(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7038353号
(P7038353)

(45)発行日　令和4年3月18日(2022.3.18)

(24)登録日　令和4年3月10日(2022.3.10)

(51)国際特許分類		FI		
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783	
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	Ｚ
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	

請求項の数　61　（全115頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-554093(P2018-554093)
(86)(22)出願日　平成29年4月12日(2017.4.12)
(65)公表番号　特表2019-513400(P2019-513400A)
(43)公表日　令和1年5月30日(2019.5.30)
(86)国際出願番号　PCT/EP2017/058891
(87)国際公開番号　WO2017/178572
(87)国際公開日　平成29年10月19日(2017.10.19)
審査請求日　令和2年4月10日(2020.4.10)
(31)優先権主張番号　62/321,964
(32)優先日　平成28年4月13日(2016.4.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　518357298
ヴィヴィア バイオテック，エス．エル
スペイン ２８７６０ マドリード カレ・サンティアゴ・グリソリア １ スイート ２０５ パルケ・シエンティフィコ・マドリード（ピーシーエム）
(74)代理人　100082072
弁理士　清原 義博
(72)発明者　バレステロス ノベル，フアン アントニオ
スペイン ２８７６０ マドリード カレ・サンティアゴ・グリソリア １ スイート ２０５ パルケ・シエンティフィコ・マドリード（ピーシーエム） ヴィヴィア・バイオテック，エス．エル
(72)発明者　ベネット，テレサ アン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　エクスビボのＢＩＴＥ活性化Ｔ細胞

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
活性化Ｔ細胞又は活性化Ｔ細胞調製物を産生するインビトロの方法であって、該方法は、（ａ）少なくとも１つのＴ細胞を含むサンプル、少なくとも１つの癌細胞を含むサンプル、及び二重特異性又は多特異性の抗体を混合することによってエクスビボの反応混合物を形成し、及び、Ｔ細胞を活性化するのに十分な条件下で、及びそれに十分な期間にわたり前記反応混合物をインキュベートする工程であって、それにより少なくとも１つの活性化Ｔ細胞を産生する、工程、及び
（ｂ）（ａ）から活性化Ｔ細胞を選択する工程であって、ここで、前記活性化Ｔ細胞の選択は、有効Ｅ：Ｔ比率を測定することにより判定される、癌細胞を死滅させるその活性の増大に基づき、ここで、前記有効Ｅ：Ｔ比率は、標的細胞（Ｔ）に対するエフェクター細胞（Ｅ）の比率であり、エフェクター細胞（Ｅ）は活性化Ｔ細胞として定義され、標的細胞（Ｔ）は前記活性化Ｔ細胞によって死滅させられる癌細胞として定義される、工程
を含む、ことを特徴とする方法。
【請求項２】
工程（ａ）において、エクスビボの反応混合物は、少なくとも１つのＴ細胞が少なくとも１つの癌細胞から細胞表面マーカーを獲得することを可能にするのに十分な条件下で、及びそれに十分な期間にわたりインキュベートされる、ことを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】

以下のインビトロの工程、
ｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を増殖する工程、
ｉｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を富化する工程、又は
ｉｉｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を精製する工程
のうち１つ、２つ、又は全てを更に含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
二重特異性又は多特異性の抗体は、二重特異性免疫グロブリン（ＢｓＩｇＧ）、付加的な抗原結合分子に作動的に結合した免疫グロブリン、二重親和性再標的化（ＤＡＲＴ）抗体フラグメント又は二重特異性Ｔ細胞エンゲージャ（ＢｉＴＥ）から選択されたリンカーにより作動的に結合される少なくとも２つのｓｃＦｖフラグメントを含む二重特異性抗体（ＢｓＡｂ）フラグメント、二重特異性融合タンパク質、又はＢｓＡｂ抱合体から選択される、ことを特徴とする請求項１乃至３の何れか１つに記載の方法。
【請求項５】
二重特異性又は多特異性の抗体は、ＢｓＭＡｂ　ＣＤ１２３／ＣＤ３、ＢｓＭＡｂ　ＣＤ１９／ＣＤ３、及びＥｐＣＡＭ／ＣＤ３から成るリストから選択される、ことを特徴とする請求項１乃至４の何れか１つに記載の方法。
【請求項６】
選択する工程（ｂ）及び／又は富化する工程ｉｉ）は、癌細胞膜へと拡散するか、或いはｉ）少なくとも１つの癌抗原、ｉｉ）活性化Ｔ細胞の少なくとも１つのマーカー、或いはｉ）とｉｉ）の両方に結合する、蛍光標識された化合物を使用する工程、又は、ｉ）少なくとも１つの癌抗原、ｉｉ）活性化Ｔ細胞の少なくとも１つのマーカー、或いはｉ）とｉｉ）の両方に結合する抗体又はそのフラグメントで被覆されたビーズを使用する工程を含む、ことを特徴とする請求項３乃至５の何れか１つに記載の方法。
【請求項７】
活性化Ｔ細胞又はその調製物は、少なくとも１つのＣＤ８＋Ｔ細胞及び／又は少なくとも１つのＣＤ２５＋Ｔ細胞、及び／又は、少なくとも１つのＣＤ８＋／ＣＤ２５＋Ｔ細胞、及び／又は、少なくとも１つのＣＤ４＋／ＣＤ２５＋Ｔ細胞、及び／又は、少なくとも１つの細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）又は少なくとも１つの腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、及び／又は、少なくとも１つのトロゴサイトーシスＴ細胞を含む、ことを特徴とする請求項１乃至６の何れか１つに記載の方法。
【請求項８】
活性化Ｔ細胞の調製物から個々のクローンを分離する工程を更に含み、分離する工程は、（ｉ）活性化Ｔ細胞の調製物を単細胞へと分離する工程、及び（ｉｉ）活性化Ｔ細胞の少なくとも１つの調製物を生成するために単細胞を増殖する工程による、単細胞のクローン増殖を含む、ことを特徴とする請求項１乃至７の何れか１つに記載の方法。
【請求項９】
工程（ａ）は、癌細胞とＴ細胞の両方を含む１つのサンプル、及び二重特異性又は多特異性の抗体を混合する工程を含む、ことを特徴とする請求項１乃至８の何れか１つに記載の方法。
【請求項１０】
少なくとも１つのＴ細胞を含むサンプルは、微小環境を持つ組織に由来し、構成成分は実質的に、全血、末梢血、骨髄、リンパ節、一次腫瘍の生検、或いは転移又は脾臓の生検から選択されるサンプルから、除去又は単離されない、ことを特徴とする請求項１乃至９の何れか１つに記載の方法。
【請求項１１】
少なくとも１つの癌細胞を含むサンプルの癌は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（Ｂ細胞リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病）、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、又は急性リンパ性白血病から選択された血液癌である、ことを

特徴とする請求項１乃至１０の何れか１つに記載の方法。
【請求項１２】
癌は、卵巣癌、直腸癌、胃癌、精巣癌、肛門癌、子宮癌、結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、小腸癌、食道癌、黒色腫、カポジ肉腫、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部の癌、皮膚又は眼内の悪性黒色腫、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、扁平上皮癌、子宮頸扁平上皮癌の癌腫、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、膣癌、軟組織の肉腫、尿道癌、外陰癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓又は尿管の癌、腎盤の癌腫、脊椎の軸の腫瘍、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管新生、上述の癌の転移性病巣、又はそれらの組み合わせから選択される固形癌である、ことを特徴とする請求項１乃至１１の何れか１つに記載の方法。
【請求項１３】
少なくとも１つのＴ細胞を含むサンプル及び／又は少なくとも１つの癌細胞を含むサンプルを提供する被験体は、
（ｉ）以前に癌の処置を受けていないか、
（ｉｉ）以前に癌の処置を少なくとも１回受けたか、又は
（ｉｉｉ）微小残存病変（ＭＲＤ）がある
ことを特徴とする請求項１乃至１２の何れか１つに記載の方法。
【請求項１４】
活性化Ｔ細胞又は活性化Ｔ細胞の調製物の、癌を死滅させる活性を評価する工程を更に含む、請求項１乃至１３の何れか１つに記載の方法。
【請求項１５】
評価する工程は、
（ａ）活性化Ｔ細胞が少なくとも１つの癌細胞を死滅させることを可能にするのに十分な期間にわたり、請求項１－１４に記載の方法に従って獲得可能な活性化Ｔ細胞又はその調製物を、少なくとも１つの癌細胞を含むサンプルと接触させる工程であって、前記癌細胞が活性化Ｔ細胞またはその調製物と同じ被験体に由来する、工程
（ｂ）工程（ａ）の後に癌細胞のレベルを判定し、及び随意に工程（ａ）の後に活性化Ｔ細胞のレベルを判定する工程、及び随意に
（ｃ）工程（ｂ）から、Ｔ細胞に対する癌細胞、又は癌細胞に対するＴ細胞の何れかの比率を判定する工程
を含む、ことを特徴とする請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
基準レベルと比較した、癌細胞のレベル又は量の減少は、癌細胞死滅の増加を示し、又は、基準レベルと比較した、癌細胞のレベル又は量の変化の減少又は実質的な変化が無いことは、癌細胞死滅の減少を示す、ことを特徴とする請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
１対１０以下の有効Ｅ：Ｔ比率は、活性化Ｔ細胞又はその調製物が癌細胞の有能なキラーであることを示し、及び、１対１、１対３、又は１対５の比率は、乏しいＴ細胞を死滅させる活性を示す、ことを特徴とする請求項１５又は１６に記載の方法。
【請求項１８】
有効Ｅ：Ｔ比率は、二重特異性又は多特異性の抗体の複数回用量の用量反応曲線の実験値の数学的なフィッティングから算出される、ことを特徴とする請求項１乃至１７のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１９】
工程（ａ）において、免疫調節剤が混合物に加えられ、ここで、前記免疫調節剤は、免疫チェックポイント阻害剤、Ｔ細胞のアゴニスト、及び免疫調節薬からなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１乃至１８のいずれか１つに記載の方法。
【請求項２０】
免疫チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＣＤ１６０、２Ｂ４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ３（ＣＤ２７６）

、Ｂ７－Ｈ４（ＶＴＣＮ１）、ＨＶＥＭ（ＴＮＦＲＳＦ１４又はＣＤ２７０）、ＢＴＬＡ、ＫＩＲ、ＭＨＣクラスＩ、ＭＨＣクラスＩＩ、ＧＡＬ９、ＶＩＳＴＡ、ＢＴＬＡ、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ１及びＡ２ａＲからなる群から選択される免疫チェックポイントを阻害する、ことを特徴とする請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

活性化Ｔ細胞を含む組成物であって、ここで、前記活性化Ｔ細胞は、１対１０以下の有効Ｅ：Ｔ比率を有し、前記有効Ｅ：Ｔ比率は、標的細胞（Ｔ）に対するエフェクター細胞（Ｅ）の比率であり、エフェクター細胞（Ｅ）は、二重特異性又は多特異性の抗体を有する活性化Ｔ細胞の数として定義され、及び、標的細胞（Ｔ）は前記活性化Ｔ細胞によって死滅させられる癌細胞の数として定義される、組成物。

【請求項２２】

トロゴサイトーシス活性化Ｔ細胞を含む、請求項２１に記載の組成物。

【請求項２３】

活性化Ｔ細胞は、癌細胞表面マーカーの少なくとも１００のコピーを含み、及び検出可能な量の二重特異性又は多特異性の抗体も含む、ことを特徴とする請求項２１又は２２に記載の組成物。

【請求項２４】

活性化Ｔ細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞又はＣＤ４＋Ｔ細胞から選択された細胞傷害性Ｔリンパ球又はヘルパーＴ細胞である、ことを特徴とする請求項２１乃至２３の何れか１つに記載の組成物。

【請求項２５】

組成物又は調製物中の細胞の総数の少なくとも３０％の濃度でトロゴサイトーシスＴ細胞を含む、請求項２２乃至２４の何れか１つに記載の組成物。

【請求項２６】

免疫チェックポイント阻害剤、Ｔ細胞のアゴニスト、及び免疫調節薬からなる群から選択される免疫調節剤を含む、請求項２１乃至２５の何れか１つに記載の組成物。

【請求項２７】

免疫チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＣＤ１６０、２Ｂ４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ３（ＣＤ２７６）、Ｂ７－Ｈ４（ＶＴＣＮ１）、ＨＶＥＭ（ＴＮＦＲＳＦ１４又はＣＤ２７０）、ＢＴＬＡ、ＫＩＲ、ＭＨＣクラスＩ、ＭＨＣクラスＩＩ、ＧＡＬ９、ＶＩＳＴＡ、ＢＴＬＡ、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ１及びＡ２ａＲからなる群から選択される免疫チェックポイントを阻害する、請求項２６に記載の組成物。

【請求項２８】

請求項２１乃至２７のいずれかに記載の組成物及び薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項２９】

被験体における癌を処置するための薬剤の調製のための請求項２８に記載の医薬組成物の使用であって、ここで、癌の処置は養子癌治療からなり、前記被験体は少なくとも１つのＴ細胞を含むサンプルと同じ被験体であり、及び／又は前記被験体は少なくとも１つの癌細胞を含むサンプルと同じ被験体であり、及び／又は前記被験体は少なくとも１つのＴ細胞を含むサンプル及び少なくとも１つの癌細胞を含むサンプルとは異なる被験体である、医薬組成物の使用。

【請求項３０】

癌は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、又は多発性骨髄腫から選択される血液癌である、請求項２９に記載の医薬組成物の使用。

【請求項３１】

治療に対する被験体の反応性を評価するインビトロの方法であって、該方法は、

（ａ）少なくとも１つのＴ細胞を含むサンプル、少なくとも１つの癌細胞を含むサンプル

、二重特異性又は多特異性の抗体、及び治療薬を混合することによってエクスビボの反応混合物を形成し、及び、Ｔ細胞を活性化するのに十分な条件下で、及びそれに十分な期間にわたり前記反応混合物をインキュベートする工程であって、それにより少なくとも１つの活性化Ｔ細胞を産生する、工程、
（ｂ）（ａ）から活性化Ｔ細胞を選択する工程であって、ここで、活性化Ｔ細胞の選択は、有効Ｅ：Ｔ比率を測定することにより判定される癌細胞を死滅させる活性の増加に基づき、ここで、前記有効Ｅ：Ｔ比率は、標的細胞（Ｔ）に対するエフェクター細胞（Ｅ）の比率であり、エフェクター細胞（Ｅ）は活性化Ｔ細胞として定義され、標的細胞（Ｔ）は前記活性化Ｔ細胞によって死滅させられる癌細胞として定義され、及びここで、治療が無い状態での基準値に比べて、前記治療薬の存在下での反応混合物の癌細胞を死滅させる活性の増加は、前記治療薬に対するより高い反応性を示す、工程
を含む、ことを特徴とする方法。
【請求項３２】
工程（ａ）において、エクスビボの反応混合物は、少なくとも１つのＴ細胞が少なくとも１つの癌細胞から細胞表面マーカーを獲得することを可能にするのに十分な条件下で、及びそれに十分な期間にわたりインキュベートされる、ことを特徴とする請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
以下のインビトロの工程、
ｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を増殖する工程、
ｉｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を富化する工程、又は
ｉｉｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を精製する工程
のうち１つ、２つ、又は全てを更に含む、請求項３１又は３２に記載の方法。
【請求項３４】
工程（ｂ）は、工程（ａ）の後に癌細胞のレベルを判定し、及び随意に工程（ａ）の後に活性化Ｔ細胞のレベルを判定する工程を付加的に含む、ことを特徴とする請求項３１乃至３３の何れか１つに記載の方法。
【請求項３５】
二重特異性又は多特異性の抗体は、二重特異性免疫グロブリン（ＢｓＩｇＧ）、付加的な抗原結合分子に作動的に結合される免疫グロブリン、二重特異性抗体（ＢｓＡｂ）フラグメント、二重特異性融合タンパク質、又はＢｓＡｂ抱合体から選択される、ことを特徴とする請求項３１乃至３４の何れか１つに記載の方法。
【請求項３６】
治療薬は、免疫チェックポイント阻害剤の阻害剤、Ｔ細胞のアゴニスト、ＭＤＳＣ及び／又はＴｒｅｇ細胞の阻害剤、レナリドミド、ワクチン、サイトカイン、自己由来Ｔ細胞、アミノ酸異化、腫瘍由来の細胞外ＡＴＰのシグナル伝達、アデノシンシグナル伝達、アデノシン産生、ケモカイン及びケモカイン受容体、異物の認識、或いはキナーゼシグナル伝達活性に関連した構成成分のモジュレーター、又はＩＤＯ、ＣＯＸ２、ＡＲＧ１、ＡｒＧ２、ｉＮＯＳ、或いはホスホジエステラーゼの阻害剤、又はＴＬＲアゴニスト、或いはケモカインアンタゴニストから選択される免疫調節剤あるいは複数の免疫調節剤の組み合わせである、ことを特徴とする請求項３１乃至３５の何れか１つに記載の方法。
【請求項３７】
前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
免疫チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＣＤ１６０、２Ｂ４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ３（ＣＤ２７６）、Ｂ７－Ｈ４（ＶＴＣＮ１）、ＨＶＥＭ（ＴＮＦＲＳＦ１４又はＣＤ２７０）、ＢＴＬＡ、ＫＩＲ、ＭＨＣクラスＩ、ＭＨＣクラスＩＩ、ＧＡＬ９、ＶＩＳＴＡ、ＢＴＬＡ、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ１及びＡ２ａＲからなる群から選択される免疫チェックポイントを阻害する、請求項３７に記載の方法。

【請求項３９】
癌を処置するための薬剤の製造における、請求項１乃至２０の何れかに記載の方法によって獲得可能な活性化Ｔ細胞、或いは請求項２１乃至２７に記載の活性化Ｔ細胞の組成物あるいは前記組成物を含む請求項２８に記載の医薬組成物の使用。
【請求項４０】
癌の前記処置は、
（ａ）少なくとも１つのＴ細胞を含むサンプルと、二重特異性又は多特異性の抗体とを混合することによって、エクスビボの反応混合物を形成し、及び、Ｔ細胞を活性化するのに十分な条件下で、及びそれに十分な期間にわたり反応混合物をインキュベートする工程であって、それにより少なくとも１つの活性化Ｔ細胞を産生する、工程、
（ｂ）（ａ）から活性化Ｔ細胞を選択する工程であって、活性化Ｔ細胞の選択は、有効Ｅ：Ｔ比率を測定することにより判定される、癌細胞を死滅させる活性の増大に基づく、工程、及び
（ｃ）有効な量の活性化Ｔ細胞を被験体に投与する工程
を含む、ことを特徴とする請求項３９に記載の使用。
【請求項４１】
工程（ａ）において、エクスビボの反応混合物は、少なくとも１つのＴ細胞が少なくとも１つの癌細胞から細胞表面マーカーを獲得することを可能にするのに十分な条件下で、及びそれに十分な期間にわたりインキュベートされる、ことを特徴とする請求項４０に記載の使用。
【請求項４２】
以下のインビトロの工程、
ｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を増殖する工程、
ｉｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を富化する工程、又は
ｉｉｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を精製する工程
のうち１つ、２つ、又は全てを更に含む、請求項４０又は４１に記載の使用。
【請求項４３】
第２の治療薬又は処置を施す工程を更に含む、請求項４０乃至４２の何れか１つに記載の使用。
【請求項４４】
第２の治療薬又は処置は、化学療法、標的とされた抗癌治療、腫瘍崩壊薬物、細胞傷害性薬剤、免疫ベースの治療、サイトカイン、外科的処置、放射線処置、Ｔ細胞のアゴニスト、免疫チェックポイント阻害剤の阻害剤、免疫調節剤或いは複数の免疫調節剤の組み合わせ、ワクチン、又は細胞免疫療法のうち少なくとも１つから選択される、ことを特徴とする請求項４３に記載の使用。
【請求項４５】
前記免疫調節剤は免疫チェックポイント阻害剤である、請求項４４に記載の使用。
【請求項４６】
免疫チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＣＤ１６０、２Ｂ４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ３（ＣＤ２７６）、Ｂ７－Ｈ４（ＶＴＣＮ１）、ＨＶＥＭ（ＴＮＦＲＳＦ１４又はＣＤ２７０）、ＢＴＬＡ、ＫＩＲ、ＭＨＣクラスＩ、ＭＨＣクラスＩＩ、ＧＡＬ９、ＶＩＳＴＡ、ＢＴＬＡ、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ１及びＡ２ａＲからなる群から選択される免疫チェックポイントを阻害する、請求項４５に記載の使用。
【請求項４７】
活性化Ｔ細胞を生成する被験体の能力を評価するインビトロの方法であって、該方法は、
（ａ）少なくとも１つのＴ細胞を含むサンプル、少なくとも１つの癌細胞を含むサンプル、及び二重特異性又は多特異性の抗体を混合することによってエクスビボの反応混合物を形成し、及び、Ｔ細胞を活性化するのに十分な条件下で、及びそれに十分な期間にわたり反応混合物をインキュベートする工程であって、それにより少なくとも１つの活性化Ｔ細

胞を産生する、工程、
（ｂ）（ａ）から活性化Ｔ細胞を選択する工程であって、ここで、活性化Ｔ細胞の選択は、有効Ｅ：Ｔ比率を測定することにより判定される、癌細胞を死滅させる活性の増大に基づき、前記有効Ｅ：Ｔ比率は、標的細胞（Ｔ）に対するエフェクター細胞（Ｅ）の比率であり、エフェクター細胞（Ｅ）は活性化Ｔ細胞として定義され、及び標的細胞（Ｔ）は前記活性化Ｔ細胞によって死滅させられる癌細胞として定義される、工程、及び
（ｃ）エクスビボの反応混合物中の高い有効Ｅ：Ｔ比率を持つ活性化Ｔ細胞のレベルを定量化する工程であって、Ｔ細胞、癌細胞、或いは二重特異性又は多特異性の抗体の無い状態でのエクスビボの反応混合物中に生成される、活性化Ｔ細胞の基準レベルと比較したエクスビボの反応混合物中の高い有効Ｅ：Ｔ比率を持つ活性化Ｔ細胞のレベルの上昇は、被験体が高い有効Ｅ：Ｔ比率を持つ活性化Ｔ細胞を生成することができ、且つ請求項３９乃至４６の何れかの方法に反応すると識別されることを示し、エクスビボの反応混合物中の高い有効Ｅ：Ｔ比率を持つ低いレベルの活性化Ｔ細胞は、被験体が活性化Ｔ細胞を生成することがほとんどできず、且つ請求項３９乃至４６の何れかの方法に反応しないと識別されることを示す、工程
を含む、ことを特徴とする方法。
【請求項４８】
工程（ａ）において、エクスビボの反応混合物は、少なくとも１つのＴ細胞が少なくとも１つの癌細胞から細胞表面マーカーを獲得することを可能にするのに十分な条件下で、及びそれに十分な期間にわたりインキュベートされる、ことを特徴とする請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
以下のインビトロの工程、
ｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を増殖する工程、
ｉｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を富化する工程、又は
ｉｉｉ）（ｂ）からの活性化Ｔ細胞を精製する工程
のうち１つ、２つ、又は全てを更に含む、請求項４７又は４８に記載の方法。
【請求項５０】
癌細胞は、血液癌、固形癌、転移癌、循環腫瘍細胞、又はそれらの組み合わせから選択される細胞である、ことを特徴とする請求項４７乃至４９の何れか１つに記載の方法。
【請求項５１】
Ｔ細胞は、末梢血サンプル、骨髄サンプル、リンパ節サンプル、ＣＴＬ及び／又はＴＩＬを含む腫瘍サンプル、又はそれらの組み合わせから選択される細胞である、ことを特徴とする請求項４７乃至５０の何れか１つに記載の方法。
【請求項５２】
Ｔ細胞は、ＣＤ８及び／又はＣＤ２５を発現し、及び／又は、ＣＤ４及び／又はＣＤ２５を発現する、ことを特徴とする請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
活性化Ｔ細胞上の腫瘍抗原の存在が検出される、ことを特徴とする請求項４７乃至５２の何れか１つに記載の方法。
【請求項５４】
エクスビボの反応混合物中の活性化Ｔ細胞のレベルの上昇は、被験体が活性化Ｔ細胞を生成することができることを示す、ことを特徴とする請求項４７乃至５３の何れか１つに記載の方法。
【請求項５５】
活性化Ｔ細胞はトロゴサイトーシス活性化Ｔ細胞を含む、ことを特徴とする請求項４７乃至５４の何れか１つに記載の方法。
【請求項５６】
エクスビボの反応混合物の存在下での癌細胞死滅のレベルの上昇は、反応混合物中の活性化Ｔ細胞の活性を示す、ことを特徴とする請求項４７乃至５５の何れか１つに記載の方法。

【請求項５７】
インビボで癌細胞を死滅させる際の、活性化Ｔ細胞又はその調製物の有効性を識別するインビトロの方法であって、該方法は、
（ａ）癌細胞に特異的な活性化Ｔ細胞の集団を提供する工程、及び
（ｂ）有効Ｅ：Ｔ比率のパラメータを判定する工程
を含む、ことを特徴とする方法。
【請求項５８】
活性化Ｔ細胞又はその調製物の効力を評価するインビトロの方法であって、該方法は：
（ａ）活性化Ｔ細胞が癌細胞を死滅させることを可能にするのに十分な条件下で、及びそれに十分な期間にわたり、請求項１－２０に記載の方法に従って獲得可能な少なくとも１つの活性化Ｔ細胞又はその調製物を、少なくとも１つの癌細胞を含むサンプルと接触させる工程であって、前記癌細胞が活性化Ｔ細胞又はその調製物と同じ被験体に由来する、工程、
（ｂ）工程（ａ）の後に癌細胞のレベルを判定し、及び随意に工程（ａ）の後に活性化Ｔ細胞のレベルを判定する工程、及び
（ｃ）工程（ｂ）から、Ｔ細胞に対する癌細胞、又は癌細胞に対するＴ細胞の何れかの有効Ｅ：Ｔ比率を判定する工程
を含み、
ここで、癌細胞のレベル又は量の減少は癌細胞死滅の増加を示し、癌細胞のレベル又は量の実質的な変化が無いことは癌細胞死滅の減少を示す、ことを特徴とする方法。
【請求項５９】
接触させる工程は、用量反応曲線を生成するために投与量を増大させて二重特異性又は多特異性の抗体を追加することを更に含む、ことを特徴とする請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
１対１０以下の有効Ｅ：Ｔ比率は強力な癌細胞を死滅させる活性を示す、ことを特徴とする請求項５８又は５９に記載の方法。
【請求項６１】
Ｔ細胞が強力な癌細胞を死滅させる活性を持つ場合、被験体は二重特異性又は多特異性の抗体に対して強く反応すると識別される、ことを特徴とする請求項５８乃至６０の何れか１つに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明はエクスビボのＢＩＴＥ活性化Ｔ細胞に関する。
【背景技術】
【０００２】
養子細胞療法（ＡＣＴ）は、患者からの免疫細胞の収集、細胞の増殖、及び同じ又は異なる患者への細胞の再導入を含む、プロセスである。例えば、ドナー由来のエクスビボの増殖されたヒト細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）のＡＣＴは、癌を処置するための有望な方法として現れたものである。ＡＣＴの例は、培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、単離され且つ増殖されたＴ細胞クローン、及び、従来のＴ細胞受容体又はキメラ抗原受容体を発現する遺伝子工学的に操作されたリンパ球（例えば、Ｔ細胞）を含んでいる。遺伝子工学的に操作されたリンパ球は、特異性抗原を発現する癌細胞を排除するように設計されており、患者へと増殖且つ送達される。ＡＣＴの別の例は、癌ワクチンの投与後の、患者の血液からのＴ細胞の単離及びその使用である。ＡＣＴは、患者における腫瘍細胞の減少へとつながる、腫瘍特異的リンパ球（例えば、Ｔ細胞）を提供することができる。
【０００３】
しかし、ＡＣＴの制限は、例えば、Ｔ細胞のオフターゲット活性化、及び／又は非癌組織を標的としそうにない抗原を選択することに関する懸念を含み得る。有効な治療を提供するためにＴ細胞の適切な亜群（例えばＣＴＬ）を選択しつつ、副作用を最小限にする方法

の必要性が依然として残っている。
【発明の概要】
【０００４】
本開示は、少なくとも部分的に、病変組織（例えば癌）を選択的且つ効果的に標的とする、活性化免疫エフェクター細胞（例えば活性化Ｔ細胞）を生成するための最適化されたアプローチを特徴とする。
【０００５】
１つの実施形態において、活性化免疫細胞（例えば活性化Ｔ細胞）は、標的細胞、例えば癌細胞の死滅を誘導する。活性化Ｔ細胞は通常、本明細書において「癌を死滅させるＴ細胞」として称されており、この用語は、エフェクターメモリーＴ細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、ヘルパーＴ細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、及びトロゴサイトーシスＴ細胞（ｔｒｏｇｏｃｙｔｏｔｉｃ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ）を含むがこれらに限定されない、活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞を含んでいる。本開示は、少なくとも部分的に、標的細胞を死滅させる活性の用語の非常に有効な免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞）の生成及び識別が、例えば標的（例えば癌）細胞と免疫エフェクター細胞との近接の最適化によって増強され得るという驚くべき発見に基づいている。
【０００６】
本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は、多様な癌型、例えば固形癌、血液癌、及びそれらの転移形態に非常に有効な治療を提供することができる。本明細書に開示される癌を死滅させるＴ細胞を使用する治療はまた、被験体に強い免疫応答を典型的には誘発しない癌、例えば黒色腫以外の癌を処置するのに適している。実施形態において、本明細書に開示される癌治療は、例えば、被験体の癌を選択的且つ効果的に標的とする、癌を死滅させるＴ細胞（例えば自己由来の癌を死滅させるＴ細胞）を生成することによって、与えられた被験体に合わせる又は個別化することができる。
【０００７】
従って、本明細書には、標的細胞を死滅させる活性を増強した免疫エフェクター細胞（例えば癌を死滅させるＴ細胞）を生成する方法；そのような免疫細胞を含む組成物；細胞を使用する方法（例えば処置方法）；例えば標的細胞と免疫細胞、例えばＴ細胞との近接、例えば空間的近接を増強することによって、標的細胞を死滅させる活性を増強させるのび最適な薬剤を選択する方法；最適化された（例えば、最高の活性分画／クローン）免疫細胞、例えばＴ細胞を選択する方法；及び他の癌治療に対する患者の反応性を評価するためにこの方法を使用する方法が提供される。
【０００８】
癌を死滅させるＴ細胞を産生する方法
１つの態様において、本明細書には、癌を死滅させるＴ細胞を産生する（例えば、作成／提供する）方法が提供される。前記方法は、
（ａ）癌（例えば、血液癌、固形癌、転移癌、又はそれらの組み合わせ）を持つ被験体のＴ細胞を提供する工程；
（ｂ）例えば被験体から癌細胞を提供する工程；
（ｃ）例えばＴ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得することを可能にすることによって、例えば、Ｔ細胞を活性化するのに十分な条件（例えば一定期間にわたる）の下で、Ｔ細胞、癌細胞、及び近接免疫コーチング因子（ｐｒｏｘｉｍｉｔｙ　ｉｍｍｕｎｏ－ｃｏａｃｈｉｎｇ　ｆａｃｔｏｒ）（ｐＩＣＦ）を含むエクスビボの反応混合物を形成する工程
を含む。幾つかの実施形態において、活性化Ｔ細胞は、癌細胞から細胞表面マーカーを獲得し、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞になる。
【０００９】
幾つかの実施形態において、癌細胞とＴ細胞は、サンプル、例えば癌を持つ被験体のサンプルに存在する。１つの実施形態において、癌細胞とＴ細胞は、同じサンプル、例えば単一のサンプル（例えば本明細書に記載されるようなサンプル）に存在する。他の実施形態

において、癌細胞とＴ細胞は、例えば癌を持つ被験体の異なるサンプル、例えば１つ以上のサンプル（例えば、本明細書に記載されるような１つ以上のサンプル）に存在する。
【００１０】
実施形態において、（例えば産生する）方法の工程（ａ）及び工程（ｂ）は、癌細胞とＴ細胞の両方を含む１つのサンプルを提供する工程を含む。
【００１１】
実施形態において、（例えば産生する）方法の工程（ａ）及び工程（ｂ）は、２つのサンプルする工程を含み、２つのサンプルのうち一方は癌細胞を含み、他方はＴ細胞を含む。
【００１２】
実施形態において、前記方法は更に、以下のうち１つ、２つ、３つ、又は全てを含む：
ｉ）（ｃ）からの癌を死滅させるＴ細胞を増殖する工程；
ｉｉ）（ｃ）からの癌を死滅させるＴ細胞を選択する工程；
ｉｉｉ）（ｃ）からの癌を死滅させるＴ細胞を富化する工程；又は
ｉｖ）（ｃ）からの癌を死滅させるＴ細胞を精製する工程。
【００１３】
別の態様において、本明細書には、癌を死滅させるＴ細胞を産生する（例えば、作成／提供する）方法も提供される。前記方法は、
（ａ）癌（例えば、血液癌、固形癌、転移癌、又はそれらの組み合わせ）を持つ被験体からの癌細胞及びＴ細胞を含むサンプル（「癌及びＴ細胞サンプル」）を提供する工程；
（ｂ）例えばＴ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得することを可能にすることによって、例えばＴ細胞を活性化するのに十分な条件（例えば一定期間にわたる）の下で、サンプルを近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）と接触させる工程（実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞を産生するエクスビボの反応混合物を形成する工程）；
（ｃ）癌を死滅させるＴ細胞、例えば活性化Ｔ細胞（例えば、癌細胞から細胞表面マーカーを獲得したＴ細胞）を富化する工程
を含む。
【００１４】
また別の態様において、本明細書には、癌を死滅させるＴ細胞を産生する（例えば、作成／提供する）方法も特徴付けられている。前記方法は、
（ａ）例えば癌を持つ被験体から、癌サンプル、例えば癌細胞（例えば、血液癌、固形癌、転移癌（例えば循環腫瘍細胞（ＣＴＣ））、又はそれらの組み合わせ）を含むサンプルを提供する工程；
（ｂ）例えば癌を持つ被験体から、Ｔ細胞サンプル、例えばＴ細胞（例えば、血液サンプル（例えば末梢血サンプル）、骨髄サンプル、リンパ節サンプル、脾臓サンプル、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）及び／又は腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を含む腫瘍サンプル、又はそれらの組み合わせ）を含むサンプルを提供する工程；
（ｃ）例えばＴ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得することを可能にするために、例えばＴ細胞を活性化するのに十分な条件（例えば一定期間にわたる）の下で、工程（ａ）のサンプルを工程（ｂ）のサンプル及び近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）と接触させる工程（実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞を産生するエクスビボの反応混合物を形成する工程）；
及び（ｄ）癌を死滅させるＴ細胞、例えば活性化Ｔ細胞（例えば、癌細胞から細胞表面マーカーを獲得したＴ細胞）を富化する工程
を含む。
【００１５】
本明細書に開示される方法及び組成物のうち何れかの幾つかの実施形態において、サンプルは、血液癌、固形癌、転移癌（例えばＣＴＣ、一次、二次、或いは付加的な転移癌）、又はそれらの組み合わせから選択された癌サンプルである。
【００１６】
本明細書に開示される方法及び組成物のうち何れかの別の実施形態において、サンプルは

、血液サンプル（例えば末梢血サンプル）、骨髄サンプル、リンパ節サンプル、脾臓サンプル、ＣＴＬを含む腫瘍サンプル、ＴＩＬ、又はそれらの組み合わせから選択されるＴ細胞サンプルである。

【００１７】

本明細書に開示される方法及び組成物のうち何れかの実施形態において、成分（例えば細胞）は実質的にサンプルから除去又は単離されていない。

【００１８】

本明細書に開示される方法及び組成物のうち何れかの実施形態において、サンプルは、起源の組織からの微小環境を実質的に維持、例えば、腫瘍又は免疫の微小環境の構造を実質的に維持する。

【００１９】

本明細書に開示される方法及び組成物のうち何れかの実施形態において、サンプルは腫瘍抗原特異性Ｔ細胞（例えばＣＴＬ又はＴＩＬ）を含む。理論に縛られることなく、腫瘍抗原特異性Ｔ細胞は、例えば腫瘍内微小環境に存在する時に免疫抑制され得る。１つの実施形態において、免疫抑制された腫瘍抗原特異性Ｔ細胞は、本明細書に記載される条件下、例えば、癌細胞とｐＩＣＦとの接触時に活性化される。

【００２０】

本明細書に開示される方法及び組成物のうち何れかの幾つかの実施形態において、サンプル（複数可）は癌細胞とＴ細胞を含む。例えば、サンプルは、Ｔ細胞（例えば腫瘍抗原特異性ＣＴＬ）を含む血液癌（例えば、骨髄、リンパ節由来の癌）に由来してもよい。血液サンプルはまた、癌細胞、例えば白血病又はリンパ腫芽細胞（例えばＣＤ１９、ＣＤ１２３、ＣＤ２０、又はその他から選択された１つ以上のマーカーを発現する芽細胞）を含み得る。実施形態において、サンプルへのｐＩＣＦの追加は、Ｔ細胞と、Ｔ細胞を活性化する（例えば、腫瘍抗原特異性ＣＴＬを活性化する）癌細胞との相互作用を促進する。幾つかの実施形態において、活性化Ｔ細胞は、癌細胞から細胞表面マーカーを獲得し、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞になる。

【００２１】

本明細書に開示される方法及び組成物のうち何れかの他の実施形態において、癌は固形腫瘍である。サンプルは、本明細書に記載されるような腫瘍抗原特異性Ｔ細胞（例えばＣＴＬ又はＴＩＬ）及び癌細胞を含み得る。実施形態において、サンプルへのｐＩＣＦの追加は、Ｔ細胞と、Ｔ細胞を活性化する（例えば、腫瘍抗原特異的ＣＴＬ又はＴＩＬを活性化する）癌細胞との相互作用を促進する。幾つかの実施形態において、活性化Ｔ細胞は、癌細胞から細胞表面マーカーを獲得し、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞になる。

【００２２】

本明細書に開示される方法及び組成物のうち何れかの他の実施形態において、サンプルは、転移性のサンプル、例えば転移癌を持つ被験体由来のサンプルを含む。１つの実施形態において、転移性サンプルはＣＴＣを含む。実施形態において、ＣＴＣは、癌、例えば固形腫瘍を持つ被験体の末梢血に見出される腫瘍細胞である。エクスビボの反応混合物は、転移癌細胞及びＴ細胞を含んで形成され得る。実施形態において、Ｔ細胞は、転移癌サンプル（例えば、一次腫瘍サンプル、二次腫瘍サンプル、或いはそれらの組み合わせ）から得ることができる。幾つかの実施形態において、エクスビボの反応混合物は、転移性サンプルを標的とする（例えば、ＣＴＣ、一次腫瘍サンプル、二次腫瘍サンプル、又はそれらの組み合わせを標的とする）腫瘍抗原特異性Ｔ細胞（例えばＣＴＬ又はＴＩＬ）を含む。実施形態において、腫瘍抗原特異性Ｔ細胞は、ｐＩＣＦ及び転移性サンプル（例えばＣＴＣ、一次腫瘍サンプル、二次腫瘍サンプル、又はそれらの組み合わせ）の存在下で活性化される。例えば、転移癌において、腫瘍増殖は、例えば本明細書で二次腫瘍と称される、一次腫瘍部位とは異なる組織に生じ得る。一次腫瘍からの癌細胞は、二次又は他の転移部位とは異なり得る。例えば、骨髄腫瘍浸潤が固形腫瘍に生じ得る。別の例として、骨髄で増殖し得る固形癌、例えば膵臓癌又は乳癌からの転移性腫瘍細胞は、一次腫瘍における腫瘍細胞とは生物学的に異なる。そのような実施形態において、ｐＩＣＦの存在下でのＴ細

胞の活性化は、被験体における腫瘍細胞によって影響を受けた全ての組織において繰り返され得る。そのような実施形態において、活性化Ｔ細胞（例えば活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞）は、被験体に存在する一次及び二次腫瘍に対して選択的であり得る。

【００２３】

１つの実施形態において、サンプルはＣＴＣを含む。エクスビボの反応混合物は、被験体に存在する一次及び二次腫瘍からのサンプルを含むＣＴＣ含有サンプルで形成することができ、それにより、被験体に存在するＣＴＣ、一次及び二次腫瘍に対して選択的な活性化Ｔ細胞（例えば活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞）を産生する。

【００２４】

組成物と反応混合物

本明細書の目的のために、用語「組成物」は癌を死滅させるＴ細胞を含んでおり、この用語は、エフェクターメモリーＴ細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、ヘルパーＴ細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、及びトロゴサイトーシスＴ細胞を含むがこれらに限定されない活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞、並びにそれらの医薬組成物を含んでいる。

【００２５】

一態様において、本明細書では、Ｔ細胞、癌細胞、及び近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）を含むエクスビボの反応混合物も特徴付けられており、Ｔ細胞と癌細胞は、サンプル、例えば血液サンプル（例えば全血、末梢血）；血液癌のサンプル；骨骨髄のサンプル、リンパ節のサンプル；又は脾臓のサンプル、固形腫瘍のサンプル；転移癌（例えばＣＴＣ）のサンプルに存在し；成分（例えば細胞）はサンプルから実質的に除去又は単離されていない。

【００２６】

実施形態において、サンプルは、癌（例えば血液癌、固形癌、転移癌）を持つ被験体由来である。

【００２７】

実施形態において、サンプルは、微小環境を実質的に維持、例えば、腫瘍内微小環境の構造を実質的に維持する。

【００２８】

実施形態において、サンプルは腫瘍抗原特異性Ｔ細胞（例えばＣＴＬ又はＴＩＬ）を含む。理論に縛られることなく、腫瘍抗原特異性Ｔ細胞は、例えば腫瘍内微小環境に存在する時に免疫抑制され得る。１つの実施形態において、免疫抑制された腫瘍抗原特異性Ｔ細胞は、本明細書に記載される条件下、例えば、癌細胞とｐＩＣＦとの接触時に活性化され得る。

【００２９】

別の態様において、本明細書には、組成物、例えば、本明細書に記載される方法によって産生される癌を死滅させる細胞、及び薬学的に許容可能な担体、例えばＧＭＰ許容可能な担体を含む組成物が提供される。

【００３０】

また別の態様において、本開示は、組成物（例えば精製された調製物）を特徴とする。

前記組成物は、

（１）癌を死滅させる細胞：（ｉ）癌細胞に対する細胞傷害性活性を有し、且つ（ｉｉ）例えば１つ以上の細胞表面マーカーの細胞表面マーカーの９０－５００のコピー（例えば、少なくとも９０、１００、２００、３００、４００、又は５００のコピー）の量で癌細胞由来の細胞表面マーカーを含む；及び

（随意に）（２）近接免疫コーチング因子、例えば検知可能な量（例えば微量）のｐＩＣＦを含む。

【００３１】

実施形態において、組成物は更に、薬学的に許容可能な担体、例えばＧＭＰ許容可能な担体を含む。

【００３２】

１つの実施形態において、反応混合物中のＴ細胞の合計のうち約２～７５％（例えば、約２～７０％、２～６０％、２～５０％、又は２～４０％）は、１つ以上の癌細胞表面マーカー（例えば１つ以上の白血病細胞癌）を発現する。

【００３３】

実施形態において、癌を死滅させる細胞は富化又は精製される。幾つかの実施形態において、富化又は精製された癌を死滅させる細胞の集団は、少なくとも８０％、９０％、９５％、９９％、又は１００％の癌を死滅させる細胞を含み、癌を死滅させる細胞は１つ以上の癌細胞表面マーカーを含む。

【００３４】

処置方法

別の態様において、本開示は、癌（例えば、本明細書に記載されるような血液癌、固形癌、又は転移癌）を持つ被験体を処置する方法を特徴とする。前記方法は、本明細書に記載される方法によって作られた癌を死滅させるＴ細胞を含む調製物を提供する工程；及び調製物を被験体に投与する工程を含む。

【００３５】

また別の態様において、本開示は、癌（例えば、本明細書に記載されるような血液癌、固形癌、又は転移癌）を持つ被験体を処置する方法を提供する。

前記方法は、

（ａ）被験体からのサンプルを提供する工程であって、該サンプルはＴ細胞及び癌細胞（例えば本明細書に記載されるようなサンプル）を含む、工程；

（ｂ）癌を死滅させるＴ細胞が（例えば一定期間にわたり）産生されるような条件下で、サンプルを近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）と接触させる工程；

（ｃ）（随意に）癌細胞から細胞表面マーカーを獲得した、癌を死滅させるＴ細胞を富化、又は増殖する工程；

（ｄ）被験体に癌を死滅させるＴ細胞を投与する工程であって、それにより被験体を処置する、工程

を含む。

【００３６】

また別の態様において、本明細書には、癌（例えば、血液癌、固形癌、又は転移癌）を持つ被験体を処置する方法が提供され、該方法は：

（ａ）例えば被験体から、本明細書に記載されるような癌サンプルを提供する工程；

（ｂ）例えば被験体から、本明細書に記載されるようなＴ細胞サンプルを提供する工程；

（ｃ）癌を死滅させるＴ細胞が（例えば一定期間にわたり）産生されるような条件下で、癌サンプルをＴ細胞サンプル及び近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）と接触させる工程；

（ｄ）（随意に）癌細胞から細胞表面マーカーを獲得した、癌を死滅させるＴ細胞を富化、又は増殖する工程；

（ｅ）被験体に癌を死滅させるＴ細胞を投与する工程であって、それにより被験体を処置する、工程

を含む。

【００３７】

幾つかの実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞は、実質的な増殖無しに投与される。他の実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞は、細胞増殖の後、例えば個々の細胞の増殖後に投与される。

【００３８】

前述の方法の何れかの幾つかの実施形態において、被験体に投与される、例えばサンプル中の活性化（例えば癌を死滅させる）Ｔ細胞の数は、少なくとも５－１０，０００（例えば、５、１０、１００、１０００、１０，０００、又はそれ以上）である。

【００３９】

被験体を評価するためのアッセイ及び方法

別の態様において、本明細書には、癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ

細胞を含む活性化Ｔ細胞）を生成する被験体の能力を評価するための方法又はアッセイが提供される。該方法又はアッセイは：
（ａ）癌を持つ被験体のＴ細胞（例えば、本明細書に記載されるようなＴ細胞）を提供する工程；
（ｂ）被験体から癌細胞（例えば、本明細書に記載されるような癌細胞）を提供する工程；
（ｃ）Ｔ細胞を活性化する、例えばＴ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得するのに十分な、例えば一定期間にわたる条件の下で、例えばエクスビボの反応混合物が形成される、Ｔ細胞、癌細胞、及びｐＩＣＦを含む、エクスビボの反応混合物を形成する工程であって、それにより癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）を形成する、工程；
（ｄ）エクスビボ反応混合物中の癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）を随意に識別する工程；及び
（ｅ）エクスビボ反応混合物中の癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）のレベル又は活性を判定、例えば定量化する工程
を含む。

【００４０】

別の態様において、本発明は、被験体を評価する方法、例えば、治療、例えば免疫調節剤及び／又は癌治療薬に反応する被験体を識別又は選択する方法を特徴とし、該方法は：
（ａ）癌を持つ被験体のＴ細胞（例えば、本明細書に記載されるようなＴ細胞又はＴ細胞サンプル）を提供する工程；
（ｂ）被験体から癌細胞（例えば、本明細書に記載されるような癌細胞又は癌細胞サンプル）を提供する工程；
（ｃ）Ｔ細胞、癌細胞、及び免疫調節剤及び／又は癌治療薬を含むエクスビボ反応混合物を形成する工程；
（ｄ）工程（ｃ）の反応混合物の細胞を死滅させる活性を判定する工程であって、基準値（例えば治療が無い状態）に対する治療の存在下での反応混合物の細胞を死滅させる活性の増加は、治療に対するより高い反応性を示す、工程
を含む。

【００４１】

実施形態において、工程（ｃ）は、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物と標的細胞、例えば癌細胞とのエクスビボ混合物を形成する工程を含む。実施形態において、癌細胞は、血液癌、固形癌、転移癌、ＣＴＣ、又はそれらの組み合わせから選択された細胞である。実施形態において、癌細胞は、白血病又はリンパ腫芽細胞（例えばＣＤ１９、ＣＤ１２３、ＣＤ２０、又はその他から選択された１つ以上のマーカーを発現する芽細胞）である。実施形態において、Ｔ細胞は、血液サンプル（例えば末梢血サンプル）、骨髄サンプル、リンパ節サンプル、ＣＴＬ及び／又はＴＩＬを含む腫瘍サンプル、又はそれらの組み合わせから選択される細胞である。実施形態において、Ｔ細胞はＣＤ８及び／又はＣＤ２５を発現する（例えば、それはＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞である）。実施形態において、Ｔ細胞はＣＤ４及び／又はＣＤ２５を発現する（例えば、それはＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞である）。

【００４２】

実施形態において、工程（ｅ）は、自動化プラットフォーム、例えば、自動化フローサイトメトリーの蛍光ベースのプラットフォーム、例えば本明細書に記載されるＥｘｖｉＴｅｃｈプラットフォームを使用して実行される。そのような実施形態において、検知可能に（蛍光）標識された癌を死滅させるＴ細胞のレベルが評価される。

【００４３】

１つの実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞上の腫瘍抗原のレベル及び／又は存在が検出される（例えば、トロゴサイトーシスＴ細胞の数又は活性が検出される）。

【００４４】

実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞のレベルは、ＣＴＬ又はＴＩＬの数又は活性の

検出により判定される。他の実施形態において、ＣＤ８及び／又はＣＤ２５を発現するＴ細胞（例えば、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞）の数又は活性が検出される。他の実施形態において、ＣＤ４及び／又はＣＤ２５を発現するＴ細胞（例えば、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞）の数又は活性が検出される。

【００４５】

実施形態において、（例えば、基準レベルと比較して）エクスビボ反応混合物中の癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）のレベルの上昇は、被験体が癌を死滅させるＴ細胞を産生することが可能である（例えば、そのより高い産生者である）ことを示す。実施形態において、前記被験体は、本明細書に開示される方法及び組成物におそらく反応すると識別される。

【００４６】

他の実施形態において、（例えば、各サンプル中の標的に対する特異的エフェクターの比率に依存した基準レベルと比較して）エクスビボ反応混合物中の癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）のレベルの低さは、被験体が癌を死滅させるＴ細胞を産生することができないことを示す。実施形態において、前記被験体は、本明細書に開示される方法及び組成物におそらく反応しないと識別される。

【００４７】

実施形態において、方法又はアッセイは更に、癌を死滅させるＴ細胞を生成する能力に基づいて被験体を識別又は選択する工程、例えば、癌を死滅させるＴ細胞の産生が多い又は少ない被験体を識別する工程を含む。

【００４８】

実施形態において、基準レベルは、Ｔ細胞、癌細胞、又はｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤のうち１つ以上が無い状態の、同様のエクスビボ反応混合物中で生成された活性化Ｔ細胞（例えば、癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞））の数又は活性を含む。１つの実施形態において、基準レベルは、癌を死滅させるＴ細胞上の腫瘍抗原のレベル及び／又は存在の検出により判定される。他の実施形態において、基準レベルは、ＣＴＬ又はＴＩＬの数又は活性の検出により判定される。１つの実施形態において、基準レベルは、ＣＤ８及び／又はＣＤ２５を発現するＴ細胞（例えば、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞）の数又は活性を含む。１つの実施形態において、基準レベルは、ＣＤ４及び／又はＣＤ２５を発現するＴ細胞（例えば、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞）の数又は活性を含む。

【００４９】

他の実施形態において、エクスビボ反応混合物中で産生される癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）の活性が、評価される。幾つかの実施形態において、工程（ｃ）からのエクスビボ反応混合物は、癌細胞死滅が生じるような条件下で、癌細胞（例えば、ＣＤ１９、ＣＤ１２３、ＣＤ２０、又はその他から選択される１以上のマーカーを発現する芽細胞）の存在下でインキュベートされる。エクスビボ反応混合物の存在下での癌細胞死滅のレベル又は量の検出は、反応混合物中の癌を死滅させるＴ細胞の活性を示す。実施形態において、例えば基準レベルに対する、癌細胞のレベル又は量の減少は、癌細胞死滅の増加を示す。他の実施形態において、例えば基準レベルに対する、癌細胞のレベル又は量における小さな変化又は実質的に変化が無いことは、癌細胞死滅の減少を示す。

【００５０】

実施形態において、前記方法は更に、被験体、例えば本明細書に記載されるような癌を持つ被験体に、癌を死滅させるＴ細胞を投与する工程を含む。

実施形態において、被験体は、本明細書に開示される方法及び組成物におそらく反応する、例えば、（例えば、基準レベルと比較して）反応混合物中により多くの数の癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）を示すと識別される。

【００５１】

Ｅ：Ｔ比率を評価するためのアッセイ及び方法

別の態様において、本明細書には、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物の効力を評価するための方法又はアッセイが提供される。該方法又はアッセイは：

（ａ）例えば被験体（例えば本明細書に記載されるような癌を持つ被験体）から、例えば本明細書に記載される方法に従い産生される癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物を提供する工程；
（ｂ）標的細胞（例えば癌細胞）を提供する工程であって、例えば癌細胞は被験体由来である、工程；
（ｃ）癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞を死滅させることを可能にするのに十分な（例えば一定期間にわたる）条件下で、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物を標的細胞（例えば癌細胞）と接触させる工程（実施形態において、接触させる工程は更に、例えば異なる容量（例えば投与量を増大）で、本明細書に記載されるようなｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の追加を含む）；
（ｄ）（例えば、ｐＩＣＦ又は免疫調節剤を追加しないサンプル、例えばｐＩＣＦを追加しない同じ被験体からのサンプルに比べて）工程（ｃ）の後に排除される標的細胞のレベル、例えば数を判定し、及び（例えば、ｐＩＣＦを追加しないサンプル、例えばｐＩＣＦ又は免疫調節剤を追加しない同じ被験体からのサンプルに比べて）工程（ｃ）の後に産生される癌を死滅させるＴ細胞（例えば新たに生成された細胞）のレベル、例えば数を（随意に）判定する工程（実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞のレベル、例えば数は、工程（ｃ）の後に１つ以上の時間間隔で判定される）；及び
（随意に）（ｅ）工程（ｄ）から、癌を死滅させるＴ細胞に対する標的細胞の比率、或いは標的細胞に対する癌を死滅させるＴ細胞の比率の何れかを判定する工程
を含む。

【００５２】
また別の態様において、本明細書には、候補となるｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤を評価するための方法又はアッセイが提供される。前記方法は、
（ａ）例えば被験体（例えば本明細書に記載されるような癌を持つ被験体）から、例えば本明細書に記載される方法に従い産生される癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物を提供する工程；
（ｂ）標的細胞（例えば癌細胞）を提供する工程であって、例えば癌細胞は被験体由来である、工程；
（ｃ）癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞を死滅させることを可能にするのに十分な条件（例えば、一定期間にわたる、及び／又は、予め定められた濃度の候補となるｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の存在下）の下で、候補となるｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤（例えば１つ以上の候補となるｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤）を、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物及び標的細胞（例えば癌細胞）と接触させる工程；
（ｄ）（例えば、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤を追加しない別のサンプルに比べて）工程（ｃ）の後に排除される標的細胞のレベル、例えば数を判定し、及び、（例えば、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤を追加しない別のサンプルに比べて）工程（ｃ）の後に新たに生成された癌を死滅させるＴ細胞のレベル、例えば数を判定する工程（実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞の数は、工程（ｃ）の後に、１つ以上の時間間隔で、及び１つ以上の濃度の候補となるｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤で、判定される）；及び
（随意に）（ｅ）工程（ｄ）から、癌を死滅させるＴ細胞に対する標的細胞の比率、或いは標的細胞に対する癌を死滅させるＴ細胞の比率の何れかを判定する工程を含む。

