

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7082051号

(P7082051)

(45)発行日 令和4年6月7日(2022.6.7)

(24)登録日 令和4年5月30日(2022.5.30)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K

35/17

Z

A 6 1 K 38/20 (2006.01)

A 6 1 K

38/20

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K

48/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 2 1

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K

45/00

請求項の数 22 (全78頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-531211(P2018-531211)

(86)(22)出願日 平成29年1月10日(2017.1.10)

(65)公表番号 特表2019-506843(P2019-506843
A)

(43)公表日 平成31年3月14日(2019.3.14)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/012882

(87)国際公開番号 WO2017/123557

(87)国際公開日 平成29年7月20日(2017.7.20)

審査請求日 令和1年12月26日(2019.12.26)

(31)優先権主張番号 62/277,442

(32)優先日 平成28年1月11日(2016.1.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 515286243

アルモ・バイオサイエンス・インコ
ーポレイテッドアメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4
0 6 3、レッドウッド・シティ、チェサ
ピーク・ドライブ・5 7 5

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100131990

弁理士 大野 玲恵

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 マム, ジョン・ブライアン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗原特異的 C D 8 + T 細胞の産生におけるインターロイキン - 1 0 及びその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患を有する被験体の治療方法に用いるための医薬組成物の製造方法であって、

前記製造方法は、I L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な疾患に対して I L - 1 0 剤療法を投与した被験体から採取した 1 つ以上の C D 8 + T 細胞を含む試料由来の核酸を配列決定すること；

疾患抗原特異的 C D 8 + T 細胞の T C R の V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチド対をコードする核酸を 1 つ以上の構築物にクローニングして、疾患抗原特異的 T C R の V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチドの一方または両方をコードするベクターを作製すること；

前記ベクターを C D 8 + T 細胞内に導入して、疾患抗原特異的 T C R の前記 V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチド対を発現する遺伝子改変 T 細胞を産生することを含み、

前記医薬組成物は遺伝子改変 C D 8 + T 細胞を含み、

前記治療方法は、遺伝子改変 C D 8 + T 細胞を前記 C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患を有する被験体に投与することを含み、

前記 T 細胞が、前記 C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患を有する被験体の前記疾患の抗原に特異的である疾患抗原特異的 T C R の V / V ペアの V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチドを含む組換え T C R を発現するように遺伝子改変されており、

前記疾患抗原特異的 T C R の V / V ペアの V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチドは、I L - 1 0 剤療法に先立ってまたは I L - 1 0 剤療法中のより早い時点において I L - 1 0 剤治療を受け入れ可能な疾患を有する 1 人以上の患者から採取した参照試料中よりも、I L - 1 0 剤治療を受け入れ可能な疾患に対して I L - 1 0 剤治療を施した被験体から採取した 1 つ以上の C D 8 + T 細胞を含有する試料中に、多量に存在する V ポリペプチド及び V ポリペプチドをコードする核酸に由来するものであり；

前記投与が、前記 C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患を有する被験体の前記疾患を治療するのに有効である、医薬組成物。

【請求項 2】

前記製造方法が、前記 V T C R ポリペプチドの相補性決定領域 (C D R) 及び前記 V T C R ポリペプチドの相補性決定領域 (C D R) の前記アミノ酸配列を同定することを含む、請求項 1 に記載の製造方法。

10

【請求項 3】

前記製造方法が、前記 V T C R ポリペプチド及び前記 V T C R ポリペプチドの前記アミノ酸配列を同定することを含む、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 4】

前記遺伝子改変 T 細胞の前記 V T C R ポリペプチド及び前記 V T C R ポリペプチドが、同一または異なる発現構築物の別々の発現カセットにコードされる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 5】

前記遺伝子改変 T 細胞の前記 V T C R ポリペプチドが、前記構築物にコードされ、その C 末端で定常 T C R ポリペプチドに作動可能に連結する、請求項 4 に記載の製造方法。

20

【請求項 6】

前記遺伝子改変 T 細胞の前記 V T C R ポリペプチドが、前記構築物にコードされ、その C 末端で定常 T C R ポリペプチドに作動可能に連結する、請求項 4 または 5 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 7】

前記遺伝子改変 T 細胞の前記 V T C R ポリペプチド及び前記 V T C R ポリペプチドが、前記 V T C R ポリペプチド及び前記 V T C R ポリペプチドを含む一本鎖 T C R (s c T v) をコードする核酸を含む構築物にコードされる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の製造方法。

30

【請求項 8】

前記 s c T v が、N - 末端から C - 末端方向に、前記 V T C R ポリペプチド、リンカー、及び前記 V T C R ポリペプチドを含む、請求項 7 に記載の製造方法。

【請求項 9】

前記 C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患ががんであり、
前記遺伝子改変 C D 8 + T 細胞の前記疾患抗原特異的 T C R ががんの抗原に特異的である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 10】

前記がんが固形腫瘍である、請求項 9 に記載の製造方法。

40

【請求項 11】

前記腫瘍が、子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、胃腸管、腎臓、腎細胞、膀胱、骨、骨髓、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、膵臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳、神経節、中枢神経系 (C N S) 及び末梢神経系 (P N S) 、または造血系、脾臓、もしくは胸腺の癌から選択されるがんの腫瘍である、請求項 9 または 10 に記載の製造方法。

【請求項 12】

前記がんが、食道、咽頭、胃、小腸、大腸、結腸、または直腸の癌である、請求項 9 または 10 に記載の製造方法。

【請求項 13】

前記がんが、メラノーマ、結腸直腸癌、または腎臓癌である、請求項 9 または 10 に記載

50

の製造方法。

【請求項 14】

前記 CD8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患がウイルス感染であり、
前記遺伝子改変 CD8 + T 細胞の前記疾患抗原特異的 TCR が前記ウイルスの抗原に特異的である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 15】

前記ウイルスが、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスである、請求項 14 に記載の製造方法。

【請求項 16】

前記ウイルスが、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV) またはヒト免疫不全ウイルス (HIV) である、請求項 14 に記載の製造方法。

10

【請求項 17】

前記治療方法が、さらなる治療剤を投与することを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 18】

前記治療剤が IL - 10 である、請求項 17 に記載の製造方法。

【請求項 19】

前記 CD8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患ががんであり、
前記治療剤が化学療法剤である、請求項 17 または 18 に記載の製造方法。

【請求項 20】

20

前記 CD8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患がウイルス感染であり、
前記治療剤が抗ウイルス剤である、請求項 17 または 18 に記載の製造方法。

【請求項 21】

前記投与が、複数の遺伝子改変 CD8 + T 細胞を投与することを含み、
前記複数の前記遺伝子改変 CD8 + T 細胞が、異なる疾患抗原特異的 TCR を有する遺伝子改変 CD8 + T 細胞を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 22】

前記遺伝子改変 CD8 + T 細胞が、前記 CD8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患を有する被験体に対して自己由来である、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本願は、2016 年 1 月 11 日に出願された米国仮出願第 62 / 277, 442 号の優先権を主張し、前記出願はその全体を参照によって本明細書に援用する。

【0002】

[発明の分野]

本発明は、抗原特異的 CD8 + T 細胞を誘発するための IL - 10 剤の使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

40

[序論]

サイトカインのインターロイキン - 10 (IL - 10) は、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、及び抗原提示細胞 (APC) に対する作用を介して複数の免疫応答を調節する多面発現性サイトカインである。IL - 10 は、活性化単球及び活性化マクロファージにおける IL - 1、IL - 1、IL - 6、IL - 8、TNF -、GM - CSF 及び G - CSF の発現を阻害することによって免疫応答を抑制することができ、NK 細胞による IFN - 産生も抑制する。IL - 10 は主にマクロファージで発現するが、発現は活性化 T 細胞、B 細胞、肥満細胞及び単球においても検出されている。IL - 10 は、免疫応答を抑制することに加えて、IL - 2 及び IL - 4 処理した胸腺細胞の増殖を刺激し、B 細胞の生存率を高め、MHC クラス II の発現を刺激することを含む免疫刺激特性を示す。

50

【 0 0 0 4 】

ヒトIL - 10はホモダイマーであり、2つのモノマーサブユニット間の非共有結合相互作用の破壊によって生物学的に不活性になる。公開されたIL - 10の結晶構造から得られたデータは、この機能性二量体がIFN - に一定の類似性を示すことを示している (Zdanov et al, (1995) Structure (Lond) 3:591 - 601)。

【 0 0 0 5 】

IL - 10は、古典的に、免疫抑制性サイトカインとして定義されている (de Waal Malefyt et al. J Exp Med, 1991. 174 (5): p. 1209 - 20; de Waal Malefyt et al., J Exp Med, 1991. 174 (4): p. 915 - 24)。最近の証拠は、このサイトカインのペグ化形態が免疫腫瘍学に関して免疫刺激効果を発揮することを明らかに示している (Emmerich et al. Cancer Res, 2012. 72 (14): p. 3570 - 81; Mumm et al., Cancer Cell, 2011. 20 (6): p. 781 - 96)。この抗腫瘍効果の特異的機序には、CD8 + T細胞及び内在性IFN の両方が必要であることが示されている (Mummら、上記)。具体的には、CD8 + T細胞をIL - 10 / PEG - IL - 10に曝露することにより、IFN、グランザイムB及びパーフォリン分泌の増強がもたらされる。IFN及びグランザイムBの両方の分泌は、T細胞受容体と、同族のMHC I / 抗原複合体との会合に依存する (Chan et al, J Interferon Cytokine Res, 2015, 35 (12): 948 - 955)。

【 0 0 0 6 】

その多面発現活性の結果として、IL - 10は、炎症症状、免疫関連障害、線維性障害、代謝障害及びがんを含む広範囲の疾患、障害及び病態に関連している。多くのそのような疾患、障害及び病態に対するIL - 10による臨床及び前臨床評価は、その治療可能性を確固たるものにしている。

【 0 0 0 7 】

PEG - rHuIL - 10 (AM0010) 単独療法によるヒトがん患者の治療は、グランザイムB + 腫瘍内CD8 + T細胞浸潤の実質的な増加を特徴とする実質的な抗腫瘍応答をもたらす。この活性化CD8 + 腫瘍内T細胞浸潤に付随して、血清サイトカインであるIFN、IL - 18、IL - 7、IL - 4、GM - CSF及び活性化T細胞マーカー FasLにおいても増加が再現される (Infante, et al., ASCO Meeting Abstracts, 2015. 33 (15__suppl): p. 3017)。これらのサイトカインは、広域免疫活性化の特徴である。

【 0 0 0 8 】

[概要]

本開示は、疾患抗原特異的T細胞受容体を発現する単離されたCD8 + T細胞、ならびにそのような疾患抗原特異的T細胞のT細胞受容体 (TCR) のV 及びV ポリペプチド対をコードする核酸に関連する方法及び組成物を提供する。そのような疾患抗原特異的CD8 + T細胞は、IL - 10剤による治療を受け入れ可能な疾患を有する被験体の末梢 (例えば、血液) から得ることができる。本開示はまた、単離された疾患抗原特異的CD8 + T細胞の被験体への投与に関連する治療方法及び組成物、ならびに疾患抗原特異的TCR及び/またはキメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変したCD8 + T細胞に関連する治療方法及び組成物を企図する。

【 0 0 0 9 】

本明細書では、疾患抗原特異的T細胞のTCRの可変 (V) T細胞受容体 (TCR) ポリペプチド及び/または可変 (V) TCRポリペプチドの同定方法を提供し、当該方法は: IL - 10剤治療を受け入れ可能な疾患を有する被験体にIL - 10剤を投与すること; 前記被験体から採取した1つ以上のCD8 + T細胞を含有する試料由来の核酸を配列決定すること; V TCRポリペプチドをコードする核酸及び/またはV TCRポ

10

20

30

40

50

リペプチドをコードする核酸の存在量を、I L - 1 0 剤療法に先立ってまたはI L 1 0 剤療法中のより早い時点においてI L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な疾患を有する1人以上の患者から採取した参照試料中のV T C Rポリペプチドをコードする核酸及び/またはV T C Rポリペプチドをコードする核酸の存在量と比較することを含み;ここで、前記配列決定は、可変 (V) T C Rポリペプチドをコードする核酸及び/または可変 (V) T C Rポリペプチドをコードする核酸を配列決定することを含み、試料中に参照試料よりも多量に存在するV 及び/またはV T C Rポリペプチドは、疾患抗原特異的C D 8 + T細胞に特異的なV / V T C Rポリペプチド対であることを表す。

【0010】

本明細書では、疾患抗原特異的T細胞のT C Rの可変 (V) T細胞受容体 (T C R) ポリペプチド及び可変 (V) T C Rポリペプチドをコードするベクターの生成方法も提供し、当該方法は：I L - 1 0 剤治療を受け入れ可能な疾患に対してI L - 1 0 剤治療を施した被験体から採取した1つ以上のC D 8 + T細胞を含有する試料由来の核酸を配列決定することを含み、ここで、前記C D 8 + T細胞は、可変 (V) T C Rポリペプチド及び可変 (V) T C Rポリペプチドをコードする核酸を含む疾患抗原特異的T細胞受容体 (T C R) を発現し;方法はまた、疾患抗原特異的C D 8 + T細胞のT C RのV 及びV T C Rポリペプチド対をコードする核酸を1つ以上の構築物にクローニングして、疾患抗原特異的T C RのV 及びV T C Rポリペプチドの一方または両方をコードするベクターを作製することを含み、ここで、I L - 1 0 剤療法に先立ってまたはI L 1 0 剤療法中のより早い時点においてI L - 1 0 剤治療を受け入れ可能な疾患を有する1人以上の患者から採取した参照試料よりも多量に試料中に存在するV 及び/またはV T C Rポリペプチドは、疾患抗原特異的C D 8 + T細胞に特異的なV / V T C Rポリペプチド対であることを表す。

【0011】

任意の実施形態において、被験体は、I L - 1 0 剤治療に対し、少なくとも安定 (stable disease) または少なくとも部分奏効を示し得る。いくつかの実施形態では、被験体は、I L - 1 0 剤療法に対する少なくとも部分奏効を示す。

【0012】

任意の実施形態において、試料を、P D 1 + , C D 8 + T細胞で富化してもよい。いくつかの実施形態では、P D 1 + , C D 8 + T細胞は、少なくともP D 1 + m i dのレベルで細胞表面P D 1を発現する。いくつかの実施形態では、P D 1 + , C D 8 + T細胞は、少なくともP D 1 + h i g hのレベルで細胞表面P D 1を発現する。

【0013】

任意の実施形態において、試料を、C D 4 5 R O + , C D 8 + T細胞で富化してもよい。任意の実施形態において、試料を、I F N + , C D 8 + T細胞で富化してもよい。いくつかの実施形態では、試料を、I F N + , C D 4 5 R O + , C D 8 + T細胞で富化する。いくつかの実施形態では、試料を、I F N + P D 1 + , C D 8 + T細胞で富化する。いくつかの実施形態では、試料を、P D 1 + , C D 4 5 R O + , C D 8 + T細胞で富化する。いくつかの実施形態では、試料を、I F N + C D 4 5 R O + , P D 1 + , C D 8 + T細胞で富化する。いくつかの実施形態では、方法は、C D 8 + T細胞をC D 3 アゴニストと接触させてI F N 発現を刺激することを含む。いくつかの実施形態では、C D 3 アゴニストは抗C D 3抗体である。

【0014】

任意の実施形態において、試料は、末梢血、リンパ、または被験体の腫瘍由来であってもよい。

【0015】

任意の実施形態において、試料を、P D 1 + , I F N + , C D 4 5 R O + , グランザイムB +、及び/またはパーフォリン+であるC D 8 + T細胞で富化してもよい。

【0016】

任意の実施形態において、1人以上の患者は被験体を含み得る。いくつかの実施形態では

10

20

30

40

50

、 1 人以上の患者が被験体である。

【 0 0 1 7 】

任意の実施形態において、方法は、V T C R ポリペプチドをコードする核酸及び／または V T C R ポリペプチドをコードする核酸を配列決定すること； V T C R ポリペプチド及び／または V T C R ポリペプチドの少なくとも相補性決定領域（C D R）のアミノ酸配列を決定すること；及び、 V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列の存在量及び／または V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列の存在量を、 I L - 1 0 剤療法に先立って、または I L 1 0 剤療法中のより早い時点において、 I L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な疾患を有する 1 人以上の患者から採取した参照試料中の V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列の存在量及び／または V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列の存在量と比較することを含み得る。

10

【 0 0 1 8 】

任意の実施形態において、本方法は、上記のように、疾患抗原特異的 T 細胞の T C R の可変（V）T 細胞受容体（T C R）ポリペプチド及び／または可変（V）T C R ポリペプチドのいずれか一つの同定方法の実施形態に従って単離する C D 8 + T 細胞上に発現する T C R の抗原特異性を、 V 及び／または V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列と、参照試料の V 及び／または V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列とを比較することによって評価することを含み得る。

【 0 0 1 9 】

本明細書では、疾患抗原特異的 T 細胞の T 細胞受容体（T C R）のアミノ酸配列の取得方法も提供し、本方法は、インターロイキン（I L）- 1 0 剤を、 I L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な疾患を有する被験体に投与することを含んでもよく、ここで、前記投与は、被験体において少なくとも部分奏効を提供するのに有効であり；本方法はまた、 I L - 1 0 剤療法に対して少なくとも部分奏効を有する被験体から末梢血リンパ球（P B L）を取得し； P B L から P D 1 + , C D 8 + T 細胞を単離し；可変（V）T C R ポリペプチドをコードする核酸及び／または可変（V）T C R ポリペプチドをコードする核酸を配列決定することを含んでもよく、ここで、 V T C R ポリペプチド及び T C R ポリペプチドは、単離された P D 1 + , C D 8 + T 細胞の表面に発現する T C R の V / V T C R ペアであり；ならびに本方法はまた、配列決定した核酸によってコードされる V T C R ポリペプチド及び／または V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列を決定することを含んでもよく、ここで V 及び V T C R ポリペプチドは、疾患の抗原に特異的な V / V T C R ポリペプチド対を表す。

20

30

【 0 0 2 0 】

本明細書において、疾患抗原特異的 T 細胞の T C R の可変（V）T 細胞受容体（T C R）ポリペプチド及び可変（V）T C R ポリペプチドをコードするベクターの作製方法も提供し、本方法は： I L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な疾患に対する I L - 1 0 剤療法に対して少なくとも部分奏効を示す被験体由来の末梢血リンパ球（P B L）から P D 1 + , C D 8 + T 細胞を単離することを含み、ここで、 P D 1 + , C D 8 + T 細胞は、 V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチドを有する疾患抗原特異的 T C R を発現し；ならびに、本方法は、単離された P D 1 + , C D 8 + T 細胞の T C R の V 及び V T C R ポリペプチド対をコードする核酸を 1 つ以上の構築物にクローニングして、疾患抗原特異的 T C R の V 及び V T C R ポリペプチドの一方または両方をコードするベクターを生成することを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、 V 及び V T C R ポリペプチド対の促進された発現を C D 8 + T 細胞に安定導入するのに適している。いくつかの実施形態では、 V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチドを、同じベクターにクローニングする。いくつかの実施形態では、全長 T C R ポリペプチドをコードし、全長 T C R ポリペプチドをコードする核酸を提供するように、 V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチドをベクターにクローニングする。いくつかの実施形態では、一本鎖 T 細胞受容体（s c T v）をコードする核酸を提供するように、 V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチドをベクターにクローニングする。いくつかの実施形態

40

50

では、s c T vは、N末端からC末端方向に、V T C Rポリペプチド、リンカー、及びV T C Rポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは発現ベクターである。いくつかの実施形態では、単離されたP D 1 + , C D 8 + T細胞のT C Rの複数のV / V T C RペアのV 及びV T C Rポリペプチドをコードする複数の核酸を複数のベクターにクローニングして、P D 1 + , C D 8 + T細胞の疾患抗原特異的T C RのV 及びV T C Rポリペプチド対をコードする構築物のライブラリーを作製する。本明細書に記載するように作製した核酸ベクターのライブラリーもまた、提供する。

【0021】

任意の実施形態において、単離とは、I F N + , C D 4 5 R O + , P D 1 + , C D 8 + T細胞を単離することを含み得る。いくつかの実施形態では、本方法は、P B Lまたは単離されたP D 1 + , C D 8 + T細胞をC D 3 アゴニストと接触させてI F N 発現を刺激することを含む。いくつかの実施形態では、C D 3 アゴニストは抗C D 3 抗体である。

10

【0022】

任意の実施形態において、単離とは、C D 4 5 R O + , P D 1 + , C D 8 + T細胞を単離することを含み得る。

【0023】

任意の実施形態において、P D 1 + , C D 8 + T細胞は、少なくともP D 1 + m i dのレベルで細胞表面P D 1を発現し得る。いくつかの実施形態では、P D 1 + , C D 8 + T細胞は、少なくともP D 1 + h i g hのレベルで細胞表面P D 1を発現する。

【0024】

任意の実施形態において、P D 1 + , C D 8 + T細胞は、I F N 、C D 4 5 R O、グランザイムB、及びパーフォリンのうちの1つ以上を発現し得る。

20

【0025】

任意の実施形態において、被験体は腫瘍を有する場合があります、P D 1 + , C D 8 + T細胞は腫瘍抗原に特異的であり得る。いくつかの実施形態では、P D 1 + , C D 8 + T細胞は、腫瘍浸潤性リンパ球であり得る。いくつかの実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、胃腸管、腎臓、腎臓細胞、膀胱、骨、骨髓、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、脾臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳、神経節、中枢神経系(C N S)及び末梢神経系(P N S)の癌、または造血系、脾臓、もしくは胸腺の癌から選択されるがんの腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、食道、咽頭、胃、小腸、大腸、結腸、または直腸の癌の腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、メラノーマ、結腸直腸癌、または腎臓癌である。

30

【0026】

任意の実施形態において、被験体はウイルス感染を有する場合があります、P D 1 + , C D 8 + T細胞は感染ウイルスの抗原に特異的であり得る。いくつかの実施形態では、ウイルスは、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス(C M V)またはヒト免疫不全ウイルス(H I V)である。

【0027】

任意の実施形態において、I L - 1 0 剤は、ヒトI L - 1 0であってもよい。

40

【0028】

任意の実施形態において、I L - 1 0 剤は、ペグ化I L - 1 0 (P E G - I L - 1 0)であってもよい。いくつかの実施形態では、P E G - I L - 1 0 は、I L - 1 0 の少なくとも1つの単量体のN末端アミノ酸残基に共有結合した少なくとも1つのP E G分子を含む。いくつかの実施形態では、P E G - I L - 1 0 は、モノP E G化I L - 1 0 及びジP E G化I L - 1 0 の混合物を含む。いくつかの実施形態では、P E G - I L - 1 0 のP E G成分は、5 k D a ~ 3 0 k D a の分子量を有する。

【0029】

任意の実施形態において、I L - 1 0 剤を被験体に皮下投与してもよい。

【0030】

50

任意の実施形態において、被験体はヒト被験体であってもよい。

【0031】

任意の実施形態において、本方法は：V T C Rポリペプチドをコードする核酸及び／またはV T C Rポリペプチドをコードする核酸を配列決定し；V T C Rポリペプチド及び／またはV T C Rポリペプチドのアミノ酸配列を決定し；V T C Rポリペプチド及び／またはV T C Rポリペプチドのアミノ酸配列を分析して、V T C Rポリペプチド及び／またはV T C Rポリペプチドの相補性決定領域（C D R）を同定することを含み得る。

【0032】

任意の実施形態において、本方法は：V 及び／またはV T C Rポリペプチドのアミノ酸配列を、I L - 1 0 剤を投与する前に疾患組織に存在するT細胞上に発現するT C RのV 及び／またはV T C Rポリペプチドのアミノ酸配列と比較することによって、単離されたP D 1 + , C D 8 + T細胞上に発現するT C Rの抗原特異性を評価することを含み得る。

【0033】

本明細書ではまた、遺伝子改変T細胞の作製方法を提供し、本方法は、上記のように、疾患抗原特異的T細胞のT C Rの可変（V）T細胞受容体及び可変（V）T C Rポリペプチドをコードするベクターの生成方法の任意の実施形態によって得られる構築物をC D 8 + T細胞に導入して、疾患抗原特異的T C RのV 及びV T C Rポリペプチド対を発現する遺伝子改変T細胞を産生することを含む。いくつかの実施形態では、V T C Rポリペプチド及びV T C Rポリペプチドは、同じまたは異なる発現構築物上の別々の発現カセットにコードされる。いくつかの実施形態では、構築物によってコードされるV T C Rポリペプチドは、そのC末端で、定常T C Rポリペプチドに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、構築物によってコードされるV T C Rポリペプチドは、そのC末端で定常T C Rポリペプチドに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、構築物は、V T C Rポリペプチド及びV T C Rポリペプチドを含む一本鎖T C R（s c T v）をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、s c T vは、N末端からC末端方向に、V T C Rポリペプチド、リンカー、及びV T C Rポリペプチドを含む。本明細書に記載の方法によって産生する遺伝子改変C D 8 + T細胞の集団もまた提供する。

【0034】

本明細書ではまた、C D 8 + T細胞療法を受け入れ可能な疾患を有する被験体の治療方法も提供し、本方法は：遺伝子改変C D 8 + T細胞を被験体に投与することを含み、前記T細胞は、被験体の疾患の抗原に特異的な疾患抗原特異的T C RのV / V 対のV T C Rポリペプチド及びV T C Rポリペプチドを有する組換えT C Rを発現するように遺伝子改変されており；前記投与は被験体の疾患の治療に有効である。いくつかの実施形態では、V T C RポリペプチドのC D R及びV T C RポリペプチドのC D Rのアミノ酸配列は、上記のように、疾患抗原特異的T細胞のT細胞受容体（T C R）のアミノ酸配列の取得方法の任意の実施形態に従って同定した。いくつかの実施形態では、V T C Rポリペプチド及びV T C Rポリペプチドのアミノ酸配列は、V T C Rポリペプチドをコードする核酸及び／またはV T C Rポリペプチドをコードする核酸を配列決定し；V T C Rポリペプチド及び／またはV T C Rポリペプチドのアミノ酸配列を決定し；ならびに、V T C Rポリペプチド及び／またはV T C Rポリペプチドのアミノ酸配列を分析して、V T C Rポリペプチド及び／またはV T C Rポリペプチドの相補性決定領域（C D R）を同定することを含む方法に従って同定した。

【0035】

任意の実施形態において、遺伝子改変T細胞のV T C Rポリペプチド及びV T C Rポリペプチドは、同じまたは異なる発現構築物の別々の発現カセットにコードされ得る。いくつかの実施形態では、構築物にコードされる遺伝子改変T細胞のV T C Rポリペプチドは、そのC末端で定常T C Rポリペプチドに作動可能に連結する。いくつかの実施

10

20

30

40

50

形態では、構築物にコードされる遺伝子改変T細胞のV T C Rポリペプチドは、そのC末端で 定常T C Rポリペプチドに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、遺伝子改変T細胞のV T C Rポリペプチド及びV T C Rポリペプチドは、V T C Rポリペプチド及びV T C Rポリペプチドを含む一本鎖T C R (s c T v) をコードする核酸を含む構築物によってコードされる。いくつかの実施形態では、s c T v は、N末端からC末端方向に、V T C Rポリペプチド、リンカー、及びV T C Rポリペプチドを含む。

【0036】

任意の実施形態において、C D 8 + T細胞療法を受け入れ可能な疾患はがんであってもよく、遺伝子改変C D 8 + T細胞の疾患抗原特異的T C Rは、がんの抗原に特異的であってもよい。いくつかの実施形態では、がんは固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、胃腸管、腎臓、腎臓細胞、膀胱、骨、骨髓、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、脾臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳、神経節、中枢神経系 (C N S) 及び末梢神経系 (P N S) の癌、または造血系、脾臓もしくは胸腺の癌である。いくつかの実施形態では、がんは、食道、咽頭、胃、小腸、大腸、結腸、または直腸の癌である。いくつかの実施形態では、がんは、メラノーマ、結腸直腸癌、または腎臓癌である。

10

【0037】

任意の実施形態において、C D 8 + T細胞療法を受け入れ可能な疾患はウイルス感染であってもよく、遺伝子改変C D 8 + T細胞の疾患抗原特異的T C Rはウイルスの抗原に特異的であり得る。いくつかの実施形態では、ウイルスは、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス (C M V) またはヒト免疫不全ウイルス (H I V) である。

20

【0038】

任意の実施形態において、本方法は、さらなる治療剤を投与することを含み得る。いくつかの実施形態では、治療剤はI L - 10剤である。いくつかの実施形態では、C D 8 + T細胞療法を受け入れ可能な疾患はがんであり、治療剤は化学療法剤である。いくつかの実施形態では、C D 8 + T細胞療法を受け入れ可能な疾患はウイルス感染であり、治療剤は抗ウイルス剤である。

【0039】

30

任意の実施形態において、投与は、複数の遺伝子改変C D 8 + T細胞を投与することを含み、ここで、複数の遺伝子改変C D 8 + T細胞には、異なる疾患抗原特異的T C Rを保有する遺伝子改変C D 8 + T細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、遺伝子改変C D 8 + T細胞は、被験体に対して自己由来である。

【0040】

他の実施形態は、本開示の教示に基づいて当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】パネルA ~ Dは、i n v i t r oで試験した場合のマウスC D 8 + T細胞機能 (パネルA ~ B) 及びヒトC D 8 + T細胞機能 (パネルC ~ D) に対するI L - 10の効果を示す。

40

【図2】腫瘍抗原特異的腫瘍内C D 8 + T細胞 (腫瘍浸潤性リンパ球、または「T I L」とも呼ばれる) に対する、6日間 (パネルA) 、10日間 (パネル B) 、または15日間 (パネルC) の、腫瘍保有マウスの治療効果を示す。

【図3】P D 1陽性であるI F N 陽性C D 8 + T細胞腫瘍浸潤性リンパ球 (T I L) の割合に対する腫瘍保有マウスの長期I L - 10治療 (21 ~ 28日) の効果を示す。

【図4】I L - 10単独療法に部分奏功を示したメラノーマ患者の末梢から採取したP D 1 + C D 8 + T細胞上 (パネルA) 、及びI L - 10単独療法に部分奏効を示したR C C患者の末梢から採取したP D 1 + C D 8 + T細胞上 (パネルB) のC D 45 R Oの発現を図示する。

