新鮮なメラノーマ腫瘍サンプル (F r T u 1 9 1 3) から単離され、C D 8、P D - 1、L A G - 3、T I M - 3 もしくは 4 - 1 B B の発現、または P D - 1、L A G - 3、T I M - 3 もしくは 4 - 1 B B の発現欠損によってソートされ、14 日間のインビトロ増加 (in vitro expansion) (R E P) 後の、C D 8⁺ 細胞数の倍増加 (fold-expansion) を示すグラフである。40

【 図 2 】 図 2 A ~ 2 E は、5 つの異なるメラノーマ腫瘍サンプル (F r T u 1 9 1 3 (A)、F r T u 3 5 5 0 (B)、F r T u 3 2 8 9 (C)、F r T u 2 4 4 8 (D)、または F r T u 3 7 1 3 (E)) の 1 つから単離された C D 8⁺ 細胞による、インターフェロン (I F N) - ガンマ分泌 (p g / m l) (黒棒)、または C D 3、C D 8、及び 4 - 1 B B を発現するエフェクター T 細胞 (T_{eff}) の百分率 (灰色棒) を示す。細胞を、C D 8、P D - 1、L A G - 3、T I M - 3、もしくは 4 - 1 B B 発現、または P D 50

- 1、 L A G - 3、 T I M - 3、 もしくは 4 - 1 B B 発現の欠損によってソートし、 14 日間、 インビトロで増加させた。 インターフェロン (I F N) - ガンマ分泌及び 4 - 1 B B 発現を、 自己腫瘍細胞株との共培養時に分析した。

【図 3】図 3 A ~ 3 C は、 メラノーマ腫瘍サンプル F r T u 1913 から単離され、 C D 8 発現 (白円)、 P D - 1 発現 (黒円)、 T I M - 3 発現 (黒ひし形)、 L A G - 3 発現 (黒三角) または 4 - 1 B B 発現 (黒四角)、 あるいは P D - 1 発現の欠損 (灰色円)、 T I M - 3 発現の欠損 (灰色ひし形)、 L A G - 3 発現の欠損 (灰色三角)、 または 4 - 1 B B 発現の欠損 (灰色四角) でソートされたエフェクター C D 8⁺ T 細胞による標的腫瘍細胞株 T C 1913 (自己) (A)、 T C 3289 (同種異系) (B)、 または T C 2448 (H L A - A 0 2 0 1 適合) (C) の、 示されたエフェクター : ターゲット比での特異的溶解の百分率を示す。 図 3 D ~ 3 F は、 メラノーマ腫瘍サンプル F r T u 3713 (D - F) から単離され、 C D 8 発現 (白円)、 P D - 1 発現 (黒円)、 T I M - 3 発現 (黒ひし形)、 または 4 - 1 B B 発現 (黒四角)、 あるいは P D - 1 発現の欠損 (灰色円)、 T I M - 3 発現の欠損 (灰色ひし形)、 または 4 - 1 B B 発現の欠損 (灰色四角) によってソートされたエフェクター C D 8⁺ T 細胞による標的腫瘍細胞株 T C 3713 (自己) (D)、 T C 3550 (同種異系) (E) または T C 1379 (同種異系) (F) の示されたエフェクター : ターゲット比での特異的溶解の百分率を示す。
10

【図 4 A】図 4 A は、 メラノーマ腫瘍 (F r T u 3713) から単離され、 C D 8⁺、 P D - 1⁺、 P D - 1⁻、 4 - 1 B B⁺、 4 - 1 B B⁻、 4 - 1 B B^{+/PD-1-}、 4 - 1 B B^{+/PD-1+}、 4 - 1 B B^{-/PD-1+}、 または 4 - 1 B B^{-/PD-1-} によってソートされ、 インビトロで 14 日間増加させた細胞の自己腫瘍認識を示す。 自己腫瘍細胞株との共培養時に 4 - 1 B B を発現する C D 3⁺ C D 8⁺ 細胞の百分率を示す。
20

【図 4 B】図 4 B は、 メラノーマ腫瘍 (F r T u 3612) から単離された後に、 4 - 1 B B (灰色棒) を発現し、 または I F N - ガンマ (黒棒) を分泌する C D 3⁺ C D 8⁺ 細胞の百分率を示すグラフである。 細胞は、 C D 8⁺、 P D - 1⁺、 P D - 1⁻、 4 - 1 B B^{+/PD-1-}、 4 - 1 B B^{+/PD-1+}、 4 - 1 B B^{-/PD-1+}、 または 4 - 1 B B^{-/PD-1-} 集団についてソートされ、 インビトロで 14 日間増加させ、 自己腫瘍細胞株との共培養時の I F N - ガンマ分泌及び 4 - 1 B B 上方制御が示される。

【図 5】図 5 A ~ 5 C は、 ⁵ Cr 放出分析 (release assay) によって測定されるように、 メラノーマ腫瘍 (F r T u 3713) から単離され、 4 - 1 B B^{+/PD-1-} (円)、 4 - 1 B B^{+/PD-1+} (四角)、 4 - 1 B B^{-/PD-1+} (ひし形)、 または 4 - 1 B B^{-/PD-1-} (U) 集団についてソートされたエフェクター C D 8⁺ 細胞による標的腫瘍細胞株 T C 3713 (自己) (A)、 T C 3550 (同種異系) (B) 及び T C 1379 (同種異系) (C) の、 示された標的に対するエフェクターの比率での特異的溶解の百分率を示す。
30

【図 6】図 6 は、 胃腸腫瘍 (F r T u 3446 b) から単離され、 C D 8⁺、 P D - 1⁺、 P D - 1⁻、 T I M - 3⁺、 T I M - 3⁻、 4 - 1 B B⁺、 または 4 - 1 B B⁻ 集団についてソートされ、 培地において 21 日間増加させた、 4 - 1 B B (灰色棒) を発現し、 または I F N - ガンマ (黒棒) を分泌する C D 8⁺ 細胞の百分率を示すグラフである。 自己腫瘍細胞株との共培養時の I F N - ガンマ及び 4 - 1 B B 上方制御を示す。
40

【図 7】図 7 A 及び 7 B は、 ソートされた P D - 1⁻ 細胞 (2985 T C R クロノタイプ) (A) またはソートされた P D - 1⁺ 細胞 (805 T C R クロノタイプ) (B) の 14 日間のインビトロ増加後の固有 T C R ベータ鎖 C D R 3 領域アミノ酸配列の頻度 (%) を示すグラフである。 図 7 C は、 ソートされた P D - 1⁻ 細胞 (黒円) またはソートされた P D - 1⁺ 細胞 (灰色円) の固有 T C R ベータ鎖 C D R 3 領域アミノ酸配列の頻度 (%) を示すグラフである。

【図 8】図 8 は、 自己腫瘍細胞株によって特異的に発現される変異エピトープ p 14 A R F / p 16 I N K 4 a (黒円) または H L A - A 1 1 m u t (灰色円) を認識する、 P D - 1⁻ 集団または P D - 1⁺ 集団における T C R 鎖クロノタイプ、 並びに未知の反応性を有するクロノタイプ (白円) の頻度 (%) を示すグラフである。
50

【発明を実施するための形態】**【0010】****本発明の詳細な説明**

T I M - 3 (T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有分子-3 (T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3))、L A G - 3 (リンパ球活性化遺伝子3; C D 2 2 3)、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、及びP D - 1 (C D 2 7 9)バイオマーカのいずれか1以上も発現するC D 8⁺細胞を選択することにより、新鮮な腫瘍サンプルから単離された腫瘍反応性T細胞が濃縮されることが判明した。P D - 1、4 - 1 B B、T I M - 3、及びL A G - 3のいずれか1以上も発現するC D 8⁺細胞を選択することにより、これらのマーカを発現しないC D 8⁺細胞と比べて、より多数の腫瘍反応性T細胞が有利に濃縮される。

【0011】

この点において、本発明の実施態様は、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を得る方法を提供し、該方法は：(a)腫瘍サンプルからT細胞の混合集団を得ること；(b)混合集団からT I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B、及びP D - 1のいずれか1以上を発現するC D 8⁺T細胞を特異的に選択すること；及び(c)(b)において選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を得ること、を含む。本発明の方法は、有利には、患者へ細胞を投与する前に、細胞のインビトロでの培養時間を短くすることを可能にする。更に、本発明の方法は、有利には、自己腫瘍認識についてスクリーニングする必要なく患者へ投与されてよい、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を提供し得る。

【0012】

本方法は、当分野で知られた任意の適切な方法によって腫瘍サンプルからT細胞の混合集団を得ることを含み得る。例えば、腫瘍サンプルを解離して、特異的な細胞集団が選択され得る細胞懸濁液とすることによって、T細胞の混合集団を腫瘍サンプルから得ることができる。T細胞の混合集団を得るのに適切な方法としては、機械的に腫瘍を解離すること（例えば、細かに切ること）、酵素的に腫瘍を解離すること（例えば、消化すること）、及び吸引すること（例えば、針を用いるのと同様）のいずれか1以上が挙げられるが、これに限定されない。

【0013】

腫瘍サンプルから得られたT細胞の混合集団は、T細胞の任意の適切なタイプを含み得る。好ましくは、腫瘍サンプルから得られたT細胞の混合集団は、腫瘍浸潤リンパ球(TI Ls)を含む。