【００５３】
前述の方法又はアッセイの何れかの幾つかの実施形態において、基礎Ｅ：Ｔ比率が得られる。１つの実施形態において、基礎Ｅ：Ｔは、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の暴露の前の癌細胞に対する細胞障害性Ｔ細胞の比率である。

【００５４】
前述の方法又はアッセイの何れかの幾つかの実施形態において、有効Ｅ：Ｔ比率が得られる。１つの実施形態において、有効Ｅ：Ｔ比率は、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の暴露の後の、死滅された癌細胞に対する生成された癌を死滅させるＴ細胞の比率である。

【００５５】
前述の方法又はアッセイの何れかの幾つかの実施形態において、有効Ｅ：Ｔ比率は、１つ以上の予め定められた濃度のｐＩＣＦで計算され得る。１つの実施形態において、予め定められた濃度のｐＩＣＦは、有効Ｅ：Ｔ比率の計算のために最適化される。１つの実施形態において、Ｅ：Ｔ比率は、最大濃度のｐＩＣＦに暴露された時の、腫瘍及び活性化Ｔ細胞の数を使用して計算される。別の実施形態において、Ｅ：Ｔ比率は、活性化Ｔ細胞の数の最大ピークを生成する濃度のｐＩＣＦに暴露された時の、腫瘍及び活性化Ｔ細胞の数を使用して計算される。更なる実施形態において、Ｅ：Ｔ比率は、それぞれの用量反応曲線のＥＣ５０濃度に相当する、腫瘍及び活性化Ｔ細胞の数を使用して計算される。
【００５６】
前述の方法又はアッセイの何れかの幾つかの実施形態において、有効Ｅ：Ｔ比率はまた、有効Ｔ：Ｅ比率（例えば、癌を死滅させるＴ細胞に対する癌細胞の比率）として表され得る。
【００５７】
幾つかの実施形態において、本明細書に記載される方法により産生される癌を死滅させるＴ細胞が、提供される。幾つかの実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞はトロゴサイトーシスＴ細胞である。他の実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞はＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞である。他の実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞はＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞である。トロゴサイトーシスＴ細胞は、より有効な癌細胞キラーであると考えられるが、細胞障害性Ｔ細胞、例えばＣＤ８＋Ｔ細胞及び活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞も、癌細胞を死滅させる活性を持つ。従って、活性化Ｔ細胞のタイプは全て、有効Ｅ：Ｔ比率で含まれ得る。
【００５８】
幾つかの実施形態において、前記方法又はアッセイは、新たに生成された癌を死滅させる細胞障害性Ｔ細胞の数、及び、同じ条件下、例えば同じウェルにおいて死滅された標的細胞の数を検知する工程、例えば計数する工程を含む。これら値の比率は有効Ｅ：Ｔ比率である。
【００５９】
幾つかの実施形態において、前記比率は２つの控除間の比率であり、１つの控除は、インキュベーション前と比べたインキュベーション後に標的の数であり（即ち、そのような条件で死滅された標的細胞の数を測定すること）、他方の控除は、インキュベーション前と比べたインキュベーション後の癌を死滅させるＴ細胞の数である（即ち、そのような条件において標的細胞を死滅させる細胞傷害性Ｔ細胞の数を測定すること）。幾つかの実施形態において、ｐＩＣＦの無い癌を死滅させるＴ細胞はゼロであり（或いは、検知できない）、故に控除は、癌を死滅させるＴ細胞の総数（例えば、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞の総数又はＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞の総数）と等しい。
【００６０】
前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、例えばｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤を追加しない基準レベルに対する、癌細胞のレベル又は量の減少は、癌細胞死滅の増加を示す。他の実施形態において、例えば基準レベルに対する、癌細胞のレベル又は量における変化の減少又は実質的に変化が無いことは、癌細胞死滅の減少を示す。
【００６１】
前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤により誘導される新たに生成された標的を死滅させるＴ細胞に比べてより高レベルの標的細胞死滅（例えば、標的細胞と癌を死滅させるＴ細胞との高い有効な比率）は、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物が癌細胞の有効なキラーであることを示している。１つの実施形態において、Ｔ細胞に対する標的の比率は基準の比率と比較される。例えば、１（Ｔ細胞）対１０、２０、３０、４０、５０、７５、１００、５００、又はそれ以上（標的細胞）の比率は、強力なＴ細胞を死滅させる活性を示す。好ましい実施形態において、Ｔ細胞：標的細胞の比率は、１：５００又はそれ以上に及ぶ。強力な細胞を死滅させる活性を持

つＴ細胞を有する被験体は、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤に対して強く反応すると識別され得る。

【００６２】

１つの実施形態において、基準の比率は、２つの控除間の比率である：

－共に同じ実験的インキュベーション条件を共有する、ｐＩＣＦを加えた標的細胞（ΔＴｐＩＣＦ）の数を控除したｐＩＣＦの無い標的細胞の数、

・ここで、この数は、最高の標的細胞死滅を誘導するｐＩＣＦの用量、或いは代替的に最高の用量のｐＩＣＦで標的細胞の数を控除することによって計算され、

・ここで、最大値と最小値は、ｐＩＣＦの複数回用量の用量反応曲線の実験値の数学的なフィッティングに由来するものである。

－共に同じインキュベーション条件を共有する、ｐＩＣＦの無いエフェクターの癌を死滅させるＴ細胞（ΔＥｐＩＣＦ）の数を控除した、ｐＩＣＦを加えたエフェクターの癌を死滅させるＴ細胞の数、

・ここで、この数は、最高の標的細胞死滅を誘導するｐＩＣＦの用量、或いは代替的に最高の用量のｐＩＣＦで標的細胞の数を控除することによって計算され、

・ここで、最大値と最小値は、ｐＩＣＦの複数回用量の用量反応曲線の実験値の数学的なフィッティングに由来するものである。

－これらの２つの変数間の比率は、有効Ｅ：Ｔ比率として定義され、且つΔＴｐＩＣＦ／ΔＥｐＩＣＦと同等である。

－この有効Ｅ：Ｔ比率は、そのような条件において一つの癌を死滅させるＴ細胞により死滅された標的細胞の数を測定する。この比率は、異なるインキュベーション事件における同じサンプル及びｐＩＣＦに関して同様である。なぜならそれは、異なる時間で精製される、同じ癌を死滅させるＴ細胞の活性を表わすからである。

【００６３】

幾つかの実施形態において、有効Ｅ：Ｔ比率は、癌標的細胞を死滅させる際に生成された癌を死滅させるＴ細胞の活性の推定を表わす。理論に縛られることなく、癌を死滅させるＴ細胞が実際には被験体、例えば癌患者を処置するための活性な薬物であるため、それは死癌細胞を死滅させる際の薬物の活性と同等である。有効Ｅ：Ｔ比率は、異なる患者から癌を死滅させるＴ細胞の活性に順位を付け、それによりそれら患者を層別化することができる。この順序付け又は層別化は、癌標的細胞を死滅させる際に効能を測定する標準分析法に由来する順序付け又は層別化とは大いに異なり得る。例えば、１：２００の有効Ｅ：Ｔ比率を持つ非常に効果的な癌を死滅させるＴ細胞は、１つの癌を死滅させるＴ細胞につき２００の標的細胞を排除するものであり、患者が非常に大きな密度の癌標的細胞を持つ場合に癌細胞を全て死滅させることができない場合もある。多くの癌細胞を生きたまま残すことは通常、標準化学療法活性測定において癌を死滅させるＴ細胞に関する低活性の兆候であると考えられ；この場合それは、ｐＩＣＦにより生成された癌を死滅させるＴ細胞の真の高活性を逃し、問題は、幾つかの癌細胞が、免疫抑制され、且つ他の場合には生成された高活性の癌を死滅させるＴ細胞に耐性があることである。

【００６４】

従って、有効Ｅ：Ｔ比率は、最も活性な癌を死滅させるＴ細胞、例えば、患者に投与するのに更に適した癌を死滅させるＴ細胞を識別することができる。

【００６５】

代替的に　低レベルの有効Ｅ：Ｔ比率は、貧しいＴ細胞を死滅させる活性を示す。１つの実施形態において、１：５（例えば１、３、又は５）の癌を死滅させるＴ細胞：標的細胞の比率は、貧しいＴ細胞を死滅させる活性を示す。細胞を死滅させる活性が減少したＴ細胞を有する被験体は、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤に対する反応が貧しいと識別され得る。

【００６６】

有効Ｅ：Ｔ比率、基礎Ｅ：Ｔ比率、ＥＣ５０、Ｅｍａｘ、及びこれら変数の関連付けに加えて、癌を死滅させるＴ細胞の活性を推定する代替的な方法が存在する。異なる薬理学的

な操作モデルを使用する、より精巧な数学的計算、及び実験データに適合させる様々な方法は、本明細書で提唱された有効Ｅ：Ｔ比率に比べてどれだけの癌細胞が癌を死滅させるＴ細胞によって死滅させられるのかを計算する様々な方法を提供し得る。癌を死滅させるＴ細胞の活性を推定するために同じ概念を実質的に計算する、それら代替的な方法はまた、有効Ｅ：Ｔ比率の定義によりカバーされたと考えられる。

【００６７】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞のレベルは、工程（ｃ）の後に１つ以上の時間間隔で判定される。典型的な実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞のレベルは、工程（ｃ）の後に１－１６８時間（例えば１、２、４、８、１６、２４、４８、７２、９６、１２０、１４４、又は１６８時間）、数日、或いは数週で判定される。

【００６８】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、接触させる工程は更に、例えば用量－反応曲線を生成するために、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の異なる用量（例えば投与量を増大）でのｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の追加を含む。１つの実施形態において、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤のゼロ用量又は対照レベル（例えば閾値用量）でのＴ細胞又は癌細胞のレベルと飽和用量でのレベルとの差が、判定される。実施形態において、飽和用量でのＴ細胞又は癌細胞のレベル対閾値用量でのレベルの差が判定される。実施形態において、本明細書で使用されるような有効Ｅ：Ｔ比率は、癌細胞のレベルの差に対するＴ細胞のレベルの差の比率である。実施形態において、本明細書で使用されるような有効Ｅ：Ｔ比率は、それらのＥＣ５０濃度それぞれでのＴ細胞及び標的細胞の数の比率である。

【００６９】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、前記方法は、自動化プラットフォーム、例えば、自動化の蛍光ベースのプラットフォーム、例えば本明細書に記載されるＥｘｖｉＴｅｃｈプラットフォームを使用して実行される。

【００７０】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の活性が、用量反応曲線を測定するためにエクスビボ／インビトロのアッセイを使用して判定され、その数学的フィッティングにより、ＥＣ５０、有効Ｅ：Ｔ比率、Ｅｍａｘ、又は動態の少なくとも１つから選択される定量パラメーターは活性を推定することができる。前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、工程（ｅ）により評価されたｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の活性は、例えば標準の枯渇用量反応曲線と比較して、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の活性の用量反応を使用する活性の評価とは異なる。

【００７１】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、基準比率は、予め定められた比率であり、例えば、約１：３～１：１０、例えば約１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、又は１：１０である。実施形態において、高い標的細胞に対する工程（ｅ）のＴ細胞の比率は、約１：４～１：５００（例えば１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１５、１：２０、１：２５、１：３０、１：３５、１：４０、１：４５、１：５０、１：７５、１：１００、１：５００、又はそれ以上）である。

【００７２】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、工程（ｃ）は、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物と標的細胞、例えば癌細胞とのエクスビボ混合物を形成する工程を含む。実施形態において、癌細胞は、血液癌、固形癌、転移癌（例えば、ＣＴＣ、又はそれらの組み合わせ）から選択された細胞である。実施形態において、癌細胞は、白血病又はリンパ腫芽細胞（例えばＣＤ１９、ＣＤ１２３、ＣＤ２０、又はその他から選択された１つ以上のマーカーを発現する芽細胞）である。実施形態において、Ｔ細胞は、血液サンプル（例えば末梢血サンプル）、骨髄サンプル、リンパ節サンプル、脾臓サンプル、ＣＴＬ

及び／又はＴＩＬを含む腫瘍サンプル、又はそれらの組み合わせから選択される細胞である。実施形態において、Ｔ細胞はＣＤ８及び／又はＣＤ２５を発現する（例えば、それはＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞である）。他の実施形態において、Ｔ細胞はＣＤ４及び／又はＣＤ２５を発現する（例えば、それはＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞である）。

【００７３】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物は、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤、例えば本明細書に記載されるｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の使用を含む方法を使用して産生される。

【００７４】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物は、Ｔ細胞、例えば、ＣＤ８＋及びＣＤ２５＋、ＣＤ４＋及びＣＤ２５＋、或いはその両方であるＣＴＬを含む。

【００７５】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤は、異なる投与量（例えば投与量の増大）で投与される。

【００７６】

前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の存在下でのＴ細胞の細胞を死滅させる活性の増加は、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の高い効能を示す。代替的に、候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の存在下でのＴ細胞の細胞を死滅させる活性の小さな変化又は実質的に変化が無いことは、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の低い効能を示す。

【００７７】

スクリーニングアッセイ

別の態様において、本明細書には、被験体からの癌を死滅させるＴ細胞の産生に使用するための有効なｐＩＣＦを識別するための方法又はアッセイが提供される。前記方法は、

（ａ）候補のｐＩＣＦ（例えば１以上の候補のｐＩＣＦ）を提供する工程；

（ｂ）癌細胞及びＴ細胞を含むサンプル、例えば本明細書に記載されるような１つ以上のサンプルを提供する工程；及び

（ｃ）例えばＴ細胞を活性化する（例えば、Ｔ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得するのを可能にする）のに十分な（例えば一定期間にわたる）条件の下で、候補のｐＩＣＦ及びサンプルを含むエクスビボの反応混合物を形成する工程であって、それにより癌を死滅させるＴ細胞を産生する、工程

を含む。

【００７８】

また別の態様において、本明細書には、被験体からの癌を死滅させるＴ細胞の産生に使用するための有効な免疫調節物質を識別するための方法又はアッセイが提供される。前記方法は、

（ａ）候補の免疫調節物質（例えば、本明細書に記載される１以上の候補の免疫調節物質）を提供する工程；

（ｂ）癌細胞及びＴ細胞を含むサンプル、例えば本明細書に記載されるような１つ以上のサンプルを提供する工程；及び

（ｃ）例えばＴ細胞を活性化する（例えば、Ｔ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得するのを可能にする）のに十分な（例えば一定期間にわたる、及び／又は予め定められた濃度の候補の免疫調節物質の存在下）条件の下で、候補の免疫調節物質及びサンプルを含むエクスビボの反応混合物を形成する工程であって、それにより癌を死滅させるＴ細胞を産生する、工程

を含む。

【００７９】

実施形態において、前記方法又はアッセイは更に、

（ｄ）例えば、各候補のｐＩＣＦ又は候補の免疫調節物質について、癌細胞の枯渇、活性

化された、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞の数又はパーセンテージ、及び活性化された、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞の増殖から選択された１つ以上のパラメーターを判定する工程を含む。幾つかの実施形態において、（ｉ）－（ｉｖ）のうち１つ以上は、候補のｐＩＣＦ又は免疫調節物質が、被験体からの癌を死滅させるＴ細胞の産生に使用するための有効なｐＩＣＦ又は免疫調節物質であることを示す：

（ｉ）ｐＩＣＦ又は免疫調節物質は、基準レベルと比較して生きた癌細胞の数の減少につながり、例えば、基準レベルは、反応混合物中の生きた癌細胞の数、或いは、ｐＩＣＦ又は免疫調節物質が無い状態で工程（ｃ）によって産生される癌を死滅させるＴ細胞でのインキュベーションの後の生きた癌細胞の数である；

（ｉｉ）ｐＩＣＦ又は免疫調節物質は、基準レベルと比較してより多くの数／パーセンテージの活性化された癌を死滅させるＴ細胞につながり、例えば、基準レベルは、ｐＩＣＦ又は免疫調節物質を欠く同様のエクスビボの反応混合物中の活性化Ｔ細胞の数／パーセンテージ、或いは、Ｔ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得することを可能にするには不十分な期間にわたり形成されたエクスビボの反応混合物中の活性化Ｔ細胞の数／パーセンテージである；

（ｉｉｉ）ｐＩＣＦ又は免疫調節物質は、基準レベルと比較して活性化された癌を死滅させるＴ細胞のより大きな増殖につながり、例えば、基準レベルは、癌細胞に暴露されなかったＴ細胞（例えばＣＴＬ）（例えば、非癌性の被験体のＴ細胞、例えばＣＴＬ）、又は、例えばエクスビボでｐＩＣＦ又は免疫調節物質に暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば癌性又は非癌性の被験体由来）の増殖である；及び／又は

（ｉｖ）ｐＩＣＦ又は免疫調節物質は、同じサンプル及びインキュベーション条件での異なるｐＩＣＦと比較して、より大きな有効Ｅ：Ｔ比率につながる。

【００８０】

本明細書に記載される前述の方法又はアッセイの何れかにおいて、前記方法又はアッセイは更に、免疫調節剤（例えば本明細書に記載されるような、免疫のチェックポイント分子の阻害剤、免疫細胞のアゴニスト、又は他の免疫調節剤物或いは細胞治療薬のうち１つ以上）を提供する工程を含み得る。免疫調節剤は、候補のｐＩＣＦ、免疫調節剤、及びサンプルを含むエクスビボの反応混合物が形成されるように追加され得る。エクスビボの反応混合物の活性は、工程（ｄ）に従い測定され得る。

【００８１】

本明細書に記載されるような前述の方法又はアッセイの何れかにおいて、前記方法又はアッセイは更に、サプレッサー免疫細胞、例えば骨髄由来のサプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）又は調節性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞のうち１つ以上のレベル又は活性を評価する工程を含み得る。幾つかの実施形態において、サプレッサー免疫細胞の表現型の変化が評価される。１つの実施形態において、Ｔｒｅｇ細胞マーカー、例えば、ＣＤ４＋ＣＤ２５ｈｉＦｏｘＰ３＋ＣＤ１２７発現細胞のレベル又は発現が検出される。代替的に、又は組み合わせて、ＭＤＳＣマーカーのレベル又は発現は、ＣＤ３３＋／ＣＤ１１ｂ＋／ＨＬＡ－ＤＲｌｏｗ／ｎｅｇ（例えばＡＭＬにおける）、ＩＤＯｈｉＣＤ１４＋ＨＬＡ－ＤＲｌｏｗ（例えばＣＬＬにおける）、又はＣＤ１１ｂ＋／ＣＤ１４－／ＨＬＡ－ＤＲｌｏｗ／ｎｅｇ／ＣＤ３３＋ＣＤ１５＋（例えばＭＭにおける）のうち１つ以上の検出により判定される。免疫抑制細胞のマーカーは、例えば、自動化された蛍光細胞選別（例えば、ＥｘｖｉＴｅｃｈプラットフォームを使用する）によって検出され得る。

【００８２】

本明細書に記載される前述の方法又はアッセイの何れかの幾つかの実施形態において、ｐＩＣＦ、例えば候補のｐＩＣＦの効果は、Ｔ細胞（例えば活性化Ｔ細胞）、トロゴサイトーシスＴ細胞、Ｔｒｅｇ、又はＭＤＳＣのうち１つ、２つ、３つ、又は全てのレベル及び／又は活性に応じて評価され得る。幾つかの実施形態において、ｐＩＣＦの存在下又は不在下での前述の細胞の１つ以上の数及び／又は比率が、判定され得る。

【００８３】

本明細書に記載される前述の方法又はアッセイの何れかの幾つかの実施形態において、任

意の化合物（例えば免疫調節剤、例えばｐＩＣＦ）の治療効力は、癌を死滅させるＴ細胞のレベル又は活性、及び／又はサプレッサー免疫細胞、例えばＴｒｅｇ細胞又はＭＤＳＣのレベル又は活性の検出によって、評価され得る。１つの実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞のレベル又は活性の増加、及び／又はサプレッサー免疫細胞のレベル又は活性の減少は、化合物の治療効力の増加を示す。代替的に、癌を死滅させるＴ細胞のレベル又は活性の減少、及び／又はサプレッサー免疫細胞のレベル又は活性の増加は、化合物の治療効力の減少を示す。

【００８４】

別の態様において、本明細書では、インビボで癌細胞を死滅させるのに恐らく有効な癌を死滅させるＴ細胞を識別する方法又はアッセイが特徴とされ、該方法又はアッセイは、

（ａ）例えば本明細書に記載される方法により産生される、癌細胞に特異的な癌を死滅させるＴ細胞の集団を提供する工程；及び

（ｂ）癌細胞に対する癌を死滅させるＴ細胞の細胞傷害性活性、癌を死滅させるＴ細胞の生存度、癌を死滅させるＴ細胞の増殖、及び癌を死滅させるＴ細胞上の細胞表面マーカーの発現から選択された１つ以上のパラメーターを判定する工程

を含む。

【００８５】

幾つかの実施形態において、インビボでの癌を死滅させるＴ細胞の有効性は、下記の１つ以上により評価される：

（ｉ）例えば基準レベルと比較した、癌細胞に対する癌を死滅させるＴ細胞の細胞傷害性活性の検出であって、癌を死滅させるＴ細胞のより高い細胞傷害性活性は、インビボでの有効性の増加を示す、検出（実施形態において、基準レベルは、異なるタイプの癌細胞に対する癌を死滅させるＴ細胞の細胞傷害性活性、或いは非癌細胞に対する癌を死滅させるＴ細胞の細胞傷害性活性によって検出される）；

（ｉｉ）例えば基準レベルと比較した、癌を死滅させるＴ細胞の増殖の検出であって、例えば、より高度の増殖はインビボでの有効性の増加を示す、検出（実施形態において、基準レベルは、癌細胞に暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば、非癌性の被験体のＴ細胞、例えばＣＴＬ）、又は、エクスビボでｐＩＣＦに暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば癌性又は非癌性の被験体由来）の増殖である）；

（ｉｉｉ）例えば基準レベルと比較した、癌を死滅させるＴ細胞の生存率の検出であって、例えば、癌を死滅させるＴ細胞の生存率の増加はインビボでの有効性の増加を示す、検出（実施形態において、基準レベルは、癌細胞に暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば、非癌性の被験体のＴ細胞、例えばＣＴＬ）、又は、エクスビボでｐＩＣＦに暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば癌性又は非癌性の被験体由来）の生存率である）；又は

（ｉｖ）例えば基準レベルと比較した、癌を死滅させるＴ細胞上の１つ以上の癌抗原、ＰＤ－１、又はＴＩＭ－３の発現のレベルの検出であって、より高度なレベルの発現はインビボでの有効性の増加を示す、検出（実施形態において、基準レベルは、癌細胞に暴露されていないＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば、非癌性の被験体のＴ細胞、例えばＣＴＬ）の上の癌抗原、ＰＤ－１、及び／又はＴＩＭ－３の発現である）。

【００８６】

また別の態様において、本明細書には、インビボで癌を死滅させるのに恐らく有効な癌を死滅させるＴ細胞の１つ以上のクローンを識別（及び、例えば選択）する方法又はアッセイも特徴とされ、該方法又はアッセイは、

（ａ）例えば本明細書に記載される方法により産生される、癌細胞に特異的な癌を死滅させるＴ細胞の複数のクローンを含む集団を提供する工程；

（ｂ）集団を例えば個々のクローンへと分ける工程；及び

（ｃ）癌細胞に対する癌を死滅させるＴ細胞の細胞傷害性活性、癌を死滅させるＴ細胞の生存度、癌を死滅させるＴ細胞の増殖、又は癌を死滅させるＴ細胞上の細胞表面マーカーの発現から選択された１つ以上のパラメーターを判定する工程

を含む。実施形態において、クローンは個々に評価される。
【００８７】
実施形態において、（ｉ）―（ｖ）のうち１つ以上は、クローンがインビボで恐らく有効であることを示す：
（ｉ）例えば基準レベルと比較した、例えば有効Ｅ：Ｔ比率を使用して測定されるような癌細胞に対するクローンのより高度な細胞傷害性活性（例えば、基準レベルは、異なるタイプの癌細胞に対するクローンの細胞傷害性活性、又は非癌細胞に対するクローンの細胞傷害性活性である）；
（ｉｉ）例えば基準レベルと比較した、クローンのより高度な増殖（例えば、基準レベルは、癌細胞に暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば、非癌性の被験体のＴ細胞、例えばＣＴＬ）、又は、エクスビボでｐＩＣＦに暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば癌性又は非癌性の被験体由来）の増殖である）；
（ｉｉｉ）例えば基準レベルと比較した、クローンのより高度な生存率（例えば、基準レベルは、癌細胞に暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば、非癌性の被験体のＴ細胞、例えばＣＴＬ）、又は、エクスビボでｐＩＣＦに暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば癌性又は非癌性の被験体由来）の生存率である）；及び／又は
（ｉｖ）例えば基準レベルと比較した、１つ以上の抗原、ＰＤ－１、又はＴＩＭ－３のより高度な発現（例えば、基準レベルは、癌細胞に暴露されていないＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば、非癌性の被験体のＴ細胞、例えばＣＴＬ）の上の癌抗原、ＰＤ－１、及び／又はＴＩＭ－３の発現である）
を含む。
【００８８】
実施形態において、分離する工程は、限界希釈（例えば、クローン細胞集団を得るために）、磁気ビーズベースの富化、或いは蛍光活性化セルソーティングのうち１つ以上を含む。実施形態において、分離する工程は、容器の別個のウェルに個々の細胞（例えば個々のクローン）を蒔く工程を更に含む。前記方法は、各クローンの集団を産生するために個々の細胞の各々を増殖する工程を更に含む。幾つかの実施形態において、細胞は増殖なしに投与される。他の実施形態において、細胞は、細胞増殖の後、例えば個々の細胞の増殖後に投与される。
【００８９】
実施形態において、前記方法は、インビボでおそらく有効と識別されたクローンを増殖する工程を更に含む。
【００９０】
実施形態において、前記方法は、インビボでおそらく有効であると識別された２つ以上のクローンを組み合わせる工程、及び（随意に）クローンの混合物を増殖する工程を更に含む。
【００９１】
癌治療に反応する被験体を識別するためのアッセイ及び方法
別の態様において、本明細書では、被験体を評価する方法又はアッセイ、例えば、治療、例えば免疫調節治療及び／又は癌治療に反応する被験体を識別又は選択する方法又はアッセイも特徴とされる。前記方法は、
（ａ）癌を持つ被験体のＴ細胞（例えば、本明細書に記載されるようなＴ細胞又はＴ細胞サンプル）を提供する工程；
（ｂ）被験体から癌細胞（例えば、本明細書に記載されるような癌細胞又は癌細胞サンプル）を提供する工程；
（ｃ）Ｔ細胞、癌細胞、近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）、及び治療薬、例えば癌治療薬を含む、エクスビボの反応混合物を形成する工程；
（ｄ）工程（ｃ）の反応混合物の細胞を死滅させる活性を判定する工程
を含む。
【００９２】

幾つかの実施形態において、基準値（例えば治療が無い）に対する治療の存在下での反応混合物の細胞を死滅させる活性の増加は、治療に対するより高い反応性を示す。

【００９３】

幾つかの実施形態において、工程（ｄ）は、工程（ｃ）の後に標的細胞のレベルを判定する工程、及び随意に、工程（ｃ）の後に癌を死滅させるＴ細胞のレベルを判定する工程を含む（実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞のレベルは、工程（ｃ）の後に１つ以上の時間間隔で判定される）。実施形態において、前記方法は、例えば本明細書に記載されるように、標的細胞とＴ細胞、或いはＴ細胞と標的細胞との何れかの有効Ｅ：Ｔ比率を判定する工程を更に含む。

【００９４】

実施形態において、ｐＩＣＦは、二重特異性抗体分子、例えば、二重特異性免疫グロブリン（ＢｓＩｇＧ）、付加的な抗原結合分子に作動的に結合された免疫グロブリン、二重特異性抗体（ＢｓＡｂ）フラグメント、二重特異性融合タンパク質、又はＢｓＡｂ抱合体である。

【００９５】

実施形態において、ｐＩＣＦは、ＢｓＭＡｂ　ＣＤ１２３／ＣＤ３、ＢｓＭＡｂ　ＣＤ１９／ＣＤ３、及びＥｐＣＡＭ／ＣＤ３から成るリストから選択された二重特異性抗体である。

【００９６】

実施形態において、治療薬は、免疫調節剤、例えば本明細書に記載されるような免疫調節剤である。１つの実施形態において、免疫調節剤は、免疫チェックポイント阻害剤の阻害剤、例えば、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤、例えば、ＣＴＬＡ４、ＰＤ１、ＰＤＬ１、ＰＤＬ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＢＴＬＡ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、又はＨＶＥＭのうち１つ以上の阻害剤である。実施形態において、免疫調節剤は、Ｔ細胞のアゴニスト、例えば、本明細書に記載されるＴ細胞のアゴニスト、例えば、ＣＤ１３７、ＧＩＴＲ、又はＣＤ４０に対するアゴニスト抗体又はそのフラグメントである。１つの実施形態において、免疫調節剤はＭＤＳＣ及び／又はＴｒｅｇ細胞の阻害剤である。

【００９７】

１つの実施形態において、免疫調節剤はレナリドミドである。他の実施形態において、免疫調節剤は、腫瘍特異性抗原に対する免疫反応を活性化し、例えばそれはワクチン（例えば、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、又はＭＡＧＥＡ３などの標的に対するワクチン）である。他の実施形態において、免疫調節剤は、サイトカイン、例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ１５、ＩＬ－１８、又はＩＬ－２１のうち１つ以上から選択された組み換え型サイトカインである。他の実施形態において、免疫調節剤は、自己由来のＴ細胞、例えば、腫瘍標的化された細胞外及び細胞内の腫瘍特異性抗原（例えばＣＡＲ　Ｔ細胞又はＴＣＲ　Ｔ細胞）である。また他の実施形態において、免疫調節剤は、アミノ酸異化、腫瘍由来の細胞外ＡＴＰのシグナル伝達、アデノシンシグナル伝達、アデノシン産生、ケモカイン及びケモカイン受容体、異物の認識、又はキナーゼシグナル伝達活性に関連した成分（例えば酵素又は受容体）のモジュレーターである。典型的な薬剤は、ＩＤＯ、ＣＯＸ２、ＡＲＧ１、ＡｒＧ２、ｉＮＯＳ、又はホスホジエステラーゼ（例えばＰＤＥ５）の阻害剤（例えば小分子阻害剤）；ＴＬＲアゴニスト、或いはケモカインアンタゴニストを含む。免疫調節剤の追加の例は、例えばＡｄａｍｓ　ＪＬ（２０１５）とＳｅｒａｆｉｎｉ（２００８）において更に記載されており、それら各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【００９８】

癌を死滅させるＴ細胞の産生時に使用するための有効なｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質を識別する方法又はアッセイ

一態様において、本明細書では、被験体から癌を死滅させるＴ細胞を産生する際に使用するための有効なｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質を識別するための方法又はアッセイが特徴とされ、該方法又はアッセイは、

（ａ）候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質（例えば１以上の候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質）を提供する工程；
（ｂ）癌細胞及びＴ細胞を含むサンプル、例えば本明細書に記載されるような１つ以上のサンプルを提供する工程；及び
（ｃ）例えばＴ細胞を活性化する（例えば、Ｔ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得するのを可能にする）のに十分な（例えば一定期間にわたる）条件の下で、候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質とサンプルとを含むエクスビボの反応混合物を形成する工程であって、それにより癌を死滅させるＴ細胞を産生する、工程
を含む。

【００９９】
実施形態において、前記方法又はアッセイは更に、
（ｄ）例えば、各候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質について、癌細胞の枯渇、活性化された、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞の数又はパーセンテージ、及び活性化された、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞の増殖から選択された１つ以上のパラメーターを判定する工程を含む。

【０１００】
実施形態において、（ｉ）―（ｉｉｉ）のうち１つ以上は、候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質が、被験体から癌を死滅させるＴ細胞を産生する際に使用するための有効なｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質であることを示す：
（ｉ）ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質は、基準レベルと比較して生きた癌細胞の数の減少につながり、例えば、基準レベルは、反応混合物中の生きた癌細胞の数、或いは、工程（ｃ）によって産生される癌を死滅させるＴ細胞でのインキュベーションの後の生きた癌細胞の数である；
（ｉｉ）ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質は、基準レベルと比較してより多くの数／パーセンテージの活性化Ｔ細胞につながり、例えば、基準レベルは、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質を欠く同様のエクスビボの反応混合物中の活性化Ｔ細胞の数／パーセンテージ、或いは、Ｔ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得することを可能にするには不十分な期間にわたり形成されたエクスビボの反応混合物中の活性化Ｔ細胞の数／パーセンテージである；及び／又は
（ｉｉｉ）ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質は、基準レベルと比較して活性化Ｔ細胞のより大きな増殖につながり、例えば、基準レベルは、癌細胞に暴露されなかったＴ細胞（例えばＣＴＬ）（例えば、非癌性の被験体のＴ細胞、例えばＣＴＬ）、又は、エクスビボでｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質に暴露されなかったＴ細胞、例えばＣＴＬ（例えば癌性又は非癌性の被験体由来）の増殖である。

【０１０１】
候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質を評価する（例えば、スクリーニングする）方法
幾つかの態様において、スクリーニング方法は、本明細書に記載される方法を使用して癌を死滅させるＴ細胞を生成する工程を含み、例えば、患者からの第１のサンプルはｐＩＣＦと混合される。実施形態において、スクリーニング方法は、患者からの第２サンプルを、癌を死滅させるＴ細胞及び１つ以上の候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質と引き続き混合する工程を含む。実施形態において、Ｔ細胞と標的細胞との異なる比率（Ｅ：Ｔ比率）は、固定された濃度のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質と組み合わされる。他の実施形態において、Ｔ細胞と標的細胞との固定比率（Ｅ：Ｔ比率）は、様々な濃度のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質と組み合わされ、例えばそれにより、活性によるｐＩＣＦ／免疫調節物質の順序付けが可能になる。

【０１０２】
従って、一態様において、本明細書には、候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質を評価する方法が提供され、該方法は：
（ａ）例えば被験体（例えば本明細書に記載されるような癌を持つ被験体）から、例えば本明細書に記載される方法に従い産生される癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物を提供

する工程；
（ｂ）例えば被験体からサンプルを提供する工程であって、該サンプルは標的細胞（例えば癌細胞）を含む、工程；
（ｃ）癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞を死滅させることを可能にするのに十分な条件（例えば、一定期間にわたる）の下で、候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質（例えば、１つ以上の候補のｐＩＣＦ及び／又は免疫調節物質）を、工程（ａ）の癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物及び工程（ｂ）の第２のサンプルと接触させる工程；
（ｄ）工程（ｃ）の後に標的細胞のレベルを判定し、及び随意に、工程（ｃ）の後に癌を死滅させるＴ細胞のレベルを判定する工程（実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞のレベルは、工程（ｃ）の後に１つ以上の時間間隔で判定される）；及び随意に（ｅ）工程（ｄ）から、標的細胞とＴ細胞、又はＴ細胞と標的細胞との何れかの有効な比率を判定する工程を含む。

【０１０３】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物、及び標的細胞（例えば癌細胞）は、同じサンプルに由来する。

【０１０４】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物、及び標的細胞（例えば癌細胞）は、異なるサンプルに由来する。

【０１０５】
実施形態において、工程（ａ）、（ｂ）、又は（ａ）と（ｂ）の両方は、例えば同じ被験体の１つ以上の追加のサンプルを用いて繰り返される。

【０１０６】
実施形態において、工程（ｅ）は、異なる比率のＴ細胞と標的細胞とを、固定された量の候補に接触させる工程であって、それにより有効な候補を識別する、工程を含む。

【０１０７】
実施形態において、工程（ｅ）は、固定されたＴ細胞と標的細胞殿比率を、異なる濃度の候補と接触させる工程であって、それにより候補の活性を判定し且つ活性に基づいて候補を随意に順序付けする、工程を含む。

【０１０８】
実施形態において、例えば基準レベルに比べて、癌細胞のレベル又は量の減少は、癌細胞死滅の増加を示す。

【０１０９】
実施形態において、例えば基準レベルに比べて、癌細胞のレベル又は量における変化の減少又は実質的に変化が無いことは、癌細胞死滅の減少を示す。

【０１１０】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞に比べて高レベルの標的細胞（例えば、標的細胞と癌を死滅させるＴ細胞との高い有効な比率）は、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物が癌細胞の有効なキラーであることを示している。

【０１１１】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞に対する標的の比率は基準の比率と比較される。

【０１１２】
実施形態において、１（癌を死滅させるＴ細胞）対１０、２０、３０、４０、５０、７５、１００、又はそれ以上（標的細胞）の比率は、強力なＴ細胞を死滅させる活性を示す。好ましい実施形態において、標的細胞に対するＴ細胞の比率は、１：１００、又はそれ以上に及ぶ。実施形態において、１：１００、又はそれ以上の標的細胞と癌を死滅させるＴ細胞との有効な比率は、癌を死滅させるＴ細胞が優れたキラーＴ細胞であると判定する。

【０１１３】
実施形態において、候補のｐＩＣＦの存在下での、Ｔ細胞の細胞を死滅させる活性の増加、及び／又は標的細胞と癌を死滅させるＴ細胞との高い有効な比率は、ｐＩＣＦの高い効能を示す。

【０１１４】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞に比べて低レベルの標的細胞（例えば、標的細胞と癌をさせるＴ細胞との低い有効な比率）は、貧しいＴ細胞を死滅させる活性を示す。
【０１１５】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞に対する標的の比率は基準の比率と比較される。
【０１１６】
実施形態において、１（Ｔ細胞）対１、３、又は５（標的細胞）の有効な比率は、貧しいＴ細胞を死滅させる活性を示す。
【０１１７】
実施形態において、候補のｐＩＣＦの存在下での、Ｔ細胞の細胞を死滅させる活性における小さな変化又は実質的に変化が無いこと、及び／又は標的細胞とＴ細胞との低い有効比率は、ｐＩＣＦの低い効能を示す。
【０１１８】
実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞のレベルは、工程（ｃ）の後に１つ以上の時間間隔で判定される。
【０１１９】
実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞のレベルは、工程（ｃ）の後に、０時間、１－７５時間（例えば１、２、４、８、１６、２４、３６、又は７２時間）、或いは数日で判定される。
【０１２０】
実施形態において、接触させる工程は更に、例えば用量反応曲線を生成するために、ｐＩＣＦの異なる用量（例えば投与量の増大）でのｐＩＣＦの追加を含む。
【０１２１】
実施形態において、前記方法は更に、ｐＩＣＦのゼロ用量又は対照レベル（例えば閾値用量）でのＴ細胞又は癌細胞のレベルと飽和用量でのレベルとの差を判定する工程を含む。
【０１２２】
実施形態において、前記方法は、飽和用量対閾値用量でのＴ細胞又は癌細胞のレベルの差を判定する工程を含む。
【０１２３】
実施形態において、標的細胞（例えば癌細胞）と癌を死滅させるＴ細胞（例えば工程（ｅ）における）との有効な比率は、癌細胞のレベルの差に対する癌を死滅させるＴ細胞のレベルの差の比率である。
【０１２４】
実施形態において、前記方法は、自動化プラットフォーム、例えば、自動化の蛍光ベースのプラットフォーム、例えば本明細書に記載されるＥｘｖｉＴｅｃｈプラットフォームを使用して実行される。
【０１２５】
実施形態において、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の活性が、用量反応曲線を測定するためにエクスビボ／インビトロのアッセイを使用して判定され、その数学的フィッティングにより、ＥＣ５０、有効Ｅ：Ｔ比率、Ｅｍａｘ、又は動態の少なくとも１つから選択される定量パラメーターは活性を推定することができる。実施形態において、工程（ｅ）により評価されたｐＩＣＦの活性は、例えば標準の枯渇用量反応曲線と比較して、ｐＩＣＦの活性の用量反応を使用する活性の評価とは異なる。
【０１２６】
実施形態において、基準比率は、予め定められた比率であり、例えば、約１：３～１：１０、例えば約１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、又は１：１０である。
【０１２７】
実施形態において、標的細胞と癌を死滅させるＴ細胞との高い有効な比率は、約１：４～１：１００（例えば１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：

１５、１：２０、１：２５、１：３０、１：３５、１：４０、１：４５、１：５０、１：７５、１：１００、又はそれ以上）である。実施形態において、１：１００、又はそれ以上の標的細胞と癌を死滅させるＴ細胞との有効な比率は、癌を死滅させるＴ細胞が優れたキラーＴ細胞であると判定する。

【０１２８】

実施形態において、工程（ｃ）は、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物と標的細胞、例えば癌細胞とのエクスビボ混合物を形成する工程を含む。

【０１２９】

実施形態において、癌細胞は、血液癌、固形癌、転移癌（例えば、ＣＴＣ、又はそれらの組み合わせ）から選択された細胞である。

【０１３０】

実施形態において、癌細胞は、白血病又はリンパ腫芽細胞（例えばＣＤ１９、ＣＤ１２３、ＣＤ２０、又はその他から選択された１つ以上のマーカーを発現する腫瘍細胞）である。

【０１３１】

実施形態において、Ｔ細胞は、血液サンプル（例えば末梢血サンプル）、骨髄サンプル、リンパ節サンプル、ＣＴＬ及び／又はＴＩＬを含む腫瘍サンプル、又はそれらの組み合わせから選択される細胞である。

【０１３２】

実施形態において、Ｔ細胞はＣＤ８及び／又はＣＤ２５を発現する（例えば、それはＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞である）。

【０１３３】

実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物は、ｐＩＣＦ、例えば本明細書に記載されるｐＩＣＦの使用を含む方法を使用して産生される。

【０１３４】

実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物は、ＣＤ８＋及びＣＤ２５＋であるＴ細胞、例えばＣＴＬを含む。

【０１３５】

実施形態において、候補のｐＩＣＦは、異なる投与量（例えば投与量の増大）で加えられる。

【０１３６】

本明細書に記載される方法及び組成物の付加的な特徴又は実施形態は、以下２つの実施形態の１つ以上を含む：

【０１３７】

前述の方法又は組成物の何れかの実施形態において、癌を死滅させる細胞は、（ｉ）癌細胞に対する細胞傷害性活性を有し、且つ（ｉｉ）癌細胞由来の細胞表面マーカー、例えば１つ以上の細胞表面マーカーの少なくとも９０－５００のコピー（例えば、９０、１００、２００、３００、４００、又は５００、例えば１つ以上の癌細胞表面マーカー）を含む。

【０１３８】

前述の方法又は組成物の何れかの実施形態において、反応混合物中のＴ細胞の合計のうち約２～７５％（例えば、約２～７０％、２～６０％、２～５０％、又は２～４０％）は、１つ以上の癌細胞表面マーカー（例えば１つ以上の白血病細胞癌）を発現する。

【０１３９】

実施形態において、癌を死滅させる細胞は富化又は精製される。幾つかの実施形態において、富化又は精製された癌を死滅させる細胞の集団は、少なくとも８０％の癌を死滅させるＴ細胞（例えば８０％、９０％、９５％、９９％、又は１００％）を含み、癌を死滅させる細胞は１つ以上の癌細胞表面マーカーを含む。

【０１４０】

本明細書に記載される方法又は組成物の何れかの幾つかの実施形態において、ｐＩＣＦは、Ｔ細胞のために親和性を提供する第１の要素（例えば第１の結合特異性）、及び癌細胞のために親和性を有する第２の要素（例えば第２の結合特異性）を持つ。実施形態におい

て、第１及び第２の要素の各々は、１、２、３、４、５、又は６つのＣＤＲを含む。実施形態において、第１及び第２の要素の各々は、Ｆｃ領域以外である。

【０１４１】

実施形態において、第１及び第２の要素の各々は、１μＭ以下、例えば１ｐＭ以下のその標的のための解離定数（Ｋｄ）を持つ。

【０１４２】

実施形態において、第１の要素はＴ細胞に結合し、相当な数の癌細胞には結合せず（例えば、第１の要素は、癌細胞よりも少なくとも１０－１００００倍（例えば１０、１００、１０００、１００００倍以上）高い親和性を持つＴ細胞に結合する）；第２の要素は癌細胞に結合し、相当な数のＴ細胞には結合しない（例えば、第２の要素は、Ｔ細胞よりも少なくとも１０－１００００倍（例えば１０、１００、１０００、１００００倍以上）高い親和性を持つ癌細胞に結合する）。

【０１４３】

実施形態において、第２の要素は、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ５２、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、ｇｐＡ３３、ムチン、ＴＡＧ－７２、炭酸脱水酵素ＩＸ、ＰＳＭＡ、葉酸結合タンパク質、ガングリオシド（例えばＧＤ２、ＧＤ３、又はＧＭ２）、Ｌｅｗｉｓ－Ｙ２、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、αＶβ３、α５β１、ＥｒｂＢ１／ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２／ＨＥＲ２、ＥＲｂＢ３、ｃ－ＭＥＴ、ＩＧＦ１Ｒ、ＥｐｈＡ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＲＡＮＫＬ、ＦＡＰ、テネイシン、ＣＤ１２３、ＣＤ１９、ＢＣＭＡ、又は他の癌細胞抗原のうち１つ以上に結合する（例えば、特異的に結合する）。

【０１４４】

実施形態において、第１の要素は、Ｔ細胞、例えば細胞障害性Ｔ細胞、例えば、ＣＤ８、ＣＤ３、α／βＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、γδＴＣＲ、ＣＤ４５ＲＯ、及び／又はＣＤ４５ＲＡのうち１つ以上を含むＴ細胞に結合する（例えば特異的に結合する）。

【０１４５】

実施形態において、例えばＳｐｉｅｓｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６７：９５－１０６（例えば、参照により本明細書に組み込まれる図１を参照）に記載されるように、ｐＩＣＦは、二重特異性抗体分子、例えば、二重特異性免疫グロブリン（ＢｓＩｇＧ）、付加的な抗原結合分子に作動的に結合された免疫グロブリン、二重特異性抗体（ＢｓＡｂ）フラグメント、二重特異性融合タンパク質、又はＢｓＡｂ抱合体を含む。

【０１４６】

実施形態において、ＢｓＡｂフラグメントは、例えば、リンカー（例えばダイアボディ）、例えば二重親和性再標的化（ＤＡＲＴ）抗体フラグメント又は二重特異性Ｔ細胞エンゲージャ（Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｎｇａｇｅｒ）（ＢｉＴＥ）により作動的に結合される、２つ以上のｓｃＦｖフラグメントを含む。実施形態において、ＢｓＡｂフラグメントは、例えばリンカーにより作動的に結合される２つ以上の単一ドメイン抗体フラグメント（ｄＡｂ）を含む。幾つかの実施形態において、ＢｓＡｂフラグメントは、Ｆｃ領域を含まない。

【０１４７】

実施形態において、ｐＩＣＦは、ＢｓＭＡｂ　ＣＤ１２３／ＣＤ３、ＢｓＭＡｂ　ＣＤ１９／ＣＤ３、及びＥｐＣＡＭ／ＣＤ３から成るリストから選択された二重特異性抗体である。

【０１４８】

実施形態において、ｐＩＣＦは、ＣＤＲ移植足場ドメイン、例えばフィブロネクチン足場ドメインを含む。

【０１４９】

他の実施形態において、抗体分子は、固体表面、例えばビーズ又はポリマーに付けられる（例えば抱合される）。

【０１５０】

本明細書に記載される前述の方法又はアッセイの何れかにおいて、前記方法又はアッセイ

は更に、免疫調節剤（例えば本明細書に記載されるような、免疫チェックポイント分子の阻害剤、免疫細胞のアゴニスト、又は他の免疫調節剤物のうち１つ以上）を提供する工程を含み得る。幾つかの実施形態において、免疫調節剤は、本明細書に記載されるようなエクスビボの反応混合物に加えることができ、それにより、候補のｐＩＣＦ、免疫調節剤、及びサンプルを含むエクスビボの反応混合物を形成する。他の実施形態において、免疫調節剤は、被験体、例えば、併用療法プロトコルの一部として本明細書に記載されるような癌を死滅させるＴ細胞を受ける被験体に投与される。

【０１５１】

１つの実施形態において、免疫調節剤は、免疫チェックポイント阻害剤の阻害剤、例えば、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤、例えば、ＣＴＬＡ４、ＰＤ１、ＰＤＬ１、ＰＤＬ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＢＴＬＡ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、又はＨＶＥＭのうち１つ以上の阻害剤である。実施形態において、免疫調節剤は、Ｔ細胞のアゴニスト、例えば、本明細書に記載されるＴ細胞のアゴニスト、例えば、ＣＤ１３７抗体、ＧＩＴＲ、又はＣＤ４０に対するアゴニスト抗体又はそのフラグメントである。１つの実施形態において、免疫調節剤はＭＤＳＣ及び／又はＴｒｅｇ細胞の阻害剤である。

【０１５２】

１つの実施形態において、免疫調節剤はレナリドミドである。他の実施形態において、免疫調節剤は、腫瘍特異性抗原に対する免疫反応を活性化し、例えばそれはワクチン（例えば、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、又はＭＡＧＥＡ３などの標的に対するワクチン）である。他の実施形態において、免疫調節剤は、サイトカイン、例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ１５、ＩＬ－１８、又はＩＬ－２１のうち１つ以上から選択された組み換え型サイトカインである。他の実施形態において、免疫調節剤は、自己由来のＴ細胞、例えば、腫瘍標的化された細胞外及び細胞内の腫瘍特異性抗原（例えばＣＡＲ　Ｔ細胞又はＴＣＲ　Ｔ細胞）である。また他の実施形態において、免疫調節剤は、アミノ酸異化、腫瘍由来の細胞外ＡＴＰのシグナル伝達、アデノシンシグナル伝達、アデノシン産生、ケモカイン及びケモカイン受容体、異物の認識、又はキナーゼシグナル伝達活性に関連した成分（例えば酵素又は受容体）のモジュレーターである。典型的な薬剤は、ＩＤＯ、ＣＯＸ２、ＡＲＧ１、ＡｒＧ２、ｉＮＯＳ、又はホスホジエステラーゼ（例えばＰＤＥ５）の阻害剤（例えば小分子阻害剤）；ＴＬＲアゴニスト、或いはケモカインアンタゴニストを含む。免疫調節剤の追加の例は、例えばＡｄａｍｓ　ＪＬ（２０１５）とＳｅｒａｆｉｎｉ　Ｐ（２００８）において更に記載されている。

【０１５３】

癌を死滅させるＴ細胞を産生する方法の更なる実施形態

実施形態において、（例えば産生する）方法は、癌を死滅させるＴ細胞調製物、例えば医薬調製物を産生する工程を更に含む。

【０１５４】

実施形態において、（例えば産生する）方法は、癌を死滅させるＴ細胞の存在を検出する工程を更に含む。

【０１５５】

実施形態において、（例えば産生する）方法は、ＩＣＦから癌を死滅させるＴ細胞を精製する工程を更に含む。

【０１５６】

実施形態において、ｐＩＣＦは、例えば、１０重量％未満、例えば１０重量％、９重量％、８重量％、７重量％、６重量％、５重量％、４重量％、３重量％、２重量％、１重量％、０．５重量％、０．１重量％、０．０５重量％、０．０１重量％、０．００５重量％未満、或いはそれ以下（しかし、例えば０．００１重量％以上）の濃度で調製物中に存在する。

好ましい実施形態において、ｐＩＣＦは、０．００５重量％から１０重量％の濃度で調製物中に存在する。

【０１５７】
実施形態において、反応混合物は、数ナノリットル（例えば１０ｎｌ未満、約１～５ナノリットル）の量のｐＩＣＦを含み、これは５０マイクロリットル以上（例えば約６０マイクロリットル）の細胞懸濁液に加えられる。
【０１５８】
実施形態において、調製物は、免疫アッセイによって検出可能なｐＩＣＦ、例えばｐＩＣＦのレベルを含む。
【０１５９】
実施形態において、選択する及び／又は富化する工程（例えば、上述の産生する方法の工程ｉｉ）－ｉｉｉ）又は（ｄ））は、癌細胞膜へと拡散するか、ｉ）１つ以上の癌抗原又はｉｉ）活性化Ｔ細胞の１つ以上のマーカー或いはｉ）とｉｉ）の両方に結合する、蛍光標識された分子（例えば、細胞表面標識、例えば蛍光標識された抗体又はそのフラグメント、細胞追跡色素）を使用する工程を含む。実施形態において、選択する及び／又は富化する工程は、蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）を使用する工程を含む。
【０１６０】
実施形態において、選択する及び／又は富化する工程（例えば、上述の産生する方法の工程ｉｉ）－ｉｉｉ）又は（ｄ））は、ｉ）１つ以上の癌抗原又はｉｉ）活性化Ｔ細胞の１つ以上のマーカー或いはｉ）とｉｉ）の両方に結合する、抗原又はそのフラグメントで被覆されたビーズ（例えば磁気ビーズ）を使用する工程を含む。
【０１６１】
実施形態において、選択する及び／又は富化する工程（例えば、上述の産生する方法の工程ｉｉ）－ｉｉｉ）又は（ｄ））は、少数、例えば不十分な数の癌細胞の連続的な追加を含む。実施形態において、上述の産生する方法は、細胞障害性Ｔ細胞の異なるクローンを生成することができる。実施形態において、癌細胞を死滅させる際に最も有効又は最も強力な細胞障害性Ｔ細胞クローンの選択は、少数、例えば不十分な量の癌細胞を連続的に追加することによって達成され得る。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞を含む反応物に加えられ得る、少ない又は不十分な数或いは量の癌細胞は、活性化Ｔ細胞の数の５０％以下、例えば３０％、１０％、１％、０．１％、又は０．０１％以下である。１つの実施形態において、少ない又は不十分な数の癌細胞は、１回以上、例えば２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０回、癌を死滅させるＴ細胞（例えば、癌細胞、Ｔ細胞、及び／又はｐＩＣＦを含む反応物）に加えられ得る。１つの実施形態において、少ない又は不十分な数の癌細胞は、６時間、１２時間、２４時間、３６時間、又は４８時間ごとに加えられる。実施形態において、加えられる少ない又は不十分な数の癌細胞は、患者の癌細胞である。実施形態において、加えられる少ない又は不十分な数の癌細胞は、患者の癌細胞ではない。実施形態において、加えられる少ない又は不十分な数の癌細胞は、癌細胞株の癌細胞である。
【０１６２】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞は増殖される。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞の増殖は、例えば調製中の癌を死滅させるＴ細胞の数を、例えば少なくとも２倍（例えば、少なくとも約３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、５０倍、１００倍、１０００倍、10^4倍、10^5倍、10^6倍、又はそれ以上）増加させる工程を含む。
【０１６３】
他の実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞は実質的に増殖されない。
【０１６４】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、蛍光標識された分子（例えば、細胞表面標識、例えば蛍光標識された抗体又はそのフラグメント、細胞追跡色素）及び／又はｐＩＣＦを含み、例えば、蛍光標識された分子及び／又はｐＩＣＦは、微量（例えば５重量％未満、例えば５重量％、４重量％、３重量％、２重量％、１重量％、０．５重量％、０．２５重量％、０．１重量％、０．０５重量％、０．０１重量％、０．００５重量％、