50

【図 5】指示された AM0010 の一日量を投与した後の患者の腫瘍縮小効果、及びがん患者の末梢血における増大及び収縮した T 細胞クローンの相対的数を示す。治療後の括弧内に示す日に、患者の腫瘍縮小効果を分析した。治療後の、示した日に存在する T 細胞クローンを、AM0010 を投与する前の 1 日目の前と比較することによって分析した。Me1 = メラノーマ；CRC = 結腸直腸癌；RCC = 腎細胞癌；PD = 進行；SD = 安定；PR = 部分奏効。「抗 PD1 mAb」= 抗 PD1 モノクローナル抗体。

【図 6】PEG-rHuIL-10 単剤療法後に進行性疾患を示した（パネル A）か、または少なくとも部分奏効を示した（パネル B）腎細胞癌患者における末梢 T 細胞の評価結果を示す。

【図 7】IL-10 剤で治療した被験体から採取した PD1+，CD8+ 疾患抗原特異的 T 細胞の製造の概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0042】

[詳細な説明]

本開示をさらに説明する前に、本開示は本明細書に記載の特定の実施形態に限定されるものでないことは理解されたく、また、本明細書中で使用する用語は、単に特定の実施形態を説明するためのものに過ぎず、これに限定することを意図するものでないことも理解されたい。

【0043】

ある範囲の値が提供される場合、その範囲の上限と下限との間で、明示的に別段の定めがない限り、下限の単位の 10 分の 1 までの各介在値と、その記載する範囲内の任意の他の指定値、または介在値は、本発明に包含される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、独立して、より小さい範囲に含むことができ、記載する範囲内の特定の除外される境界を条件として、本発明に包含される。記載する範囲が境界の一方または両方を含む場合、その含まれる境界の一方または両方を除外した範囲も本発明に含まれる。他に特段の定めのない限り、本明細書中で使用するすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0044】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈上他に明確に指示されない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。請求項は任意の要素を排除するように作成し得ることにさらに留意されたい。したがって、この記述は、請求項要素の詳述に関連して、そのような排他的な用語、例えば「専ら」、「単なる」などを使用するための、または「否定的な」制限を使用するための前提として用いられることを意図している。

【0045】

本明細書中に記載する刊行物は、本願の出願日前のそれらの開示についてのみ提供される。さらに、提示する公開日は、実際に公開された日付とは異なる場合があり、個別に確認する必要がある場合がある。

【0046】

[概要]

CAR-T T 細胞療法などの遺伝子改変 CD8+ T 細胞による治療は、例えばがん関連（例えば B 細胞及び T 細胞リンパ腫）ならびに免疫関連悪性腫瘍の治療のための治療的アプローチである。CAR-T T 細胞には、一般的に、例えば関心対象の腫瘍上に存在する既知の抗原に特異的な組換え T 細胞受容体を発現するように遺伝子改変した患者由来記憶 CD8+ T 細胞が含まれる。本開示は、がんの治療のために CAR-T 細胞療法を用いることに関連して一般的に記載しているが、そのような療法はまた、他の適応症、例えばウイルス感染（例えば、HBV、HCV、HIV、CMV）の治療にも利用できることを理解されたい。

【0047】

CAR-T T 細胞療法の開発における 1 つの課題は、遺伝子改変 CD8+ T 細胞の TC

10

20

30

40

50

Rの所望の抗原特異性を提供するための、CAR-Tポリペプチドに用いるV/VTCRペアの適切な可変(V)及び可変(V)TCRポリペプチドの同定である。

【0048】

本明細書中に記載するように、PEG-IL-10によるがん患者の治療により、腫瘍抗原特異的PD1+CD8+T細胞の末梢血における蓄積が生じる。この現象は、グランザイムB+、CD8+腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)の増加に付随して起こる。PEG-IL-10によるがん患者の治療により、細胞傷害性腫瘍抗原特異的CD8+T細胞の蓄積が生じる。この集団のうち、PD1+mid~PD1+high末梢CD8+T細胞は、腫瘍関連抗原及び特異的抗原を認識するユニークなTCR配列を表す。PEG-IL-10による治療に应答してがん患者から単離されたこれらの細胞は、腫瘍(例えば固形腫瘍)に対して、マウス腫瘍モデルからのモデル化では達成し得ない高親和性成熟選択TCR配列を提供する。同じ腫瘍徴候及び同じMHCハプロタイプにおけるPEG-IL-10による治療(単剤療法として、または免疫チェックポイント療法及び/または化学療法との併用で)によって生成する配列を調べることにより、現時点では未知の腫瘍抗原に特異的で、生産的な抗腫瘍免疫応答を誘発可能なV/VTCRペアが得られるであろう。

10

【0049】

本開示は、IL-10剤による治療後の患者由来の疾患抗原特異的CD8+T細胞の生成及び単離方法、ならびにそのような疾患抗原特異的CD8+T細胞のTCRのV/VTCRペアの、可変(V)及び可変(V)TCRポリペプチド、及び/または可変(V)及び可変(V)TCRポリペプチドのCDRのアミノ酸配列の同定方法を提供する。いくつかの実施形態では、抗原特異的CD8+T細胞は、PD1+でもある末梢CD8+T細胞である。コード核酸及び/またはそこから得られる情報は、そのようなV/VTCRペアをコードする個々の構築物及び/または構築物のライブラリーを作製するために用いることができる。そのような核酸及び/またはそれらから得られる情報を用いて、そのようなV/VTCRポリペプチド対(またはそのようなV/VTCRポリペプチドの少なくともCDR)を含む組換えTCRを発現する遺伝子改変CD8+T細胞を産生することができ、ここで、組換えTCRは、例えばリンカーを介してVポリペプチドに作動可能に連結したVポリペプチドを含む単鎖T細胞受容体(scTv)を含むCAR-Tであり得る。本開示はさらに、がん患者及び/またはCD8+T細胞療法を受け入れ可能な疾患を有する患者、例えば慢性的なウイルス感染患者(例えば、HBV感染患者)の治療方法を企図する。

20

30

【0050】

[定義]

他に特段の指示がない限り、以下の用語は以下に示す意味を有することを意図するものとする。他の用語は、本明細書中の別の箇所において定義される。

【0051】

用語「患者」または「被験体」は、同じ意味で用いられ、ヒトまたは非ヒト動物(例えば、哺乳類)を指す。

【0052】

用語「投与」、「投与する」などは、それらを、例えば、被験体、細胞、組織、器官、または生物学的液体に対して用いる場合、例えばIL-10もしくはPEG-IL-10)、核酸(例えば、天然ヒトIL-10をコードする核酸);上記のものを含む医薬組成物、または、被験体、細胞、組織、器官、もしくは生物学的液体に対する診断薬の接触を指す。細胞との関連で、投与は、細胞に対する試薬の接触(例えば、in vitroまたはex vivoでの)、ならびに細胞と接触している流体への試薬の接触を含む。

40

【0053】

用語「治療する」、「治療すること」、「治療」などは、診断、観察などがなされている疾患、障害もしくは病態、またはその徴候の後に開始する一連の行為(IL-10またはIL-10を含む医薬組成物の投与など)を指し、被験体が患っている疾患、障害もしくは

50

は病態の根本原因の少なくとも1つ、または被験体が患っている疾患、障害、病態に関連する症状の少なくとも1つを、一時的にもしくは永久に、排除、低減、抑制、緩和もしくは改善する。したがって、治療には、活動性疾患を阻害すること（例えば、疾患、障害または病態の発症もしくはさらなる進展、またはその臨床症状との連関を阻止すること）が含まれる。これらの用語は、IL - 10またはPEG - IL - 10が、他の状況、例えば、液相またはコロイド相においてIL - 10受容体と接触する状況下でも使用され得る。

【0054】

本明細書中で使用する用語「治療を必要とする」とは、医師または他の介護者によってなされる、被験体が治療を必要とするか、または治療から恩恵を受けるであろうとの判断を指す。この判断は、医師または介護者の専門知識の領域にある様々な要因に基づいてなされる。

10

【0055】

用語「予防する」、「予防すること」、「予防」などは、一般的に、特定の疾患、障害または病態にかかりやすい被験体に関して、被験体の疾患、障害、病態などの発症リスクを、一時的にまたは永続的に、予防、抑制、阻害または軽減する（例えば、臨床症状がないことによって判定する）か、またはその発症を遅らせるために、ある様式で（例えば、疾患、障害、病態またはその症状の発症前に）開始する一連の行為（例えば、IL - 10またはIL - 10を含む医薬組成物の投与）を指す。場合により、本用語はまた、疾患、障害または病態の、有害な病態または望ましくない病態への進行を遅らせるか、またはその進行を抑制することを指す。

20

【0056】

本明細書中で使用する用語「予防を必要とする」とは、医師または他の介護者によってなされる、被験体が予防的ケアを必要とするか、または予防的ケアから恩恵を受けるであろうとの判断を指す。この判断は、医師または介護者の専門知識の領域にある様々な要因に基づいてなされる。

【0057】

語句「治療有効量」とは、単独または医薬組成物の一部として、単回用量または連続用量のいずれかで、被験体に投与する場合に、疾患、障害または病態の任意の症状、態様、または特徴に対して任意の検出可能な、プラスの効果を有し得る量で、被験体に薬剤を投与することを指す。治療有効量は、関連する生理学的効果を測定することによって確認することができ、投与レジメン及び被験体の病態の診断分析などに関連して調整することができる。例えば、投与後に産生される炎症性サイトカインの量の測定値を、治療有効量が使用されたかどうかの指標とすることができる。

30

【0058】

語句「変化を起こすのに十分な量で」とは、特定の治療の投与前（例えば、ベースラインレベル）及び投与後に測定する指標のレベルの間に検出可能な差があることを意味する。指標は、任意の客観的パラメータ（例えば、IL - 10の血清濃度）または主観的パラメータ（例えば、被験体の幸福感）を含む。

【0059】

いくつかの実施形態における本開示は、フローサイトメトリーを用いたマーカー、例えば、細胞表面マーカーの発現の分析を含む。マーカー特異的試薬（例えば、蛍光標識抗体）による染色後の、フローサイトメトリーによって評価する検出可能な標識（例えば、蛍光）の相対強度に基づいて、細胞を「陽性」または「陰性」として分類することができる。一般的に、二峰性に分布するマーカー、例えばCD8、PD1、IFN、CD45RO、グランザイムB、パーフォリンなどの染色において容易に識別できる差異に基づくそれらの発現レベルに従って細胞を区別する。いくつかの実施形態では、すべての細胞について、マーカー染色の頻度分布が得られ、集団曲線を、より高い染色及びより低い染色集団にフィッティングし、それぞれの集団分布の統計分析の観点から最も統計的に属する可能性の高い集団に細胞を割り当てる。いくつかの実施形態では、マーカー染色の頻度分布はすべての細胞について得られ、集団曲線を、より高い染色、中間レベルの染色、及びより

40

50

低い染色集団にフィッティングし、それぞれの集団分布の統計分析の観点から最も統計的に属する可能性の高い「高」、「中」、及び/または「低」集団に細胞を割り当てる。T細胞を+及び-カテゴリー、ならびに「高」、「中」及び/または「低」カテゴリーに分離する方法は、当業者に公知である。

【0060】

したがって、例えば、本開示は、T細胞上のPD1発現の分析を企図する。T細胞は、PD1(CD279としても知られる)細胞表面発現の実質的に二峰性の分布を示し、ここで、PD1細胞表面発現のより高いピーク周辺の細胞を、「PD1 high」(または「PD1+」)として分類してもよく、PD1細胞表面発現のより低いピーク周辺の細胞を、「PD1 low」(または「PD1-」)として分類してもよい。活性化CD8+T細胞を含むCD8+T細胞の集団はまた、PD1 high細胞とPD1 low細胞との間に細胞の中間集団(「PD1 mid」)を含む場合があり、ここで、PD1 mid細胞は、PD1 low細胞より高いがPD1 high細胞より低いレベルのPD1細胞表面発現を有する。したがって、関心対象の活性化CD8+T細胞は、PD1の中間(「mid」)～高レベルの細胞表面発現(「PD1 mid-high」)を有し得る。言い換えれば、活性化CD8+T細胞は、細胞表面上に低いPD1発現を有さない(すなわち、「PD1 low」ではない)CD8+T細胞の集団であり得る。

【0061】

本明細書中で使用する場合、「PD1 mid」は、細胞集団中のPD1発現の最低レベル(「PD1 low」)の少なくとも約100～150倍であり、細胞集団中のPD1発現の最高レベル(「PD1 high」)の約1/3未満であるようなPD1の細胞表面発現レベルを指し、ここで、細胞表面PD1発現はフローサイトメトリーによって検出する。例えば、「PD1 mid」細胞は、およそ3000のフローサイトメトリーによる平均チャネル蛍光検出をもたらす細胞表面PD1のレベルを発現する場合があり、一方、低いPD1発現(「PD1 low」)は、およそ200の平均チャネル蛍光検出で表され、高いPD1発現(「PD1 high」)は、およそ9000の平均チャネル蛍光検出で表される。「PD1 low」細胞は、PD1+またはPD1のいずれかとして細胞を特徴付ける場合、「PD1 low」はPD1陰性(「PD1-」)であるとみなされることに留意すべきである。

【0062】

用語「小分子」とは、約10 kDa未満、約2 kDa未満、または約1 kDa未満の分子量を有する化合物を指す。小分子は、無機分子、有機分子、無機成分を含む有機分子、放射性原子を含む分子、及び合成分子を含むが、これらに限定されない。治療的には、小分子は細胞に対してより透過性であり、分解の影響を受けにくく、大分子よりも免疫応答を誘発しにくい。

【0063】

用語「リガンド」とは、受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することができる分子またはその複合体を指す。用語「リガンド」は、天然及び合成リガンド、例えば、サイトカイン、サイトカイン変異体、類似体、ムテイン、ならびに抗体由来の結合組成物を包含する。用語「リガンド」はまた、小分子、例えば、サイトカインのペプチド模倣物及び抗体のペプチド模倣物も包含する。本用語はまた、アゴニストでもアンタゴニストでもないが、その生物学的特性、例えばシグナル伝達または接着に有意に影響を及ぼすことなく受容体に結合することができる薬剤を包含する。用語「リガンド」はまた、例えば、化学的方法または組換え方法によって、膜結合リガンドの可溶性バージョンに変更された膜結合リガンドも含む。受容体は細胞内に存在することができ、すなわち細胞質、核、またはその他の細胞内区画に存在するか、または会合し、細胞膜を潜在的に横断し、さらに細胞膜の細胞内表面にリガンド結合部位を有することができる。リガンドと受容体との複合体は、「リガンド-受容体複合体」と呼ばれる。

【0064】

用語「阻害剤」及び「アンタゴニスト」、または「アクチベーター」及び「アゴニスト」

とは、それぞれ阻害分子または活性化分子、例えばリガンド、受容体、補因子、遺伝子、細胞、組織、または器官を指す。阻害剤は、生体分子、例えば、遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体、または細胞の活性を、低減、遮断、抑止、遅延活性化、不活性化、脱感作、または下方制御する分子である。アクチベーターは、生体分子、例えば遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体、または細胞の活性を増加、活性化、促進、活性化の増強、感作、または上方制御する分子である。阻害剤はまた、構成的活性を、低減、抑止、または不活性化する分子として定義され得る。「アゴニスト」は、標的と相互作用して標的の活性の増加を引き起こすか、または促進する分子である。「アンタゴニスト」は、アゴニストの作用（複数可）に対抗する分子である。アンタゴニストは、アゴニストの活性を抑止、低減、阻害、または中和し、アンタゴニストはまた、同定したアゴニストが存在しない場合でさえ、標的（例えば、標的受容体）の構成的活性を、抑止、阻害、または低減することができる。

10

【 0 0 6 5 】

用語「調節する」、「調節」などは、単独で、または他の因子と組み合わせて、他の生体分子の機能または活性を、直接的または間接的に、調節、増加または減少させる分子の能力を指す。用語「モジュレーター」は、上記の活性を調節可能な分子を広く指すことを意味する。例えば、遺伝子、受容体、リガンド、または細胞のモジュレーターは、遺伝子、受容体、リガンド、または細胞の活性を変化させる分子であり、活性を、活性化、阻害するか、またはその調節特性を変化させることができる。モジュレーターは単独で作用可能であるか、または補因子、例えばタンパク質、金属イオン、または小分子を使用することができる。

20

【 0 0 6 6 】

分子の「活性」とは、例えば：（a）リガンドまたは受容体への分子の結合；（b）その受容体に結合した場合の触媒活性へのリガンドの応答レベル；（c）遺伝子発現または細胞シグナル伝達、分化または成熟を刺激する能力；（d）抗原活性；及び／または（e）他の分子の活性の調節を説明するものであるか、またはそれらを指し得る。本用語はまた、細胞間相互作用（例えば、接着）を調節または維持する活性、または細胞の構造（例えば、細胞膜）を維持する活性を指し得る。「活性」はまた、[触媒活性] / [mg タンパク質]、または[免疫学的活性] / [mg タンパク質]、生物学的区画内の濃度などの比活性を意味し得る。用語「増殖活性」は、例えば細胞分裂を、促進するか、それに必要であるか、またはそれに特異的に関連する活性を包含する。

30

【 0 0 6 7 】

本明細書中で使用する場合、「同等」、「同等の活性」、「～と同等の活性」、「同等の効果」、「～と同等の効果」、「同様の」及び「実質的に同様の」は、定量的及び／または定性的に観ることが可能な比較用語である。本用語の意味は、多くの場合、それらを使用する文脈に依存する。一例として、受容体を活性化する2つの薬剤は、定性的観点からは同等の効果を有すると見なすことができるが、一方の薬剤が、当技術分野で一般に受け入れられているアッセイ（例えば、用量反応アッセイ）または当技術分野で一般に受け入れられている動物モデルにおいて測定する他の薬剤の活性の20%を達成可能であるに過ぎない場合に、2つの薬剤は、定量的な観点からは同等の効果がないと見なすことができる。1つの結果を別の結果と比較する（例えば、1つの結果を参照標準と比較する）場合、「同等の」とは、多くの場合、1つの結果が参照標準から、35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、7%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、または1%未満ずれていることを意味する。特定の実施形態では、1つの結果が参照標準から、15%未満、10%未満、または5%未満ずれている場合に、参照標準と同等である。一例として、限定するものではないが、活性または効果は、有効性、安定性、溶解性、または免疫原性を意味し得る。

40

【 0 0 6 8 】

例えば、細胞、組織、器官、または生物の用語「応答」は、例えば、生物学的区画内の濃度、密度、接着、または移動などの生化学的挙動または生理学的挙動の変化、遺伝子の発

50

現速度、または分化の状態を包含し、ここで、その変化は、活性化、刺激、もしくは治療、または遺伝的プログラミングのような内部機構と相関する。特定の状況において、用語「活性化」、「刺激」などは、内部機構、ならびに外部または環境因子によって調節される細胞活性化を指し；一方、用語「阻害」、「下方制御」などは、反対の効果を指す。

【0069】

本明細書中において同じ意味で用いられる用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」とは、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。ポリペプチドは、遺伝的にコードされた及び非遺伝的にコードされたアミノ酸、化学的に修飾されたアミノ酸、及び修飾されたポリペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る。ポリペプチドの例として、限定するものではないが、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質を含む融合タンパク質；異種及び同種のリーダー配列を有する融合タンパク質；N末端メチオニン残基を有するかまたは有さない融合タンパク質；免疫学的に標識されたタンパク質との融合タンパク質；などが挙げられる。

【0070】

本開示を通して、一文字または三文字コードに従って遺伝的にコード化されたL-アミノ酸が参照されることが理解されよう。読者の便宜のために、以下の1文字及び3文字のアミノ酸コードを提供する：

G	グリシン	G l y	P	プロリン	P r o
A	アラニン	A l a	V	バリン	V a l
L	ロイシン	L e u	I	イソロイシン	I l e
M	メチオニン	M e t	C	システイン	C y s
F	フェニルアラニ	P h e	Y	チロシン	T y r
W	トリプトファン	T r p	H	ヒスチジン	H i s
K	リジン	L y s	R	アルギニン	A r g
Q	グルタミン	G l n	N	アスパラギン	A s n
E	グルタミン酸	G l u	D	アスパラギン酸	A s p
S	セリン	S e r	T	スレオニン	T h r

【0071】

本明細書中で使用する場合、用語「変異体」は、天然型の変異体及び非天然型の変異体を包含する。天然型の変異体には、相同体（ある種と別の種とで、アミノ酸またはヌクレオチド配列がそれぞれ異なるポリペプチド及び核酸）、及び対立遺伝子変異体（種内のある個体と別の個体とで、アミノ酸またはヌクレオチド配列がそれぞれ異なるポリペプチド及び核酸）が含まれる。非天然型の変異体には、それぞれ、アミノ酸またはヌクレオチド配列を変化させたポリペプチド及び核酸が含まれ、ここで、配列の変化は人為的に導入される（例えば、ムテイン）。例えば、変化は、実験室で人間の介入によって生成される（「人工的に」）。用語「ムテイン」とは、単一または複数のアミノ酸置換によって改変されたタンパク質を指す。ムテインは、多くの場合、部位特異的またはランダム突然変異誘発に供してクローニングした遺伝子、または完全に合成した遺伝子に由来する。

【0072】

用語「DNA」、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」などは、本明細書中では同じ意味で用いられ、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはその類似体の任意の長さのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドの非限定的な例には、直鎖及び環状核酸、メッセンジャーRNA（mRNA）、相補DNA（cDNA）、組換えポリヌクレオチド、ベクター、プローブ、プライマーなどが含まれる。

【0073】

本明細書中でポリペプチドの構造に関して用いる場合、用語「N末端（N-terminus）」（または「アミノ末端（amino terminus）」）及び「C末端（C-terminus）」（または「カルボキシル末端（carboxyl terminus）」）とは、それぞれ、ポリペプチドのアミノ及びカルボキシ最末端を指し、一方、

10

20

30

40

50

用語「N末端の(N-terminal)」及び「C末端の(C-terminal)」とは、それぞれ、ポリペプチドのN末端及びC末端に向かったのポリペプチドのアミノ酸配列における相対的な位置を指し、それぞれ、N末端及びC末端の残基を含み得る。「すぐN末端側の」または「すぐC末端側の」とは、第一及び第二のアミノ酸残基が共有結合して連続アミノ酸配列を提供する場合の、第二のアミノ酸残基に対する第一のアミノ酸残基の位置を指す。

【0074】

ポリペプチド及び核酸に関して使用する場合、用語「由来する」とは、参照ポリペプチドまたは核酸に由来するアミノ酸またはヌクレオチド配列を含むポリペプチドまたは核酸（例えば、天然型ポリペプチドまたは核酸）を指し、参照分子の供給源にも、参照分子を改変した方法にも限定されない。一例として、用語「由来する」は、参照アミノ酸またはDNA配列の相同体または変異体を含む。

10

【0075】

ポリペプチドまたは核酸に関して、用語「単離された」とは、天然型の場合、天然に存在し得る環境とは異なる環境にある、関心対象のポリペプチドまたは核酸を指す。「単離された」とは、関心対象のポリペプチドが実質的に富化されている、及び/または関心対象のポリペプチドが部分的または実質的に精製されている試料内のポリペプチドまたは核酸を含むことを意味する。ポリペプチドが非天然型の場合、「単離された」とは、ポリペプチドが、合成または組換えのいずれかの手段によって作製した環境から分離されていることを示す。

20

【0076】

「富化された」とは、関心対象の分子が、a) 開始時の試料中の関心対象の分子の濃度より高い濃度（例えば、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも64倍、またはそれ以上）で存在するように、試料を非天然に操作する（例えば、科学者によって）ことを意味する。開始時の試料は、生体試料（例えば、試料中に関心対象の分子が天然に存在するか、または投与後に関心対象の分子が存在する試料）であるか、または関心対象の分子の濃度が環境より高い由来元に由来するもの（例えば、ポリペプチドを発現する組換え細菌細胞由来のもの）であってもよい。

【0077】

用語「実質的に純粋な」とは、関心対象の成分を含む組成物であって、関心対象の成分（例えば、ポリペプチド）が組成物の全量の約50%超、一般的には、組成物の全量の約60%超を構成する組成物を指す。より一般的には、「実質的に純粋な」とは、全組成物の少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、またはそれ以上が関心対象の成分である組成物を指す。いくつかの場合には、関心対象の成分は、組成物の全量の約90%超、または約95%超を構成するであろう。

30

【0078】

本明細書中で使用する場合、用語「特異的に結合する」または「選択的に結合する」とは、リガンドとその受容体、抗体とその抗原、または他の結合対との相互作用を指す。選択的結合を使用して、異種混合物中のリガンドの存在を示し得る。したがって、指定の条件下で、リガンドはその受容体に選択的に結合すると考えられ、リガンドはその受容体に結合し、異種混合物中の他の成分には実質的に結合しない。免疫グロブリンに関して、抗原に選択的に結合する免疫グロブリンは、その抗原、またはその変異体もしくはムテインに対して、任意の他の抗原よりも少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、または少なくとも100倍高い親和性で結合する。特定の実施形態では、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンは、例えば、Scatchard分析による測定において、約 10^9 L/mol 超の親和性を有する(Munsen, et al., 1980 Analyt. Biochem. 107: 220-239)。

40

【0079】

本開示のポリペプチド及び核酸分子に関連する「ヒト」への任意の言及は、ポリペプチドまたは核酸の取得方法またはその由来元に関して限定することを意味するものではなく、

50

むしろ、天然型のアイソフォームを含む天然型ヒトポリペプチドまたは核酸分子の配列に対応し得ることから、その配列に関してのみの言及であることに留意すべきである。

【 0 0 8 0 】

本明細書中で使用する「～上に発現する」とは、通常、細胞内での、細胞部分、もしくはその前駆体の産生の結果として、細胞の表面上に存在する細胞部分（例えば、タンパク質またはその複合体）、及び細胞部分、もしくはその前駆体の、細胞膜の外表面への移行を記載するために使用され得る。

【 0 0 8 1 】

「プログラム細胞死タンパク質 1」または「PD1」とは、リンパ球のサブセットで発現する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞表面受容体を指し、CD279としても知られている。ヒトPD1（遺伝子ID：5133）は、PDCD1遺伝子によってコードされる。

10

【 0 0 8 2 】

「CD45RO」とは、リンパ球のサブセットで発現する受容体型タンパク質チロシンホスファターゼファミリーメンバーであるCD45のアイソフォームを指す。CD45の他のアイソフォームには、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RAB、CD45RAC、CD45RBC、及びCD45R(ABC)が含まれる。CD45ROは、他のアイソフォームよりも短く、RA、RB及びRCとして知られるCD45エクソンを欠くCD45のアイソフォームである。ヒトCD45（遺伝子ID：5788）は、PRPRC遺伝子によってコードされる。

20

【 0 0 8 3 】

本明細書中で使用する場合、「抗原特異的T細胞」及び「抗原に特異的なT細胞」とは、可変領域を含有する 及び ポリペプチド鎖などのTCRポリペプチドの構造により、抗原に特異的に結合するT細胞受容体（TCR）を、その細胞表面上に発現するT細胞を指す。TCRが抗原に特異的であるT細胞は、成熟中にTCRゲノム遺伝子座の組換えを受けてもよく、及び/または遺伝子改変して1つ以上のTCRポリペプチドまたは改変TCR様受容体（キメラ抗原受容体など）を発現してもよい。

【 0 0 8 4 】

「疾患抗原」または「疾患関連抗原」とは、免疫応答、例えば、T細胞を介した免疫応答を誘発するエピトープ（例えば、抗原性ペプチド、脂質、多糖類、核酸など）を指す。疾患が腫瘍である場合、腫瘍抗原または腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞上に発現するエピトープであり得る。腫瘍抗原は腫瘍細胞に特有のものであり、体内の他の細胞、特に同じ系統の細胞には通常発現しない。いくつかの場合には、腫瘍抗原は、体の他の細胞で通常発現するエピトープであり得るが、非腫瘍の状況では免疫応答を誘導しない。腫瘍抗原は、免疫系が未成熟で応答できない胎児発育中に正常細胞上に一般的に発現する1つ以上のエピトープを有し得る。腫瘍抗体は、通常、正常細胞上では非常に低いレベルで存在するが、腫瘍細胞上では有意に高いレベルで発現する1つ以上のエピトープを有し得る。

30

【 0 0 8 5 】

[疾患抗原特異的CD8+T細胞の作製方法の概要]

本開示は、一実施形態では、IL-10剤療法で治療可能な疾患を有する患者の末梢における疾患抗原特異的CD8+T細胞の増殖の誘導方法を提供し、本方法は、そのような疾患抗原特異的CD8+T細胞の誘導を誘発するのに有効な量のIL-10剤を患者に投与し、患者から疾患抗原特異的CD8+T細胞を採取する（例えば、末梢血試料などの患者の組織試料中のCD8+T細胞）。したがって、本開示は、IL-10剤、IL-10剤の製造方法、疾患抗原特異的CD8+T細胞の産生及びIL-10剤療法のための投薬レジメン、疾患抗原特異的CD8+T細胞の産生方法、そのようなT細胞のTCRの分析、TCR 及び 配列及び核酸のライブラリーの作製、そのようなT細胞のTCRの抗原特異性の分析、そのようなT細胞の疾患抗原特異的TCRのTCR 及び 配列を有する組換えTCRを発現する遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T）の産生、遺伝子改変T細胞組成物、ならびにそれらの製造方法及び治療における使用法、ならびに医薬組成物及び

40

50

キットを提供する。いくつかの実施形態では、抗原特異的CD8+T細胞は、PD1+でもある末梢CD8+T細胞である。これらの本開示の特徴を以下に説明する。

【0086】

[IL-10剤(例えば、PEG-IL-10)]

ヒトサイトカイン合成阻害因子(CSIF)としても知られる抗炎症性サイトカインIL-10は、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24(Mda-7)、及びIL-26、インターフェロン(IFN-、-、-、-、-、-、-、及び-)ならびにインターフェロン様分子(リミチン、IL-28A、IL-28B、及びIL-29)を含むサイトカインのセットであるタイプ(クラス)-2サイトカインに分類される。