【0014】

腫瘍サンプルは、任意の哺乳動物から入手され得る。特に指定のない限り、本明細書で使用する場合、「哺乳動物」という用語は、ウサギ等のウサギ目；ネコ科動物（ネコ）及びイヌ科動物（イヌ）を含む食肉目；ウシ亜科動物（ウシ）及びイノシシ科動物（豚）を含む偶蹄目；またはウマ科動物（ウマ）を含む奇蹄目の哺乳動物を含むが、これらに限定されない任意の哺乳動物のことをいう。哺乳動物は、例えば、サル目、セボイド(Ceboids)目、またはシモイド(Simoids)目(サル)あるいはアンスロポイド目(ヒト及び類人猿)の非ヒト霊長類であることが好ましい。いくつかの実施態様では、哺乳動物は、マウス及びハムスター等のネズミ目の哺乳動物であり得る。好ましくは、哺乳動物は、非ヒト霊長類またはヒトである。特に好ましい哺乳動物は、ヒトである。

【0015】

本方法は、混合集団からT I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B、及びP D - 1のいずれか1以上を発現するC D 8⁺T細胞を特異的に選択することを含み得る。好ましい実施態様では、本方法は、C D 3も発現する細胞を選択することを含む。本方法は、任意の適切な方法において細胞を特異的に選択することを含み得る。好ましくは、当該選択は、フローサイトメトリーを用いて実施される。フローサイトメトリーは、当分野で知られた任意の適切な方法を用いて実施され得る。フローサイトメトリーは、任意の適切な抗体及び染

色剤を使用し得る。例えば、CD3、CD8、TIM-3、LAG-3、4-1BB、またはPD-1の特異的な選択は、それぞれ抗CD3、抗CD8、抗TIM-3、抗LAG-3、抗4-1BB、または抗PD-1抗体を用いてなされ得る。好ましくは、抗体は、選択されている特定のバイオマーカを特異的に認識し、結合するように選択される。抗体または複数の抗体は、ビーズ（例えば、磁気ビーズ）または蛍光色素に結合し得る。好ましくは、フローサイトメトリーは、蛍光活性化セルソーティング（FACS）である。

【0016】

本発明の実施態様では、特異的に選択することは、TIM-3、LAG-3、4-1BB、もしくはPD-1のいずれか1つ、TIM-3、LAG-3、4-1BB及びPD-1の2つもしくは3つの任意の組み合わせ、またはTIM-3、LAG-3、4-1BB、及びPD-1の4つ全ての発現に対して陽性であるCD8⁺T細胞を特異的に選択することを含み得る。この点において、特異的に選択することは、TIM-3、LAG-3、4-1BB、及びPD-1のいずれか1つの発現に関し、シングルポジティブであるT細胞を特異的に選択すること、またはTIM-3、LAG-3、4-1BB、及びPD-1のいずれか2つ、3つまたは4つの同時共発現に対し、二重、三重、または四重陽性であるT細胞を特異的に選択することを含み得る。本発明の実施態様において、本方法は、混合集団からTIM-3を発現するCD8⁺T細胞を特異的に選択することを含む。別の実施態様では、本方法は、混合集団からLAG-3を発現するCD8⁺T細胞を特異的に選択することを含む。もう1つの実施態様では、本方法は、混合集団から4-1BBを発現するCD8⁺T細胞を特異的に選択することを含む。本発明のもう1つの実施態様では、本方法は、混合集団からPD-1を発現するCD8⁺T細胞を特異的に選択することを含む。本発明の追加的な実施態様は、(i) 4-1BB⁺/PD-1⁺、(ii) 4-1BB⁻/PD-1⁺、及び/または(iii) 4-1BB⁺/PD-1⁻であるCD8⁺T細胞を混合集団から特異的に選択することを含む方法を提供する。本発明の別の実施態様は、(i) LAG-3⁺/PD-1⁺、(ii) LAG-3⁻/PD-1⁺、及び/または(iii) LAG-3⁺/PD-1⁻であるCD8⁺T細胞を混合集団から特異的に選択することを含む方法を提供する。本発明のもう1つの実施態様は、(i) TIM-3⁺/PD-1⁺、(ii) TIM-3⁻/PD-1⁺、または(iii) TIM-3⁺/PD-1⁻であるCD8⁺T細胞を混合集団から特異的に選択することを含む方法を提供する。本発明のもう1つの実施態様は、(i) TIM-3⁺/LAG-3⁺、(ii) TIM-3⁻/LAG-3⁺、または(iii) TIM-3⁺/LAG-3⁻であるCD8⁺T細胞を混合集団から特異的に選択することを含む方法を提供する。本発明の別の実施態様は、(i) 4-1BB⁺/LAG-3⁺、(ii) 4-1BB⁻/LAG-3⁺、または(iii) 4-1BB⁺/LAG-3⁻であるCD8⁺T細胞を混合集団から特異的に選択することを含む方法を提供する。本発明のもう一つの実施態様は、(i) 4-1BB⁺/TIM-3⁺、(ii) 4-1BB⁻/TIM-3⁺、または(iii) 4-1BB⁺/TIM-3⁻であるCD8⁺T細胞を混合集団から特異的に選択することを含む方法を提供する。本発明の別の実施態様では、本明細書中に記載された方法のいずれかは、CD3⁺も発現する細胞を選択することを更に含んでよい。

【0017】

本発明の実施態様では、特異的に選択することは、本明細書中に記載されたマーカのいずれかを発現するCD8⁺細胞の組み合わせを特異的に選択することを含み得る。この点について、本方法は、腫瘍反応性細胞について濃縮された細胞集団であって、本明細書中に記載されたバイオマーカのいずれか2つ、3つ、4つまたはそれ以上を発現する細胞の混合物を含むものを作製し得る。本発明の実施態様では、特異的に選択することは、細胞の以下の組み合わせのいずれかを特異的に選択することを含む：(a) PD-1⁺細胞及び4-1BB⁺細胞、(b) PD-1⁺細胞及びLAG-3⁺細胞、(c) PD-1⁺細胞及びTIM-3⁺細胞、(d) 4-1BB⁺細胞及びLAG-3⁺細胞、(e) 4-1BB⁺細胞及びTIM-3⁺細胞、(f) LAG-3⁺細胞及びTIM-3⁺細胞、(g) PD-1⁺細胞、4-1BB⁺細胞、及びLAG-3⁺細胞、(h) PD-1⁺細胞、4-1BB⁺細胞、及びTIM-3⁺細胞、(i) PD-1⁺細胞、LAG-3⁺細胞、及びTIM-3⁺細胞、(j) 4

- 1 B B⁺細胞、 L A G - 3⁺細胞、 及び T I M - 3⁺細胞、 並びに / あるいは (k) P D - 1⁺細胞、 4 - 1 B B⁺細胞、 L A G - 3⁺細胞、 及び T I M - 3⁺細胞。本発明の別の実施態様では、本明細書中に記載された方法のいずれかは、 C D 8⁺及び / または C D 3⁺も発現する細胞を選択することを更に含み得る。

【 0 0 1 8 】

本方法は、選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を得ることを含み得る。この点において、選択された細胞は、選択されていない細胞から物理的に分離され得る。選択された細胞は、例えば、ソーティング等の任意の適切な方法によって、選択されていない細胞から分離され得る。選択されていない細胞から選択された細胞を分離することにより、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団が好ましくは作製される。10

【 0 0 1 9 】

本発明の方法によって得られた細胞集団は、腫瘍反応性 T 細胞について有利に濃縮される。この点において、T I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B、及びP D - 1 のいずれか 1 以上の発現によってソートすることにより得られなかった細胞集団に比べて、本発明の方法によって得られた細胞集団は、より高い割合の腫瘍反応性 T 細胞を含み得る。

【 0 0 2 0 】

本発明の実施態様では、本方法は、自己腫瘍認識についてスクリーニングすることなく、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を得ることを含む。この点において、本発明の方法は、自己腫瘍認識について細胞をスクリーニングする必要なく、腫瘍反応性を有する細胞について濃縮された細胞集団を有利に提供する。20

【 0 0 2 1 】

本発明の実施態様では、本方法は、細胞を特異的に選択するより前に、T 細胞の混合集団を非特異的に刺激することを含まない。この点において、本発明の方法は、T 細胞の混合集団を非特異的に刺激（例えば、抗 4 - 1 B B 抗体、抗 C D 3 抗体、抗 C D 2 8 抗体を用いて）することなく、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を有利に提供する。。

【 0 0 2 2 】

本発明の実施態様では、本方法は、本発明の方法によって得られた濃縮された細胞集団においてインビトロで T 細胞数を増大させることを更に含む。T 細胞の数は、少なくとも約 3 倍（または 4、5、6、7、8、もしくは 9 倍）、より好ましくは少なくとも約 10 倍（または 20、30、40、50、60、70、80、もしくは 90 倍）、より好ましくは少なくとも約 100 倍、より好ましくは少なくとも約 1,000 倍、または最も好ましくは少なくとも約 10,000 倍に増加され得る。T 細胞の数は、その分野において知られた任意の適切な方法を用いて増加され得る。細胞数を増大させる典型的な方法は、米国特許第 8,034,334 号及び米国特許出願公開第 2012/0244133 号において記述され、そのそれぞれは、参照することによって本明細書中に組み込まれる。30