０．００１重量％未満、又はそれ以下）で存在する。
【０１６５】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物（精製又は増殖の前）は、調製物中の細胞の総数の５％以下の濃度で癌を死滅させるＴ細胞を含む。
【０１６６】
実施形態において、精製された又は富化された癌を死滅させるＴ細胞調製物は、調製物中の細胞の総数の少なくとも５０％（例えば少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、又はそれ以上）の濃度で癌を死滅させるＴ細胞を含む。
【０１６７】
実施形態において、精製された又は富化された癌を死滅させるＴ細胞調製物は、例えば、調製物中の細胞の総数の少なくとも５０％（例えば少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、又はそれ以上）の濃度で、活性化された癌を死滅させるＴ細胞を含む。
【０１６８】
実施形態において、精製された又は富化された癌を死滅させるＴ細胞調製物は、例えば、調製物中の細胞の総数の少なくとも５０％（例えば少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、又はそれ以上）の濃度で、トロゴサイトーシスで癌を死滅させるＴ細胞を含む。
【０１６９】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は、１つ以上のＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は、１つ以上のＣＤ４＋Ｔ細胞を含む。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は、１つ以上のＣＤ２５＋Ｔ細胞を含む。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は、１つ以上のＣＤ８＋／ＣＤ２５＋ＣＴＬを含む。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は、１つ以上のＣＤ４＋／ＣＤ２５＋Ｔ細胞を含む。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は、１つ以上の細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、例えば癌抗原特異性ＣＴＬを含む。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は、１つ以上のエフェクターメモリーＴ細胞を含む。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、相当な数の調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）を含まない。
【０１７０】
実施形態において、（例えば産生する）方法は、癌を死滅させるＴ細胞調製物中のＴｒｅｇの数を減らす工程を更に含む。１つの実施形態において、ｐＩＣＦは、癌を死滅させるＴ細胞を選択的に増殖し、それにより、癌を死滅させるＴ細胞：Ｔｒｅｇの有効Ｅ：Ｔ比率を増加させる。
【０１７１】
他の実施形態において、前記方法は、例えばＴｒｅｇ細胞表面マーカーに付けられるビーズ（例えば磁気ビーズ）を使用する、物理的分離によってＴｒｅｇを除去（例えば、枯渇）する工程を更に含む。
【０１７２】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、調製物中の細胞の総数の１０％未満（例えば、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％未満、又はそれ以下）の濃度でＴｒｅｇを含む。
【０１７３】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、相当な数のナイーブＴ細胞を含まない。
【０１７４】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、調製物中の細胞の総数の１０％未満（例えば、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％未満、又はそれ以下）の濃度でナイーブＴ細胞を含む。

【０１７５】
実施形態において、ナイーブＴ細胞は、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２７、ＣＤ２８、及び／又はＣＤ５７を発現する。
【０１７６】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、癌を死滅させるＴ細胞の１より多くのクローンを含む。
【０１７７】
実施形態において、（例えば産生する）方法は、癌を死滅させるＴ細胞調製物から個々のクローンを分離する工程を更に含む。
【０１７８】
実施形態において、分離する工程は、単細胞のクローン増殖（例えば、（ｉ）癌を死滅させるＴ細胞の調製物を単細胞（例えば、ウェル又は容器につき１つの単細胞）へと分離する工程、及び（ｉｉ）癌を死滅させるＴ細胞の１つ以上の調製物を生成するために単細胞を増殖する工程、ここで各調製物は単一のクローンを含む）を含む。
【０１７９】
実施形態において、分離する工程はフローサイトメトリー又は限界希釈を含む。
【０１８０】
実施形態において、（例えば産生する）方法は更に、癌を死滅させるＴ細胞調製物の癌を死滅させる活性を判定する工程、及び随意に、癌細胞を死滅させる活性の増加、毒性の減少、オフターゲット効果の減少、生存度の増加、増殖の増加、又は癌細胞の死滅について有効Ｅ：Ｔ比率のうち１つ以上から選択されたパラメーターに基づいて調製物を選択する工程を含む。
【０１８１】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、高い癌を死滅させる活性及び／又は低い毒性を持つ細胞を含む。
【０１８２】
低い毒性を持つ癌を死滅させるＴ細胞調製物に含まれる細胞は、著しく少ない非病理学的細胞を死滅させる、即ちより選択的に死滅させる細胞である。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は低い毒性を持つ細胞を含み、このことは、それら細胞が上清中及び／又は細胞内で少数のサイトカインを生成するためである。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、より高い癌を死滅させる活性及び低い毒性を共に且つ同時に持つ細胞を含む。このことは、それら細胞が癌細胞死滅の単位につき上清中で及び／又は細胞内で少数のサイトカインを生成するためであり、即ち、一度、放出されたサイトカインのタイプ及び／又はレベルが、有効Ｅ：Ｔ比率、ＥＣ５０、Ｅｍａｘ、動態、又はこれら要因の組み合わせなどの癌細胞を死滅させる活性の定量によって標準化されるためである。
【０１８３】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、１つのＴ細胞につき１つの高い標的細胞にて癌細胞を効果的に死滅させる細胞を含む。実施形態において、高い標的細胞に対するＴ細胞の比率は、約１：４～１：１００（例えば１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１５、１：２０、１：２５、１：３０、１：３５、１：４０、１：４５、１：５０、１：７５、１：１００、それ以上）である。
【０１８４】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、癌を死滅させるＴ細胞の１０未満のクローンから成る細胞の集団を含む。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞の１０、９、８、７、６、５、４、３、２、又は１つのクローンは調製物に存在する。１つの実施形態において、２－４つのクローンが調製物に存在する。他の実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞の単一のクローンが存在する。
【０１８５】
実施形態において、（例えば産生する）方法のＴ細胞又はＴ細胞サンプル、及び（例えば産生する）方法の癌細胞又は癌細胞サンプルは、同じ被験体由来である。

【０１８６】
実施形態において、（例えば産生する）方法のＴ細胞又はＴ細胞サンプル、及び（例えば産生する）方法の癌細胞又は癌細胞サンプルは、異なる被験体由来である。
【０１８７】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は被験体に投与され、例えば、被験体は、Ｔ細胞（及び／又は、癌細胞）が得られた被験体と同じ被験体である。
例えば、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は自己由来である。
【０１８８】
実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は被験体に投与され、例えば、被験体は、Ｔ細胞（及び／又は、癌細胞）が得られた被験体とは異なる被験体である。例えば、癌を死滅させるＴ細胞又は調製物は同種である。
【０１８９】
実施形態において、（例えば産生する）方法は、Ｔ細胞を含むサンプルを提供する工程を含む。実施形態において、（例えば産生する）方法は、癌細胞を含むサンプルを提供する工程を含む。
【０１９０】
実施形態において、（例えば産生する）方法のＴ細胞及び癌細胞は、同じサンプルに由来する。
【０１９１】
実施形態において、（例えば産生する）方法のＴ細胞及び癌細胞は、異なるサンプルに由来する。
【０１９２】
実施形態において、サンプルは、微小環境を持つ組織、例えば骨髄、リンパ節、原発性腫瘍、転移に由来する。
【０１９３】
実施形態において、サンプルは、被験体の血液（例えば全血、末梢血、又は骨髄）、固形腫瘍（例えば原発性腫瘍又は転移から切除されたサンプル）、リンパ節、或いは脾臓を含む。実施形態において、サンプルは、血液サンプル、例えば全血、末梢血、又は骨髄であり、構成成分（例えば細胞又は血漿）は実質的に血液サンプルから除去或いは単離されていない。実施形態において、サンプルは、例えば工程（ｃ）の前及び／又はその間に、例えば生理学的に互換性をもつ緩衝液又は培地で希釈される。
【０１９４】
実施形態において、（例えば産生する）方法は、被験体の血液サンプルからＴ細胞を提供する工程を含み、例えばＴ細胞は、血液サンプル中の他の構成成分、例えば細胞又は血漿から精製されない。実施形態において、血液サンプルは、骨髄サンプル、末梢血サンプル、又は全血サンプルである。
【０１９５】
実施形態において、（例えば産生する）方法は、被験体の血液サンプルから癌細胞を提供する工程を含み、例えば癌細胞は、血液サンプル中の他の構成成分、例えば細胞又は血漿から精製されない。実施形態において、血液サンプルは、骨髄サンプル、全血サンプル、又は末梢血サンプルである。
【０１９６】
実施形態において、（例えば産生する）方法の癌細胞は、例えば血液サンプル、例えば被験体の末梢血サンプルの循環癌細胞を含む。
【０１９７】
実施形態において、（例えば産生する）方法は、被験体の例えば腫瘍又は転移の組織サンプル、例えば生検から癌細胞を提供する工程を含む。
【０１９８】
実施形態において、（例えば産生する）方法は、Ｔ細胞と癌細胞の両方を含むサンプル、例えば血液サンプル（例えば骨髄、末梢血、又は全血のサンプル）を提供する工程を含む。

【０１９９】
実施形態において、被験体は成人又は小児の被験体である。
【０２００】
実施形態において、癌は血液癌、例えばＢ細胞又はＴ細胞悪性である。
【０２０１】
実施形態において、癌は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えばＢ細胞リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病）、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、又は急性リンパ性白血病である。
【０２０２】
実施形態において、癌は固形癌であり、例えば固形癌は、卵巣癌、直腸癌、胃癌、精巣癌、肛門癌、子宮癌、結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、小腸癌、食道癌、黒色腫、カポジ肉腫、内分泌系の癌、甲状腺癌副甲状腺癌、副腎癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部の癌、皮膚又は眼内の悪性黒色腫、子宮癌、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、扁平上皮癌、子宮頚扁平上皮癌の癌腫、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、膣癌、軟組織の肉腫、尿道癌、外陰癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓又は尿管の癌、腎盤の癌腫、脊椎の軸の腫瘍、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管新生、上述の癌の転移性病巣、又はそれらの組み合わせを含む。
【０２０３】
実施形態において、癌は黒色腫ではない。
【０２０４】
実施形態において、（例えば産生する）方法は、サンプルをｐＩＣＦに接触させる前に蛍光分子で癌細胞（例えば癌細胞膜）を標識する工程を含まない。
【０２０５】
実施形態において、被験体は、
（ａ）以前に癌の処置を受けていない；
（ｂ）以前に癌の処置を１回以上受けた；又は
（ｃ）微小残存病変（ＭＲＤ）がある。
【０２０６】
実施形態において、期間は、１２～１２０時間（例えば１２－２４時間、２４－４８時間、４８－３６時間、３６－６０時間、６０－９０時間、又は９０－１２０時間）、或いは１－７日（例えば１、２、３、４、５、又は７日）である。
【０２０７】
実施形態において、本明細書に記載される方法は、Ｔ細胞及び癌細胞の異なるサンプルを使用して、サンプル又は細胞を提供する工程、エクスビボの反応物形成工程、及び／又は富化工程（例えば、産生する方法の工程（ａ）－（ｄ））を繰り返す工程を更に含み、例えば工程の繰り返しはそれぞれ、Ｔ細胞及び癌細胞の異なるサンプルを使用する。実施形態において、Ｔ細胞及び癌細胞の異なるサンプルは、微小環境を持つ組織、例えば骨髄、リンパ節、原発性腫瘍、又は転移に由来するサンプルを含む。
【０２０８】
実施形態において、工程の繰り返しそれぞれから産生された癌を死滅させるＴ細胞は、癌を死滅させるＴ細胞の混合物を形成するために貯留される。
【０２０９】
実施形態において、Ｔ細胞はＣＴＣを含み、Ｔ細胞は被験体のサンプル（例えば、血液（例えば全血、末梢血、又は骨髄）、リンパ節、原発性腫瘍、又は転移）由来である。実施形態において、Ｔ細胞はＣＴＣのために富化される。実施形態において、Ｔ細胞は、例えば、例えば被験体の血液サンプル（例えば全血、末梢血、又は骨髄）の細胞の他のタイプから精製される。
【０２１０】

実施形態において、前記方法は、被験体のＴ細胞の異なるサンプルを使用して、サンプル又は細胞を提供する工程、エクスビボの反応物形成工程、及び／又は富化工程（例えば、産生する方法の工程（ａ）－（ｄ））を繰り返す工程を更に含み、例えば工程の繰り返しはそれぞれ、被験体のＴ細胞の異なるサンプルを使用する。

【０２１１】

実施形態において、Ｔ細胞の異なるサンプルは、被験体の癌含有組織、例えば原発性腫瘍、１つ以上の転移、リンパ節、リンパ液サンプル、又は血液サンプル（例えば全血、末梢血、又は骨髄）に由来するサンプルを含む。

【０２１２】

実施形態において、サンプル又は細胞を提供する工程、エクスビボの反応物形成工程、及び／又は富化工程（例えば、産生する方法の工程（ａ）－（ｄ））の繰り返しそれぞれから産生された、癌を死滅させるＴ細胞は、癌を死滅させるＴ細胞の混合物を形成するために貯留される。

【０２１３】

実施形態において、（例えば産生する）方法は、癌を死滅させるＴ細胞の癌を死滅させる活性を評価する工程を更に含む。特定の実施形態において、評価する工程は、

（ａ）癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞を死滅させることを可能にするのに十分な条件（例えば一定期間にわたる）の下で、癌を死滅させるＴ細胞を、癌由来の標的細胞（例えば、標的細胞は癌由来の細胞株を含み、例えば標的細胞は被験体から単離されない）に接触させる工程；

（ｂ）工程（ａ）の後に標的細胞の数を判定し、及び随意に工程（ａ）の後に癌を死滅させるＴ細胞の数を判定する工程

を含み；

ここで、接触させる工程の前の標的細胞の数と比較した標的細胞の数の減少は、癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞の死滅に有効であることを示す。実施形態において、例えば接触させる工程の前の癌を死滅させるＴ細胞の数と比較した、癌を死滅させるＴ細胞の数の増加は、癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞の死滅に有効であることを示す。

【０２１４】

特定の実施形態において、評価する工程は、

（ａ）例えば被験体（例えば本明細書に記載されるような癌を持つ被験体）から、例えば本明細書に記載される方法に従い産生される癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物を提供する工程；

（ｂ）標的細胞（例えば癌細胞）を提供する工程であって、例えば癌細胞は被験体由来である、工程；

（ｃ）癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞を死滅させることを可能にするのに十分な（例えば一定期間にわたる）条件下で、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物を標的細胞（例えば癌細胞）と接触させる工程（実施形態において、接触させる工程は更に、例えば異なる容量（例えば投与量を増大）での、ｐＩＣＦの追加を更に含む）；

（ｄ）工程（ｃ）の後に標的細胞のレベルを判定し、及び随意に、工程（ｃ）の後に癌を死滅させるＴ細胞のレベルを判定する工程（実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞のレベルは、工程（ｃ）の後に１つ以上の時間間隔で判定される）；及び（随意に）（ｅ）工程（ｄ）から、Ｔ細胞に対する標的細胞、又は標的細胞に対するＴ細胞の何れかの比率を判定する工程（例えば、本明細書に記載されるような有効Ｅ：Ｔ比率を判定する工程）

を含む。

【０２１５】

実施形態において、評価する工程は、例えば本明細書に記載される方法を使用して癌を死滅させるＴ細胞を生成するために、例えばＴ細胞と癌細胞を含む、第１の患者サンプルを使用する工程を含む。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞は精製され、選別され、富化され、増殖され、及び／又は選択される。実施形態において、評価する工程は、同じ

患者の第２のサンプルを、第１患者のサンプルを使用して精製された癌を死滅させるＴ細胞と引き続き混合する工程を含む。実施形態において、様々な濃度の癌を死滅させるＴ細胞を第２のサンプルと混合することができ、例えば第２のサンプルは、例えば用量反応曲線を生成するために固定濃度にある。

【０２１６】

従って、実施形態において、評価する工程は、

（ａ）例えば請求項１に記載の方法に従い、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物を産生する工程であって、Ｔ細胞と癌細胞は患者のサンプルに存在する、工程、

（ｂ）工程（ａ）の癌を死滅させるＴ細胞を随意に増殖し、選択し、富化し、及び／又は精製する工程、

（ｃ）工程（ａ）又は（ｂ）の癌を死滅させるＴ細胞を、例えば同じ患者の第２のサンプルと接触させる工程であって、第２のサンプルは１つ以上の癌細胞を含み、癌を死滅させるＴ細胞は癌細胞と接触させられる、工程、及び

（ｄ）本明細書に記載されるように用量反応及び／又は薬力学的パラメーターを判定する工程

を含む。

【０２１７】

実施形態において、エクスビボの混合物中の癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシス細胞）の活性のレベルは、有効Ｅ：Ｔ比率、ＥＣ５０、Ｅｍａｘ、動態、又はこれらの要素の組み合わせによって測定される。

【０２１８】

実施形態において、工程（ｃ）は、複数の比率、例えば有効Ｅ：Ｔ比率で、癌細胞を、癌を死滅させるＴ細胞と接触させる工程を含む。

【０２１９】

実施形態において、工程（ｃ）は、異なる量の癌を死滅させるＴ細胞を固定量の癌細胞と混合する工程を含む。

【０２２０】

前述の方法の何れかの幾つかの実施形態において、有効Ｅ：Ｔ比率が得られる。１つの実施形態において、有効Ｅ：Ｔ比率は、ｐＩＣＦの暴露の後の、癌細胞に対する癌を死滅させるＴ細胞の比率である。

【０２２１】

前述の方法の何れかの実施形態において、例えば基準レベルに比べて、癌細胞のレベル又は量の減少は、癌細胞死滅の増加を示す。他の実施形態において、例えば基準レベルに比べて、癌細胞のレベル又は量における変化の減少又は実質的に変化が無いことは、癌細胞死滅の減少を示す。

【０２２２】

前述の方法の何れかの実施形態において、Ｔ細胞に比べて高レベルの標的細胞（例えば、標的細胞と癌を死滅させるＴ細胞との高い有効Ｅ：Ｔ比率）は、癌をさせるＴ細胞又はその調製物が癌細胞の有効なキラーであることを示している。１つの実施形態において、Ｔ細胞に対する標的の比率は基準の比率と比較される。例えば、１（癌を死滅させるＴ細胞）対１００（例えば１０、２０、３０、４０、５０、７５、１００、又はそれ以上）（標的細胞）の有効Ｅ：Ｔ比率は、強力なＴ細胞を死滅させる活性を示す。強力な細胞を死滅させる活性を持つＴ細胞を有する被験体は、ｐＩＣＦに対して強く反応すると識別され得る。

【０２２３】

代替的に、Ｔ細胞に比べて低レベルの標的細胞（例えば、標的細胞と癌を死滅させるＴ細胞との低い有効Ｅ：Ｔ比率）は、貧しいＴ細胞を死滅させる活性を示す。１つの実施形態において、Ｔ細胞に対する標的の比率は基準の比率と比較される。１つの実施形態において、１（癌を死滅させるＴ細胞）対５（標的細胞）（例えば１、３、又は５）の有効Ｅ：Ｔ比率は、貧しいＴ細胞を死滅させる活性を示す。細胞を死滅させる活性が減少したＴ細

胞を有する被験体は、ｐＩＣＦに対する反応が貧しいと識別され得る。
【０２２４】
前述の方法の何れかの実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させるＴ細胞のレベルは、工程（ｃ）の後に１つ以上の時間間隔で判定される。典型的な実施形態において、標的細胞及び／又は癌を死滅させる細胞のレベルは、工程（ｃ）の後に、０時間、１－７５時間（例えば１、２、４、８、１６、２４、３６、又は７２時間）、或いは数日で判定される。
【０２２５】
前述の方法の何れかの実施形態において、接触させる工程は更に、例えば用量反応曲線を生成するために、ｐＩＣＦの異なる用量（例えば投与量の増大）でのｐＩＣＦの追加を含む。１つの実施形態において、ｐＩＣＦのゼロ用量又は対照レベル（例えば閾値用量）での癌を死滅させるＴ細胞又は癌細胞のレベルと飽和用量でのレベルとの差が、判定される。実施形態において、飽和用量での癌を死滅させるＴ細胞又は癌細胞のレベル対閾値用量でのレベルの差が判定される。実施形態において、本明細書で使用されるような有効Ｅ：Ｔ比率は、癌細胞のレベルの差に対する癌を死滅させるＴ細胞のレベルの差の比率である。
【０２２６】
前述の方法の何れかの実施形態において、前記方法は、自動化プラットフォーム、例えば、自動化の蛍光ベースのプラットフォーム、例えば本明細書に記載されるＥｘｖｉＴｅｃｈプラットフォームを使用して実行される。
【０２２７】
前述の方法又はアッセイの何れかの実施形態において、ｐＩＣＦ及び／又は免疫調節剤の活性が、用量反応曲線を測定するためにエクスビボ／インビトロのアッセイを使用して判定され、その数学的フィッティングにより、ＥＣ５０、有効Ｅ：Ｔ比率、Ｅｍａｘ、又は動態の少なくとも１つから選択される定量パラメーターは活性を推定することができる。前述の方法の何れかの実施形態において、工程（ｅ）により評価されたｐＩＣＦの活性は、例えば標準の枯渇用量反応曲線と比較して、ｐＩＣＦの活性の用量反応を使用する活性の評価とは異なる。
【０２２８】
前述の方法の何れかの実施形態において、基準比率は、予め定められた比率であり、例えば、約１：３～１：１０、例えば約１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、又は１：１０である。実施形態において、工程（ｅ）の標的細胞とＴ細胞との高い比率は、約１：４～１：１００（例えば１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１５、１：２０、１：２５、１：３０、１：３５、１：４０、１：４５、１：５０、１：７５、１：１００、又はそれ以上）である。
【０２２９】
前述の方法の何れかの実施形態において、工程（ｃ）は、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物と標的細胞、例えば癌細胞とのエクスビボ混合物を形成する工程を含む。実施形態において、癌細胞は、血液癌、固形癌、転移癌（例えば、ＣＴＣ、又はそれらの組み合わせ）から選択された細胞である。実施形態において、癌細胞は、白血病又はリンパ腫芽細胞（例えばＣＤ１９、ＣＤ１２３、ＣＤ２０、又はその他から選択された１つ以上のマーカーを発現する芽細胞）である。実施形態において、Ｔ細胞は、血液サンプル（例えば末梢血サンプル）、骨髄サンプル、リンパ節サンプル、ＣＴＬ及び／又はＴＩＬを含む腫瘍サンプル、又はそれらの組み合わせから選択される細胞である。実施形態において、Ｔ細胞はＣＤ８及び／又はＣＤ２５を発現する（例えば、それはＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞である）。
【０２３０】
前述の方法の何れかの実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物は、ｐＩＣＦ、例えば本明細書に記載されるｐＩＣＦの使用を含む方法を使用して産生される。
【０２３１】
前述の方法の何れかの実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞又はその調製物は、ＣＤ

８＋及びＣＤ２５＋であるＴ細胞、例えばＣＴＬを含む。幾つかの実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞はトロゴサイトーシスＴ細胞である。他の実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞はＣＤ２８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞である。

【０２３２】

前述の方法の何れかの実施形態において、癌を死滅させる細胞は、（ｉ）癌細胞に対する細胞傷害性活性を有し、且つ（ｉｉ）癌細胞由来の細胞表面マーカー、例えば細胞表面マーカーの少なくとも９０－５００のコピー（例えば、９０、１００、２００、３００、４００、又は５００のコピー、例えば１つ以上の癌細胞表面マーカー）を含む。

【０２３３】

前述の方法の何れかの実施形態において、反応混合物中のＴ細胞の合計のうち約２～７５％（例えば、約２～７０％、２～６０％、２～５０％、又は２～４０％）は、１つ以上の癌細胞表面マーカー（例えば１つ以上の白血病細胞癌）を発現する。

【０２３４】

実施形態において、癌を死滅させる細胞は富化又は精製される。幾つかの実施形態において、富化又は精製された癌を死滅させる細胞の集団は、少なくとも８０％－１００％の癌を死滅させるＴ細胞（例えば８０％、９０％、９５％、９９％、又は１００％）を含み、癌を死滅させる細胞は１つ以上の癌細胞表面マーカーを含む。

【０２３５】

実施形態において、エクスビボの反応混合物は、適正製造基準（ＧＭＰ）に従い調製される。実施形態において、癌を死滅させるＴ細胞の増殖、選択、及び／又は富化のうち１つ以上は、適正製造基準（ＧＭＰ）に従うものである。実施形態において、前記方法は更に、産生された癌を死滅させるＴ細胞を、例えば病院や医療従事者に送る工程を含む。実施形態において、前記方法は更に、例えば病院や医療従事者から、Ｔ細胞、癌細胞、又はその両方を受け取る工程を含む。

【０２３６】

処置方法の更なる実施形態

実施形態において、（例えば処置する）方法は、第２の治療薬又は手順を施す工程を更に含む。実施形態において、第２の治療薬又は手順は、化学療法、標的とされた抗癌治療、腫瘍崩壊薬物、細胞傷害性薬剤、免疫ベースの治療、サイトカイン、外科的処置、放射線処置、Ｔ細胞のアゴニスト（例えば、アゴニスト抗体又はそのフラグメント、或いは共刺激分子の活性化因子）、抑制分子の阻害剤（例えば免疫チェックポイント阻害剤）、免疫調節剤、ワクチン、又は細胞免疫療法のうち１つ以上から選択される。

【０２３７】

実施形態において、第２の治療薬は、Ｔ細胞のアゴニスト（例えば、アゴニスト抗体又はそのフラグメント、或いは共刺激分子の活性化因子）、又は免疫チェックポイント阻害剤である。

【０２３８】

実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ４、ＰＤ１、ＰＤＬ１、ＰＤＬ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＢＴＬＡ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、又はＨＶＥＭのうち１つ以上の阻害剤である。

【０２３９】

幾つかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、イピリムマブ、トレメリムマブ、ＭＤＸ－１１０６、ＭＫ３４７５、ＣＴ－０１１、ＡＭＰ－２２４、ＭＤＸ－１１０５、ＩＭＰ３２１、又はＭＧＡ２７１のうち１つ以上を含む。

【０２４０】

実施形態において、Ｔ細胞のアゴニストは、ＣＤ１３７、ＣＤ４０、及び／又はグルココルチコイド誘導ＴＮＦ受容体（ＧＩＴＲ）に対する抗体又はそのフラグメントを含む。

【０２４１】

１つの実施形態において、免疫調節剤はＭＤＳＣ及び／又はＴｒｅｇ細胞の阻害剤である。実施形態において、免疫調節剤はレナリドミドを含む／レナリドミドである。

【０２４２】
実施形態において、第２の治療薬は、Ｔ細胞の免疫適格性を増強及び／又は回復させる。
【０２４３】
他の実施形態において、免疫調節剤は、腫瘍特異性抗原に対する免疫反応を活性化し、例えばそれはワクチン（例えば、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、又はＭＡＧＥＡ３などの標的に対するワクチン）である。他の実施形態において、免疫調節剤は、サイトカイン、例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ１５、ＩＬ－１８、又はＩＬ－２１のうち１つ以上から選択された組み換え型サイトカインである。他の実施形態において、免疫調節剤は、自己由来のＴ細胞、例えば、腫瘍標的化された細胞外及び細胞内の腫瘍特異性抗原（例えばＣＡＲ　Ｔ細胞又はＴＣＲ　Ｔ細胞）である。また他の実施形態において、免疫調節剤は、アミノ酸異化、腫瘍由来の細胞外ＡＴＰのシグナル伝達、アデノシンシグナル伝達、アデノシン産生、ケモカイン及びケモカイン受容体、異物の認識、又はキナーゼシグナル伝達活性に関連した成分（例えば酵素又は受容体）のモジュレーターである。典型的な薬剤は、ＩＤＯ、ＣＯＸ２、ＡＲＧ１、ＡｒＧ２、ｉＮＯＳ、又はホスホジエステラーゼ（例えばＰＤＥ５）の阻害剤（例えば小分子阻害剤）；ＴＬＲアゴニスト、或いはケモカインアンタゴニストを含む。免疫調節剤の更なる例は本明細書に記載されている。
【０２４４】
組成物と反応混合物の更なる実施形態
実施形態において、ｐＩＣＦは、抗体分子、例えば二重特異性抗体又はそのフラグメント、例えば、二重特異性免疫グロブリン（ＢｓＩｇＧ）、付加的な抗原結合分子に作動的に結合された免疫グロブリン、二重特異性抗体（ＢｓＡｂ）フラグメント、二重特異性融合タンパク質、又はＢｓＡｂ抱合体を含む。
【０２４５】
実施形態において、ｐＩＣＦは、ＢｓＭＡｂ　ＣＤ１２３／ＣＤ３、ＢｓＭＡｂ　ＣＤ１９／ＣＤ３、及びＥｐＣＡＭ／ＣＤ３から成るリストから選択された二重特異性抗体である。
【０２４６】
実施形態において、ｐＩＣＦは、検出可能な量、例えば、１０重量％未満、例えば１０重量％、９重量％、８重量％、７重量％、６重量％、５重量％、４重量％、３重量％、２重量％、１重量％、０．５重量％、０．１重量％、０．０５重量％、０．０１重量％、０．００１％重量％未満、或いはそれ以下（しかし、０．０００１重量％以上）の濃度で、本明細書に記載される組成物中に存在する。１つの実施形態において、ｐＩＣＦは１％未満のレベルで存在する。好ましい実施形態において、ｐＩＣＦは、０．００５重量％から１０重量％の濃度で調製物中に存在する。
【０２４７】
実施形態において、癌を死滅させる細胞は活性化Ｔ細胞を含む。
【０２４８】
実施形態において、癌を死滅させる細胞は、トロゴサイトーシスを受ける細胞、例えば癌細胞の細胞膜の一部を含む細胞を含む。
【０２４９】
実施形態において、癌を死滅させる細胞は、Ｔ細胞、例えば細胞傷害性Ｔリンパ球、例えばＣＤ８＋Ｔ細胞である。
【０２５０】
実施形態において、組成物又は調製物は、相当な数の癌細胞、例えば、組成物又は調製物中の細胞の総数の３０％未満（例えば、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、２．５％、１％、０．５％、０．１％未満、又はそれ以下）の濃度での癌細胞を含まない。
【０２５１】
実施形態において、組成物又は調製物は、相当な数の調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、例えば、組成物又は調製物中の細胞の総数の３０％未満（例えば、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、２．５％、１％、０．５％、０．１％未満、又はそれ以下）の濃度

でのＴｒｅｇを含まない。
【０２５２】
実施形態において、組成物又は調製物は、相当な数のナイーブＴ細胞、例えば、組成物又は調製物中の細胞の総数の３０％未満（例えば、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、２．５％、１％、０．５％、０．１％未満、又はそれ以下）の濃度でのナイーブＴ細胞を含まない。
【０２５３】
実施形態において、組成物又は調製物は、相当な数の赤血球、例えば、組成物又は調製物中の細胞の総数の３０％未満（例えば、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、２．５％、１％、０．５％、０．１％未満、又はそれ以下）の濃度での赤血球を含まない。
【０２５４】
実施形態において、組成物又は調製物は、相当な数の非免疫細胞、例えば、組成物又は調製物中の細胞の総数の３０％未満（例えば、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、２．５％、１％、０．５％、０．１％未満、又はそれ以下）の濃度での非免疫細胞を含まない。
【０２５５】
実施形態において、組成物又は調製物は、組成物又は調製物中の細胞の総数の少なくとも３０％（例えば、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、又はそれ以上）の濃度で活性化Ｔ細胞を含む。
【０２５６】
実施形態において、組成物又は調製物は、組成物又は調製物中の細胞の総数の少なくとも３０％（例えば、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、又はそれ以上）の濃度でトロゴサイトーシスＴ細胞を含む。
【０２５７】
また本明細書には、被験体の癌（例えば、血液癌、固形癌、又は転移癌）の処置に使用する（例えば、処置用の薬物の調製に使用する）ための、（例えば、本明細書に記載される方法により作られた）癌を死滅させるＴ細胞の調製も提供される。
【０２５８】
また本明細書には、被験体の癌（例えば、血液癌、固形癌、又は転移癌）の処置に使用する（例えば、処置用の薬物の調製に使用する）ための、癌を死滅させるＴ細胞も提供され、癌を死滅させるＴ細胞は、以下を含む方法によって産生される：
（ａ）被験体からサンプルを提供する工程であって、サンプルはＴ細胞と癌細胞を含む、工程；
（ｂ）例えば一定期間にわたり、サンプルを近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）と接触させる工程；及び
（ｃ）癌細胞から細胞表面マーカーを獲得した、癌を死滅させるＴ細胞を富化する工程。
【０２５９】
また本明細書では、被験体の癌（例えば、血液癌又は固形癌）の処置に使用する（例えば、処置用の薬物の調製に使用する）ための、癌を死滅させるＴ細胞も特徴とされ、癌を死滅させるＴ細胞は、以下を含む方法によって産生される：
（ａ）被験体から腫瘍サンプルを提供する工程；
（ｂ）被験体から血液サンプル（例えば末梢血サンプル）を提供する工程であって、血液サンプルはＴ細胞を含む、工程；
（ｃ）例えば一定期間にわたり、腫瘍サンプルを血液サンプル及び近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）と接触させる工程；及び
（ｄ）癌細胞から細胞表面マーカーを獲得した、癌を死滅させるＴ細胞を富化する工程。
【０２６０】
他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術的用語及び科学的用語は、本発明の属する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。

本明細書に記載されるものと同様の、又はそれらに等しい方法及び材料が、本発明の実施又は試験に使用され得るが、適切な方法及び材料は以下に記載される。刊行物、特許出願、特許、及び本明細書で言及される他の引用文献は全て、それら全体における参照によって組み込まれるものとする。抵触が生じた場合、定義を含む本明細書が統制することになる。加えて、材料、方法、及び例は例示的なものに過ぎず、制限するようには意図されていない。

【０２６１】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び請求項から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【０２６２】

【図１】事前にｐＩＣＦと共にサンプルをインキュベートすることによって生成した細胞傷害性Ｔ細胞に、続いて少数の腫瘍細胞を加えることによって細胞傷害性Ｔ細胞を選択する典型的なプロセスを示すスキーム。

【図２】トロゴサイトーシスを測定するために使用される、細胞表面標識のメカニズムを示すスキーム。上側のパネルは、癌細胞上の特定の細胞表面マーカーを認識する蛍光標識された抗体による、細胞表面標識を図示する。下側のパネルは、細胞追跡色素による、癌細胞の非特異的な細胞表面標識を示す。標識抗体または細胞追跡色素がＴ細胞表面に存在するように、標識された腫瘍細胞とＴ細胞の遭遇は、標識された腫瘍細胞とＴ細胞との間の免疫シナプスの形成、およびＴ細胞により腫瘍細胞膜部分が組み込まれるトロゴサイトーシスをもたらす。

【図３】癌を死滅させるＴ細胞（細胞傷害性Ｔ細胞）と癌細胞との間に形成された免疫シナプスを示す画像であり、ここでＴ細胞はその触手を広げて癌細胞を捕らえている。この接触には、両方の細胞にわたる膜の区画を含むそれぞれの細胞膜が深く重なり合う。

【図４】細胞表面（上部）の標的に特異的に結合する蛍光標識抗体、および脂質膜二重層内に非特異的に分布する蛍光性の脂肪好性分子である細胞追跡色素を使用した細胞表面標識によるトロゴサイトーシスの測定を示すスキームである。

【図５】癌細胞とＴ細胞の両方を含むサンプル中で細胞追跡色素を使用してトロゴサイトーシスを測定する典型的なプロセスを示すスキームである。まず、癌細胞、Ｔ細胞およびｐＩＣＦを一緒にインキュベートする（例えば１４４時間）。ｐＩＣＦは除去可能であり（例えば洗浄工程による）、および混合物中に高パーセントの細胞傷害性Ｔ細胞と低パーセントの癌細胞があるように、生成された細胞傷害性Ｔ細胞は癌細胞を殺す。細胞追跡色素で標識された第２セットの癌細胞が導入され得、およびトロゴサイトーシスは、第２セットの癌細胞からの標識細胞膜として組込んだＴ細胞の識別によって測定され得る。

【図６】様々な濃度の腫瘍標的ＣＤ３　Ｔ細胞二重特異性抗体でのインキュベーション後の、多発性骨髄腫患者からの骨髄サンプルにおけるＴリンパ球細胞数（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋）および形質細胞数を示すグラフである。

【図７】様々な濃度のＣＤ１９（腫瘍標的）／ＣＤ３（Ｔ細胞標的）二重特異性抗体でのインキュベーション後の、慢性リンパ性白血病患者からの末梢血サンプルにおける悪性Ｂ細胞数およびＴリンパ球様細胞数（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋）を示すグラフ。

【図８】様々な濃度のＣＤ１２３（腫瘍標的）／ＣＤ３（Ｔ細胞標的）二重特異性抗体でのインキュベーション後の、３人の急性骨髄性白血病患者からの骨髄サンプル（サンプル１、２および３）からの、芽細胞数およびＴリンパ球様細胞数（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋）を示すグラフ一式。

【図９】薬物（二重特異性モノクローナル抗体）でのインキュベーションの前（図９Ａおよび９Ｂ）および後（図９Ｃ）の、ＡＭＬ患者の骨髄サンプルにおける様々な種類の細胞集団を示すグラフである。図９Ｃの円は、トロゴサイトーシス集団ＣＤ１１７＋／ＣＤ３＋の出現を示す。

【図１０】１４４時間、ＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂに接触させた後の、新しく生成されたＣＴＬ集団（トロゴサイトーシス細胞）の殺滅能力を示す実験の、フローサイトメトリーのドットプロット（ＣＤ１１７対ＣＤ３）である。図１０Ａは、１４４時間のＢｓ

ＭＡｂ暴露後の、第１のＡＭＬサンプルからのドットプロットを示し、ここでＡＭＬ芽細胞（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）は除去され、新たに生成されたＴ細胞（ＣＤ３＋／ＣＤ１１７－）のみが残る。図１０Ｂは、芽細胞（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）と低レベルの残存Ｔ細胞（ＣＤ１１７－／ＣＤ３＋）が存在する同じ患者からの、凍結保存された新たなバイアルのドットプロットを示す。図１０Ｃは、０時間点における図１０Ａと図１０Ｂのサンプルの混合物のドットプロットを示し、ここではＴ細胞（ＣＤ３＋／ＣＤ１１７－）および新たなＡＭＬ芽細胞（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）の両方の存在を見ることができる。図１０Ｄは、２４時間のインキュベーション後のドットプロットであり、ここでＡＭＬ芽細胞（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）は明らかに、あらかじめ生成されたＴ細胞集団の存在下において失われた。これはＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂのない状態で行われた。

【図１１】薬物（二重特異性抗体）の再導入の有無両方において、ＡＭＬ芽細胞を殺すために新たに生成されたトロゴサイトーシスＴ細胞の能力の経時的な結果を示すグラフ。

【図１２】Ｅ：Ｔ比率（図１２Ａ）、またはＴ細胞数（図１２Ｂ）による、ＡＭＬサンプルからの芽細胞に対する選別された活性化Ｔリンパ球（ＣＤ４＋ＣＤ２５＋、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋、およびＣＤ４＋ＣＤ２５＋／ＣＤ８＋ＣＤ２５＋の混合）による標的細胞溶解の代表的なプロット一式（腫瘍細胞生存％）。個々のデータポイントは、モデルフィッティング無しで線によって結合された。

【図１３】活性癌を死滅させるＴ細胞（図１３Ａ：ＣＤ８＋ＣＤ２５＋、図１３Ｂ：ＣＤ４＋ＣＤ２５＋、および図１３Ｃ：ＣＤ４＋ＣＤ２５＋／ＣＤ８＋ＣＤ２５＋の混合）による腫瘍細胞死滅％を、ＡＭＬサンプルにおける双曲線のリガンド－受容体モデルによってフィッティングしたグラフ一式。腫瘍細胞生存％は薬物無しの対照に対して推定された。点線はＩＣ５０の数値に対応する。

【図１４】ＡＭＬ患者からの２つのＢＭサンプルにおいてＣＴＬ細胞数がどのように富化されたかを示すフローサイトメトリーのドットプロット（ＣＤ５対ＣＤ２５）である。図１４Ａは、受入（ＣＳ５－ＣＤ２５－）に際するサンプルの状態を示す。図１４Ｂは、ＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂ（ＣＤ５＋ＣＤ２５＋）でのインキュベーション後のサンプルを示す。図１４Ｃは、蛍光活性化細胞がＣＤ５＋ＣＤ２５＋集団をソーティングした後のサンプルを示す。表は、プロセスの各工程の間に存在したＣＴＬの割合を示す。

【図１５】トロゴサイトーシス（ＣＤ５＋ＣＤ１２３＋）および非トロゴサイトーシス（ＣＤ５＋ＣＤ１２３－）ＣＴＬ集団へとＣＴＬがどのようにソーティングされ得るかを示すフローサイトメトリーのドットプロット（ＣＤ５対ＣＤ１２３）。図１５Ａは、ＣＤ３＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２３－細胞集団を示す。図１５Ｂは、ＣＤ３＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２３＋細胞集団を示す。図１５Ｃは、ＡＭＬ芽細胞を枯渇させるＣＤ１２３＋およびＣＤ１２３－集団の能力を示す。

【図１６】ＡＭＬ患者サンプルにおける、芽細胞数（図１６Ａ）およびＴ細胞数（図１６Ｂ）に対するＣＤ１２３ＣＤ３　ＢｓＭＡｂの効果を示すグラフ一式。Ｔ細胞の絶対数の時間および濃度依存性の増大に対応する、時間および濃度依存性の芽細胞数の減少がある。

【図１７】ＭＲＤ　ＡＭＬを有する患者からのサンプルにおけるＣＤ１２３ＣＤ３　ＢｓＭＡｂの効果。サンプルの単球集団が５％未満の芽細胞を含んでいたとしても、Ｔ細胞の絶対数（図１７Ｂ）の時間依存性の増加に対応した、芽細胞数（図１７Ａ）の時間依存性の減少がある。点線はＢｓＭＡｂ無しの対照サンプルを表し、および実線はＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂデータを表す。

【図１８】１２０時間のＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂでの、ＡＭＬ患者からのＢＭサンプルのインキュベーション前後の、発現マーカーのレベルを示すフローサイトメトリーのドットプロット。図１８Ａ－１８Ｄは、ＢｓＭＡｂ前の、基礎時間点での細胞を表し、図１８Ｅ－１８Ｈはインキュベーション後のサンプルの状態を示す。図１８Ａおよび１８Ｅは、活性化マーカーＣＤ２５の発現レベルを示す。図１８Ｂおよび１８Ｆは、表現型によって示された部分母集団の分布を示す：ナイーブＴ細胞（ナイーブ、ＣＤ４５ＲＡ＋／ＣＣＲ７＋／ＣＤ２７＋）、セントラルメモリーＴ細胞（ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＣＲ７＋／ＣＤ２７＋）、エフェクターメモリーＴ細胞（ＥＭ、ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＣＲ７－

／ＣＤ２７＋／－）、および末梢エフェクターメモリーＴ細胞（Ｅ、ＣＤ４５ＲＡ＋／ＣＣＲ７－／ＣＤ２７－）。図１８Ｃと図１８Ｇは、マーカーＣＣＲ７およびＣＤ６２Ｌの発現レベルを示し、図１８Ｄと図１８Ｈは、マーカーＣＤ２８およびＣＤ５７を示す。データは、試験された４つのＡＭＬサンプルを代表する１つのＡＭＬサンプルからである。

【図１９】７２時間と１２０時間の２つの時間点における、ＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂでＡＭＬ　ＢＭサンプルをインキュベートした結果である。図１９Ａは、７２時間のインキュベーションに関する芽細胞枯渇を示し、図１９Ｂは１２０時間のインキュベーションに関する芽細胞枯渇を示す。活性化ＣＴＬのレベルを同時に測定し、７２時間のインキュベーションについては図１９Ｃに、および１２０時間のインキュベーションについては図１９Ｄに示す。

【図２０】対照および腫瘍細胞におけるＥｐＣＡＭ／ＣＤ３二重特異性抗体の効果である。図２０Ａは、用量依存的な方法での腫瘍細胞の殺滅を表す。図２０Ｂは、腫瘍枯渇が、Ｔ細胞におけるＣＤ２５活性化マーカーの増大に関係することを示す。

【図２１】Ｔ細胞のトロゴサイトーシス能力を例示するフローサイトメトリーのドットプロット（ＣＤ５対ＰＫＨ６７）である。図２１Ａは、インキュベーション前の基礎時間における芽細胞（ＰＫＨ６７＋＋／ＣＤ５－）およびＴ細胞（ＰＫＨ６７－／ＣＤ５＋＋）のドットプロットを示す。図２１Ｂは、インキュベーション後、およびＢｓＭＡｂの欠如下における芽細胞（ＰＫＨ６７＋＋／ＣＤ５－）およびＴ細胞（ＰＫＨ６７－／ＣＤ５＋＋）のドットプロットを示す。図２１Ｃは、インキュベーション後、およびＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂの存在下における芽細胞（ＰＫＨ６７＋＋／ＣＤ５－）およびＴ細胞（ＰＫＨ６７－／ＣＤ５＋＋）のドットプロットを示す。

【図２２】ＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂは、ＡＭＬ患者からのＢＭサンプルにおける反応を誘発する。図２２Ａは、ＣＴＬ集団における用量応答の増大を示し、それは芽細胞（腫瘍）枯渇の用量応答（図２２Ｂ）に一致する。絶対数の変化（＊）は、１：１００の有効Ｅ：Ｔ比率の判定に使用される。

【図２３】１３のＡＭＬ骨髄サンプルで、異なる時間点（７２－９６－１２０時間）における、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋ＣＴＬ（白丸）および腫瘍細胞（黒丸）の両方のＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂのＥＣ５０を示すグラフ一式。図２３Ａは、サンプルに関するＥＣ５０数値の分布を示す。図２３Ｂは、各時間点における細胞集団ごとの中間値を示す。ＣＤ８＋ＣＤ２５＋ＣＴＬと腫瘍細胞の両方に関するＥＣ５０は、集団と時間点との間で比較的類似している。

【図２４】ＢｓＭＡｂ　ＣＤ１２３／ＣＤ３でインキュベートされた５つのＡＭＬサンプル（図２３に示されるものから選択、サンプルＩＤ００１－００５）の、異なるインキュベーション時間における有効Ｅ：Ｔ比率である。Ｙ軸は、各時間点におけるエフェクター細胞（ＣＴＬ）ごとの標的細胞（腫瘍細胞）の数を示す。

【図２５】対になったＢＭサンプル（上パネル）およびＰＢサンプル（下パネル）の両方を伴う、５人のＡＭＬ患者（１－５）へのＣＤ１２３ＣＤ３　ＢｓＭＡｂの効果を示すグラフ一式。有効Ｅ：Ｔ比率がサンプルごとに対応するグラフに表され、ＢＭサンプルにおいてより高い細胞傷害性が示されている。

【図２６】健康な顆粒球を含む、異なる細胞集団における２人のＭＭ患者（ＡおよびＢ）に対するＢｓＭＡｂの結果を示すグラフ。ＢｓＭＡｂは、ＣＴＬ（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋）の増加を伴う腫瘍細胞での低下を示すが、健康な顆粒球を殺さない。

【図２７】健康なＢ細胞を含む、異なる細胞集団における２つのＡＭＬ患者（ＡおよびＢ）に対するＢｓＭＡｂの結果を示すグラフ。ＢｓＭＡｂは、ＣＴＬ（ＣＤ４＋ＣＤ２５＋およびＣＤ８＋ＣＤ２５＋）の増加を伴う腫瘍細胞での低下、および健康なＢ細胞の最小限の死滅を示す。

【発明を実施するための形態】

【０２６３】

本開示は、少なくとも部分的には、望ましくない標的細胞に対する、例えば癌細胞に対する細胞傷害性活性を高める免疫エフェクター細胞を生成および／または選択するための、

個別化医療アプローチに関する。例えば、標的に対する、例えば癌細胞に対する細胞傷害性活性を高める免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）を製造するための方法が、本明細書で大きく扱われる。実施形態では、該方法は、標的細胞、例えば癌細胞に、免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えば細胞傷害性リンパ球（ＣＴＬ））を空間的に近接させる工程を含む。実施形態では、該方法は、空間的近接を誘発するために、薬剤を、例えば近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）を使用する工程を含む。

【０２６４】

理論に束縛されることを望むものではないが、標的細胞との、例えば癌細胞との免疫エフェクター細胞の空間的近接は、例えばｐＩＣＦの欠如下でトロゴサイトーシスを起こす細胞の数と比較して、免疫細胞活性化を起こす免疫エフェクター細胞の数を増加させ、およびそれらのいくつかはトロゴサイトーシスと呼ばれるプロセスを起こすと考えられる。さらに、理論に束縛されることを望むものではないが、トロゴサイトーシスを起こした（トロゴサイトーシスＴ細胞としても言及される）Ｔ細胞（例えばＣＴＬ）は、標的細胞に対する、例えば癌細胞に対する細胞傷害性活性が高まると考えられる。トロゴサイトーシスＴ細胞は、本明細書に記載される方法に暴露される特定の標的細胞（例えば癌細胞）を殺すために、平衡させおよび高度に増感させた多数のメモリーＴ細胞を含み得る。さらに、固形腫瘍および血液悪性腫瘍中のＴ細胞の割合は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）および／または癌抗原特異性ＣＴＬ（すなわち癌細胞に特異的な抗原を認識するＣＴＬ）において高いと考えられる。固形腫瘍の塊の内部に存在するＴ細胞の全てではないにしてもほとんどが、ＴＩＬ（腫瘍浸潤リンパ球）と呼ばれる免疫抑制性の腫瘍特異抗原Ｔ細胞であると考えられる。さらに、固形腫瘍におけるＴＩＬの％は、免疫療法処置に対する臨床応答の重要な予測因子であると考えられる。これらの概念は、免疫腫瘍学の基礎変数としての「基礎Ｅ：Ｔ比率」、すなわち固形腫瘍における標的細胞とエフェクター細胞の基礎比率の使用の拡大をもたらした。しかしながら、血液悪性腫瘍または血液、骨髄、脾臓、リンパ節などの固形腫瘍の血液組織からの、癌細胞を有する血液組織には、常に多くのＴ細胞が存在する。したがって、これらの血液組織における基礎Ｅ：Ｔ比率は、固形腫瘍とは非常に異なる意味を有する。実際に、癌細胞を有するこれらの血液組織における免疫抑制性腫瘍特異抗原（ＴＳＡ）Ｔ細胞の集団は、非常に小さいと考えられる。従って、固形腫瘍と同じアプローチに従って基礎Ｅ：Ｔ比率が計算された場合、全癌細胞とＴ細胞の比率およびＴＳＡ　Ｔ細胞の％は非常に低く、これらの基礎Ｅ：Ｔ比率は、癌細胞（ＴＳＡ）を効果的に殺すための先天性の能力を有するが免疫抑制性であるＴ細胞の数を過大評価しすぎる場合もある。本明細書において見出される「有効Ｅ：Ｔ比率」は、癌細胞を効果的に死滅させる能力を有するエフェクターＴ細胞の数を、癌細胞の数で割った比率の、この同じ概念を取り込む；それはｐＩＣＦの存在下における、新たに生成された癌を死滅させる活性化されたＴ細胞の数（癌細胞を殺すことができる唯一のもの）、および死滅させられた癌細胞の数の、双方を対照条件と比較した、客観的な測定値である。刊行物における、血液悪性腫瘍のサンプルでインキュベートされた二重特異性抗体の基本変数としての基礎Ｅ：Ｔ比率の圧倒的使用は、血液悪性腫瘍組織のＴ細胞における異質性の理解不足を示す。

【０２６５】

これらのＣＴＬのより高い割合は、固形腫瘍、骨髄およびリンパ節などの、３次元構造を伴う微小環境に存在し、一方でこれらのＣＴＬのより低い割合は末梢血などのより流動的な環境に存在し得ると考えられる。ＣＴＬ、例えば癌抗原特異性ＣＴＬは、例えばサンプル（癌細胞およびＣＴＬを含む）をｐＩＣＦと共にインキュベートすることによって癌を死滅させる活性の増強されたＣＴＬを産生するための、望ましい出発物質であり得る。いくつかの例では、サンプルは、例えば固形腫瘍、骨髄、リンパ節などの３次元構造を有する微小環境であり得る。他の例では、サンプルは、末梢血などのより流動的な微小環境であり得る。

【０２６６】

付加的に、理論に束縛されることを望むものではないが、ＣＴＬのいくつか、例えば癌抗原特異性ＣＴＬは、自身の微小環境、例えば骨髄または固形腫瘍によって免疫抑制される

と考えられる。さらに、エクスビボで癌細胞にＣＴＬ（例えば、癌抗原特異性ＣＴＬ）を直接接触させることによって、ｐＩＣＦはＣＴＬ（例えば、癌抗原特異性ＣＴＬ）の活性化および／または増殖を促すことができると考えられる。ＣＴＬ（例えば、癌抗原特異性ＣＴＬ）の活性化は、その免疫抑制状態からＣＴＬを解放し、およびその強固な増殖を誘発し得る。これは、特異的に癌抗原を認識し、および高い有効性でその特異性抗原を有する癌細胞を殺す、混合物内の多くのＣＴＬをもたらすことができる。癌細胞とＣＴＬを集める際に、ｐＩＣＦはさらにＣＴＬのトロゴサイトーシスを促進する場合もある。したがって、混合物内のトロゴサイトーシスＴ細胞は、特定の癌細胞を殺す高い効果を有するＣＴＬである傾向があると考えられる。特定の癌細胞を殺す高い効果を有するＣＴＬの集団は、本明細書においてトロゴサイトーシスＴ細胞としても言及される。有利に、エクスビボでのｐＩＣＦの使用は、極めて少数の癌抗原特異性ＣＴＬを含むサンプルからであっても、そのような死滅させる効果の高いＣＴＬの生成をもたらすことができる。

【０２６７】

したがって、ｐＩＣＦは、従来から利用可能な技術、例えば従来から利用可能なＡＣＴよりも、増強された標的細胞の死滅活性を伴う免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞）の産生のより効果的な方法（およびそのような細胞をより多く産生するための方法）を提供する。ｐＩＣＦとトロゴサイトーシス、およびそれらの活性を測定し、かつ高い効果の癌を死滅させるＴ細胞を認識するための方法は、より詳細に以下に記載される。

【０２６８】

そのような細胞の生成方法に加えて、癌細胞に対する増強された細胞傷害活性を有する（例えば癌を死滅させるＴ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）を含む組成物、例えば医薬組成物が本明細書において提供される。

【０２６９】

さらに、理論に束縛されることを望むものではないが、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞（例えば癌を死滅させるＴ細胞）を含む治療は、固形癌から血液癌までの様々な癌を殺すのに驚くほど効果的であると考えられる。これは、主として高い免疫原性の癌、例えば黒色腫にのみ有効な傾向がある単離された／増殖された腫瘍浸潤リンパ球などの、従来の多くの利用可能なＡＣＴとは異なっている。したがって、特に驚くべきは、癌細胞（例えば、黒色腫とは異なる：これは他の種類の癌よりも高い突然変異率を有し、したがってより免疫原性であり得る）に対して典型的に低い／最小限の免疫反応を有する癌を殺しおよび治療するための、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞（例えば癌を死滅させるＴ細胞）の能力である。

【０２７０】

実施形態では、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞、例えば癌を死滅させるＴ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞、それらを製造する方法、および（例えば処置用に）使用する方法は、以下の利点の１つ以上を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は、多数の種類の癌細胞を標的とする（および除去する／縮小する）ことができる。実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は、患者の細胞の遺伝子改変なしに製造することができる。例えば、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は、Ｔ細胞を差し向ける特異性抗原を特定することなく、製造することができる。実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は、癌細胞の事前の標識、例えば検出可能なマーカーによる事前の標識癌細胞膜、または特異性抗原による事前の標識癌細胞なしで製造することができる。実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は、癌細胞への暴露／インキュベーション前に、抗原を有する事前活性化Ｔ細胞なしで製造することができる。実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は、被験体からの血液サンプル（例えば骨髄、全血または末梢血）と共にｐＩＣＦをインキュベートすることによって、血液サンプルからいかなる細胞もソーティングする必要なく、製造することができる。例えば、血液サンプルは、標的細胞（例えば癌細胞）、および標的細胞を標的とする免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、