10

【0087】

IL-10は、免疫調節及び炎症において多面的効果を有するサイトカインである。IL-10は、肥満細胞によって産生され、これらの細胞がアレルギー反応の部位で有する炎症作用を打ち消す。IL-10は、IFN-、IL-2、IL-3、TNF及びGM-CSFなどの前炎症性サイトカインの合成を阻害することができるが、IL-10は、T細胞及び肥満細胞に対しても刺激性であり、B細胞の成熟、増殖及び抗体産生を刺激する。IL-10は、NF- κ B活性を抑止することができ、JAK-STATシグナル伝達経路の調節に関与する。IL-10はまた、CD8+T細胞の細胞傷害活性及びB細胞の抗体産生を誘導し、マクロファージ活性及び腫瘍促進性炎症を抑制する。CD8+T細胞の調節は用量依存性であり、より高い用量は、より強い細胞傷害性応答を誘導する。

20

【0088】

ヒトIL-10は37kDaの分子量を有するホモダイマーであり、各18.5kDaモノマーは178個のアミノ酸を含み、その最初の18個はシグナルペプチドを含み、2個のシステイン残基は2個の分子内ジスルフィド結合を形成する。IL-10二量体は、2つの単量体サブユニット間の非共有相互作用の破壊により生物学的に不活性になる。

【0089】

本開示は、80%の相同性を示すヒトIL-10(NP_000563)及びマウスIL-10(NP_034678)及びその使用を意図する。さらに、本開示の範囲は、ラット(受託番号NP_036986.2;GI148747382);ウシ(受託番号NP_776513.1;GI41386772);ヒツジ(受託番号NP_001009327.1;GI57164347);イヌ(受託番号ABY86619.1;GI166244598);及びウサギ(受託番号AAC23839.1;GI3242896)を含む他の哺乳動物種由来のIL-10オースログ及びその修飾形態を含む。

30

【0090】

用語「IL-10」、「IL-10ポリペプチド(複数可)」、「IL-10分子(複数可)」、「IL-10剤(複数可)」などは、広義に解釈することが意図され、例えば、ホモログ、変異体(ムテインを含む)、及びその断片を含むヒト及び非ヒトIL-10関連ポリペプチド、ならびに例えばリーダー配列(例えば、シグナルペプチド)、及び前記の改変バージョンを有するIL-10ポリペプチドを含む。さらなる特定の実施形態では、IL-10、IL-10ポリペプチド(複数可)、及びIL-10剤(複数可)はアゴニストである。

40

【0091】

IL-10受容体、II型サイトカイン受容体は、及びサブユニットからなり、これらはそれぞれR1及びR2とも呼ばれる。受容体の活性化には、との両方に結合する必要がある。IL-10ポリペプチドの1つのホモダイマーはに結合し、同じIL-10ポリペプチドの他のホモダイマーはに結合する。

【0092】

組換えヒトIL-10の有用性は、腎クリアランス、タンパク質分解及び血流中での単量体化などに起因し得るその比較的短い血清半減期によってしばしば制限される。結果として、その二量体構造を破壊せず、その活性に悪影響を及ぼすことなく、IL-10の薬物

50

動態特性を改善するための様々なアプローチが検討されている。IL - 10 のペグ化は、特定の薬物動態パラメータ（例えば、血清半減期）の改善及び/または活性の増強をもたらす。

【0093】

本明細書中で使用する場合、用語「ペグ化 IL - 10」及び「PEG - IL - 10」とは、IL - 10 タンパク質の少なくとも1つのアミノ酸残基に、一般的にリンカーを介して共有結合し、それにより結合が安定するようにした1つ以上のポリエチレングリコール分子を有する IL - 10 分子を指す。用語「モノペグ化 IL - 10」及び「モノ - PEG - IL - 10」は、1つのポリエチレングリコール分子が IL - 10 二量体の1つのサブユニット上の単一アミノ酸残基に、一般的にリンカーを介して共有結合していることを示す。本明細書中で使用する場合、用語「ジペグ化 IL - 10」及び「ジ - PEG - IL - 10」は、少なくとも1つのポリエチレングリコール分子が IL - 10 二量体の各サブユニット上の単一残基に、一般的にリンカーを介して結合していることを示す。

10

【0094】

特定の実施形態では、本開示で使用する PEG - IL - 10 は、IL - 10 二量体の1つのサブユニットのN末端のアミノ酸残基の アミノ基に、1～9個のPEG分子がリンカーを介して共有結合しているモノ - PEG - IL - 10 である。1つの IL - 10 サブユニット上のモノペグ化は、通常、サブユニットシャッフリングに起因する非ペグ化、モノペグ化及びジペグ化 IL - 10 の異種混合物を生じる。さらに、ペグ化反応を完了まで進行させることは、一般的に、非特異的かつ多ペグ化された IL - 10 をもたらし、その生物活性を低下させる。したがって、本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載の方法によって生成したモノペグ化 IL - 10 及びジペグ化 IL - 10 の混合物の投与を含む。

20

【0095】

特定の実施形態では、PEG部分の平均分子量は、約5 kDa～約50 kDaである。IL - 10 へのPEG結合の方法または部位は重要ではないが、特定の実施形態において、ペグ化は、IL - 10 剤の活性を変化させないか、または最小限しか変化させない。特定の実施形態では、半減期の増加は、生物学的活性の任意の減少より大きい。PEG - IL - 10 の生物学的活性は、米国特許第7,052,686号に記載のように、通常、細菌抗原（リポ多糖類（LPS））でチャレンジした被験体の血清中の炎症性サイトカイン（例えば、TNF - またはIFN - ）のレベルを評価し、PEG - IL - 10 で処置することによって測定する。

30

【0096】

IL - 10 変異体は、血清半減期の増加、IL - 10 に対する免疫応答の低下、精製または調製の促進、IL - 10 からその単量体サブユニットへの変換の低減、治療有効性の向上、及び治療使用中の副作用の重篤度または発生の軽減を含む、様々な目的を考慮して調製することができる。アミノ酸配列変異体は、天然には見出されない所定の変異体であるが、翻訳後変異体、例えばグリコシル化変異体であることもあり得る。IL - 10 の任意の変異体は、それが適切なレベルの IL - 10 活性を保持するならば使用可能である。

【0097】

語句「保存的アミノ酸置換」とは、タンパク質のアミノ酸（複数可）を、類似の酸性、塩基性、電荷、極性、または側鎖サイズを有する側鎖を含むアミノ酸で置換することによってタンパク質の活性を保存する置換を指す。保存的アミノ酸置換は、一般的に、以下の群のアミノ酸残基の置換を伴う：1）L、I、M、V、F；2）R、K；3）F、Y、H、W、R；4）G、A、T、S；5）Q、N；及び6）D、E。置換、挿入または欠失の指針は、異なる変異型タンパク質または異なる種由来のタンパク質のアミノ酸配列のアラインメントに基づき得る。したがって、任意の天然型 IL - 10 ポリペプチドに加えて、本開示は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の、通常20、10、または5個以下のアミノ酸置換を有することを意図しており、ここで、置換は、多くの場合、保存的アミノ酸置換である。

40

【0098】

50

本開示はまた、成熟 I L - 10 に由来する連続アミノ酸残基を含む成熟 I L - 10 の活性断片（例えば、部分配列）を企図する。ペプチドまたはポリペプチド部分配列の連続アミノ酸残基の長さは、部分配列が由来する特定の天然型アミノ酸配列に応じて様々に異なる。一般的に、ペプチド及びポリペプチドは、約 20 アミノ酸～約 40 アミノ酸、約 40 アミノ酸～約 60 アミノ酸、約 60 アミノ酸～約 80 アミノ酸、約 80 アミノ酸～約 100 アミノ酸、約 100 アミノ酸～約 120 アミノ酸、約 120 アミノ酸～約 140 アミノ酸、約 140 アミノ酸～約 150 アミノ酸、約 150 アミノ酸～約 155 アミノ酸、約 155 アミノ酸～全長ペプチドまたはポリペプチドであり得る。

【0099】

さらに、I L - 10 ポリペプチドは、規定の長さの連続アミノ酸（例えば、「比較ウィンドウ」）にわたって参照配列と比較して規定の配列同一性を有し得る。比較用の配列のアラインメント方法は、当該技術分野で公知である。比較用の配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) のローカルホモロジーアルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) のホモロジーアラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988) の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis. の GAP、BESTFIT、FASTA、及び TFASTA)、または手動アラインメント及び目視検査によって実行可能である（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 補足資料) 参照）。

【0100】

一例として、適切な I L - 10 ポリペプチドは、約 20 アミノ酸～約 40 アミノ酸、約 40 アミノ酸～約 60 アミノ酸、約 60 アミノ酸～約 80 アミノ酸、約 80 アミノ酸～約 100 アミノ酸、約 100 アミノ酸～約 120 アミノ酸、約 120 アミノ酸～約 140 アミノ酸、約 140 アミノ酸～約 150 アミノ酸、約 150 アミノ酸～約 155 アミノ酸、約 155 アミノ酸～最大で全長ペプチドまたはポリペプチドの連続ストレッチに対して、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0101】

以下でさらに考察するように、I L - 10 ポリペプチドは、天然源から単離することができ（例えば、天然の環境以外の環境）、また、組換えにより作製することもでき（例えば、細菌、酵母、Pichia、昆虫細胞などの遺伝子改変宿主細胞内で）、ここで、遺伝子改変宿主細胞は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で改変されている。I L - 10 ポリペプチドはまた、合成によっても産生可能である（例えば、無細胞化学合成法によって）。

【0102】

I L - 10 剤をコードする核酸分子は、それらの天然型及び非天然型アイソフォーム、対立遺伝子変異体及びスプライシング変異体を含む本開示によって企図される。本開示はまた、天然型 DNA 配列に比べて 1 残基以上の塩基が様々に変化しているが、遺伝コードの縮重により、I L - 10 ポリペプチドに対応するアミノ酸配列になお翻訳される核酸配列も包含する。

【0103】

[I L - 10 の産生方法]

本開示のポリペプチドは、非組換え法（例えば、化学合成法）及び組換え法を含む任意の適切な方法によって産生することができる。

【0104】

化学合成法

10

20

30

40

50

ポリペプチドを化学的に合成する場合、液相または固相を介して合成を進行させることができる。固相ペプチド合成 (SPPS) により、非天然アミノ酸の取り込み及び/またはペプチド/タンパク質主鎖修飾が可能になる。本開示のポリペプチドを合成するために、9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 及び t-ブチルオキシカルボニル (Boc) などの様々な形態の SPPS が利用可能である。化学合成の詳細は当技術分野で公知である (例えば、Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6: 3-10; 及び Camarero J. A. et al., (2005) Protein Pept Lett. 12: 723-8)。

【0105】

固相ペプチド合成は、以下に記載するように実施することができる。官能基 (N) 及び任意の反応性側鎖を、酸不安定性基または塩基不安定性基で保護する。保護基は、アミド結合を連結する条件下では安定であるが、形成されたペプチド鎖を損なうことなく容易に開裂させることができる。アミノ官能基のための適切な保護基として、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない: Boc、ベンジルオキシカルボニル (Z)、O-クロロベンジルオキシカルボニル、ピフェニルイソプロピルオキシカルボニル、tert-アミルオキシカルボニル (Amoc)、
、
-ジメチル-3, 5-ジメトキシ-ベンジルオキシカルボニル、o-ニトロスルフェニル、2-シアノ-t-ブトキシ-カルボニル、Fmoc、1-(4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)エチル (Dde) など。

【0106】

適切な側鎖保護基として: アセチル、アリル (All)、アリルオキシカルボニル (Alloc)、ベンジル (Bzl)、ベンジルオキシカルボニル (Z)、t-ブチルオキシカルボニル (Boc)、ベンジルオキシメチル (Bom)、o-プロモベンジルオキシカルボニル、t-ブチル (tBu)、t-ブチルジメチルシリル、2-クロロベンジル、2-クロロベンジルオキシカルボニル、2, 6-ジクロロベンジル、シクロヘキシル、シクロペンチル、1-(4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)エチル (Dde)、イソプロピル、4-メトキシ-2, 3-6-トリメチルベンジルスルホニル (Mtr)、2, 3, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル (Pmc)、ピバリル、テトラヒドロピラン-2-イル、トシル (Tos)、2, 4, 6-トリメトキシベンジル、トリメチルシリル及びトリチル (Trit) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0107】

固相合成において、C末端アミノ酸を、適切な支持材料にカップリングする。適切な支持材料は、合成プロセスの段階的な縮合及び開裂反応のための試薬及び反応条件に対して不活性であり、使用する反応媒体には溶解しないものである。市販の支持材料の例として、反応性基及び/またはポリエチレングリコールで修飾したスチレン/ジビニルベンゼン共重合体; クロロメチル化スチレン/ジビニルベンゼン共重合体; ヒドロキシメチル化またはアミノメチル化スチレン/ジビニルベンゼン共重合体; などが挙げられる。ペプチド酸の調製が所望される場合、4-ベンジルオキシベンジルアルコール (Wang-アンカー) または塩化 2-クロロトリチルで誘導体化したポリスチレン (1%) -ジビニルベンゼンまたは Tentagel (登録商標) を使用することができる。ペプチドアミドの場合には、5-(4-アミノメチル)-3, 5-ジメトキシフェノキシ) 吉草酸 (PAL-アンカー) または p-(2, 4-ジメトキシフェニル-アミノメチル)-フェノキシ基 (Rinkアミドアンカー) を用いることができる。

【0108】

ポリマー支持体への結合は、C末端 Fmoc 保護アミノ酸を、室温または高温 (例えば、40 ~ 60) 下、例えば 2 ~ 72 時間の反応時間で、エタノール、アセトニトリル、N, N-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、N-メチルピロリドンまたは類似の溶媒中への活性化試薬の添加により、支持材料と反応させることによって達成することができる。

10

20

30

40

50

【0109】

PAL、WangまたはRinkアンカーへのN 保護アミノ酸（例えば、Fmocアミノ酸）のカップリングは、例えばN,N - ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、N,N - ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）または他のカルボジイミド、2 - （1H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル） - 1,1,3,3 - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート（TBUT）または他のウロニウム塩、O - アシル - 尿素、ベンゾトリアゾール - 1 - イル - トリス - ピロリジノ - ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）または他のホスホニウム塩、N - ヒドロキシスクシンイミド、他のN - ヒドロキシイミドまたはオキシムなどのカップリング試薬の補助の下、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾールまたは1 - ヒドロキシ - 7 - アザベンゾトリアゾールの存在下または非存在下、例えばHOBtを添加したTBUTの補助の下、例えば、ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）、トリエチルアミンまたはN - メチルモルホリンなどの塩基の添加の存在下または非存在下、例えば、ジイソプロピルエチルアミンの存在下、2 ~ 72時間の反応時間で（例えば、1.5 ~ 3倍過剰のアミノ酸及び2倍過剰のカップリング試薬で3時間、例えば、約10 ~ 50 の温度、例えば25 で、例えばジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドンまたはジクロロメタンなどの溶媒中で）行うことができる。

10

【0110】

カップリング試薬の代わりに、上記の条件下で、活性エステル（例えば、ペンタフルオロフェニル、p - ニトロフェニルなど）、N - Fmoc - アミノ酸の対称無水物、その酸塩化物または酸フッ化物を使用することも可能である。

20

【0111】

N 保護アミノ酸（例えば、Fmocアミノ酸）は、DIEAを添加して10 ~ 120分、例えば20分の反応時間で、ジクロロメタン中の2 - クロロトリチル樹脂にカップリングさせることができるが、この溶媒及びこの塩基の使用に限定されない。

【0112】

保護されたアミノ酸の連続的なカップリングは、ペプチド合成における通常の方法、一般的には自動化ペプチド合成機で実施することができる。例えばジメチルホルムアミド中のピペリジン（10% ~ 50%）を5 ~ 20分間、例えばDMF中の50%ピペリジンで2 x 2分間及びDMF中20%ピペリジンで1 x 15分間処理することにより、固相上の結合したアミノ酸のN - Fmoc保護基を切断した後、3 ~ 10倍過剰、例えば10倍過剰の後続の保護されたアミノ酸を、ジクロロメタン、DMFまたはこれらの2つの混合物などの不活性非極性溶媒中、約10 ~ 50、例えば25 の温度で前方のアミノ酸にカップリングする。第一のN - Fmocアミノ酸をPAL、WangまたはRinkアンカーにカップリングさせるための前述の試薬は、カップリング試薬として適している。保護されたアミノ酸の活性エステル、またはその塩化物もしくはフッ化物または対称無水物も代替物として使用することができる。

30

【0113】

固相合成の終了時に、ペプチドを支持材料から切断すると同時に、側鎖保護基を切断する。切断は、5% ~ 20% V/Vのスカルベンジャー、例えば、ジメチルスルフィド、エチルメチルスルフィド、チオアニソール、チオクレゾール、m - クレゾール、アニソールエタンジチオール、フェノールまたは水、例えば15% v/vのジメチルスルフィド/エタンジチオール/m - クレゾール1:1:1を添加したトリフルオロ酢酸または他の強酸性媒体で、0.5 ~ 3時間、例えば2時間以内に行うことができる。完全に保護された側鎖を有するペプチドは、2 - クロロトリチルアンカーを氷酢酸/トリフルオロエタノール/ジクロロメタン2:2:6で切断することによって得られる。保護されたペプチドは、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製することができる。ペプチドがWangアンカーを介して固相に結合しており、C末端アルキルアミド化を有するペプチドを得ることを意図している場合、アルキルアミンまたはフルオロアルキルアミンによるアミノ分解によって切断を行うことができる。アミノ分解は、約10 ~ 50（例えば、約25）の温度、及び約12 ~ 24時間（例えば、約18時間）の反応時間で実施する。さらに、ペプ

40

50

チドは、例えばメタノールを用いた再エステル化により、支持体から切断することができる。

【0114】

得られる酸性溶液は、ペプチドを沈殿させ、エーテル中に残るスカベンジャーと切断した保護基とを分離するために、3～20倍量の冷エーテルまたはn-ヘキサン、例えば10倍過剰のジエチルエーテルと混合することができる。氷酢酸から数回ペプチドを再沈殿させることにより、さらなる精製を行うことができる。得られる沈殿物を、水もしくはtert-ブタノールまたは2つの溶媒の混合物、例えばtert-ブタノール/水の1:1混合物中に溶解し、凍結乾燥することができる。

【0115】

得られるペプチドは、酢酸塩形態の弱塩基性樹脂上でのイオン交換；非誘導体化ポリスチレン/ジビニルベンゼン共重合体（例えばAmberlite（登録商標）XAD）上の疎水性吸着クロマトグラフィー；シリカゲルでの吸着クロマトグラフィー；イオン交換クロマトグラフィー、例えばカルボキシメチルセルロース；例えばSephadex（登録商標）G-25上の分配クロマトグラフィー；向流分配クロマトグラフィー；または高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、例えば、オクチルまたはオクタデシルシリルシリカ（ODS）相上の逆相HPLCを含む様々なクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【0116】

B. 組換え生成

ヒト及びマウスIL-10の調製を記載する方法は、例えば、組換え技術及び他の合成技術を含む、IL-10活性を有するタンパク質の製造方法を示す米国特許第5,231,012号に見出すことができる。IL-10はウイルス起源であり得、エプスタイン-バーウイルス（BCRF1タンパク質）からのウイルスIL-10のクローニング及び発現は、Moore et al., (1990) Science 248:1230に開示されている。IL-10は、本明細書に記載するような当該技術分野で公知の標準技術を使用して、多くの方法で得ることができる。組換えヒトIL-10はまた、例えば、Peprotech, Inc., Rocky Hill, N.Jから市販されている。

【0117】

組換え技術を使用してポリペプチドを産生する場合、任意の適切な構築物、及び原核細胞または真核細胞、例えば、それぞれ、細菌（例えば、E. coli）または酵母宿主細胞などの任意の適切な宿主細胞を使用して、ポリペプチドを細胞内タンパク質または分泌タンパク質として産生することができる。宿主細胞として使用可能な真核細胞の他の例として、昆虫細胞、哺乳類細胞、及び/または植物細胞が挙げられる。哺乳類宿主細胞を使用する場合、それらには、ヒト細胞（例えば、HeLa、293、H9及びJurkat細胞）；マウス細胞（例えば、NIH3T3、L細胞、及びC127細胞）；霊長類細胞（例えば、Cos1、Cos7及びCV1）；ならびにハムスター細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）が含まれる。

【0118】

ポリペプチドの発現に適した様々な宿主-ベクター系を、当該分野で公知の標準的な手順に従って使用することができる。例えば、Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York; 及び Ausubel et al., 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons 参照。宿主細胞への遺伝物質の導入方法として、例えば、形質転換、エレクトロポレーション、コンジュゲーション、リン酸カルシウム法などが挙げられる。導入した、ポリペプチドをコードする核酸が安定に発現するように、これらの導入方法を選択することができる。ポリペプチドをコードする核酸は、継代可能なエピソーム要素（例えば、プラスミド）として提供可能であるか、またはゲノムに組み込むことができる。関心対象のポリペプチドの産生に使用するための様々な適

10

20

30

40

50

切なベクターが市販されている。

【 0 1 1 9 】

ベクターは、宿主細胞中の染色体外で維持することができるか、または宿主細胞ゲノムへ組み込むことができる。発現ベクターは、転写及び翻訳調節配列を提供し、コード領域が転写開始領域の転写制御下で作動可能に連結する誘導性または構成的発現、ならびに転写及び翻訳終止領域を提供することができる。一般的に、転写及び翻訳調節配列には、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始及び終止配列、翻訳開始及び終止配列、ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列が含まれ得るが、これらに限定されない。プロモーターは、構成的または誘導性のいずれかであり得、強力な構成的プロモーター（例えば、T7）であり得る。

10

【 0 1 2 0 】

発現構築物は、一般的に、プロモーター配列の近くに位置する好都合な制限部位を有し、関心対象のタンパク質をコードする核酸配列の挿入を提供する。発現宿主中で作用する選択マーカーを存在させて、ベクターを含む細胞の選択を容易にすることができる。さらに、発現構築物は、さらなる要素を含み得る。例えば、発現ベクターは、1つまたは2つの複製系を有することができ、それにより生物において、例えば発現のために哺乳類または昆虫細胞、ならびにクローニング及び増幅のために原核生物宿主において維持可能になる。さらに、発現構築物は、選択可能なマーカー遺伝子を有することができ、形質転換した宿主細胞の選択を可能にする。選択可能な遺伝子は当該技術分野において公知であり、使用する宿主細胞によって様々に異なる。

20

【 0 1 2 1 】

タンパク質の単離及び精製は、当該分野で公知の方法に従って達成することができる。例えば、タンパク質は、構成的及び/または誘導時にタンパク質を発現するように遺伝子改変した細胞の溶解物から、または免疫親和性精製によって合成反応混合物から単離することができ、これは通常、試料を抗タンパク質抗体に接触させ、非特異的に結合した物質を除去し、特異的に結合したタンパク質を溶出することを含む。単離したタンパク質は、透析及びタンパク質精製に通常使用される他の方法によってさらに精製することができる。一実施形態では、金属キレートクロマトグラフィー法を用いてタンパク質を単離することができる。タンパク質は、単離を容易にするための改変を含み得る。

【 0 1 2 2 】

ポリペプチドは、実質的に純粋な形態または単離された形態（例えば、他のポリペプチドを含まない）で調製することができる。ポリペプチドは、存在し得る他の成分（例えば、他のポリペプチドまたは他の宿主細胞成分）に比べてポリペプチドが富化された組成物中に存在し得る。例えば、他の発現タンパク質を実質的に含まない組成物中に、ポリペプチドが、例えば、約90%未満、約60%未満、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満、または約1%未満で存在するように、精製ポリペプチドを提供することができる。

30

【 0 1 2 3 】

組換え技術を用いてIL-10ポリペプチドを作製し、当該分野で公知の異なるIL-10関連核酸を操作し、IL-10ポリペプチドをコード可能な構築物を提供することができる。特定のアミノ酸配列を提供する場合、当業者であれば、例えば分子生物学における当業者の背景及び経験の観点から、そのようなアミノ酸配列をコードする様々な異なる核酸分子を認識するであろうことは理解されるであろう。

40

【 0 1 2 4 】

アミド結合の置換

いくつかの場合には、IL-10は、ペプチド結合以外の1つ以上の結合を含み、例えば、少なくとも2つの隣接するアミノ酸が、アミド結合以外の結合を介して結合する。例えば、望ましくないタンパク質分解または他の分解手段を低減または排除するため、及び/または血清安定性を増加させるため、及び/または立体構造の自由度を制限または高めるために、IL-10の骨格内の1つ以上のアミド結合を置換することができる。

50

【0125】

別の例では、IL-10中の1つ以上のアミド結合(-CO-NH-)は、-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-(シス及びトランス)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-または-CH₂SO-などのアミド結合のアイソスターである結合で置換することができる。IL-10における1つ以上のアミド結合は、例えば、還元アイソスター擬似ペプチド結合によって置換することもできる。Coudere et al. (1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41: 181-184 参照。そのような置換及びそれらの実施方法は、当業者に公知である。

【0126】

アミノ酸置換

IL-10ポリペプチド中に1つ以上のアミノ酸置換を作製することができる。以下は非限定的な例である：

【0127】

a) アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、ノルロイシン、(S)-2-アミノ酪酸、(S)-シクロヘキシルアラニン、または分枝状、環状及び直鎖状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニル置換基を含むC1-C10炭素由来の脂肪族側鎖で置換された他のシンプル-アミノ酸を含むアルキル置換疎水性アミノ酸の置換；

【0128】

b) フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、スルホチロシン、ビフェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、2-ベンゾチエニルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、ヒスチジンを含む疎水性アミノ酸、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アザ、ハロゲン化(フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード)、または上記に列挙した芳香族アミノ酸のアルコキシ(C1-C4)置換型、その例は：2-、3-または4-アミノフェニルアラニン、2-、3-または4-クロロフェニルアラニン、2-、3-または4-メチルフェニルアラニン、2-、3-または4-メトキシフェニルアラニン、5-アミノ-、5-クロロ-、5-メチル-または5-メトキシトリプトファン、2-、3-または4-アミノ-、2-、3-または4-クロロ-、2、3または4-ビフェニルアラニン、2-、3-または4-メチル-、2-、3-または4-ビフェニルアラニン、及び2-または3-ピリジルアラニンであり；

【0129】

c) 例えば、プロR位において置換基がヘテロ原子上(例えば、窒素、または遠位窒素もしくは窒素)または炭素上のどちらにあるかに関わらず、アルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン、2,3-ジアミノプロピオン酸、ホモアルギニンを含む塩基性側鎖を含むアミノ酸、ならびに前記アミノ酸のアルキル、アルケニル、またはアリール置換型(C1-C10分枝、直鎖、または環状)誘導体の置換。一例となり得る化合物として：N-イソプロピル-リジン、3-(4-テトラヒドロピリジル)-グリシン、3-(4-テトラヒドロピリジル)-アラニン、N,N-ジエチル-ホモアルギニンが挙げられる。アルキル基が炭素のプロR位を占める化合物である-メチル-アルギニン、-メチル-2,3-ジアミノプロピオン酸、-メチル-ヒスチジン、-メチル-オルニチンも含まれる。アルキル、芳香族、ヘテロ芳香族(ヘテロ芳香族基は、1つ以上の窒素、酸素、または硫黄原子を単一でまたは組合せで有する)、カルボン酸、または酸塩化物、活性エステル、活性アゾリド及び関連誘導体、ならびにリジン、オルニチンまたは2,3-ジアミノプロピオン酸などの多くの公知の活性化誘導体のいずれかから形成されるアミドも含まれる。

【0130】

d) アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、チロシン、2,4-ジアミノプリオピオン酸のアルキル、アリール、アリールアルキル及びヘテロアリールスルホンアミド、オルニチンまたはリジン、ならびにテトラゾール置換アルキルアミノ酸を含む酸性アミノ酸の置換；

【0131】

10

20

30

40

50

e) アスパラギン、グルタミン、及びアスパラギンまたはグルタミンのアルキルまたは芳香族置換誘導体を含む側鎖アミド残基の置換；ならびに

【0132】

f) セリン、スレオニン、ホモセリン、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、及びセリンまたはスレオニンのアルキルまたは芳香族置換誘導体を含むヒドロキシル含有アミノ酸の置換。

【0133】

いくつかの場合では、IL - 10 は、天然型の非遺伝子コード型 L - アミノ酸、合成 L - アミノ酸、またはアミノ酸の D - エナンチオマーの 1 つ以上を含む。例えば、IL - 10 は、D - アミノ酸のみを含むことができる。例えば、IL - 10 ポリペプチドは、以下の残基の 1 つ以上を含むことができる：ヒドロキシプロリン、 α - アラニン、*o* - アミノ安息香酸、*m* - アミノ安息香酸、*p* - アミノ安息香酸、*m* - アミノメチル安息香酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、 β - アミノイソ酪酸、N - メチルグリシン（サルコシン）、オルニチン、シトルリン、*t* - ブチルアラニン、*t* - ブチルグリシン、N - メチルイソロイシン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ノルロイシン、ナフチルアラニン、ピリジルアラニン 3 - ベンゾチエニルアラニン、4 - クロロフェニルアラニン、2 - フルオロフェニルアラニン、3 - フルオロフェニルアラニン、4 - フルオロフェニルアラニン、ペニシラミン、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸、 β - 2 - チエニルアラニン、メチオニンスルホキシド、ホモアルギニン、N - アセチルリジン、2, 4 - ジアミノ酪酸、*rho* - アミノフェニルアラニン、N - メチルバリン、ホモシステイン、ホモセリン、 γ - アミノヘキサン酸、 δ - アミノヘキサン酸、 ϵ - アミノヘプタン酸、 ζ - アミノオクタン酸、 η - アミノデカン酸、 θ - アミノテトラデカン酸、シクロヘキシルアラニン、 ω - ジアミノ酪酸、 ω - ジアミノプロピオン酸、 ω - アミノ吉草酸、及び 2, 3 - ジアミノ酪酸。