【 0 0 2 3 】

本発明の実施態様では、本方法は、T W S 1 1 9、インターロイキン (I L) - 2 1、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 7、形質転換成長因子 (TGF) ベータ、及び A K T インヒビター (AKTi) のいずれか 1 以上の存在下、本発明の方法によって得られた濃縮された細胞集団を培養することを更に含む。特定の理論に拘束されることなく、T W S 1 1 9、I L - 2 1、及び / または I L - 1 2 の存在下において、濃縮された細胞集団を培養することにより、濃縮された細胞集団の分化を抑制または遅らせることによって、濃縮された細胞集団の抗腫瘍反応性が有利に促進され得ると考えられている。40

【 0 0 2 4 】

本発明の実施態様では、本方法は、I L - 1 2、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2、I L - 2 1、m i r 1 5 5、及び抗 P D - 1 s i R N A のいずれか 1 以上をコードするヌクレオチド配列を用いて、本明細書中に記述された本発明の方法のいずれかによって得られた濃縮された集団の細胞を形質導入すること、またはトランスフェクトすることを更に50

含む。

【0025】

本発明の実施態様では、本方法は、本発明の方法によって得られた濃縮された細胞集団を、癌抗原及び／または自己腫瘍細胞で刺激することを更に含む。癌抗原及び／または自己腫瘍細胞で濃縮された細胞集団を刺激することは、任意の適切な方法によってなされ得る。例えば、濃縮された細胞集団を刺激することは、癌抗原及び／または自己腫瘍細胞を濃縮された細胞集団に物理的に接触させることによってなされ得る。特定の理論に拘束されることなく、癌抗原及び／または自己腫瘍細胞で濃縮された細胞集団を刺激することにより、濃縮された細胞集団の抗腫瘍反応性が有利に促進されると考えられる。

【0026】

本明細書中において使用される「癌抗原」という用語は、抗原が腫瘍または癌に関連付けられるように、腫瘍細胞または癌細胞によってもっぱらまたは大部分が発現され、または過剰発現される任意の分子（例えば、タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物等）のことをいう。癌抗原は、正常、非腫瘍、または非癌性細胞によって追加的に発現され得る。しかしながら、このような場合には、正常、非腫瘍、または非癌性細胞による癌抗原の発現は、腫瘍または癌細胞による発現程に強く（robust）ない。この点において、腫瘍または癌細胞は、抗原を過剰発現し得、または正常、非腫瘍、もしくは非癌性細胞による抗原の発現に比べて、より有意に高いレベルにおいて抗原を発現し得る。また、癌抗原は、発生または成熟（maturation）の異なる状態の細胞によって追加的に発現され得る。例えば、癌抗原は、胚形成期または胎児期の細胞によって追加的に発現され得、該細胞は、成体宿主（adult host）において通常みられない。あるいは、癌抗原は、幹細胞または前駆細胞によって追加的に発現され得、該細胞は、成体宿主には通常みられない。

【0027】

癌抗原は、本明細書中に記述された癌及び腫瘍を含む、任意の癌または腫瘍のいずれかの細胞によって発現される抗原であり得る。癌抗原は、1種類のみの癌または腫瘍に関連づけられ、またはこれらに特徴的であるように、1種類のみの癌または腫瘍の癌抗原であり得る。代わりに、癌抗原は、2種類以上の癌または腫瘍の癌抗原（例えば、特徴的であり得る）であり得る。例えば、癌抗原は、乳癌及び前立腺癌細胞の両方によって発現され、正常、非腫瘍、または非癌性細胞によって全く発現されなくてもよい。典型的な癌抗原としては、gp100、MART-1、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、NY-ESO-1、血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR-2）、HER-2、メソテリン（mesothelin）、及び上皮細胞増殖因子受容体変異体III（epidermal growth factor receptor variant III, EGFR III）のいずれか1以上が挙げられ得る。

【0028】

本発明の方法は、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を有利に作製する。T細胞は、腫瘍細胞を特異的に認識し、溶解し、及び／または殺すように腫瘍反応性であり得る。この点において、本発明の実施態様は、本明細書中に記述された本発明の方法のいずれかによって得られた腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団であって、単離され、または精製された細胞集団を提供する。実施態様では、単離され、または精製された細胞集団は、(a) CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁺T細胞、(b) CD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁺T細胞、(c) CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁻T細胞、(d) CD8⁺/LAG-3⁺/PD-1⁺T細胞、(e) CD8⁺/LAG-3⁻/PD-1⁺T細胞、(f) CD8⁺/LAG-3⁺/PD-1⁻T細胞、(g) CD8⁺/TIM-3⁺/PD-1⁺T細胞、(h) CD8⁺/TIM-3⁻/PD-1⁺T細胞、(i) CD8⁺/TIM-3⁺/PD-1⁻T細胞、(j) CD8⁺/TIM-3⁺/LAG-3⁺T細胞、(k) CD8⁺/TIM-3⁻/LAG-3⁺T細胞、(l) CD8⁺/TIM-3⁺/LAG-3⁻T細胞、(m) CD8⁺/4-1BB⁺/LAG-3⁺T細胞、(n) CD8⁺/4-1BB⁻/LAG-3⁺T細胞、(o) CD8⁺/4-1BB⁺/LAG-3⁻T細胞、(p) CD8⁺/4-1BB⁻

10

20

30

40

50

/ T I M - 3⁺ T 細胞、(q) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻ / T I M - 3⁺ T 細胞、及び(r) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / T I M - 3⁻ T 細胞のいずれか1以上を含み、細胞集団は、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮される。本発明の別の実施態様では、単離され、または精製された細胞集団が、(a) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / P D - 1⁺ T 細胞、(b) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻ / P D - 1⁺ T 細胞、(c) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / P D - 1⁻ T 細胞、(d) C D 8⁺ / L A G - 3⁺ / P D - 1⁺ T 細胞、(e) C D 8⁺ / L A G - 3⁻ / P D - 1⁺ T 細胞、(f) C D 8⁺ / L A G - 3⁺ / P D - 1⁻ T 細胞、(g) C D 8⁺ / T I M - 3⁺ / P D - 1⁺ T 細胞、(h) C D 8⁺ / T I M - 3⁻ / P D - 1⁺ T 細胞、(i) C D 8⁺ / T I M - 3⁺ / P D - 1⁻ T 細胞、(j) C D 8⁺ / T I M - 3⁺ / L A G - 3⁺ T 細胞、(k) C D 8⁺ / T I M - 3⁻ / L A G - 3⁺ T 細胞、(l) C D 8⁺ / T I M - 3⁺ / L A G - 3⁻ T 細胞、(m) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / L A G - 3⁺ T 細胞、(n) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻ / L A G - 3⁺ T 細胞、(o) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / L A G - 3⁻ T 細胞、(p) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻ / T I M - 3⁺ T 細胞、(q) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / T I M - 3⁻ T 細胞、または(r) C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / T I M - 3⁻ T 細胞を含む。本発明の別の実施態様では、本明細書中に記述された細胞集団のいずれかは、C D 3⁺でもあり得る。

【 0 0 2 9 】

本発明の実施態様では、単離され、または精製された細胞集団は、本明細書中に記述されたバイオマーカのいずれかを発現する細胞の混合物を含む。例えば、単離され、または精製された細胞集団は、(a) P D - 1⁺ 細胞及び 4 - 1 B B⁺ 細胞、(b) P D - 1⁺ 細胞及び L A G - 3⁺ 細胞、(c) P D - 1⁺ 細胞及び T I M - 3⁺ 細胞、(d) 4 - 1 B B⁺ 細胞及び L A G - 3⁺ 細胞、(e) 4 - 1 B B⁺ 細胞及び T I M - 3⁺ 細胞、(f) L A G - 3⁺ 細胞及び T I M - 3⁺ 細胞、(g) P D - 1⁺ 細胞、4 - 1 B B⁺ 細胞、及び L A G - 3⁺ 細胞、(h) P D - 1⁺ 細胞、4 - 1 B B⁺ 細胞、及び T I M - 3⁺ 細胞、(i) P D - 1⁺ 細胞、L A G - 3⁺ 細胞、及び T I M - 3⁺ 細胞、(j) 4 - 1 B B⁺ 細胞、L A G - 3⁺ 細胞、及び T I M - 3⁺ 細胞、並びに / または(k) P D - 1⁺ 細胞、4 - 1 B B⁺ 細胞、L A G - 3⁺ 細胞、及び T I M - 3⁺ 細胞の組み合わせを含み得る。本発明の別の実施態様では、本明細書中に記述された細胞集団のいずれかはまた、C D 8⁺ 及び / または C D 3⁺ であり得る。

【 0 0 3 0 】

本明細書中において使用される「単離され (isolated)」という用語は、その天然の環境から取り出されていることを意味する。本明細書中において使用される「精製され (purified)」という用語は、純度を増加させたことを意味し、「純度」は、相対的な用語であり、必ずしも絶対純度と解釈されない。例えば、純度は、少なくとも約 50% であり得、60%、70% もしくは 80% より大きく、90% より大きく、あるいは 100% であり得る。