例えばＣＴＬ）出発物質の両方を含んでもよく、そうすると、癌細胞と出発免疫エフェクター細胞を別々に調製する必要はない。

【０２７１】

本明細書の方法および組成物の別の利点には、活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞の安全性の利点が含まれる。理論に束縛されることを望むものではないが、例えば本明細書に記載される方法を使用して製造された、本明細書に記載される活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞は、特定の癌抗原を発現する癌細胞を優先的に認識し、および特定の癌抗原を発現しない他の細胞、例えば正常な細胞への反応は低減されていると考えられる。これらの活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞が優先的に癌細胞を殺すであろうことから、これらの活性化腫瘍抗原特定性Ｔ細胞に安全性の利点が付与され得る。理論に束縛されることを望むものではないが、この特異性は、既に癌抗原に特異的であるＣＴＬ由来の活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞のｐＩＣＦを使用する、インビボおよびエクスビボアッセイにおける好ましいおよび／または選択的な活性化と増殖によるものと考えられる。

【０２７２】

さらに、被験体、例えば患者にとって適切な免疫療法を選択する方法が、本明細書において提供される。例えば本明細書には、ｐＩＣＦ、例えば癌細胞に対する増強された細胞傷害活性を有する（例えば癌を死滅させるＴ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）の生成に最適な活性を有するｐＩＣＦをスクリーニングする方法が提供される。実施形態では、候補となるｐＩＣＦは、これまでに記述されたことのない新しい化合物／分子であり、およびこれらの方法は創薬に使用される。

【０２７３】

付加的に、本明細書には、活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞を使用する処置に反応する可能性のより高い被験体を特定する方法が提供される。本明細書にはさらに、最も高い癌死滅活性を有する癌を死滅させるＴ細胞の集団（例えば単一のクローンまたは多数のクローン）を選択する方法が記載される。

【０２７４】

本明細書にはさらに、癌治療、例えば従来から記述されてきた癌治療、例えば単独療法としてのまたは本明細書に記載の癌を死滅させるＴ細胞療法と併用した癌治療、に反応する可能性の高い患者を特定する方法が開示される。該方法は、（本明細書に記載されるような）ｐＩＣＦを使用することによって高い細胞傷害性の癌を死滅させるＴ細胞を製造するための、およびエクスビボアッセイにこれらの細胞を適用するための能力を利用する。例えば、該方法は、活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞、例えば癌を死滅させるＴ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞（それらは標的細胞を死滅させる増強された活性を有する）を含むエクスビボ反応混合物を生成する工程を含み、反応混合物は患者由来の構成分子から生成される。該方法は、有効Ｅ：Ｔ比率を算出する工程を含むことができ、高い有効Ｅ：Ｔ比率は強力なＴ細胞死滅活性を示し、および低い有効Ｅ：Ｔ比率は不十分なＴ細胞死滅活性を示す。該方法は、例えば癌を殺す活性などの反応を検出するために、反応混合物に候補となる癌治療を加える工程を含み得る。理論に束縛されることを望むものではないが、反応混合物中の活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞、例えば癌を死滅させるＴ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞の存在は、アッセイの感度を高め、それによって、これまでに記述されたエクスビボアッセイにおいては癌を死滅させる活性の見られなかったかもしれない癌治療が、このより高感度のアッセイにおいて癌を死滅させる活性を示すであろうと、考えられる。この個別化医療アッセイは、標的とされた治療を特定し、および特定の患者にあまり効果がないと思われる治療の投与を避けるために、特定の患者における潜在的有効性に関して広範な癌治療群を試験する方法でもある。このアプローチは、特定の患者に効果的でありかつ利用可能であり得る癌治療を、これまでに記述されたエクスビボアッセイによって特定され得るよりも多く特定することができるかもしれない。

【０２７５】

＜定義＞

本明細書において使用されるように、冠詞「１つ（ａ）」および「１つ（ａｎ）」は、冠詞の文法上の目的語の１つ以上、例えば少なくとも１つ、を指す。本明細書において用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」と合わせて使用される場合の単語「１つ（ａ）」または「１つ（ａ）」の使用は、「１つ（ｏｎｅ）」を意味する場合もあるが、さらに「１つ以上」、「少なくとも１つ」、および「１つまたは１つより多い」の意味と矛盾しない。

【０２７６】

本明細書において使用されるように、「約」および「およそ」は一般的に、測定の性質または正確性を考慮して、測定された数に関する許容可能な程度の誤差を意味する。誤差の典型的な度合は、所与の数値範囲の２０パーセント（％）内、典型的には１０％内、およびより典型的には５％内である。

【０２７７】

用語「自己由来の」は、それが後にその個体に再導入されることになる、同じ個体から取り出された任意の物質を指す。

【０２７８】

用語「同種異型の」は、物質が導入される個体としての、同じ種の異なる動物から取り出された任意の物質を指す。

【０２７９】

本明細書の目的ための用語「組成物」は用語「癌を死滅させるＴ細胞」を含み、該用語は、限定されないがエフェクターメモリーＴ細胞、細胞傷害性リンパ球（ＣＴＬ）、ヘルパーＴ細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）およびトロゴサイトーシスＴ細胞を含む活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞、およびそれらの医薬組成物を含む。

【０２８０】

対象化合物の「有効量」が処置に使用される。本発明に従って使用される化合物の用量は、化合物と処置される疾病、例えば年齢、体重、およびレシピエント患者の臨床症状に応じて変動する。他の要因には以下が含まれる：投与経路、患者、患者の病歴、疾患の経過の重症度、および特定の化合物の効力。用量は、受け入れがたい毒性を患者に生じさせることなく、処置される疾患の症状または徴候を改善するのに十分であるべきである。一般的に、化合物の有効量は、症状の主観的な軽減、または臨床医または他の資格のあるオブザーバーによって認められるような客観的に識別可能な改善のいずれかを提供するものである。

【０２８１】

本明細書で使用される「近接ＩＣＦ」または「ｐＩＣＦ」は、免疫エフェクター細胞、例えばＴ細胞を、標的細胞、例えば癌細胞に近接させることによって、免疫エフェクター細胞、例えばＴ細胞（例えばＣＴＬ）のトロゴサイトーシスを増強する薬剤を指す。一実施形態では、近接ＩＣＦは、免疫エフェクター細胞および標的細胞の各々に結合する（例えば直接結合）。いくつかの実施形態では、近接ＩＣＦは抗体分子、例えば免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）に対する一次結合特異性、および標的細胞に対する二次結合特異性を有する二重特異性抗体分子である。理論に束縛されることを望むものではないが、ｐＩＣＦは細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）の感作および／または活性化を助けることができ、続いて細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）は腫瘍細胞を認識および／または除去することができる。いくつかの実施形態では、例えばｐＩＣＦのない状態で免疫エフェクター細胞と癌細胞の混合物から精製されたトロゴサイトーシス免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）の集団と比較して、ｐＩＣＦは、トロゴサイトーシス免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞）の集団を、少なくとも０．５％、１％、５％、１０％、２５％、３０％、またはそれ以上に増加させる。

【０２８２】

本明細書で使用される「トロゴサイトーシス」は、標的細胞（例えば抗原提示細胞、例えば癌細胞）の細胞膜の部分が、免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）に運ばれ、それによって標的細胞からの細胞膜部分を含む「トロゴサイトーシス」免疫エフェクター細胞を形成するプロセスを指す。いくつかの実施形態では、標的細胞の細胞膜部

分は１つ以上の標的細胞抗原を含む。したがって、トロゴサイトーシス免疫エフェクター細胞は、それらの細胞表面上に１つ以上の標的細胞抗原を含み得る。他の実施形態では、標的細胞の細胞膜部分は膜蛍光色素を損なう。したがって、トロゴサイトーシス免疫エフェクター細胞は、癌細胞表面マーカー、または以前に癌細胞を染色するのに使用された膜色素を異常に発現する。理論に束縛されることを望むものではないが、トロゴサイトーシスを行った、例えば１つ以上の標的細胞抗原を取り込んだ、免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）は、トロゴサイトーシスを行っていない免疫エフェクター細胞と比較して、標的細胞に対する免疫反応（例えば死滅させる）の形成により効果的であると考えられる。

【０２８３】

本明細書で使用される用語「免疫エフェクター細胞」は、免疫反応、例えば免疫エフェクター反応の促進における免疫反応に含まれる細胞を指す。免疫エフェクター細胞の例として、限定されないが、Ｔ細胞、例えばＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞、アルファ／ベータＴ細胞およびガンマ／デルタＴ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、および肥満細胞があげられる。

【０２８４】

本明細書で使用されるように「ナイーブＴ細胞」は、例えばメモリー細胞の前駆体である、抗原未熟な（ａｎｔｉｇｅｎ－ｉｎｅｘｐｅｒｉｅｎｃｅｄ）細胞を含むＴ細胞を指す。いくつかの実施形態では、ナイーブＴ細胞はより若いＴ細胞、つまりより小さな分化表現型を含むＴ細胞である。いくつかの実施形態では、ナイーブＴ細胞は、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ２７、ＣＣＲ７、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ２８、およびＣＤ１２７の発現、およびＣＤ５７、ＣＤ９５、ＣＤ１２２、ＫＬＲＧ－１、またはＣＤ４５ＲＯの発現の欠如が特徴である。実施形態では、ナイーブＴ細胞はテロメアの長さが長いことが特徴である。例えば、ナイーブＴ細胞に関連する表現型のマーカーは、例えばＭａｕｓ　Ｍ（２０１４）に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【０２８５】

本明細書で使用される「細胞傷害性リンパ球」（ＣＴＬ）は、標的細胞を殺す能力を有するＴ細胞を指す。実施形態では、ＣＴＬは、それらの細胞表面上でＣＤ８を発現する。理論に束縛されることを望むものではないが、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、一旦標的細胞上の抗原の認識によって活性化されると、ＣＴＬになると考えられる。例えば、以下の２つの工程が起こった時に、ＣＴＬの活性化が起こる：１）標的細胞上の抗原結合ＭＨＣ分子と、ＣＴＬ上のＴ細胞受容体との間の相互活性が生じる；および２）Ｔ細胞および標的細胞上で同時刺激分子の係合によって同時刺激信号が作られる。次にＣＴＬは、標的細胞上の特異性抗原を認識し、および例えば細胞溶解によるこれらの標的細胞の破壊を誘発する。実施形態では、ＣＴＬは、癌細胞、および例えばウイルスに感染している細胞、または他の方法で損傷した細胞を標的として殺す。実施形態では、ＣＤ４＋Ｔ細胞はさらに標的細胞を殺すことができ、したがって「ＣＴＬ」はさらにＣＤ４＋Ｔ細胞を指し得る。

【０２８６】

「腫瘍浸潤リンパ球」（ＴＩＬ）は本明細書において、腫瘍内に遊走したリンパ球を指して用いられる。実施形態では、ＴＩＬは、成熟または分化の異なる段階にある細胞であり得、例えばＴＩＬは、他の種類のリンパ球のうちＣＴＬ、Ｔｒｅｇ、および／またはエフェクターメモリーＴ細胞を含み得る。実施形態では、ＴＩＬは、癌抗原特異性である、つまり特定の癌抗原を認識するＣＴＬを含む。実施形態では、ＴＩＬは腫瘍を死滅させる活性がある。実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍以外のサンプルから単離されたリンパ球と比較して、異なる構成または異なる細胞集団を含む場合もある。

【０２８７】

本明細書で使用される「エフェクターメモリーＴ細胞」は、例えばエフェクターサイトカインを急速に生成することによって、抗原の存在に速い時間スケールで反応するＴ細胞を指す。例えば、抗原との接触に際して、エフェクターメモリーＴ細胞は大量の炎症性サイトカインを分泌する。実施形態では、エフェクターメモリーＴ細胞には以下の細胞表面表

現型がある：ＣＤ６２Ｌｌｏｗ、ＣＤ４４、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＩＬ－７Ｒ（ＣＤ１２７）、ＩＬ－１５ＲおよびＣＣＲ７ｌｏｗ。

【０２８８】

本明細書で使用される「有効比率」または「有効Ｅ：Ｔ比率」は、ｐＩＣＦおよび／または免疫調節剤との接触後の癌を死滅させるＴ細胞と標的癌細胞の比率を指す。有効Ｅ：Ｔ比率は、ｐＩＣＦおよび／または免疫調節剤との接触後の癌を死滅させるＴ細胞（Ｅ）の数と標的癌細胞（Ｔ）の数を使用して算出される。他の実施形態では、有効Ｅ：Ｔ比率は、ｐＩＣＦの異なる濃度ごとに、例えばｐＩＣＦの最高濃度において、活性化または細胞傷害性の癌を死滅させるＴ細胞の数を最大ピークにするｐＩＣＦの濃度において、またはそれぞれの用量応答曲線のＥＣ５０濃度において、算出することができる。実施形態では、有効Ｅ：Ｔ比率は有効Ｔ：Ｅ比率としても表すことができる。本明細書において使用されるように、「基礎Ｅ：Ｔ比率」は、サブタイプを特定しないエフェクターＴ細胞の総数と、標的細胞の総数の比率として定義される。したがって基礎Ｅ：Ｔ比率は「有効Ｅ：Ｔ比率」とは異なり、基礎Ｅ：Ｔ比率は、ｐＩＣＦおよび／または免疫調節剤の欠如下、またはそれらとの接触前の、Ｔ細胞と標的細胞の総数の比率を指す。

【０２８９】

本明細書で使用される「調節性Ｔ細胞」（Ｔｒｅｇ）は、例えば接触独立および接触依存メカニズムを通じて、免疫抑制および免疫寛容原性の反応を媒介する、胸腺内で産生されたＴ細胞を指す。いくつかのＴｒｅｇは誘導可能なＴｒｅｇであり、それは末梢のナイーブＴ細胞から生成される。実施形態では、Ｔｒｅｇは、自己抗原に対する耐性を維持し、および自己免疫を低減する。実施形態では、ＴｒｅｇはエフェクターＴ細胞の増殖および誘導を抑制および／またはダウンレギュレートする。実施形態では、Ｔｒｅｇは、細胞表面上の以下のマーカーの１つ以上を発現する：αβＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ２５、ＣＴＬＡ４、および／またはグルココルチコイド誘導ＴＮＦ受容体（ＧＩＴＲ）。実施形態では、Ｔｒｅｇは、以下の分子の１つ以上を分泌する：ＩＬ－１０、ＴＧＦβ、および／またはＩＬ－３５。

【０２９０】

本明細書で使用される「クローン」は、同じ原細胞に由来する細胞の集団を指す。実施形態では、細胞のクローン内の細胞は、同じ表現型および遺伝子型を共有する。

【０２９１】

本明細書で使用される「抗体分子」は、少なくとも１つの免疫グロブリン可変領域配列を含むタンパク質、例えばそれらの免疫グロブリン鎖またはフラグメントを指す。抗体分子は抗体（例えば完全長の抗体）および抗体フラグメントを包含する。例えば、完全長の抗体は、自然に生じる、または正常な免疫グロブリン遺伝子フラグメントのリコンビナトリアルプロセスによって生成された、免疫グロブリン（Ｉｇ）分子（例えばＩｇＧ抗体）である。

【０２９２】

実施形態では、抗体分子は、抗体フラグメントなどの、免疫グロブリン分子の免疫学的活性のある抗原結合部分を指す。抗体フラグメント、例えば機能性フラグメントは、抗体の部分、例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆ（ａｂ）２、可変フラグメント（Ｆｖ）、領域抗体（ｄＡｂ）、または単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）である。機能性抗体フラグメントは、完全な（例えば完全長の）抗体によって認識されたものと同じ抗原に結合する。用語「抗体フラグメント」または「機能性フラグメント」はさらに、重鎖と軽鎖の可変領域、または軽鎖と重鎖の可変領域がペプチドリンカーにより連結された（「ｓｃＦｖタンパク質」）組換え単鎖ポリペプチド分子の可変領域から成る「Ｆｖ」フラグメントなどの、可変領域から成る単離されたフラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗体フラグメントは、Ｆｃフラグメントまたは単一アミノ酸残基などの、抗原結合活性のない抗体の部分を含まない。典型的な抗体分子には、完全長の抗体および抗体フラグメント、例えばｄＡｂ（領域抗体）、単一鎖、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、および単一鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）が含まれる。実施形態では、抗体分子は単

一特異的であり、例えばそれは単一エピトープに対する結合特異性を含む。いくつかの実施形態では、抗体分子は多特異性であり、例えばそれは複数の免疫グロブリン可変領域配列を含み、ここで第１の免疫グロブリン可変領域配列は第１のエピトープに結合特異性を有し、および第２の免疫グロブリン可変領域配列は第２のエピトープに結合特異性を有する。いくつかの実施形態では、抗体分子は二重特異性抗体分子である。

【０２９３】

本明細書で使用される「二重特異性抗体分子」は、２つ以上（例えば２、３または４以上）のエピトープおよび／または抗原に特異性を有する抗体分子を指す。二重特異性抗体分子は様々な型を包含することができ、および本明細書の二重特異性抗体分子の箇所により詳細に記載される。

【０２９４】

本明細書で使用される「抗原」（Ａｇ）は、免疫反応を誘発することができる分子、例えば特定の免疫細胞および／または抗体生成の活性化を含む分子を指す。ほぼ全てのタンパク質またはペプチドを含む高分子は抗原であり得る。抗原はさらに、ゲノム組換え体またはＤＮＡに由来し得る。例えば、免疫反応を誘発することができるタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡは、「抗原」をコードする。実施形態では、抗原は、遺伝子の完全長のヌクレオチド配列によってのみコードされる必要はなく、および抗原が遺伝子によってコードされる必要も全くない。実施形態では、抗原は合成可能であり、または生体サンプル、例えば組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞、または他の生体構成分子を有する流体から得ることができる。

【０２９５】

「抗原結合部位」または抗体分子の「結合部分」は、抗原結合に関与する抗体分子、例えば免疫グロブリン（Ｉｇ）分子の部分を指す。実施形態では、抗原結合部位は、重鎖（Ｈ）および軽鎖（Ｌ）の可変（Ｖ）領域のアミノ酸残基によって形成される。超可変領域と呼ばれる、重鎖および軽鎖の可変領域内の高度に分岐した３つの伸張部は、「フレームワーク領域」（ＦＲ）と呼ばれるより保護された側面伸長部の間に配される。ＦＲは、免疫グロブリンの超可変領域の間に、およびそれに隣接した位置に本来見出だされるアミノ酸配列である。実施形態において、抗体分子では、軽鎖の３つの超可変領域および重鎖の３つの超可変領域は、抗原結合表面を形成するために、互いに対して３次元空間で配され、それは結合抗原の３次元表面に相補的である。各重鎖および軽鎖の３つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」と呼ばれる。フレームワーク領域およびＣＤＲは、例えばＫａｂａｔ　ＥＡ（１９９１）とＣｈｏｔｈｉａ　Ｃ（１９８７）において定義され、および記載されている。各可変鎖（例えば可変重鎖および可変軽鎖）は典型的に、３つのＣＤＲと４つのＦＲから構成され、アミノ酸の順にアミノ末端からカルボキシ末端へと配置される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３およびＦＲ４。

【０２９６】

本明細書で使用される「微小残存病変」（ＭＲＤ）は、例えば患者が寛解にある（すなわち疾患の徴候または症状がない）時に、処置中または処置後の患者に残る細胞、例えば病巣細胞、例えば癌細胞の小集団を指す。実施形態では、ＭＲＤは、患者に疾患、例えば癌の再発を引き起こす細胞の源であり得る。ＭＲＤは、患者のサンプル、例えば組織サンプル中の少数の病巣細胞を測定することができるフローサイトメトリー、タンパク質またはＤＮＡまたはＲＮＡベースのアッセイを使用して検出することができる。

【０２９７】

本明細書で使用される「癌」は、全ての種類の腫瘍形成プロセスおよび／または癌の成長を包含し得る。実施形態では、癌には原発腫瘍および転移組織または悪性形質転換細胞、組織または器官が含まれる。実施形態では、癌は、癌の全ての病理組織診断およびステージ、例えば侵襲性／重症度のステージを包含する。実施形態では、癌は、再発癌および／または耐性癌を含む。用語「癌」および「腫瘍」は、同義語として用いることができる。

【０２９８】

「サンプル」または「組織サンプル」は、被験体または患者の組織または体液から得られ

た生体サンプルを指す。組織サンプルの供給源は、新鮮な、冷凍された、および／または保存された器官、組織サンプル、生検または吸引液からの固形組織；血液または任意の血液成分（例えば血清、血漿）；骨髄または任意の骨髄成分；尿、脳脊髄液、全血、血漿および血清などの体液、であり得る。サンプルは非細胞分画（例えば尿、血漿、血清または他の非細胞体液）を含み得る。他の実施形態では、サンプルを得るための個体の体液は血液（例えば全血）を含む。一実施形態では、サンプルは、被験体から得られた全血サンプル、全骨髄サンプル、全末梢血サンプル、または全腫瘍サンプルである。実施形態では、「全」サンプルは、例えば全血サンプル、全骨髄サンプル、または全末梢血サンプルを指す場合、実質的に何の構成要素（例えば細胞）もサンプルから除去または単離されていないサンプルである。一実施形態では、サンプル、例えば血液サンプルは、該方法の残りの工程での使用に先立って希釈される（例えば生理的適合性のある緩衝剤または培地を用いて）。他の実施形態では、「全」サンプル、例えば全組織サンプルまたは全腫瘍サンプルは、組織起源からの微小環境を実質的に維持する、例えば腫瘍または免疫の微小環境の構造を実質的に維持する。別の実施形態では、例えば腫瘍サンプルなどのサンプルは、より小さな単位に処理され（例えばすり砕く、刻む、混合する、粉砕する等）、および希釈される（例えば生理的適合性のある緩衝剤または培地を用いて）。

【０２９９】

本明細書で使用される「細胞表面標識」は、例えば特異的および／または非特異的に、細胞表面の構成要素、例えば細胞表面タンパク質、多糖類、細胞膜と、相互に活性する薬剤を指す。実施形態では、薬剤は、細胞表面または細胞自体を標識する機能を果たす検出可能なシグナルを含む。実施形態では、検出可能なシグナルは、既知の波長で蛍光を発する化学分子、例えば蛍光色素である。一実施形態では、細胞表面標識は選択的に１つ以上の細胞表面標的を認識する抗体であり、ここで抗体はフルオロフォア分子に付着し、例えば化学的に付着し、例えば本明細書ではさらに「蛍光標識抗体」として言及される。一実施形態では、細胞表面標識は、アプタマーなどの１つ以上の細胞表面標的を認識することができる別の高分子である。別の実施形態では、細胞表面標識は細胞追跡色素である。実施形態では、細胞追跡色素は、蛍光性分子を含む分子、例えば蛍光色素であり、それは非特異的な方法で細胞膜全体にわたって分布または拡散することができる。一実施形態では、細胞追跡色素は両親媒性であり得、例えば膜と水の界面に分布し、肪好性または疎水性であり、例えば膜の二重層にある脂質に共有結合で付着する。

【０３００】

＜癌を死滅させるＴ細胞の生成＞

増強された癌を死滅させる活性（例えば癌を死滅させるＴ細胞）を有する免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）を製造する（例えば、作る／提供する）方法が、本明細書に提供される。

【０３０１】

実施形態では、該方法は、被験体（例えば、Ｔ細胞と癌細胞共に同じ被験体、またはＴ細胞と癌細胞で異なる被験体）からのＴ細胞および癌細胞を提供する工程を含む。

【０３０２】

実施形態では、Ｔ細胞および癌細胞は被験体からのサンプルの形態で提供される。サンプルは、血液サンプル、例えば全血、末梢血、または骨髄サンプルであり得る。他の実施形態では、サンプルは、固形腫瘍（例えば原発腫瘍または転移癌から切除されたサンプル）、リンパ節または脾臓由来である。

【０３０３】

実施形態では、実質的に何の構成要素（例えば細胞）も、サンプルから除去または単離されていない。例えば血液サンプルなどのサンプルは、例えば、該方法の残りの工程での使用に先立って希釈される（例えば生理的適合性のある緩衝剤または培地を用いて）。別の例では、例えば腫瘍サンプルなどのサンプルは、該方法の残りの工程での使用に先立って、より小さな単位に処理され（例えばすり砕く、刻む、混合する、粉砕する等）、および希釈される（例えば生理的適合性のある緩衝剤または培地を用いて）。

【０３０４】
別の実施形態では、Ｔ細胞および癌細胞は、被験体からの異なるサンプルの形態で提供される。例えば、Ｔ細胞は、血液サンプル、例えば全血、末梢血、または骨髄サンプルの形態で提供される。別の例では、Ｔ細胞は、例えばＴ細胞が腫瘍浸潤Ｔ細胞を含む腫瘍サンプル（例えば原発腫瘍または転移癌から切除されたサンプル）の形態で提供される。例えば、癌細胞は血液サンプルの形態で、例えば全血、末梢血、または骨髄サンプルの形態で提供され、例えば血液サンプルは循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）を含む。別の例では、癌細胞は、固形腫瘍（例えば原発腫瘍または転移癌から切除されたサンプル）、リンパ節または脾臓からのサンプルの形態で提供される。
【０３０５】
該方法はさらに、近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）に加えて、Ｔ細胞および癌細胞を用いて、エクスビボ反応混合物を形成する工程を含む。本明細書に記載される任意のｐＩＣＦを該方法に使用することができる。ｐＩＣＦは、本明細書の「近接免疫コーチング因子」（ｐＩＣＦ）の箇所でより詳細に記載される。実施形態では、エクスビボ反応混合物は、Ｔ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを得ることを可能にする（例えばＴ細胞がトロゴサイトーシスを行うことを可能にすること）のに十分な期間、などの条件下で形成される。該方法はその結果として癌を死滅させるＴ細胞を産生する。
【０３０６】
理論に束縛されることを望むものではないが、血液腫瘍と固形腫瘍の両方に、被験体の腫瘍細胞に冒された異なる組織があり得ると考えられる。例えば、固形腫瘍では、転移癌は、原発腫瘍部位内の腫瘍細胞とは異なる特性、例えば発現パターン（例えば異なる抗原発現パターン）を有する腫瘍細胞を含み得る。そのため、該方法は、被験体の体内において癌細胞に冒された各組織内の癌特異性ＣＴＬを活性化するために、ｐＩＣＦを使用する工程を含み得る。
【０３０７】
例えば、実施形態において、本明細書に記載される方法は：
（ａ）癌（例えば血液癌または固形癌）を有する被験体からＴ細胞を提供する工程；
（ｂ）例えば被験体から癌細胞を提供する工程；
（ｃ）例えばＴ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを得ることを可能にするのに十分な条件下（例えば期間）で、Ｔ細胞、癌細胞および近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）を含むエクスビボ反応混合物を形成し、それによって癌を死滅させるＴ細胞を製造する、工程；および
（ｄ）
ｉ）（ｃ）からの癌を死滅させるＴ細胞を増殖する工程；
ｉｉ）（ｃ）からの癌を死滅させるＴ細胞を選択する工程；
ｉｉｉ）（ｃ）からの癌を死滅させるＴ細胞を富化する工程；または
ｉｖ）（ｃ）からの癌を死滅させるＴ細胞を精製する工程、
の１つ、２つ、３つ、またはすべての工程
を含み、ここで癌細胞は、被験体からの原発性固形腫瘍に由来する、被験体からの転移癌に由来する、および／または被験体の血液（例えば全血、骨髄または末梢血）からの循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）またはリンパサンプルである。
【０３０８】
別の例では、本明細書に記載される方法は以下の工程を含む：
（ａ）癌（例えば血液癌または固形癌）を有する被験体からサンプルを提供する工程であって、サンプルはＴ細胞および癌細胞を含む、工程；
（ｂ）例えばＴ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを得ることを可能にするのに十分な条件下（例えば期間）で、近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）にサンプルを接触させる工程；
（ｃ）癌細胞から細胞表面マーカーを得た癌を死滅させるＴ細胞を富化する工程
を含み、ここでサンプルは、被験体からの原発性固形腫瘍に由来する、被験体からの転移

癌に由来する、および／または被験体からの血液（例えば全血、骨髄または末梢血）である、またはリンパサンプルである。

【０３０９】

さらに別の例では、本明細書に記載される方法は以下の工程を含む：

（ａ）癌（例えば血液癌または固形癌）を有する被験体からサンプルを提供する工程であって、サンプルは癌細胞を含む、工程；

（ｂ）被験体からサンプル、例えば血液サンプル（例えば末梢血サンプル）を提供する工程であって、サンプルはＴ細胞を含む、工程；

（ｃ）例えばＴ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを得ることを可能にするのに十分な条件下（例えば期間）で、工程（ａ）からのサンプルを工程（ｂ）からのサンプルおよび近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）に接触させる工程；

（ｄ）癌細胞から細胞表面マーカーを得た癌を死滅させるＴ細胞を富化する工程

を含み、ここで工程（ａ）からのサンプルは、被験体からの原発性固形腫瘍に由来する、被験体からの転移癌に由来する、および／または被験体からの血液（例えば全血、骨髄または末梢血）である、またはリンパサンプルである。

【０３１０】

実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）を製造／生成する方法は、所与の被験体からの異なるサンプルを使用して繰り返され、各繰り返しは癌細胞の異なるサンプル、例えば原発性固形腫瘍、転移癌、血液（例えば全血、骨髄または末梢血）、またはリンパの使用を含む。

【０３１１】

実施形態では、該方法は、これらの異なる癌細胞サンプルを使用して生成されたトロゴサイトーシスＴ細胞をプールする工程をさらに含む。

【０３１２】

理論に束縛されることを望むものではないが、そのような方法は、所与の被験体の異なる組織内に存在し得る異なる種類の癌細胞に対して効果的なトロゴサイトーシスＴ細胞を産生するであろうと考えられる。理論に束縛されることを望むものではないが、そのような方法は、被験体の体内の１つの部位でのみ癌細胞を殺す代わりに、体内全体にわたって（例えば、原発腫瘍および転移癌の両方において、さらにおそらくは血液内を循環しながら）有利に癌細胞を殺すことができると考えられる。

【０３１３】

付加的に、理論に束縛されることを望むものではないが、ＣＴＣ（癌患者、典型的には固形腫瘍癌患者の末梢血で見つかった腫瘍細胞）は、転移の原因である場合もあり、したがって死滅させるのに格好の標的であると考えられる。そのため、本明細書に記載される方法は、末梢血サンプル（ＣＴＣおよびＴ細胞を含む）を用いたｐＩＣＦのエクスビボでのインキュベーションを含み、それによって、トロゴサイトーシスＴ細胞を生成するためにＣＴＣをそれらと同種の癌抗原特異性Ｔ細胞に近接させる。他の実施形態では、例えば癌抗原特異性Ｔ細胞が十分に富化されていない末梢血サンプルにおいて、癌抗原特異性Ｔ細胞において富化される可能性のある３次元の微小環境（例えば骨髄、腫瘍、転移癌）からのサンプルを、末梢血サンプルの代わりに使用する。そのような場合、例えば、方法は、被験体からの骨髄、腫瘍または転移癌サンプル（癌抗原特異性Ｔ細胞を含む）を用いて、エクスビボでｐＩＣＦおよび単離されたＣＴＣをインキュベートする工程を含み得る。このエクスビボ混合物は、ｐＩＣＦがＣＴＣ上の抗原と適合する癌抗原特異性Ｔ細胞にＣＴＣを近接させるのを可能にし、それによって適切なＴ細胞を活性化し、トロゴサイトーシスＴ細胞を生成する。実施形態では、そのような方法は、例えばＣＴＣと適切な癌抗原特異性Ｔ細胞の適合を最大化するために、癌に冒された被験体の各組織を使用して繰り返すことができる。

【０３１４】

＜癌を死滅させるＴ細胞のさらなる処理＞

本明細書に記載される方法に従って、実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞はさらに選択

され、富化され、精製され、および／または増殖される。
【０３１５】
実施形態では、例えば本明細書に記載の方法によって製造された、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は、例えば反応混合物から選択される。例えば、反応混合物はＴ細胞、癌細胞および近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）を含む。実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は、Ｔ細胞および／またはｐＩＣＦから精製される。実施形態では、本明細書に記載の癌を死滅させるＴ細胞は、反応混合物中で細胞（例えば、癌細胞および／または様々な種類のＴ細胞）の混合物から富化される。
【０３１６】
実施形態では、選択工程、精製、および／または富化工程は、フローサイトメトリー（例えば蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ））またはビーズ（例えば磁気ビーズ）などの他の分離方法の使用を含む。例えば、ビーズは、１つ以上の癌抗原および／または１つ以上の活性化Ｔ細胞（例えばＣＴＬ）のマーカーに結合するそれらの抗体またはフラグメントでコーティングされ得る。このように、そのようなビーズに結合する細胞は、１つ以上の癌抗原を発現する活性化Ｔ細胞（例えばＣＴＬ）であり得る。これらの細胞は、癌を死滅させるための増強された活性を有する有望なトロゴサイトーシスＴ細胞である。同様に、ＦＡＣＳでは、活性化Ｔ細胞（例えばＣＴＬ）の両方のマーカーおよび癌細胞（例えば有望なトロゴサイトーシスＴ細胞）のマーカーを発現する細胞を、他の細胞型からソーティングすることができる。負または正の選択方法を、選択工程、精製、および／または富化工程に使用することができる。
【０３１７】
実施形態では、例えば本明細書に記載の方法で製造された、本明細書に記載の癌を死滅させるＴ細胞は、例えば被験体へと投与するための量の癌を死滅させるＴ細胞を精製するために増殖される。実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞の調製物が増殖される。実施形態では、増殖は、特定のＴ細胞集団の選択、富化または精製に先立って行なわれる。他の実施形態では、増殖は、特定のＴ細胞集団の選択、富化または精製の後に行なわれる。
【０３１８】
例えば癌を死滅させるＴ細胞などの細胞を増殖する典型的な方法には、米国特許第８，０３４，３３４号、米国特許第２０１２／０２４４１３３号、およびＭｏｎｔｅｓ　Ｍ（２００５）に記載されるものが含まれ、これらは参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞の増殖は、例えば調製物中の癌を死滅させるＴ細胞の数を、例えば少なくとも約２倍（例えば、少なくとも約３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、５０倍、１００倍、１０００倍、10^4倍、10^5倍、および10^6倍以上）に増やすことを含む。実施形態では、増殖は、少なくとも２日、例えば少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３または１４日以上の間に行なわれる。いくつかの例では、ＩＬ－２および／またはＩＬ－１５などのサイトカインの存在下において、随意にＴ細胞レセプター、例えば抗ＣＤ３抗体またはそのフラグメントを刺激する薬剤を添加し、細胞を培養することにより細胞を増殖させる。
【０３１９】
実施形態では、選択工程、精製工程、および／または増殖工程は、少数の、例えば不十分な数の癌細胞の連続的添加を含む。細胞傷害性Ｔ細胞を生成するために癌細胞、Ｔ細胞およびｐＩＣＦをインキュベートする工程を含む本明細書に記載の方法は、細胞傷害性Ｔ細胞の異なるクローンを生成することができる。実施形態では、癌細胞を殺すのに最も効果的または最も有力である細胞傷害性Ｔ細胞クローンの選択は、少量の、例えば不十分な量の癌細胞を、連続して添加することにより達成され得る。一実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞を含む反応物に添加可能な少ないまたは不十分な数または量の癌細胞は、５０％以下、例えば３０％、１０％、１％、０．１％、または０．０１％以下の数の活性化Ｔ細胞である。一実施形態では、少数または不十分な数の癌細胞を、少なくとも１回以上（例えば２、３、４、５、６、７、８または１０回以上）、混合物（例えば癌細胞、Ｔ細胞お

よび／またはｐＩＣＦを含む）に添加することができる。一実施形態では、少数または不十分な数の癌細胞は、６－４８時間（例えば６時間、１２時間、２４時間、３６時間または４８時間）おきに添加される。一実施形態では、少数または不十分な数の添加される癌細胞は、患者からの癌細胞である。一実施形態では、少数または不十分な数の添加される癌細胞は、患者からの癌細胞ではない。一実施形態では、少数または不十分な数の添加される癌細胞は、癌細胞株からの癌細胞である。

【０３２０】

理論に束縛されることを望むものではないが、例えば新たに生成された癌を死滅させるＴ細胞によって、一旦Ｔ細胞およびｐＩＣＦとの混合物中の癌細胞が除去されると、癌を死滅させるＴ細胞は使い尽くされ、およびその数が減少し得ると考えられる。しかしながら、理論に束縛されることを望むものではないが、少数の、例えば不十分な数の癌細胞が、生成された癌を死滅させるＴ細胞に添加されると、癌を死滅させるＴ細胞のサブセットが新たに添加された癌細胞を認識して殺す。癌細胞の認識は、例えばそのＴＣＲの選択的な認識および癌細胞表面で発現した癌抗原への結合を介して起こり得る；および、癌抗原に対する最も高い親和性または最も速い速度定数ｋｏｎを有するＴ細胞クローンは、より強くおよび／またはより速く、新たに添加された癌細胞に結合することができ、それによって癌細胞の除去および癌を死滅させるＴ細胞クローンの増殖の活性化をもたらす。癌を死滅させるＴ細胞間の直接競争によって、より効果的な癌を死滅させるＴ細胞のサブセットが活性化および増殖され、一方で新たに添加された癌細胞を認識しない残りの癌を死滅させるＴ細胞は、消耗および自己排泄のプロセスを継続し、それによってより効果的な癌を死滅させるＴ細胞のみが残ることになる。したがって、理論に束縛されることを望むものではないが、新たに添加された癌細胞を殺す癌を死滅させるＴ細胞のサブセットは、最良のキラー、例えば最も活性のあるまたは最も有力な癌キラーＴ細胞であると考えられる。実施形態では、理論に束縛されることを望むものではないが、少数の、例えば不十分な数の癌細胞を添加するこのプロセスの繰り返しは、優先的にまたは選択的に活性化および増殖させるために、最も活性のある、かつより効果的またはより有力な癌を死滅させるＴ細胞に選択的な進化ストレスを課すと考えられる。したがって、少数の、例えば不十分な数の癌細胞の連続添加は、最も活性があり、かつ最も効果的な癌を死滅させるＴ細胞クローンの選択と富化に有用である。少数の癌細胞の連続添加を含む典型的なプロセスは、図１に描かれる。

【０３２１】

実施形態では、選択され、精製され、富化され、および／または増殖された細胞によって、癌を死滅させるＴ細胞の調製物を形成することができる。

【０３２２】

＜近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）＞

ｐＩＣＦは、例えば二重特異性抗体分子、またはＣＤＲ－移植足場を含み得る。

【０３２３】

＜二重特異性抗体分子＞

実施形態では、二重特異性抗体分子は１つより多い抗原結合部位を含むことができ、異なる部位は異なる抗原に特異的である。実施形態では、二重特異性抗体分子は、同じ抗原上の１より多い（例えば２以上の）エピトープを結合させ得る。実施形態では、二重特異性抗体分子は、標的細胞（例えば癌細胞）特異性抗原結合部位、および免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）に特異的な異なる抗原結合部位を含む。二重特異性抗体分子は５つの異なる構造の群に分類することができる：（ｉ）二重特異性免疫グロブリンＧ（ＢｓＩｇＧ）；（ｉｉ）追加の抗原結合部分を付加されたＩｇＧ；（ｉｉｉ）二重特異性抗体フラグメント；（ｉｖ）二重特異性融合タンパク質；および（ｖ）二重特異性抗体抱合体。

【０３２４】

（ｉ）ＢｓＩｇＧは各抗原に対し１価の型である。典型的なＢｓＩｇＧ型には、限定されないが、ｃｒｏｓｓＭａｂ、ＤＡＦ（２ｉｎ１）、ＤＡＦ（４ｉｎ１）、ＤｕｔａＭａｂ

、ＤＴＩｇＧ、ＫｉＨ（ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ）の一般的ＬＣ、ＫｉＨ（ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ）集合体、チャージペア（ｃｈａｒｇｅ ｐａｉｒ）、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤｂｏｄｙ、Ｔｒｉｏｍａｂ、ＬＵＺ－Ｙ、Ｆｃａｂ、κλ－ｂｏｄｙ、オルトゴナルＦａｂが含まれる。図１のＳｐｉｅｓｓ（２０１５）を参照されたい。典型的なＢｓＩｇＧｓには、抗ＣＤ３アームおよび抗ＥｐＣＡＭアームを含むｃａｔｕｍａｘｏｍａｂ（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｔｒｉｏｎ Ｐｈａｒｍａ，Ｎｅｏｐｈａｒｍ）；および、ＣＤ３とＨＥＲ２を標的とするｅｒｔｕｍａｘｏｍａｂ（Ｎｅｏｖｉｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｂｉｏｔｅｃｈ）が含まれる。いくつかの実施形態では、ＢｓＩｇＧは、ヘテロ二量体化のために設計された重鎖を含む。例えば、重鎖は、「ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ」法、ＳＥＥＤプラットフォーム、一般的な重鎖（例えばκλ－ｂｏｄｙ）、およびヘテロ二量体のＦｃ領域の使用を用いて、ヘテロ二量体化のために設計され得る。Ｓｐｉｅｓｓ Ｃ（２０１５）を参照されたい。ＢｓＩｇＧ内のホモ二量体の重鎖対合を回避するために使用される方法には、ＫｉＨ、ＤｕｏＢｏｄｙ、Ａｚｙｍｅｔｒｉｃ、チャージペア、ＨＡ－ＴＦ、ＳＥＥＤｂｏｄｙ、および差異タンパク質Ａ親和性が含まれる。Ｉｄを参照されたい。ＢｓＩｇＧは、異なる宿主細胞におけるコンポーネント抗体の別個の発現、および続くＢｓＩｇＧへの精製／集合によって生成され得る。ＢｓＩｇＧはさらに、単一の宿主細胞におけるコンポーネント抗体の発現によって生成され得る。ＢｓＩｇＧは、アフィニティークロマトグラフィーを使用して、例えばタンパク質Ａおよび連続ｐＨ溶出を使用して、精製され得る。

（ｉｉ）追加の抗原結合部分を付加されたＩｇＧは、二重特異性抗体分子の別の型である。例えば、単一特異的ＩｇＧは、例えば重鎖または軽鎖のいずれかのＮ末端またはＣ末端において、単一特異的ＩｇＧ上に追加の抗原結合単位を付加することによって、二重特異性を有するように設計され得る。典型的な追加の抗原結合単位には、単一領域抗体（例えば可変重鎖または可変軽鎖）、改変タンパク質足場、およびペア抗体可変領域（例えば単鎖可変フラグメントまたは可変フラグメント）が含まれる。Ｉｄを参照されたい。付加ＩｇＧ型の例として、双対変数領域ＩｇＧ（ＤＶＤ－Ｉｇ）、ＩｇＧ（Ｈ）－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ－（Ｈ）ＩｇＧ、ＩｇＧ（Ｌ）－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ－（Ｌ）ＩｇＧ、ＩｇＧ（Ｌ，Ｈ）－Ｆｖ、ＩｇＧ（Ｈ）－Ｖ、Ｖ（Ｈ）－ＩｇＧ、ＩｇＧ（Ｌ）－Ｖ、Ｖ（Ｌ）－ＩｇＧ、ＫＩＨ ＩｇＧ－ｓｃＦａｂ、２ｓｃＦｖ－ＩｇＧ、ＩｇＧ－２ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ４－Ｉｇ、ｚｙｂｏｄｙ、およびＤＶＩ－ＩｇＧ（４ｉｎ１）があげられる。図１、ＳｐｉｅｓｓＣ（２０１５）を参照されたい。ＩｇＧ－ｓｃＦｖの一例として、ＩＧＦ－１ＲおよびＨＥＲ３を結合するＭＭ－１４１（Ｍｅｒｒｉｍａｃｋ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）があげられる。ＤＶＤ－Ｉｇの例として、ＩＬ－１αおよびＩＬ－１βを結合するＡＢＴ－９８１（ＡｂｂＶｉｅ）；および、ＴＮＦおよびＩＬ－１７Ａを結合するＡＢＴ－１２２（ＡｂｂＶｉｅ）があげられる。

（ｉｉｉ）二重特異性抗体フラグメント（ＢｓＡｂ）は、いくつかのまたはすべての抗体定常領域を欠く二重特異性抗体分子の型である。例えば、いくつかのＢｓＡｂはＦｃ領域を欠く。実施形態では、二重特異性抗体フラグメントは、単一の宿主細胞におけるＢｓＡｂの効果的な発現を可能にする、ペプチドリンカーによって連結される重鎖領域と軽鎖領域を含む。典型的な二重特異性抗体フラグメントとして、限定されないが、ナノボディ、ナノボディ－ＨＡＳ、ＢｉＴＥ、Ｄｉａｂｏｄｙ、ＤＡＲＴ、ＴａｎｄＡｂ、ｓｃＤｉａｂｏｄｙ、ｓｃＤｉａｂｏｄｙ－ＣＨ３、Ｄｉａｂｏｄｙ－ＣＨ３、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、ＴｒｉＢｉミニボディ、ｓｃＦｖ－ＣＨ３ ＫＩＨ、Ｆａｃ－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ－ＣＨ－ＣＬ－ｓｃＦｖ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆ（ａｂ’）２－ｓｃＦｖ２、ｓｃＦｖ－ＫＩＨ、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ－Ｆｃ、４価ＨＣＡｂ、ｓｃＤｉａｂｏｄｙ－Ｆｃ、Ｄｉａｂｏｄｙ－Ｆｃ、タンデムｓｃＦｖ－Ｆｃ、および細胞内抗体があげられる。Ｉｄを参照されたい。例えば、ＢｉＴＥ型は、タンデムｓｃＦｖを含み、コンポーネントｓｃＦｖは、Ｔ細胞上のＣＤ３および癌細胞上の表面抗原に結合する。典型的なＢｉＴＥｓとして、ＣＤ３およびＣＤ１９を結合するブリナツモマブ（Ａｍｇｅｎ）；ＣＤ３およびＥｐＣＡＭを結合するｓｏｌｉｔｏｍａｂ（Ａｍｇｅｎ）；ＣＤ３およびＣＥＡを結合す

るＭＥＤＩ５６５（ＭｅｄＩｍｍｕｎｅ，Ａｍｇｅｎ）；および、ＣＤ３およびＰＳＭＡを結合するＢＡＹ２０１０１１２（Ｂａｙｅｒ，Ａｍｇｅｎ）があげられる。典型的なＤＡＲＴとして、ＣＤ３およびＣＤ１２３を結合するＭＧＤ００６（Ｍａｃｒｏｇｅｎｉｃｓ）；および、ＣＤ３およびｇｐＡ３３を結合するＭＧＤ００７（Ｍａｃｒｏｇｅｎｉｃｓ）があげられる。典型的なＴａｎｄＡｂｓとして、ＣＤ３およびＣＤ１９を結合するＡＦＭ１１（Ａｆｆｉｍｅｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）；および、ＣＤ３０およびＣＤ１６Ａを結合するＡＦＭ１３（Ａｆｆｉｍｅｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）があげられる。タンデムｓｃＦｖの一例は、ＣＤ２８およびＭＡＰＧを結合するｒＭ２８（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ　ｏｆ　Ｔｕｂｉｎｇｅｎ）である。典型的なナノボディとして、ＴＮＦおよびＨＳＡを結合するオゾラリズマブ（Ａｂｌｙｎｘ）；ＩＬ－１７Ａ／ＦおよびＨＳＡを結合するＡＬＸ－０７６１（Ｍｅｒｃｋ　Ｓｅｒｏｎｏ，Ａｂｌｙｎｘ）；ＩＬ－６ＲおよびＨＳＡを結合するＡＬＸ－００６１（ＡｂｂＶｉｅ，Ａｂｌｙｎｘ）；ＲＡＮＫＬおよびＨＳＡを結合するＡＬＸ－０１４１（Ａｂｌｙｎｘ、Ｅｄｄｉｎｇｐｈａｒｍ）があげられる。ＢｓＡｂのコンポーネントフラグメントは、ファージディスプレーを使用して特定／選択することができる。いくつかの実施形態では、ｐＩＣＦはブリナツモマブを含まない。

（ｉｖ）二重特異性融合タンパク質は、例えばさらなる特異性および／または機能性を加えるために、他のタンパク質に連結された抗体フラグメントを含む。二重特異性融合タンパク質の一例はｉｍｍＴＡＣであり、それは、ＨＬＡ－提示ペプチドを認識する親和性の成熟Ｔ細胞受容体に関連づけられた抗ＣＤ３　ｓｃＦｖを含む。実施形態では、ＤＮＬ（ｄｏｃｋ－ａｎｄ－ｌｏｃｋ）法は、より高い原子価を有する二重特異性抗体分子を生成するために使用することができる。さらに、アルブミン結合タンパク質またはヒト血清アルブミンへの融合は、抗体フラグメントの血中半減期を延ばすことができる。Ｉｄを参照されたい。実施形態では、化学的な結合、例えば抗体および／または抗体フラグメントの化学的な結合は、ＢｓＡｂ分子を作成するために使用することができる。Ｉｄを参照されたい。典型的な二重特異性抗体結合体はＣｏｖＸ－ｂｏｄｙ型を包含し、ここで低分子量薬は、各Ｆａｂアームまたは抗体またはそれらのフラグメントにおいて、単一の反応リジンに部位特異的に結合される。実施形態では、結合は、低分子量薬の血中半減期を改善する。典型的なＣｏｖＸ－ｂｏｄｙはＣＶＸ－２４１（ＮＣＴ０１００４８２２）であり、それはＶＥＧＦまたはＡｎｇ２のいずれかを阻害する２つの短いペプチドに結合された抗体を含む。Ｉｄを参照されたい。

（ｖ）二重特異性抗体分子は、宿主の器官において、例えば少なくとも１つの構成要素の組換発現によって生み出すことができる。典型的な宿主器官には、真核細胞（例えば哺乳動物細胞、例えばＣＨＯ細胞、または昆虫細胞、例えばＳＦ９またはＳ２細胞）、および原核細胞（例えば大腸菌）が含まれる。二重特異性抗体分子は、異なる宿主細胞におけるコンポーネントの別個の発現、および続く精製／集合によって生み出すことができる。代替的に、二重特異性抗体分子は、単一の宿主細胞におけるコンポーネントの発現によって生み出すことができる。二重特異性抗体分子の精製は、例えばタンパク質Ａおよび連続ｐＨ溶出を使用して、アフィニティークロマトグラフィーなどの様々な方法によって実行することができる。他の実施形態では、アフィニティータグを精製に使用することができ、例えばヒスチジン含有タグ、ｍｙｃタグ、ストレプトアビジンタグである。

【０３２５】

＜ＣＤＲ移植足場＞

実施形態では、ｐＩＣＦはＣＤＲ移植足場領域である。実施形態では、足場領域はフィブロネクチン領域、例えばフィブロネクチンＩＩＩ型領域に基づく。フィブロネクチンＩＩＩ型（Ｆｎ３）領域の全折畳みは、最も小さい機能性抗体フラグメント、抗体重鎖の可変領域に密接に関係する。Ｆｎ３の末端には３つのループがある；ＢＣ、ＤＥおよびＦＧループの位置は、抗体のＶＨ領域のＣＤＲ１、２および３にほぼ対応する。Ｆｎ３にはジスルフィド結合がない；したがって、Ｆｎ３は、抗体およびそのフラグメントとは異なり、還元条件下で安定している（例えば国際公開第９８／５６９１５号；国際公開第０１／６

４９４２号；国際公開第００／３４７８４号を参照）。Ｆｎ３領域は、例えば本明細書に記載の抗原／マーカー／細胞に結合する領域を選択するために、修飾または修正され得る（例えば、本明細書に記載のＣＤＲまたは超可変ループを使用）。

【０３２６】

実施形態では、足場領域、例えば折り畳まれた領域は、抗体、例えばモノクローナル抗体の重鎖可変領域から３つのβストランドを削除することにより作られた「ミニボディ」足場に基づく（例えば、Ｔｒａｍｏｎｔａｎｏ Ａ（１９９４），Ｍａｒｔｉｎ Ｆ（１９９４）を参照））。「ミニボディ」は、２つの超可変ループを提示するために使用することができる。実施形態では、足場領域は、Ｖ様領域（例えば国際公開第９９／４５１１０号を参照）またはテンダミスタット（ｔｅｎｄａｍｉｓｔａｔｉｎ）由来の領域であり、それは７４の残留物、２つのジスルフィド結合によって一緒にされた６鎖ベータシートサンドイッチである（例えばＭｃＣｏｎｎｅｌｌ ＳＪ（１９９５）を参照）。例えば、テンダミスタットのループは、例えば本明細書に記載のマーカー／抗原／細胞に結合する領域を選択するために、修飾または修正され得る（例えばＣＤＲまたは超可変ループを使用）。別の典型的な足場領域は、ＣＴＬＡ－４の細胞外領域に由来するベータサンドイッチ構造である（例えば国際公開第００／６００７０号を参照）。

【０３２７】

他の典型的な足場領域は限定されないが、Ｔ細胞レセプター；ＭＨＣタンパク質；細胞外領域（例えばフィブロネクチンＩＩＩ型リピート、ＥＧＦリピート）；プロテアーゼ阻害剤（例えばクニッツ領域、エコチン、ＢＰＴＩなど）；ＴＰＲリピート；三葉構造；ジンクフィンガー領域；ＤＮＡ結合タンパク質；特にモノマーＤＮＡ結合タンパク質；ＲＮＡ結合タンパク質；酵素、例えばプロテアーゼ（特に不活性化されたプロテアーゼ）、リボヌクレアーゼ；シャペロン、例えばチオレドキシン、および熱ショックタンパク質；および細胞内シグナル伝達領域（ＳＨ２およびＳＨ３領域など）を含む。例えば米国特許第２００４／０００９５３０号および米国特許第７，５０１，１２１号を参照、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【０３２８】

実施形態では、足場領域は、例えば以下の基準の１つ以上によって評価および選択される：（１）アミノ酸配列、（２）いくつかの相同領域の配列、（３）３次元構造、および／または（４）様々なｐＨ、温度、塩分、有機溶媒、オキシダント濃度に関する安定性データ。実施形態では、足場領域は、小さくて安定したタンパク質領域、例えば１００未満のアミノ酸（例えば１００、７０、５０、４０または３０アミノ酸）のタンパク質である。領域は１つ以上のジスルフィド結合を含んでもよく、または金属、例えば亜鉛をキレート化する。

【０３２９】

＜Ｔ細胞の活性を増強する他の組成物および方法＞

本明細書に記載される組成物および方法に従って、実施形態では、Ｔ細胞活性、例えばトロゴサイトーシスを増強するために、ｐＩＣＦに加えて他の免疫調節剤が使用され得る。これらの免疫調節剤には、限定されないが、免疫チェックポイント阻害剤、Ｔ細胞のアゴニスト、および他の免疫調節剤が含まれる。代替的に、Ｔ細胞活性、例えばトロゴサイトーシスを増強する他の薬剤（例えば免疫チェックポイント阻害剤、Ｔ細胞のアゴニストおよび他の免疫調節薬などの、免疫調節剤の使用）を、ｐＩＣＦの代わりに使用することができる。

【０３３０】

＜免疫チェックポイント阻害剤＞

実施形態では、本明細書に記載される方法は、例えば癌細胞と免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）を伴う反応混合物において、例えばｐＩＣＦに加えて、またはｐＩＣＦの代わりとしての、免疫チェックポイント阻害剤の使用を含む。実施形態では、本明細書に記載される方法は、癌細胞および免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）を、免疫チェックポイント阻害剤に接触させる工程を含む。該方法はさらに