【0134】

さらなる修飾

システイン残基またはシステインアナログを IL - 10 ポリペプチドに導入して、ジスルフィド結合を介して別のペプチドへの結合を提供するか、または IL - 10 ポリペプチドの環化を提供することができる。システインまたはシステイン類似体の導入方法は、当該分野で公知であり；例えば、米国特許第 8, 067, 532 号を参照されたい。

【0135】

IL - 10 ポリペプチドは環化することができる。IL - 10 ポリペプチドに、1 つ以上のシステインまたはシステイン類似体を導入することができ、導入されたシステインまたはシステイン類似体は、第二の導入されたシステインまたはシステイン類似体とジスルフィド結合を形成することができる。環化の他の手段として、オキシムリンカーまたはランチオニンリンカーの導入が挙げられ；例えば、米国特許第 8, 044, 175 号を参照されたい。環化結合を形成可能なアミノ酸（または非アミノ酸部分）の任意の組合せを使用及び/または導入することができる。環化結合は、架橋の導入を可能にする官能基を用いて、アミノ酸の任意の組合せ（またはアミノ酸と $-(CH_2)_n-CO-$ または $-(CH_2)_n-C_6H_4-CO-$ ）で生成することができる。いくつかの例は、ジスルフィド、ジスルフィド模倣物、例えば、 $-(CH_2)_n$ - カルバ架橋、チオアセタール、チオエーテル架橋（シスタチオニンまたはランチオニン）ならびにエステル及びエーテルを含有する架橋などである。これらの例では、*n* は任意の整数であってもよいが、多くの場合、10 未満である。

【0136】

他の修飾として、例えば、N - アルキル（もしくはアリール）置換（ $[CONR]$ ）、またはラクタム及び他の環状構造を構築するための骨格架橋が挙げられる。他の誘導体として、C 末端ヒドロキシメチル誘導体、*o* - 修飾誘導体（例えば、C 末端ヒドロキシメチルベンジルエーテル）、アルキルアミド及びヒドラジドなどの置換アミドを含む N 末端修飾誘導体が挙げられる。

【0137】

10

20

30

40

50

いくつかの場合には、IL - 10 ポリペプチド中の1つ以上のL - アミノ酸を1つ以上のD - アミノ酸で置換する。

【0138】

いくつかの場合には、IL - 10 ポリペプチドは、レトロインベルソ類似体である（例えば、Sela and Zisman (1997) FASEB J. 11: 449 参照）。レトロ - インベルソペプチド類似体は、直鎖状ポリペプチドの異性体であり、アミノ酸配列の方向が逆転（レトロ）し、例えば、L - アミノ酸よりむしろD - アミノ酸を用いて、その中の1つ以上のアミノ酸のキラリティーD - またはL - が反転（インベルソ）している。[例えば、Jameson et al. (1994) Nature 368: 744 ; 及び Brady et al. (1994) Nature 368: 692 参照]。

10

【0139】

IL - 10 ポリペプチドは、「タンパク質形質導入ドメイン」(PTD)を含むことができ、これは、脂質二重層、ミセル、細胞膜、細胞小器官膜、または小胞膜を横断することを容易にするポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、または有機もしくは無機分子を指す。別の分子に結合したPTDは、例えば、細胞外空間から細胞内空間へ、または細胞質ゾルからオルガネラ内への移動など、分子が膜を横断することを容易にする。いくつかの実施形態では、PTDはIL - 10 ポリペプチドのアミノ末端に共有結合し、他の実施形態ではPTDはIL - 10 ポリペプチドのカルボキシル末端に共有結合する。例示的なタンパク質形質導入ドメインとして、最小限のウンデカペプチドタンパク質形質導入ドメイン(YGRKKRRQRRR ; 配列番号1を含むHIV - 1 TATの残基47 ~ 57に対応) ; 細胞に進入するのに十分な数のアルギニン残基(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、または10 ~ 50アルギニン)を含むポリアルギニン配列 ; VP22ドメイン(Zender et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9(6): 489 - 96) ; Drosophila Antennapediaタンパク質形質導入ドメイン(Noguchi et al. (2003) Diabetes 52(7): 1732 - 1737) ; トランケート型ヒトカルシトニンペプチド(Trehin et al. (2004) Pharm. Research 21: 1248 - 1256) ; ポリリジン(Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 13003 - 13008) ; RRQRRRTSKLMKR (配列番号2) ; トランスポータンGWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (配列番号3) ; KALAEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (配列番号4) ; 及びRQIKIWFQNRRMKWKK (配列番号5) が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なPTDとして、YGRKKRRQRRR (配列番号6) 、 RKKRRQRRR (配列番号7) ; 3アルギニン残基 ~ 50アルギニン残基のアルギニンホモポリマーが挙げられるが、これらに限定されない ; 例示的なPTDドメインアミノ酸配列には、以下のいずれかが含まれるが、これらに限定されない : YGRKKRRQRRR (配列番号8) ; RKKRRQRRR (配列番号9) ; YARAAARQARA (配列番号10) ; THRLPRRRRRR (配列番号11) ; 及びGGRRARRRRR (配列番号12) 。

20

30

【0140】

IL - 10 ポリペプチドのC末端のアミノ酸のカルボキシル基COR₃は、遊離型(R₃ = OH)または、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩もしくはカルシウム塩などの生理学的に許容可能なアルカリもしくはアルカリ土類塩の形態で存在することができる。カルボキシル基はまた、例えば、メタノール、分枝状または非分枝状C1 - C6 - アルキルアルコール、例えばエチルアルコールまたはtert - ブタノールなどの第一級、第二級または第三級アルコールでエステル化することもできる。カルボキシル基はまた、アンモニア、分枝または非分枝C1 - C6 - アルキルアミンまたはC1 - C6ジ - アルキルアミン、例えばメチルアミンまたはジメチルアミンなどの第一級または第二級アミンでアミド化することもできる。

40

【0141】

50

IL - 10 ポリペプチドのN末端のアミノ酸NR₁R₂のアミノ基は、遊離型 (R₁ = H 及び R₂ = H) または生理学的に許容可能な塩の形態、例えば、塩化物または酢酸塩の形態で存在し得る。アミノ基は、R₁ = H 及び R₂ = アセチル、トリフルオロアセチル、またはアダマンチルなどの酸でアセチル化することもできる。アミノ基は、上記で提供されるもの (例えば、Fmoc、ベンジルオキシカルボニル (Z)、Boc、及びAlloc) などの、ペプチド化学において慣用的に使用されるアミノ保護基によって保護された形態で存在し得る。アミノ基は、N - アルキル化可能であり、ここで、R₁ 及び / または R₂ = C₁ - C₆ アルキルまたは C₂ - C₈ アルケニルまたは C₇ - C₉ アラルキルである。アルキル残基は、直鎖、分枝または環状 (例えば、それぞれ、エチル、イソプロピル及びシクロヘキシル) であり得る。

10

【0142】

IL - 10 機能を増強及び / または模倣するための特定の修飾

本明細書中に開示する治療様式 (例えば、IL - 10) の1つ以上の物理的特性及び / またはそれらを投与する様式を改善することは、多くの場合に有益であり、時には不可欠である。物理的特性の改善には、例えば、免疫原性の調節；水溶性、バイオアベイラビリティ、血清半減期、及び / または治療半減期を高める方法；及び / または生物活性の調節が含まれる。特定の修飾はまた、例えば、検出アッセイ (例えば、エピトープタグ) に用いるための抗体の産生及びタンパク質精製を容易にするために有用であり得る。そのような改善は、通常、治療様式の生物活性に悪影響を及ぼさず、及び / またはその免疫原性を増加させることなく加えなければならない。

20

【0143】

IL - 10 のペグ化は、本開示によって企図される1つの特定の修飾であるが、他の修飾として、グリコシル化 (N - 及び O - 結合)；ポリシアル化；血清アルブミン (例えば、ヒト血清アルブミン (HSA)、カニクイザル血清アルブミン、またはウシ血清アルブミン (BSA)) を含むアルブミン融合分子；例えば共役脂肪酸鎖を介したアルブミン結合 (アシル化)；及びFc融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0144】

ペグ化：タンパク質治療薬の臨床的有効性は、短い血漿半減期及びプロテアーゼ分解に対する感受性によってしばしば制限される。様々な治療用タンパク質 (例えば、フィルグラスチム) の研究は、ポリペプチド配列を様々な非タンパク質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンのいずれかに複合体化または連結することを含む様々な修飾によって、そのような困難を克服することができることを示した。これは、タンパク質、及び例えばPEGなどの非タンパク質性ポリマーの両方に共有結合した連結部分によって頻繁に行われる。そのようなPEG結合型生体分子は、より良好な物理的及び熱安定性、酵素分解に対する感受性の保護、溶解性の増加、より長いin vivo循環半減期及びクリアランスの減少、免疫原性及び抗原性の低下、ならびに毒性の低減を含む、臨床上有用な特性を有することが示された。

30

【0145】

PEG化が薬物動態パラメータに及ぼす有益な効果に加えて、ペグ化それ自体が活性を増強できる。例えば、PEG - IL - 10 は、非PEG化IL - 10 よりも特定のがんに対してより有効であることが示されている (例えば、EP 2 066 36 A 2 参照)。

40

【0146】

ポリペプチド配列への複合体化に適したPEGは、一般的に、室温で水に可溶性であり、一般式R(O - CH₂ - CH₂)_nO - Rを有し、式中、Rは、水素または保護基、例えばアルキルまたはアルカノール基であり、nは1 ~ 1000の整数である。Rが保護基である場合、それは一般的に1 ~ 8個の炭素を有する。ポリペプチド配列に複合体化したPEGは、直鎖または分枝鎖であり得る。分枝PEG誘導体、「スター - PEG」及びマルチアームPEGは、本開示によって企図される。本開示において使用するPEGの分子量は、任意の特定の範囲に限定されるものではなく、本明細書中の他の箇所に例を記載する

50

。一例として、特定の実施形態は5 kDa ~ 20 kDaの分子量を有し、他の実施形態は4 kDa ~ 10 kDaの分子量を有する。

【0147】

本開示はまた、PEGが異なるn値を有し、したがって様々な異なるPEGが特定の比で存在する複合体の組成物を企図する。例えば、いくつかの組成物は、 $n = 1, 2, 3$ 及び4である複合体の混合物を含む。いくつかの組成物は、 $n = 1$ である複合体の割合は18 ~ 25%であり、 $n = 2$ である複合体の割合は50 ~ 66%であり、 $n = 3$ である複合体の割合は12 ~ 16%であり、 $n = 4$ である複合体の割合は最大5%である。そのような組成物は、当該分野で公知の反応条件及び精製方法によって生成することができる。例示的な反応条件を、本明細書を通して記載する。カチオン交換クロマトグラフィーを用いて複合体を分離することができ、その後、例えば、未修飾タンパク質配列と、他の数のPEGを有する複合体とを含むことなく精製された、所望の数のPEGが結合した複合体を含む画分を同定する。

10

【0148】

ペグ化は、ポリペプチドのN末端のアミノ基、リジン残基の側鎖のアミノ基、及びヒスチジン残基の側鎖のイミダゾール基で最も頻繁に生じる。大部分の組換えポリペプチドは単一の及び多数のアミノ及びイミダゾール基を有するため、リンカーの化学的性質に応じて多数の位置異性体を生成することができる。当該分野で公知の一般的なペグ化戦略を本明細書に適用することができる。

【0149】

2つの広く使用されている第1世代活性化モノメトキシPEG (mPEG) は、スクシンイミジルカーボネートPEG (SC-PEG; 例えば、Zalipsky, et al. (1992) *Biootechnol. Appl. Biochem* 15:100-114; 及びMiron and Wilcheck (1993) *Bio-conjug. Chem.* 4:568-569) ならびにリジン残基と優先的に反応してカルバミン酸結合を形成するが、ヒスチジン及びチロシン残基と反応することも知られているベンゾトリアゾールカーボネートPEG (BTC-PEG; 例えば、Dolence, et al. 米国特許第5,650,234号参照) である。特定の分子 (例えば、IFN) 上のヒスチジン残基への結合は、加水分解に対して不安定なイミダゾールカルバミン酸結合であることが示されている (例えば、Lee and McNemar, 米国特許第5,985,263号参照)。第二世代ペグ化技術は、これらの不安定な結合ならびに残基反応性における選択性の欠如を回避するように設計されている。PEG-アルデヒドリンカーの使用は、還元アミノ化を介してポリペプチドのN末端上の単一部位を標的とする。

20

【0150】

1つ以上のポリペプチド配列の遊離アミノまたはカルボキシル基とポリエチレングリコールとの間の結合を媒介する末端反応基 (「スペーサー」) を介して、PEGを本開示のポリペプチドに結合させることができる。遊離アミノ基に結合可能なスペーサーを有するPEGとして、ポリエチレングリコールのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシンイミドで活性化することにより調製することができるN-ヒドロキシスクシンイミドポリエチレングリコールが挙げられる。遊離アミノ基に結合可能な別の活性化ポリエチレングリコールは、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルと塩化シアヌルとを反応させて調製することができる2,4-ビス(O-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンである。遊離カルボキシル基に結合する活性化ポリエチレングリコールとして、ポリオキシエチレンジアミンが挙げられる。

30

40

【0151】

スペーサーを有するPEGへの本開示の1つ以上のポリペプチド配列の複合体化は、様々な従来の方法によって行うことができる。例えば、複合体化反応は、試薬対タンパク質のモル比4:1 ~ 30:1を使用して、pH 5 ~ 10、温度4 ~ 室温で、30分間 ~ 20時間、溶液で行うことができる。反応条件は、反応が所望する置換の程度を支配的に生じるように選択することができる。一般的に、低温、低pH (例えば、pH = 5)、及び

50

短い反応時間は、結合した P E G の数を減少させる傾向がある一方で、高温、中性～高 p H（例えば、p H 7）、及び長い反応時間は、結合した P E G の数を増加させる傾向にある。当該技術分野で公知の様々な手段を用いて反応を終了させることができる。いくつかの実施形態では、反応混合物を酸性化し、例えば - 2 0 で凍結させることによって反応を終了させる。様々な分子のペグ化は、例えば、米国特許第 5, 2 5 2, 7 1 4 号；第 5, 6 4 3, 5 7 5 号；第 5, 9 1 9, 4 5 5 号；第 5, 9 3 2, 4 6 2 号；及び第 5, 9 8 5, 2 6 3 号に記載されている。P E G - I L - 1 0 は、例えば、米国特許第 7, 0 5 2, 6 8 6 号に記載されている。本明細書中での使用が意図される具体的な反応条件は、実施例の項に記載されている。

【 0 1 5 2 】

本開示はまた、P E G 模倣体の使用を企図する。P E G の特性（例えば、血清半減期の向上）を保持しながら、いくつかのさらなる有利な特性を付与する組換え P E G 模倣物が開発されている。一例として、P E G と同様の拡張された立体構造を形成可能な単純なポリペプチド鎖（例えば、A l a、G l u、G l y、P r o、S e r 及び T h r を含む）を、関心対象のペプチドまたはタンパク質性薬剤に、あらかじめ組換えによって融合させて生成することができる（例えば、A m u n i x の X T E N 技術；M o u n t a i n V i e w、C A）。これにより、製造プロセス中のさらなる複合体化工程の必要性が排除される。さらに、確立された分子生物学技術により、ポリペプチド鎖の側鎖組成を制御することができ、免疫原性及び製造特性を最適化することができる。

【 0 1 5 3 】

〔グリコシル化〕：本開示の目的では、「グリコシル化」は、タンパク質、脂質または他の有機分子にグリカン結合させる酵素的プロセスを広く指すことを意図する。本開示と関連して、用語「グリコシル化」の使用は、一般的に、1 つ以上の炭水化物部分を付加または除去する（基礎的なグリコシル化部位を除去することによって、または化学的及び/または酵素的手段によってグリコシル化を除去することによって）こと、及び/または天然配列に存在し得る、または存在し得ない 1 つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味することを意図する。さらに、この語句は、存在する様々な炭水化物部分の性質及び割合の変化を含む天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

【 0 1 5 4 】

グリコシル化は、I L - 1 0 などのポリペプチドの物理的性質（例えば、可溶性）に劇的に影響し得るうえに、タンパク質安定性、分泌及び細胞内局在化においても重要であり得る。グリコシル化されたポリペプチドはまた、向上した安定性を示し得るか、または半減期などの 1 つ以上の薬物動態特性を向上させることができる。さらに、溶解度の改善は、例えば、非グリコシル化ポリペプチドを含む製剤よりも医薬投与に適した製剤の生成を可能にする。

【 0 1 5 5 】

グリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変することによって達成することができる。ポリペプチドに対する改変は、例えば、1 つ以上のセリンまたはスレオニン残基（O - 結合グリコシル化部位の場合）またはアスパラギン残基（N - 結合グリコシル化部位の場合）の付加または置換によって行うことができる。N - 結合型及び O - 結合型オリゴ糖の構造及び各型で見出される糖残基は、異なり得る。両方に一般的に見られる 1 つのタイプの糖は、N - アセチルノイラミン酸（以下、シアル酸と称する）である。シアル酸は、多くの場合、N - 結合オリゴ糖及び O - 結合オリゴ糖の両方の末端残基であり、その負電荷のために、糖タンパク質に酸性特性を付与することができる。本開示の特定の実施形態は、N - グリコシル化変異体の生成及び使用を含む。

【 0 1 5 6 】

本開示のポリペプチド配列は、核酸レベルでの変化によって、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが生成するように予め選択した塩基でポリペプチドをコードする核酸を変異させることによって任意に改変することができる。

【 0 1 5 7 】

ポリシアリル化：本開示はまた、ポリペプチドの安定性及び *in vivo* 薬物動態学を改善するために、ポリシアリル化の使用、すなわち、天然型の生分解性 - (28) 結合ポリシアル酸 (「PSA」) へのポリペプチドの複合体化を企図する。PSAは、生分解性の非毒性の天然ポリマーであり、親水性が高く、血中における高い見かけの分子量を与え、血清半減期を延長させる。さらに、ある範囲のペプチド及びタンパク質治療剤のポリシアリル化は、顕著に低下したタンパク質分解、*in vivo* 活性の保持、及び免疫原性及び抗原性の低下をもたらした (例えば、G. Gregoriadis et al., Int. J. Pharmaceutics 300 (1-2): 125-30 参照)。部位特異的ポリシアリル化のための様々な技術が利用可能である (例えば、T. Lindhout et al., PNAS 108 (18) 7397-7402 (2011) 参照)。

10

【0158】

〔アルブミン融合〕：複合体化のためのさらなる適切な成分及び分子として、ヒト血清アルブミン (HSA)、カニクイザル血清アルブミン、及びウシ血清アルブミン (BSA) などのアルブミンが挙げられる。

【0159】

本開示によれば、アルブミンは、カルボキシル末端、アミノ末端、カルボキシル末端及びアミノ末端の両方において、及び内部で薬物分子 (例えば、本明細書に記載のポリペプチド) と複合体化させることができる (例えば、USP 5, 876, 969 及び USP 7, 056, 701 参照)。

20

【0160】

本開示によって企図される HSA - 薬物分子複合体において、アルブミン分泌性プレ配列及びその変異体、その断片及び変異体、及び HSA 変異体などの、様々な形態のアルブミンを使用することができる。そのような形態は、一般的に、1つ以上の所望のアルブミン活性を有する。さらなる実施形態では、本開示は、アルブミン、アルブミン断片、及びアルブミン変異体などに直接または間接的に融合したポリペプチド薬物分子を含む融合タンパク質を含み、ここで融合タンパク質は、非融合型の薬物分子よりも高い血漿安定性を有し、及び/または、融合タンパク質は、非融合型の薬物分子の治療活性を保持している。いくつかの実施形態では、間接的な融合は、リンカー、例えばペプチドリリンカーまたはその修飾されたバージョンによって行う。

30

【0161】

上記に示唆したように、本開示の1つ以上のポリペプチドへのアルブミンの融合は、例えば、遺伝子操作によって達成することができ、それによって、HSAをコードする核酸またはその断片を、1つ以上のポリペプチド配列をコードする核酸に結合させる。

【0162】

代替アルブミン結合戦略：直接融合の代替として、いくつかのアルブミン結合戦略が開発され、本明細書に記載の IL-10 剤とともに使用することができる。一例として、本開示は、共役脂肪酸鎖 (アシル化) ならびにアルブミン結合ドメイン (ABD) ポリペプチド配列及び本明細書に記載の1つ以上のポリペプチドの配列を含む融合タンパク質を介したアルブミン結合を企図する。

40

【0163】

他の分子との複合体化：複合体化のためのさらなる適切な成分及び分子として、例えば、サイログロブリン；破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリ (D-リジン；D-グルタミン酸) などのポリアミノ酸；ロタウイルスの VP6 ポリペプチド；インフルエンザウイルスヘマグルチニン、インフルエンザウイルス核タンパク質；キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)；ならびに B 型肝炎ウイルスコアタンパク質及び表面抗原；またはこれらの任意の組合せが挙げられる。

【0164】

したがって、本開示は、ポリペプチド配列の N 末端及び/または C 末端における、1つ以上の追加の成分または分子、例えば、別のポリペプチド (例えば、目的のポリペプチドに

50

対して異種のアミノ酸配列を有するポリペプチド)、または担体分子の複合体化を企図する。したがって、例示的なポリペプチド配列は、別の成分または分子との複合体として提供することができる。

【0165】

IL-10ポリペプチドはまた、大きくて緩やかに代謝される高分子、例えば、タンパク質;セファロース、アガロース、セルロース、またはセルロースビーズなどの多糖類;ポリグルタミン酸またはポリリジンなどのポリマー性アミノ酸;アミノ酸共重合体;不活性化ウイルス粒子;ジフテリア、破傷風、コレラ、またはロイコトキシン分子由来のトキシイドなどの不活性化細菌毒素;不活性化細菌;及び樹状細胞などに複合体化することもできる。そのような複合体化形態は、所望であれば、本開示のポリペプチドに対する抗体を産生するために使用することができる。

10

【0166】

複合体化のためのさらなる候補成分及び分子として、単離または精製に適したものが挙げられる。特定の非限定的な例として、結合分子、例えば、ビオチン(ビオチン-アビジン特異的結合対)、抗体、受容体、リガンド、レクチン、または、例えば、プラスチックもしくはポリスチレンビーズ、プレートもしくはビーズ、磁気ビーズ、試験ストリップ、及び膜を含む固体支持体を含む分子が挙げられる。

【0167】

Fc融合分子:特定の実施形態では、本開示のポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシル末端を免疫グロブリンFc領域(例えば、ヒトFc)と融合させて、融合型複合体(または融合分子)を形成することができる。Fc融合型複合体は、バイオ医薬品の全身性半減期を増加させることが示されており、したがって、バイオ医薬品は、より少ない頻度の投与で済む可能性がある。

20

【0168】

Fcは、血管をライニングする内皮細胞の新生児Fc受容体(FcRn)に結合し、結合すると、Fc融合分子は分解から保護され、循環器中に再放出され、循環器中で分子をより長く維持する。このFc結合は、内在性IgGがその長い血漿半減期を保持する機構であると考えられている。より最近のFc融合技術は、バイオ医薬品の単一コピーを抗体のFc領域に連結し、従来のFc融合型複合体に比べてバイオ医薬品の薬物動態学的及び薬力学的特性を最適化する。

30

【0169】

他の改変:本開示は、1つ以上の特性を改善するための、現在公知であるか、または将来開発されるIL-10の他の修飾の使用を意図する。例として、その様々な態様が、例えば、米国特許出願第2007/0134197号及び第2006/0258607号に記載されるヘキシル化、ならびに融合タグとしてのSUMOを含む融合分子(Life Sensors, Inc.; Malvern, PA)が挙げられる。

【0170】

リンカー:リンカー及びその使用は上記に記載されている。本開示のポリペプチド配列を修飾するために使用する任意の前述の成分及び分子は、リンカーを介して場合により複合体化していてもよい。適切なリンカーとして、改変したポリペプチド配列と連結した成分及び分子との間のいくらかの動きを可能にするのに一般的に十分な長さの「可撓性リンカー」が挙げられる。リンカー分子は、通常、約6~50原子の長さである。リンカー分子はまた、例えば、アリアルアセチレン、2~10個のモノマーユニットを含むエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二酸、アミノ酸、またはそれらの組合せであってもよい。適切なリンカーは、容易に選択することができ、任意の適切な長さ、例えば、1残基のアミノ酸(例えば、Gly)、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10~20、20~30、30~50残基または50残基を上回るアミノ酸であり得る。

40

【0171】

可撓性リンカーの例として、グリシンポリマー(G)_n、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、グリシン-セリンポリマー(例えば、(GmSo)_n、(G

50

S G G S)_n (配列番号 13)、(G m S o G m)_n (配列番号 14)、(G m S o G m S o G m)_n (配列番号 15)、(G S G G S m)_n (配列番号 16)、(G S G S m G)_n (配列番号 17) 及び (G G G S m)_n (配列番号 18)、ならびにそれらの組合せが挙げられ、式中、m、n、及びoは、それぞれ独立して、少なくとも1～20の整数、例えば1～18、2～16、3～14、4～12、5～10、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10から選択される)、及び他の可撓性リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは、比較的構造化されておらず、したがって、構成要素間の中立的テザーとして機能し得る。可撓性リンカーの例として、G G S G (配列番号 19)、G G S G G (配列番号 20)、G S G S G (配列番号 21)、G S G G G (配列番号 22)、G G G S G (配列番号 23)、及びG S S S G (配列番号 24) が挙げられる。

10

【0172】

可撓性リンカーのさらなる例として、グリシンポリマー (G)_n またはグリシン-セリンポリマー (例えば、(G S)_n、(G S G G S)_n (配列番号 25)、(G G G S)_n (配列番号 26)、及び (G G G G S)_n (配列番号 27) であり、式中、n = 1～50、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30、30～50である) が挙げられる。例示的な可撓性リンカーとして、G G G S (配列番号 //)、G G G G S (配列番号 28)、G G S G (配列番号 29)、G G S G G (配列番号 30)、G S G S G (配列番号 31)、G S G G G (配列番号 32)、G G G S G (配列番号 33)、及びG S S S G (配列番号 34) が挙げられるが、これらに限定されない。これらのリンカー配列の多量体 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30、または30～50) を一緒に連結して可撓性リンカーを提供してもよく、これを用いて、本明細書中に開示する I L - 10 剤に異種アミノ酸配列を複合体化してもよい。本明細書中に記載するように、異種アミノ酸配列は、シグナル配列及び/またはアルブミン、Fc配列などのような融合パートナーであってもよい。

20

【0173】

P D 1 + , C D 8 + T細胞の産生及び治療のための I L - 10 剤投与
末梢 P D 1 + , C D 8 + , 疾患抗原特異的 T細胞を誘発するために、I L - 10 剤 (例えば、P E G - I L - 10) を治療有効量で被験体に投与する。治療有効量は、治療する疾患、治療によって達成する目標、被験体に投与する他の治療剤、ならびに被験体の年齢、体重、性別、健康状態及び身体状態、投与する I L - 10 製剤ならびに投与経路などの一般的に評価される被験体の様々な特性などの要因を考慮して、熟練した医師によって容易に決定され得る。I L - 10 剤の治療有効量は、例えば、安全性及び用量漸増試験、i n v i v o 試験 (例えば、動物モデル)、及び当業者に公知の他の方法から容易に決定することができる。

30

【0174】

他の箇所では詳細に考察するように、本開示は、特定の血清トラフ濃度を達成するための、及び/または特定の平均血清トラフ濃度を維持するための I L - 10 投与の実施形態を企図する。

【0175】

一般的に、投薬パラメータは、治療有効量が、被験体に対して不可逆的に有毒であり得る量 (すなわち、最大耐量、「M T D」) 未満であり、被験体に測定可能な効果を生成するために必要な量以上であることを必要とする。そのような量は、例えば、投与経路及び他の要因を考慮して、A D M Eに関連する薬物動態学的及び薬力学的パラメータによって決定される。

40

【0176】

治療有効量 (E D) とは、それを摂取する被験体のある割合に対して、治療応答または所望の効果を生じさせる薬剤の用量または量である。薬剤の「有効量中央値」または E D 50 は、投与を受ける集団の 50 % において治療応答または所望の効果を生じさせる薬剤の用量または量である。E D 50 は、薬剤の効果の合理的な期待尺度として一般的に使用さ

50

れるが、必ずしも医師が関連するすべての要因を考慮して適切と考えるであろう用量ではない。したがって、いくつかの状況では、有効量は、計算されたED50を上回ることが可能であり、他の状況では、有効量は、計算されたED50を下回ることが可能であり、さらに他の状況では、有効量は、計算されたED50と同等であり得る。

【0177】

PEG-IL-10の治療有効量の例は、約0.01～約100 µgのPEG-IL-10/kg体重/日、約0.1～20 µgのPEG-IL-10/kg体重/日、約0.5～10 µgのPEG-IL-10/kg体重/日、または約1～4 µgのPEG-IL-10/kg体重/日であり得る。いくつかの実施形態では、PEG-IL-10を連続注入により投与し、約50～800 µgタンパク質/kg体重/日（例えば、約1～16 µgタンパク質/kg体重/日のPEG-IL-10）を送達する。注入速度は、例えば、副作用及び血球数の評価に基づいて様々に変化させることができる。IL-10剤についての他の特定の投薬パラメータは、本明細書中の他の箇所に記載されている。

10

【0178】

特定の実施形態では、IL-10剤の用量は、「単位剤形」で表される。語句「単位剤形」とは、物理的に別個の単位を指し、各単位は、所定の量のIL-10剤を、単独で、または1つ以上の追加の薬剤と組み合わせて、所望の効果を生じるのに十分な量で含む。単位剤形のパラメータは、特定の薬剤及び達成すべき効果に依存することが理解されるであろう。

【0179】

IL-10剤の全身性レベルは：(1)特定のレベルを上回るレベルもしくはあるレベルの範囲内の平均IL-10血清トラフ濃度；(2)ある程度の時間の間、特定のレベルを上回る平均IL-10血清トラフ濃度；(3)特定のレベルを上回るかもしくは下回る定常状態のIL-10血清濃度レベル、またはあるレベルの範囲内の定常状態のIL-10血清濃度レベル；または(4)特定のレベルを上回るかもしくは下回る、またはあるレベルの範囲内の濃度特性のC_{max}を含む、いくつかの方法で特徴づけることができる。本明細書に記載されるように、IL-10剤の投与期間にわたるIL-10濃度の平均血清の維持は、特定の疾患状態の治療において特に有益であることが見出されている。