【 0 0 3 1 】

本発明の別の実施態様は、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を哺乳動物へ投与する方法を提供し、該方法は：(a) 腫瘍サンプルから T 細胞の混合集団を得ること；(b) T I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B、及び P D - 1 のいずれか1以上を発現する C D 8⁺ T 細胞を混合集団から特異的に選択すること；(c) (b) において選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を得ること；及び(d) 腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を哺乳動物へ投与すること、を含む。腫瘍サンプルから T 細胞の混合集団を得ること、混合集団から T I M - 3、L A G - 3、4 - 1 B B、及び P D - 1 のいずれか1以上を発現する C D 8⁺ T 細胞を特異的に選択すること、並びに、選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、細胞集団を得ることは、本発明の他の態様について本明細書中に記述されたようになされ得る。

【 0 0 3 2 】

本方法は、腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団を哺乳動物へ投与することを更に含み得る。腫瘍反応性 T 細胞について濃縮された細胞集団は、任意の適切な方法にお

いて投与され得る。好ましくは、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団は、例えば、静脈に注射することによって投与される。

【0033】

腫瘍反応性T細胞について濃縮された本発明の細胞集団は、医薬組成物等の組成物中に含まれ得る。この点において、本発明は、本明細書中に記述された細胞集団のいずれか及び医薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0034】

本発明の別の実施態様は、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を含む医薬組成物を得る方法を提供し、該方法は：(a)腫瘍サンプルからT細胞の混合集団を得ること；(b)TIM-3、LAG-3、4-1BB、及びPD-1のいずれか1以上を発現するCD8⁺T細胞を混合集団から特異的に選択すること；(c)(b)において選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を得ること；及び(d)腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を医薬上許容される担体と組み合わせて、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を含む医薬組成物を得ること、を含む。腫瘍サンプルからT細胞の混合集団を得ること、TIM-3、LAG-3、4-1BB、及びPD-1のいずれか1以上を発現するCD8⁺T細胞を混合集団から特異的に選択すること、並びに、選択された細胞を、選択されていない細胞から分離して、細胞集団を得ることは、本発明の他の態様について本明細書中に記述されたようになされ得る。

【0035】

本方法は、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を医薬上許容される担体と組み合わせて、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を含む医薬組成物を得ることを含み得る。好ましくは、担体は、医薬上許容される担体である。医薬組成物に関し、担体は、細胞の投与のために従来使用されるもののいずれかであり得る。かかる医薬上許容される担体は、当業者に周知であり、公に容易に利用可能である。医薬上許容される担体は、使用条件下で有害な副作用または毒性を全く有さないものであることが好ましい。注射用の細胞のための適切な医薬上許容される担体としては、例えば、生理食塩水（水中における約0.90%w/vのNaCl、水中における約300mOsm/LのNaCl、または水1リットル当たり約9.0g NaCl）、NORMOSOL-R電解質溶液（Abbot、シカゴ、IL）、PLASMA-LYTE A（バクスター、ディアフィールド、IL）、水中における約5%ブドウ糖、または乳酸リンゲル液等の任意の等張性担体が挙げられ得る。実施態様において、医薬上許容される担体には、ヒト血清アルブミン(albumen)が追加される。

【0036】

本発明の目的のため、投与される用量(dose)、例えば、腫瘍反応性T細胞について濃縮された本発明の細胞集団における細胞の数は、合理的な時間枠にわたって哺乳動物において、例えば治療応答または予防応答などをもたらすのに十分でなければならない。例えば、細胞の数は、投与時点から約2時間またはそれ以上、例えば、12~24時間またはそれ以上の期間において、癌抗原と結合するため、または癌を検出、治療若しくは予防するために、十分でなければならない。ある実施態様では、時間は、更に長くなり得る。細胞の数は、例えば、特定の細胞の有効性及び哺乳動物（例えば、ヒト）の状態、並びに治療対象の哺乳動物（例えば、ヒト）の体重によって決定されるだろう。

【0037】

腫瘍反応性T細胞について濃縮された本発明の細胞集団から、投与される細胞の数を決定するための多くの分析が、その分野において知られている。本発明の目的のため、分析は、それぞれ異なる数の細胞が与えられる1セットの哺乳動物間で、ある哺乳動物へ所与の数のかかる細胞が投与された時に、標的細胞が溶解される程度、またはIFN-g及びIL-2等の1以上のサイトカインが分泌される程度を比較することを含み、該分析が、哺乳動物に投与される開始数を決定するために使用され得る。ある数の細胞の投与時に、標的細胞が溶解される程度、または例えば、IFN-g及びIL-2等のサイトカインが

10

20

30

40

50

分泌される程度は、その分野において知られた方法によって分析され得る。例えば、IL-2等のサイトカインの分泌は、細胞調製物 (cell preparation) の品質 (例えば、表現型及び / または有効性) の指標も提供し得る。

【0038】

腫瘍反応性T細胞について濃縮された本発明の細胞集団からの細胞の数は、特定の細胞集団の投与に伴い得る有害な副作用の存在、類型及び程度によっても決定されるだろう。通常、主治医が、年齢、体重、全体的な健康、食生活、性別、投与ルート、及び治療されている疾患の重症度等の多様な要因を考慮して、それぞれ個々の患者を治療するための細胞の数を決定するだろう。例として、本発明を制限する意図なく、細胞の数は、注入1回当たり (per infusion) 約 10×10^6 から約 10×10^{11} 細胞、注入1回当たり 約 10×10^9 細胞から約 10×10^{11} 細胞、または注入1回当たり 10×10^7 から約 10×10^9 細胞であり得る。本発明の方法によって得られた細胞集団は、有利には、効果的に癌を治療または予防することを可能にし得る。10

【0039】

本発明の方法によって得られた細胞集団は、癌を治療または予防する方法において使用され得ると考えられる。この点において、本発明は、哺乳動物において癌を治療または予防する方法であって、哺乳動物において癌を治療または予防するのに有効な量で、本明細書中に記述された本発明の方法のいずれかによって得られた医薬組成物または細胞集団を哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。本発明の別の実施態様は、哺乳動物において癌を治療または予防する方法であって、哺乳動物において癌を治療または予防するのに有効な量で、本明細書中に記述された本発明の方法のいずれかにより、腫瘍反応性T細胞について濃縮された細胞集団を哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。20

【0040】

「治療する」及び「予防する」という用語、並びにその派生語は、本明細書中で使用される場合、100%または完全な治療または予防を必ずしも意味しない。むしろ、当業者が、潜在的な利益または治療的効果を有すると認識する治療または予防の様々な度合いがある。この点では、本発明の方法は、哺乳動物において任意の量または任意のレベルの癌の治療または予防をもたらし得る。更に、本発明の方法によってもたらされる治療または予防としては、治療または予防される疾患、例えば、癌の1以上の状態または症状の治療または予防が挙げられる。また、本明細書中の目的のために、「予防」は、疾患、また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。30

【0041】

本発明の方法の目的のために、細胞集団が投与される場合において、細胞は、哺乳動物に対して同種または自己の細胞であり得る。好ましくは、細胞は、哺乳動物に対して自家性である。

【0042】

本発明の実施態様には、本明細書中に記述された本発明の方法のいずれかによって得られる濃縮された細胞集団のいずれかを投与する前に、哺乳動物のリンパ球を枯渇させること (lymphodepleting) が更に含まれる。リンパ球枯渇の例としては、骨髓非破壊的リンパ球枯渇化学療法 (nonmyeloablative lymphodepleting chemotherapy)、骨髓破壊的リンパ球枯渇化学療法 (myeloablative lymphodepleting chemotherapy)、全身照射 (total body irradiation) 等が挙げられるが、これらに限定され得ない。40

【0043】

本発明の方法に関し、癌は、肉腫 (例えば、滑膜肉腫、骨肉腫、子宮平滑筋肉腫 (leiomyosarcoma uteri)、及び胞巣状横紋筋肉腫)、リンパ腫 (例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫)、肝細胞癌、神経膠腫、頭頸部癌、急性リンパ腫 (acute lymphocytic cancer)、急性骨髓性白血病、骨肉腫、脳腫瘍、乳癌、肛門癌、肛門管癌、または肛門直腸癌、眼癌、肝内胆管癌、関節癌 (cancer of the joints)、頸部癌、胆囊癌、または胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌、または中耳癌 (middle ear)、口腔癌、外陰癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髓癌 (chronic myeloid cancer)、結腸癌 (colon cancer) (例えば50

、結腸上皮性悪性腫瘍 (colon carcinoma)) 、食道癌、子宮頸癌、消化管癌（例えば、消化管カルチノイド腫瘍）、下咽頭癌、咽頭癌、肝癌、肺癌、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭癌、卵巣癌、膀胱癌、腹膜癌 (peritoneum cancer) 、網癌 (omentum cancer) 、及び腸間膜癌 (mesentery cancer) 、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌、小腸癌、軟部組織癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌、及び膀胱癌のいずれかを含む任意の癌であり得る。