、インビボ治療プロトコルで使用され得る。
【０３３１】
実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤はチェックポイント分子を阻害する。チェックポイント分子は、場合によっては、ＣＡＲ発現細胞が免疫エフェクター反応を開始する能力を低下させることができる。典型的なチェックポイント分子として、限定されないが、ＣＴＬＡ４、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＣＤ１６０、２Ｂ４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ３（ＣＤ２７６）、Ｂ７－Ｈ４（ＶＴＣＮ１）、ＨＶＥＭ（ＴＮＦＲＳＦ１４またはＣＤ２７０）、ＢＴＬＡ、ＫＩＲ、ＭＨＣクラスＩ、ＭＨＣクラスＩＩ、ＧＡＬ９、ＶＩＳＴＡ、ＢＴＬＡ、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ１、およびＡ２ａＲがあげられる。例えばＰａｒｄｏｌｌ　ＤＭ（２０１２）を参照、これは参照により本明細書に組み込まれる。
【０３３２】
実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤はＰＤ－１阻害剤であり、例えばニボルマブ、ペムブロリズマブまたはＰｉｄｉｌｉｚｕｍａｂなどの抗ＰＤ－１抗体である。ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、ＭＤＸ－１１０６－０４、ＯＮＯ－４５３８またはＢＭＳ－９３６５５８とも呼ばれる）は、特にＰＤ１を阻害する完全なヒトＩｇＧ４モノクローナル抗体である。例えば米国特許第８，００８，４４９号、および国際公開第２００６／１２１１６８号を参照されたい。ペムブロリズマブ（ランブロリズマブ、ＭＫ－３４７５、ＭＫ０３４７５、ＳＣＨ－９００４７５またはＫＥＹＴＲＵＤＡ（登録商標）；Ｍｅｒｃｋとも呼ばれる）は、ＰＤ－１に結合するヒト化ＩｇＧ４モノクローナル抗体である。例えばＨａｍｉｄ　Ｏ（２０１３）、米国特許第８，３５４，５０９号、および国際公開第２００９／１１４３３５号を参照されたい。Ｐｉｄｉｌｉｚｕｍａｂ（ＣＴ－０１１またはＣｕｒｅ　Ｔｅｃｈとも呼ばれる）は、ＰＤ１に結合するヒト化ＩｇＧ１ｋモノクローナル抗体である。例えば国際公開第２００９／１０１６１１号を参照されたい。一実施形態では、ＰＤ－１の阻害剤は、それに実質的に同一または類似する、例えばニボルマブ、ペムブロリズマブまたはＰｉｄｉｌｉｚｕｍａｂの配列に少なくとも８５％、９０％、または９５％以上同一である、配列を有する抗体分子である。さらなる抗ＰＤ１抗体、例えばＡＭＰ５１４（Ａｍｐｌｉｍｍｕｎｅ）は、例えば米国特許第８，６０９，０８９号、米国特許第２０１０／０２８３３０号、および／または米国特許第２０１２／０１１４６４９号に記載されている。
【０３３３】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、例えば定常領域（例えば免疫グロブリンのＦｃ領域）に融合されたＰＤ－１リガンド（例えばＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２）の細胞外／ＰＤ－１結合部分を含むイムノアドヘシンなどのイムノアドヘシンである。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＡＭＰ－２２４（Ｂ７－ＤＣＩｇ、例えば国際公開第２０１１／０６６３４２号および国際公開第２０１０／０２７８２７号に記載）、Ｂ７－Ｈ１とＰＤ－１との間の相互活性を妨害するＰＤ－Ｌ２　Ｆｃ融合可溶性受容体である。
【０３３４】
実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、例えば抗体分子である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＹＷ２４３．５５．Ｓ７０、ＭＰＤＬ３２８０Ａ、ＭＥＤＩ－４７３６、ＭＳＢ－００１０７１８Ｃ、またはＭＤＸ－１１０５である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＭＳＢ００１０７１８Ｃ（Ａ０９－２４６－２；Ｍｅｒｃｋ　Ｓｅｒｏｎｏとも呼ばれる）であり、それはＰＤ－Ｌ１に結合するモノクローナル抗体である。典型的なヒト化抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、例えば国際公開第２０１３／０７９１７４号に記載される。一実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は抗－ＰＤ－Ｌ１抗体、例えばＹＷ２４３．５５．Ｓ７０である。ＹＷ２４３．５５．Ｓ７０抗体は、例えば国際公開第２０１０／０７７６３４号に記載される。一実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤はＭＤＸ－１１０５（ＢＭＳ－９３６５５９とも呼ばれる）であり、それは例えば国際公開第２００７／００５８７４に記載される。一実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤はＭＤＰＬ３２８０Ａ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／Ｒｏｃｈｅ）であり、それはＰＤ－

Ｌ１に対するヒトＦｃ最適化ＩｇＧ１モノクローナル抗体である。例えば米国特許第７，９４３，７４３号および米国特許第２０１２／００３９９０６号を参照されたい。一実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の阻害剤は、それに実質的に同一または類似する、例えばＹＷ２４３．５５．Ｓ７０、ＭＰＤＬ３２８０Ａ、ＭＥＤＩ－４７３６、ＭＳＢ－００１０７１８Ｃ、またはＭＤＸ－１１０５の配列に少なくとも８５％、９０％、または９５％以上同一である、配列を有する抗体分子である。

【０３３５】

実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－Ｌ２阻害剤、例えばＡＭＰ－２２４（それはＰＤ１とＢ７－Ｈ１との間の相互活性を妨害するＰＤ－Ｌ２　Ｆｃ融合可溶性受容体である）である。例えば国際公開第２０１０／０２７８２７号および国際公開第２０１１／０６６３４２号を参照されたい。

【０３３６】

一実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ＬＡＧ－３阻害剤、例えば抗ＬＡＧ－３抗体分子である。実施形態では、抗ＬＡＧ－３抗体はＢＭＳ－９８６０１６（ＢＭＳ９８６０１６；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂとも呼ばれる）である。ＢＭＳ－９８６０１６および他のヒト化抗ＬＡＧ－３抗体は、例えば米国特許第２０１１／０１５０８９２号、国際公開第２０１０／０１９５７０号および国際公開第２０１４／００８２１８号に記載される。

【０３３７】

実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ＴＩＭ－３阻害剤、例えば抗ＴＩＭ３抗体分子であり、例えば米国特許第８，５５２，１５６号、国際公開第２０１１／１５５６０７号、欧州特許第２５８１１１３号、および米国特許第２０１４／０４４７２８号に記載される。

【０３３８】

実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ－４阻害剤、例えば抗ＣＴＬＡ－４抗体分子である。典型的な抗ＣＴＬＡ４抗体として、トレメリムマブ（ファイザーからのＩｇＧ２モノクローナル抗体であり、以前はチシリムマブ、ＣＰ－６７５，２０６として知られていた）；およびイピリムマブ（ＭＤＸ－０１０とも呼ばれる、ＣＡＳＮｏ．４７７２０２－００－９）があげられる。他の典型的な抗ＣＴＬＡ－４抗体は、例えば米国特許第５，８１１，０９７号に記載されている。

【０３３９】

＜Ｔ細胞のアゴニスト（例えばアゴニスト抗体）＞

実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法は、例えば癌細胞と免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）を伴う反応混合物において、例えばｐＩＣＦに加えて、またはｐＩＣＦの代わりとしての、Ｔ細胞のアゴニスト（例えばアゴニスト抗体）の使用を含む。実施形態では、本明細書に記載される方法は、癌細胞および免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）を、Ｔ細胞のアゴニスト（例えばアゴニスト抗体）に接触させる工程を含む。

【０３４０】

実施形態では、Ｔ細胞のアゴニストは、アゴニスト抗体またはそのフラグメント、または同時刺激分子の活性化因子／アゴニストである。実施形態では、Ｔ細胞のアゴニストは同時刺激分子を含む、または同時刺激分子である。同時刺激分子は、抗原に対するリンパ球、例えばＴ細胞の効果的な反応に必要な細胞表面分子である。実施形態では、同時刺激分子は、抗原受容体またはそのリガンド以外の分子である。理論に束縛されることを望むものではないが、同時刺激はＴ細胞の増殖、生存およびエフェクター機能を増強する（例えば、Ｔ細胞の持続性および／または癌治療活性を増強する）と考えられる。例えばＳｏｎｇ　ＤＪ（２０１２）を参照されたい。典型的な同時刺激分子として、限定されないが、ＣＤ２８、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＢＴＬＡ、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＯＸ４０、ＣＤ２７、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ４０、ＣＤ３０、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＩＣＡＭ－１、Ｂ７－１、Ｔｏｌｌ様受容体、ＬＦＡ－１

（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＧＩＴＲ、ＢＡＦＦＲ、Ｂ７－Ｈ３、シグナルリンパ球活性化分子（ＳＬＡＭタンパク質）、ＳＬＡＭＦ７、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、インテグリン、ＩＬ２Ｒベータ、ＩＴＧＡ４、ＭＨＣクラスＩ分子、ＴＮＦ受容体、ＣＤ４９Ｄ、ＣＤ４９ｆ、ＬＦＡ－１、ＣＤ２９、ＣＤ１８、ＴＮＦＲ２、ＣＤ８４、ＲＡＮＫＬ、ＣＤ２２９、ＣＤ６９、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、およびＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙ１０８）があげられる。

【０３４１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のアゴニストは、ＣＤ１３７、ＧＩＴＲまたはＣＤ４０に対するアゴニスト抗体またはそのフラグメントである。

【０３４２】

典型的なアゴニスト抗体は、例えばＳｃｏｔｔ　ＡＭ（２０１２）に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【０３４３】

＜他の免疫調節薬＞

実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法は、例えば癌細胞と免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）を伴う反応混合物において、例えばｐＩＣＦに加えて、またはｐＩＣＦの代わりとして免疫調節薬、例えばレナリドミドを含む。実施形態では、本明細書に記載される方法は、癌細胞および免疫エフェクター細胞（例えばＴ細胞、例えばＣＴＬ）を、Ｔ細胞のアゴニスト（例えばアゴニスト抗体）に接触させる工程を含む。

【０３４４】

いくつかの実施形態では、ＩＣＦはレナリドミドなどの免疫調節薬である。

【０３４５】

一実施形態では、免疫調節剤は、ＭＤＳＣおよび／またはＴｒｅｇ細胞の阻害剤である。理論に束縛されることを望むものではないが、ＭＤＳＣおよび制御性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞は、免疫を抑制する腫瘍微小環境の重要な構成要素である。ＭＤＳＣがＴｒｅｇ細胞の成長および誘発を調整することが、実験的証拠によりを明らかになっている。例えば、ＭＤＳＣは様々な方法でＴ細胞エフェクター機能を抑制することができる。いくつかの因子は、ｌ－アルギニンの枯渇、ＲＮＳおよびＲＯＳの放出（それぞれ、最も普及した分子であるＯＮＯＯおよびＨ２Ｏ２による）、または高ＮＯレベルの無対立生成を含む微小環境への最終効果で、ＭＤＳＣサブセットにおけるアルギニン、ＮＡＤＰＨオキシダーゼおよびＮＯＳの発現レベルを調整することができる。さらに、ｌ－システインはＭＤＳＣによって隔離され得る。これらの分子の全ては、抗原刺激の後にＴ細胞分裂反応を制御する細胞内シグナル伝達経路に影響を与える。ＭＤＳＣ媒介免疫抑制はさらに、Ｔｒｅｇ細胞集団の増殖、Ｔ細胞分裂反応の阻害およびＴ細胞アポトーシスの促進に関係し得る。

【０３４６】

一実施形態では、免疫調節剤はレナリドミドである。

【０３４７】

他の実施形態では、免疫調節剤は、腫瘍特異抗原に対する免疫反応を活性化し、例えばそれはワクチンである（例えばｇｐ１００、ＭＵＣ１またはＭＡＧＥＡ３などの、標的に対するワクチン）。

【０３４８】

他の実施形態では、免疫調節剤は、サイトカイン、例えばＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８またはＩＬ－２１の１つ以上から選択された組換えサイトカインである。

【０３４９】

他の実施形態では、免疫調節剤は、自己由来のＴ細胞、例えば腫瘍標的細胞外および細胞内腫瘍特異抗原（例えばＣＡＲ　Ｔ細胞またはＴＣＲ　Ｔ細胞）である。

【０３５０】

さらに他の実施形態では、免疫調節剤は、アミノ酸異化活性、腫瘍由来の細胞外ＡＴＰのシグナル伝達、アデノシンシグナル伝達、アデノシン生成、ケモカインおよびケモカイン受容体、外来の有機体の認識、またはキナーゼシグナル伝達活性に関係する構成要素（例えば酵素または受容体）の修飾因子である。典型的な薬剤には、ＩＤＯ、ＣＯＸ２、ＡＲＧ１、ＡｒＧ２、ｉＮＯＳまたはホスホジエステラーゼ（例えばＰＤＥ５）の阻害剤（例えば小分子阻害剤）；ＴＬＲアゴニスト、またはケモカインアンタゴニストが含まれる。典型的なＩＤＯ阻害剤にはＩＮＣＢ２４３６０、１－メチルトリプトファン阻害剤およびＮＬＧ９１９が含まれる。典型的なＡＲＧ１／ＡＲＧ２阻害剤には、化合物９、ＮＣＸ－４０１６およびＡＴ３８が含まれる。典型的なＰＤＥ５阻害剤にはタダラフィルが含まれる。腫瘍を調整する典型的な薬剤には、細胞外ＡＴＰ、Ｐ２Ｘ７のアゴニストまたは拮抗薬およびＰ２Ｙ１１の拮抗薬が含まれる。アデノシンシグナルを調整する典型的な薬剤には、Ａ２Ａ受容体の拮抗薬およびＡ２Ｂ受容体の拮抗薬（例えばＰＳＢ１１１５）が含まれる。ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ４、ＣＣＲ２およびＣＣＲ５などのケモキネスおよびケモカイン受容体の修飾因子は、限定されないが、ＣＸＣＲ２に特異的な抗体、プレリキサホル、ＰＦ－４１３６３０９およびマラビロクを含む。ＴＬＲの修飾因子は、ＴＬＲ４（例えばＯＭ－１７４、ＴＬＲ４アゴニスト）、ＴＬＲ７（例えばイミキモド、８５２Ａ、ＴＬＲ７／８アゴニスト）、ＴＬＲ８（例えばＶＴＸ－２３３７、ＴＬＲ８アゴニスト）およびＴＬＲ９（例えばＩＭＯ－２０５５、ＴＬＲ９アゴニスト）などである。典型的なキナーゼ阻害剤として、限定されないが、ＡＬＫ、ＢＲＡＦ、ＲＯＮ、ＣＳＦ１、ＰＩ３ＫデルタおよびｐＩ３Ｋガンマの阻害剤があげられる。

【０３５１】

免疫調節剤のさらなる例は、例えばＡｄａｍｓ　ＪＬ（２０１５）およびＳｅｒａｆｉｎｉ　Ｐ（２００８）にさらに記載され、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【０３５２】

＜癌を死滅させるＴ細胞の評価＞

本明細書に記載の方法に従って、実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞（例えば癌を死滅させるＴ細胞の調製物、例えば選択、精製、富化、および／または増殖された細胞）を、多数の方法で特徴づけまたは評価することができる。

【０３５３】

例えば、癌を死滅させるＴ細胞は、例えばモノクローナル抗体などの抗体群を伴う様々な癌細胞および／またはエフェクターＴ細胞マーカーの発現に特徴づけられ得る。実施形態では、細胞は、他の免疫チェックポイント分子（例えば、本明細書に記載の免疫チェックポイント分子）のうちで、ＰＤ－１およびＴＩＭ－３などのマーカーの発現に特徴づけられる。実施形態では、細胞上でのＰＤ－１および／またはＴＩＭ－３の発現の存在は、癌を死滅させるＴ細胞がより大きな腫瘍免疫反応性を有することを示し得る。

【０３５４】

実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞は、例えばインビトロまたはエクスビボでの、癌細胞に対するそれらの反応に関して評価され得る。理論に束縛されることを望むものではないが、例えばインビトロまたはエクスビボでの癌細胞に対する反応は、癌を死滅させるＴ細胞がインビボで癌細胞を殺すのにどれほど効果的であるかの測定であると考えられる。実施形態では、癌細胞に対する反応は、癌を死滅させるＴ細胞を癌細胞に、例えば癌由来の細胞株または原発癌サンプルに接触させることによって、評価することができる。

【０３５５】

実施形態では、原発癌サンプルは、被験体の血液悪性腫瘍から単離した、例えば血液悪性腫瘍を有する被験体の血液サンプル（例えば末梢血または骨髄）から単離した、細胞を含む。例えば、癌を死滅させるＴ細胞および癌細胞は、共培養することによって、例えばあらかじめ決められたＴ細胞：癌細胞比率で、接触させられる。典型的なＴ細胞：癌細胞比率として、約１：４から１：１００（例えば１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１５、１：２０、１：２５、１：３０、１：３５、１：４０、１：４５、１：５０、１：７５、１：１００、またはそれ以上）があげられる。実施形態で

は、反応は、共培養後に１－３６時間の期間（例えば１－３６時間、１－６時間、６－１２時間、１２－２４時間または２４－３６時間）に評価され得る。反応は、細胞によって放出されたインターフェロンガンマの量、および／または４－１ＢＢを発現するＴ細胞の割合の定量化により評価することができる。実施形態では、対照レベルと比較したインターフェロンガンマおよび／または４－１ＢＢの高位レベルは、癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞に反応的であることを示す。代替的に、特定の腫瘍系統用マーカーを評価することができ、限定されないがＣＤ１０７ａ、グランザイムＢ、パーフォリン、および他の特定の系統腫瘍マーカーが含まれる。

【０３５６】

他の実施形態では、反応は、癌を死滅させるＴ細胞との共培養に先立ってマーカー（例えば放射性マーカー、例えば５１Ｃｒ、蛍光性マーカー、または他の分子）でまず癌細胞を標識することにより評価される。癌を死滅させるＴ細胞と標識された癌細胞の共培養の後、培地に放出されたマーカーの量（例えば癌細胞溶解の程度の指標）は、癌細胞死の程度の尺度になる。放射性マーカー、例えば５１Ｃｒの量は、放射能を検出し定量化する任意の方法を使用することで定量化することができる。蛍光性マーカーの量は、蛍光を検出し定量化する任意の方法を使用して定量化することができる。マーカー、例えば蛍光性マーカーまたは他の分子の量もまた、抗体ベースのアッセイ（例えばＥＬＩＳＡ）を使用して定量化することができる。実施形態では、対照レベルと比較した癌細胞からの放出マーカーの高位レベルは、癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞へ反応的であることを示す。

【０３５７】

実施形態では、対照レベルは、インターフェロンガンマおよび／または４－１ＢＢのレベル、および／または癌を死滅させるＴ細胞の欠如下、癌細胞の欠如下、または標識癌細胞の欠如下での類似のアッセイで生成されたマーカーのレベルである。

【０３５８】

さらに本明細書は、細胞表面標識を使用して癌を死滅させるＴ細胞のトロゴサイトーシスを測定する方法を提供する。癌を死滅させるＴ細胞のトロゴサイトーシスの測定は、本明細書に記載のいずれかの方法によって精製された癌を死滅させるＴ細胞の選択、特性評価および評価に有用であり得る。

【０３５９】

トロゴサイトーシスを測定するためのアッセイは、さらにスクリーニングアッセイに有用であり得る。実施形態では、トロゴサイトーシスは、１）癌細胞を細胞表面標識に、例えば蛍光標識された抗体またはそのフラグメント、または細胞追跡色素に接触させ、それによって癌細胞を標識する；２）標識癌細胞にＴ細胞を接触させる；および３）癌細胞からの細胞表面標識を組み込んだＴ細胞の判定によってトロゴサイトーシスを測定する、ことによって評価される。一実施形態では、細胞表面標識は、標的抗原に、例えば癌細胞表面マーカーに特異的に結合する、蛍光標識された抗体またはそのフラグメントである。一実施形態では、細胞表面標識は、細胞膜全体にわたって非特異的に拡散する、および／または細胞膜内に非特異的に分布する、細胞追跡色素である。

【０３６０】

蛍光標識された抗体および細胞追跡色素間の差異が図２に示される：蛍光標識された抗体は、細胞表面に、例えば細胞表面マーカーに発現した特異性抗原に結合し、一方で細胞追跡色素は、はるかに小さな選択性、本質性、非特異性でもって細胞膜全体にわたって分布し、細胞の表面膜のすべてを標識する。

【０３６１】

実施形態では、トロゴサイトーシスが起こる場合、Ｔ細胞が癌にその有毒因子を挿入するのに先立って、細胞間で生成された免疫シナプス内の癌を死滅させるＴ細胞と標的癌細胞との間の細胞膜表面の広範な接触がある。図３はこのプロセスを図示する画像であり、ここでＴ細胞はタコのような触手を伸ばして癌細胞を捕らえている。この接触において、両細胞にわたる膜の区画を含むそれぞれの細胞膜が深く重なり合う。トロゴサイトーシスでは、Ｔ細胞はこれらの膜区画のいくつかを、これらの膜区画に存在する細胞表面標識、例

えば蛍光標識抗体または細胞追跡色素に沿って、吸収する。
【０３６２】
トロゴサイトーシスのプロセスは、図４に概略的に描かれる：上のパネルは、癌細胞上の特定の細胞表面マーカーを認識する、例えばそれに結合する蛍光標識抗体での標識を示し、および下のパネルは、細胞追跡色素による癌細胞膜の非特異性標識示す。免疫シナプスが生じると（図の中央）、細胞が分離した後に、細胞傷害性Ｔ細胞は最終的に膜表面上の免疫シナプスの一部を形成する癌細胞表面膜の区画のいくつかになる。
【０３６３】
蛍光標識抗体の使用の利点として、癌細胞からの特定の細胞表面マーカーを組み込んだトロゴサイトーシスＴ細胞の識別および追跡があげられる。しかしながら、理論に束縛されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、蛍光標識抗体の使用はトロゴサイトーシスを検出することができないかもしれない。実施形態では、Ｔ細胞に吸収された癌細胞の蛍光抗体の数は、免疫シナプスの膜区画上のそれらの相対数に依存し得る。例えば、いくつかの実施形態では、標的細胞上の細胞表面マーカーの濃度または数は、起こり得るトロゴサイトーシスの検出には低すぎ、例えば、検出可能シグナルごとに標的を認識する十分な標識抗体がない、またはトロゴサイトーシス事象の検出後にＴ細胞に組み込まれる十分な標識抗体がない。別の例では、一実施形態において、抗体に連結された蛍光色素は、十分な検出可能シグナルを発せず、したがってトロゴサイトーシス事象において検出することができず、この事象において標識された抗体標的のごく一部が癌を死滅させるＴ細胞によって吸収される。別の例では、一実施形態において、細胞表面マーカーに結合された蛍光標識抗体は内化（インターナライズ）される場合もあり、それは結果として、検出限界以下に蛍光シグナルを実質的に低下させ得る。
【０３６４】
細胞追跡色素には、水性培地にとどまらないが、細胞の疎水性の表面膜全体にわたって分布する、脂肪好性または両親媒性の蛍光色素が含まれる。したがって、蛍光標識抗体とは対照的に、細胞追跡色素が使用される実施形態では、Ｔ細胞によって吸収された癌細胞の膜のいかなる区画も、蛍光性の分子を運び、および検出可能である。高用量の細胞追跡色素が使用される実施形態では、トロゴサイトーシスによってＴ細胞の細胞膜に組み込まれた蛍光性分子の数は、特定の癌細胞標的の蛍光標識抗体の数よりも高くなり得る、例えば実質的により高い。
【０３６５】
細胞膜の標識における細胞追跡色素の非特異的性質ゆえに、癌細胞とＴ細胞の両方を含むサンプル（例えば本明細書で使用される全サンプル）における細胞追跡色素の使用は、癌細胞とＴ細胞の両方を標識することができるがゆえに、トロゴサイトーシス事象の正確な測定を妨げ得る。したがって、そのような実施形態では、細胞追跡色素は、癌細胞にのみ、例えばＴ細胞または癌を死滅させるＴ細胞のない癌細胞に、選択的に加えられる。細胞追跡色素が使用され、およびサンプルが癌細胞とＴ細胞の両方を含む実施形態では、細胞追跡色素はサンプルに直接添加されない。そのような実施形態では、癌細胞、Ｔ細胞およびｐＩＣＦは、癌を死滅させるＴ細胞を生成するために本明細書に記載される条件下で提供される。一実施形態では、ｐＩＣＦは、癌細胞とＴ細胞から、例えば癌を死滅させるＴ細胞から洗い流され得る。一実施形態では、生成された癌を死滅させるＴ細胞がすべてのまたはほぼすべての癌細胞を殺した後に、１つの標識癌細胞または標識癌細胞の集団を、新しく生成された癌を死滅させるＴ細胞に加えることができる。実施形態では、１つの標識癌細胞または標識癌細胞の集団は、患者からの（例えば患者から直接の、または凍結保存され解凍されたサンプルからの）癌細胞、または細胞追跡色素で標識された癌細胞株からの癌細胞であり得る。実施形態では、理論に束縛されることを望むものではないが、生成された癌を死滅させるＴ細胞で標識された癌細胞の添加は、癌を死滅させるＴ細胞を再活性化し、および増殖を誘発することができ、したがって細胞追跡色素から発せられたシグナルの検出によってトロゴサイトーシスを測定することができる。この典型的なプロセスは図５に示される。

【０３６６】
さらに、本明細書は、例えば特定の患者のために、最も効果的な癌を死滅させるＴ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞を選択する方法を提供する。
【０３６７】
実施形態では、本明細書に記載される方法は、例えば養子細胞療法として、インビボで効果的であるかどうかの可能性に関して、癌を死滅させるＴ細胞またはその調製物を評価する工程を含む。実施形態では、該方法は、以下のパラメーターの１つ以上を判定する工程を含む：癌細胞を殺す活性の増強、毒性の低減、非特異的効果の低減、生存率の増加、または増殖の増強。理論に束縛されることを望むものではないが、癌細胞を殺す活性を増強し、毒性を低減し、非標的効果を低減し、生存率を増加させ、および／または増殖を増強させる癌を死滅させるＴ細胞（またはその調製物）は、例えば養子細胞療法として、インビボでより効果的であろうと考えられる。
【０３６８】
癌を死滅させるＴ細胞またはその調製物の毒性低減は、有意により少ない非病的細胞を殺す、つまりより選択的に殺す細胞である。これは、非病的細胞を標識し、および参照と比較した時により選択的な癌細胞キラーを示すことにより測定することができ、ここで前記参照は、同じ癌タイプの異なる患者サンプル、または同じ患者サンプル内の異なる細胞サブセット（例えばクローン）（例えばトロゴサイトーシス）のいずれであり得る。
【０３６９】
細胞療法で観察された最も一般的な毒性は、サイトカインストームと呼ばれ、サイトカインカスケードおよび高サイトカイン血症としても知られている。それは、細胞溶解による殺しのプロセスにおいて、癌を死滅させるＴ細胞によって放出されたサイトカインが細胞外に放出された時に生じる、致命的な可能性のある免疫反応であり、結果として非常に高いレベルの様々なサイトカインをもたらす。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞またはその調製物は、低減された毒性を有する細胞を含み、これは、それらが上澄みおよび／または細胞内でより少ないサイトカインを生成することに起因する。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞またはその調製物は、より高い癌を死滅させる活性および低減された毒性の両方を有する、またはそれらを同時に有する細胞を含み、なぜならそれらは癌細胞の死滅１単位に対して上澄みおよび／または細胞内でより少ないサイトカインを生成するからであり、すなわち放出されたサイトカインの種類および／またはレベルは、有効Ｅ：Ｔ比率、ＥＣ５０、Ｅｍａｘ、動態、またはこれらの因子の組み合わせなどの、癌細胞死滅活性の量的評価によって標準化される。
【０３７０】
実施形態では、本明細書に記載の方法はさらに、癌を死滅させるＴ細胞（例えば選択、富化、精製および／または増殖された）癌を死滅させるＴ細胞またはそれらの調製物の癌を死滅させる活性を判定する工程を含む。癌を死滅させる活性は、以下を含む方法などの方法によって判定することができる：
（ａ）癌を死滅させるＴ細胞に標的細胞を殺させるのに十分な条件下（例えば期間）で、癌に由来する標的細胞に癌を死滅させるＴ細胞（またはその調製物）を接触させる工程；および
（ｂ）工程（ａ）の後に標的細胞の数を判定する工程。
【０３７１】
実施形態では、接触工程前の標的細胞の数と比較した、接触工程後の標的細胞の数の減少は、癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞を殺すのに効果的であることを示す。
【０３７２】
実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞の活性は、Ｔ細胞を単離した患者と同じ患者からの癌細胞に対して試験される。さらなる実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞の活性は、異なる患者（つまりＴ細胞を単離した患者以外の患者）、例えばＴ細胞を単離した患者と同じ種類の癌を有する患者からの癌細胞に対して試験される。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞の活性は、Ｔ細胞を単離した患者と同じ種類の癌からの細胞株に対して試験され

る。
【０３７３】
実施形態では、該方法はさらに、工程（ａ）の後に癌を死滅させるＴ細胞の数を判定する工程を含み得る。実施形態では、接触工程前の癌を死滅させるＴ細胞の数と比較した癌を死滅させるＴ細胞の数の増加は、癌を死滅させるＴ細胞が生存度および／または増殖を増加させ、および癌細胞を殺すのにより効果的であり得ることを示す。
【０３７４】
実施形態では、評価および／または判定工程は、本明細書に記載の選択、富化、精製または増殖工程の前および／または後に実行することができる。実施形態では、インビボで効果的である可能性がより高いと判定された癌を死滅させるＴ細胞（またはその調製物）を増殖させる。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞のさらなる増殖は、癌細胞、例えば癌由来の細胞株または原発性癌サンプルに癌を死滅させるＴ細胞を接触させることにより達成され得る。一実施形態では、少数または不十分な数の癌細胞を、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞に加える。一実施形態では、癌細胞を１回以上、例えば数回、例えば連続して、癌を死滅させるＴ細胞に加える。一実施形態では、癌細胞、例えば少数の癌細胞の各付加は、接触工程で使用されるすべてのまたは一部のがん細胞が除去された時、例えば殺された時に、実行される。実施形態では、理論に束縛されることを望むものではないが、癌細胞の各付加は、癌を死滅させるＴ細胞の増殖および／または特定の癌を死滅させるＴ細胞クローンの選択的な増殖をさらに誘発する。
【０３７５】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の癌を死滅させるＴ細胞（またはその調製物）は、例えば本明細書に記載の方法によって製造され、Ｔ細胞の２つ以上のクローンを含む。実施形態では、いくつかのクローンが他より高い癌を死滅させる活性を有する場合もある。
【０３７６】
実施形態では、最も大きな活性（例えば癌細胞を殺す際に）を含む癌を死滅させるＴ細胞のクローンが選択される。実施形態では、クローンは、限界希釈法またはフローサイトメトリー法を使用して、例えば互いに別個の単細胞へと、例えば別個のウェルに平板培養されて、選別され得る。実施形態では、単細胞は各クローンの集団を生成するために増殖される。各クローンは、例えば癌を死滅させる活性の判定、および随意に本明細書に記載の他のパラメーターの判定によって、インビボでの効果の可能性に関して評価され得る。実施形態では、最も高い癌を死滅させる活性を示すクローンはさらに増殖および／または保存される。実施形態では、最も活性のある癌を死滅させるＴ細胞クローンは、例えば同じ患者または癌細胞株からの少数の癌細胞、例えば不十分な数の癌細胞を、連続して、例えば既存の癌細胞が除去される度に付加することによって選択される。実施形態では、最も活性のあるＴ細胞クローンは、わずかの癌細胞を認識し、例えば結合し、および除去し、それによって最も活性のあるＴ細胞クローンの増殖を優先的に誘発する一次Ｔ細胞の１つである。したがって、理論に束縛されることを望むものではないが、前述の方法は、Ｔ細胞プールの最も活性のある癌を死滅させるＴ細胞を経時的に富化すると考えられる。随意に、高い癌キラー活性を示す多数のクローンを一緒にプールし、および例えばさらに増殖および／または保存する。
【０３７７】
実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞（またはその調製物）は、Ｔ細胞の単一のクローンを含む。
【０３７８】
実施形態では、本明細書に記載される癌を死滅させるＴ細胞は適正製造基準（ＧＭＰ）に従って調製される。例えば、例えば癌を死滅させるＴ細胞の生成に使用される、本明細書に記載のエクスビボ反応混合物は、適正製造基準（ＧＭＰ）に従って調製される。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞は、ＧＭＰシステムまたは設備に埋め込まれた自動化されたフローサイトメトリープラットフォームを使用して調製される。実施形態では、エクス

ビボ反応混合物で使用されるＴ細胞、癌細胞、またはそれらの両方は、病院または医療従事者から得られる。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞の増殖、選択、精製、および／または富化は、適正製造基準（ＧＭＰ）に従って実行される。実施形態では、本明細書に記載の方法はさらに、病院または医療従事者に癌を死滅させるＴ細胞（例えばＧＭＰによって製造）を送付する工程を含む。

【０３７９】

＜癌を死滅させるＴ細胞および被験体の反応性の評価＞

本明細書は、癌を死滅させるＴ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞を生成するための患者の潜在力を評価する方法を提供する。さらに本明細書には、癌を死滅させるＴ細胞に対する被験体の反応性を評価する方法が提供される。

【０３８０】

実施形態では、該方法は：（ａ）癌を有する被験体からＴ細胞を提供する工程；（ｂ）被験体から癌細胞を提供する工程；および（ｃ）Ｔ細胞、癌細胞およびｐＩＣＦを含むエクスビボ反応混合物を形成する工程を含み、例えばエクスビボ反応混合物は、Ｔ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを得るのに十分な、例えば癌細胞に対する細胞傷害性活性のあるトロゴサイトーシスＴ細胞の生成を可能にするのに十分な条件下で、例えば期間において、形成される。

【０３８１】

実施形態では、候補となるｐＩＣＦおよび／または免疫調整剤の活性、および生成されたＴ細胞は、用量応答曲線を測定するためのエクスビボ／インビトロアッセイを使用して判定され、その数学的近似は、ＥＣ５０、有効Ｅ：Ｔ比率、Ｅｍａｘまたは動態の少なくとも１つから選択された量的パラメーターによる活性の推定を可能にする。これらのパラメーターは、癌を死滅させるＴ細胞および個々の被験体の反応性を評価するために使用することができる。

―Ｔ細胞増殖のＥＣ５０は、サンプル中の活性化癌を死滅させるＴ細胞の５０％を生じさせるｐＩＣＦの濃度を判定する。Ｔ細胞活性化のＥＣ５０は癌細胞枯渇のＥＣ５０に類似する。

―有効Ｅ：Ｔ比率は、癌細胞（標的細胞）で生成された癌を死滅させるＴ細胞（効果的なＴ細胞）の活性を表す。高い有効Ｅ：Ｔ比率は、自己由来細胞治療としての癌を死滅させるＴ細胞への高感度な患者を予測し、および低い有効Ｅ：Ｔ比率は、自己由来細胞治療としてのこれらの癌を死滅させるＴ細胞に抵抗する患者を予測する。

―癌細胞の用量応答曲線のＥｍａｘは、所与のインキュベーション時間において、高用量のｐＩＣＦで生存する癌細胞の割合（％）を判定する。より長いインキュベーションは、癌を死滅させるＴ細胞がより多くの癌細胞を殺すことを可能にする。活性化癌を死滅させるＴ細胞は、患者に適した単独療法処置であるためには、これらのＴ細胞ごとに癌細胞の１００％を殺す必要がある。癌細胞の殺滅が１００％を大幅に下回る場合、これはより長いインキュベーション時間でも改善されず、生きているそれらの癌細胞は抵抗し、および処置を決定するための臨床的情報を提供し得る。抵抗力のある表現型を回復させるために、免疫のチェックポイント阻害剤などの追加の免疫調節剤の付加がこの免疫抑制を克服し、したがってこの抵抗を克服する場合もある。

【０３８２】

癌を死滅させるＴ細胞活性の時間依存的動態。Ｔ細胞活性化の有効性および癌細胞枯渇は、同じｐＩＣＦの各被験体ごとに異なる。癌細胞をより速く殺す癌を死滅させるＴ細胞は、細胞療法においてより効果的であろう。より速い活性は、患者における癌細胞に対するより速い効果と相関し、より高い感度を反映する肯定的な結果である。癌を死滅させるＴ細胞が、ＭＨＣ－Ｉメカニズムを通じて癌細胞を認識するＣＤ８＋腫瘍特異抗原Ｔ細胞である場合、より速い活性は、癌細胞に対するより高い親和性をさらに意味する。

【０３８３】

実施形態では、該方法はさらに、反応混合物中のトロゴサイトーシスＴ細胞を識別する工程を含む。実施形態では、該方法はさらに、反応混合物中のトロゴサイトーシスＴ細胞を

定量化する工程を含む。識別および／または定量化は、癌細胞から１つ以上のマーカーを発現する細胞の識別を含み得る。付加的に、または代替的に、識別および／または定量化は、ＣＴＬ、例えばエフェクターメモリーＣＴＬの１つ以上のマーカーを発現する細胞の識別を含む。ＣＴＬマーカーの識別および／または定量化は、標識抗体分子（例えば蛍光標識された、または放射能標識された抗体分子）を使用して実行することができる。実施形態では、トロゴサイトーシスマーカーの識別および／または定量化はさらに、細胞表面標識を使用して、例えば標的細胞膜にまたはその全体にわたって分布する蛍光性の細胞追跡色素を使用して、実行することができる。そのような実施形態では、細胞表面標識、例えば細胞追跡色素は、癌細胞に加えられるが、トロゴサイトーシスＴ細胞を生成するための反応物、例えば癌細胞、Ｔ細胞およびｐＩＣＦを含む反応物中の癌を死滅させるＴ細胞には付加されない。いくつかの例では、フローサイトメトリーは、反応混合物中の細胞上のマーカー発現を識別（および随意に定量化）するために使用することができる。実施形態では、フローサイトメトリーは、特定の発現パターン、例えば癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）を示す発現パターン）を有する細胞の数を定量化するために使用することができる。実施形態では、被験体からの構成要素（例えばＴ細胞および癌細胞）を使用して生成されたより多くのトロゴサイトーシスＴ細胞（例えば基準レベルと比較して）は、被験体が癌を死滅させるＴ細胞、例えばトロゴサイトーシスＴ細胞を産生可能であることを示す。実施形態では、被験体からの構成要素（例えばＴ細胞および癌細胞）を使用して生成されたより多くのトロゴサイトーシスＴ細胞（例えば基準レベルと比較して）は、被験体が、例えば養子細胞療法としての癌を死滅させるＴ細胞を含む治療に反応を示すことを示す。実施形態では、基準レベルは、Ｔ細胞、癌細胞またはｐＩＣＦの１つ以上が欠如した類似の反応混合物で生成された癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）の数であり得る。例えば、基準レベルは、ｐＩＣＦのない類似の反応混合物で生成された癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）の数であり得る。他の実施形態では、基準レベルは、Ｔ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを得るのに十分ではない期間の後に、エクスビボ反応混合物で生成された癌を死滅させるＴ細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）の数である。

【０３８４】

実施形態では、癌細胞死をもたらす癌を死滅させるＴ細胞と標的細胞（例えば癌細胞）の比率は、被験体の癌を死滅させるＴ細胞への反応性の指標になり得る。理論に束縛されることを望むものではないが、より高い標的細胞：癌を死滅させるＴ細胞の比率は、より多くの活性化（例えばトロゴサイトーシス）Ｔ細胞が生成された（例えば、本明細書に記載の方法を使用）ことを示すことができ、また代わって被験体が癌を死滅させるＴ細胞によりよく反応すること（および場合によっては、癌を死滅させるＴ細胞の生成に使用されるｐＩＣＦへのよりよい反応性）を示し得る、と考えられる。

【０３８５】

＜医薬組成物および処置の方法＞

本明細書に開示される医薬組成物は、癌を死滅させるＴ細胞を含むことができ、活性化腫瘍抗原特異性Ｔ細胞を含み、限定されないが、エフェクターメモリーＴ細胞、細胞傷害性リンパ球（ＣＴＬ）、ヘルパーＴ細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）およびトロゴサイトーシスＴ細胞、またはそれらの調製物を、本明細書に記載されるように、１つ以上の生理的または薬学的に許容可能な担体、賦形剤、または添加剤と組み合わせて含む。例えば医薬組成物は、緩衝剤（例えば、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水）；ポリペプチド／アミノ酸（例えばグリシン）；抗凝血剤（例えばヘパリン）；タンパク質；酸化防止剤；炭水化物（例えばグルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール）；アジュバント（例えば水酸化アルミニウム）；キレート剤（例えばＥＤＴＡまたはグルタチオン）；および／または保存剤を含み得る。実施形態では、医薬組成物は、マイコプラズマ、内毒素、レンチウイルス、またはそれらの構成要素などの汚染物質、磁気ビーズ、細菌、真菌、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、および／またはプラスミドまたはベクターコンポーネントを実質的に含まない。実施形態では、医薬組成物は、適正製造基準（

ＧＭＰ）に従って調製される癌を死滅させるＴ細胞を含む。

【０３８６】

実施形態では、医薬組成物は精製された調製物である。例えば、医薬組成物は汚染物質を実質的に含まない、例えば検出可能なレベルの汚染物質がない。実施形態では、汚染物質には、内毒素、マイコプラズマ、ｐ２４、ＶＳＶ－Ｇ核酸、ＨＩＶ　ｇａｇ、複製可能レンチウイルス（ＲＣＬ）、残存ｐＩＣＦ、抗体、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、プールされたヒト血清、培地コンポーネント、ベクターパッケージング細胞またはプラスミドコンポーネント、細菌または真菌が含まれる。一実施形態では、細菌は、アルカリ糞便菌、カンジダアルビカンス、大腸菌、インフルエンザ菌、髄膜炎菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、肺炎レンサ球菌、およびＡ群化膿連鎖球菌から成る群から選択される少なくとも１つのものである。

【０３８７】

特定の実施形態では、医薬組成物は、検出可能な量（例えば微量）のｐＩＣＦ、例えば本明細書に記載のｐＩＣＦを含む。実施形態では、ｐＩＣＦは、１０重量％未満の濃度で、例えば１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０５％、０．０１％、またはそれ未満（例えば０．０００１重量％以上）の重量％の濃度で存在する。

【０３８８】

特定の実施形態では、医薬組成物は、検出可能な量（例えば微量）の細胞表面標識を、例えば、本明細書に記載されるような抗体細胞表面標識または細胞追跡色素などの蛍光性の細胞表面標識を含む。実施形態では、細胞表面標識、例えば蛍光性の細胞表面標識は、１０重量％未満の濃度で、例えば１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０５％、０．０１％、またはそれ未満（例えば０．０００１重量％以上）の重量％の濃度で存在する。

【０３８９】

実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の方法を使用して調製された癌を死滅させるＴ細胞（またはその調製物）を含む。

【０３９０】

本明細書に記載の方法は、本明細書に記載の癌を死滅させるＴ細胞（またはその調製物）を使用して、例えば本明細書に記載の医薬組成物を使用して、被験体の癌を処置する工程を含む。さらに、被験体の癌の症状を低減または改善する方法、および癌の成長を阻害し、および／または１つ以上の癌細胞を殺すための方法が提供される。実施形態では、本明細書に記載の方法は、本明細書に記載の癌を死滅させるＴ細胞または本明細書に記載の医薬組成物を投与された被験体における、腫瘍のサイズを減少させる、および／または癌細胞の数を減らす。

【０３９１】

実施形態では、癌は血液癌である。実施形態では、血液癌は白血病またはリンパ腫である。典型的な血液癌には、限定されないが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えばＢ細胞リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病）、急性骨髄性白血病、慢性骨髄白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫または急性リンパ性白血病が含まれる。実施形態では、癌は急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）以外である。

【０３９２】

実施形態では、癌は固形癌である。典型的な固形癌には、限定されないが、卵巣癌、直腸癌、胃癌、精巣癌、肛門癌、子宮癌、結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、小腸癌、食道癌、黒色腫、カポジ肉腫、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部の癌、皮膚または眼内の悪性黒色腫、子宮癌、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、扁平上皮癌、子宮頸癌、扁平上皮癌、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、膣癌、軟組織の肉腫、尿道癌、外陰癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓または尿管の癌、腎盤の癌腫

、脊椎軸腫瘍、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管新生、前記癌の転移性病巣、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【０３９３】

実施形態では、癌は黒色腫ではない。

【０３９４】

実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞によって処置される被験体は、癌を死滅させるＴ細胞の生成用にＴ細胞および／または癌細胞を単離した被験体と同じである。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞によって処置される被験体は、癌を死滅させるＴ細胞の生成用にＴ細胞および／または癌細胞を単離した被験体とは異なる。実施形態では、両被験体は、同じ種類の癌を有する、または有していた。

【０３９５】

実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞（または医薬組成物）は、処置または予防される疾患に適切な方法で投与される。投与の量および頻度は、患者の状態、および患者の疾患の種類と重症度などの因子によって判定される。適切な投与量は、治験によって決定される場合もある。例えば、「有効量」または「治療量」が示される場合、投与される医薬組成物（または癌を死滅させるＴ細胞）の正確な量は、腫瘍のサイズ、感染または転移の程度、被験体の年齢、体重、および症状における個体差を考慮して、医師によって決定され得る。実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、１０４～１０９細胞／ｋｇ体重、例えば１０５～１０６細胞／ｋｇ体重）、それらの範囲内の全ての整数値を含む用量で投与することができる。実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物は、これらの用量で複数回投与することができる。実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物は、免疫療法（例えばＲｏｓｅｎｂｅｒｇ　ＳＡ（１９８８）を参照）に記載される注入技術を使用して投与することができる。

【０３９６】

実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞（またはその調製物）または医薬組成物は、被験体に非経口的に投与される。実施形態では、細胞は、静脈内、皮下、腫瘍内、結節内、筋肉内、皮内、または腹腔内へと、被験体に投与される。実施形態では、細胞は、例えば腫瘍またはリンパ節に直接注入されることで投与される。実施形態では、細胞は、注入（例えばＲｏｓｅｎｂｅｒｇ　ＳＡ（１９８８）に記載のように）または静注として投与される。実施形態では、細胞は注射可能なデポー剤製剤として投与される。

【０３９７】

実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞（または医薬組成物）の単回投与を被験体に施す。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞の複数回投与を被験体に施す。実施形態では、各投与間の時間は少なくとも１２時間、例えば少なくとも１２、２４、３６、４８、７２、または９６時間以上、または少なくとも１、２、３、４、５、６、７日以上、または少なくとも１、２、３、４週以上である。

【０３９８】

実施形態では、単回投与は１０３～１０１１の癌を死滅させるＴ細胞（例えば１０３～１０４、１０４～１０５、１０５～１０６、１０６～１０７、１０７～１０８、１０８～１０９、１０９～１０１０、または１０１０～１０１１の癌を死滅させるＴ細胞）を含む。

【０３９９】

実施形態では、複数回投与レジメンの各用量は、１０３～１０１１の癌を死滅させるＴ細胞（例えば１０３～１０４、１０４～１０５、１０５～１０６、１０６～１０７、１０７～１０８、１０８～１０９、１０９～１０１０、または１０１０～１０１１の癌を死滅させるＴ細胞）を含む。

【０４００】

実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞またはその調製物（または医薬組成物）は、被験体における癌細胞の数または割合を、例えば負の対照に対して、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６５％、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９５％、または少なくとも９９％まで減らす。

【０４０１】
実施形態では、被験体は哺乳動物である。実施形態では、被験体は、ヒト、サル、ブタ、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ラットまたはマウスである。実施形態では、被験体はヒトである。実施形態では、被験体は小児の被験体であり、例えば１８歳未満、例えば１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１歳未満またはそれ以下である。実施形態では、被験体は成人であり、例えば少なくとも１８歳、例えば少なくとも１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２５－３０、３０－３５、３５－４０、４０－５０、５０－６０、６０－７０または８０－９０歳である。
【０４０２】
＜併用療法＞
本明細書に記載の方法に従って、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターＴ細胞、例えば本明細書に記載のエフェクターＴ細胞集団（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）は、第２の治療薬または処置と組み合わせて使用することができる。
【０４０３】
実施形態では、被験体が癌と診断された後に、例えば癌が被験体から除去される前に、エフェクターＴ細胞と、第２の治療薬または処置が投与／実行される。
【０４０４】
実施形態では、エフェクターＴ細胞および第２の治療薬または処置は、同時にまたは一斉に投与／実行される。例えば、１つの処置の送達は、第２の処置の送達が始まった時にも依然として行われており、例えば処置の投与は重複する。他の実施形態では、エフェクターＴ細胞と、第２の治療薬または処置は、連続して投与／実行される。例えば、１つの処置の送達は、他の処置の送達が始まる前に停止される。
【０４０５】
実施形態では、併用療法はより効果的な処置をもたらし、例えば癌細胞をより効果的に死滅させる。実施形態では、第１および第２の処置の組み合わせは、第１または第２の処置単独よりも効果的である（例えば、症状および／または癌細胞のより大きな低減をもたらす）。実施形態では、併用療法は、単独療法として投与された時に同様の効果を達成するのに通常求められる第１または第２の処置の容量と比較して、第１または第２の処置のより少ない用量の使用を可能にする。実施形態では、併用療法は、部分的な相加効果、完全な相加効果、または相加効果より大きな効果を有する。
【０４０６】
実施形態では、第２の治療薬または処置は、本明細書の「Ｔ細胞の活性を増強する他の方法」の部分に記載された治療を含む。実施形態では、第２の治療薬は、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、本明細書に記載の免疫チェックポイント阻害剤）、Ｔ細胞のアゴニスト（例えば本明細書に記載のＴ細胞のアゴニスト）、および／または本明細書に記載されるような他の免疫調節薬（例えばレナリドミド）を含む。
【０４０７】
＜新たなｐＩＣＦおよび免疫調整剤のためのスクリーニングアッセイ＞
候補となるｐＩＣＦおよび／または免疫調整剤に関するスクリーニングの方法が本明細書に提供される。例えば、該方法は、ｐＩＣＦの有効性、例えばエクスビボでの有効性を評価する工程を含む。本明細書の方法は、特定の患者の特定の腫瘍／癌の種類に対して最も効果的なｐＩＣＦおよび／または免疫調整剤のセットを特定するために、多数のｐＩＣＦおよび／または免疫調整剤の候補および／またはそれらの組み合わせをスクリーニングする工程を含む。
【０４０８】
実施形態では、該方法は、細胞ベースのアッセイを含み、および例えばフローサイトメトリーにより、例えばＥｘｖｉＴｅｃｈのプラットフォームを使用した、自動化されたサンプル調製および自動化された評価を含み得る。例えば米国特許第８，７０３，４９１号、米国特許第２０１３／０１０９１０１Ａ１号、米国特許第２０１０／０２９８２５５Ａ１

号、米国特許第８，３１３，９４８号、およびＢｅｎｎｅｔｔ　ＴＡ（２０１４）を参照のこと、これらは参照により本明細書に組み込まれる。例えば、自動化プラットフォーム、例えば自動化フローサイトメトリープラットフォームの使用は、何百または何千もの異なるｐＩＣＦおよび／または免疫調整剤の評価を可能することができ、およびこの評価はエクスビボで行うことができる。フローサイトメトリー法の使用は、個々の細胞の評価と、さらに特定の細胞集団のソーティングを可能にする。免疫細胞は、細胞型特異性細胞表面マーカーに結合する抗体で染色することができる。標的癌細胞は、細胞表面標識、例えば標的細胞膜に分布する細胞型特異性細胞表面マーカーまたは細胞追跡色素に結合する抗体で、染色することができる。細胞はさらに、細胞内にある分子に対して染色することができ、タンパク質、例えばインターロイキンまたはインターフェロンの産生による細胞の特性評価を可能にする。

【０４０９】

実施形態では、候補となるｐＩＣＦおよび／または免疫調整剤は、ＥｘｖｉＴｅｃｈプラットフォームなどの自動化フローサイトメトリープラットフォームを使用してスクリーニングすることができる。Ｉｄを参照されたい。このプラットフォームは、何百または何千ものｐＩＣＦおよび／または免疫調整剤の癌を死滅させる（例えばトロゴサイトーシス）潜在力の判定を可能にする。ｐＩＣＦおよび／または免疫調整剤の癌を死滅させる潜在力はさらに、本明細書に記載の標的癌細胞と癌を死滅させるＴ細胞の比率によって測定することができる。プラットフォームはさらに、ｐＩＣＦおよび／または免疫調整剤の多くの組み合わせのスクリーニングを可能にする。

【０４１０】

実施形態では、スクリーニング法は、１つ以上の候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬を癌細胞およびＴ細胞とインキュベートする工程を含む。実施形態では、該方法は、１つ以上の候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬をサンプル、例えば血液サンプルとインキュベートする工程を含み、ここで、血液サンプルは癌細胞およびＴ細胞の両方を包含している。実施形態では、該方法は、１つ以上の候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬を腫瘍サンプルとインキュベートする工程を含み、ここで、腫瘍サンプルは癌細胞およびＴ細胞の両方を包含している。他の実施形態では、癌細胞とＴ細胞は、様々なサンプルに由来し、例えば、癌細胞は腫瘍サンプルに由来し、Ｔ細胞は血液サンプルに由来する。

【０４１１】

実施形態では、サンプルは、血液サンプル、例えば全血サンプル、末梢血、骨髄、を含む。別の実施形態では、サンプルはリンパ節または脾臓から得られる。実施形態では、サンプルは、悪性腫瘍、例えば血液学的悪性腫瘍、固形癌、に関係する他の組織から得られる。実施形態では、サンプルは、得られた直後に、本明細書に記述された方法で使用される。あるいは、サンプルは、凝固を回避するために化学薬品で処置され、後の時点で分析されてもよい。一実施形態では、血液サンプルは、凝固を回避するためにヘパリンで処置される。別の実施形態では、血液サンプルは、凝固を回避するためにＥＤＴＡで処置される。別の実施形態では、血液サンプルは、凝固を回避するために、トロンビン抑制物質を含むがこれらに限定されない抗凝血剤で処置される。実施形態では、サンプルは、例えば細胞環境がインビボ環境により類似するように、精製または分離の工程を経ずに使用される。

【０４１２】

実施形態では、インキュベーション時間は例えば、癌細胞を死滅させるトロゴサイトーシスＴ細胞を形成するようトロゴサイトーシスを受けるために、Ｔ細胞が癌細胞からの細胞表面マーカーを得るのに十分である。実施形態では、インキュベーション時間は、ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬が、排除された癌細胞とＣＤ８および／またはＣＤ４活性化Ｔ細胞との間の有意により高い有効Ｅ：Ｔ比率を誘導するのに十分である。実施形態では、インキュベーション時間は、少なくとも１２時間（例えば、少なくとも１２、２４、３６、４８、７２、９６、１２０時間、またはそれ以上）である。実施形態では、癌細胞、Ｔ細胞およびｐＩＣＦの第１の反応混合物が、エクスビボで癌を死滅させるＴ細胞を生成した後に、第２のまたは後続の癌細胞セットが加えられ、この場合には、インキュベーシ

ョン時間はより短く、例えば少なくとも１時間（例えば少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、２４時間、またはそれ以上）である。