20

【0180】

本開示のいくつかの実施形態では、IL-10剤療法の経過中のIL-10剤の有用な血漿及び/または血清レベルの濃度特性には：約1.0 pg/mL超、約10.0 pg/mL超、約20.0 pg/mL超、約30 pg/mL超、約40 pg/mL超、約50.0 pg/mL超、約60.0 pg/mL超、約70.0 pg/mL超、約80.0 pg/mL超、約90 pg/mL超、約0.1 ng/mL超、約0.2 ng/mL超、約0.3 ng/mL超、約0.4 ng/mL超、約0.5 ng/mL超、約0.6 ng/mL超、約0.7 ng/mL超、約0.8 ng/mL超、約0.9 ng/mL超、約1.0 ng/mL超、約1.5 ng/mL超、約2.0 ng/mL超、約2.5 ng/mL超、約3.0 ng/mL超、約3.5 ng/mL超、約4.0 ng/mL超、約4.5 ng/mL超、約5.0 ng/mL超、約5.5 ng/mL超、約6.0 ng/mL超、約6.5 ng/mL超、約7.0 ng/mL超、約7.5 ng/mL超、約8.0 ng/mL超、約8.5 ng/mL超、約9.0 ng/mL超、約9.5 ng/mL超、または約10.0 ng/mL超の平均IL-10血漿及び/または血清トラフ濃度が含まれる。

30

40

【0181】

本開示の特定の実施形態において、IL-10剤を被験体に投与し、IL-10治療の経過中の平均IL-10血清トラフ濃度を1.0 pg/mL～10 ng/mLの範囲で、あるいは1.0 pg/mL～100 pg/mLの範囲、あるいは0.1 ng/mL～1.0 ng/mLの範囲、あるいは1.0 ng/mL～10 ng/mLの範囲で達成する。本開示は、そのような範囲が明示的に列挙されていなくても、本明細書に記載する濃度に包含される任意の濃度を含む範囲を意図することが理解されるべきである。一例として、一実施形態における平均血清IL-10濃度は、0.5 ng/mL～5 ng/mLの範囲であ

50

り得る。さらなる例として、本開示の特定の実施形態は、約 0.5 ng/mL ~ 約 10.5 ng/mL 、約 1.0 ng/mL ~ 約 10.0 ng/mL 、約 1.0 ng/mL ~ 約 9.0 ng/mL 、約 1.0 ng/mL ~ 約 8.0 ng/mL 、約 1.0 ng/mL ~ 約 7.0 ng/mL 、約 1.5 ng/mL ~ 約 10.0 ng/mL 、約 1.5 ng/mL ~ 約 9.0 ng/mL 、約 1.5 ng/mL ~ 約 8.0 ng/mL 、約 1.5 ng/mL ~ 約 7.0 ng/mL 、約 2.0 ng/mL ~ 約 10.0 ng/mL 、約 2.0 ng/mL ~ 約 9.0 ng/mL 、約 2.0 ng/mL ~ 約 8.0 ng/mL 、及び約 2.0 ng/mL ~ 約 7.0 ng/mL の範囲の平均 IL-10 血清トラフ濃度を含む。特定の実施形態では、 $1 \sim 2 \text{ ng/mL}$ の平均 IL-10 血清トラフ濃度を、治療期間にわたって維持する。

10

【0182】

本開示はまた、平均 IL-10 血清ピーク濃度が、IL-10 剤治療の期間にわたって約 10.0 ng/mL 以下である実施形態を企図する。さらなる実施形態は、平均 IL-10 血清トラフ濃度が約 1.0 pg/mL 以上であることを意図する。最適な平均血清濃度は、通常、望ましくない副作用を導入することなく所望の治療効果を達成する平均血清濃度である。

【0183】

本開示の特定の実施形態は、IL-10 治療を受ける被験体をモニタリングし、予測し、したがって副作用を潜在的に回避する方法を提供し、方法は：(1) 被験体の IL-10 のピーク濃度を測定し；(2) 被験体の IL-10 トラフ濃度を測定し；(3) ピークトラフ変動を算出し；及び(4) 算出したピークトラフ変動を用いて被験体における潜在的な副作用を予測することを含む。特定の被験体集団では、ピークトラフの変動が小さいことは、被験体が IL-10 関連副作用を経験する確率が低いことを示す。さらに、いくつかの実施形態、特にピークトラフ変動は、特定の投与パラメータを用いて特定の疾患、障害及び病態を治療するために決定され、その変動は参照標準として使用される。

20

【0184】

大多数の薬物について、血漿薬物濃度は多指数関数的に低下する。静脈内投与の直後に、薬物は最初の空間（血漿体積として最小限に画定される）全体に急速に分布し、血管外空間（例えば、特定の組織）へのより緩慢な平衡分布が生じる。静脈内 IL-10 投与は、そのような 2 区画動態モデルに関連する (Rachmawati, H. et al. (2004) Pharm. Res. 21 (11): 2072 - 78 参照)。皮下組換え hIL-10 の薬物動態も研究されている (Radwanski, E. et al. (1998) Pharm. Res. 15 (12): 1895 - 1901)。したがって、適切な IL-10 投薬関連パラメータを評価する場合、分布容積の考慮が適切である。さらに、IL-10 剤を特定の細胞型に標的化する努力が探求されている（例えば、Rachmawati, H. (May 2007) Drug Met. Dist. 35 (5): 814 - 21 参照）。

30

【0185】

本開示は、上記のように治療されている被験体における任意の IL-10 血清トラフ濃度の維持をもたらす IL-10 剤の任意の用量の投与及び投薬レジメンを企図する。非限定的な例として、被験体がヒトである場合、非ペグ化 hIL-10 は、 $0.5 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $1.0 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $2.5 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $5 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $7.5 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $10.0 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $12.5 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $15 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $17.5 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $20 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $22.5 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $25 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $30 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、または $35 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量で投与することができる。さらに、非限定的な例として、被験体がヒトである場合、比較的小さな PEG（例えば、5 kDa モノ-ジ-PEG-hIL-10）を含むペグ化 hIL-10 は、 $0.5 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $0.75 \mu\text{g/kg/day}$ を超える用量、 $1.0 \mu\text{g/kg/day}$ を

40

50

超える用量、 $1.25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $1.75 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $2.25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $2.75 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $3.0 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $3.25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $3.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $3.75 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $4.25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $4.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、 $4.75 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量、または $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を超える用量で投与することができる。

【0186】

特定のIL-10血清濃度などを達成するのに必要なIL-10血清濃度、用量及び治療プロトコルに関する先の考察は、IL-10剤（例えば、PEG-IL-10）による単剤療法に属するが、1つ以上のさらなる療法と組み合わせてIL-10剤（例えば、PEG-IL-10）を投与する場合、当業者（例えば、薬理学者）は、最適な投薬レジメン（複数可）を決定することができる。

10

【0187】

投与経路

本開示は、任意の適切な様式でのIL-10剤（例えば、PEG-IL-10）、及びその組成物の投与を企図する。投与の最適な経路として、非経口（例えば、筋肉内、静脈内、皮下（例えば、注射またはインプラント）、腹腔内、大槽内、関節内、腹腔内、脳内（実質内）及び脳室内）、経口、経鼻、経膈、舌下、眼内、経直腸、局所（例えば、経皮）、舌下及び吸入が挙げられる。一般的に、皮下または筋肉内に投与するデポ注射もまた、本明細書に開示するIL-10剤を規定の期間にわたって放出するために利用することができる。

20

【0188】

疾患抗原特異的PD1 + CD8 + 末梢T細胞の作製方法

上記のように、本開示は、一実施形態において、治療有効量のIL-10剤を患者に投与することによる、IL-10剤療法で治療可能な疾患を有する被験体の末梢における疾患抗原特異的CD8 + T細胞の増殖の誘導方法を提供する。さらに、疾患抗原特異的CD8 + T細胞は、治療有効量のIL-10剤を被験体に投与した後に被験体から組織試料を得ることによって単離され得る。一実施形態では、抗原特異的CD8 + T細胞は、PD1 + （例えば、PD1 mid-high）であり、被験体から末梢血試料を採取することによって、治療有効量のIL-10剤で治療した被験体からCD8 + T細胞を得ることができる。

30

【0189】

図7を参照すると、本開示の方法の一般的な実施例は、IL-10剤療法、例えばPEG-IL-10療法を、IL-10剤による治療を受け入れ可能な疾患を有する患者に投与することを含み得る710。患者が所定時間IL-10剤療法を受けた後、リンパ球（例えば、末梢血リンパ球（PBL）を含む末梢血試料）を含む組織試料を患者から採取する720。場合により、IL-10剤療法に対する奏効について患者をモニタリングしてもよい。いくつかの場合には、患者がIL-10剤治療に対して少なくとも安定状態または少なくとも部分奏効を示す場合、組織試料を患者から採取する。いくつかの場合には、患者が少なくとも安定または少なくとも部分奏効を示さない場合、組織試料を採取せずにIL-10剤療法を継続する。

40

【0190】

患者から組織試料を採取した後720、組織試料中の核酸を核酸配列決定によって分析し740、TCR配列を得る（例えば、可変（V）TCRポリペプチドをコードする核酸及び/または可変（V）TCRポリペプチドをコードする核酸）。この配列を分析して、CD8 + T細胞上に発現するTCRに対するV TCRポリペプチドをコードする核酸及び/またはV TCRポリペプチドをコードする核酸の[相対的]存在量の推定値を取得し得る。試料中のCD8 + T細胞上に発現するTCRのV TCRポリペプチドを

50

コードする核酸及び／またはV T C Rポリペプチドをコードする核酸と、I L - 1 0 剤療法の前、またはI L - 1 0 剤療法の初期の時点でI L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な疾患を有する1人以上の患者から採取した参照試料中のC D 8 + T細胞上に発現するT C RのV T C Rポリペプチドをコードする核酸及び／またはV T C Rポリペプチドをコードする核酸とを比較することによって、抗原特異的T C R（鎖及び鎖のT C Rペア配列によって定義される）を発現する特定のT細胞集団が、クローン的に増大し、クローン的に収縮しているか、またはI L - 1 0 剤療法に应答して新たに生成したかどうかを判定することが可能である。

【0191】

試料中のV T C Rポリペプチドをコードする核酸及び／またはV T C Rポリペプチドをコードする核酸の存在量は、任意の適切な手段を用いて測定してもよい。いくつかの場合には、存在量とは、V T C Rポリペプチドをコードする核酸及び／またはV T C Rポリペプチドをコードする核酸の、参照核酸に比べた出現頻度である。いくつかの場合には、存在量とは、V T C Rポリペプチドをコードする核酸及び／またはV T C Rポリペプチドをコードする核酸の、参照核酸に比べた数、またはその生物情報学的に取得した推定値である。

10

【0192】

増大は、3倍以上、例えば5倍以上、10倍以上、20倍以上、または30倍以上の参照試料と比較した、被験体由来の試料中のV T C Rポリペプチド及び／またはV T C Rポリペプチドをコードする核酸の存在量の変化を含み得る。

20

【0193】

いくつかの場合では、試料は、関心対象の抗原特異的C D 8 + T細胞を単離するために、細胞表面マーカー発現に基づいて分画され得るP B Lを含有する。関心対象のC D 8 + T細胞には、P D 1（C D 2 7 9）及び／またはL A G 3などの細胞表面マーカーの上昇した発現に基づいて同定された活性化疾患抗原特異的C D 8 + T細胞が含まれ得る。いくつかの実施形態では、方法は、場合により、末梢血試料からP D 1 + C D 8 + T細胞及び／またはP D - 1 + L a g 3 + C D 8 + T細胞を同定及び単離することを含み得る。一実施形態では、T細胞は、P D 1 m i d - h i g h、C D 8 +として同定及び単離され、ならびにI F N、C D 4 5 R O、グランザイムB、及びパーフォリンのうちの1つ以上の発現について陽性である。単離されたC D 8 + T細胞、例えばP D 1 + C D 8 + T細胞を、疾患関連抗原に特異的な活性化T細胞中で富化してもよく、それに伴い、その疾患抗原特異性は及び鎖T C Rペア配列に応じたものとなる。

30

【0194】

これらのT C Rペアのアミノ酸配列は、疾患抗原特異性をT細胞に付与する配列を含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の方法は、全長及び鎖T C Rペアのアミノ配列をコードする核酸構築物、または及び鎖T C Rペアのアミノ配列の可変領域を含むキメラ抗原受容体をコードする核酸構築物を形質導入することによって、組換え疾患抗原特異的T細胞を生成する750ことを含み、ここで、及び鎖T C Rペアのアミノ配列は、I L - 1 0 剤で治療した患者から採取した疾患抗原特異的T細胞含有組織試料由来であった。次いで、これらの改変型疾患抗原特異的T細胞を、改変型疾患抗原特異的T細胞上に発現するT C Rが特異的に結合する抗原を発現していることを特徴とする疾患の治療を必要とする適切な患者に投与してもよい。

40

【0195】

本開示の方法は、病状を治療するためにI L - 1 0 剤を投与した患者から疾患抗原特異的C D 8 + T細胞の集団を得ることを含み得る。患者は、I L - 1 0 剤療法に应答する疾患、例えばC D 8 + T細胞の抗原反応性細胞傷害活性が病状の改善に寄与するような病状を有する任意の個体であり得る。

【0196】

患者は、限定するものではないが、がん；コレステロール関連疾患、ならびにウイルス、細菌、真菌、原生動物及び細胞内生活環を有する寄生虫などの感染性因子によって引き起

50

こされる疾患を含む I L - 1 0 剤療法に応答する任意の病状を有していてもよい。

【 0 1 9 7 】

本明細書に記載の方法によれば、病態または疾患は、がんまたはがん関連障害などの増殖性障害であり得る。特定のがんに限定されないが、がんは、結腸癌、メラノーマ及び扁平上皮癌に関連する腫瘍を含む固形腫瘍であり得るか、または血液学的障害であり得る。患者は、子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、胃腸管（例えば、食道、口腔咽頭、胃、小腸もしくは大腸、結腸、または直腸の癌を含むが、これらに限定されない）、腎臓、腎臓細胞、膀胱、骨、骨髓、皮膚、頭頸部、皮膚、肝臓、胆嚢、心臓、肺、脾臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳（例えば、神経膠腫）、神経節、中枢神経系（C N S）及び末梢神経系（P N S）の癌；ならびに造血系及び免疫系の癌（例えば、脾臓または胸腺）が挙げられる。特定の実施形態では、腫瘍またはがんは、結腸癌、卵巣癌、乳癌、メラノーマ、肺癌、膠芽細胞腫、または白血病である。がん関連疾患、障害及び病態という用語（複数可）の使用は、がんに直接的または間接的に関連する状態を広く指すこと意味し、例えば、血管形成及び異形成などの前がん状態を含む。いくつかの実施形態では、がんは転移性である。

10

【 0 1 9 8 】

ウイルス感染因子には、一本鎖 DNA（s s DNA）、二本鎖 DNA（d s DNA）及び RNA ウイルスが含まれる。いくつかの実施形態では、ウイルスは、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、またはヘルペスウイルスである。いくつかの場合では、患者は、限定されないが、A 型肝炎、B 型肝炎（H B V）、C 型肝炎（H C V）、インフルエンザ、水痘帯状疱疹ウイルス（V Z V）、アデノウイルス、エプスタイン - バーウイルス（E B V）、単純ヘルペスウイルス I 型（H S V - I）、単純ヘルペスウイルス II 型（H S V - I I）、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、R S ウイルス、ヒトパピローマウイルス（H P V）、パポバウイルス、サイトメガロウイルス（C M V）、エキノウイルス、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ヒト免疫不全ウイルス I 型（H I V - I）、及びヒト免疫不全ウイルス II 型（H I V - I I）、ヒト T リンパ球性ウイルス（H T L V - 1 及び H T L V - 2）、コロナウイルス、ポリオウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6 型（H H V - 6）などによって引き起こされるウイルス感染を有する。

20

【 0 1 9 9 】

いくつかの実施形態では、患者は、以下にさらに記載するように I L - 1 0 剤を投与した被験体であり、その病状は、I L - 1 0 剤治療に対して少なくとも臨床部分応答を示す。治療に対する臨床応答は、任意の適切な方法を用いて測定してもよく、治療する病状によって様々に異なるであろう。

30

【 0 2 0 0 】

例えば、病態が腫瘍である場合、I L - 1 0 剤治療に対する被験体の応答は、例えば、腫瘍負荷（例えば、腫瘍質量、腫瘍体積、腫瘍バイオマーカーの量など）及び / または治療前後の腫瘍分布を測定することによって得られる。I L - 1 0 剤治療に対するがんを有する被験体の「臨床部分応答」は、一般的に、腫瘍のサイズの減少、または患者の体内におけるがんの程度の低下を指し、治療前に比べた、治療後の測定臨床変数（例えば、腫瘍体積及び / または腫瘍質量）の、5 0 % 以上を含む 1 0 % 以上の、例えば、2 0 % 以上、3 0 % 以上、4 0 % 以上の、及び 6 0 % 以下を含む 9 9 % 以下の、例えば 9 0 % 以下、8 0 % 以下、7 0 % 以下の減少を含み得、ここで、1 0 0 % の減少は、測定した臨床変数が検出不可能なレベル及び / またはバックグラウンドレベルまで低下することを表し得る。病態のバックグラウンドレベルは、その病態を有していないことが既知の個体で得られた病態の臨床変数の平均測定値であってもよい。対照的に、がんの被験体は、I L - 1 0 剤療法後に「安定」を呈していると称され、そこでは、選択した臨床変数（例えば、腫瘍体積及び / または腫瘍質量など）によって測定されるがんの程度または重症度は減少も増加もしない。がんの被験体は、I L - 1 0 剤療法後の治療に対する「非応答者」として分類され、そこでは、選択した臨床変数（例えば、腫瘍体積及び / または腫瘍質量など）によって測定されるがんの程度または重症度は増加する。

40

50

【0201】

いくつかの実施形態では、IL-10 剤治療に対するウイルス感染性疾患の応答は、関連する臨床測定値、例えば、IL-10 剤治療の前及び後の、ウイルス力価（例えば、血中の）、抗ウイルス抗体（例えば、血中の）、ウイルス由来核酸のレベル（例えば、PCR によって検出する血中または組織中の）を比較することによって得られる。IL-10 剤治療に対するウイルス感染の「臨床部分応答」は、測定される臨床変数（例えば、ウイルス力価、ウイルス特異的抗体力価及び／またはウイルスタンパク質力価）において、治療前に比べて治療後に、50%以上を含む10%以上の、例えば20%以上、30%以上、40%以上の、及び60%以下を含む99%以下の、例えば90%以下、80%以下、70%以下の減少を含み得、ここで、100%の減少は、測定される臨床変数が検出不可能なレベル及び／またはバックグラウンドレベルまで低下することを表し得る。例えば、いくつかの実施形態では、IL-10 剤療法に対する少なくとも臨床部分応答は、血中または血液画分（血清／血漿）中の qPCR によって検出可能なウイルス核酸の少なくとも90%の減少；既知のウイルス抗原（複数可）に対する抗体力価の少なくとも90%の減少；血清中のウイルスタンパク質（例えば、ELISA によって検出する）の少なくとも90%の減少の1つ以上であり得る。病態のバックグラウンドレベルは、病態を有していないことが既知の個体で得られる病態の臨床変数の平均測定値であってもよい。

10

【0202】

IL-10 剤療法は、病態を治療するための上記の任意の適切な IL-10 剤療法であってもよく、治療有効量の IL-10 剤を患者に投与することを含む。適切な IL-10 剤として、組換えヒト IL-10 及びペグ化 IL-10 が挙げられ、例えば、US 6,217,857；US 2008/0317707；及び US 8,691,205 に記載されている。いくつかの実施形態では、IL-10 剤は、例えば US 8,691,205 に記載されているようなペグ化 IL-10、例えば、モノペグ化 IL-10 及びジペグ化 IL-10 などの混合物である。投与レジメンは、病態、例えばがんまたは感染性疾患に対する治療効果を達成するための任意の適切な投薬量、投薬間隔、及び投薬期間を含み得る。いくつかの場合には、投与レジメンは、10 µg / Kg 以上を含む 0.1 µg / Kg 以上の、例えば 0.5 µg / Kg 以上、1.0 µg / Kg 以上、2.0 µg / Kg 以上、5.0 µg / Kg 以上の IL-10 剤の投与量、及び 20 µg / Kg 以下を含む 50 µg / Kg 以下、例えば 40 µg / Kg 以下、30 µg / Kg 以下の投与量を含む。いくつかの場合には、投与レジメンは、10 ~ 40 µg / Kg を含む 0.1 ~ 50 µg / Kg、0.5 ~ 40 µg / Kg、1.0 ~ 40 µg / Kg の範囲の IL-10 剤の投与量を含む。

20

30

【0203】

いくつかの場合には、IL-10 剤の投与レジメンは、1日に1回またはそれより短い間隔を含む、1週間に1回またはそれより短い間隔で、例えば3日に1回またはそれより短い間隔で、2日に1回またはそれより短い間隔で、及び、1日1回またはそれより長い間隔を含む、1日3回またはそれより長い間隔で、例えば1日2回またはそれより長い間隔で投与することを含む。いくつかの場合には、投与レジメンは、1日2回 ~ 2日に1回を含む、1日3回 ~ 週1回、例えば1日2回 ~ 3日に1回の範囲の間隔で投与することを含む。いくつかの場合には、IL-10 療法を、少なくとも1 ~ 150日間、少なくとも5 ~ 100日間、少なくとも10 ~ 50日間、少なくとも15 ~ 45日間、少なくとも20 ~ 40日間、少なくとも30日以上、患者に投与し、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、または29日以上の間、投与してもよい。いくつかの場合には、IL-10 剤を、3か月以上を含む数週間、例えば、3週間以上、4週間以上、5週間以上、6週間以上、2か月以上の間、及び3か月以下を含む5年以下、例えば1年以下、9か月以下、6か月以下の間、投与する。いくつかの実施形態では、IL-10 療法を、4週間 ~ 6か月間を含む2週間 ~ 5年、例えば3週間 ~ 1年間、4週間 ~ 9か月間、患者に投与した。

40

【0204】

50

上記のように、IL-10 剤療法で治療した患者から得られる組織試料は、CD8 + T細胞を含む任意の適切な組織試料であり得る。いくつかの場合には、組織試料は、原発腫瘍またはその転移由来の試料のような腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、試料は末梢血試料である。いくつかの実施形態では、末梢血CD8 + T細胞は、患者から採取した試料、例えば末梢血試料から単離する。本明細書中で使用する場合、「末梢血」とは、個体の循環器系内を循環する血液を指す。末梢血試料は、血液の循環プールから直接採取してもよい。本開示の態様によれば、任意の適切な方法を用いて、上記のようにIL-10 剤で治療した患者から、末梢CD8 + T細胞の集団を採取してもよい（例えば、Fuss et al. (2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1, John Wiley, Inc. NY）。いくつかの実施形態では、試料はリンパ節試料、またはリンパ試料である。

10

【0205】

患者試験試料、ならびにCD8 + T細胞を含む任意の適切な患者参照試料は、任意の適切な時間に患者から採取し得る。いくつかの実施形態では、IL-10 剤療法の開始前に参照試料を採取し、治療開始後に試験試料を採取することが重要であり得る。患者の病態が、少なくとも安定している（安定）か、またはIL-10 剤療法に対する少なくとも臨床部分応答（PR）を示した後の時点で試験試料を採取した。試験試料（及び/またはT細胞増殖に対する継続的なIL-10 剤療法の効果の分析に関心がある場合、参照試料）を採取する時点として以下が挙げられるが、これらに限定されない：治療開始から1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、または29日以内もしくは以後、またはそれ以降、及び、例えば、治療開始から1～200日、10～190日、20～180日後であってもよい。いくつかの場合では、CD8 + T細胞を含有する試料は、3か月以上を含む数週間、例えば3週間以上、4週間以上、5週間以上、6週間以上、2か月以上、及び3か月以下を含む5年以下、例えば、1年以下、9か月以下、6か月以下の間のIL-10 剤投与後の患者から採取してもよい。いくつかの実施形態では、CD8 + T細胞を含む試料を採取する前に、IL-10 療法を、4週間～6か月を含む2週間～5年、例えば3週間～1年間、4週間～9か月、患者に投与した。

20

【0206】

いくつかの場合には、患者から採取する試料を任意の都合の良い様式で処理して、CD8 + T細胞、例えば、末梢CD8 + T細胞を単離してもよい。いくつかの場合には、試料中のリンパ球、例えば末梢血リンパ球（PBL）を、リンパ球、例えばPBL上の細胞表面マーカーの発現に基づいて選別または分画して、特定のCD8 + T細胞サブタイプ（例えば、PD1mid-high、CD8 + T細胞）で富化したCD8 + T細胞の集団を含む1つ以上の試料を提供する。選別または分画は、任意の適切な方法、例えば、蛍光標識細胞分取（FACS）、磁気ビーズに基づく分離などを用いてもよい。

30

【0207】

試料中に含まれる及び/または患者から採取した試料から単離したCD8 + T細胞の集団を、活性化され、抗原特異的である任意の適切なCD8 + T細胞で富化してもよい。上記のように、T細胞は、細胞表面マーカー発現、例えばPD1（CD279としても知られる）細胞表面発現の実質的に二峰性の分布を示し得る。したがって、PD1の表面発現に基づいて活性化T細胞を同定する場合、PD1細胞表面発現のより高いピーク周辺の細胞を「PD1high」として分類し、PD1細胞表面発現のより低いピーク周辺の細胞を「PD1low」として分類する。活性化CD8 + T細胞を含むCD8 + T細胞の集団は、PD1high細胞とPD1low細胞との間に、中間の細胞集団（PD1mid）を含む場合があり、そこでは、PD1mid細胞は、PD1low細胞よりも高いが、PD1high細胞より低いレベルのPD1細胞表面発現を有する。したがって、関心対象の活性化抗原特異的CD8 + T細胞は、PD1の中～高レベルの細胞表面発現（「PD1mid-high」）を有し得る。換言すれば、活性化抗原特異的CD8 + T細胞は、細胞

40

50

表面上の P D 1 発現が低くない（すなわち、「P D 1 l o w」ではない）C D 8 + T 細胞の集団であり得る。

【 0 2 0 8 】

細胞表面マーカー、例えば P D 1 の発現レベルを測定してもよく、所望の範囲内にある細胞表面マーカーの発現レベルを有する細胞を、任意の適切な方法、例えば、限定するものではないが、細胞表面マーカーに対する蛍光検出可能な抗体で細胞を標識し、続いて F A C S で；または磁気ビーズに基づく分離法などを用いて単離してもよい。

【 0 2 0 9 】

抗原特異的 C D 8 + T 細胞は、抗原特異的 C D 8 + T 細胞用の任意の他の適切なマーカーによって定義され得る。いくつかの実施形態では、抗原特異的 C D 8 + T 細胞は、C D 4 5 R O の細胞表面発現の上昇（「C D 4 5 R O +」）を示す。いくつかの実施形態では、抗原特異的 C D 8 + T 細胞は、インターフェロン（I F N）を高レベルに発現する（「I F N +」）。いくつかの実施形態では、抗原特異的 C D 8 + T 細胞は、T 細胞活性化のマーカーであるグランザイム B 及び/またはパーフォリンの発現の上昇を示す。したがって、本開示は、P D 1 及び C D 8 細胞表面発現、ならびに例えば以下のような他のマーカーの任意の組合せを企図する：

【 0 2 1 0 】

1) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、C D 4 5 R O + ；

【 0 2 1 1 】

2) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、I F N + ；

【 0 2 1 2 】

3) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、C D 4 5 R O +、グランザイム B + ；

【 0 2 1 3 】

4) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、C D 4 5 R O +、パーフォリン + ；

【 0 2 1 4 】

5) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、C D 4 5 R O +、グランザイム B +、パーフォリン + ；

【 0 2 1 5 】

6) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、I F N +、グランザイム B + ；

【 0 2 1 6 】

7) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、I F N +、パーフォリン + ；

【 0 2 1 7 】

8) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、I F N +、グランザイム B +、パーフォリン + ；

【 0 2 1 8 】

9) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、グランザイム B + ；

【 0 2 1 9 】

1 0) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、グランザイム B +、パーフォリン + ；

【 0 2 2 0 】

1 1) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、パーフォリン + ；または

【 0 2 2 1 】

1 2) P D 1 + (例えば、P D 1 m i d - h i g h)、C D 8 +、I F N +、C D 4 5 R O +、グランザイム B +、パーフォリン + 。

【 0 2 2 2 】

1 3) L A G 3 + (例えば、L A G 3 m i d - h i g h)、C D 8 +、C D 4 5 R O + ；

10

20

30

40

50

【 0 2 2 3 】

1 4) L A G 3 + (例 え ば 、 L A G 3 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 I F N + ;

【 0 2 2 4 】

1 5) L A G 3 + (例 え ば 、 L A G 3 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 C D 4 5 R O + 、
グ ラ ン ザ イ ム B + ;

【 0 2 2 5 】

1 6) L A G 3 + (例 え ば 、 L A G 3 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 C D 4 5 R O + 、
パ ー フ ォ リ ン + ;

【 0 2 2 6 】

1 7) L A G 3 + (例 え ば 、 L A G 3 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 C D 4 5 R O + 、
グ ラ ン ザ イ ム B + 、 パ ー フ ォ リ ン + ;

10

【 0 2 2 7 】

1 8) L A G 3 + (例 え ば 、 L A G 3 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 I F N + 、 グラ
ン ザ イ ム B + ;

【 0 2 2 8 】

1 9) L A G 3 + (例 え ば 、 L A G 3 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 I F N + 、 パー
フ ォ リ ン + ;

【 0 2 2 9 】

2 0) L A G 3 + (例 え ば 、 L A G 3 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 I F N + 、 グラ
ン ザ イ ム B + 、 パ ー フ ォ リ ン + ;