【0044】

以下の実施例は、本発明を更に説明するが、言うまでもなく、その範囲を多少なりとも限定すると解釈すべきではない。

【実施例】

【0045】

実施例 1

本実施例は、新鮮なメラノーマ腫瘍消化物サンプルにおいて P D - 1 、 T I M - 3 、 L A G - 3 または 4 - 1 B B を発現する C D 3⁺ / C D 8⁺ 細胞の頻度を示す。本実施例は、新鮮なメラノーマ腫瘍サンプルから単離された C D 8⁺ T 細胞による 1) T I M - 3 及び P D - 1 、 2) L A G - 3 及び P D - 1 、並びに 3) L A G - 3 及び T I M - 3 の共発現も示す。本実施例は、 M A R T - 1₂₇ - 3₅ 反応性細胞による P D - 1 、 T I M - 3 、または L A G - 3 発現も示す。

【0046】

新鮮なメラノーマ腫瘍サンプルの機械的及び酵素的消化物から得られる単細胞懸濁液を、解凍し、サイトカイン非存在下において 1×10^6 細胞 / m l で一晩静置した。細胞を染色し、 P D - 1 、 T I M - 3 、 L A G - 3 、 4 - 1 B B 、 O X 4 0 、 C D 2 5 、 C D 2 8 、 C D 2 7 、または C D 7 0 を発現する C D 3⁺ C D 8⁺ 細胞の百分率を、フローサイトメトリーによって測定した。結果を図 1 A に示す。図 1 A に示すように、新鮮な腫瘍消化物サンプルからの C D 3⁺ / C D 8⁺ 細胞は、 P D - 1 、 T I M - 3 、 L A G - 3 または 4 - 1 B B を発現し得る。

【0047】

別個の実験では、細胞を、 2 つの異なるメラノーマ腫瘍の新鮮なサンプルから得て、 T I M - 3 及び P D - 1 の共発現、 L A G - 3 及び P D - 1 の共発現、並びに L A G - 3 及び T I M - 3 の共発現を、生きている細胞及び C D 3⁺ C D 8⁺ 細胞についてゲーティングされたフローサイトメトリーを用いて測定した。その結果、メラノーマ腫瘍に浸潤する C D 8⁺ T 細胞のサブセットが、 1) T I M - 3 及び P D - 1 、 2) L A G - 3 及び P D - 1 、並びに 3) L A G - 3 及び T I M - 3 を共発現することが示された。

【0048】

別個の実験では、 M A R T - 1₂₇ - 3₅ 反応性 T 細胞における P D - 1 、 T I M - 3 、または L A G - 3 発現を、生きている細胞及び C D 3⁺ C D 8⁺ 細胞についてゲーティングされたフローサイトメトリーを用いて測定し、 M A R T - 1₂₇ - 3₅ 反応性がない C D 3⁺ C D 8⁺ T 細胞のものと比較した。その結果、メラノーマ腫瘍に浸潤する M A R T - 1₂₇ - 3₅ 反応性細胞が、 M A R T - 1₂₇ - 3₅ 反応性がない C D 3⁺ C D 8⁺ T 細胞と比べて、高レベルの P D - 1 、 T I M - 3 、及び L A G - 3 を発現することが示された。

【0049】

実施例 2

本実施例は、 P D - 1 、 T I M - 3 、 L A G - 3 及び 4 - 1 B B の 1 つを発現する C D 3⁺ C D 8⁺ 細胞を特異的に選択し、選択された細胞の数を増加させる方法を示す。

【0050】

新鮮なメラノーマ腫瘍サンプル (F r T u 1913) から得られた単細胞懸濁液を解凍し、サイトカイン非存在下で一晩静置し、その後、染色した。抗 C D 3 、抗 C D 8 、抗 P D - 1 、 T I M - 3 、 L A G - 3 及び 4 - 1 B B 抗体を用いて、細胞を、以下の C D 3⁺ 集団にソートした：蛍光活性化セルソーティング (F A C S) による C D 8⁺ 、 C D 8⁺

10

20

30

40

50

/ P D - 1⁺、 C D 8⁺ / L A G 3⁺、 C D 8⁺ / T I M - 3⁺、 C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺、 C D 8⁺ / P D - 1⁻、 C D 8⁺ / L A G 3⁻、 C D 8⁺ / T I M - 3⁻、 または C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻。細胞数を、その後、急速拡張プロトコル (rapid expansion protocol) を用いて増加させ (200倍過剰照射されたフィーダー (200-fold excess irradiated feeder)、30ng/ml 抗CD3 及び 500CU/ml IL-2)、単離された集団の増加倍率を測定した。結果を図1Bに示す。図1Bに示すように、P D - 1、T I M - 3、L A G - 3 及び 4 - 1 B B の1つも発現する C D 8⁺細胞数が増加した。

【0051】

実施例3

本実施例は、新鮮なメラノーマ腫瘍サンプルから単離され、C D 8 と、P D - 1、L A G - 3、T I M - 3、及び4 - 1 B B の1つの発現によってソートされたT細胞のインピトロでの反応性を示す。

【0052】

4 - 1 B B 上方制御は、T C R 刺激の指標である。T細胞数を増加させた後、T C R 刺激の非存在下において、4 - 1 B B 発現が失われることが認められた。細胞数を増加させ、細胞を自己腫瘍細胞株とともに共培養した後、4 - 1 B B 発現を先に失って、腫瘍細胞株で刺激されたT細胞は、4 - 1 B B を再び発現するだろうということも認められた。従って、4 - 1 B B 発現を、自己腫瘍細胞株に対するT C R 刺激マーカとして、自己腫瘍とともに共培養した24時間後に測定する。

【0053】

新鮮なメラノーマ腫瘍消化物サンプル (F r T u 1913) からの単細胞懸濁液を、サイトカインを用いずに一晩静置し、以下の集団についてソートした：実施例3において記述された通り、F A C S による C D 8⁺、C D 8⁺ / P D - 1⁺、C D 8⁺ / L A G 3⁺、C D 8⁺ / T I M - 3⁺、C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺、C D 8⁺ / P D - 1⁻、C D 8⁺ / L A G 3⁻、C D 8⁺ / T I M - 3⁻、または C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻ 集団。ソートされた細胞の数を、インピトロで14日間増加させた。14日目に、細胞を洗浄し、自己腫瘍細胞株 (1 × 10⁵ エフェクター : 1 × 10⁵ 標的細胞) と共に培養した。自己腫瘍細胞株 (T C 1913) 及び同種異系 (Allo.) 腫瘍細胞株との共培養の24時間後に、I F N - ガンマ放出、及び4 - 1 B B を発現する C D 8⁺細胞の百分率を定量することによって反応性を評価した。T細胞によって標的とされる特異的変異エピトープ (C D K n 2 A) を認識する C D 8⁺細胞の百分率も、この特定のエピトープに対する四量体を用いて定量した。結果を表1及び2ならびに図2A～2Eにおいて示す。

【0054】

10

20

30

【表1】

表1

	T cells	TC 19/3 Aut.	TC1913 *W6/32	FrTu#1913 Aut.	FrTu#1913 *W6/32	TC 624 CIITA Allo. *A0201	TC 624 CIITA + W6/32	TC 2119 Allo. *A0201	TC2448 Allo. *A0201	TC1865 Allo. *A0201	TC1379 Allo. *A11	TC2301 Allo	OKT3 (0.1 μg/ml)
CD8 ⁺	31 (0.7)	77 (0.8)	0 (0.8)	<u>398</u> (1.1)	83 (0.6)	<u>14598</u> (2.2)	40 (0.8)	<u>9626</u> (2.1)	<u>2127</u> (0.7) (1.5)	<u>1845</u> (0.8)	318 (2.3) (0.3)	<u>1760</u> (2.0)	<u>606</u> (1.1) (0.3)
PD-1 ⁺	11 (0.4)	<u>26696</u> (42.2)	<u>851</u> (16.9)	<u>4108</u> (45.0)	<u>363</u> (4.4)	0 (0.2)	0 (0.3)	0 (0.5)	<u>1766</u> (1.6) (1.6)	0 (0.8)	0 (0.3)	0 (0.3)	<u>266</u> (2.1) (2.1)
PD-1-	0 (0.1)	0 (0.4)	0 (0.2)	27 (0.5)	13 (0.2)	<u>11103</u> (2.9)	0 (0.5)	<u>9986</u> (1.6)	78 (0.2) (1.6)	105 (0.7) (3.0)	<u>1456</u> (0.8)	<u>424</u> (1.9) (3.0)	<u>355</u> (1.2) (0.2)
LAG-3 ⁺	0 (0.1)	<u>55291</u> (49.0)	<u>2345</u> (25.3)	<u>6485</u> (45.7)	<u>449</u> (4.3)	0 (0.1)	0 (0.1)	0 (0.1)	<u>412</u> (0.8) (0.1)	0 (0.1)	0 (0.3)	0 (0.2)	0 (0.1)
LAG-3-	4 (0.4)	53 (n.d.)	0 (0.5)	<u>225</u> (1.1)	45 (0.4)	<u>17820</u> (3.7)	20 (0.9)	<u>14872</u> (2.9)	<u>532</u> (0.7) (2.9)	91 (0.6) (1.6)	<u>922</u> (4.8) (1.6)	<u>808</u> (3.9) (0.1)	<u>570</u> (1.7) (0.1)
TIM-3 ⁺	0 (0.1)	<u>25472</u> (53.4)	<u>1000</u> (17.9)	<u>4761</u> (60.0)	310 (5.4)	0 (0.1)	0 (0.1)	0 (0.1)	<u>3545</u> (2.0) (0.1)	7 (1.6)	0 (0.1)	0 (0.1)	<u>500</u> (1.5) (0.1)
TIM-3-	0 (0.1)	11 (0.6)	0 (0.1)	136 (0.6)	41 (0.2)	<u>8092</u> (2.5)	0 (0.3)	<u>6316</u> (1.6)	<u>1614</u> (0.2) (1.6)	<u>467</u> (0.9) (4.2)	<u>1050</u> (4.1)	<u>1167</u> (4.5)	160 (1.3) (0.1)
41BB ⁺	<u>572</u> (8.8)	<u>23845</u> (31.3)	589 (13.4)	<u>4581</u> (33.9)	952 (11.1)	<u>6364</u> (3.7) (4.2)	<u>2117</u> (6.2)	<u>21207</u> (6.5)	<u>882</u> (3.5) (6.5)	<u>526</u> (4.9) (4.9)	<u>294</u> (4.9) (3.3)	<u>>1666</u> (3.3)	71272 (82.7)
41BB-	22 (0.2)	10 (0.4)	6 (0.2)	106 (0.6)	44 (0.1)	<u>11892</u> (3.4)	46 (0.6)	<u>11705</u> (2.4)	<u>4227</u> (0.8) (2.4)	<u>562</u> (1.6) (4.5)	<u>1147</u> (4.5)	<u>1035</u> (8.0)	87 (1.3) (8.5)