【０４１３】

数百または数千の候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬を評価またはスクリーニングすることができる。本明細書に記述された方法は、個別化薬物レジメン（例えば、癌を死滅させるＴ細胞の個別化された産生および使用）のための多数の変数を評価するために、アリコート形態で、様々な濃度で、多数の候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬（例えば候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬の組み合わせ）を分析することができる。一実施形態では、該方法は、約５－５００のアリコート（例えば５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、２００、５００、またはそれ以上）を、（随意に候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬あたり）分析し、または、範囲は、前述の値のうちの任意の２つによって画定される。別の実施形態では、該方法は、約９６以上のアリコートを分析する。さらに、候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬の数は、アリコートの数と共に変動しうる。一実施形態では、アリコートの数と、様々な候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬の数との両方が、それぞれ、約５より大きく（例えば５、１０、１５、２０、２５、３０、３５または４０）、または、範囲は、前述の値のうちの任意の２つによって画定される。別の実施形態では、アリコートの数と、様々な候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬の数との両方は、それぞれ、約５０より大きい。別の実施形態では、アリコートの数と、様々な候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬の数との両方は、それぞれ、約９６より大きい。別の実施形態では、当該技術において既知の認可された薬の有効成分を、潜在的ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬を同定するために、本明細書に記述されたアッセイでスクリーニングすることができる。そのような認可された薬は、ヒトにおいて安全で、患者への投与用に癌を死滅させるＴ細胞を生成するために使用することができる。

【０４１４】

実施形態では、スクリーニング法は、標的細胞（例えば癌細胞）集団を同定する工程（および、例えば、定量する工程）を含む。その代わりに、または、それに加えて、スクリーニング法は、エフェクター細胞集団（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞集団）を同定する工程を含む。細胞集団は、特定の細胞表面または細胞内マーカー、例えば蛍光タグのような検出標識に結合する抗体に向けられた抗体、例えばモノクローナル抗体を用いることによって同定することができる。実施形態では、細胞表面マーカーは、血液学的悪性腫瘍（例えば白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫）、および白血球の同定に使用される分化（ＣＤ）マーカーのクラスターを含む。ＣＤマーカーも、固形腫瘍を同定し診断するために使用される。フローサイトメトリーは、細胞集団の検出および定量に使用することができる。細胞表面ラベル、例えば細胞追跡色素も、癌を死滅させるＴ細胞によってトロゴサイトーシスを測定するために、癌細胞の表面の細胞膜にラベルを付すために使用することができる。免疫組織化学も、例えば細胞集団を同定するために、特定の細胞マーカーを検出するために使用することができる。

【０４１５】

実施形態では、エフェクター細胞（例えばＴ細胞）の集団およびサブ集団に対する候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬の効果が判定される。例えば、サンプルは、ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬とのインキュベーション前に様々なタイプのＴ細胞を含み得、かつ、ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬とのインキュベーション後に様々なＴ細胞のタイプの様々な組み合わせまたは様々なレベルを含み得る。実施形態では、ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬とのインキュベーションは、トロゴサイトーシスＴ細胞の形成および／またはその数の増加をもたらしうる。実施形態では、ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬とのインキュベーションの後にトロゴサイトーシス（および、エフェクターＴ細胞と癌細胞の両方からの明白なマーカー）になるＴ細胞のパーセンテージが測定される。

【０４１６】

実施形態では、標的細胞（例えば癌細胞）集団に対する候補ｐＩＣＦおよび／または免疫

調節薬の効果が測定される。測定は、細胞枯渇の測定、例えば、陰性対照を含むウェルに対するｐＩＣＦまたは免疫調節薬を含むウェルの細胞数の定量、を含むことができる。

【０４１７】

実施形態では、エフェクター細胞（例えばトロゴサイトーシスＴ細胞）集団に対する候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬の効果が測定される。測定は、細胞増殖分析、例えば、陰性対照を含むウェルに対するｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬を含むウェルの細胞数の比較、を含むことができる。

【０４１８】

実施形態では、（ｉ）標的（例えば癌）細胞の枯渇、（ｉｉ）（例えば、癌細胞由来のマーカーおよびエフェクターＴ細胞、例えばＣＴＬ、由来のマーカーを含む）トロゴサイトーシスＴ細胞の形成またはレベルの上昇、および／または、（ｉｉｉ）エフェクターＴ細胞（例えばＣＴＬ）の増殖、をもたらす候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬は、有効なｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬として特定され、例えば、増強された癌を死滅させる活性を有するＴ細胞の生成に有効であると特定される。

【０４１９】

実施形態では、候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬は、例えば本明細書に記述されるｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬などの基準と比較して評価される。基準と比較して標的（例えば癌）細胞の同様またはより大きな枯渇をもたらす候補ｐＩＣＦが、有効なｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬として同定される。実施形態では、トロゴサイトーシスＴ細胞（例えば、癌細胞由来のマーカーおよびエフェクターＴ細胞、例えばＣＴＬ、由来のマーカー）の、同様またはより大きな形成またはレベルの上昇をもたらす候補ｐＩＣＦが、有効なｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬として同定される。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞の、同様またはより大きな程度の増殖をもたらす候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬が、有効なｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬として同定される。

【０４２０】

実施形態では、候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬および生成されたＴ細胞の活性が、用量反応曲線を測定するためのエクスビボ／インビトロアッセイを用いて、測定され、これの数学的フィッティング（ｍａｔｈｅｍａｔｉｃａｌ　ｆｉｔｔｉｎｇ）は、ＥＣ５０、有効Ｅ：Ｔ比率、Ｅｍａｘまたは動態から選択される少なくとも１つから選択される活性を推定するための定量的パラメーターを可能にする。

【０４２１】

－Ｔ細胞増殖のＥＣ５０は、サンプル中の活性化された癌を死滅させるＴ細胞の５０％を生成するｐＩＣＦの濃度を判定する。Ｔ細胞活性化のＥＣ５０は、癌細胞枯渇のＥＣ５０に類似している。

【０４２２】

－有効Ｅ：Ｔ比率は、癌細胞（標的細胞）上で生成された癌を死滅させるＴ細胞（有効Ｔ細胞）の活性を表わす。高有効Ｅ：Ｔ比率は、自己由来の細胞療法としての癌を死滅させるＴ細胞に対する感受性患者を予測し、低有効Ｅ：Ｔ比率は、自己由来の細胞療法としてのこれらの癌を死滅させるＴ細胞に対する耐性患者を予測する。

【０４２３】

－癌細胞の用量反応曲線のＥｍａｘは、所定のインキュベーション時間で、高用量のｐＩＣＦで、生きている癌細胞のパーセンテージ（％）を判定する。より長いインキュベーションは、癌を死滅させるＴ細胞が、より多くの癌細胞を死滅させることを可能にする。活性化した癌を死滅させるＴ細胞は、これらのＴ細胞が患者のための適切な単剤療法であるためには、癌細胞の１００％を死滅させる必要がある。癌細胞の死滅が１００％より有意に低く、これか、これがより長いインキュベーション時に改善しない場合、生存しているこれらの癌細胞は耐性であり、処置を決定するために臨床的に有益であり得る。耐性表現型を元に戻すために、免疫チェックポイント阻害剤などの追加の免疫調節剤を追加することで、この免疫抑制を克服し、このようにして、この耐性を克服してもよい。

１．免疫抑制を緩和するためのエクスビボで追加の免疫調節剤を加えることは、その後の

細胞療法のために生成される、癌を死滅させるＴ細胞にとって特に有意義である。その理由は、ポリ免疫療法（ｐｏｌｙ－ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ）を制限する毒性制限のために、インビボで被験体に同時に投与される２－３種の免疫療法薬の組合せしかできない従来技術に記載の併用療法とは対称的に、これにより、複数の免疫療法剤、複数の作用機序を含む免疫調節剤の組み合わせが、最大５、１０、または２０薬剤まで可能になる、ということである。単独でまたは癌細胞死滅活性によって正常化された癌を死滅させるＴ細胞のエクスビボ／インビトロ毒性を測定する、本明細書中に提示されるスクリーニングアッセイは、それらの組み合わせた毒性を制限しながら組み合わせた活性を増強する、エクスビボ／インビトロでインキュベートされた免疫療法の最適な組み合わせを同定するのに適している可能性がある。従って、細胞療法のためにエクスビボで生成される癌を死滅させるＴ細胞は、ポリ免疫療法の利点を利用することができる。

２．追加の免疫療法的処置として、インビボで癌を死滅させるＴ細胞に免疫調節剤を加え、組み合わせ処置をもたらす。単独でまたは癌細胞死滅活性によって正常化された癌を死滅させるＴ細胞のエクスビボ／インビトロ毒性を測定する、本明細書中に提示されるスクリーニングアッセイは、その組み合わせた毒性を制限しながら組み合わせた活性を増強することによって患者を処置するために免疫療法の最適な組み合わせを予測するのに適している可能性がある。

【０４２４】

－癌を死滅させるＴ細胞活性の時間依存性の動態。Ｔ細胞活性化および癌細胞枯渇の効率は、同じｐＩＣＦの各被験体によって異なる。癌細胞をより早く死滅させる、癌を死滅させるＴ細胞は、細胞療法においてより有効である可能性が高い。より速い活性は、患者の癌細胞に対するより速い効果と相関し、より高い感受性を反映する肯定的な結果である。より速い活性は、癌を死滅させるＴ細胞がＭＨＣ－１機構を介して癌細胞を認識するＣＤ８＋腫瘍特異的抗原Ｔ細胞である場合、癌細胞に対するより高い親和性をも意味する。

【０４２５】

実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞調製物は、非病理学的な細胞を有意に少なく死滅させる、すなわち、より選択的に死滅させるため、エクスビボ／インビトロでの毒性がより低い細胞を含む。これは、非病理学的な細胞を標識し、基準と比較してより選択的な癌細胞の死滅を示すことによって、測定することができ、ここにおいて、上記の基準は、同じ癌タイプの異なる患者サンプル、または、同じ患者サンプル（例えば白血球増加症）内の異なる細胞サブセット（例えばクローン）のいずれかであり得る。

【０４２６】

細胞療法中で観察された最も一般的な毒性は、サイトカインストーム（Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｓｔｏｒｍ）と呼ばれ、サイトカインカスケードおよび高サイトカイン血症としても知られている。これは、細胞溶解癌細胞による死滅過程において癌を死滅させるＴ細胞によって放出されたサイトカインが細胞外に放出された場合に生じる潜在的に致命的な免疫反応であり、様々なサイトカインの濃度の高い上昇を結果としてもたらす。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞の調製物は、上清および／または細胞内でサイトカインをあまり生成しないため、エクスビボ／インビトロでの毒性がより低い細胞を含む。実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞の調製物は、癌細胞死滅の単位当たりの上清および／または細胞内であまりサイトカインを生成しないため、エクスビボ／インビトロでより高い癌を死滅させる活性およびより低い毒性の両方を同時に有する細胞を含み、一度、放出されるサイトカインのタイプおよび／またはレベルは、有効Ｅ：Ｔ比率、ＥＣ５０、Ｅｍａｘ、動態、またはこれらの因子の組み合わせなどの癌細胞死滅活性の定量的評価によって正規化される。

【０４２７】

実施形態では、候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬の効力、例えば効力、活性は、例えば、標的細胞が癌細胞であり得る場合の癌を死滅させるＴ細胞：標的細胞の様々な比率を使用するエクスビボ／インビトロアッセイを用いて判定される。いくつかの実施形態では、アッセイは癌を死滅させるＴ細胞、または、例えば、本明細書に記述された方法によって産生されるその調製物を提供する工程を含む。実施形態では、アッセイはさらに、（

ａ）候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節物質と、標的細胞（例えば、癌細胞）と、癌を死滅させるＴ細胞、または、癌を死滅させるＴ細胞が標的細胞を死滅させることを可能にするのに十分な（例えば、候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節剤の一定の期間および特定の濃度についての）条件下でのその調製物と、を含む複数のエクスビボ反応混合物を形成する工程を含む。実施形態では、エクスビボ反応混合物は、複数の標的細胞対Ｔ細胞比率を含む。アッセイはまた、各標的細胞対Ｔ細胞比率について、工程（ａ）後に標的細胞の数を判定し、および随意に、工程（ａ）後に癌を死滅させるＴ細胞の数を判定する工程（ｂ）を含むことができる。実施形態では、アッセイはさらに、工程（ａ）から得られた標的細胞Ｔ細胞比率を工程（ｂ）における標的細胞の数と相関させる工程（ｃ）を含む。実施形態では、工程（ａ）後に標的細胞を少なくさせる、工程（ａ）から得られた高い標的細胞Ｔ細胞比率（例えば基準比より高い比率）は、候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬が、被験体から癌を死滅させるＴ細胞を産生する際に使用するための有効なｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬（例えば、強力なｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬）である、ということを示唆する。

【０４２８】

実施形態では、基準比は、所定の比率であり、例えば、１：３から１：１０、例えば１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、または、１：１０である。実施形態では、工程（ｂ）から得られる高い標的細胞Ｔ細胞比率は、１：４から１：１００（例えば１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１５、１：２０、１：２５、１：３０、１：３５、１：４０、１：４５、１：５０、１：７５、１：１００、またはそれ以上）である。

【０４２９】

実施形態では、工程（ａ）後のより少数の標的細胞は、対照値と比較して、工程（ｂ）のより少ない数の標的細胞（例えば少なくとも１．５倍、例えば少なくとも２倍、３倍、４倍、６倍、８倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、１５０倍、２００倍、５００倍、１０００－、またはそれ以上少ない）によって示される。実施形態では、対照値は、エクスビボ混合物の形成前の標的細胞の数、または癌を死滅させるＴ細胞が標的細胞を死滅させるのに十分でない期間後のエクスビボ混合物中の標的細胞の数である。実施形態では、対照値は、ｐＩＣＦなしで、またはＴ細胞相互作用アーム（例えば、ＣＤ３）のみを含むｐＩＣＦのヌル対照と、同じ期間インキュベートされたエクスビボ混合物中の標的細胞の数である。

【０４３０】

実施形態では、癌を死滅させるＴ細胞またはその調製物は、Ｔ細胞、例えば、ＣＤ８＋およびＣＤ２５＋であるＣＴＬ、および／または、ＣＤ４＋およびＣＤ２５＋であるＴ細胞、を含む。

【０４３１】

実施形態では、方法（例えば、本方法の工程（ｂ））は、自動化されたプラットフォーム、例えば、本明細書に記述される自動フローサイトメトリープラットフォーム、例えば本明細書に記述されるＥｘｖｉＴｅｃｈプラットフォーム、で行なわれる。

【０４３２】

実施形態では、有効な候補ｐＩＣＦおよび／または免疫調節薬は、本明細書に記述される方法、例えば、本明細書に記述される癌を死滅させるＴ細胞を産生する方法、本明細書に記述される処置の方法、本明細書に記述される癌処置を評価する方法、および／または、本明細書に記述される癌を死滅させるＴ細胞に反応する患者を同定する方法、で使用される。

【０４３３】

癌処置のための評価アッセイ

患者が特定の癌処置に反応するか否かを評価する方法が本明細書に提供される。実施形態では、評価する方法は、特定の患者において有効であると可能性があるがん治療についてのスクリーニング方法を含む。

【０４３４】
実施形態では、多数のタイプの癌処置（例えば、化学療法、標的化抗癌治療、腫瘍溶解性薬、細胞傷害性薬物、免疫に基づく治療、サイトカイン、Ｔ細胞のアゴニスト（例えば、アゴニスト抗体またはそのフラグメントまたは共刺激分子の活性化因子）、抑制分子の阻害剤（例えば免疫チェックポイント阻害剤）、免疫調節剤、ワクチン、または、細胞免疫療法）を評価することができる。実施形態では、評価される癌処置には、限定されないが、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、ＣＴＬＡ４、ＰＤ１、ＰＤＬ１、ＰＤＬ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＢＴＬＡ、ＣＤ８０、ＣＤ８６またはＨＶＥＭの１つ以上の阻害剤が含まれる。典型的な免疫のチェックポイント阻害剤には、イピリムマブ、トレメリムマブ、ＭＤＸ－１１０６、ＭＫ３４７５、ＣＴ－０１１、ＡＭＰ－２２４、ＭＤＸ－１１０５、ＩＭＰ３２１またはＭＧＡ２７１が含まれる。実施形態では、評価される癌処置には、Ｔ細胞のアゴニスト、例えば、ＣＤ１３７、ＣＤ４０、および／またはグルココルチコイド誘導性ＴＮＦ受容体（ＧＩＴＲ）に対する抗体またはそのフラグメント、が含まれる。実施形態では、評価される癌処置には、レナリドマイド（ｌｅｎｏｌｉｄｏｍｉｄｅ）などの免疫調節剤が含まれる。本明細書に記述される任意の免疫調節剤を評価することができる。

【０４３５】
実施形態では、評価する方法は以下を含む：（ａ）癌（例えば血液学的癌または固形癌）を有する対象からＴ細胞を提供する工程；（ｂ）癌細胞を、例えば被験体から提供する工程；（ｃ）Ｔ細胞、癌細胞および近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）を含むエクスビボ反応混合物を、例えば、Ｔ細胞が癌細胞から細胞表面マーカーを獲得できるのに十分な条件（例えば一定の期間）下で、形成する工程；および、（ｄ）エクスビボ反応混合物を候補の癌処置または癌処置の組み合わせと接触させる工程。該方法は、特定の患者の癌細胞を死滅させる際の候補の癌処置の有効性を示す１つ以上のパラメーターを判定することをさらに含む。

【０４３６】
例示的なｐＩＣＦは、本明細書の「近接免疫コーチング因子（ｐＩＣＦ）」に詳細に記載されている。

【０４３７】
実施形態では、Ｔ細胞と癌細胞は、同じサンプル由来であり、例えば、（癌処置への反応性について）評価される患者由来である。例えば、評価される患者からの血液サンプル（例えば、癌細胞とＴ細胞の両方を含む）が、サンプルとして提供される。あるいは、評価される患者由来の腫瘍サンプル（例えば、癌細胞とＴ細胞、例えば腫瘍浸潤Ｔ細胞、の両方を含む）が提供される。実施形態では、該方法は、エクスビボ反応混合物を形成する前に、サンプル、例えば血液サンプルまたは腫瘍サンプル、から任意の構成要素（例えば細胞構成要素）を取り除く工程を含まない。実施形態では、血液サンプルまたは腫瘍サンプルは、新たに単離されたサンプルまたは凍結および解凍されたサンプルであり得る。

【０４３８】
実施形態では、サンプルは、血液サンプル、例えば全血サンプル、末梢血、骨髄、を含む。別の実施形態では、サンプルはリンパ節または脾臓から得られる。実施形態では、サンプルは、悪性腫瘍、例えば血液学的悪性腫瘍、固形癌、に関係する他の組織から得られる。実施形態では、サンプルは、得られた直後に、本明細書に記述された方法で使用される。あるいは、サンプルは、凝固を回避するために化学薬品で処置され、後の時点で分析されてもよい。一実施形態では、血液サンプルは、凝固を回避するためにヘパリンで処置される。別の実施形態では、血液サンプルは、凝固を回避するためにＥＤＴＡで処置される。別の実施形態では、血液サンプルは、凝固を回避するために、トロンビン抑制物質を含むがこれらに限定されない抗凝血剤で処置される。実施形態では、サンプルは、例えば細胞環境がインビボ環境により類似するように、精製または分離の工程を経ずに使用される。

【０４３９】
実施形態では、反応混合は、容器、例えば、マルチウェルディッシュまたはプレートのウ

ェル（例えば、６、１２、２４、４８、または９６ウェルを含むマイクロプレート）またはアッセイチューブ中で実施される。

【０４４０】

実施形態では、該方法（例えば、ｐＩＣＦを含むことによる）は、癌を死滅させる活性を増強したトロゴサイトーシスＴ細胞の集団を生成する。理論に縛られることを望むものではないが、この増強された癌を死滅させるＴ細胞の集団の生成によって、アッセイはそのような癌を死滅させるＴ細胞を含んでいない他のタイプのアッセイよりも、癌処置の効果の検出においてより感受性が高いと考えられる。

【０４４１】

実施形態では、評価する方法は、高スループットな方法で実施することができ、例えば、特定の患者において有効である可能性がある癌処置についてのスクリーニングを含むことができる。実施形態では、スクリーニング法は細胞ベースのアッセイを含み、自動サンプル調製および自動評価を、例えば、ＥｘｖｉＴｅｃｈプラットフォームを用いる、フローサイトメトリーによって、含むことができる。例えば、自動プラットフォーム、例えば自動フローサイトメトリープラットフォーム、を使用することで、数百または数千の様々な癌処置の評価ができることがあり、かつ、この評価はエクスビボで行うことができる。実施形態では、候補の癌処置は、ＥｘｖｉＴｅｃｈプラットフォームなどの自動フローサイトメトリープラットフォームを使用してスクリーニングすることができる。プラットフォームはまた、癌処置の多数の組み合わせのスクリーニングを可能にする。

【０４４２】

数百または数千の癌処置候補をサンプリングすることができる。本明細書に記述された方法は、多数の変数を評価するために、アリコートの形態で、様々な濃度で、多数の候補癌処置（例えば、癌処置の組み合わせ）を分析することができる。一実施形態では、該方法は、約５－５００のアリコート（例えば５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、２００、５００、またはそれ以上）を、（随意に癌処置について）、または前述の値のうちの任意の２つによって画定された範囲を分析する。別の実施形態では、該方法は、約９６以上のアリコートを分析する。さらに、癌処置の数は、アリコートの数と共に変動しうる。一実施形態では、アリコートの数と、様々な候補癌処置の数との両方が、それぞれ、約５－４０より大きく（例えば５、１０、１５、２０、２５、３０、３５または４０）、または、範囲は、前述の値のうちの任意の２つによって画定される。別の実施形態では、アリコートの数と、様々な候補癌処置の数との両方は、それぞれ、約５０より大きい。別の実施形態では、アリコートの数と、様々な候補癌処置の数との両方は、それぞれ、約９６より大きい。

【０４４３】

評価される患者由来の癌細胞に対する候補癌処置の効果は、候補処置の非存在下と比較して、候補処置の存在下で起こる癌を死滅させる程度によって判定することができる。癌を死滅させる程度は、本明細書に記述される方法を用いて判定される。実施形態では、癌を死滅させる活性は、本明細書に記載され、有効Ｅ：Ｔ比率と称される、排除された標的癌細胞と活性化Ｔ細胞（癌を死滅させるＴ細胞）との間の有効Ｅ：Ｔ比率を測定することによって判定される。例えば、癌細胞は、癌特異的細胞マーカーの検出（例えばフローサイトメトリーの使用による）によって同定され、次いで、定量されうる。

【０４４４】

実施形態では、アッセイにおいてより多くの癌の死滅をもたらす候補癌処置（例えば、処置前よりも処置後の癌細胞の数が少ない、または、陰性対照処置を含有するサンプルと比較して癌細胞の数が少ない）（例えば、癌細胞の数が少なくとも１０％、例えば、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１．５倍、２倍５倍、１０倍、２０倍、５０倍、１００倍、またはそれ以上、少ない）は、患者はその癌処置に感受性があるか、またはそれに反応する可能性が高い、すなわち、癌処置は癌細胞を効果的に死滅させ、および／または患者の腫瘍負荷を軽減させる可能性が高い、ということを示す。

【０４４５】
実施形態では、アッセイにおいてより多くの癌の死滅をもたらす候補癌処置（例えば、処置前よりも後の癌細胞の数が少ない、または、陰性対照処置を含有するサンプルと比較して癌細胞の数が少ない）（例えば、癌細胞の数が、少なくとも１０％、例えば、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１．５倍、２倍５倍、１０倍、２０倍、５０倍、１００倍、またはそれ以上、少ない）は、その癌処置は、患者の癌の処置に有効である可能性が高い、ということを示す。
【０４４６】
実施形態では、該方法はさらに、様々な候補癌処置に対する患者の反応性についての報告書を準備および／または提供する工程を含む。実施形態では、報告書は、患者、または他の人または実体、例えば、医師、例えば腫瘍専門医、病院、診療所、第三者の支払人、保険会社または官公庁などの医療提供者に提供される。別の実施形態では、報告書は、癌細胞に対する候補の癌処置の効果（例えば、癌の死滅の程度）を解釈または判定する責任を負う当事者に提供される。
【０４４７】
実施形態では、報告書は、電子、ウェブベース、または紙の形式であってもよい。報告は、本方法から得られる結果、例えば、癌細胞の同定、癌細胞の定量、および、各癌処置または癌処置の組み合わせに対応する癌細胞死滅の程度、を含みうる。
【０４４８】
一実施形態では、癌細胞死およびその効果をもたらした関連する癌処置の程度を同定する報告書が紙または電子形式で生成される。
【０４４９】
そのような情報は、癌処置についての潜在的または示唆的な情報を含みうる。報告書には、癌処置の有効可能性、癌処置の受け入れ可能性、または、患者に対する癌処置の適用可能性に関する情報が含まれうる。例えば、その報告書は、癌処置の投与、例えば、予め選択された用量、または予め選択された治療レジメン、例えば、他の薬物と組み合わせて、での患者への投与に関する情報または勧告を含みうる。実施形態では、本方法で試験されたすべての候補癌処置が、報告書中で特定されるとは限らない。例えば、報告書は、患者に有効である可能性の高い癌処置に限定することができる。他の例では、報告書は、患者に有効であるとは思われない癌処置を省略することができる。この報告書は、本方法を実施する実体によるサンプルの受領から３－２１日以内（例えば、３、４、５、６、７、１４、または２１日以内）に、例えば本明細書に記載の実体に送達することができる。
【０４５０】
＜実施例＞
実施例１：多発性骨髄腫（ＭＭ）中の二重特異性抗体の効果
実施形態では、血液学的悪性腫瘍の患者から得られたサンプルは、標的（悪性）細胞およびエフェクター（ＣＴＬ）細胞の両方を包含しているので、悪性細胞上の特定の腫瘍標的およびＣＴＬ上のＴ細胞標的（ＣＤ３）に対するＢｓＭＡｂの効果を試験するために有用である。骨髄（ＢＭ）サンプルは、多発性骨髄腫と診断された患者から得られた。すべてのサンプルは、研究参加についてのインフォームドコンセントをした１８歳以上の成人患者由来である。
【０４５１】
二重特異性モノクローナル抗体（ＢｓＭＡｂ）および対照抗体が、９６ウェルプレートに加えられた。各ＢＭサンプルを培養培地でそのまま希釈し（すなわち、最初に細胞または他の成分をＢＭから分離せずに）、ＢｓＭＡｂ、対照抗体、またはいずれも含まないウェルからなる９６ウェルプレートにプレーティングし、すべての条件を２通りで試験した。サンプル中のＣＴＬの増殖を促進するために、サンプルを９６時間インキュベートした。分析の直前に、赤血球を溶解し、悪性細胞集団およびＣＴＬ集団を定義する抗体をプレートに加えた：ＣＤ１３８－ＰＥ（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ，Ｒｅｆ：ＣＹＴ－１３８ＰＥ４，クローンＢ－Ａ３８）／ＣＤ３８ＰｅｒＣＰ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ，Ｒｅｆ：３８ＰＰ－

１００Ｔ，クローンＧＲ７Ａ４）／ＣＤ４５－ＰＢ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｒｅｆ：５６０３６７，クローン３０－Ｆ１１）／Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ，Ｒｅｆ：ＡＮＸＶＦ）／ＣＤ３ＰＥ（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ，Ｒｅｆ：ＣＹＴ－３ＰＥ５，クローン３３－２Ａ３）／ＣＤ４ＰＢ（ＩＭＭＵＮＯＳＴＥＰ，Ｒｅｆ：４ＣＦＢ－１００Ｔ，クローンＨＰ２／６）／ＣＤ８ ＦＩＴＣ（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ，Ｒｅｆ：ＣＹＴ－８Ｆ８，クローンＵＣＨＴ－４）／ＣＤ２５ ＡＰＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｒｅｆ：３０２６１０，クローンＢＣ９６）／ＣＤ６９ ＰｅｒＣＰ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｒｅｆ：３１０９２８，クローンＦＮ５０）。Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣを、アポトーシスのレベルをモニタリングするために加えた。プレートを、ＥｘｖｉＴｅｃｈフローサイトメトリーベースのプラットフォームを使用して分析した。細胞は、前方散乱（ＦＳＣ）、側方散乱（ＳＳＣ）、および、ＣＤ３８、ＣＤ１３８およびＣＤ５６を含む様々な表面マーカーの発現に基づくゲーティング戦略を用いて同定された。生存細胞のパーセンテージを、ＢｓＭＡｂを含むウェル中の生存細胞の数とＢｓＭＡｂを含まない対照ウェル中の生存細胞の数とを比較することによって判定した。

【０４５２】

図６は、ｘ軸上に表示されたＢｓＭＡｂ（薬物）の様々な濃度での９６時間のインキュベーション後の悪性細胞およびＣＴＬの数の両方を示す、代表的なサンプルのグラフを示す。悪性細胞集団（点線、四角）の減少に対応するＣＴＬ（連続線、三角）の増殖の増加においてＢｓＭＡｂ用量反応効果があった。悪性細胞集団の減少は、アポトーシスとは別のメカニズムを介して起こり、これは、Ｔ細胞溶解と一致する非アポトーシス細胞死を示唆する。悪性細胞またはＴ細胞集団だけを標的とする対照ｍＡｂｓは、効果がない。このサンプルについて、基礎（ＢｓＭＡｂなし）Ｅ：Ｔ比率は１：２．７であり、１：６．１である有効（ＢｓＭＡｂあり）Ｅ：Ｔ比率とは異なる。これは、ＢｓＭＡｂの機能をエクスビボで評価することができること、および、ＣＴＬの増殖が、骨髄サンプル全体からリンパ球を予め単離する必要なく、ＢｓＭＡｂ（一方のアームは抗ＣＤ３である）の存在下で全骨髄サンプルにおいて促進されたことを実証する。

【０４５３】

実施例２：慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）における標的細胞およびエフェクター細胞に対するＢｓＭＡｂの効果

この実施例では、標的細胞およびエフェクター細胞に対するＢｓＭＡｂの効果を、実施例１で試験したものとは異なる指標および異なるサンプルのタイプで試験した。ＣＬＬと診断された患者由来の末梢血（ＰＢ）サンプルが使用された。すべてのサンプルは、研究参加についてのインフォームドコンセントをした１８歳以上の成人患者由来である。

【０４５４】

悪性細胞上のＣＤ１９およびＣＴＬ上のＣＤ３ならびに対照抗体を標的とするＢｓＭＡｂを９６ウェルプレートに加えた。各ＰＢサンプルを培養培地でそのまま希釈し（すなわち、最初に細胞または他の成分をＰＢから分離せずに）、ＢｓＭＡｂ、対照抗体、またはいずれも含まないウェルからなる９６ウェルプレートにプレーティングし、すべての条件を２通りで試験した。サンプル中のＣＴＬの増殖を促進するために、サンプルを１４４時間インキュベートした。分析の直前に、赤血球を溶解し、悪性細胞集団およびＣＴＬ集団を定義する抗体をプレートに加えた。８つのカラーパネルを使用して、以下の各生存集団におけるＣＤ３／ＣＤ１９ ＢｓＭＡｂの効果を判定した：ＣＤ３ＰＢ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｒｅｆ：５５８１１７，クローンＵＣＨＴ１）／ＣＤ４５－ＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｒｅｆ：ＭＨＣＤ４５３０，クローンＨＩ３０）／Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ，Ｒｅｆ：ＡＮＸＶＦ）／ＣＤ１９－ＰＥ（Ｅｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｒｅｆ：１２－０１９９－４２，クローンＨＩＢ１９）／ＣＤ４－ＰＥＣＹ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｒｅｆ：３１７４１２，クローンＯＫＴ４）／ＣＤ５－ＰＥＣＹ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｒｅｆ：３００６２２，クローンＵＣＨＴ２）／ＣＤ８ ＡＰＣ（ＢＤ，Ｒｅｆ：５５５３６９，クローンＲＰＡ－Ｔ８）／ＣＤ２５ ＡＰＣＨ７（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｒｅｆ：５６０２２５，クローンＭ－Ａ２５１）。Ａｎ

ｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣを加えてアポトーシスのレベルをモニターし、生存細胞の数を完全に定量した。生存白血病Ｂ細胞（ＣＤ４５＋ＣＤ１９＋、四角）の数と、生存ＣＴＬ（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋、三角）の数とがＹ軸に表示される。Ｘ軸はＣＤ３ＣＤ１９ ＢｓＭＡｂ（ｎｇ／ｍｌ）の８つの濃度を表わす。プレートをＥｘｖｉＴｅｃｈフローサイトメトリーベースのプラットフォームを使用して分析した。細胞は、前方散乱（ＦＳＣ）、側方散乱（ＳＳＣ）、および、様々な表面マーカーの発現または発現の欠如に基づくゲーティング戦略を用いて同定された。生存細胞のパーセンテージを、ＢｓＭＡｂを含むウェル中の生存細胞の数とＢｓＭＡｂを含まない対照ウェル中の生存細胞の数とを比較することによって判定した。

【０４５５】

図７は、ＢｓＭＡｂ（薬物）の様々な濃度での１４４時間のインキュベーション後の悪性Ｂ細胞およびＣＴＬの数の両方を示す、代表的なサンプルのグラフを示す。悪性細胞集団（四角）の減少に対応するＣＴＬ（三角）の増殖の増加において用量反応効果があった。悪性細胞集団の減少は、Ｔ細胞溶解と一致する非アポトーシス細胞死を示唆する、アポトーシスとは別のメカニズムを介して起こった。悪性細胞またはＴ細胞集団だけを標的とする対照ｍＡｂｓは、効果がなかった。このサンプルについて、基礎（ＢｓＭＡｂなし）Ｅ：Ｔ比率は１：３０．１であり、１：５．７である有効（ＢｓＭＡｂあり）Ｅ：Ｔ比率とは異なる。これらの結果は、全末梢血ならびに全骨髄を用いてＢｓＭＡｂの機能をエクスビボで評価できることを実証する。ＣＴＬの増殖は、ＰＢサンプルからリンパ球を予め単離する必要なく、ＣＤ１９／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂの存在下でＰＢサンプル全体において促進された。

【０４５６】

実施例３：急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）中の標的細胞およびエフェクター細胞に対するＢｓＭＡｂの効果

この実施例では、標的細胞およびエフェクター細胞に対するＢｓＭＡｂの効果を、実施例１および２のものとは異なる指標で試験した。骨髄（ＢＭ）サンプルは、ＡＭＬと診断された患者から得られた。すべてのサンプルは、研究参加についてのインフォームドコンセントをした１８歳以上の成人患者由来である。

【０４５７】

悪性細胞上のＣＤ１２３およびＴ細胞集団上のＣＤ３、ならびに対照抗体を標的とするＢｓＭＡｂを９６ウェルプレートに加えた。各ＢＭサンプルを培養培地でそのまま希釈し（すなわち、最初に細胞または他の成分をＢＭから分離せずに）、ＢｓＭＡｂ、対照抗体、またはいずれも含まないウェルからなる９６ウェルプレートにプレーティングし、すべての条件を２通りで試験した。サンプル中のＣＴＬの増殖を促進するために、サンプルを１２０時間インキュベートした。分析の直前に、赤血球を溶解し、悪性細胞集団およびＣＴＬ集団を定義する抗体をプレートに加えた：ＣＤ３ＰＢ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｒｅｆ：５５８１１７，クローンＵＣＨＴ１）／ＣＤ４５－ＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｒｅｆ：ＭＨＣＤ４５３０，クローンＨＩ３０）／Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ，Ｒｅｆ：ＡＮＸＶＦ）／ＣＤ１１７－ＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｒｅｆ：３１３２０４，クローン１０４Ｄ２）またはＣＤ３３ＰＥ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｒｅｆ：５５５４５０，クローンＷＭ５３／ ＣＤ４－ＰＥＣＹ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｒｅｆ：３１７４１２，クローンＯＫＴ４）／ＣＤ５－ＰＥＣＹ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｒｅｆ：３００６２２，クローンＵＣＨＴ２）／ＣＤ８ ＡＰＣ（ＢＤ，Ｒｅｆ：５５５３６９，クローンＲＰＡ－Ｔ８）／ＣＤ２５ ＡＰＣＨ７（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｒｅｆ：５６０２２５，クローンＭ－Ａ２５１）。Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣを、アポトーシスのレベルをモニタリングするために加えた。

【０４５８】

プレートをＥｘｖｉＴｅｃｈフローサイトメトリーベースのプラットフォームを使用して分析した。細胞は、前方散乱（ＦＳＣ）、側方散乱（ＳＳＣ）、および、様々な表面マーカーの発現または発現の欠如に基づくゲーティング戦略を用いて同定された。生存細胞の

パーセンテージを、ＢｓＭＡｂを含むウェル中の生存細胞の数とＢｓＭＡｂを含まない対照ウェル中の生存細胞の数とを比較することによって判定した。

【０４５９】

図８は、ｘ軸上に表示されるようなＢｓＭＡｂ（薬物）の様々な濃度での１２０時間のインキュベーション後の悪性細胞（生存芽細胞）およびＣＴＬ（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋）の数の両方を示す、３つの代表的なサンプルのグラフを示す。各サンプルについて悪性細胞集団（黒線、四角）の減少に対応するＣＴＬ（灰線、三角）の増殖の増加において用量反応効果があった。悪性細胞集団の減少は、Ｔ細胞溶解と一致する非アポトーシス細胞死を示唆する、アポトーシスとは別のメカニズムを介して起こった。悪性細胞またはＴ細胞集団だけを標的とする対照ｍＡｂｓは、効果がない。この実施例では、エフェクター細胞（悪性の芽細胞）集団の増加と同様、標的細胞（ＡＭＬ芽細胞）の減少のレベルは、サンプルごとに異なっていた。有効Ｅ：Ｔ比率もまた、異なる患者サンプル間で１：０．８から１：７．１まで変化し、これは、あるサンプルについては、１つ未満の癌が各活性化Ｔ細胞によって死滅させられ（１：０．８）、一方、別のサンプルについては、７つを超える癌が各活性化Ｔ細胞によって死滅させられている（１：７．１）ということを意味する。これは、好ましい有効Ｅ：Ｔ比率、すなわちＢｓＭＡｂとのインキュベーション後の比率を有する患者を同定する方法を実証する。実施形態では、好ましい有効Ｅ：Ｔ比率は、養子細胞療法が特に有効であり得る患者に対応し得る。これは、さらに、ＢｓＭＡｂの機能をエクスビボで評価することができ、および、ＣＴＬの増殖が、骨髄サンプル全体からリンパ球を予め単離する必要なく、ＢｓＭＡｂ（一方のアームは抗ＣＤ３である）の存在下で全骨髄サンプルにおいて促進されたことを実証する。

【０４６０】

実施例４：ＡＣＴに理想的なトロゴサイトーシスエフェクター細胞集団のフローサイトメトリー同定

いくつかの実施形態では、ＢｓＭＡｂ用量依存性増殖を示したＴ細胞の集団は、ＣＴＬおよび悪性の血漿細胞集団の両方についてのマーカーを潜在的に有している可能性があった。そのような実施形態では、このＣＴＬの集団は悪性細胞に活発に関与している可能性があり、かつ、悪性細胞を溶解する際、悪性細胞の細胞表面マーカーのうちのいくつかはトロゴサイトーシスプロセスにおいてＣＴＬの細胞膜に埋め込まれるようになりうる。この集団は、本明細書で「トロゴサイトーシスＣＴＬ」と称され、これらは、悪性細胞と相互作用し、排除する可能性が高い、活性化Ｔ細胞のサブセットである。ＣＴＬが悪性細胞との近い接触を経験すると、いくつかの実施形態では、これらは悪性細胞上の特異性抗原に暴露され、したがってこれらの抗原に特異的な受容体を生成するように刺激されるだろう（ｂｅ　ｐｒｉｍｅｄ）。他の実施形態では、これらのＣＴＬは、悪性細胞中の複数の抗原を認識する。特定の理論に縛られることを望むものではないが、トロゴサイトーシスＣＴＬのこの集団を増殖することができ、宿主中の悪性細胞の認識（および死滅）に使用できる可能性があると考えられる。

【０４６１】

この効果を実証するために、ＡＭＬ患者由来のＢＭサンプルをＣＤマーカーに対する完全なアレイの抗体で分析して、悪性細胞およびマーカーを描写し、リンパ球集団のサブセットを同定した。ウェルを、ＡＭＬサンプルにおける１２０時間のＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂ暴露後の膜表面に異常な芽細胞マーカー（ＣＤ１１７＋）を発現するＴ細胞（ＣＤ３＋）として定義されるトロゴサイトーシス集団の存在について評価した。

【０４６２】

図９のＡは、側方散乱（ＳＳＣ）およびＣＤ３発現を使用して、Ｔ細胞集団（灰色）を定義するゲート（四角）を示す。図９のＢは、Ｔ細胞（ＣＤ３＋／ＣＤ１１７－）集団（四角ゲート、灰色）およびＡＭＬ芽細胞（四角ゲート、黒色）集団（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）のＢｓＭＡｂがない状態での１２０時間のインキュベーションの後のドットプロットを示す。ＢｓＭＡｂの非存在下では、ＣＤ１１７＋／ＣＤ３＋集団を描写する円形のゲートで見られるのと同じくらい明白なトロゴサイトーシス細胞は存在しない。図９のＣは、

図９のＢと同じだが、ＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂの存在下での１２０時間のインキュベーションの後の、ゲートを示す。この時点で、０．０５オｇ／ｍｌを超える濃度のＢｓＭＡｂを包含しているウェルにおいては、悪性芽細胞（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）の明確な除去、およびＴ細胞（ＣＤ３＋／ＣＤ１１７－）の数の明確な増加があった。さらに、ＡＭＬ芽細胞マーカーを発現する、新しいＴ細胞集団（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３＋、円）の出現が観察された。この集団はトロゴサイトーシスＣＴＬ集団として定義される。

【０４６３】

様々なｐＩＣＦ、例えば様々なＢｓＭＡｂ、の有効性はエクスビボで試験することができ、例えば、この実施例に記載されたものなどのアッセイにおいて試験することができる。実施形態では、悪性細胞を標的とすることに優れている可能性があるＣＴＬ集団の存在を検出することができる。実施形態では、この集団を増殖することができ、かつ、ＣＴＬ細胞調製物は、特に悪性腫瘍、例えば血液学的悪性腫瘍、のＡＣＴ処置において薬剤として使用することができる。

【０４６４】

実施例５：ＢｓＭＡｂ抗体の使用を通じて生成されたＣＴＬ集団の死滅能力の評価

いくつかの実施形態では、ＢｓＭＡｂの使用を通じて生成されたトロゴサイトーシスＣＴＬは、同じ宿主から悪性細胞集団を除去するためのより大きな能力がある可能性がある。実施形態では、トロゴサイトーシス集団は、サンプルの残りから、例えば蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）の使用により、単離されるだろう。これを調べるために、ＡＭＬと診断された患者の白血球を包む、凍結保存されたサンプルを試験した。

【０４６５】

図１０のＡ、１０Ｂおよび１０Ｃは、ＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂに１２０時間暴露した後に新たに生成されたＣＴＬ集団の死滅能力を実証する実験のフローサイトメトリードットプロット（ＣＤ１１７ｖｓＣＤ３）を示す。最初に、ＡＭＬ患者由来の凍結保存された細胞の１本のチューブが、１２０時間の間、０．８７５μｇ／ｍｌの濃度のＣＤ１２３ＣＤ３　ＢｓＭＡｂに暴露された。結果として生じた細胞を過剰なＢｓＭＡｂを除去するために洗浄し、かつ、細胞を湿気とともに５％CO_2で３７℃で一晩インキュベートした。同じ患者由来の凍結保存された細胞の第２のチューブを解凍し、かつ、このサンプルを、ＢｓＭＡｂに暴露することによって予め生成したサンプルと混合した。

【０４６６】

図１０のＡは、１２０時間のＢｓＭＡｂ暴露の後の第１のＡＭＬサンプルの結果からのドットプロット（ＣＤ１１７ｖｓＣＤ３）を示し、ここでは、新しく生成されたＴ細胞（ＣＤ３＋／ＣＤ１１７）のみを残してＡＭＬ芽細胞（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）を除去した。

【０４６７】

図１０のＢは、芽細胞（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）および低レベルの残存Ｔ細胞（ＣＤ１１７－／ＣＤ３＋）のを有する同一患者由来の新しい凍結保存バイアルのドットプロット（ＣＤ１１７／ＣＤ３）を示す。図１０のＡで示される細胞のサンプルは、ＢｓＭＡｂへの暴露前の図１０のＢに類似しているように見えた。一旦サンプルが混合されると、これらは、０．８７５μｇ／ｍｌのＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂがある状態およびない状態で、２時間、４時間、および、２４時間インキュベートされた。新しく溶解された細胞も、前処理された（図５のＡ）細胞を加えることなく単独でテストされた。

【０４６８】

図１０のＣは、０時点での図１０のＡおよび図１０のＢの細胞集団の混合のドットプロット（ＣＤ１１７／ＣＤ３）を示し、ここでＴ細胞（ＣＤ３＋／ＣＤ１１７－）および新しいＡＭＬ芽細胞（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）の両方の存在が確認できる。図１０のＤは、２４時間のインキュベーション後のドットプロット（ＣＤ１１７／ＣＤ３）であり、ここでは明らかに、ＡＭＬ芽細胞（ＣＤ１１７＋／ＣＤ３－）は予め生成されたＴ細胞集団の存在下で枯渇した。これはＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂがない状態で行われた。予め生成されたＴ細胞集団は、ＢｓＭＡｂの援助なしにＡＭＬ芽細胞集団を死滅させることができた。これは、ＢｓＭＡｂおよび悪性細胞の両方への最初の接触によって生成されたＣ

ＴＬがＢｓＭＡｂのない状態で悪性集団を死滅させる能力を保持していたことを実証する。

【０４６９】

図１１のグラフは、経時的に新しいバイアルからのＡＭＬ芽細胞を枯渇させるために予め生成されたＣＴＬの動態効果を示す。中濃度の灰色の破線は、図１０のＡ由来のＴ細胞のないＡＭＬ芽細胞（図１０のＢ由来）の対照集団を表す。結果は、経時的な芽細胞集団のわずかな自発的な枯渇を示す。黒丸は、図１０のＡ由来のＴ細胞と混合したＡＭＬ芽細胞を表わす。予め生成されたＴ細胞集団によってＡＭＬ芽細胞が非常に急速に枯渇し、ほぼ５０％の芽細胞が最初の２時間で消失した。２４時間時点では、芽細胞集団のほとんど１００％が枯渇した。ＣＤ１２３／ＣＤ３　ＢｓＭＡｂ（淡灰色の四角）の追加は効果がなかった。これらの結果は、新しいバイアルに存在するＴ細胞集団（図１０のＢの細胞）の結果であるとするにはあまりにも短い期間にわたって起こった。

【０４７０】

実施例６：様々なＥ：Ｔ比率の用量反応によるｐＩＣＦによって誘導された活性化Ｔ細胞の活性の測定

薬物の活性を測定する方法は、様々な濃度でその活性を評価する用量反応曲線を生成し、そのデータを、活性を記述する作用薬力学的数学的モデルに適合させることであり、これは、標準的なパラメーターによるその定量を可能にする。

【０４７１】

Ｔ細胞および腫瘍細胞をｐＩＣＦでインキュベートすることにより、腫瘍細胞を死滅させる薬剤である、癌を死滅させるＴ細胞の活性化および増殖を誘導する。

【０４７２】

第１の工程では、活性化された癌を死滅させるＴ細胞は、ｐＩＣＦで患者サンプル（例えば血液、骨髄）をインキュベートする工程（例えば１２０時間）により生成され、癌を死滅させるＴ細胞が多数の腫瘍細胞を排除するため、腫瘍細胞の数がより少なくなる。続く工程で、いくつかの場合では、ｐＩＣＦは随意に洗浄され得、癌を死滅させるＴ細胞ＣＤ４＋ＣＤ２５＋およびＣＤ８＋ＣＤ２５＋は、随意に、ＦＡＣＳ（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｅｒ）によって純粋集団として選別することができる。あるいは、同じスキームを、ｐＩＣＦを洗浄することなく、および／またはＦＡＣＳによって選別することなく、使用することができる。

【０４７３】

次いで、第２の患者サンプル、例えば同じ患者サンプルのアリコートを、癌を死滅させるＴ細胞の群に加え、単離し、または残りの細胞のバッチ全体に加えることができる。癌を死滅させるＴ細胞は薬剤を表すので、それを異なる量で、特に異なるＥ：Ｔ比率で、第２のアリコート（患者サンプル）に添加することにより、用量反応曲線の測定と、標準的な薬力学的モデリングアプローチの使用とが可能になる。いくつかの例では、腫瘍細胞の数は固定され、加えられる癌を死滅させるＴ細胞の数は、様々なＥ：Ｔ比率で用量反応曲線を生成するために変動する。これが、薬物活性を測定するための薬力学的アプローチである。

【０４７４】

この実施例はまた、ＡＭＬサンプル由来の芽細胞に対する二重特異性抗体ＣＤ３ｘＣＤ１２３の、ｐＩＣＦとしての使用を記載する。Ｔリンパ球を、５％CO_2を含む湿った空気中およびＣＤ１２３ｘＣＤ３　ＢＩＴＥ（Ｃｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ）の存在下で、３７℃で１２０時間インキュベートした後、凍結ＡＭＬサンプルから生成した。この期間後、活性化された（ＣＤ２５＋）Ｔ細胞（ＣＤ８＋およびＣＤ４＋）を、ＦＡＣＳ　Ａｒｉａ　ＩＩＩフローサイトメーター（ＢＤ）を使用する蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳソート）によって選別した。選別した細胞集団の純度は９９％より高かった。エフェクターＴ細胞を精製すると、同一患者からの新しいバイアルを解凍して選別された集団の細胞傷害性を評価した。

【０４７５】

エフェクターＴ細胞（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋またはＣＤ４＋ＣＤ２５＋または、同時に同じ

５０／５０の割合の両方）を、１：１に近い比率で始まる、様々なエフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比率で、一定の数の芽細胞と混合した。両方の細胞型（エフェクターおよび標的）を、ＣＤ１２３ｘＣＤ３　ＢＩＴＥが存在しない５％CO_2を含む湿った空気中で３７℃でさらに２４時間インキュベートするために播種した。

【０４７６】

図１２は、細胞用量依存的な方法でＣＤ１２３ｘＣＤ３　ＢＩＴＥ暴露後の、選別されたＣＤ８＋ＣＤ２５＋またはＣＤ４＋ＣＤ２５＋細胞の死滅能力を実証し、これは１：１に近い比率で最大死滅能力に達する。Ｘ軸は、Ｅ：Ｔ比率（図１２のＡ）または活性化Ｔ細胞の数（図１２のＢ）を表わす。芽細胞の数が固定されていると仮定すれば、グラフは両方の表示において同一であり、ｙ軸は、様々な比率またはＴ細胞数での２４時間のインキュベーション後の生存芽細胞のパーセンテージを表す。

【０４７７】

様々な薬力学的モデリングおよびシミュレーション戦略を用いて、免疫調節および腫瘍細胞枯渇活性を特徴づける。これらのモデルは、典型的な集団パラメーターの推定、ならびに個々の単一個体の活性の正確な評価を可能にする。最も単純なモデルは、Ｔ細胞の活性化と腫瘍細胞の枯渇との関係、または、薬物濃度とこれらの変数のうちのいずれかとの直接的な関係を評価する。最終反応と基礎Ｅ：Ｔ比率（ＮＫ）との関係、または、活性化Ｔ細胞（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋またはＣＤ４＋ＣＤ２５＋）の最大数と基礎芽細胞との比率、または、特定の基準薬物濃度点での活性化Ｔ細胞と枯渇した芽細胞の比率（本明細書に記載の有効Ｅ：Ｔ比率を含む）、などの、より複雑な状況がモデリングできる。この関係は、様々な濃度および様々なインキュベーション時間での薬物の効果を説明する。生じた元のＥ：Ｔ比率のみ、または活性化Ｔ細胞の最大数など、測定が１つのサンプル当たり一つに制限された場合、異なるモデリングアプローチを使用することができる。例えば、集団モデリングアプローチを使用することができ、ここでは各サンプルからの測定は、すべてのサンプルに対して有効な連続モデル関数を構築することに寄与する。第２の変数が分析される第２のモデル（例えば、腫瘍細胞枯渇対活性化Ｔ細胞）の入力として、１つのモデルの依存性変数（例えば、Ｔ細胞の活性化対薬物濃度および時間）が使用される入れ子モデル（ｎｅｓｔｅｄ　ｍｏｄｅｌｓ）も適用することができる。

【０４７８】

標準的な薬力学的モデルを適用して、本明細書に記述されるデータセット、例えばこの実施例ではそれぞれの活性を定量するオペレーショナルモデル、に適合させることができる。癌細胞死滅は、活性化Ｔ細胞におけるＴ細胞受容体の腫瘍標的細胞への結合に起因するので、リガンド－受容体結合の単純なモデルが適用される。平衡モデルは、リガンド濃度（ｘ、Ｔ細胞数）の関数として結合データ（ｙ）を適合させるために使用される。最大結合能力（ＢＬｍａｘ）および受容体の結合親和性（Ｋｄ）が使用される。このモデルは以下の双曲線方程式に従う：

【０４７９】

【数１】

$$y = C + BL_{\max}\left(1 - \left(\frac{x}{Kd + x}\right)\right)$$

【０４８０】

このモデルと適合する、癌を死滅させるＴ細胞（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋およびＣＤ８＋ＣＤ２５＋／ＣＤ８＋ＣＤ２５＋）の３つのサブセットの各々についてのデータポイントが図１３のＡ－Ｃに示される。図１３に示される適合グラフは、これらの３つのサブセット間の活性の有意な差を示す。この差は、活性の定量後に認識され、フィッティングエフォート（ｆｉｔｔｉｎｇ　ｅｆｆｏｒｔ）によって可能になる。以下の表１は、各Ｔ細胞サブセットの標準的な活性値を示す。効力またはＩＣ５０、すなわち５

０％の腫瘍細胞の死滅を誘導する濃度（活性化Ｔ細胞の数）。適合曲線がＸ軸上でゼロと交差する、すなわち、活性化Ｔ細胞が添加されていない対照ウェルと類似しているが同一ではない、Ｔ細胞の非存在しない、Ｅ０または％生存率。活性化Ｔ細胞の最大用量でのＥｍａｘまたは％生存率。ＡＵＣ（濃度曲線下面積）は、適合した曲線（非常に大きく非現実的なＴ細胞の数または比率での人為的結果を回避するために０～１０００のＴ細胞に制限されている）の下の領域を積分する。ＡＵＣは、活性化された全てのＴ細胞の全体的な蓄積された活性を捕捉する。ＣＤ８＋ＣＤ２５＋対ＣＤ４＋ＣＤ８＋：６７対３３６、または５倍、の有意により高い効力があった。これは、同数の腫瘍細胞を死滅させるためには、ＣＤ８対ＣＤ４活性化Ｔ細胞に対して５倍少ないＴ細胞を要することを意味する。しかしながら、ＣＤ８サブセットは腫瘍細胞の１３．７％を生存させ、一方ＣＤ４サブセットはそれらのすべてを死滅させる。ＣＤ８由来のＡＵＣは、実質的にＣＤ４由来のＡＵＣより少ない。等しい割合でのＣＤ４／ＣＤ８の混合物は中間の値を有する。したがって、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋は癌細胞を死滅させるのにより優れているように見えるが、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋サブセットは、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋細胞がこの２４時間の時間枠で死滅させることができなかったいくつか（１３．７％）の癌細胞を含め、すべての癌細胞を殺すという点でさらなる活性を追加する。

【０４８１】

【表１】

表１

	IC50 (T細胞 #)	E0 (生存率%)	Emax (%生存率)	AUC (0-1000)
CD8+CD25+	67	84.8	13.7	29392.1
CD4+CD25+	336	96.5	0.0	44769.0
(CD4+CD25+)+(CD8+CD25+) [1:1]	164	138.4	0.0	44499.9