20

【 0 2 3 0 】

2 1) L A G 3 + (例 え ば 、 L A G 3 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 グラ ン ザ イ ム B + ;

【 0 2 3 1 】

2 2) P D 1 + (例 え ば 、 P D 1 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 グラ ン ザ イ ム B + 、 パ
ー フ ォ リ ン + ;

【 0 2 3 2 】

2 3) P D 1 + (例 え ば 、 P D 1 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 パ ー フ ォ リ ン + ; ま た は

【 0 2 3 3 】

2 4) P D 1 + (例 え ば 、 P D 1 m i d - h i g h) 、 C D 8 + 、 I F N + 、 C D 4 5
R O + 、 グラ ン ザ イ ム B + 、

30

【 0 2 3 4 】

2 5) P D 1 + 、 L A G 3 + 、 C D 8 + 、 C D 4 5 R O + ;

【 0 2 3 5 】

2 6) P D 1 + 、 L A G 3 + 、 C D 8 + 、 I F N + ;

【 0 2 3 6 】

2 7) P D 1 + 、 L A G 3 + 、 C D 8 + 、 C D 4 5 R O + 、 グラ ン ザ イ ム B + ;

【 0 2 3 7 】

2 8) P D 1 + 、 L A G 3 + 、 C D 8 + 、 C D 4 5 R O + 、 パ ー フ ォ リ ン + ;

【 0 2 3 8 】

2 9) P D 1 + 、 L A G 3 + 、 C D 8 + 、 C D 4 5 R O + 、 グラ ン ザ イ ム B + 、 パ ー フ ォ
リ ン + ;

40

【 0 2 3 9 】

3 0) P D 1 + 、 L A G 3 + 、 C D 8 + 、 I F N + 、 グラ ン ザ イ ム B + ;

【 0 2 4 0 】

3 1) P D 1 + 、 L A G 3 + 、 C D 8 + 、 I F N + 、 パ ー フ ォ リ ン + ;

【 0 2 4 1 】

3 2) P D 1 + 、 L A G 3 + 、 C D 8 + 、 I F N + 、 グラ ン ザ イ ム B + 、 パ ー フ ォ
リ ン + ;

【 0 2 4 2 】

3 3) P D 1 + 、 L A G 3 + 、 C D 8 + 、 グラ ン ザ イ ム B + ;

50

【0243】

34) PD1+, LAG3+, CD8+, グランザイムB+, パーフォリン+;

【0244】

35) PD1+, LAG3+, CD8+, パーフォリン+; または

【0245】

36) PD1+, LAG3+, CD8+, IFN γ +, CD45RO+, グランザイムB+,

【0246】

その発現を用いて、活性化及び/または抗原特異的CD8+T細胞を分類及び富化し得る他の適切な細胞表面マーカーとして、限定するものではないが、LAG-3、TIM-3、4-1BB、CTLA-4及びICOSの1つ以上が挙げられる(例えば、Grosset al., J Clin Invest. 2014 May; 124(5): 2246-59 参照)。

10

【0247】

疾患抗原特異的CD8+T細胞のTCR分析とライブラリー作製

配列決定さらなる態様において、本開示の方法は、抗原特異的(例えば、PD1+及び/またはLAG3+)CD8+T細胞を含む試料由来のT細胞受容体(TCR)の及び鎖をコードするヌクレオチド配列を含む核酸の配列決定を含む。配列決定は、CD8+T細胞、例えば単離されたCD8+T細胞を含有する試料中に発現する機能的な抗原特異的TCRを構成する及び鎖の可変領域中の少なくとも相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列を決定可能な任意の適切な方法を用いて行ってもよい。適切な方法は、例えば、US20140322716、US20130273647、US20150031043に記載されている(例えば、Howie et al., "High-throughput pairing of T cell receptor and sequences," Science translational medicine 7.301(2015): 301ra131-301ra131も参照)。

20

【0248】

いくつかの実施形態では、配列決定は、ハイスループット配列決定プラットフォーム(例えば、Roche 454(例えば、Roche 454 GS FLX); Applied BiosystemsのSOLiD(登録商標)システム(例えば、SOLiD(登録商標)v4); IlluminaのGAIIx、HiSeq(登録商標)2000及びMiSeq(登録商標)シーケンサー; Life TechnologiesのIon Torrent(登録商標)半導体配列決定プラットフォーム、Pacific BiosciencesのPacBio RS及びSangerの3730xl); 多様なTCR配列を増幅するように設計された適切なプライマー対; 及び個々のCD8+T細胞、例えば単離されたCD8+T細胞上に発現する及び鎖のペアを決定するために、適切なコンピュータアルゴリズムを使用することを含み得る。適切な方法は、例えば、US20140322716、US20150031043に記載されており、これらの各々は、参照として本明細書に援用する。

30

【0249】

いくつかの実施形態では、配列決定は、CD8+T細胞、例えば単離されたCD8+T細胞の集団の個々の細胞を選別し、個々に選別したCD8+T細胞、例えば単離されたCD8+T細胞に発現するTCRの及び鎖をコードするヌクレオチド配列の配列を決定することを含み得る(例えば、US20130273647; Kobayashi et al., Nat Med. 2013 Nov; 19(11): 1542-6 参照)。

40

【0250】

いくつかの実施形態では、CD8+T細胞、例えば単離されたPD1+CD8+T細胞をin vitroで培養し、T細胞由来の核酸を配列決定する前に、患者から採取した単離CD8+T細胞の集団を増大させ、及び/または選択してもよい。任意の適切な方法を使用して、培養中の単離された抗原特異的CD8+T細胞の集団を増大させ、及び/また

50

は選択してもよい。

【0251】

CD8+T細胞、例えば単離されたCD8+T細胞の表面上に発現するTCRの 及び 鎖ペアをコードする核酸を配列決定した後、各鎖のCDR領域を含む 及び 鎖のアミノ酸配列を決定してもよい。

【0252】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、上記の方法によって決定するCD8+T細胞、例えば単離されたCD8+T細胞の表面上に発現するTCRの 及び 鎖ペアのアミノ酸配列を分析することを含む。いくつかの実施形態では、分析は、IL-10剤で治療した患者の末梢血に由来するTCR配列の 及び 鎖ペアを、IL-10剤治療前の患者の病理部位に由来するTCR配列の同様の 及び 鎖ペアと比較することを含み得る。そのような分析は、IL-10剤治療によって優先的に増大するT細胞上に発現する1つ以上の抗原特異的TCRを明らかにする可能性がある。病理部位は、例えば腫瘍または感染部位であってもよく、病理部位に浸潤するT細胞は、IL-10剤治療前に生検によって患者から採取してもよい。

10

【0253】

いくつかの場合には、分析は、1人以上の患者由来の複数のクローンの 及び/または 鎖アミノ酸配列を比較し、公知または公知ではない疾患関連抗原に特異的なTCRの 及び/または 鎖のコンセンサス一次構造を生成することを含み得る。コンセンサス一次構造は、一次構造中のアミノ酸位置に応じて様々に異なるアミノ酸配列の任意の特徴を含み得、特徴は抗原特異性に関連し得る。関心対象のコンセンサス一次構造には、 及び/または 鎖の長さに沿ったコンセンサス電荷分布、ならびに 及び/または 鎖のコンセンサスアミノ酸配列が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0254】

いくつかの場合には、CD8+T細胞、例えば単離されたCD8+T細胞の表面上に発現するTCRの 及び 鎖ペアのアミノ酸配列を分析することは、多数の患者由来の複数のクローンの 及び/または 鎖アミノ酸配列を比較し、試料の1つ以上のパラメータに基づいて、TCRの 及び/または 鎖のコンセンサス一次構造を生成することを含み得る。パラメータは、患者のハプロタイプ、患者の有する疾患のタイプ（例えば、がんのタイプ、感染のタイプ）などを含むが、これらに限定されない試料の任意の適切なパラメータであり得る。例えば、いくつかの場合には、アミノ酸配列を分析することにより、患者が患者に特有の疾患または疾患抗原に対するクローンの 及び/または 鎖アミノ酸配列を有すること（すなわち、「プライベート」T細胞応答）を明らかにしてもよい。いくつかの場合には、アミノ酸配列を分析することにより、2人以上の患者がそれぞれ、疾患または疾患抗原（すなわち、「パブリック」T細胞応答）と類似のクローンの 及び/または 鎖アミノ酸配列を有することを明らかにしてもよい。

30

【0255】

CD8+T細胞、例えば単離されたCD8+T細胞の表面上に発現するTCRの 及び 鎖ペアのアミノ酸配列間のコンセンサス配列の分析は、任意の簡便な方法を用いて行ってもよい。適切な方法は、例えば、Khan, et al. Journal of Infectious Diseases 185.8 (2002): 1025-1034; Trautmann, et al. European journal of immunology 32.11 (2002): 3181-3190に記載されている。通常、アミノ酸配列の分析は、TCRの抗原特異性に寄与するTCRの 及び 鎖の領域にわたって実施する。いくつかの場合では、分析は、TCRの 及び 鎖の一方または両方の可変領域（V 及びV ）の1つ以上の相補性決定領域（CDR、例えばCDR1、CDR2及び/またはCDR3）に関して実施する。いくつかの場合には、分析は、TCRの 及び 鎖の可変領域に関して実施する。いくつかの場合には、分析は、可変領域及び定常領域（すなわち全長 及び 鎖TCRポリペプチド）を含むTCRの 及び 鎖の領域に関して実施する。いくつかの場合には、分析は、TCRの全長 及び 鎖に関して実施する。

40

50

【0256】

抗原特異性の分析いくつかの実施形態では、CD8 + T細胞、例えば単離されたCD8 + T細胞をさらに選別して、公知の抗原、例えば公知の疾患抗原に特異的な、またはT細胞を採取した患者の疾患組織に存在する新たな抗原に特異的な細胞を同定し、単離してもよい。

【0257】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して、新規疾患抗原特異的TCR / ペア及び／または新規疾患特異的抗原を同定することができる。そのような実施形態では、疾患抗原特異性は、IL - 10剤治療の前に、患者CD8 + T細胞を含む病変組織の試料を患者から採取する（例えば、固形腫瘍生検）ことによって評価することができる。この前処理試料は、アーカイブ試料として使用することができる。この前処理試料を、本明細書に記載の後処理試料と同じ処理及び分析に供し、前処理試料中のTCR 及び 配列を得ることができる。次いで、前処置試料中に存在するTCR 配列を、治療後の試料（複数可）（例えば、IL - 10剤療法の開始後の異なる時点で採取した）のTCR 配列と比較して、IL - 10剤治療前及びIL - 10剤治療後（例えば、異なる時点で、例えば、1日目と、1日目、5日目、10日目、15日目、20日目、30日目などの1つ以上とを比較して）に疾患組織T細胞内に存在するTCR 及び 配列を同定することができる。IL - 10剤療法後に出現頻度が高まったTCR 及び／または 配列は、IL - 10剤療法に応答して増大した、疾患組織の抗原に特異的な（例えば、腫瘍抗原特異的な）CD8 + T細胞のTCRとして同定される。

【0258】

疾患抗原結合特異性は、例えば、IL - 10剤療法後に増大した患者のT細胞上に存在するTCRを同定することによって分析することができる。例えば、IL - 10剤治療の前に、患者CD8 + T細胞を含有する疾患組織または疾患関連組織の試料（例えば、固形腫瘍生検、ウイルス感染組織など）中に存在するV 及び／またはV TCRポリペプチドのアミノ酸配列、またはコードする核酸配列を患者から採取する。この前処理試料は、アーカイブ試料として使用できる。前処理試料はTCR 関連配列の供給源として使用されるため、この試料をT細胞の選択に供する必要はないことに留意すべきである。

【0259】

前処理及び後処理試料中に存在するV 及び／またはV TCRポリペプチドのコード核酸配列、またはアミノ酸配列を決定してもよい。V TCRポリペプチド配列は、通常、V TCRポリペプチドよりもTCR間でより多様性を示すため、この段階での配列分析は、前処理及び後処理試料中のV TCRポリペプチド（その断片、例えば、V TCRのCDR3などを含む）のアミノ酸配列またはそのコードする核酸に対してのみ実施することができる。次いで、TCR 及び／または 配列を比較して、IL - 10剤療法の前に疾患組織に存在するT細胞中に存在するもの、及びIL - 10剤療法後に出現頻度が高まったこれらの配列を決定することができる。IL - 10剤療法後の出現頻度が、選択したバックグラウンドレベルを超えて増加するTCR 配列は、疾患組織の抗原に特異的なTCR（例えば、腫瘍抗原特異的、ウイルス抗原特異的）に関連するものとして同定され、IL - 10剤療法によって増大するT細胞クローン中に存在するTCRを表す。

【0260】

同定した疾患抗原特異的TCRのV 及び／またはV TCRポリペプチドの（例えば、TCRのV / V ポリペプチド対を含む、V 及び／またはV TCRポリペプチドの）アミノ酸配列、コードする核酸配列、ならびにそのようなコードする核酸配列を含む構築物は、核酸及び／またはクローンのライブラリー、ならびに核酸配列及び／またはアミノ酸配列情報のデータベースに含めるうえで特に重要である。同様に、本開示は、少なくともV ポリペプチドについての核酸及び／またはアミノ酸配列情報のデータベースの構築を提供し、場合により、V ポリペプチド配列情報、ならびに前処理試料中に存在するT細胞のV / V ポリペプチド対の配列情報を含むことができる。

【0261】

疾患抗原結合特異性は、患者の前治療疾患組織への特異的結合を評価することによって、例えば、IL-10 剤療法にตอบสนองして上方制御または誘導することによって同定される TCR / ペアを含む組換え TCR (例えば、CAR-T) を発現するように遺伝子改変した CD8+T 細胞の特異的結合を試験することによって分析することができる。そのような組換え TCR、及び / またはそのような抗原の T 細胞エピトープが結合する疾患抗原は、当該分野で公知の方法によって同定することができる。

【0262】

抗原が既知の抗原である場合、本方法を用いて、例えば、既知の抗原のエピトープに結合する新規 T 細胞エピトープ及び / または新規 TCR ポリペプチド対を同定することができる。いくつかの場合には、CD8+T 細胞、例えば既知の抗原に特異的な単離された CD8+T 細胞を、支持体、例えば磁気ビーズ、カラムなどに複合体化した既知の抗原と接触させ、それにより既知の抗原に特異的な細胞と、特異的でない細胞とを分離してもよい。いくつかの場合には、CD8+T 細胞、例えば、既知の抗原に特異的な単離された CD8+T 細胞を、蛍光部分に複合体化した既知の抗原、及び例えば FACS により蛍光レベルに基づいて選別した細胞と接触させ、抗原特異的 T 細胞を単離してもよい。好適な方法は、例えば、US 2006013470 号に記載されており、これは参照として本明細書に援用する。任意の適切な公知の抗原を使用してもよい。いくつかの場合には、IL-10 剤療法を投与した患者ががんを有する場合、誘導した CD8+T 細胞が指向する抗原は、既知の腫瘍関連抗原である。限定するものではないが、CBX2、PLAC1、CLDN6、SPANX、MAGEA3、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、MAGEA4、MAGEA5、SUNC1、MAGEA10、LRRN1、MAGEA9、WT1、癌胎児性抗原 (CEA)、フェトプロテイン (AFP)、CA19-9、CA125、PSA、CA72-4、SCC、MK-1、MUC-1、p53、HER2、G250、gp-100、メラノーマ関連抗原 (MAGE)-1、-2、及び-3、BAGE、SART、MART、MYCN、BCR-ABL、TRP、LAGE、GAGE、チロシナーゼ、上皮性腫瘍抗原 (ETA)、Her-2/Neu、血清前立腺特異抗原 (PSA)、及び NY-ESO1 を含む多種多様な腫瘍関連抗原が当該分野で公知である。いくつかの実施形態では、上記のように、IL-10 剤療法を投与した患者が感染性疾患を有する場合、公知の抗原は、CMV pp65、HIV gp120 などのウイルス抗原、または細胞内病原体由来の任意の他の公知の抗原性ペプチドである。

【0263】

ライブラリー。また、本明細書では、核酸構築物、例えばベクターのライブラリーを提供し、ここでライブラリーは、本明細書に記載の方法を用いて取得する複数の抗原特異的 TCR 及び 鎖ペア配列、またはその可変領域の少なくとも 1 つ以上を表す。いくつかの場合には、ライブラリーの各構築物は、例えばマルチシストロン構築物として、または CAR として、抗原特異的 TCR 及び 鎖ペア配列、またはその可変領域の少なくとも 1 つ以上を含み得る。

【0264】

遺伝子改変 T 細胞の産生。CD8+T 細胞、例えば単離された CD8+T 細胞の表面上に発現する TCR の 及び 鎖ペアの患者特異的配列及び / またはコンセンサス配列は、以下にさらに記載するように、疾患特異的抗原を標的とし、必要とする個体 (誘導した CD8+T 細胞を単離した患者を含むが、これに限定されない) に投与する場合に治療効果を提供するトランスジェニック CD8+T 細胞集団の生成に利用できる。

【0265】

本方法の態様は、T 細胞内で TCR または TCR 様受容体 (例えば、以下にさらに記載するような、キメラ抗原受容体 (CAR)) を発現するように構成される 1 つ以上のベクターに、疾患抗原特異的 V 及び V TCR ペアのそれぞれをコードするヌクレオチド配列を含む核酸をクローニングすることを含み得る。核酸のクローニングは、任意の適切な方法を用いて行ってもよい。ベクターは、T 細胞内で、TCR サブユニット、または TCR

10

20

30

40

50

様受容体、例えばCARをクローニング及び／または発現するための任意の適切なベクターであり得る。いくつかの実施形態では、ベクターは発現ベクターである。発現ベクターは、多数の公知の遺伝子導入系（例えば、天然の形質転換受容性、化学的な方法による形質転換、プロトプラスト形質転換、電気穿孔法、遺伝子銃による形質転換、形質移入、または接合）のいずれかによって宿主細胞に導入してもよい。選択する遺伝子導入系は、使用する宿主細胞及びベクター系に依存する。いくつかの場合には、ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターである（例えば、Jones et al., Hum Gene Ther. 2009 Jun; 20(6): 630-40 参照）。

【0266】

いくつかの場合には、以下にさらに記載するように、単一のベクターは、例えば全長TCRとして、または一本鎖T細胞受容体（scTv）を含むキメラ抗原受容体として、TCRの 及び 鎖の両方、または少なくともその可変領域を含む遺伝子産物を発現するように構成される。

【0267】

遺伝子改変T細胞、同細胞の産生、及び治療における使用方法

本開示は、組換え疾患抗原特異的TCRを発現する遺伝子改変T細胞の新規生成、同定、増大、産生及び使用、ならびに治療における使用方法を意図する。

【0268】

遺伝子組換えT細胞の作製

本開示は、遺伝子改変T細胞を提供し、前記T細胞は、組換えT細胞受容体（TCR）を発現するように改変され、前記TCRは、可変（V）T細胞受容体（TCR）ポリペプチドの1つ、2つ、及び／または3つの相補性決定領域（CDR）及びV/V TCRペアの可変（V）TCRポリペプチドの1つ、2つ、及び／または3つのCDRを含み、前記V/V TCRペアは、IL-10剤の投与に応答して哺乳類において誘導されるPD1+、CD8+末梢T細胞の疾患抗原特異的TCR由来である。一実施形態では、遺伝子改変T細胞上に発現するTCRは、IL-10剤の投与に応答して哺乳類に誘導されるCD8+末梢T細胞の疾患抗原特異的TCRに由来するV/V TCRペアの完全長V及びV ポリペプチドを含み得る。

【0269】

一実施形態では、遺伝子改変T細胞は、キメラ抗原受容体T細胞である。キメラ抗原受容体T細胞（CAR；人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、及びキメラ免疫受容体としても知られる）は、がん（例えば、B及びT細胞リンパ腫の治療）及び他の悪性腫瘍の新たな治療法を表す。CAR T細胞は、既知の疾患抗原（例えば、関心対象の腫瘍上に存在する抗原）に特異的な組換えT細胞受容体を発現するように改変した自己（患者由来）または同系ドナー記憶CD8+T細胞（例えば、CD45RO+、CD8+T細胞）を含み得る。同系ドナーT細胞を使用する場合、T細胞をさらに遺伝子改変し、内在性TCRの発現を破壊（例えば、ノックアウト）してもよいことに留意すべきである。本明細書で企図する他のタイプのT細胞として、ナイーブT細胞、セントラル記憶型T細胞、エフェクター記憶型T細胞、またはそれらの組合せが挙げられる。本開示は、がんの治療について、CAR T細胞療法を用いるという文脈で一般的に記載するが、そのような治療がこれに限定されないことを理解されたい。CAR T細胞療法は、CD8+T細胞療法を受け入れ可能な任意の疾患、例えばウイルス感染の治療に利用できる。

【0270】

CAR T細胞療法は、養子細胞移入（ACT）の使用を含み得る。患者自身の培養T細胞を利用するACTは、患者特異的ながん療法として、有望性を示した（Snook and Waldman (2013) Discov Med 15(81): 120-25）。規定された特異性の抗原標的化受容体をT細胞に挿入するための遺伝子工学的アプローチの使用は、ACTの潜在的能力を大きく拡大させた。ほとんどの場合、これらの改変キメラ抗原受容体は、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に移植するために使用される。

【0271】

CAR T細胞療法の開始には、患者または患者との十分なMHC適合性を有するドナーからのT細胞の除去が含まれる。次いで、T細胞を遺伝子改変し、既知のがん（例えば、腫瘍）に特異的な抗原に対するCARを発現させる。ex vivoで十分な数まで増大した後、自己細胞を患者の体内に注入して戻し、がんの抗原特異的破壊をもたらす。

【0272】

CARは、通常、細胞外抗原結合部分に融合した細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン、最も一般的にはモノクローナル抗体由来の一本鎖可変フラグメント（scFv）からなるタイプの抗原標的化受容体である。CARは、MHCを介した提示とは無関係に細胞表面抗原を直接認識し、複数の患者において、任意の所定の抗原に特異的な単一受容体構築物の使用を可能にする。

10

【0273】

キメラ抗原受容体は、通常、いくつかの主要成分を含み、そのいくつかを以下に記載する。その抗原結合特異性が、可変アルファ（V）T細胞受容体（TCR）ポリペプチドの相補性決定領域（CDR）及びV / V TCRペアの可変（V）TCRポリペプチドのCDRによって提供されるキメラ抗原受容体を、本明細書中ではCAR-Tと称し、そのようなCAR-T構築物を含む遺伝子改変T細胞をCAR-T T細胞と称する。そのようなCAR-T構築物の抗原結合部分を、本明細書中では一本鎖T細胞受容体、すなわち「scTv」と称する場合がある。

【0274】

20

本明細書中で使用する場合、語句「抗原特異的標的化領域」（ASTR）とは、CARを特異的抗原に指向させる領域を指す。CARの標的化領域は細胞外である。本開示の特定の実施形態において、CARは、少なくとも2つの異なる抗原を標的とする少なくとも2つの標的化領域を含む。さらなる実施形態では、CARは、少なくとも3つ以上の異なる抗原を標的とする3つ以上の標的化領域を含む。

【0275】

本開示に関して、CAR-TのASTRは、1つ、2つまたは3つのCDRを含み、CDRは、可変（V）T細胞受容体（TCR）ポリペプチドのCDRに対応する配列を有し、及び前記ASTRは、1つ、2つまたは3つのCDRを含み、CDRは、IL-10剤の投与に应答して哺乳類に誘導されるCD8+末梢T細胞の疾患抗原特異的TCRのV / V TCRペアの可変（V）TCRポリペプチドのCDRに対応する配列を有する。一実施形態では、CAR-TのASTRは、IL-10剤の投与に应答して哺乳類に誘導されるCD8+末梢T細胞の疾患抗原特異的TCRに由来するV / V TCRペアの全長V 及びV ポリペプチドを含む。別の実施形態では、CAR-TのASTRは、IL-10剤の投与に应答して哺乳類に誘導されるCD8+末梢T細胞の疾患抗原特異的TCRに由来するV / V TCRペアと90%以上の配列相同性を有するV 及びV ポリペプチドを含む。

30

【0276】

通常、ASTRは、V ポリペプチドに作動可能に連結した（例えば、ペプチドリッカーを介して）V ポリペプチドを含む一本鎖ポリペプチドを含み、一本鎖TCR（scTv）のASTRを提供する。例えば、scTvのASTRは、N末端からC末端方向に、V ポリペプチド-リンカー-V ポリペプチドの一般構造を有していてもよい。scTvのASTRのV ポリペプチドのC末端をscTvの追加成分に作動可能に融合させてもよく、例えばN末端からC末端方向に、細胞外スパーサードメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインであり、その各々の例を以下に示す。scTvの産生方法は、当該分野において記載されており、例えば、US 2012/0252742を参照されたい。本開示はまた、scTvのASTRを含む可溶性ポリペプチド（「可溶性scTv」）を企図する。そのような場合、これらのポリペプチドは、例えば、scTvのASTRのV ポリペプチドのN末端に融合したヒト血清アルブミンなどの溶解性を促進するポリペプチドを含む。

40

50

【0277】

本明細書中で使用する場合、用語「細胞外スペーサードメイン」(ESD)とは、抗原特異的標的化領域と膜貫通ドメインとの間のCARの親水性領域を指す。本開示は、CAR-TがESDを含む実施形態を企図し、その例として、例えば、US2012/0252742に記載されるようなCD8及び他のドメインのヒンジ領域；IgG(ヒトIgG4など)のGly3またはCH1及びCH3ドメインを含む人工的スペーサー配列；またはこれらの組合せが挙げられる。当業者であれば、本明細書中で企図する他のESDを認識している。

【0278】

本明細書中で使用する場合、用語「膜貫通ドメイン」(TMD)とは、原形質膜を横断するCARの領域を指す。いくつかの実施形態では、膜貫通領域は、膜貫通タンパク質(例えば、I型膜貫通タンパク質)、人工疎水性配列、またはこれらの組合せである。当業者であれば、本開示の記載とともに使用し得る他の膜貫通ドメインを認識している。

10

【0279】

本明細書中で使用する場合、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」(ISD)及び「細胞質ドメイン」とは、エフェクター機能シグナルを形質導入し、その特化した機能を細胞に行わせるCARの部分の部分を指す。ISDの例として、T細胞受容体複合体の鎖またはその任意の相同体(例えば、鎖、FcR1及び鎖、MB1(Ig)鎖、B29(Ig)鎖など)、ヒトCD3鎖、CD3ポリペプチド(、及び)、sykファミリーチロシンキナーゼ(Syk、ZAP70など)、srcファミリーチロシンキナーゼ(Lck、Fyn、Lynなど)及びT細胞形質導入に関与する他の分子、例えばCD2、CD5及びCD28が挙げられる。当業者であれば、本開示の記載とともに使用し得る他のISDを認識している。

20

【0280】

用語「同時刺激ドメイン」(CSD)とは、記憶細胞の増殖、生存または発達を促進するCARの部分の部分を指す。本明細書中の他の箇所に示すように、本開示のCARは、1つ以上の同時刺激ドメインを含み得る。本開示のいくつかの実施形態では、CSDには、TNFRスーパーファミリーの1つ以上のメンバー、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-1、TNFR-II、Fas、CD30、CD40またはこれらの組合せが含まれる。当業者であれば、本開示の記載とともに使用し得る他の同時刺激ドメインを認識している。

30

【0281】

本明細書中に記載するCAR-T細胞技術とともに使用する場合、用語「リンカー」、「リンカードメイン」及び「リンカー領域」とは、本開示のCARのドメイン/領域のいずれかを共に連結する約1~100アミノ酸長のオリゴまたはポリペプチド領域を指す。リンカーは、隣接するタンパク質ドメインが互いに対して自由に動くように、グリシン及びセリンなどの自由度の高い残基から構成され得る。特定の実施形態は、2つの隣接するドメインが相互に立体的に干渉しないようにすることが望ましい場合に、より長いリンカーを使用することを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは切断不能であるが、他の実施形態では切断可能である(例えば、2Aリンカー(例えばT2A))、2A様リンカーまたはその機能的均等物、及び上記の組合せ。本開示の実施形態は、リンカーに、ピコルナウイルス2A様リンカー、プタテッシュウウイルス(P2A)、Thosea asignaウイルス(T2A)のCHYSEL配列、またはそれらの組合せ、変異体及び機能的均等物が含まれることを企図する。さらなる実施形態では、リンカー配列は、2Aグリシンと2Bプロリンとの間の切断をもたらすAsp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly(2A)-pro(2B)モチーフを含む。他のリンカーは、当業者には容易に明らかであり、本開示の教示とともに使用することが意図される。

40

【0282】

治療における遺伝子改変T細胞の使用方法

50

記載する遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T細胞）は、単独で、または他の治療剤との組合せで、CD8+細胞療法を受け入れ可能な疾患の治療に有用である。一般的に、遺伝子改変T細胞（複数可）（例えば、CAR-T細胞）は、治療対象の疾患に従って選択する。

【0283】

本開示の方法は、CD8+細胞療法による治療を受け入れ可能な疾患に罹患している哺乳類被験体に、1つ以上の選択した遺伝子改変CD8+T細胞を投与することを企図する。

【0284】

一実施形態では、CD8+細胞療法による治療を受け入れ可能な疾患に罹患している哺乳類被験体に投与する遺伝子改変CD8+T細胞は、同一の組換えTCRを発現する遺伝子改変CD8+T細胞の集団である。別の実施形態では、CD8+細胞療法による治療を受け入れ可能な疾患に罹患している哺乳類被験体に投与する遺伝子改変CD8+T細胞は、細胞表面上に発現する疾患抗原特異的TCRに対して異種である。この後者のアプローチでは、集団中の遺伝子改変CD8+T細胞の異なるV/VTCRペアを、同一の疾患抗原（例えば、同じ抗原の異なるエピトープ）または異なる疾患抗原に結合するように選択してもよい。