鮮な腫瘍消化物サンプルから分離され、かつ、示された細胞表面マーカー発現に従つてソートされ、自己 (Aut.) 脲瘍細胞株 (TC 1913) 及び同種異系 (a 11 o.) 脢瘍細胞株に対して共培養した。IFN ガンマによる反応性 (pg/m1) を示す。括弧内の数値は、共培養の 2 回間後に CD 137 (41BB) を上方制御した CD 3⁺CD 8⁺細胞の百分率である。腫瘍細胞株 (TC) 624 CIITA、2119、2448、及び 1865 は、TC 1913 と HLA A*0201 を共有し、TC 1913 と A*11 を共有する。TC 2301 は、ネガティブコントロールとして使用される同種異系のコントロール (全ての HLA に対してミスマッチした) である。*コントロール A*11 は、RCT 1L3309 によって認識された C R K R S 遺伝子からのペプチドを拘束した。

200 pg/m1 より大きく、かつバックグラウンドの 2 倍より大きい数値は、陽性とみなし、太字及び下線で示した。

【表2】

表2

	T cells	Aut. TC1913 A 0201	Aut. TC1913 + W6/32	Allo. TC2301	COS A11 1 μM irrel. Pept	COS A11 1 μM CDKN2A _{mut}
PD1 ⁺	0 (2.1)	<u>9633</u> (46.1)	57 (12.9)	<u>268</u> (3.1)	9 (1.3)	<u>17762</u> (30.3)
PD1-	0 (0.5)	0 (1.0)	0 (0.9)	176 (3.2)	69 (0.7)	68 (0.6)
LAG-3 ⁺	0 (1.3)	<u>15290</u> (61.2)	<u>221</u> (16.5)	0 (0.6)	0 (1.0)	<u>23587</u> (55.7)
LAG-3-	0 (1.7)	0 (1.2)	0 (1.4)	632 (4.2)	<u>363</u> (1.3)	427 (1.4)
TIM-3 ⁺	0 (1.2)	<u>11954</u> (58)	102 (11.4)	<u>1190</u> (2.9)	0 (0.5)	<u>21140</u> (56.3)
TIM-3-	0 (0.8)	0 (1.0)	0 (0.9)	79 (3.0)	100 (0.5)	92 (0.4)
41BB ⁺	55 (10.3)	<u>6418</u> (39.6)	44 (10.0)	<u>1767</u> (11.2)	11 (1.7)	<u>12557</u> (19.5)
41BB-	0 (0.6)	0 (1.0)	0 (0.8)	106 (2.7)	<u>1874</u> (1.3)	<u>2026</u> (1.4)

新鮮な腫瘍消化物サンプルから分離され、かつ、示された細胞表面マーカー発現に従つてソートされ、インビトロで数を増加させたエフェクタ集団を、自己腫瘍細胞株 (TC1913)、ネガティブコントロールとしての同種異系腫瘍細胞株 (TC2301)、及び無関係な (irrelevant) ペプチドとともにパルスされたCOS A11細胞に対して共培養した。IFN-ガンマによる反応性 (pg/ml) を示す。括弧内の数値が、培養の24時間後にCD137 (41BB) を上方制御するCD3⁺CD8⁺細胞の百分率である。200 pg/mlより大きく、かつバックグラウンドの2倍より大きい数値を陽性とみなし、太字及び下線で示す。

【0056】

表1及び2に示すように、新鮮なメラノーマ腫瘍サンプルから単離され、かつCD8発現、及びPD-1、LAG-3、TIM-3、及び4-1BBの1つの発現によってソートされたT細胞は、IFN-ガンマ分泌、4-1BB発現、及びCDKn2Aを認識する細胞の百分率によって測定された通り、自己腫瘍細胞株に対して反応性を有する。図2A

50

30

10

20

- 2 E に示すように、5つの異なる新鮮なメラノーマ腫瘍サンプルのそれぞれから単離され、かつ、CD8発現、及びPD-1、LAG-3、TIM-3、及び4-1BBの1つの発現によってソートされたT細胞は、IFN-ガンマ分泌及び4-1BB発現によって測定された通り、自己腫瘍細胞株に対する反応性を有する。

【0057】

別個の実験では、実施例3に記述された通りに、細胞を、2つの独立の新鮮なメラノーマ腫瘍サンプル(FrTu 1913及びFrTu 3713)から単離し、CD8発現、並びにPD-1、LAG-3、TIM-3または4-1BB発現によってソートした。ソートされた細胞数を、インビトロにおいて14日間、増加させた。15日目に、標的腫瘍細胞株(自己及び同種異系)を⁵¹Crで標識し、図3A~3Fに示された比率においてエフェクター細胞とともに4時間、共培養した。⁵¹Cr放出を、ガンマ計測によって3重に決定し、特異的溶解の百分率を、以下の式を用いて算出した：[(1分当たりの実験的カウント(cpm)-自発的cpm)/(最大cpm-自発的cpm)] × 100。結果を、図3A~3Fに示す。図3A~3Fに示すように、PD-1、LAG-3、TIM-3または4-1BBの発現によってソートされた細胞は、自己腫瘍細胞株において溶解を行うことができた。

【0058】

実施例4

本実施例は、メラノーマ腫瘍サンプルから単離され、かつ4-1BB及び/またはPD-1の発現によってソートされたCD8⁺細胞の反応性を示す。

【0059】

細胞を、3人の患者からの新鮮なメラノーマ腫瘍サンプルから単離し、FACSによりCD3⁺/CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁻、CD3⁺/CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁺、CD3⁺/CD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁺、CD3⁺/CD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁻、CD3⁺/CD8⁺/PD-1⁺、CD3⁺/CD8⁺/4-1BB⁺、CD3⁺/CD8⁺/PD-1⁻、またはCD3⁺/CD8⁺/4-1BB⁻集団についてソートした。ソートされた細胞を、自己腫瘍細胞とともに共培養し、4-1BB発現の上方制御を、フローサイトメトリーによって測定した。結果は、自己腫瘍を認識するT細胞(4-1BB発現の上方制御によって測定された通り)は、単独陽性PD-1⁺または4-1BB⁺発現細胞にみられ得るが、最も高頻度の腫瘍反応性細胞(4-1BB上方制御によって測定された通り)は、新鮮なメラノーマ腫瘍消化物サンプルにおいて4-1BB及びPD-1の両方を共発現する集団においてみられたことを、3つの腫瘍サンプル全てに対して示した。

【0060】

別個の実験では、細胞を、新鮮なメラノーマ腫瘍サンプル(FrTu 1913)から単離し、FACSによりCD3⁺/CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁺、CD3⁺/CD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁺、及びCD3⁺/CD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁻集団についてソートし、ソートされた細胞からクローンを樹立した。クローンを、自己腫瘍細胞株とともに共培養し、4-1BB発現の上方制御をフローサイトメトリーによって測定し、IFN-ガンマ分泌を測定した。結果は、最も高頻度の腫瘍反応性クローン(4-1BB上方制御及びIFN-ガンマ分泌によって測定された通り)が、PD-1及び4-1BBの両方を共発現する集団においてみられる事を示した。

【0061】

別個の実験では、メラノーマ腫瘍FrTu 3713からの単細胞懸濁液を、サイトカインを用いずに一晩静置し、細胞を、FACSによりCD8⁺、CD8⁺/PD-1⁺、CD8⁺PD-1⁻、CD8⁺/4-1BB⁺、CD8⁺/4-1BB⁻、CD8⁺/4-1B⁺/PD-1⁻、CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁺、CD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁺、及びCD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁻集団についてソートした。メラノーマ腫瘍FrTu 3612からの単細胞懸濁液を、サイトカインを用いずに一晩静置し、細胞を、FACSによりCD8⁺、CD8⁺/PD-1⁺、CD8⁺PD-1⁻、CD8⁺/4-1BB⁺、CD8⁺/4-1BB⁻、CD8⁺/4-1B⁺/PD-1⁻、CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁺、CD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁺、及びCD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁻集団についてソートした。