【０４８２】

この例は、この例は、免疫腫瘍学のエクスビボアッセイではめったに使用されないモデリングアプローチの力を示す。これらのモデルによる癌を死滅させる活性の定量は、より正確なエクスビボアッセイを可能にし、新しいＩＣＦおよび／または免疫調節薬およびその組み合わせをスクリーニングするためにアッセイをより良いものにし、免疫腫瘍学的薬物処置を単独でまたは組み合わせて個別化するためにより良くし、かつ、自家細胞療法のための適切な癌を死滅させるＴ細胞を単独でおよび組み合わせて同定するためにより良くする。薬力学的モデリングおよびシミュレーションは、薬物開発の様々な段階に広く適用されてきた。例えば、Ｕｐｔｏｎ　ＲＮ（２０１４）およびＭｏｕｌｄ　ＤＲ（２０１３）を参照。

【０４８３】

多数の適用が、腫瘍学においても同様に記載されている。例えば、Ｂｕｉｌ－ＢｒｕｎａＮ（２０１６）を参照。本明細書に記載されるのは、免疫調節および腫瘍細胞枯渇活性を特徴付ける薬力学的モデリングおよびシミュレーション戦略である。構造モデルは、共変量研究を含む、線形モデル、Ｓ字型モデル、対数－線形モデルを通じて、標準的な反応暴露関係（ｒｅｓｐｏｎｓｅ　ｅｘｐｏｓｕｒｅ　ｒｅｌａｔｉｏｎｓｈｉｐｓ）をカバーすることができる。例えば、Ｕｐｔｏｎ　ＲＮ（２０１４）、Ｍｏｕｌｄ　ＤＲ（２０１３）およびＴｈｅ　Ｇｕｉｄａｎｃｅ　ｆｏｒ　Ｉｎｄｕｓｔｒｙ　Ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ（１９９９）を参照。

【０４８４】

例えば、上述されるモデルは、薬物濃度とこれらの変数のうちのいずれかの直接的な関係、ならびに、Ｔ細胞の活性化と腫瘍細胞の枯渇の関係を評価する。追加のモデルは、上記で使用した活性化細胞を用いた相対的Ｅ：Ｔ比率、または活性化Ｔ細胞（ＣＤ８＋ＣＤ２

５＋またはＣＤ４＋ＣＤ２５＋）の最大数と基礎芽細胞との比率、または特定の基準薬物濃度点（本明細書で提案された有効Ｅ：Ｔ比率を含む）で活性化Ｔ細胞および枯渇した芽細胞の比率、との最終的な反応の関係を研究する。様々な薬物暴露レベルまたは様々なインキュベーション時間での効果としての様々な共変量を考慮して、モデルは開発されるだろう。これらのモデルは、典型的な集団パラメーターの推定を可能にし、同様に、個々の単一個体の活性の正確な推定を可能にする。

【０４８５】

上記の例でのような、複数のＥ：Ｔ比率を測定しないモデリングアプローチも存在する。例えば、サンプルを変化させる条件の第２の部分を追加することなく、ｐＩＣＦとの最初のインキュベーションから得られたデータのみを使用する時など。この場合、有効Ｅ：Ｔ比率などのいくつかのパラメーターのうちのただ１つの値のみが利用可能である。しかし、このデータは、サンプルの第２の部分で異なるＥ：Ｔ比率を混合するよりも操作が少なく、したがって尊重される。１つのサンプルにつき１つの比率しか利用できないという潜在的な制限は、各サンプルからの単一データポイントがすべてのサンプルに対して有効な連続モデル関数を構築することに寄与する、単一（ｓｉｎｇｌｅ－ｔｈｒｏｕｇｈ）サンプル設計によって克服することができる。

【０４８６】

実施例７ － ｐＩＣＦによって誘発された活性化Ｔ細胞に対する用量反応曲線におけるそれらの効果を測定することによるＩＣＦ及び／又は免疫調節薬の活性の測定

典型的な免疫調節薬が本明細書に記載され、例えば、それらは、免疫チェックポイント阻害剤（ＰＤ１またはＣＴＬ４）、Ｔｒｅｇ阻害剤、およびＭＤＳＣ阻害剤を含む。

【０４８７】

ｐＩＣＦでのインキュベーションが活性化された癌を死滅させるＴ細胞を生成した後に、第２の患者サンプル、例えば、同じ患者のサンプルの第２のアリコートを加える、上に記載されるスキームと類似したスキームが、免疫腫瘍学的反応の他の要素を評価するために使用される。Ｅ：Ｔ比率が本明細書に記載され、加えることができ、これはまた潜在的なＩＣＦまたは免疫調節薬を含むことができる。

【０４８８】

このスキームは、分子が、癌を死滅させる活性をそれ自体で増強する際の活性を有しているかどうかにかかわらず適用可能である。そのような活性は、活性化Ｔ細胞がｐＩＣＦによって生成されると一層よく観察され得る。例えば、ＰＤ１またはＣＴＬ４などの免疫チェックポイント分子は、ｐＩＣＦでのインキュベーションの数日後にだけＴ細胞の細胞表面上で発現されるようになる。したがって、適切なアッセイは、抗ＰＤ１抗体などの免疫チェックポイント阻害剤を、それらの標的がＴ細胞表面上で発現された後に加える。例えば、用量反応曲線は、抗ＰＤ１抗体などの免疫チェックポイント阻害剤の用量を用いて又はそれなしで測定され得る。この抗ＰＤ１抗体を加えることが、ＣＤ４及び／又はＣＤ８で活性化された細胞の数を増加させることによって、及び／又はＥ：Ｔ比率を改善することによって、及び／又はこれらのＴ細胞の死滅活性を増強することによって、腫瘍細胞への免疫反応を増強する場合、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、抗ＰＤ１抗体は、ＩＣＦと考えられる。活性の増強は、ＥＣ５０、Ｅｍａｘ、およびＡＵＣなどの、実施例６に示されるような薬力学的モデルにおける具体的なパラメーターによって測定され得る。抗ＰＤ１抗体などの分子が、癌を死滅させるＴ細胞の活性を増強する場合、それはＩＣＦと考えられる。

【０４８９】

上に記載されるように、異なるＩＣＦまたは免疫調節薬は、活性化Ｔ細胞または腫瘍細胞以外の細胞型に作用する。その例は、Ｔｒｅｇと呼ばれる免疫抑制性調節Ｔ細胞、および骨髄系由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）である。ＩＣＦまたは免疫調節薬としてのこれらの化合物の活性を測定するために、この同じアッセイが使用され得る、つまり、活性化Ｔ細胞の用量反応にこれらの固定用量の化合物を加える。時々、これらのエクスビボでのサンプル中のＴｒｅｇおよびＭＤＳＣの数は、そのような測定に対して少ないか又は不十

分であるかもしれない。これらの場合において、これらのＩＣＦおよび免疫調節薬の化合物の効果を適切に測定するのに十分である、固定用量のＴｒｅｇまたはＭＤＳＣ、あるいはその両方を、サンプルの第２の部分を加えることによって、スキームはさらに延長され得る。

【０４９０】

幾つかの例では、選別された及び／又は精製されたＴｒｅｇ及び／又はＭＤＳＣ（これはＴ細胞の細胞傷害性効果または細胞増殖を負に調節する）は、共培養に加えることができる。異なる集団（ＢＩＴＥ暴露後の活性化Ｔ細胞、ＴｒｅｇまたはＭＤＳＣ）がＦＡＣＳ選別されると、選別済みの細胞は、共培養実験において混合することができ、それぞれ１つ（Ｔ細胞：Ｔｒｅｇ：芽細胞；またはＴ細胞：ＭＤＳＣ：芽細胞）からの比率を変更し、例えば、これらの抑制性細胞の存在下での凍結バイアルにおける、Ｔ細胞の溶解能力を評価する。

【０４９１】

加えて、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、本明細書に記載されたようなもの、例えばＰＤ－１及び／又はＣＴＬ４の阻害剤）は、それらの効果を評価するために異なる共培養モデルへと加えることができ、例えば、芽細胞溶解またはＴ細胞増殖を増強するそれらの能力を評価した。

【０４９２】

本明細書に記載された方法は、新しいＩＣＦまたは免疫調節薬をスクリーニングし、互いに対して又は様々な組み合わせで（例えば、それら自体の中から、及び／又は標準治療などの他のタイプの分子とともに）それらを直接比較する効果的なアッセイである。

【０４９３】

実施例８ － 活性化されたＣＴＬの選択及び／又は富化。

本実施例では、活性化されたＣＴＬの集団を選択および富化する能力が実証されている。２つのＢＭサンプルを、ＡＭＬと診断された患者から得た。サンプルは、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超える、成人患者からのものであった。

【０４９４】

各サンプルの一部を調製し、存在する活性化されたＣＴＬの基礎数を判定するために試験した。解析前に、ＲＢＣを溶解し、活性なＣＴＬ集団を定義する抗体を、プレートへと加えて（ＣＤ１３８－ＰＥ（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ、Ｒｅｆ：ＣＹＴ－１３８ＰＥ４、クローンＢ－Ａ３８）／ＣＤ３８ＰｅｒＣＰ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ、Ｒｅｆ：３８ＰＰ－１００Ｔ、クローンＧＲ７Ａ４）／ＣＤ４５－ＰＢ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｒｅｆ：５６０３６７、クローン３０－Ｆ１１）／ＣＤ５６－ＡＰＣ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｒｅｆ：３４１０２７、クローンＮＣＡＭ１６，２）／ＣＤ３ＰＥ（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ、Ｒｅｆ：ＣＹＴ－３ＰＥ５、クローン３３－２Ａ３）／ＣＤ４ＰＢ（ＩＭＭＵＮＯＳＴＥＰ、Ｒｅｆ：４ＣＦＢ－１００Ｔ、クローンＨＰ２／６）／ＣＤ８ ＦＩＴＣ（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ、Ｒｅｆ：ＣＹＴ－８Ｆ８、クローンＵＣＨＴ４）／ＣＤ２５ ＡＰＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｒｅｆ：３０２６１０、クローンＢＣ９６）／ＣＤ６９ ＰｅｒＣＰ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｒｅｆ：３１０９２８、クローンＦＮ５０））、アポトーシスのレベルをモニタリングするために、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ、Ｒｅｆ：ＡＮＸＶＦ）も加えた。ＥｘｖｉＴｅｃｈフローサイトメトリーベースのプラットフォームを使用して、プレートを解析した。例えば、米国特許第８，７０３，４９１号、第８，３１３，９４８号およびＢｅｎｎｅｔｔ ＴＡ（２０１４）を参照し、これは引用によって本明細書に組み込まれる。

【０４９５】

骨髄サンプル全体（即ち、最初にＢＭから細胞または他の要素を分離することなく）を、培地で希釈し、ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ（Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ）、対照抗体のいずれかを含有する、またはいずれも含有していないウェルで構成された９６ウェルプレートへと蒔き、すべての条件を繰り返し試験した。サンプルを１２０時間インキュベートして、サンプル中のＣＴＬの増殖を促進した。インキ

ュベーション期間の終わりに、プレートを上に概説されるように処理し、ＥｘｖｉＴｅｃｈを使用して解析した。加えて、各サンプルの一部を、ＦＡＣＳ Ａｒｉａ ＩＩＩフローサイトメーター（ＢＤ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を使用して蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳソーティング）によって選別し、活性化されたＣＴＬ集団を富化した。ＣＤ５およびＣＤ２５陽性の両方であった細胞を選別するようにゲートを調製した。

【０４９６】

結果を図１４に示し、ここでサンプル１からのドットプロットは、Ｘ軸上のＣＤ５強度およびＹ軸上のＣＤ２５強度を表示している。図１４のＡは、ＣＤ５＋ＣＤ２５＋細胞の非常に低いレベルを示す、基点（Ｂａｓｅ ｐｏｉｎｔ）である（右上四半部）。図１４のＢは、ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂでインキュベートされた後のサンプルを示し、ここで細胞の大きな割合は活性化されたＣＴＬであるが、他の細胞サブタイプはまだ存在している。この集団が選別された後（図１４のＣ）、細胞の９９％以上は活性化されたＣＴＬである。各サンプルおよび各条件に対するＣＤ５＋細胞およびＣＤ２５＋細胞の割合は、図１４のＤに示される。これは、活性化されたＣＴＬが、選択的なソーティング（ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｓｏｒｔｉｎｇ）によって、どのように生成され、富化され得るかを実証している。

【０４９７】

実施例９ － トロゴサイトーシスで癌を死滅させるＴ細胞の効果。

本実施例は、ＡＭＬサンプルからの芽細胞上での、ｐＩＣＦとしてのＢｓＭＡｂの使用について記載している。悪性細胞および正常細胞の両方を含有している白血球集団を、以前に分離さし、凍結保存した、ＡＭＬサンプルから、活性化されたＴリンパ球を生成した。サンプルを、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超える、成人患者から得た。

【０４９８】

サンプルを解凍し、ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ（Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ）を含有している培地と混合した。サンプルを、５％のCO_2を含有している加湿空気中において３７℃で１２０時間インキュベートした。ＣＤ３アームはＴ細胞と結合して、Ｔ細胞の活性化を助け、一方でＣＤ１２３アームは悪性ＡＭＬ細胞と結合して、それを活性化されたＣＴＬに近接させる。

【０４９９】

インキュベーション後、サンプルを洗浄し、その後、抗体のパネルへとさらして、トロゴサイトーシスを受けた活性化されたＣＴＬと、トロゴサイトーシスを受けていない活性化されたＣＴＬとを識別した。使用される抗体カクテルは、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ、Ｒｅｆ：ＡＮＸＶＦ）とともに、ＣＤ３ＰＢ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｒｅｆ：５５８１１７、クローンＵＣＨＴ１）、ＣＤ２５ ＡＰＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｒｅｆ：３０２６１０、クローンＢＣ９６）、およびＣＤ１２３（Ｒｅｆ）であった。ＣＤ３およびＣＤ２５はＣＴＬを識別し、ＣＤ１２３は、ＣＴＬ上に存在する場合トロゴサイトーシスＣＴＬを示すであろう悪性ＡＭＬ細胞上のマーカーである。サンプルを、ＦＡＣＳ Ａｒｉａ ＩＩＩフローサイトメーター（ＢＤ）を使用して、蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳソーティング）によって、以下の２つの集団へと選別した：ＣＤ３＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２３－（図１５のＡ）およびトロゴサイトーシスＣＤ３＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２３＋（図１５のＢ）。選別済みの細胞集団の純度は、９９％を超えていた。一旦エフェクターＴ細胞が精製されると、同じ患者からの新しい凍結保存されたバイアルを解凍して、選別済みの集団の細胞傷害性を評価した。

【０５００】

両方の集団（ＣＤ１２３＋およびＣＤ１２３－）からの同数のエフェクターＴ細胞を、悪性芽細胞を含有している新しく解凍されたサンプルからの細胞と混合した。両方の細胞型（エフェクターおよび標的）を、ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂの不存在下で５％のCO_2を含有している加湿空気中において３７℃での別の２４時間のインキュベーションのために播種した。図１５のＣで見ることができるように、トロゴサイトーシスＣＴＬ（ＣＤ

１２３＋）集団は、細胞のＣＤ１２３集団より約１０％悪性の芽細胞を死滅させた（６１％対７２％の生存）。この簡易な調製さえ幾つかの利点を与えたが、この実験の異なるパラメーターの最適化は、より明らかな利点を示すかもしれない。

【０５０１】

実施例１０ － ＣＴＬおよびＡＭＬの芽細胞枯渇のＢｓＭＡｂ誘発性の生成における患者間の変動性。

本実施例は、ＡＭＬ患者からの１７ ＢＭサンプルに対するＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ（Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ）のエクスビボでの効果を評価する。すべてのサンプルは、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超える、成人患者からのものであった。

【０５０２】

収集後２４－４８時間以内にサンプルを受け取った。ＢＭサンプル全体（即ち、最初にＢＭから細胞または他の要素を分離することなく）を、培地で希釈し、ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ（Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ）、対照抗体のいずれかを含有する、またはいずれも含有していないウェルで構成された９６ウェルプレートへと蒔き、すべての条件を繰り返し試験した。サンプルを、７２、９６または１２０時間インキュベートした。解析前に、ＲＢＣを溶解し、活性なＣＴＬ集団（ＣＤ３ＰＢ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｒｅｆ：５５８１１７、クローンＵＣＨＴ１）／ＣＤ４－ＰＥＣＹ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｒｅｆ：）３１７４１２、クローンＯＫＴ４）／ＣＤ５－ＰＥＣＹ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｒｅｆ：３００６２２、クローンＵＣＨＴ２）ＣＤ８ ＡＰＣ（ＢＤ、Ｒｅｆ：５５５３６９、クローンＲＰＡ－Ｔ８）／ＣＤ２５ ＡＰＣＨ７（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｒｅｆ：５６０２２５、クローンＭ－Ａ２５１）／ＣＤ４５－ＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｒｅｆ：ＭＨＣＤ４５３０、クローンＨＩ３０））およびＡＭＬ芽細胞集団（ＣＤ３３ＰＥ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｒｅｆ：５５５４５０、クローンＷＭ５３またはＣＤ１１７－ＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｒｅｆ：３１３２０４、クローン１０４Ｄ２））を定義する抗体を、プレートに加えて、アポトーシスのレベルをモニタリングするために、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ、Ｒｅｆ：ＡＮＸＶＦ）も加えた。ＥｘｖｉＴｅｃｈフローサイトメトリーベースのプラットフォームを使用して、プレートを解析した。例えば、米国特許第８，７０３，４９１号 Ｂ２、第８，３１３，９４８号 Ｂ２およびＢｅｎｎｅｔｔ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｌｙｍｐｈｏｍａ，Ｍｙｅｌｏｍａ，ａｎｄ Ｌｅｕｋｅｍｉａ．１４．４（２０１４）：３０５－１８を参照し、これは引用によって本明細書に組み込まれる。

【０５０３】

ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂは、悪性ＡＭＬ芽細胞を含む骨髄性細胞上のＣＤ１２３と結合し、Ｔ細胞上のＣＤ３を認識する。ＣＤ３の結合およびＡＭＬ芽細胞の近接は、ＣＴＬを活性化し、結果としてＡＭＬ芽細胞の溶解をもたらす。ＡＭＬ患者からのＢＭサンプルが、ＡＭＬ芽細胞およびＴ細胞の両方を含有するため、ＢｓＭＡｂの効果は、各サンプルにおける両方の集団に対して同時に測定され得る。ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂは、時間および用量依存的な方法でＡＭＬ芽細胞の死滅を実証した（図１６のＡ）。同様に、ＣＴＬの時間および用量依存的なＴ細胞の活性化および増殖もある（図１６のＢ）。グラフにおける各ラインは、個々の患者を表わしている。これらの結果から、芽細胞枯渇の動態および効率（Ａ）およびＣＬＴ集団の増殖（Ｂ）の両方において非常に高いレベルの患者間の変動性があることが分かる。薬理学的データが、いくらかの期間にわたって用量反応データ（例えば、ＥＣ５０およびＥｍａｘ）から判定され得る、このタイプの動態解析は、ＢｓＭＡｂまたは他のＩＣＦの有効性の別の定量的評価として有用であり得る。これらの結果と患者の臨床反応との間に相関性があるかどうかを確かめるために、さらなる研究を行う必要があるが、このタイプのデータはいつか、特定のＢｓＭＡｂが特定の患者に適しているかどうかを判定するために使用されてもよい。

【０５０４】

実施例１１ － 微小残存病変（ＭＲＤ）のサンプルにおけるＢｓＭＡｂ活性の測定。

骨髄（ＢＭ）サンプルを、ＭＲＤを有するＡＭＬ患者から得た。サンプルは、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超える、成人患者からのものであった。

【０５０５】

サンプルを受け取ると、それを試験し、ＡＭＬ芽細胞集団は、単球集団の５％未満であると分かった。ＢＭサンプル全体（即ち、最初にＢＭから細胞または他の要素を分離することなく）を、培地で希釈し、ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ、対照抗体のいずれかを含有する、またはいずれも含有していないウェルで構成された９６ウェルプレートへと蒔いた。サンプルの量が少なかったため、単回用量のＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂのみを、７２、９６および１２０時間の３つの時点において、３μｇ／ｍｌで試験した。すべての条件を３回繰り返して試験した。

【０５０６】

解析の直前に、各時点で、赤血球を溶解し、悪性細胞集団およびＣＴＬ集団を定義する抗体をプレートに加えた：ＣＤ３ＰＢ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｒｅｆ：５５８１１７、クローンＵＣＨＴ１）／ＣＤ４５－ＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｒｅｆ：ＭＨＣＤ４５３０、クローンＨＩ３０）／Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ、Ｒｅｆ：ＡＮＸＶＦ）／ＣＤ１１７－ＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｒｅｆ：３１３２０４、クローン１０４Ｄ２）またはＣＤ３３ＰＥ（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｒｅｆ：５５５４５０、クローンＷＭ５３／ＣＤ４－ＰＥＣＹ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｒｅｆ：３１７４１２、クローンＯＫＴ４）／ＣＤ５－ＰＥＣＹ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｒｅｆ：３００６２２、クローンＵＣＨＴ２）／ＣＤ８ ＡＰＣ（ＢＤ、Ｒｅｆ：５５５３６９、クローンＲＰＡ－Ｔ８）／ＣＤ２５ ＡＰＣＨ７（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｒｅｆ：５６０２２５、クローンＭ－Ａ２５１）。Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ－ＦＩＴＣを加えて、アポトーシスのレベルをモニタリングした。

【０５０７】

ＥｘｖｉＴｅｃｈフローサイトメトリーベースのプラットフォームを使用して、プレートを解析した。例えば、米国特許第８，７０３，４９１号、第８，３１３，９４８号、およびＢｅｎｎｅｔｔ ＴＡ（２０１４）を参照し、これは引用によって本明細書に組み込まれる。前方散乱（ＦＳＣ）、側方散乱（ＳＳＣ）、および様々な表面マーカーの発現の欠如に基づいてゲーティング戦略を使用して細胞を識別した。

【０５０８】

図１７は、経時的な（Ｘ軸）Ｙ軸におけるＡＭＬ芽細胞（図１７のＡ）または活性化されたＣＴＬ細胞（ＣＤ２５＋、図１７のＢ）両方の絶対的な細胞数を表わしている。破線はＢｓＭＡｂのない対照サンプルを表わし、実線はＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂデータを表わしている。図１７で見ることができるように、腫瘍細胞の割合が全体のサンプルにおいて最小に発現されるときでさえ、活性化されたＣＴＬは、時間依存的な方法（図１７Ｂ）中にまだ生成される。さらに、わずかの幼若細胞は提示する、また時間依存的な方法で枯渇される（図１７のＡ）。

【０５０９】

実施例１２．ＢｓＭＡｂへの暴露前後のヒトＴリンパ球集団の特徴づけ。

本実施例は、ＢｓＭＡｂ暴露後のヒトＴリンパ球の表現型を評価する。骨髄（ＢＭ）サンプルを、ＡＭＬと診断された４人の患者から抽出した。サンプルは、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超える、成人患者からのものであった。

【０５１０】

サンプルは、２０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）のＦＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、２％のＨｅｐｅｓ、１％の抗生物質（Ｚｅｌｌ Ｓｈｉｅｌｄ，Ｌａｂｃｌｉｎｉｃｓ，Ｂａｒｃｅｌｏｎａ，Ｓｐａｉｎ）および１％のＬ－グルタミン２００ｍＭ（Ｌｏｎｚｏ，Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ）を補足した、培地（Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）培地）中で希釈し、ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ（Ｃｒｅａ

ｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ）を、０．２１８７５μｇ／ｍｌの濃度で加えた。サンプルを１２０時間インキュベートして、サンプル中のＣＴＬの増殖を促進した。

【０５１１】

Ｔ細胞表現型を特徴づけるために、以下の標識抗体を使用した：ＣＤ４（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ，Ｓａｌａｍａｎｃａ，Ｓｐａｉｎ）、ＣＤ２７（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ８（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ，Ｓａｌａｍａｎｃａ，Ｓｐａｉｎ）、ＣＤ６２Ｌ（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ４５ＲＡ（ＱｕａｎｔｏＢｉｏ，Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）、ＣＤ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＣＤ２５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＣＣＲ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＣＤ２８（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）およびＣＤ５７（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）。図１８は、ＢｓＭＡｂ露出前後の癌を死滅させるＴ細胞の調製を表わしている。この図は、試験されたサンプルのうちの１つであって、すべてのサンプルを代表するものであり、それらの間にわずかな変動があるだけであった。フローサイトメトリーのドットプロットが示され、その各々は、軸上の異なるＣＤマーカーの強度を表わしている。基礎時間に、ＢｓＭＡｂの追加前（図１８のＡ－Ｄ）に、ＣＤ２５＋細胞はほとんど観察されなかった（図１８のＡ）。ＣＤ２５は活性化マーカーであり、それ故、この低い発現が予期される。図１８のＢは、以下の通りのサンプル中の異なるＴ細胞集団表現型の分布を示す：別記もされた（Ｌａｒｂｉ Ａ ２０１４）、４６％のナイーブＴ細胞（Ｎａｉｖｅ、ＣＤ４５ＲＡ＋／ＣＣＲ７＋／ＣＤ２７＋）、４３％のセントラルメモリーＴ細胞（ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＣＲ７＋／ＣＤ２７＋）、９％のエフェクターメモリーＴ細胞（ＥＭ、ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＣＲ７－／ＣＤ２７＋／－）、および２％のターミナルエフェクターメモリーＴ細胞（Ｅ、ＣＤ４５ＲＡ＋／ＣＣＲ７－／ＣＤ２７－）。図１８のＣおよびＤは、非活性化Ｔ細胞集団において予期されるものとも対応している、マーカーＣＣＲ７、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ２８およびＣＤ５７の発現を示している。ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂでの１２０時間のインキュベーション後のこれらの同じマーカーの発現は、図１８のＥ－Ｈに示されている。図１８のＥに見られるように、細胞の９７％はここで、活性化マーカーＣＤ２５を発現する。様々な亜集団の分布に主要な変化もあり（図１８Ｆ）、細胞の９０％はここで、セントラルメモリーＴ細胞集団（ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＣＲ７＋／ＣＤ２７＋）に当てはまる。この分布はすべてのサンプルに対して類似しており、インキュベーション後は、ＣＭ集団は９０％以上等しかった。図１８のＧは、ＣＣＲ７発現が高度なままであること、およびＣＤ６２Ｌ発現が混合されたままであるが、低下し始めていることを示している。図１８のＨにおいて、ＣＤ２８はわずかに増加されて、ＣＤ５７発現は大幅に増加され、これは、活性化されたメモリー細胞集団への変化を示している。

【０５１２】

実施例１３．生理学的な適合性のある培地を使用する（自己由来血漿の使用）ＢｓＭＡｂ活性の測定。

ｐＩＣＦ（ＢｓＭＡｂ）活性に対する生理学的により関連のある培地の影響を評価するために、ＡＭＬ被験体からの１つの骨髄ＢＭサンプルを、下記条件で繰り返し試験した：

ｉ） ２０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）のＦＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、２％のＨｅｐｅｓ、１％の抗生物質（Ｚｅｌｌ Ｓｈｉｅｌｄ，Ｌａｂｃｌｉｎｉｃｓ，Ｂａｒｃｅｌｏｎａ，Ｓｐａｉｎ）および１％のＬ－グルタミン２００ｍＭ（Ｌｏｎｚｏ，Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ）を補足した、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を含有している培地

ｉｉ） 遠心分離後に得られた２０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）の自己由来血清、２％のＨｅｐｅｓ、１％の抗生物質および１％のＬ－グルタミン２００ｍＭを補足した、ＲＰＭＩ １６４０を含有している培地は。

【０５１３】

ＢＭサンプルを、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超え

る、ＡＭＬを患う成人患者から得た。両方の条件に対して、８つの濃度のＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ（Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ）を、５％のCO_2を含有している加湿空気中において３７℃で７２時間または１２０時間インキュベートした。

【０５１４】

インキュベーション後、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ ＰＢ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ，Ｓａｌａｍａｎｃａ，Ｓｐａｉｎ）、ＣＤ４５ＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）、ＣＤ８－ＦＩＴＣ（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ，Ｓａｌａｍａｎｃａ，Ｓｐａｉｎ）、ＣＤ１１７－ＰＥ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）、ＣＤ４ＰｅｒＣＰ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＣＤ５－ＰＥ－Ｃｙａ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）およびＣＤ２５－ＡＰＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を有するマルチカラーのフローパネルを、芽細胞枯渇およびＴ細胞活性化を同時に評価するために実行した。

【０５１５】

図１９に示されるように、正常培地（灰色線）または２０％の自己由来血漿を補足した培地（黒線）において、芽細胞枯渇は、７２時間または１２０時間（それぞれ、図１９のＡおよびＢ）で両方のアッセイ条件に対して類似している。しかしながら、より高いＴ細胞活性化（ＣＴＬ）及び／又は増殖が、正常培地に対して７２時間で観察される（図１９のＣ）が、１２０時間で両方の条件は類似した結果を示している（図１９のＤ）。

【０５１６】

表２は、７２時間の時点での正常培地（１：８）対自己由来血漿の培地（１：２１）でのより低い有効Ｅ：Ｔ比率を明らかにする定量的アプローチを示している。自己由来の血漿とともに生成されるＣＴＬの数がより少なかったとしても、それらは、正常培地とともに生成されるＣＴＬの数が増えるとともに同数の腫瘍細胞を死滅させることに有効であった。これは、血漿中の何かが、生成されるＣＴＬの数を減少させたが、より有効であったＣＴＬも生成したことを示唆している。

【０５１７】

しかしながら、より長いインキュベーションは、有効な死滅能力のこの差を縮小させる。恐らく、自己由来血漿ＣＴＬ集団の増殖は、よりゆっくり開始したが、その後追いつく時間があった。これは、より生理学的な類似した培地の使用によって、腫瘍細胞をより有効に除去するＣＴＬが生成されることを例示しており、患者が処置にどのように反応するだろうかに関するより有益な情報を与え得る。

【０５１８】

【表２】
表２

培地	時間	# 芽細胞	#Ｔ細胞 CD25+	△白血病	有効 E:T
CTROL	72h	11162	4		
正常	72h	4191	845	6971	1:8
自己由来血漿	72h	4367	529	6795	1:21
CTROL	120h	7052	27		
正常	120h	1233	16270	5819	0.35
自己由来血漿	120h	902	13749	6150	0.44

【０５１９】
実施例１４．固形腫瘍サンプル中のＢｓＭＡｂ活性の測定。
本実施例は、癌細胞および自己由来Ｔ細胞の同時の存在下での、Ｔｕｍｏｒ ＢｉｏＢａｎｋ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から取得した黒色腫サンプルに対するＥｐＣＡＭ／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ（Ｇ＆Ｐ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ）のエクスビボでの効果を評価する。
【０５２０】
サンプルを解凍し、いずれか３つの異なる濃度のＥｐＣＡＭ／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ（３、２および１μｇ／ｍｌ）および対照抗体を含有しているウェルで構成された９６ウェルプレートへと蒔いた。サンプルを、２０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）のＦＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、２％のＨｅｐｅｓ、１％の抗生物質（Ｚｅｌｌ Ｓｈｉｅｌｄ，Ｌａｂｃｌｉｎｉｃｓ，Ｂａｒｃｅｌｏｎａ，Ｓｐａｉｎ）および１％のＬ－グルタミン２００ｍＭ（Ｌｏｎｚｏ，Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ）を補足した、培地（Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）培地）でインキュベートした。インキュベーションの１４４時間後、すべての細胞を、０．０５％のトリプシン／ＥＤＴＡで採取し、遠心分離によって遠心沈殿させた。解析前に、マルチカラーのフローサイトメトリーパネルを加えて、腫瘍およびＴ細胞集団の両方を定義した：Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ）、ＣＤ４５ ＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＣＤ８（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ）、Ｔａｇ７２（Ｂｉｏｎｏｖａ）、ＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＥｐＣＡＭ（ＢＤ，Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）およびＣＤ２５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）。
【０５２１】
図２０に示されるように、対照ウェルにおいてではなくＥｐＣＡＭ／ＣＤ３の存在下で（グレーヒストグラム（ｇｒｅｙ ｈｉｓｔｏｇｒａｍｓ））、腫瘍細胞を、用量依存的な方法で死滅させた（図２０のＡ）。加えて、腫瘍細胞枯渇のこの増加は、Ｔ細胞上のＣＤ２５活性化マーカーの増加に関係している（図２０のＢ）。
【０５２２】
実施例１５．ＡＭＬサンプル中のトロゴサイトーシスで癌を死滅させるＴ細胞の効果。

本実施例は、トロゴサイトーシスを受けた活性化されたＣＴＬが高い死滅能力を有していることを実証している。

【０５２３】

凍結保存されたＡＭＬサンプルを、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ）、ＣＤ４５（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＣＤ３３（ＢＤ，Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）およびＣＤ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で染色した。生きている芽細胞（Ａｎｎｅｘｉｎ／ＣＤ４５＋／ＣＤ３３＋＋）および生きているＴ細胞（Ａｎｎｅｘｉｎ／ＣＤ４５＋＋／ＣＤ５＋）集団を、細胞純度＞９９％を有するＦＡＣＳ Ａｒｉａ ＩＩＩフローサイトメーター（ＢＤ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を使用して蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳソーティング）によって選別した。サンプルを、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超える、ＡＭＬと診断された成人患者から得た。

【０５２４】

芽細胞を、細胞表面色素ＰＫＨ６７（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）で染色し、ＣＤ１２３－ＣＤ３ ＢｓＭＡｂの存在下または不存在下で、異なるエフェクター：標的比率で自己由来Ｔ細胞を用いて１４４時間３回繰り返してインキュベートした。ＰＫＨ６７は細胞膜標識色素である。この特定のアッセイのために、Ｔ細胞ではなく芽細胞のみを色素で染色した。ＢｓＭＡｂ暴露後、Ｔ細胞が、ＢｓＭＡｂによって誘発された細胞間相互作用の間に芽細胞からこのマーカーを取得することが予期され、これはトロゴサイトーシスが生じたことを示すであろう。

【０５２５】

細胞を、２０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）のＦＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、２％のＨｅｐｅｓ、１％の抗生物質（Ｚｅｌｌ Ｓｈｉｅｌｄ，Ｌａｂｃｌｉｎｉｃｓ，Ｂａｒｃｅｌｏｎａ，Ｓｐａｉｎ）および１％のＬ－グルタミン２００ｍＭ（Ｌｏｎｚｏ，Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ）を補足した、培地（Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０．（Ｓｉｇｍａ，ＳｔＬｏｕｉｓ，ＭＯ））でインキュベートした。解析前に、マルチカラーのフローサイトメトリーパネルを加えて、腫瘍およびＴ細胞集団の両方を定義した：Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ）、ＣＤ４５（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＣＤ８（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ）、ＣＤ３３（ＢＤ，Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、およびＣＤ２５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）。

【０５２６】

図２１のＡ、ＢおよびＣは、Ｔ細胞のトロゴサイトーシス能力を例示する実験のフローサイトメトリーのドットプロット（ＣＤ５／ＰＫＨ６７）を示している。生きている芽細胞およびＴ細胞は同時に表わされる。図２１のＡは、インキュベーション前の基礎時間での、芽細胞（ＰＫＨ６７＋＋／ＣＤ５－、左上四半部）および少数のＴ細胞（ＰＫＨ６７－／ＣＤ５＋＋、右下四半部）のドットプロットを示している。この時点で、二重陽性Ｔ細胞（ＰＫＨ６７＋＋／ＣＤ５＋＋）は観察されなかった。図２１のＢは、インキュベーション後およびＢｓＭＡｂの不存在下での、芽細胞（ＰＫＨ６７＋＋／ＣＤ５－）およびＴ細胞（ＰＫＨ６７－／ＣＤ５＋＋）のドットプロットを示している。この時点およびＢｓＭＡｂの欠如では、二重陽性Ｔ細胞（ＰＫＨ６７＋＋／ＣＤ５＋＋（右上四半部））は観察されなかった。図２１のＣは、インキュベーション後およびＢｓＭＡｂが存在下での、芽細胞（ＰＫＨ６７＋＋／ＣＤ５－）およびＴ細胞（ＣＤ５＋＋）のドットプロットを示している。分かるように、活性化Ｔ細胞（ＣＴＬ）のほとんどは、右上四半部に現れ、これは、それらが腫瘍細胞との相互作用において追跡色素を手に入れたことを示している。ＢｓＭＡｂの存在下でこのサンプルにおいて生成されたトロゴサイトーシスＣＴＬは、対照の９％のみと比較して、ＣＤ５＋＋集団の７８％である。

【０５２７】

用量反応的な方法で芽細胞およびＴ細胞の活性化の枯渇を定量化するために、同じＡＭＬ患者からの第２の凍結保存されたチューブを使用した。サンプルを、上で使用した培地と同じ培地で希釈し、８つの異なる濃度のＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂ（０．５、１、１

０、５０、１００、２５０、５００および１０００ｎｇ／ｍｌ）を含有しているプレートに加えた。プレートを１４４時間インキュベートした。解析前に、上で使用したパネルと同じマーカーのマルチカラーのフローサイトメトリーパネルをプレートに加えて、腫瘍細胞およびＣＴＬ集団の両方を識別した。図２２のＡは、ＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂが、芽細胞（腫瘍）細胞の用量反応枯渇に対応する、用量反応的な方法でＣＴＬ集団の増加をどのように誘発したか示している。このサンプルに対する有効Ｅ：Ｔ比率は、６０：６，０００、または１：１００であり、これは、生成されたＣＴＬが腫瘍細胞を死滅させることに非常に効率的であることを実証している。有効Ｅ：Ｔ比率は、ＢｓＭＡｂの頑強性または各患者に特異的な他のＩＣＦ活性を判定するために使用される追加のツールであると証明され得る。

【０５２８】

実施例１６．癌を死滅させるＴ細胞の薬理活性のエクスビボでの測定。

患者サンプル中のｐＩＣＦｓによって生成された癌を死滅させるＴ細胞の活性を定量的に測定する及び細胞療法に使用される癌を死滅させるＴ細胞の薬理活性を判定するための４つのパラメーターがある。

【０５２９】

Ｔ細胞増殖のＥＣ５０は、活性化された、癌を死滅させるＴ細胞の５０％を生成するｐＩＣＦの濃度に対応している。図１６のＢは、ｐＩＣＦ ＢｓＭＡｂ ＣＤ３ｘＣＤ１２３の用量に応じた幾人かの独立した被験体からの活性化Ｔ細胞の重ねられた用量反応曲線を示している。Ｔ細胞活性化のＥＣ５０と癌細胞の枯渇のＥＣ５０は、活性化Ｔ細胞が、癌細胞を枯渇させる癌を死滅させる細胞へと変わることを、ｐＩＣＦがどのように誘発するかについて、同じプロセスを表わすため、類似している（図１６のＡ）ことに留意されたい。Ｔ細胞活性化および癌細胞枯渇のＥＣ５０間のこの同等性は、本明細書の図６、７および８においても観察することができる。

【０５３０】

Ｔ細胞活性化のこのＥＣ５０は、同じ疾患と診察された患者の複数のサンプルにわたって非常に類似している（図１６のＡおよび図１６のＢ）。それ故、このパラメーターは、ＥＣ５０が大多数のサンプルとは著しく異なるわずかの場合のためののみ患者の感受性に有益である。ＥＣ５０が著しくより低い場合、上記の特定の患者に関して、Ｔ細胞がｐＩＣＦのより低い用量で活性化されると解釈されるべきである。これに反して、ＥＣ５０値が著しくより高い場合、上記の特定の患者に関して、Ｔ細胞がｐＩＣＦのより高い用量で活性化され、それ故、ｐＩＣＦのより高い用量が、癌を死滅させるＴ細胞を生成するためにインキュベーション中に使用されるべきであると解釈されるべきである。

【０５３１】

有効Ｅ：Ｔ比率は、ｐＩＣＦによって生成された癌を死滅させるＴ細胞の活性を表わしている。したがって、それは、本明細書に開示されたプロセスによって得られた活性化Ｔ細胞で患者を処置するべきかどうかを決定するキーパラメーターである。このパラメーターは、図１２および１３に示されるように以前にＦＡＣＳソーティングによって分離されたｐＩＣＦでのインキュベーションの後に生成された、正確な数の活性化された癌を死滅させるＴ細胞を加えて用量反応を測定することによって確証することができる。

【０５３２】

高い有効Ｅ：Ｔ比率は、自己由来の細胞治療としてこれらの癌を死滅させるＴ細胞に対して感受性のある患者を予測し、低い有効Ｅ：Ｔ比率は、自己由来の細胞治療としてこれらの癌を死滅させるＴ細胞に対して耐性のある患者を予測する。

【０５３３】

Ｅｍａｘまたは有効性（Ｅｆｆｉｃａｃｙ）は、ｐＩＣＦの高用量で生き残った％癌細胞を測定する。このパラメーターは、インキュベーション時間に左右され、Ｔ細胞処置に関する臨床的な決定のために、長いインキュベーション時間が必要とされ、そこで活性化Ｔ細胞は、大多数のサンプルに対してすべての癌細胞を死滅させ；このインキュベーション時間で、耐性のある癌細胞のサブセットを示すサンプルの小さなサブセットは、臨床的に

有益である。活性化された癌を死滅させるＴ細胞は、患者のための適切な単独療法の処置を行うために、これらの癌を死滅させるＴ細胞に対する癌細胞の１００％を死滅させなければならない。これに反して、活性化Ｔ細胞は、すべての癌細胞を死滅させることができず（図１６のＡ）、耐性のある癌細胞のサブセットが存在する場合、単独療法としての癌を死滅させるＴ細胞は、これらの癌細胞を生き残らせると予測され、それ故、適切な処置と考えられない。癌細胞の耐性のある表現型を元に戻す処置における追加の薬物または他のＩＣＦの組み合わせが可能である。

【０５３４】

そのような癌細胞のサブセットが、癌を死滅させるＴ細胞として特定されるとき、これらの耐性のある癌細胞は、活性化された自己由来のＴ細胞の治療に耐性があるため免疫抑制される。それ故、免疫チェックポイント阻害剤などの追加の免疫調節剤の追加によって、免疫抑制に打ち勝つことができ、結果的に、処置に対する癌細胞耐性に打ち勝つことができる。これらの追加の免疫調節剤は、２つの異なる方法で加えることができる：

ａ）免疫抑制を軽減する及び十分に細胞傷害性の癌を死滅させるＴ細胞の生成を可能にするためにエクスビボで加えること。これは、続く細胞療法のために生成された癌を死滅させるＴ細胞に対して特に有意義である。それらは、ｐＩＣＦでインキュベーションして、またはｐＩＣＦでのインキュベーション後に第２の工程で同じウェルに加えることができる。免疫調節剤をエクスビボで加えることによって、５、１０、または２０までの薬剤である、複数の作用機構を有する薬剤を含む、複数の薬剤の組み合わせが可能になる。これらの数は、毒性制約がポリ免疫療法を制限する、インビボで臨床患者へと同時に投与され得る、通常の２－３の免疫療法薬よりはるかに多い。したがって、細胞療法のための癌を死滅させるＴ細胞のエクスビボでの生成は、直接的な患者の臨床的な薬物処置より優れてポリ免疫療法を活用することができる。

ｂ）細胞療法と組み合わせて患者へと投与することができ、その結果、それらは、患者の身体における免疫抑制を軽減する。これは、これらの癌細胞を、患者に対する細胞療法として投与される癌を死滅させるＴ細胞に対する耐性を持たせる癌細胞上の標的に対して特に有意義である。

【０５３５】

癌を死滅させるＴ細胞の活性を測定するための上に言及された３つのパラメーターはいずれも、インキュベーション時間に応じて変化し得、それ故、反応の動態は有意義な情報も提供し得る。時間依存的なパラメーターは、これらのプロセスの動態を反映している。有意義な解釈の幾つかの例が以下に記載される。

【０５３６】

図１６は、同じＢｓＡｂＣＤ３ｘＣＤ１２３に対するＡＭＬサンプルにわたるＴ細胞活性化および癌細胞枯渇の動態および効率における非常に高いレベルの患者間の変動性があることを示している。

【０５３７】

癌細胞をより速く死滅させる癌を死滅させるＴ細胞は、より効果的な細胞療法である傾向がある。より速い活性は、患者の癌に対するより速い効果を意味し得、これは、より高い感受性を反映する肯定的な結果である。より速い活性はまた、癌を死滅させるＴ細胞が、ＭＨＣ－Ｉ機構によって癌細胞を認識するＣＤ８＋腫瘍特異抗原Ｔ細胞である場合に、癌細胞へのより高い親和性を意味し得る。図１１は、与えられたサンプルからの癌を死滅させるＴ細胞の癌細胞の死滅の動態を示している。

【０５３８】

Ｔ細胞は、より早い時点でｐＩＣＦによって活性化されたときに、その死滅有効性を最大限にするために周期を幾つかに分割する必要があり得る。一方で、癌を死滅させるＴ細胞が癌細胞を死滅させ、癌細胞が残されなくなった後、これらのＴ細胞は消耗されて、活性化状態および死滅能力の数値が急激に低下する。時に、インキュベーション時間を増加させることによって死滅され得ない癌耐性細胞のサブセットがあるが、癌を死滅させるＴ細胞は、それらを認識し、それらの増殖を誘発し、それ故、癌細胞の数を変更することなく

癌を死滅させるＴ細胞の数を増加させ、したがって、これらのより長いインキュベーション時間で有効Ｅ：Ｔ比率を変更する。それ故、癌を死滅させるＴ細胞の活性を測定するために、増殖が関連付けられたとき、および癌を死滅させるＴ細胞が消耗に達する前またはＴ細胞耐性の癌細胞のサブセットが見つかる前に、活性化後の時間に焦点を置くことが重要である。

【０５３９】

これらの概念を実証するために、１３のＡＭＬ骨髄サンプルを、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超える、成人患者から得た。サンプルを、７２、９６または１２０時間培地でインキュベートし、８つの異なる濃度のＣＤ１２３／ＣＤ３ ＢｓＭＡｂを含有しているプレートに加えた。すべての患者をすべての時間に分析したとは限らなかったことに留意されたい。インキュベーション後に、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ，Ｓａｌａｍａｎｃａ，Ｓｐａｉｎ）、ＣＤ４５（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）、ＣＤ８（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ，Ｓａｌａｍａｎｃａ，Ｓｐａｉｎ）、ＣＤ１１７（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）、ＣＤ６４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＣＤ３４（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）、ＣＤ３３（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ））、ＨＬＡ－ＤＲ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ，Ｓａｌａｍａｎｃａ，Ｓｐａｉｎ）ＣＤ４ＰｅｒＣＰ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＣＤ５－ＰＥ－Ｃｙａ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）およびＣＤ２５－ＡＰＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を有するマルチカラーのフローパネルを、芽細胞枯渇およびＴ細胞活性化を同時に評価するために実行した。各々の特定のサンプルに適切な芽細胞マーカーを使用した。

【０５４０】

表３は、ＣＤ８＋ＣＴＬおよび腫瘍細胞両方に対する、ＥＣ５０、Ｅｍａｘ（ＭｓＭＡｂの最も高い濃度での絶対的な細胞数）、およびＥ０（ＢｓＭＡｂの不存在下での絶対的な細胞数）の統計的なパラメーターを示している。表３および図２３で見ることができるように、ＣＴＬおよび腫瘍細胞両方の集団のＥＣ５０は類似している。図２３のＡは、各時点での各サンプルに対するＣＴＬおよび腫瘍細胞両方の集団のためのＥＣ５０を示し、これは幾らかの一貫性を示すが、すべての時点で変動が見られ得る。個々の変動が予期されるが、図２３のＢは、中央のＥＣ５０値が、各集団の他に各時点に対しても非常に類似していることを示している。

【０５４１】

有効Ｅ：Ｔ比率は、エフェクター細胞の絶対数の変化および標的細胞の絶対数の変化を計算することによって測定される。ＥｍａｘおよびＥ０値は、これを定量化するために使用される。ここでは、エフェクター細胞はＣＴＬ集団であり、標的は腫瘍細胞である。有効Ｅ：Ｔ比率は、ＩＣＦ（例えばＢｓＭＡｂ）によって引き起こされた値の変化を表わしている。

【０５４２】

図２４は、上記からの５つの代表的なＡＭＬサンプルに対するＴ：Ｅ比率のバージョンを示している。Ｙ軸は、各時点（７２、９６または１２０時間）に対する各エフェクター細胞につき存在する標的細胞の数（Ｔ／Ｅ）を示している。ＣＤ８＋ＣＴＬが経時的に増加するにつれ、全般的に、より長いインキュベーション時間にわたって有効Ｔ：Ｅ比率が低下する。

【０５４３】

本実施例は、腫瘍枯渇およびＴ細胞増殖が生じ得る細胞培養モデルにおける癌を死滅させるＴ細胞の活性を定量的に測定することの関連性を実証している。動態方法でのＥＣ５０、Ｅｍａｘ、および有効Ｅ：Ｔ比率を含む複数のキーパラメーターの解析は、腫瘍およびＣＴＬ集団両方にとって有益な情報を与える。作成されたデータは、ＩＣＦの活性および有効性を定量化するための強固なツールを提供する。

【０５４４】

【表３】
表３

	集団	時間 (h.)	N	中央値	平均	最小	最大	StdDev
EC50 (μGr/mL)	生きているＴリンパ細胞 CD8+CD25+	72	13	0.16	0.19	0.11	0.43	0.09
		96	11	0.17	0.29	0.11	1.19	0.32
		120	9	0.15	0.2	0	0.51	0.15
	生きている腫瘍細胞	72	11	0.19	2.05	0	21.08	6.31
		96	9	0.21	0.16	0	0.36	0.12
		120	6	0.1	0.12	0	0.3	0.12
Emax 細胞 #	生きているＴリンパ細胞 CD8+CD25+	72	13	114	438.62	40	1970	637.55
		96	11	263	600.55	71	2267	725.49
		120	9	829	1254.67	53	2857	1056.41
	生きている腫瘍細胞	72	11	1362.4	2567.24	0	11859.22	3749.35
		96	9	1630.63	3034.86	20.09	12892.9	4324.83
		120	6	1445.47	3414.7	0	10844.15	4349.72
E0 細胞 #	生きているＴリンパ細胞 CD8+CD25+	72	13	0	10.62	0	100	27.55
		96	11	0	12.45	0	100	30.86
		120	9	0	3.67	0	28	9.27
	生きている腫瘍細胞	72	11	12118.5	11110.04	218.7	25749.3	7565.65
		96	9	11271.6	11149.57	628.2	22341.6	8020.15
		120	6	10475.2	12626.18	1476.3	30064.5	10024

【０５４５】
実施例１７：骨髄サンプル対末梢血サンプルにおける癌を死滅させるＴ細胞のエクスビボでの活性。
本実施例は、１０のペアのＢＭおよびＰＢ ＡＭＬサンプル（５のペアのＢＭおよびＰＢ）におけるＣＴＬの細胞傷害能力を評価している。サンプルを、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超える、成人患者から得た。収集後２４－４８時間以内にサンプルを受け取った。ＢＭサンプル全体（即ち、最初にＢＭから細胞または他の要素を分離することなく）を、培地で希釈し、７２時間、８つの濃度のＢｓＭＡｂおよび対照抗体を含有しているウェルで構成された９６ウェルプレートへと蒔いた。
【０５４６】
インキュベーション後、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ）、ＣＤ４５（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＣＤ８（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ）、ＣＤ１１７（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）、ＣＤ６４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ３４（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）、ＣＤ３３（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）、ＨＬＡ－ＤＲ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ）、ＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ２５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ１３８（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ）、ＣＤ３８（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ）、ＣＤ４５（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ５６（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ１９（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）およびＣＤ３（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ）を有するマルチカラーのフローパネルを、腫瘍枯渇およびＴ細胞活性化を同時に評価するために実行した。各々の特定のサンプルに適切な腫瘍マーカーを使用した。
【０５４７】

本発明者は、ｐＩＣＦが免疫抑制された腫瘍特異抗原（ＴＳＡ）Ｔ細胞を活性化することができ、これらの活性化Ｔ細胞が、ｐＩＣＦによって活性化された他の正常なＴ細胞より高度に癌細胞を死滅させるという仮説を立てた。加えて、本発明者はまた、末梢血とは対照的に、骨髄などの三次元構造を有する組織に存在する免疫抑制性の微小環境についても記載している。この仮説が正しい場合、骨髄サンプル中の癌を死滅させるＴ細胞の活性は、同じ癌患者の末梢血サンプル中の活性より高いはずである。

【０５４８】

５人のＡＭＬ患者からの（同じ患者の）骨髄および末梢血からのペアのサンプルを、ＣＤ３ｘＣＤ１２３でインキュベートした。図２５は、各患者のための両方のペアのサンプル（Ｓ１－Ｓ５、上部パネル対下部パネル）におけるＴ細胞活性化および癌細胞枯渇に対する用量反応曲線を示している。ＥＣ５０およびＥｍａｘの点から、同じ患者のための各々の血液および骨髄サンプルに対して、類似したパターンが観察される。特にそれらのＥｍａｘの点から、異なるサンプルは異なる挙動を示している。

【０５４９】

癌を死滅させるＴ細胞の活性は、図２５の各グラフおよび以下の表４に含まれる有効Ｅ：Ｔ比率によって計算される。骨髄サンプルは、サンプル１、４、および５におけるそれらの対応する血液対応物より高い有効Ｅ：Ｔ比率を有している。サンプル２および３に対する骨髄サンプルは、骨髄および血液中に同じ有効Ｅ：Ｔ比率を有している。したがって、予測される結果は、骨髄中の癌を死滅させるＴ細胞が、それらの血液対応物よりも高い又は類似した（下回らない（ｎｏｔ ｌｅｓｓ））癌を死滅させる活性を有している点で確証されている。このパターンは、ｐＩＣＦによって活性化することができる免疫抑制されたＴＳＡ Ｔ細胞の存在を反映し得、これは、骨髄対血液のペアのサンプルにおけるより高い有効Ｅ：Ｔ比率を有する骨髄サンプル中のこれらのＴ細胞がより多く存在することを示唆している。これは、免疫療法反応の既知の臨床的な予測因子として固形腫瘍サンプル中の％ＴＩＬの測定に類似し得る。

【０５５０】

【表４】

表４

	サンプル１	サンプル２	サンプル３	サンプル４	サンプル５
骨髄	25	5	8	7	9
末梢血	5	5	8	3	2
差	5倍	同じ	同じ	2.3倍	4.5倍

【０５５１】

実施例１８：癌を死滅させるＴ細胞のエクスビボでの選択的死滅

本実施例は、２人のＭＭ患者および２人のＡＭＬ患者からの残存する正常細胞に対するＣＴＬの選択的能力を評価している。サンプルを、試験参加のためにインフォームドコンセントを提出した、１８歳を超える、成人患者から得た。収集後２４－４８時間以内にサンプルを受け取った。ＢＭサンプル全体（即ち、最初にＢＭから細胞または他の要素を分離することなく）を、培地で希釈し、７２時間、８つの濃度のＢｓＭＡｂおよび対照抗体を含有しているウェルで構成された９６ウェルプレートへと蒔いた。

【０５５２】

インキュベーション後、Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ）、ＣＤ４５（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＣＤ８（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ）、ＣＤ１１７（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）、ＣＤ６４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ３４（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓ

ｏｎ）、ＣＤ３３（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）、ＨＬＡ－ＤＲ（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ）ＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ２５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ１３８（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ）、ＣＤ３８（Ｉｍｍｕｎｏｓｔｅｐ）、ＣＤ４５（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ５６（ＢＤ－Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ１９（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）およびＣＤ３（Ｃｙｔｏｇｎｏｓ）を有するマルチカラーのフローパネルを、腫瘍枯渇、Ｔ細胞活性化および残存する正常細胞を同時に評価するために実行した。この後者の集団は、ＡＭＬ患者におけるＢ細胞（ＣＤ１９＋）およびＭＭ患者に対する顆粒球（ＣＤ４５＋／ＳＳＣｈｉｇｈ／ＦＳＣｈｉｇｈ）に対応している。各々の特定のサンプルに適切な腫瘍マーカーを使用した。