【0285】

本開示によって企図される、場合により併用療法での遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T細胞）の投与を含む治療には、がん、例えば、子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、胃腸管（食道、中咽頭、胃、小腸または大腸、結腸、または直腸）、腎臓、腎細胞、膀胱、骨、骨髄、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、脾臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳（例えば神経腫瘍）、神経節、中枢神経系（CNS）及び末梢神経系（PNS）、ならびに造血系及び免疫系（例えば、脾臓または胸腺）の癌を含む増殖性疾患、障害または病態の治療または予防が含まれる。本開示はまた、例えば、免疫原性腫瘍、非免疫原性腫瘍、潜伏腫瘍、ウイルス誘発性癌（例えば、上皮細胞癌、内皮細胞癌、扁平上皮癌、及びパピローマウイルス）、腺癌、リンパ腫、癌腫、メラノーマ、白血病、骨髄腫、肉腫、奇形癌腫、化学的に誘導される癌、転移、及び血管新生を含む、他のがん関連疾患、障害または病態の治療または予防方法も提供する。本開示は、例えば、調節性T細胞及び/またはCD8+T細胞の活性を調節することによって、腫瘍細胞またはがん細胞抗原に対する忍容性を低下させることを意図する（例えば、Ramirez-Montagut, et al. (2003) Oncogene 22: 3180-87; 及び Sawaya, et al. (2003) New Engl. J. Med. 349: 1501-09 参照）。特定の実施形態では、腫瘍またはがんは、結腸癌、卵巣癌、乳癌、メラノーマ、肺癌、神経膠芽腫、または白血病である。がん関連疾患、障害及び病態という用語（複数可）の使用は、がんに直接的または間接的に関連する状態を広く指すことを意味するものであり、例えば、血管新生及び前癌状態、例えば異形成などを包含する。

【0286】

本開示はまた、ウイルス感染によって引き起こされる疾患を治療または予防するために、本明細書に記載の遺伝子改変T細胞療法（例えば、CAR-T細胞療法）を、場合により併用療法で使用することを企図する。ウイルス剤の例には、一本鎖DNA（ssDNA）、二本鎖DNA（dsDNA）及びRNAウイルスが含まれる。いくつかの実施形態では、ウイルスは、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、またはヘルペスウイルスである。いくつかの場合には、疾患は、限定するものではないが、A型肝炎、B型肝炎（HBV）、C型肝炎（HCV）、インフルエンザ、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、アデノウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、単純ヘルペスウイルスI型（HSV-I）、単純ヘルペスウイルスII型（HSV-II）、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、RSウイルス、ヒトパピローマウイルス（HPV）、パポバウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、エキノウイルス、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ヒト免疫不全ウイルスI型（HIV-I）、及びヒト免疫不全ウイルス

10

20

30

40

50

ⅡⅡ型（HⅡⅤ-ⅡⅡ）、ヒトTリンパ球性ウイルス（HTLV-1及びHTLV-2）、コロナウイルス、ポリオウイルス、ヒトヘルペスウイルス6型（HHV-6）などによって引き起こされ得る。

【0287】

併用療法

本開示はまた、遺伝子改変T細胞単独療法ならびに併用療法の両方を企図する。例えば、本発明の遺伝子改変T細胞を、単独で、または遺伝子改変T細胞を用いた併用療法に使用してもよい1つ以上の活性剤（例えば、化学療法剤）または他の予防的もしくは治療的非薬理学的様式（例えば、局在化放射線療法または放射線全身照射療法）と併用して哺乳類被験体に投与してもよい。一例として、本開示は、本明細書に記載するように、放射フェイズが1つ以上のさらなる療法（例えば、CAR-T T細胞療法、及び場合により、IL-10剤の投与）または治療剤による治療に先行するか、または後に続く、治療レジメンを企図する。いくつかの実施形態では、本開示は、CAR-T T細胞療法及びIL-10剤（例えば、PEG-IL-10）を、骨髄移植、末梢血幹細胞移植、または他の種類の移植療法と併用して使用することをさらに意図する。

10

【0288】

本明細書中で使用する場合、「併用療法」とは、別々に投与するかまたは導入可能な、例えば、別々に投与するために別々に製剤化（例えば、キットで提供してもよい）可能な療法、及び一緒に投与または導入可能な療法を含むことを意味する。特定の実施形態では、例えば1つ以上の他の薬剤に先行して1つの薬剤を投与する場合、遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）及び/または他の薬剤（複数可）を連続的に投与または塗布する。他の実施形態では、遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）及び他の薬剤（複数可）を同時に投与し、そこでは、例えば、2つ以上の薬剤を同時に、またはほぼ同時に投与し；2つ以上の薬剤は、2つ以上の別個の製剤中に存在してもよく、または単一の製剤に組み合わせてもよい（すなわち、合剤）。薬剤を連続的に投与するかまたは同時に投与するかにかかわらず、それらは本開示の目的のために併用投与されるとみなされる。

20

【0289】

本開示の遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）は、状況に応じて適切な方法で、少なくとも1つの他の活性薬剤と併用してもよい。一実施形態では、遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）による、場合によりIL-10剤及び/または他の薬剤（複数可）による治療を、ある期間にわたって維持する。別の実施形態では、少なくとも1つの他の薬剤（複数可）による治療を低減させるか、または中止し（例えば、被験体が安定している場合）、一方、遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）による、場合によりIL-10剤（例えば、PEG-IL-10）による治療を、一定の投薬レジメンで維持する。さらなる実施形態では、他の薬剤（複数可）による治療を低減させるか、または中止し（例えば、被験体が安定している場合）、一方、遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）、及び場合によりIL-10剤による治療を低減させる（例えば、より低い用量、より少ない投薬頻度、またはより短い治療レジメン）。さらに別の実施形態では、他の薬剤（複数可）による治療を、低減するか、または中止し（例えば、被験体が安定している場合）、及び遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）による、場合によりIL-10剤による治療を増加させる（例えば、より高い用量、より多くの投薬頻度、またはより長い治療レジメン）。さらに別の実施形態では、他の薬剤（複数可）による治療を維持し、遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）、及び場合によりIL-10剤による治療を、低減させるか、または中止する（例えば、より少ない用量、より少ない投薬頻度、またはより短い治療レジメン）。さらに別の実施形態では、他の薬剤（複数可）による治療及び本開示のIL-10剤（例えば、PEG-IL-10）による治療を、低減させるか、または中止し（例えば、より少ない用量、より少ない投薬頻度、またはより短い治療レジメン）、遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）による治療を維持する。

30

40

50

【0290】

本明細書に記載する遺伝子改変T細胞療法（CAR-T T細胞療法など）と併せて、本開示は、増殖状態、がん、腫瘍、または前癌性疾患、障害もしくは病態の抗原に特異的なTCRを有する遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）、及び場合によりIL-10剤（例えば、PEG-IL-10）、及び場合により所望の活性を示す少なくとも1つの追加の治療剤または予防剤（複数可）または診断剤による、増殖状態、がん、腫瘍、または前癌性疾患、障害もしくは病態の治療及び/または予防方法を提供する。本開示のいくつかの実施形態は、従来の化学療法剤（例えば、アルキル化剤、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、抗生物質、代謝拮抗物質、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、抗ホルモン剤及びタキソイド）の使用を企図する。本開示の他の実施形態は、シグナル伝達阻害剤（例えば、GLEEVECもしくはHERCEPTIN）または免疫調節剤と併用して本明細書に記載するIL-10剤を投与し、腫瘍増殖の相加的または相乗的抑制を達成することを含む、腫瘍抑制または腫瘍増殖の方法を企図する。

10

【0291】

本明細書に記載のCAR-T T細胞療法としての遺伝子改変T細胞療法（CAR-T T細胞療法など）と併せて、本開示はまた、感染性ウイルスの抗原に特異的なTCRを有する遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）を投与することによるウイルス感染の治療方法を提供する。そのような療法は、IL-10剤（例えば、PEG-IL-10）、及び/または抗ウイルス剤の投与を含み得る。

20

【0292】

医薬組成物

遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）またはIL-10剤などの治療剤を被験体に投与する場合、本開示は、被験体への投与に適した任意の形態の組成物の使用を意図する。通常、そのような組成物は、治療剤（例えば、遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）またはIL-10）及び1つ以上の薬学的に許容可能な、または生理学的に許容可能な希釈剤、担体または賦形剤を含む「医薬組成物」である。医薬組成物は、本開示の方法において使用することができ；したがって、例えば、本明細書に記載する治療方法及び予防方法及び使用を実施するために、医薬組成物をex vivoまたはin vivoで被験体に投与することができる。

30

【0293】

本開示の医薬組成物は、意図する投与方法または投与経路に適合するように製剤化することができ；例示的な投与経路を本明細書に記載する。さらに、医薬組成物は、本開示によって企図される疾患、障害及び病態を治療または予防するために、本明細書に記載する他の治療活性物質または化合物と併用することができる。

【0294】

医薬組成物は、通常、本開示によって企図される治療有効量の治療剤（例えば、遺伝子改変T細胞（例えば、CAR-T T細胞）またはIL-10剤）及び1つ以上の薬学的及び生理学的に許容可能な製剤を含む。適切な薬学的に許容可能な、または生理学的に許容可能な希釈剤、担体または賦形剤として、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸及び硫酸水素ナトリウム）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、メチルパラベン、エチルまたはn-プロピル、p-ヒドロキシ安息香酸）、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、溶媒、充填剤、増量剤、洗浄剤、緩衝剤、ビヒクル、希釈剤、及び/またはアジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、適切なビヒクルは、場合により非経口投与用の医薬組成物に一般的な他の物質を補充した生理食塩水またはクエン酸緩衝生理食塩水であり得る。中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合した生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。当業者であれば、本明細書で企図される医薬組成物及び剤形において使用可能な様々な緩衝剤を容易に認識するであろう。一般的な緩衝剤として、薬学的に許容可能な弱酸、弱塩基、またはその混合物が挙げられるが、これらに限定されない。一例として、緩衝成分は、リン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、及びその塩などの水溶性物質であり得る。許容可能

40

50

な緩衝剤として、例えば、トリス緩衝液、N - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - N - (2 - エタンスルホン酸) (H E P E S)、2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸 (M E S)、2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸ナトリウム (M E S)、3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸 (M O P S)、及び N - トリス [ヒドロキシメチル] メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸 (T A P S) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 2 9 5 】

医薬組成物を製剤化した後、それをバイアルまたはシリンジなどの滅菌容器に保存することができる。いくつかの実施形態では、適切な場合には、医薬組成物は、使い捨て容器（例えば、単回使用のバイアル、アンプル、シリンジ、または自動注入装置（EpiPen（登録商標）に類似））で提供されるが、他の実施形態では、再使用式容器（例えば、再使用式バイアル）で提供される。IL - 10 剤について、インプラント（例えば、移植可能なポンプ）及びカテーテルシステム、低速注入ポンプ及びデバイスを含む任意の薬物送達装置を使用して IL - 10 を送達することができ、これらのすべては当業者に公知である。通常、皮下または筋肉内に投与するデポー注射もまた、規定する期間にわたって本明細書に開示するポリペプチドを放出するために利用することができる。デポー注射は、通常、固形または油性のものであり、一般的に、本明細書に記載の製剤成分の少なくとも 1 つを含む。当業者であれば、可能な製剤及びデポー注射の使用に精通している。

【 0 2 9 6 】

医薬組成物は、滅菌注射用の水性または油性懸濁液の形態であり得る。この懸濁液は、本明細書に記載するそれらの適切な分散剤または湿潤剤及び懸濁剤を用いて、公知の技術に従って製剤化することができる。滅菌注射用製剤は、非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中の滅菌注射用溶液または懸濁液、例えば 1 , 3 - ブタンジオール中の溶液として存在し得る。利用できる許容可能な希釈剤、溶媒及び分散媒体として、水、リンゲル溶液、等張性塩化ナトリウム溶液、Cremophor EL（商標）（BASF、Parlissippany, NJ）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール）、及びそれらの適切な混合物が挙げられる。さらに、滅菌不揮発性油は、溶媒または懸濁媒体として従来から使用されている。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の低刺激性の不揮発性油を使用することができる。さらに、オレイン酸のような脂肪酸が、注射剤の調製に用いられる。吸収を遅らせる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチン）を含めることによって、特定の注射可能な製剤の持続的な吸収を達成することができる。

【 0 2 9 7 】

製剤はまた、インプラント、リボソーム、ヒドロゲル、プロドラッグ及びマイクロカプセル化送達システムを含む、徐放製剤などの迅速な分解または身体からの除去から組成物を保護するための担体を含むこともできる。

【 0 2 9 8 】

キット

本開示はまた、標的疾患の抗原に特異的な T C R を有する遺伝子改変 T 細胞（例えば、CAR - T T 細胞）、所望により IL - 10 剤（例えば、PEG - IL - 10）を含み、及びその医薬組成物を含むキットも企図する。キットは、一般的に、以下に記載するように、様々な構成要素を収容する物理的構造の形態であり、例えば上記方法の実施において利用することができる。

【 0 2 9 9 】

キットは、本明細書中に開示するような遺伝子改変 T 細胞の産生に使用するための所望の疾患抗原特異的 T C R をコードする遺伝子改変 T 細胞（例えば、CAR - T T 細胞）及び/または構築物（複数可）を含むことができ（例えば、滅菌容器中に提供される）、これは被験体への投与に適した医薬組成物の形態であり得る。提供する場合、IL - 10 剤は、即時使用可能な形態で、または例えば投与前に再構成または希釈が必要な形態で提供

10

20

30

40

50

され得る。IL-10 剤が、使用者によって再構成される必要がある形態である場合、キットは、IL-10 剤に同梱または別添された緩衝剤、薬学的に許容可能な賦形剤なども含むことができる。キットは、IL-10 剤及び/または使用する特定の CART 細胞療法の成分の両方を含むこともでき；キットはいくつかの薬剤を別々に含み得るか、またはそれらをキット内であらかじめ組み合わせることができる。本開示のキットは、そこに収容される構成要素を適切に維持するために必要な条件（例えば、冷凍または凍結）のために設計することができる。

【0300】

キットは、キット内の構成要素の識別情報及びそれらの使用説明書（例えば、投薬パラメータ、作用機序（複数可）、薬物動態学及び薬力学、副作用、禁忌などを含む有効成分（複数可）の臨床薬理学）を含むラベルまたはパッケージングインサートを含むことができる。キットの各構成要素は、個々の容器内に封入することができ、様々な容器はすべて単一のパッケージ内に入れることができる。ラベルまたはインサートには、ロット番号や有効期限などの製造元情報を含めることができる。ラベルまたはパッケージングインサートは、例えば、構成要素を収容する物理的構造に組み込むか、物理的構造内に別々に収容するか、またはキットの構成要素（例えば、アンプル、シリンジまたはバイアル）に固定することができる。

【0301】

ラベルまたはインサートは、コンピュータ可読媒体、例えば、ディスク（例えば、ハードディスク、カード、メモリディスク）、CD-もしくはDVD-ROM/ROMなどの光ディスク、DVD、MP3、磁気テープ、またはRAM及びROMなどの電氣的記憶媒体、またはこれらのハイブリッド、例えば磁気/光記憶媒体、フラッシュ媒体もしくはメモリ型カードをさらに含むか、またはそれらに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、実際の説明書はキット内に存在しないが、例えばインターネットサイトを介してリモートソースから説明書を取得するための手段が提供される。

【実施例】

【0302】

以下の実施例は、本発明を製造及び使用する方法の完全な開示及び説明を当業者に提供するために提示するものであり、発明者が自らの発明と見なすものの範囲を限定するものではなく、以下の実験が実施され、それらが実施可能な実験のすべてであることを表明することを意図するものでもない。なお、現時点で記載されている例示的な記述は必ずしも実施する必要はなく、そこに記載されているデータ等を生成するための記述が可能であることは理解されたい。使用する数（例えば、量、温度など）に関して正確さを保つための努力がなされているが、いくつかの実験誤差及び偏差が考慮されるべきである。

【0303】

他に示されない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏（ $^{\circ}\text{C}$ ）であり、圧力は大気圧であるか、またはそれに近い圧である。以下のような標準的な略語を使用する：sまたはsec = 秒（複数可）；min = 分（複数可）；hまたはhr = 時間（複数可）；aa = アミノ酸（複数可）；bp = 塩基対（複数可）；kb = キロベース（複数可）；nt = ヌクレオチド（複数可）；ng = ナノグラム； μg = マイクログラム；mg = ミリグラム；g = グラム；kg = キログラム；dLまたはdL = デシリットル； μL または μL = マイクロリットル；mLまたはmL = ミリリットル；LまたはL = リットル；nM = ナノモル； μM = マイクロモル；mM = ミリモル；M = モル；kDa = キロダルトン；i.m. = 筋肉内（に）；i.p. = 腹腔内（に）；SCまたはSQ = 皮下（に）；HPLC = 高速液体クロマトグラフィー；BW = 体重；U = ユニット；ns = 統計的に有意ではない；PMA = ホルボール12-ミリスレート13-アセテート；PBS = リン酸緩衝食塩水；DMEM = ダルベッコ変法イーグル培地；PBMC = 初代末梢血単核球；FBS = ウシ胎仔血清；FCS = ウシ胎仔血清；HEPES = 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸；LPS = リポ多糖類；RPMI = ロズウェルパーク記念研究所培地；APC = 抗原提示細胞；FACS = 蛍光標識細胞分取。

【0304】

材料及び方法以下の実施例において、以下の一般的な材料及び方法を、表記されている場合には使用し、または使用し得る：

【0305】

分子生物学的方法 分子生物学における標準的な方法は、科学文献に記載されている（例えば、Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; 及び Ausubel, et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y. 参照。前記文献は、細菌細胞におけるクローニング及びDNA突然変異誘発 (Vol. 1)、哺乳類細胞及び酵母におけるクローニング (Vol. 2)、複合糖質及びタンパク質発現 (Vol. 3)、ならびにバイオインフォマティクス (Vol. 4) について記載している)。

10

【0306】

ポリクローナル及びモノクローナル抗体の産生、精製、及び断片化が記載されている（例えば、Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。リガンド/受容体相互作用を特徴付けるための標準的な技術が利用可能である（例えば、Coligan et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., NY 参照）；蛍光標識細胞分取 (FACS) を含むフローサイトメトリーのための方法が利用可能である（例えば、Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ 参照）；及び、例えば、診断試薬として使用するための、核酸プライマー及びプローブ、ポリペプチド、及び抗体を含む核酸の改変に適した蛍光試薬が利用可能である (Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, MO.)。抗体のさらなる考察を、本明細書の他の箇所に示す。

20

30

【0307】

ソフトウェア 例えば、抗原断片、リーダー配列、タンパク質フォールディング、機能ドメイン、グリコシル化部位、及び配列アラインメントを決定するためのソフトウェアパッケージ及びデータベースが利用可能である（例えば、GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); 及び DeCypher (商標) (TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV) 参照。

【0308】

ペグ化 本明細書に記載するペグ化 IL-10 は、当業者に公知の任意の手段によって合成してもよい。モノ-PEG-IL-10 及びモノ/ジ-PEG-IL-10 の混合物を製造するための例示的な合成スキームが記載されている（例えば、米国特許第 7,052,686 号；米国特許出願公開第 2011/0250163 号；WO 2010/077853 参照）。本開示の特定の実施形態は、選択的に PEG 化されたモノ-及びジ-PEG-IL-10 の混合物を含む。本開示の実施に適した PEG の製造及び使用（及び他の薬物送達技術）における当業者自身の技能を活用することに加えて、当業者は、PEG 関連技術の多くの商品製造業者（例えば、NOF America Corp (Irvine, CA) 及び Parchem (New Rochelle, NY)）に精通している。

40

【0309】

動物 本開示の記載と併せて、当業者に公知の様々なマウス及び他の動物株を使用することができる。例えば、免疫適格性の Balb/C または B 細胞欠損 Balb/C マウスは、The Jackson Lab., Bar Harbor, ME から入手し、標準的な

50

手順に従って使用することができる（例えば、Martin et al (2001) Infect. Immun., 69 (11): 7067 - 73 及び Compton et al. (2004) Comp. Med. 54 (6): 681 - 89 参照）。

【0310】

IL-10 濃度 血清 IL-10 濃度レベル及び曝露レベルは、当該技術分野で使用される標準的な方法によって決定することができる。例えば、実験の被験体がマウスである場合、マウス尾小片から全血（約 50 μ L / マウス）を平滑キャピラリーチューブに収集し、遠心分離によって血清と血液細胞を分離し、標準的な ELISA キット及び技術によって IL-10 曝露レベルを決定することによって、血清曝露レベルアッセイを実施することができる。

10

【0311】

FACS 分析 FACS 分析のための多数のプロトコール、材料及び試薬が市販されており、本明細書に記載するものと併せて使用してもよい（例えば、Becton - Dickinson, Franklin Lakes, NJ; Cell Signaling Technologies, Danford, MA; Abcam, Cambridge, MA; Affymetrix, Santa Clara, CA）。直接的フローサイトメトリー（すなわち、複合体化一次抗体を用いる）及び間接的フローサイトメトリー（すなわち、一次抗体及び複合体化二次抗体を用いる）の両方を使用してもよい。例示的な直接フロープロトコールは、以下の通りである：採取した細胞を洗浄し、氷冷 PBS、10% FCS、1% アジ化ナトリウム中で $1 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / mL の濃度に細胞懸濁液を調整する。細胞を、ポリスチレン丸底 $12 \times 75 \text{ mm}^2$ フアルコンチューブ中で染色してもよい。細胞を十分に遠心分離し、細胞の喪失を最小限に留めるが細胞の再懸濁が困難になるほどではない程度に上清液を除去してもよい。一次標識抗体を添加してもよく（0.1 ~ 10 μ g / mL）、必要に応じて 3% BSA / PBS で希釈してもよい。4 で少なくとも 30 分間インキュベートした後、細胞を 400 g で 5 分間遠心分離して 3 回洗浄し、次いで 0.5 ~ 1 mL の氷冷 PBS、10% FCS、1% アジ化ナトリウム中に再懸濁してもよい。細胞は分析する時まで（好ましくは同日以内に）氷上で暗所に維持してもよい。細胞を標準的な方法論を用いて固定し、数日間保存してもよく；異なる抗原に対する固定は、抗原特異的最適化を必要とし得る。

20

【0312】

以下に記載するアッセイは代表的なものであり、排他的なものではない。

30

【0313】

組換えマウス IL-10 (rMuIL-10)、ペグ化 rMuIL-10 (PEG-rMuIL-10)、ペグ化 rHuIL-10 (PEG-rHuIL-10) 以下の実施例で使用する PEG 化 IL-10 は、特許文献（例えば、US 8,691,205）に記載されているようなモノ/ジ PEG-IL-10 ミックスの混合物であった。モノ/ジ PEG-IL-10 混合物の製造のための合成スキームの 2 つの例を以下に示す：

【0314】

ペグ化 IL-10 合成スキーム 1 IL-10（例えばマウスまたはヒト）を 50 mM リン酸ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム pH 5 ~ 7.4 に対して透析する。モル比 1 : 1 ~ 1 : 7 の 5 kDa PEG-プロピルアルデヒドを、0.75 ~ 30 mM のシアノ水素化ホウ素ナトリウムの存在下で 1 ~ 12 mg / mL の濃度で IL-10 と反応させる。あるいは、ピコリンボランを用いて同様の方法で反応を活性化することができる。反応物を 5 ~ 30 で 3 ~ 24 時間インキュベートする。ペグ化反応の pH を 6.3 に調整し、7.5 mg / mL の hIL-10 を PEG と反応させて、IL-10 対 PEG リンカーの比を 1 : 3.5 にする。シアノ水素化ホウ素の最終濃度は約 25 mM であり、反応を 15 で 12 ~ 15 時間行う。モノ-及びジ-PEG IL-10 は反応の最大産物であり、それぞれの濃度は終結時に約 50% である。反応は、グリシンまたはリジンなどのアミノ酸、あるいはトリス緩衝液を用いてクエンチしてもよい。ゲル濾過、アニオン及びカチオン交換クロマトグラフィー、ならびにサイズ排除 HPLC (SE-HPLC) などの複

40

50

数の精製方法を用いて所望のペグ化 IL - 10 分子を単離することができる。

【0315】

ペグ化 IL - 10 合成スキーム2 IL - 10 (例えば、マウスまたはヒト) を 10 mM リン酸ナトリウム pH 7.0、100 mM NaCl に対して透析する。透析した IL - 10 を、透析緩衝液を用いて 3.2 倍に希釈し、約 0.5 ~ 12 mg/mL の濃度にする。リンカーを添加する前に、SC - PEG - 12 kDa (Delmar Scientific Laboratories、Maywood、IL) 及び 1 容量の 100 mM Na - 四ホウ酸塩を pH 9.1 で 9 倍量の希釈した IL - 10 に添加して、IL - 10 溶液の pH を 8.6 に調整した。SC - PEG - 12 K リンカーを透析緩衝液に溶解し、適切な容量のリンカー溶液 (IL - 10 のモル量あたり 1.8 ~ 3.6 モルのリンカー) を希釈した IL - 10 溶液に加えてペグ化反応を開始させる。速度を制御するために反応を 5 で実施し、反応溶液を穏やかに攪拌する。サイズ排除 HPLC (SE - HPLC) によって測定するモノ - PEG - IL - 10 の収率が 40 % に近づいた段階で、1 M グリシン溶液を終濃度 30 mM となるまで加え、反応を停止させる。HCl 溶液を用いて反応溶液の pH を 7.0 に緩やかに調整し、反応物を 0.2 µm のフィルターで濾過し、-80 で保存する。0.05 % MSA を含む 10 mM HEPES、pH 6.5、100 mM NaCl 中に PEG - IL - 10 を 0.75 ~ 1.0 mg/mL で製剤化した。

10

【0316】

本明細書中で使用するモノ - 及びジ - PEG 化 rHuIL - 10 の混合物を、AM0010 と称する場合があり、5 kDa PEG 及び PPA リンカーを用いてこれを合成し、また、上記スキーム 1 に示すように合成することができる。

20

【0317】

マウス CD8 + T 細胞の単離及び IL - 10 治療：マウス CD8 + T 細胞を OT1 マウス (C56B1/6 - Tg (Tcratcrb) 1100 Mjb/J、The Jackson Laboratory、Bar Harbour、ME) から磁気的に単離し (Miltentyi、Auburn、CA)、100 ~ 1000 IU/mL rMuIL - 2 (R&D Systems、Minneapolis、MN) 中で 7 ~ 10 日間培養した。OT1 T 細胞を、1 µg/mL LPS (Sigma Aldrich、St. Louis、MO) で 3 日間活性化し、SIINFEEKL (配列番号 35) ペプチド (InvivoGen、San Diego、CA) の存在下で外因的にパルスした自己骨髄細胞で再刺激した。再刺激の 3 日後、細胞を記載の濃度の rMuIL - 10 に 5 日間曝露した。次いで、細胞を洗浄し、SIINFEEKL ペプチド (Merck Research Labs、Palo Alto、CA) の存在下でパルスした PDV6 細胞に曝露した。CellTiter Glo (Promega、Madison、WI) について、製造元の説明書に従って細胞溶解率を測定した。

30

【0318】

ヒト CD8 + T 細胞の単離及び IL - 10 治療：正常な「健康な」ヒトメラノーマ腫瘍生検からヒト CD8 + T 細胞を磁気的に単離した (Miltentyi)。腫瘍細胞を 6 - ウェルプレート (Nunc lon、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) で培養し、T 細胞を 24 ウェルプレート (Nunc lon) で別々に培養した。100 ~ 1000 IU/mL の IL - 2 (Chiron、Emeryville、CA) を補充した完全 RPMI (Hyclone、GE Healthcare Life Sciences、Logan、UT) で培養し、5 ~ 7 日ごとに再度栄養補給した。加熱溶解させた腫瘍細胞抗原で T 細胞を再刺激し、これを 10 ~ 12 日ごとに外因的に TT 細胞 (ATCC CRL - 1803、Manassas、VA) に添加して抗原提示細胞として機能させた。再刺激の 3 日後、CD8 + T 細胞を洗浄し、記載濃度の rHuIL - 10 に 5 日間曝露した。細胞を洗浄し、標識した同種腫瘍細胞 Cr51 (Perkin Elmer、Waltham、MA)、A375 腫瘍細胞 (ATCC CRL - 1619、Manassas、VA) または K562 細胞 (ATCC CCL - 243) に、記載したエフェクター対標的比で加え、標準的な 4 時間クロム放出アッセイを行った。

40

50

【0319】

ELISPOT: 記載したPEG-rMuIL-10 (Merck Research Labs) 投与後、CT26 (ATCC CRL-2638) 腫瘍保有マウスから磁気ビーズ分離 (Miltenyi) によりマウスCD8+T細胞を単離した。細胞を洗浄し、ELISPOT (R&D systems、Minneapolis、MN) あたり1000~5000個の細胞を三連で播種した。何も含まないか、1 μ g/mLの抗CD3 (eBioscience、San Diego、CA)、100~500のCT26、または100~500の4T1 (ATCC CRL-2539) を含むウェルを、10ng/mLのIFN (R&D Systems、Minneapolis、MN) に1時間、予め曝露した。プレートを37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で24時間インキュベートし、製造元の説明書に従って発色させた。CTL (Shaker Heights、OH) Immunospotアナライザーを用いてプレート画像を捕捉し、ImmunoSpot ELISPOT Analysis Softwareを用いてスポットを定量した。

10

【0320】

[qPCR]: Qiagen's RNeasy Kit及びRT² First Strand Kitをそれぞれ用いて、製造元の説明書に従って、RNAを抽出し、単離したCD8+T細胞からcDNAを合成する。製造元のプロトコールに従って、RT² SYBR Green qPCR Mastermix及びQiagenのプライマーを用いて、cDNA鋳型上で定量的PCRを実施する。Ct値は、ハウスキーピング遺伝子、GUSB及びGAPDHの平均Ct値に対して正規化する。

20

【0321】

[CT26腫瘍モデル]: 4~6週齢の雌のC57BL/6Jマウス (Jackson Laboratory) に、1 \times 10⁵個のCT26細胞 (CRL-2638; ATCC) を100 μ Lの容量で、この動物の右下側の側腹部の皮下に移植した。触知可能になった後は、腫瘍の成長を週2回測定した。腫瘍体積は、式 (幅² \times 長さ / 2) を用いて計算し、式中、長さは長手方向の寸法である。腫瘍の体積が平均75mm³に達した場合、その動物を層別化した。5匹のマウス/コホートに、ビヒクルまたはペグ化組換えIL-10 (Schering-Plough、Palo Alto、CA) を毎日、28日間にわたって皮下投与した。28日間の投与後、組織及び腫瘍分析のために各群のマウスを安楽死させた。