B B⁺ / P D - 1⁻、C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / P D - 1⁺、C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻ / P D - 1⁺、及び C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻ / P D - 1⁻集団についてソートした。ソートされた細胞数を、14日間、インビトロで増加させた。14日目に、細胞を洗浄し、自己腫瘍細胞株 (1×10^5 エフェクター : 1×10^5 標的細胞) と共に培養し、共培養から24時間後に4 - 1 B B を発現する C D 8⁺ 細胞の百分率 (Fr Tu 3612 及び Fr Tu 3713) 及び / または I FN - ガンマ分泌の量 (Fr Tu 3612) を定量することによって、反応性を評価した。結果を、図4 A 及び 4 B に示す。図4 A に示すように、二重陽性 P D - 1 及び 4 - 1 B B 共発現によってソートされた細胞は、単独陽性 P D - 1 または 4 - 1 B B 発現に基づいてソートされた細胞によって示された 4 - 1 B B 上方制御と、同様のレベルの 4 - 1 B B 上方制御を示した。図4 B に示すように、二重陽性 P D - 1 及び 4 - 1 B B 共発現によってソートされた細胞は、単独陽性 P D - 1 発現に基づいてソートされた細胞によって示された 4 - 1 B B 上方制御及び I FN - ガンマ分泌と、同様のレベルの 4 - 1 B B 上方制御及び I FN - ガンマ分泌を示した。
10

【0062】

別個の実験では、メラノーマ腫瘍 Fr Tu 3713 から単離された細胞は、FACS により C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / P D - 1⁻、C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁺ / P D - 1⁺、C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻ / P D - 1⁺、及び C D 8⁺ / 4 - 1 B B⁻ / P D - 1⁻ 集団についてソートされた。ソートされた細胞数を、14日間インビトロで増加させた。15日目に、標的腫瘍細胞株 (自己及び同種異系) を、 ^{51}Cr で標識し、図5 A ~ 5 C に示す比率においてエフェクター細胞とともに4時間、共培養した。 ^{51}Cr 放出を、- カウントによって3重に決定し、特異的溶解の百分率を、以下の式を用いて算出した : [(実験的 cpm - 自発的 cpm) / (最大 cpm - 自発的 cpm)] × 100。結果を、図5 A ~ 5 C に示す。図5 A ~ 5 C に示すように、4 - 1 B B⁺ 単独陽性発現、P D - 1⁺ 単独陽性発現、または二重陽性 4 - 1 B B⁺ / P D - 1⁺ 発現によってソートされた細胞は、インビトロで自己腫瘍細胞を溶解することができる。
20

【0063】

実施例5

本実施例は、胃腸(GI)管腫瘍サンプルから単離され、かつ P D - 1、T IM - 3、または 4 - 1 B B 発現によってソートされた C D 8⁺ 細胞の反応性を示す。

【0064】

新鮮な胃腸(GI)管腫瘍サンプル(Fr Tu 3446b)からの単細胞懸濁液をサイトカインを用いることなく一晩静置し、FACS により P D - 1、T IM - 3、または 4 - 1 B B の発現に従ってソートした。ソートされた細胞数を、14日間、インビトロで増加させた。14日目に細胞を洗浄し、自己腫瘍細胞株 (1×10^5 エフェクター : 1×10^5 標的細胞) と共に培養し、共培養の24時間後に、I FN - ガンマ放出と、4 - 1 B B を発現する C D 8⁺ 細胞の百分率とを定量することによって反応性を評価した。結果を図6に示す。図6に示すように、P D - 1、T IM - 3、または 4 - 1 B B 発現に従ってソートされた細胞は、4 - 1 B B 発現によって測定された通り、P D - 1、T IM - 3、または 4 - 1 B B 発現をそれぞれ欠損する細胞集団の腫瘍反応性に比べて、より大きな腫瘍反応性を示した。I FN - ガンマ分泌は全く検出されなかつたが、4 - 1 B B の特異的上方制御により、細胞が腫瘍反応性であったことが示される。
40

【0065】

実施例6

本実施例では、細胞数をインビトロで増加させた後に、P D - 1⁺ でソートされた細胞が P D - 1⁻ 細胞よりもオリゴクローナルであることを示す。本実施例では、P D - 1⁺ でソートされた細胞は、細胞数をインビトロで増加させた後に、自己腫瘍によって発現された変異エピトープを標的とするクローニングを含むことも示す。

【0066】

新鮮なメラノーマ腫瘍消化物サンプル(Fr Tu 1913)からの単細胞懸濁液を、サイトカインを用いずに一晩静置し、FACS により P D - 1 発現に従ってソートした。
50

ソートされた細胞数を、インビトロで14日間、増加させた。T C R ベータ鎖RNAを、 μ M A C S RNA単離キット(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)を用いて抽出した。cDNA合成及び5' R A C Eを行った。サンプルの同定のために、PCRによって、PCR産物の末端にバーコード配列を導入した。PCR産物を洗浄し、ライブラリーのサイズを定量した。ディープシーケンス(Deep sequencing)を行った(Illumina, Inc., San Diego, CA)。集団における各固有T C R ベータ鎖CDR3領域アミノ酸配列の頻度を決定した。結果を図7A～7Cに示す。図7A～7Cに示すように、細胞数をインビトロで増加させた後、PD-1⁺でソートされた細胞は、PD-1⁻細胞よりもオリゴクローナルである。

【0067】

10

PD-1⁺集団における20個の最も高頻度のクロノタイプを図8に示す。図8に示すように、細胞数を増加させた後にPD-1⁺でソートされた細胞における最も高頻度のT C R ベータ鎖クロノタイプは、PD-1⁻画分(fraction)において低頻度にみられた。図8に示すように、自己腫瘍細胞株によって発現される変異エピトープを認識するクローランは、PD-1⁺集団における20個の最も高頻度のクローラン内にみられ、PD-1⁻集団において非常に低頻度にみられた。これらの結果は、変異エピトープを標的とする腫瘍反応性クローランが、新鮮な腫瘍サンプルにおいてPD-1を初期に発現したことを示した。

【0068】

20

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。

【0069】

30

本発明を説明する文脈における“a”及び“an”及び「前記(the)」及び「少なくとも1つ(at least one)」という用語及び同様の指示対象の使用(特に、以下のクレームの文脈において)は、異なるように明細書中に示され、または文脈によって明確に否定されなければ、単数形及び複数形の両方をカバーするように解釈されるべきである。異なるように明細書中に示され、または文脈によって明確に否定されなければ、1以上の項目のリストが次に来る「少なくとも1つ(at least one)」という用語の使用(例えば、「A及びBの少なくとも1つ」)は、リストされた項目(AまたはB)から選択された1の項目、または2以上のリストされた項目の任意の組み合わせ(A及びB)を意味するべく解釈される。「含む(comprising)」「有する(having)」「含む(including)」及び「含有する(containing)」という用語は、異なるように言及されなければ、オープンエンド用語(すなわち、「を含むが、これに限定されない」ということを意味する)として解釈されるべきである。明細書中の数値範囲の記述は、本明細書中に異なるように示されなければ、範囲に入るそれぞれ別々の値に個別に言及する略記方法として役立つことを意図したに過ぎず、それぞれ別々の値が、本明細書中に個別に挙げられたように、本明細書中に組み込まれる。本明細書において異なるように指摘されなければ、あるいは文脈によって異なるように明確に否定されなければ、明細書中に記述された全ての方法が、任意の適切な順序で行うことができる。異なるようにクレームされていなければ、本明細書内で提供された任意の及び全ての実施例または例示的な言葉(例えば、「等(such as)」)の使用は、単に本発明の理解をより容易にすることが意図されており、本発明の範囲を限定するものではない。本明細書におけるいかなる言葉も、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。

40

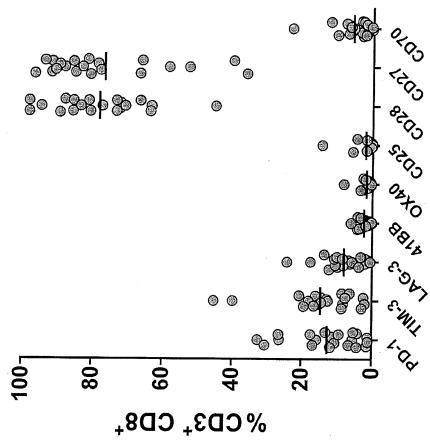
【0070】

本発明の好ましい実施の態様は、本明細書中に記述されており、本発明を実施するために本発明者らが知っている最良の形態を含んでいる。これらの好ましい実施の態様の変形例は、先の記述を読んだ当業者にとって明らかになり得る。本発明者らは、当業者が、必要に応じてかかる変形例を採用するものと思っており、本発明者らは、本明細書中に具体的に記述されたものとは異なるように本発明が実施されることを意図している。従って、