【０５５３】

本発明者は、二重特異性抗体が、抗原非依存性の作用機構においてＴ細胞を癌細胞と接近させることによってＴ細胞を活性化するという共通の理解に反して、ｐＩＣＦが、血液悪性腫瘍の骨髄サンプル中の免疫抑制された腫瘍特異抗原（ＴＳＡ）Ｔ細胞を活性化することができるという仮説を立てた。活性化Ｔ細胞は、ＴＳＡ Ｔ細胞である場合、癌細胞を認識し、選択的に死滅させるはずである。これに反して、活性化Ｔ細胞は、非選択的な抗原非依存性の方法で死滅させる場合、非病理学的な細胞も死滅させるはずである。これは、ＭＭ（図２６）およびＡＭＬ（図２７）に対するｐＩＣＦ二重特異性抗体を用いるインキュベーション実験において評価することができ、ここで、それらの対応する非病理学的な細胞を癌細胞として同時に解析する。

【０５５４】

図２６は、ｐＩＣＦが、Ｔ細胞活性化（ＣＤ８＋ＣＤ２５＋）および癌細胞死滅（腫瘍細胞の減少）を誘発する２つのＭＭ骨髄サンプル（ＡおよびＢ）を示している。顆粒球の集団がこれらのグラフに加えられるとき、最多数の非病理学的な細胞を考慮すると、それらの数は、著しい死滅なしでのｐＩＣＦでのインキュベーション後にかなり類似したままである一方で、癌細胞は死滅される。それぞれおよそ２２．０００および１１．５００の各サンプル中の多数の顆粒球は、この結果が統計的に非常に有意であることを示している。これらの結果は、癌を死滅させるＴ細胞が、選択性を有して癌細胞を死滅させることを示している。

【０５５５】

図２７は、ｐＩＣＦが、Ｔ細胞活性化および癌細胞死滅を誘発する２つのＡＭＬ骨髄サンプル（ＡおよびＢ）を示している。Ｂ細胞の集団がこれらのグラフに加えられるとき、最多数の非病理学的な細胞を考慮すると、それらの数は、ｐＩＣＦでのインキュベーション後に実質的に減少しな一方で、癌細胞は死滅される。それぞれおよそ４５０および２００の少数のＢ細胞は、ＭＭサンプル中の顆粒球より統計的に有意ではないが、ＭＭ結果と一致している。これらの結果は、癌を死滅させるＴ細胞が、選択性を有して癌細胞を死滅させることを示している。

【０５５６】

＜同等物＞

請求項において、「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」などの冠詞は、反対に示されない限り又は他に文脈から明白でない限り、１つ又はそれ以上を意味し得る。グループの１つ以上のメンバー間に「または」を含む請求項または記載は、反対に示されない限り又は他に文脈から明白でない限り、１つ、１つ以上、またはすべてのグループメンバーが、与えられた製品またはプロセスに存在する、それにおいて利用される、またはそうでなければそれに関連している場合に、満足されるものであると考えられる。本発明は、グループのまさに１つのメンバーが、与えられた製品またはプロセスに存在する、それにおいて利用される、またはそうでなければそれに関連している、実施形態を含む。本発明は、１つを超える、またはすべてのグループメンバーが、与えられた製品またはプロセスに存在する、それにおいて利用される、またはそうでなければそれに関連している、実施形態を含む。

【０５５７】

さらに、本発明は、リストされた請求項の１つ以上からの１つ以上の限定、要素、節、お

よび記述用語が、別の請求項へと導入される、すべての変更、組み合わせ、および並べ替えを包含する。例えば、別の請求項に従属している請求項は、同じ基礎請求項に従属している他の請求項で見られる１つ以上の限定を含むように修正され得る。要素が、リストとして、例えば、マーカッシュ群のフォーマットで提示される場合、要素の各サブグループも開示され、グループからあらゆる要素を除去することができる。概して、本発明、すなわち本発明の態様が、特定の要素及び／又は特徴を含むものとして言及される場合、本発明の特定の実施形態または本発明の態様が、そのような要素及び／又は特徴から成るか、または本質的に成ることが理解されるべきである。簡潔さのために、これらの実施形態は、これらの言葉で（ｉｎ ｈａｅｃ ｖｅｒｂａ）本明細書に具体的には明記されていない。用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」こと、および、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」が、開かれるように意図され、追加の要素または工程の包含を許可する。範囲が与えられる場合、エンドポイントが含まれる。さらに、他の方法で示されない限り又は他に文脈および当業者の理解から明白でない限り、範囲として表わされる値は、文脈が他に明確に指示しない限り、範囲の下限の単位の１０分の１まで、本発明の異なる実施形態における明示された範囲内のあらゆる特定の値またはサブ範囲も想定することができる。

【０５５８】

本出願は、いろいろの権利化された特許、公開だった特許出願、ジャーナル記事、および他の刊行物を指し、これらすべては、引用によって本明細書に組み込まれる。組み込まれた引用文献のいずれかと本明細書の間にコンフリクトがある場合、本明細書が優先される（ｃｏｎｔｒｏｌ）ものとする。加えて、先行技術内にある本発明のあらゆる特定の実施形態は、請求項のいずれか１項またはそれ以上から明確に除外されてもよい。そのような実施形態は、当業者に知られると考えられため、除外が本明細書で明確に明記されていなくても除外されてもよい。本発明のあらゆる特定の実施形態は、先行技術の有無に関連づけられたとしても関連づけられなかったとしても、あらゆる理由で、請求項から除外することができる。

【０５５９】

当業者は、単に日常の実験を使用して、本明細書に記載される具体的な実施形態に対する多くの同等物の使用を認識するか又は確認することができる。本明細書に記載される本実施形態の範囲は、上記の記載に限定されるようには意図されず、むしろ添付の請求項に明記された通りに意図される。当業者は、本明細書に対する様々な変更および修正が、以下の請求項に定義されるように、本発明の精神または範囲から逸脱することなく行われ得ることを理解する。

【０５６０】

＜参考文献＞

非特許文献

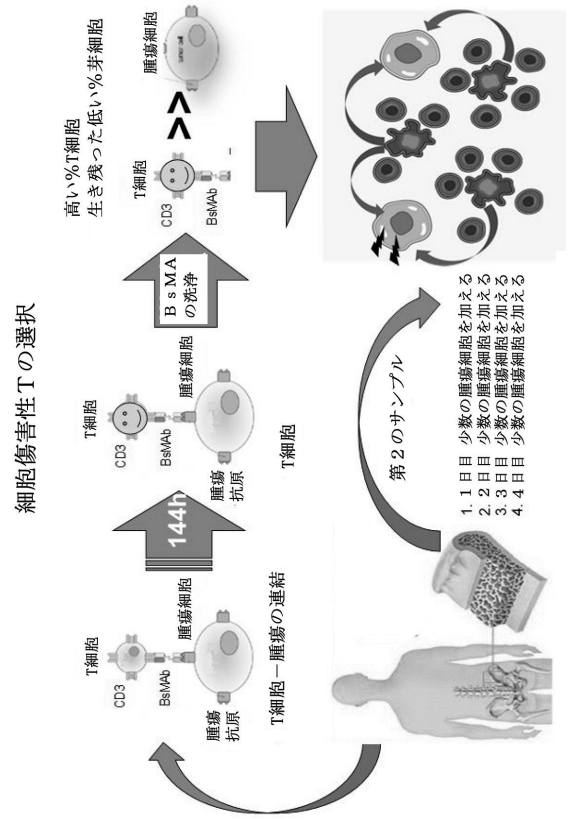
・Ａｄａｍｓ ＪＬ ｅｔ ａｌ．（２０１５）．Ｂｉｇ ｏｐｐｏｒｔｕｎｉｔｉｅｓ ｆｏｒ ｓｍａｌｌ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｉｎ ｉｍｍｕｎｏ－ｏｎｃｏｌｏｇｙ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ １４（９）：６０３－２２．
・Ｂｅｎｎｅｔｔ ＴＡ ｅｔ ａｌ．（２０１４）．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ ｐｒｏｆｉｌｅｓ ｏｆ ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｔｒｅａｔｍｅｎｔｓ ｉｎ ｐａｔｉｅｎｔ ｓａｍｐｌｅｓ ｂｙ ａｕｔｏｍａｔｅｄ ｆｌｏｗ ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ：ａ ｂｒｉｄｇｅ ｔｏ ｉｎｄｉｖｉｄｕａｌｉｚｅｄ ｍｅｄｉｃｉｎｅ．Ｃｌｉｎ．Ｌｙｍｐｈｏｍａ Ｍｙｅｌｏｍａ Ｌｅｕｋ．１４（４）：３０５－１８．
・Ｂｕｉｌ－Ｂｒｕｎａ Ｎ ｅｔ ａｌ．（２０１６）．Ｂｒｉｎｇｉｎｇ Ｍｏｄｅｌ－Ｂａｓｅｄ Ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｍｅｔｒｉｃｓ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｔｈｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｓｔ ２１（２）：２２０－３２．
・Ｃｈｏｔｈｉａ Ｃ ｅｔ ａｌ．（１９８７）．Ｃａｎｏｎｉｃａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｇｌ

obulins. J Mol Biol 196 (4) : 901-17.
・Hamid O et al. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. N Engl J Med 369 (2) : 134-44.
・Kabat EA et al. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest. US Department of Health and Human Services Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242.
・Larbi A and Fulop T (2014). From "truly naive" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. Cytometry Part A 85 (1) : 25-35.
・Martin F et al. (1994). The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. EMBO J 13 (22) : 5303-9.
・Maus MV et al. (2014). Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. Annu Rev Immunol 32 : 189-225.
・McConnell SJ et al. (1995). Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained peptide libraries. J Mol. Biol 250 (4) : 460-70.
・Montes M et al. (2005). Optimum in vitro expansion of human antigen-specific CD8 T cells for adoptive transfer therapy. Clin Exp Immunol 142 (2) : 292-302.
・Mould DR et al. (2013). Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development - Part 2: Introduction to Pharmacokinetics Modeling Methods. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol 2 (4) : e38.
・Pardoll DM. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 12 (4) : 252-64.
・Rosenberg SA et al. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. N Eng J Med 19 (25) : 1676-80.
・Scott AM et al. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. Cancer Immun 12 : 14.
・Serafini P et al. (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. Cancer Res 68 (13) : 5439-49.
・Song DG et al. (2012). CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. Blood 119 (3) : 696-706.
・Spiess C et al. (2015). Alternative molecular formats and therapeutic applications for

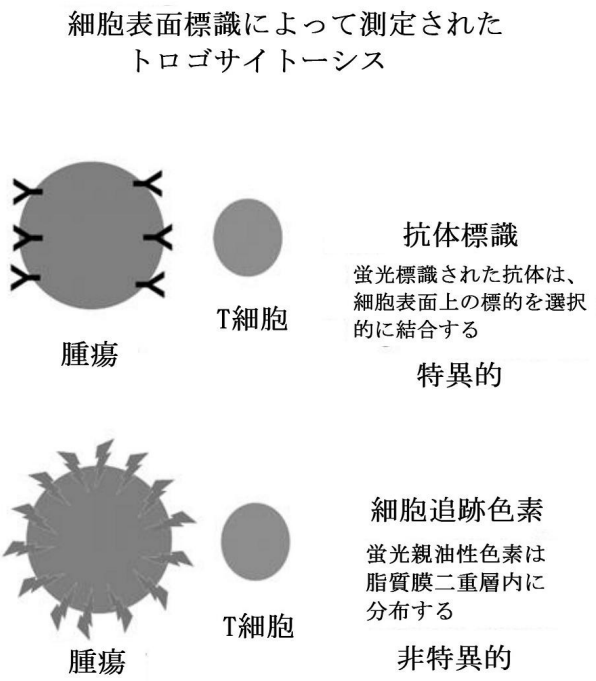
bispecific antibodies. Mol Immunol 67：95－106.
・Tramontano A et al.（1994）. The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. J Mol. Recognit 7（1）：9－24.
・Upton RN et al.（2014）. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development: Part 3－Introduction to Pharmacodynamic Modeling Methods. CPT Pharmacometrics Syst Oharmacol 3（1）：e88.
・Guidance for Industry Population Pharmacokinetics（1999）. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research（CDER）and Center for Biologics Evaluation and Research（CBER）.
・http：／／www.fda.gov／downloads／drugs／guidancecomplianceregulatoryinformation／guidances／ucm072137.pdf）.

【図面】

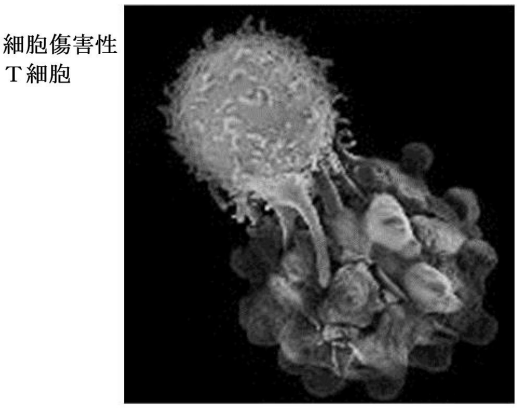
【図１】



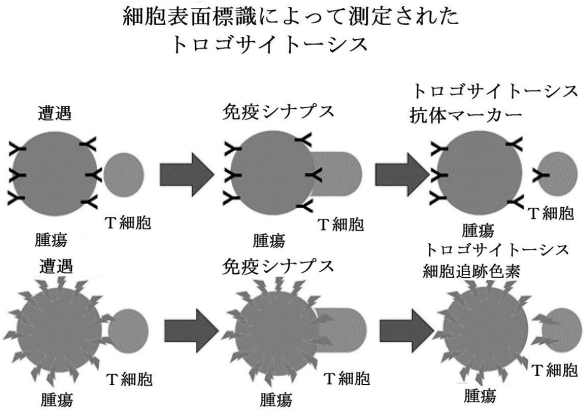
【図２】



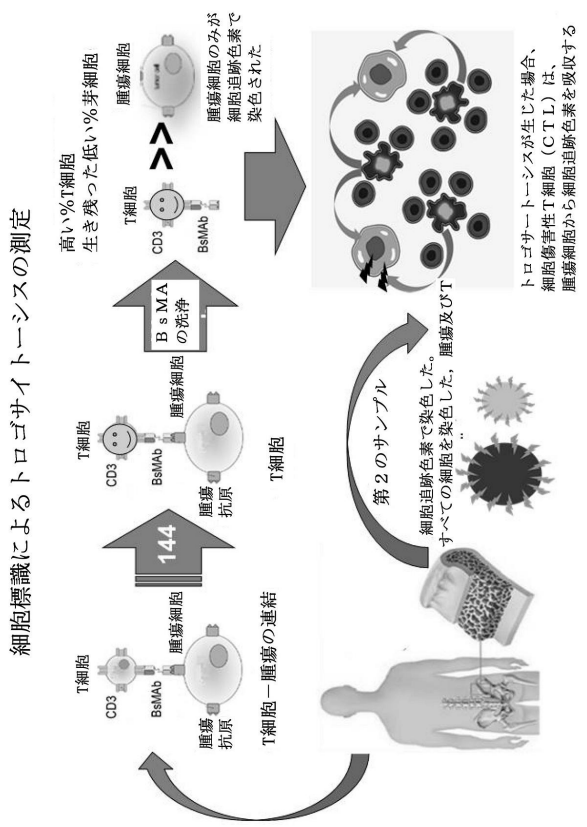
【図３】



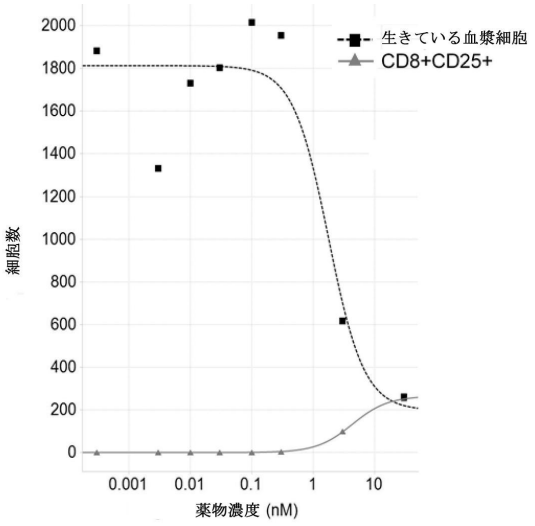
【図４】



【図５】



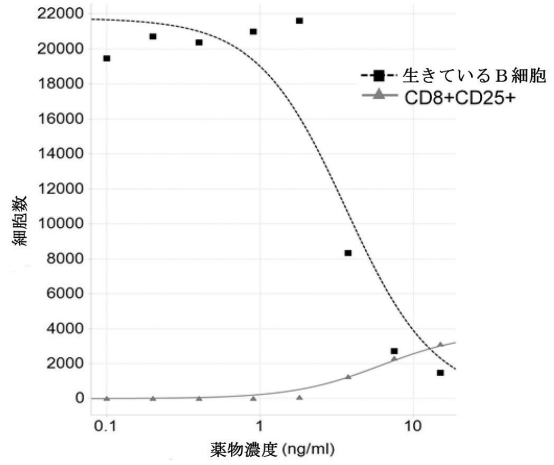
【図６】



	Ｔ細胞	血漿細胞	基礎 E:T
ベースラインでの細胞#	2809	7679	1:2.7

	Ｔ細胞 CD8+CD25+	生きている 腫瘍細胞	有効 E:T 比率
薬物濃度による変動 #	265	1616	1:6.1

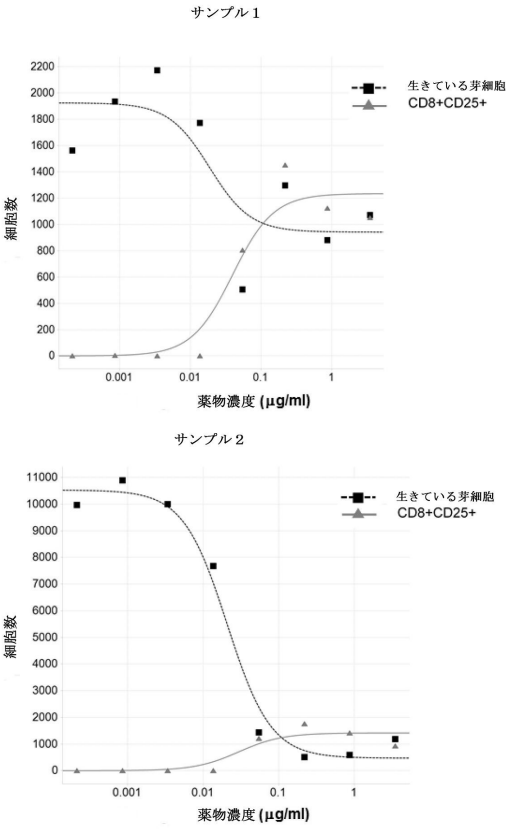
【図７】



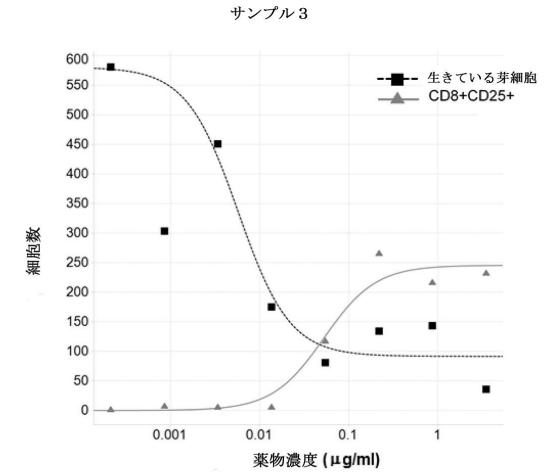
	Ｔ細胞	CD19+	基礎E:T
ベースラインでの細胞＃	1101	33166	1:30.1

	Ｔ細胞 CD8+CD25+	生きている腫瘍細胞	有効E:T比率
薬物濃度による変動＃	3799	21761	1:5.7

【図８－１】

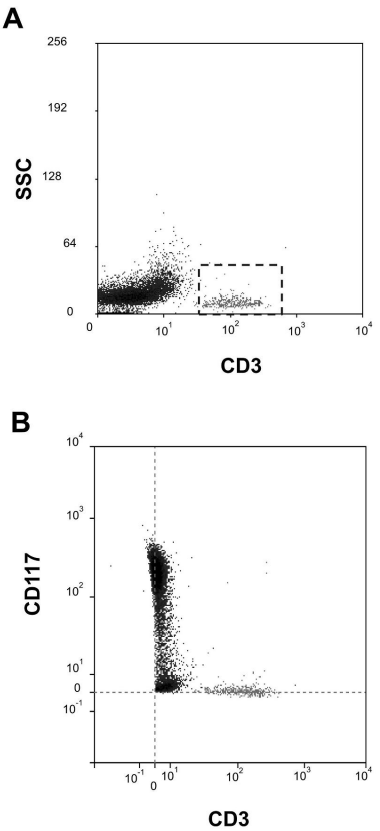


【図８－２】

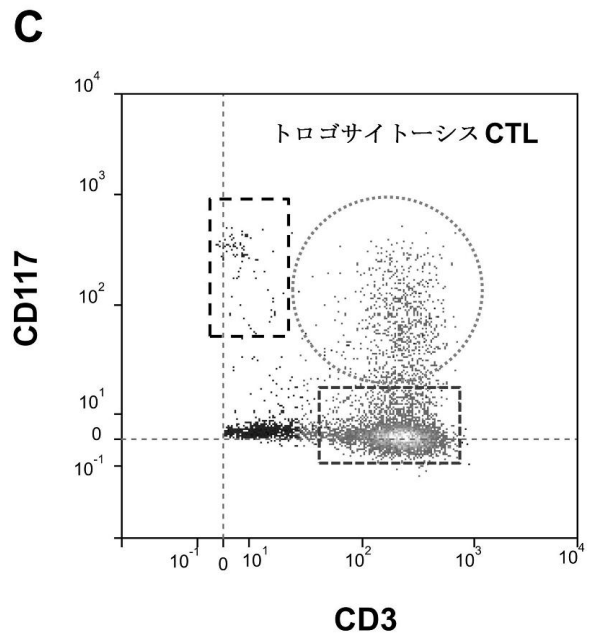


		Ｔ細胞 CD8+CD25+	生きている芽細胞	有効E:T比率
薬物濃度による変動＃	サンプル１	1234	983	1:0.8
	サンプル２	1414	10057	1:7.1
	サンプル３	245	489	1:2

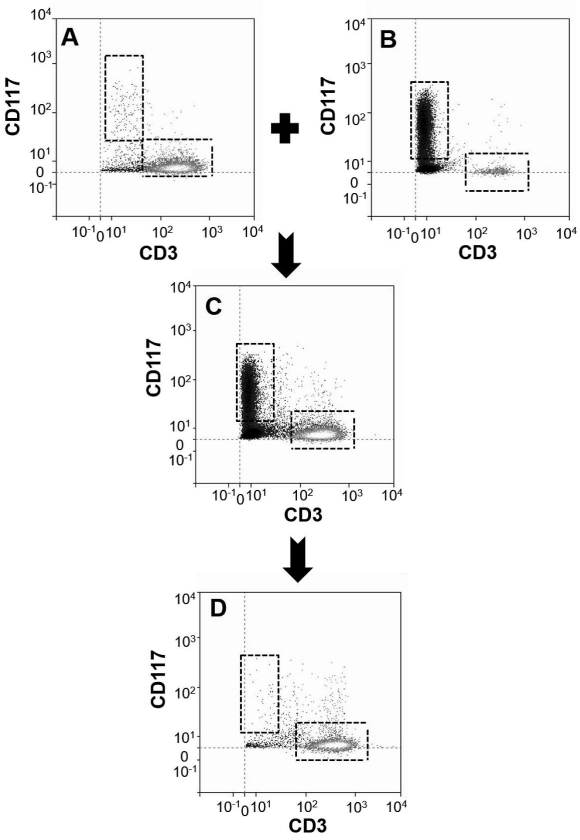
【図９－１】



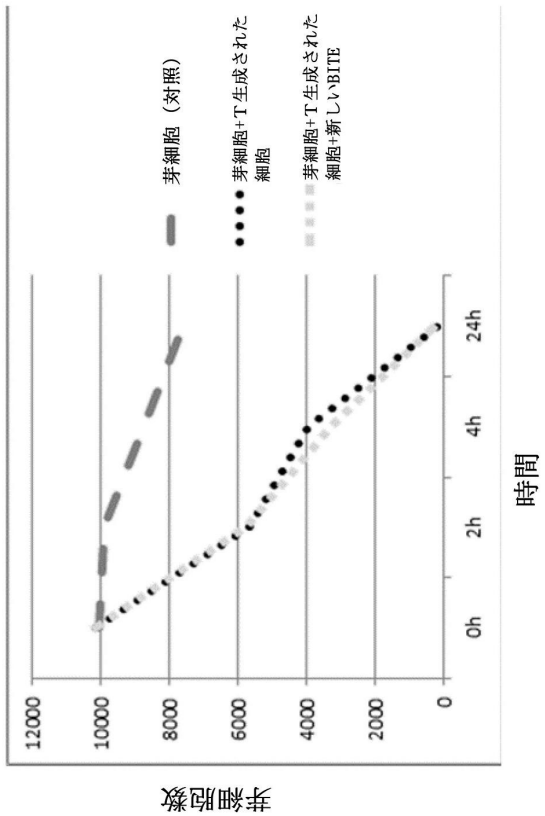
【図９－２】



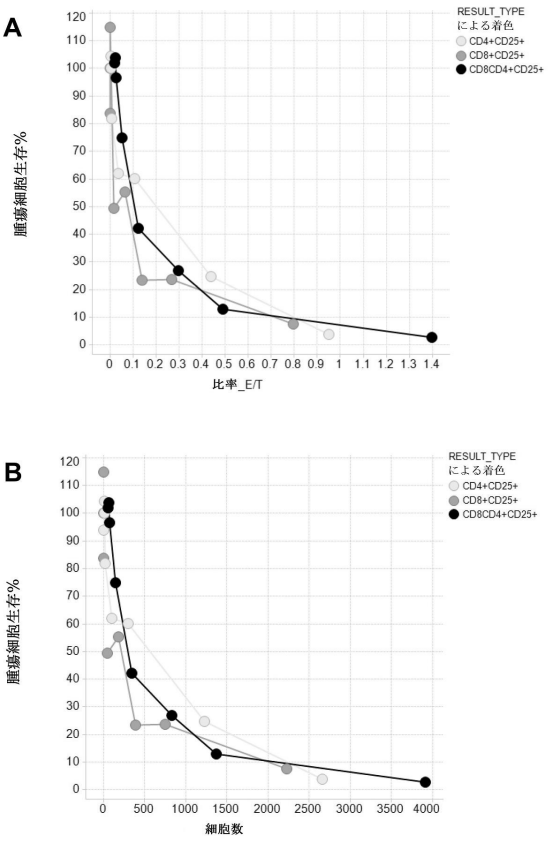
【図１０】



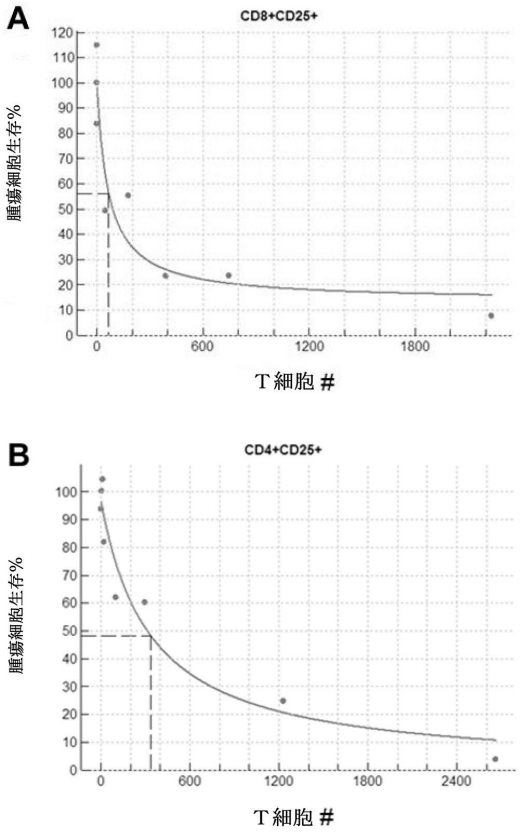
【図１１】



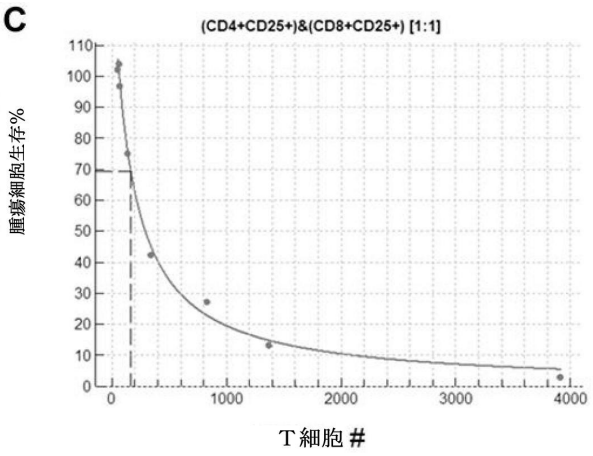
【図１２】



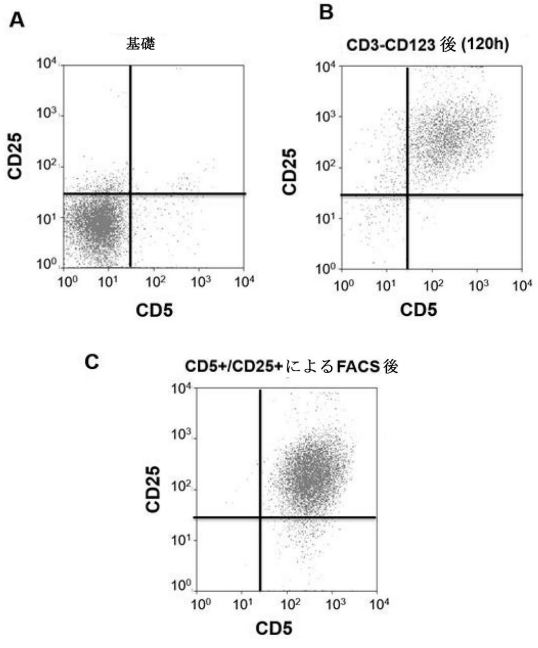
【図１３－１】



【図１３－２】

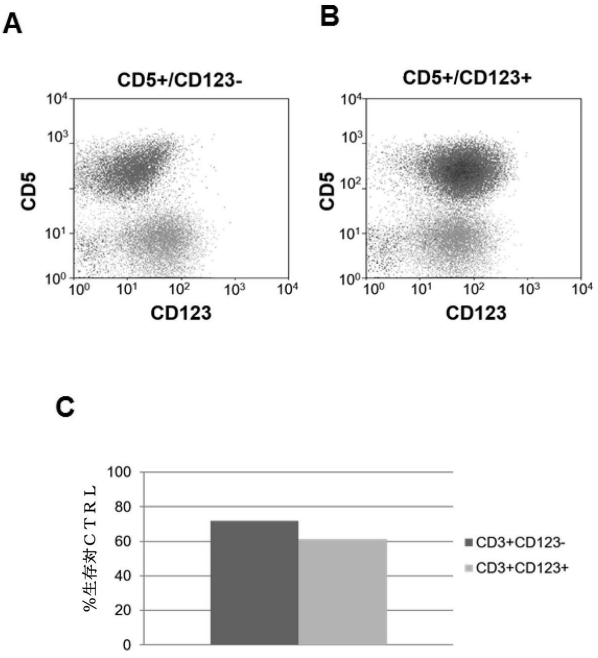


【図１４】

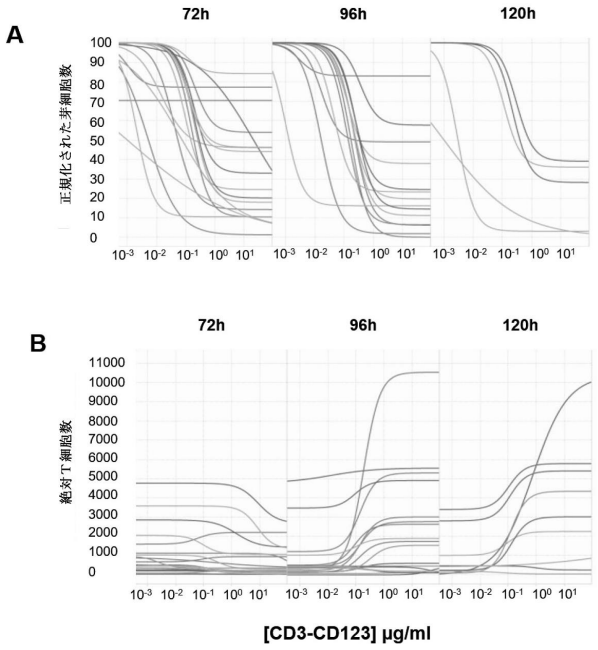


% CD5+CD25+	基礎	120h CD3-CD123	FACS 後
サンプル１	0.25%	89.8%	99.1%
サンプル２	0.3%	75.2%	99.6%

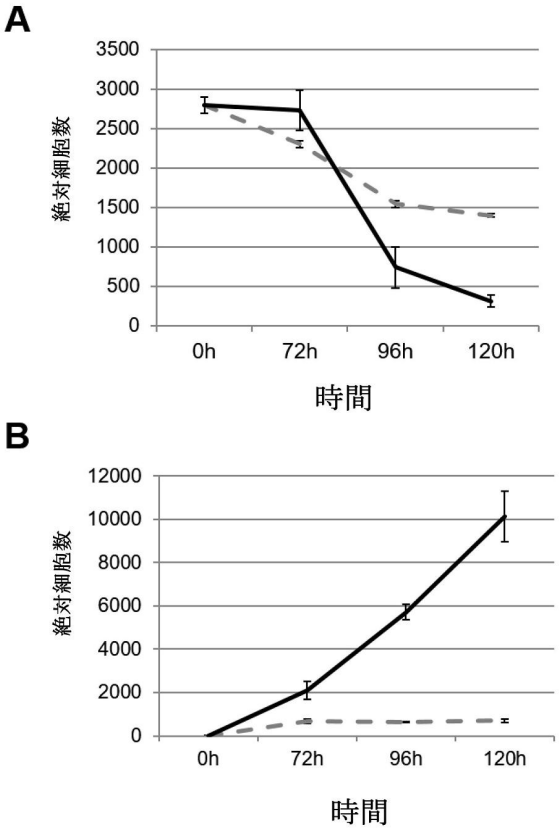
【図１５】



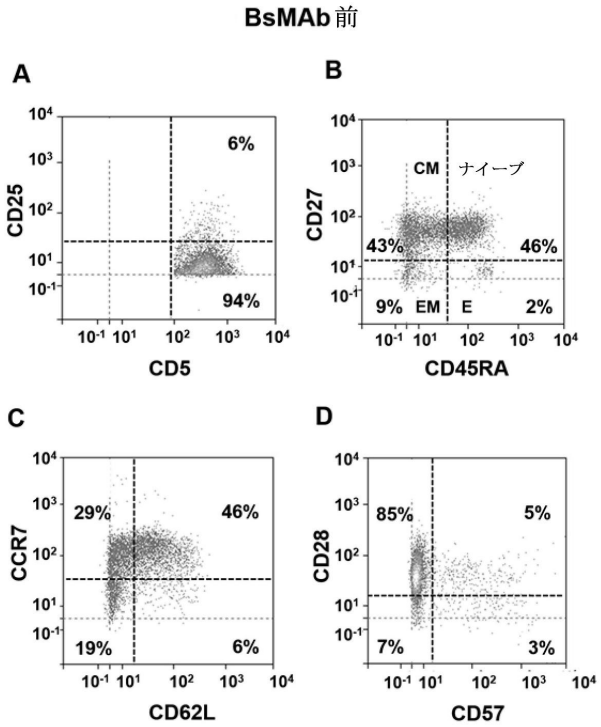
【図１６】



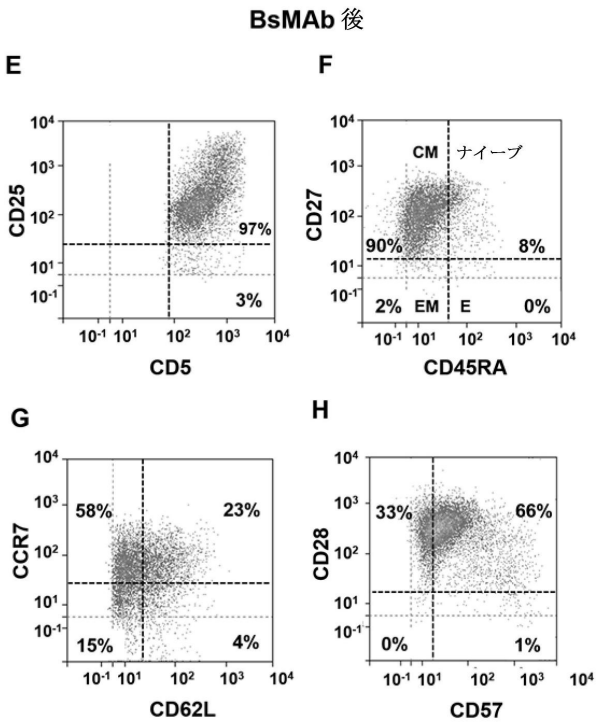
【図１７】



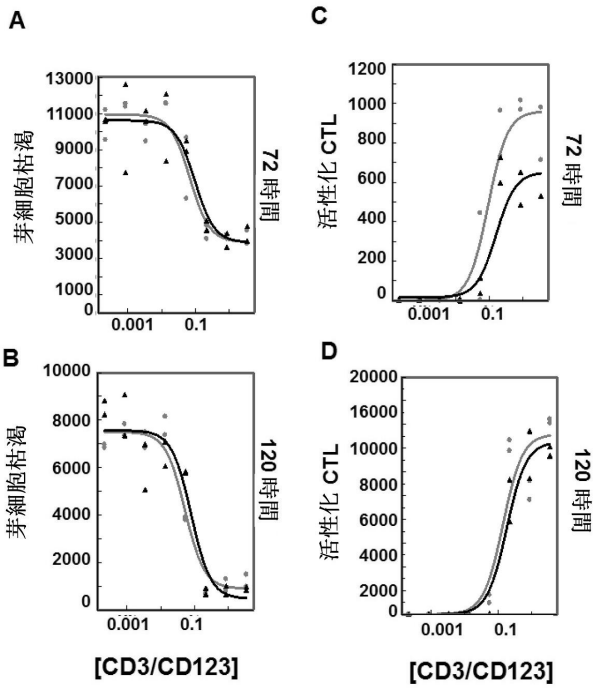
【図１８－１】



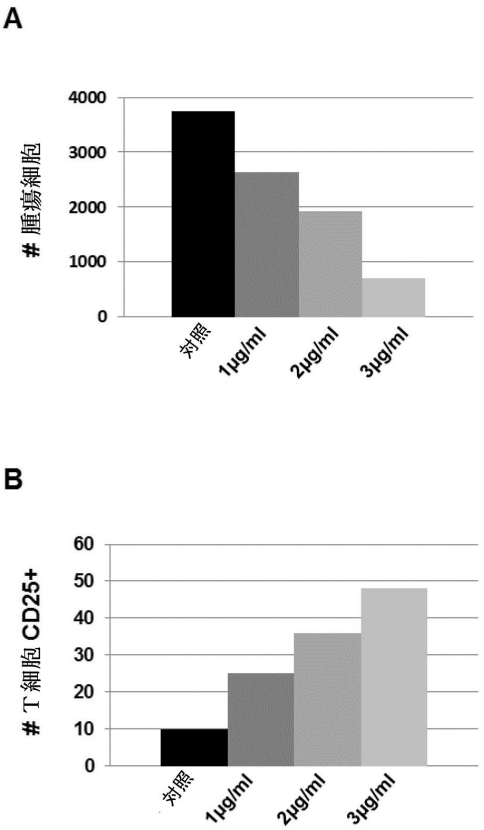
【図１８－２】



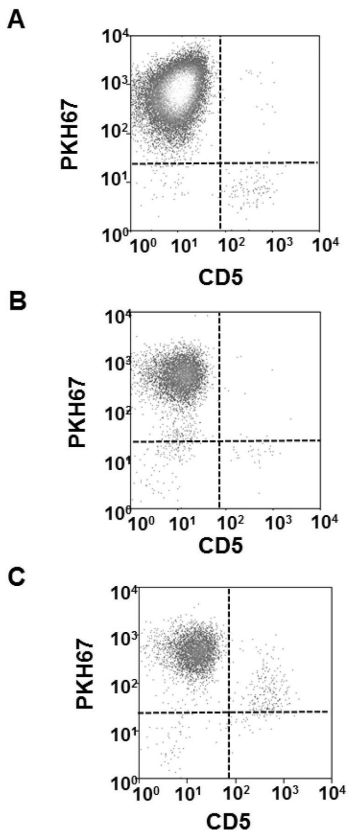
【図１９】



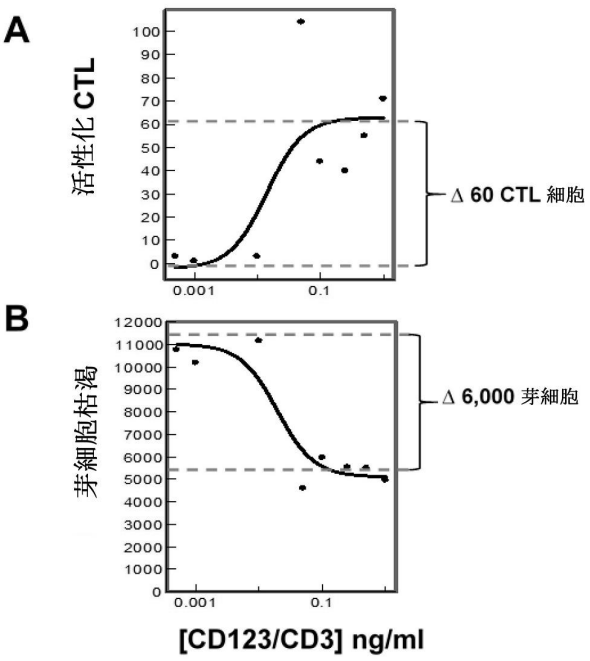
【図２０】



【図２１】

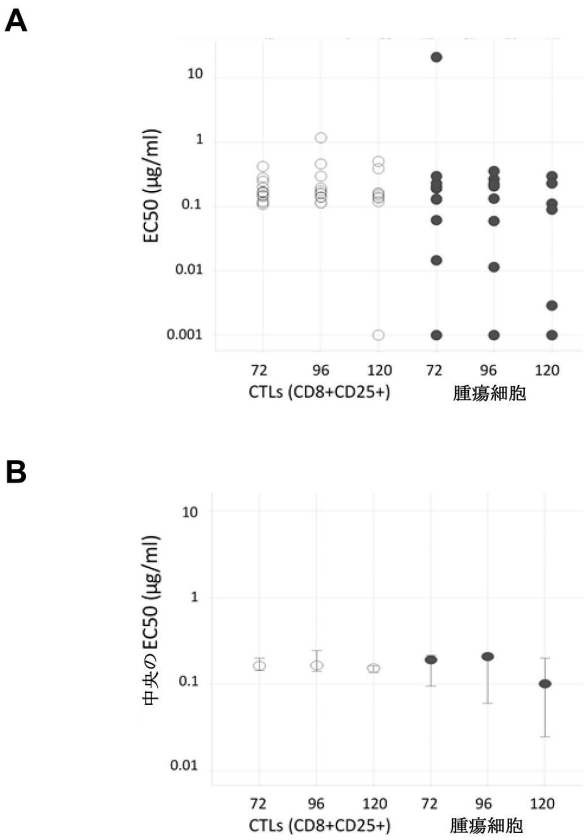


【図２２】

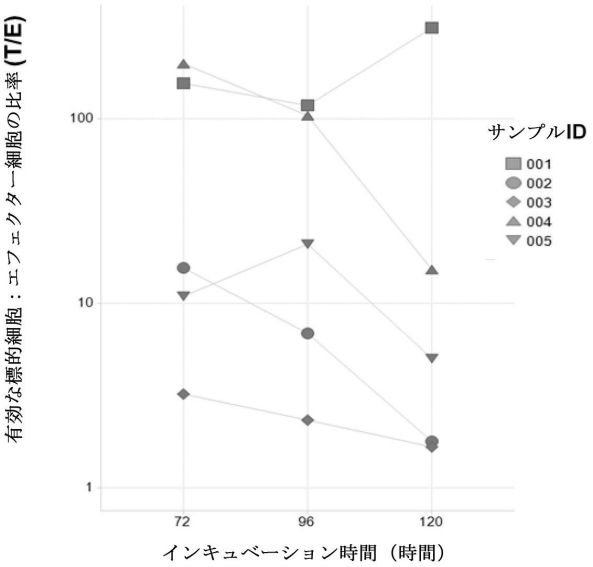


有効 E:T 比率 = ΔCTLs：Δ 芽（腫瘍）細胞
= 60:6,000 = 1:100

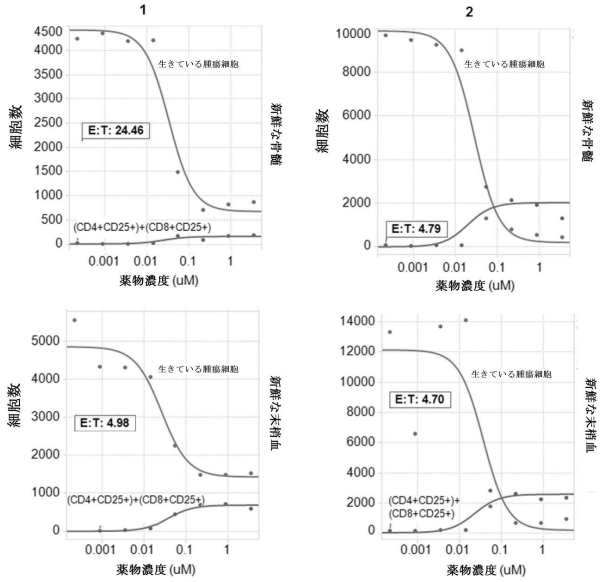
【図２３】



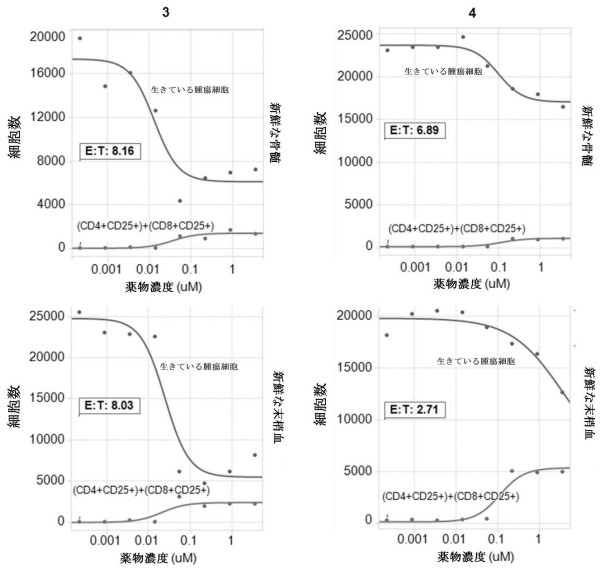
【図２４】



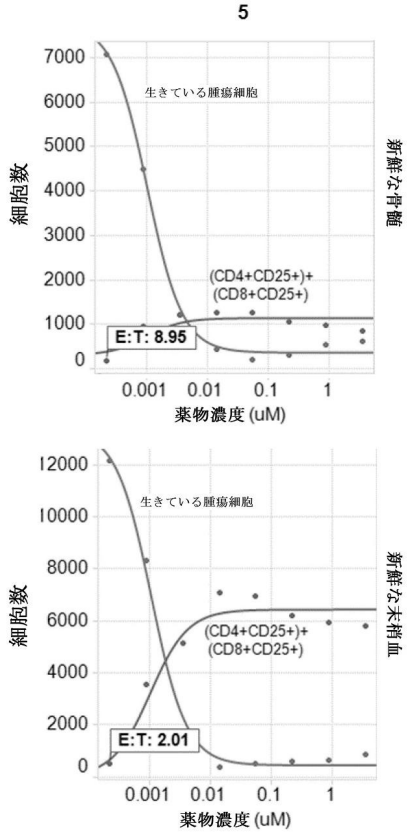
【図２５－１】



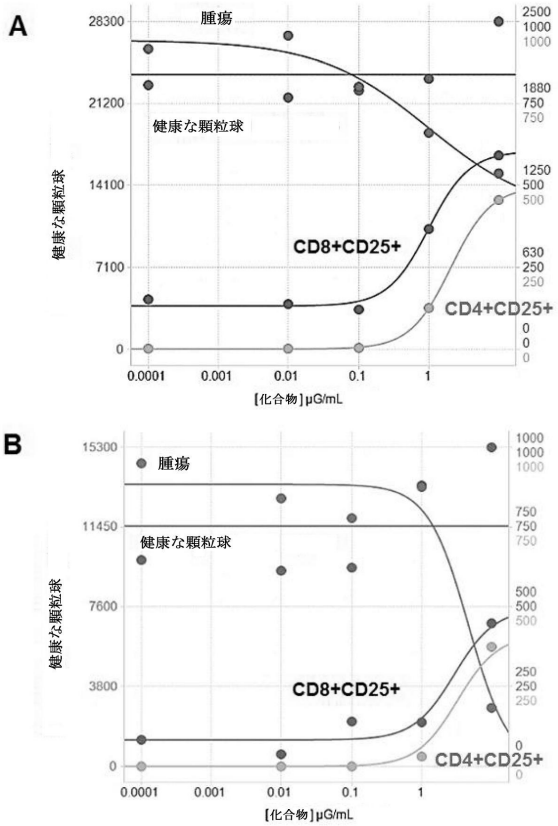
【図２５－２】



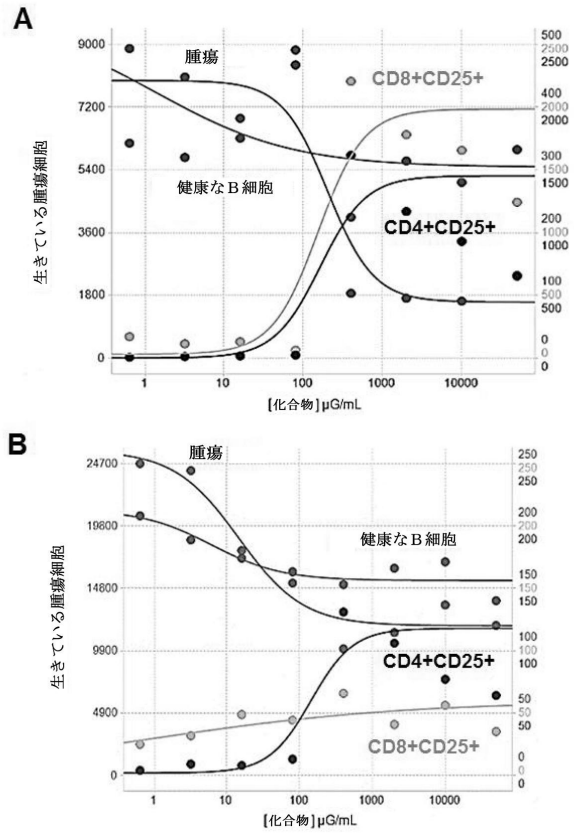
【図２５－３】


5
生きている腫瘍細胞
(CD4+CD25+)+
(CD8+CD25+)
E:T: 8.95
細胞数
残存する骨髄
薬物濃度 (uM)
生きている腫瘍細胞
(CD4+CD25+)+
(CD8+CD25+)
E:T: 2.01
細胞数
残存する骨髄
薬物濃度 (uM)

【図２６】


A
腫瘍
健康な顆粒球
CD8+CD25+
CD4+CD25+
健康な顆粒球
【化合物】μG/mL
B
腫瘍
健康な顆粒球
CD8+CD25+
CD4+CD25+
健康な顆粒球
【化合物】μG/mL

【図２７】


A
腫瘍
CD8+CD25+
健康なＢ細胞
CD4+CD25+
生きている腫瘍細胞
【化合物】μG/mL
B
腫瘍
健康なＢ細胞
CD4+CD25+
CD8+CD25+
生きている腫瘍細胞
【化合物】μG/mL

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI	
C12Q 1/04 (2006.01)		C12Q	1/04
C07K 16/46 (2006.01)		C07K	16/46
C07K 16/28 (2006.01)		C07K	16/28
C07K 16/30 (2006.01)		C07K	16/30
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00
C07K 14/705 (2006.01)		C07K	14/705
C07K 14/71 (2006.01)		C07K	14/71
C07K 14/72 (2006.01)		C07K	14/72
C07K 14/725 (2006.01)		C07K	14/725
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08

スペイン ２８７６０ マドリード カレ・サンティアゴ・グリソリア １ スイート ２０５ パルケ・シエンティフィコ・マドリード（ピーシーエム） ヴィヴィア・バイオテック，エス．エル
(72)発明者 ヘルナンデス カンポ，ピラール
スペイン ２８７６０ マドリード カレ・サンティアゴ・グリソリア １ スイート ２０５ パルケ・シエンティフィコ・マドリード（ピーシーエム） ヴィヴィア・バイオテック，エス．エル
(72)発明者 ゴメス ゴンザレス，クリスティーナ
スペイン ２８７６０ マドリード カレ・サンティアゴ・グリソリア １ スイート ２０５ パルケ・シエンティフィコ・マドリード（ピーシーエム） ヴィヴィア・バイオテック，エス．エル
(72)発明者 ゴロチャテギ ギレン，ジュリアン
スペイン ２８７６０ マドリード カレ・サンティアゴ・グリソリア １ スイート ２０５ パルケ・シエンティフィコ・マドリード（ピーシーエム） ヴィヴィア・バイオテック，エス．エル
(72)発明者 マルティネス ロペス，ホアキン
スペイン ２８００５ マドリード カレ・メリージャ ナンバー６ セクスト ビー
(72)発明者 ロブレス マテオス，アリシア
スペイン ２８７６０ マドリード カレ・サンティアゴ・グリソリア １ スイート ２０５ パルケ・シエンティフィコ・マドリード（ピーシーエム） ヴィヴィア・バイオテック，エス．エル
(72)発明者 プリモ ラモス，ダニエル
スペイン ２８７６０ マドリード カレ・サンティアゴ・グリソリア １ スイート ２０５ パルケ・シエンティフィコ・マドリード（ピーシーエム） ヴィヴィア・バイオテック，エス．エル

審査官 松原 寛子

(56)参考文献
特表２００２－５１２０２０（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５３８３３１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１５／１２６５４８（WO，Ａ１）
Haematologica，2013年06月24日，98, 12，1930-1938
Blood，2011年11月18日，118, 21, 580

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ ５／０７８３
Ａ６１Ｋ ３５／１７
Ａ６１Ｋ ４５／００
Ａ６１Ｐ ３５／００
Ａ６１Ｐ ３５／０２
Ｃ１２Ｑ １／０４
Ｃ０７Ｋ １６／４６
Ｃ０７Ｋ １６／２８
Ｃ０７Ｋ １６／３０
Ｃ０７Ｋ １９／００
Ｃ０７Ｋ １４／７０５
Ｃ０７Ｋ １４／７１
Ｃ０７Ｋ １４／７２

C07K 14／725
C12P 21／08
JSTPlus／JMEDPlus／JST7580（JDreamIII）
CAplus／MEDLINE／EMBASE／BIOSIS（STN）