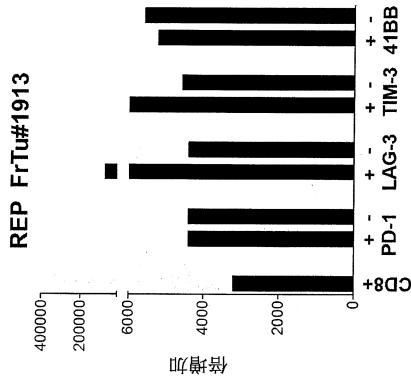
50

本発明は、本明細書に添付された特許請求の範囲に記載された要旨の、適用され得る法律によって許容されるすべての修正形態及び均等物を含む。さらに、本明細書中に異なるように示され、あるいは文脈によって異なるように明確に否定されなければ、これらの全ての可能な変形例において上述された要素の任意の組み合わせは、本発明に包含される。

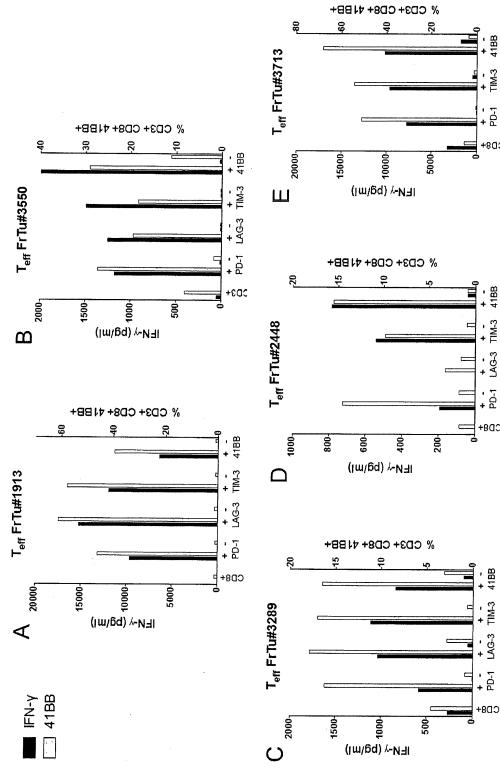
【図 1 A】



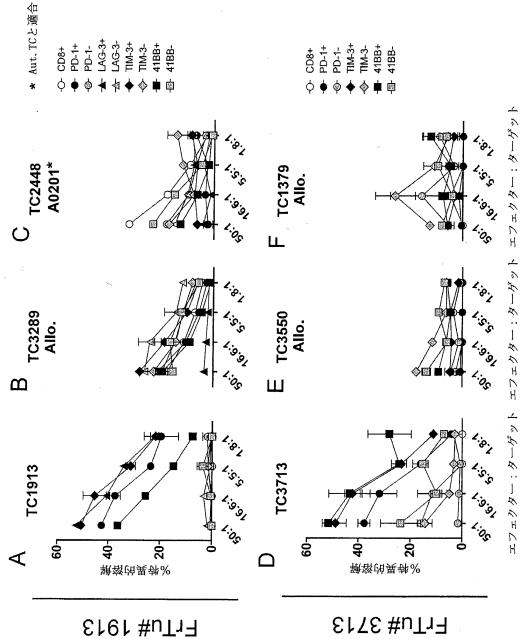
【図 1 B】



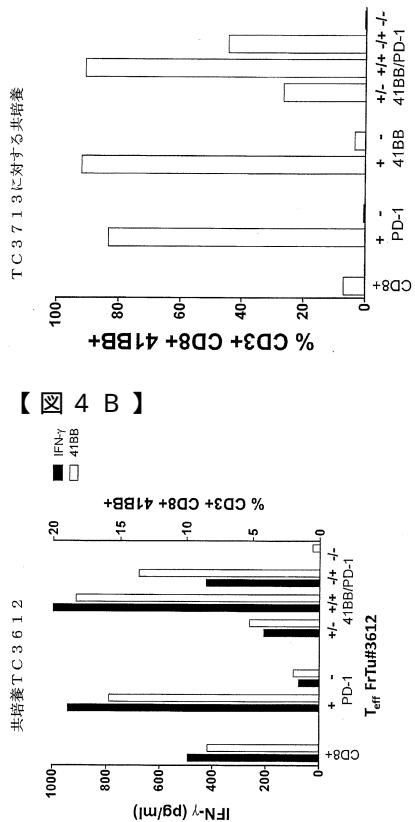
【図 2】



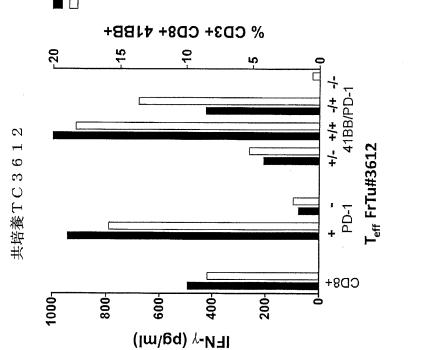
【図3】



【図4 A】



【図4 B】



【図5】

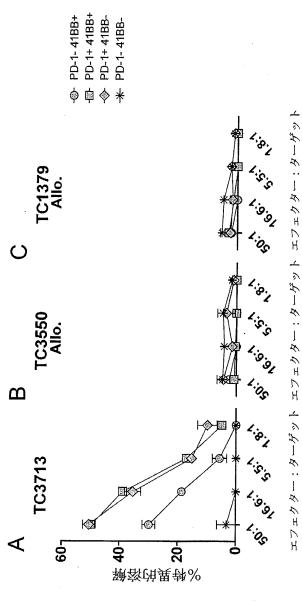
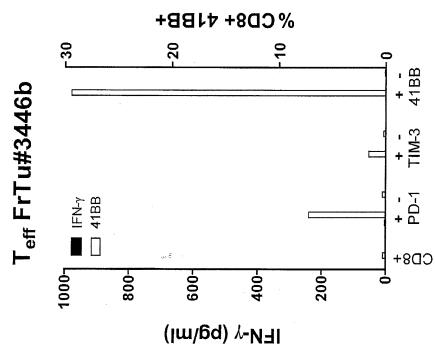
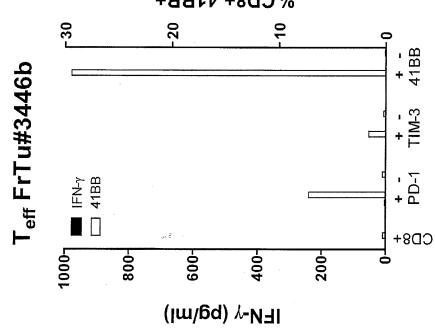
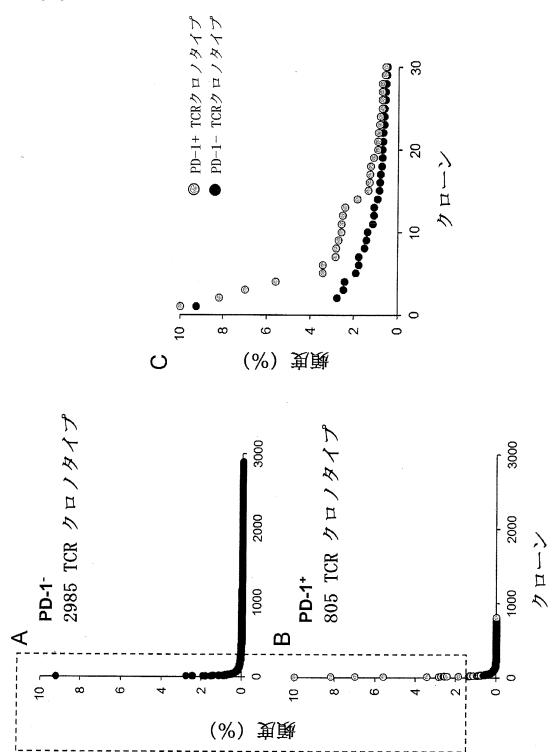


図5 (3713)

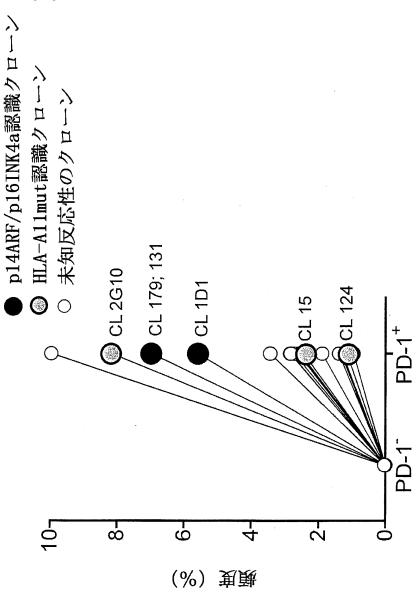
【図6】

T_{eff} FRTu#3446b

【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00

(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 グロス、アレナ
アメリカ合衆国、ワシントン、ディーシー 20009、アパートメント 906、シックスティーンズ ストリート ノースウェスト 2480
(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 101
04

審査官 小林 薫

(56)参考文献 国際公開第2012/129201(WO,A1)
国際公開第2007/018198(WO,A1)
J. Immunother., 2012, Vol.35, No.9, p.722-723
Mol. Ther., 2012, Vol.20, No.9, p.e2(768)
J. Immunother., 2010, Vol.33, No.5, p.547-556
J. Immunother., 2010, Vol.33, No.9, p.956-964, Author Manuscript

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 1 / 00 - 7 / 08
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
D W P I (D e r w e n t I n n o v a t i o n)