30

【0322】

[4T1腫瘍モデル]: 4~6週齢の雌のBALB/c (Jackson Laboratory) マウスに、1 \times 10⁴個の4T1細胞 (CRL-2539; ATCC) を100 μ Lの容量で、この動物の右下側の側腹部の皮下に移植した。触知可能になった後は、腫瘍の成長を週2回測定した。腫瘍体積は、式 (幅² \times 長さ / 2) を用いて計算し、式中、長さは長手方向の寸法である。腫瘍の体積が平均75mm³に達した場合、その動物を層別化した。5匹のマウス/コホートに、ビヒクルまたはペグ化組換えIL-10 (ARMO Biosciences、Redwood City、CA) を毎日、28日間にわたって皮下投与した。28日間の投与後、組織及び腫瘍分析のために各群のマウスを安楽死させた。

40

【0323】

[腫瘍浸潤性リンパ球の単離]: 腫瘍浸潤性リンパ球 (TIL) を単離するために、5mLの消化緩衝液 (RPMI (Life Technologies)、10%ウシ胎仔血清 (Hyclone Thermo Fisher Scientific)、10mM HEPES (Life Technologies)、2mg/mLコラゲナーゼI型 (Worthington Biochemical、Lakewood、NJ)、30U/mL DNase I (Worthington Biochemical) でミンチ状にし、消化緩衝液で35mLの最終容量にした。腫瘍のスラリーを37 $^{\circ}$ Cで45分間、回転させた。次いで、物質を70 μ mの細胞ストレーナに通すことにより、腫瘍スラリーを機械的に破壊した。細胞をRPMIで2回洗浄し、次いで25mLのHBSS (Life

50

Technologies)で再懸濁した。細胞懸濁液を15mLのHistopaque (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)の下層に配し、プレーキを停止させたうえで、室温で30分間、1000rpmで遠心分離した。遠心分離後、TILを含有する細胞界面を回収し、完全RPMIで2回洗浄した。次いで、MACS細胞分離技術(Miltenyi Biotec)を用いて製造元のプロトコールに従ってCD8+T細胞を単離した。単離したCD8+T細胞を、抗体染色及びフローサイトメトリ分析の前に、1mLの細胞あたり1µg/mLの抗CD3及び1µLのGolgiPlug (BD Biosciences、San Jose、CA)で10時間処理した。

【0324】

[活性化誘導細胞死アッセイ]：例示的な活性化誘導細胞死アッセイは、以下のプロトコールを用いて行うことができる。ヒト初代末梢血単核球(PBMC)を、標準的なプロトコールに従って単離した(例えば、Fuss et al. (2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1, John Wiley, Inc., NY参照)。Miltenyi Biotecの抗CD45RO MACSビーズ及びMACS細胞分離技術を製造元のプロトコール(Miltenyi Biotec)に従って使用して、CD45RO+CD8 T細胞を単離した。CD45ROは記憶T細胞のマーカーである。細胞を活性化するために、1mLの単離した細胞(3×10^6 細胞/mLの密度で)を、抗CD3及び抗CD28抗体(Affymetrix e Bioscience、San Diego、CA)でプレコーティングした標準的な24ウェルプレート(BD; Franklin Lakes、NJ)中のAIM V培地中で3日間(Life Technologies)培養した。24ウェルプレートを抗CD3及び抗CD28抗体でプレコーティングするために、10µg/mLの抗CD3及び2µg/mLの抗CD28抗体を含有する300µLの炭酸緩衝液(0.1M NaHCO₃ (Sigma-Aldrich)、0.5M NaCl (Sigma-Aldrich)、pH 8.3)を、各ウェル中で37℃、2時間インキュベートし、次いで各ウェルをAIM V培地で洗浄した。3日間の活性化の後、細胞を回収し、計数し、標準24ウェルプレート中の1mLのAIM V培地(2×10^6 細胞/mLの密度で)に再プレコーティングし、100ng/mLのヒトPEG化IL-10で3日間処理した。次に、上記のヒトPEG化IL-10による活性化及び処理を繰り返し、その後、製造元の手順書(Life Technologies)に従ってTrypan Blue除外によって生存細胞を計数するか、またはフローサイトメトリ分析のために染色した。

【0325】

[フローサイトメトリー]：抗マウスIFN (BioLegend、San Diego、CA、USA)、CD8 (BioLegend)、及びPD1 (BioLegend)抗体を用いて、製造元のプロトコールに従って、BD Cytotfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences)を用いて、単離したマウス腫瘍浸潤性CD8+T細胞を染色した。以下の実験における分析のために、「PD1+mid」細胞は、通常、およそ3000のフローサイトメトリーによる平均チャネル蛍光検出をもたらすレベルの細胞表面PD1を発現し、一方、低いPD1発現(「PD1+low」)はおよそ200の平均チャネル蛍光検出で表され、「PD1+high」発現は、およそ9000の平均チャネル蛍光検出で表される。

【0326】

[PEG-rHuIL-10療法及び腫瘍縮小効果の評価]ヒトメラノーマ患者を、腹部へのPEG-rHuIL-10 (AM0010)の毎日の皮下自己注射により治療した。治療上活性な用量は、5~20µg/kg/日の範囲である。進行性疾患(PD)、安定疾患(SD)及び部分奏効(PR)をコンピュータ断層撮影(CT)スキャンによって評価した。AM0010の投与前及び投与開始後6~7週の間隔で患者を1日目にスキャンした。全身CTスキャンを用いて、腫瘍の位置及び腫瘍の大きさの変化を評価した。標的病変を決定し、各スキャン時点で腫瘍塊の最大断面積を測定した。標的病変は、放射線科

10

20

30

40

50

医及び腫瘍専門医の両者によって評価する。最大の横断面総体積（２次元で測定）が１つのスキャンから次のスキャンにかけて２５％を超えて増加した標的病変を有する患者には、進行性疾患の指定を与えた。最大の横断面総体積（２次元で測定）が１つのスキャンから次のスキャンにかけて２５％を超えて増加するかまたは５０％を超えて減少するかのいずれにも該当しない標的病変を有する患者には、安定疾患の指定を与えた。最大の横断面総体積（２次元で測定）が１つのスキャンから次のスキャンにかけて５０％を超えて減少した標的病変を有する患者には、部分奏効疾患の指定を与えた。

【０３２７】

[実施例１：マウスＣＤ８＋細胞のＩＬ－１０処置は機能増強を誘導する]

単離されたマウスＣＤ８＋Ｔ細胞機能に対するＩＬ－１０の効果を*in vitro*で評価した。マウスＣＤ８＋Ｔ細胞を単離し、上記のように組換えマウスＩＬ－１０（*rMuIL-1*）の存在下で、または対照として*rMuIL-10*の非存在下で処置した。細胞毒性マーカーであるグランザイムＡ、グランザイムＢ、パーフォリン及びサイトカインＩＦＮの遺伝子発現の*qPCR*分析によって、Ｔ細胞活性化を評価した。上記のように、*SIINFEL*（配列番号３５）の存在下でパルスしたＰＤＶ６細胞を溶解するためのＩＬ－１０処置した*SIINFEL*初回刺激ＣＤ８＋Ｔ細胞の能力によって、Ｔ細胞の細胞傷害性を評価した。

10

【０３２８】

図１、パネルＡに示すように、*in vitro*でマウスＩＬ－１０により刺激したマウスＣＤ８＋細胞は、細胞傷害マーカーであるグランザイムＡ、グランザイムＢ、パーフォリン及びサイトカインＩＦＮの発現の増強を示した。図１、パネルＢに示すように、マウスＯＴ１ＣＤ８＋Ｔ細胞の処置は、*SIINFEL*存在下でパルスした腫瘍細胞標的の細胞傷害性の増強をもたらす。

20

【０３２９】

[実施例２：腫瘍生検から単離したヒトＣＤ８＋細胞のＩＬ－１０処置は機能増強をもたらす]

培養で増殖させたメラノーマ腫瘍の患者生検から、ヒトＣＤ８＋Ｔ細胞を採取し、加熱溶解した腫瘍細胞抗原で再刺激し、次いで上記のように、ＩＬ－１０の非存在下で、または記載の濃度の組換えヒトＩＬ－１０（*rHuIL-10*）の存在下で培養した。細胞毒性マーカーであるグランザイムＡ、グランザイムＢ、パーフォリン及びサイトカインＩＦＮの遺伝子発現の*qPCR*分析によって、Ｔ細胞活性化を評価した。同種のメラノーマ腫瘍細胞、Ａ３７５細胞（ヒト無色素性メラノーマ細胞株）、またはＫ５６２細胞（ヒト骨髓性白血病細胞株）を溶解する能力によってＴ細胞の細胞傷害性を評価した。

30

【０３３０】

図１のパネルＣに示すように、刺激した腫瘍内由来ヒトＣＤ８＋Ｔ細胞の*in vitro* *rHuIL-10*処置は、グランザイムＡ、Ｂ、パーフォリン及びＩＦＮの発現を増強した。さらに、示すように、*rHuIL-10*処置は、同種腫瘍細胞標的の細胞傷害性の増強をもたらす。ヒトＣＤ８＋Ｔ細胞の*rHuIL-10*処置は、Ａ３７５細胞またはＫ５６２細胞のいずれに対しても細胞毒性の顕著な増加をもたらさず、このことは、増加した細胞毒性が抗原特異的であることを示した。

40

【０３３１】

[実施例３：腫瘍を有するマウスの継続的治療は腫瘍抗原特異的な腫瘍内ＣＤ８＋Ｔ細胞の増加をもたらす]

ＣＴ２６腫瘍を有するマウスを、１ｍｇ／ｋｇのＰＥＧ－*rMuIL-10*、または対照としてビヒクルで、毎日、６、１０または１５日間処置し、ＣＤ８＋腫瘍内Ｔ細胞を単離した。ＰＢＭＣまたは機械的に破壊し、酵素消化したＣＴ２６（ＡＴＣＣ）腫瘍から１，０００個のＣＤ８＋Ｔ細胞を磁気（*Miltenyi*）ビーズで単離することによりＥＬＩＳＰＯＴ（*R&D Systems*）を作製した。ＣＤ８＋Ｔ細胞を、二次刺激なし（*w/o*）、１μｇ／ｍＬの可溶性抗ＣＤ３（*eBiosciences*）、１００ＣＴ２６細胞（ＡＴＣＣ、マウス扁平上皮腫瘍）または４Ｔ１細胞（ＡＴＣＣ、マウス乳房腫瘍

50

)(陰性対照として)に24時間曝露した。スポットをImmunoSpot Softwareで定量した。

【0332】

IFN を分泌するCD8+T細胞は、抗CD3に曝露する場合、PEG-rMuIL-10処置群において増加する(図2、パネルA)。このことは、PEG-rMuIL-10処置が、TCR連結に対するCD8+T細胞応答を増強することを示している。同様に、IFN を分泌するCD8+T細胞は、同種のCT26腫瘍細胞に曝露する場合にも、時間とともに増加し(図2、パネルB)、その結果、処置の15日目までに、TCRと抗CD3とのライゲーション時にIFN を分泌するすべての細胞もまた、同種の腫瘍細胞への曝露時にIFN を分泌した(図2、パネルC)。

10

【0333】

これらの結果は、PEG-rMuIL-10処置によって活性化され、IFN を分泌可能なCD8+T細胞が腫瘍抗原に特異的であることを示している。腫瘍抗原特異的CD8+T細胞が時間とともに増加するという観察は、PEG-rIL-10による継続的治療が、そのTCR配列が固形組織腫瘍に特異的な新規CART TCR構築物を表している腫瘍抗原特異的CD8+T細胞の漸次的蓄積を引き起こすことを示している。

【0334】

[実施例4:継続的なIL-10治療はCD8+T細胞上のPD1発現を調節する]

PD1及びIFN 発現レベルに対する、実施例3に記載のPEG-rMuIL-10による15日間の処置の効果を評価した。PD1は、CD8+T細胞活性化のマーカーである(Agata, et al., Int Immunol, 1996.8(5):p.765-72)。PD1の発現はまた、活性化誘導細胞死(Fang et al., Mol Vis, 2015.21:p.901-10)及びT細胞の疲弊(Jiang et al., Cell Death Dis, 2015.6:p.e1792)に関連する。

20

【0335】

実施例3に記載するPEG-rMuIL-10による継続的な治療は、活性化CD8+T細胞TIL上のPD1の発現レベルを変化させた。マウスでは、PEG-rMuIL-10による継続的な治療は、PD1発現を下方制御し、それによってビヒクル処置マウスに比べてCD8+T細胞をPD1+midレベルの発現状態に維持した。ビヒクル処置マウスにおけるPD1+high CD8+T細胞TILの割合は51.6%であり; PD1+high CD8+T細胞TILは、PEG-rMuIL-10で15日間処置したマウスにおいてわずか9.78%であった。対照的に、PD1+mid CD8+T細胞の割合はビヒクル処置マウスでは17.9%であったが、PEG-rMuIL-10で15日間処置したマウスでは31.2%に増加した。

30

【0336】

さらに、長期間の治療も、PD1陽性であるIFN 陽性CD8+TILの比率を変化させた。上記の図2に示すように、IFN 陽性CD8+TILは、腫瘍内の腫瘍抗原特異的CD8+T細胞を表す。したがって、これらのIFN 陽性PD1陽性細胞は、腫瘍抗原特異的CD8+T細胞のプールを表す。図3のパネルAは、ビヒクルで処置したマウス由来のTILのプール及びIFN 陽性であるPD1+/-, CD8+の量を示す。ビヒクル処置マウスにおけるPD1-, CD8+, IFN +の割合は約2.41%であり、一方、PEG-rMuIL-10で15日間処置したマウスにおけるPD1+, CD8+, IFN +の割合は約3.7%である。図3、パネルBは、PEG-rMuIL-10による長期間の処置が、これらの割合を、それぞれ15.1%及び12.8%に変化させることを示す。

40

【0337】

したがって、これらのデータは、これらのIFN 陽性PD1陽性細胞が、そこから抗原特異的TCR配列(例えば、及び TCR配列)を取得することが可能な、腫瘍抗原特異的CD8+T細胞のプールを表すことを示している。

【0338】

50

[実施例 5 : I L - 1 0 療法によって誘導される P D 1 + C D 8 + 末梢 T 細胞は、C D 4 5 R O + T 細胞 (記憶 T 細胞) である]

健常ドナー由来の P D 1 + C D 8 + 末梢 T 細胞をさらに分析して、それらの表現型を評価した。活性化誘導細胞死のモデルを使用してこれらの T 細胞の評価を行い、そこにおいては、末梢 C D 8 + T 細胞を複数回の抗 C D 3 / 抗 C D 2 8 再刺激に曝露し、活性化した細胞を休止期に P E G - r H u I L - 1 0 (A M 0 0 1 0) またはビヒクル (対照) に曝露した。次いで、細胞を、記憶 T 細胞のマーカーである P D 1 及び C D 4 5 R O の両方の表面発現について分析した。図 4 に示すように、このようにして I L - 1 0 で C D 8 + T 細胞を処置すると、P D 1 + 記憶 C D 8 + T 細胞が蓄積する。

【 0 3 3 9 】

図 4 のパネル A 及び B は、2 人の異なるドナーから採取した末梢 T 細胞を用いた結果を表す。パネル A は健常なドナー由来の末梢 C D 8 + T 細胞の分析結果を提供する。C D 8 + T 細胞を単離し、3 日間活性化し、A M 0 0 1 0 に 3 日間曝露した。3 日の休止期間後、細胞をフローサイトメトリーによって分析して、それらの P D 1 及び C D 4 5 R O 細胞表面発現を測定した (B の終り)。次いで、これらの細胞を 3 日間再刺激し、次いで A M 0 0 1 0 に 3 日間曝露した。3 日間の休止期間の後、細胞をフローサイトメトリーによって分析して、それらの P D 1 及び C D 4 5 R O 細胞表面発現を測定した (D の終り)。複数回の再刺激の後、これらの細胞を A M 0 0 1 0 に曝露すると、より生存能の高い P D 1 + 細胞が得られ、このことは、A M 0 0 1 0 が活性化誘導細胞死を予防することを示唆している。これらの細胞は、その記憶表現型 (C D 4 5 R O +) により抗原特異的であり、これらの細胞は、その P D 1 発現レベルのおかげで活性化される。刺激条件が類似しているため、同細胞は、Chan ら (J Interferon Cytokine Res (2 0 1 5) 3 5 (1 2) : 9 4 8 - 9 5 5) によって記載された I F N 陽性細胞である可能性が高い。

【 0 3 4 0 】

これらのデータは、I L - 1 0 療法によって誘導される P D 1 + , C D 8 + 末梢 C D 8 + T 細胞が、これらの患者において活性化された腫瘍抗原特異的 C D 8 + T 細胞であることを示している。

【 0 3 4 1 】

[実施例 6 : I L - 1 0 処置患者における末梢 T 細胞増大の評価]

患者の末梢 P D 1 + C D 8 + T 細胞に対する I L - 1 0 処置の効果を評価した (図 5)。メラノーマ (M e l)、腎細胞癌 (R C C)、または結腸直腸癌 (C R C) を有し、上記の P E G - I L - 1 0 (A M 0 0 1 0) 単剤療法、または抗 P D 1 モノクローナル抗体と併用した P E G - I L - 1 0 (A M 0 0 1 0) 治療を受けたがん患者から P B M C を採取した。P E G - I L - 1 0 療法の開始前に採取した末梢血試料を対照試料として用いた。図 5 の括弧内に示す日に試料を患者から採取し；投与した P E G - I L - 1 0 (A M 0 0 1 0) の用量を図 5 の X 軸上に示す。患者を、進行性疾患 (P D)、安定疾患 (S D)、または少なくとも部分奏効 (P R) として分類した。試験試料及び参照試料中の少なくとも V T C R ポリペプチドをコードする核酸を配列決定し、試験試料中の少なくとも V T C R ポリペプチド配列をコードする核酸の出現頻度を、参照試料中の同じ V T C R をコードする核酸の出現頻度と比較した。参照試料に対して試験試料中で出現頻度が増加した場合、その配列を「増大した」T 細胞クローンによって発現されたものと分類した。参照試料に対して試験試料中で出現頻度が減少した場合、その配列を「収縮した」T 細胞クローンによって発現されたものと分類した。「増大した」クローンは、疾患抗原特異的 T 細胞を表す。結果を図 5 に示す。

【 0 3 4 2 】

P E G - r H u I L - 1 0 (A M 0 0 1 0) で処置した患者において、末梢 T 細胞の増大を評価した。図 6 は、1 0 μ g / k g の P E G - r H u I L - 1 0 (A M 0 0 1 0) を皮下に毎日 (パネル A) または 2 0 μ g / k g の P E G - r H u I L - 1 0 (A M 0 0 1 0) を皮下に毎日 (パネル B) 処置した 2 人の腎細胞癌患者における末梢 T 細胞クローンの

増大対収縮の代表的な分析を示す。「パネルA」の患者は進行性疾患（RCC PD）を示し、一方、「パネルB」は腫瘍質量の93%の減少を示し、したがって少なくとも部分奏効（RCC PR）を示した。PEG-rHuIL-10の最初の投与前の1日目及び処置の29日目の両方で末梢T細胞を採取した。図6の黒丸は、1日目から処置日までの増大クローンを示し、白丸は収縮クローンを示す。図6の灰色の円は、増大も収縮もしない末梢内のクローンを表す。

【0343】

パネルAで評価したRCC PD患者は、1日目に比べて、治療後29日目に2つの増大末梢クローン及び4つの収縮クローンを示した。パネルBのRCC PR患者は、1日目に比べて、113日の治療後に899個の増大クローン及び47個の収縮クローンを示す。

10

【0344】

これらの実験データは、IL-10剤による処置に少なくとも部分奏効を有する罹患患者の末梢が、疾患抗原特異的PD1+、CD8+T細胞の豊富な供給源であることを示しており、これを用いて抗原特異的CD8+T細胞のクローン集団の産生を促進することができる。そのようなクローン集団は、単離し、*in vitro*で増殖させ、細胞ベースの療法として使用する（例えば、同じ型の疾患（例えば、同じ型の腫瘍）を有するがん患者に投与する）ことができる。PD1+、CD8+末梢T細胞は、IL-10剤による処置に少なくとも部分奏効を有する罹患患者の末梢、得られるT細胞受容体（TCR）の配列、ならびに遺伝子改変T細胞、例えば、キメラ抗原受容体を有するT細胞（CAR-T細胞）の産生における使用に適したTCR及びTCR配列のライブラリーを産生するために使用される配列から得ることができる。

20

【0345】

[実施例7：IL-10剤療法に応答する患者の末梢から採取したPD1+、CD8+T細胞からのTCR及び/または配列のライブラリーの作製]

上記に示したように、IL-10剤による治療を受け入れ可能な疾患を有し、IL-10剤療法を受けた患者の組織試料（例えば、末梢血由来）は、抗原特異的CD8+T細胞の供給源を提供する。図7は、そのような抗原特異的CD8+T細胞のTCRの配列を得るためのこの供給源の使用可能な方法の例示的な概略を提供する。

【0346】

第一に、患者試験試料として機能するCD8+T細胞の供給源を同定するか、または取得する。この供給源は、例えば、患者から採取した血液試料（または血液試料の一部）であり得る。そのような患者は、通常、IL-10療法を受け入れ可能な任意の疾患を有し、その疾患には、がん（例えば、メラノーマ、RCC、またはリンパ腫などの固形腫瘍）及びウイルス（例えば、HBV、HCV、HIV）による感染によって引き起こされる疾患が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。IL-10剤治療レジメンは、治療する疾患、投与するIL-10剤（例えば、rHuIL-10、ペグ化rHuIL-10）などの多くの要因によって様々に異なるであろう。治療レジメンは、IL-10剤単剤療法であり得るか、またはその病態についての他の治療（例えば、併用療法におけるような）を伴ってもよい。IL-10剤単独療法による治療後に少なくとも部分的に応答性である患者は特に重要であり得る。

30

40

【0347】

所望し得る患者試験試料の任意の適切な処理に続いて、試料中に存在する少なくともVTCRポリペプチド配列をコードする核酸を得て、配列決定する。場合により、そのような核酸処理及び配列決定の前に、試料を処理してT細胞を富化することができる。例えば、試料中の細胞をFACSで選別して、PD1+CD8+T細胞の集団を得ることができる。そのような細胞を、場合によりPD1-mid発現レベルについて選択してもよく、及び/または場合により、CD45RO+及び/または細胞内IFN+及び/またはグランザイムB+及び/またはパーフォリン+であるように選択してもよい。細胞内IFN+及び/またはグランザイムB+及び/またはパーフォリン+を選択することにより、活性化抗原特異的細胞の選択が容易になる。関心がある場合、そのような選択の前に、1

50

～10 μg/mlの可溶性抗CD3の存在下での2～4時間のインキュベーションを介してIFNを誘導することができる。PD1+、CD8+T細胞（または、例えば、PD1-mid、CD8+T細胞；CD45RO+PD1+、CD8+T細胞；CD45RO+、PD1-mid+、CD8+T細胞）を任意に選別し、単一の細胞集団を提供することができる。PD1+、CD8+T細胞を、任意の適切な方法（例えば、US20060134704；US20150275296参照）を用いて、それらの抗原特異性に基づいて任意に選別し、規定の抗原特異性を有するT細胞の集団を提供することができる。関心のあるところでは、PD1+CD8+T細胞の単一または集団を、当技術分野で公知の方法に従って、培養物中で任意に増大させることができる。

【0348】

及び/またはTCR遺伝子は、例えば、適応的バイオテクノロジーまたは類似の方法などの商業的サービスによって提供される方法論を用いて単離または配列決定することができる。（例えば、US20140322716；US20150275296；US9043160参照）。

【0349】

次いで、患者試験試料から取得したTCR配列を分析して、患者試験試料中に存在するV及び/またはV配列の出現頻度を、参照試料中のこれらの同じV及び/またはV配列の出現頻度と比較して決定する。参照試料は、IL-10剤治療前の患者由来の同一組織型の試料であり得る。これに代えて、または加えて、参照試料は、治療開始後の、試料分析時点よりも前の時点における同じ患者由来の同一組織型の試料であり得る。そのような参照試料の配列データをコンピュータデータベースに提供することができ、insilioで配列比較を行うことができることは理解されたい。参照試料に比べて患者試験試料中で出現頻度が増加したV及び/またはVTCR配列は、IL-10剤療法及び/または継続的IL-10剤療法に応答して増大したクローンのTCRを表す。

【0350】

V及び/またはV配列を任意に分析して、任意のアミノ酸コンセンサス配列を同定し、患者のハプロタイプ及び疾患のタイプ（例えば、がんのタイプ）の両方に関してアミノ酸コンセンサス配列を同定することができる。これらのTCR遺伝子は、内在的に生成された新規疾患抗原特異的T細胞受容体配列を表し、これは、IL-10剤による長期投与によって特異的に誘発され、強力な抗疾患細胞機能をもたらす。

【0351】

得られたTCR核酸を使用して、完全なV及び/またはTCR配列をコードする複数の構築物（例えば、レトロウイルス構築物）を含むライブラリーを作製することができる。そのような構築物を使用して1つ以上のTCRをコードする構築物を自己患者末梢血CD8+T細胞のプールに形質導入し、それによってモノクローナルまたはポリクローナルCD8+T細胞集団を誘発する。そのようなモノクローナルまたはポリクローナルCD8+T細胞集団を単離し、治療のために患者に再注入することができる。

【0352】

いくつかの実施形態では、IL-10剤処置の前に、患者CD8+T細胞を含む疾患組織の試料（例えば、固形腫瘍生検）を患者から採取する。この前処置試料は、アーカイブ試料として用いることができる。この前処置試料は、上記の後処置試料と同じ処置に供する。核酸（例えば、DNA）を抽出し、前処置及び後処置試料中のTCR及び/または配列を決定する。VTCRポリペプチド配列は、一般的に、VTCRポリペプチドよりもTCR間でより多様性を示すため、この段階での配列分析は、VTCRポリペプチドをコードする核酸に対してのみ行うことができる。次いで、TCR及び/または配列を比較して、IL-10剤療法の前に疾患組織内に存在するT細胞中に存在し、IL-10剤療法後に出現頻度が増加したこれらの配列を決定することができる。IL-10剤療法後に増加するTCR配列は、疾患組織の抗原に特異的（例えば、腫瘍抗原特異的）である可能性が高いと同定され、IL-10剤療法によって増大したT細胞クローン中に存在するTCRを表す。そのようなTCR配列は、核酸及び/またはクローンのライブラリ

10

20

30

40

50

ーに含めるうえで特に重要である。

【 0 3 5 3 】

[実施例 8 . P E G - R H I L - 1 0 によるヒトがん被験体の治療は、抗腫瘍効果に関連する C D 8 + T 細胞クローンの増殖を誘導する：]

P E G - r h I L 1 0 (A M 0 0 1 0) 処置患者における免疫応答を評価し、客観的腫瘍縮小効果との免疫相関を同定するために、 $20 \mu\text{g} / \text{kg}$ の A M 0 0 1 0 を毎日、28 日間処置した 30 人のヒト被験体において、83 の免疫関連サイトカイン、ケモカイン及び血清タンパク質を繰り返し測定した。

【 0 3 5 4 】

A M 0 0 1 0 は、T h 1 及び T h 2 調節及び C D 8 + T 細胞活性化に偏重した免疫活性化を誘導した。T h 1 サイトカイン (I F N 、 I L - 1 8 、 T N F) ならびに活性化 T h 2 C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞の産物である I L - 3 及び I L - 4 は、一貫して増加した。I L - 7 もまた有意に誘導された。A M 0 0 1 0 はまた、細胞傷害性エフェクター分子 (F a s L 、 リンボトキシン B) を増加させ、免疫抑制性サイトカイン T G F ならびに慢性炎症及び腫瘍関連炎症を媒介する T h 1 7 関連サイトカインを減少させた。I L - 2 3 、 I L - 1 7 及びホモダイマー I L - 1 2 p 4 0 は約 40 % 減少し、一方、I L - 6 は一貫して変化しなかった。血清中の免疫刺激性サイトカインの増加は、治療期間を通して、少なくとも最大 400 日持続した。A M 0 0 1 0 は、腫瘍のタイプまたは X 線写真の腫瘍縮小効果に関係なく、I L - 1 8 において同じ一貫した変化を誘導した。

【 0 3 5 5 】

観察されたサイトカイン特性は、A M 0 0 1 0 処置患者における C D 8 + T 細胞の活性化の指標であったため、血中の C D 8 + 及び C D 4 + T 細胞を分析した。P D - 1 、 L a g - 3 または T i m - 3 などの免疫チェックポイントは、誘導可能であり、それらの活性化時に T 細胞上で発現する。さらに、増加した免疫チェックポイント発現を有する C D 8 + T 細胞は、腫瘍抗原を認識する T 細胞レパトリをを表す。末梢血由来 T 細胞におけるチェックポイント発現に関して、A M 0 0 1 0 処置に応答する表現型変化を評価した。A M 0 0 1 0 処置は、持続性の腫瘍縮小効果を有する腎細胞患者の血中の L a g - 3 + C D 8 + T 細胞を増加させた。有意な割合の L a g - 3 + C D 8 + T 細胞が P D - 1 も発現していた。評価したすべての患者において、P D - 1 + T 細胞及び増殖中の (K I - 6 7 +) P D - 1 + C D 8 + T 細胞の割合は、処置期間を通して増加し、血清サイトカインによって示唆される持続的な免疫活性化を確認した。

【 0 3 5 6 】

T 細胞の活性化の増加は、複数のチェックポイントの上方制御をもたらす。L a g - 3 を発現する C D 8 + T 細胞及び増殖する L a g - 3 + C D 8 + T 細胞の数は有意かつ持続的に増加した。しかしながら、L a g - 3 + C D 4 + T 細胞は増加せず、C D 8 + T 細胞応答に焦点を当てた免疫活性化を示した。別の免疫チェックポイント、T i m - 3 は、T 細胞のアポトーシスを誘導し、がん患者の疲弊した T 細胞と関連している。T i m - 3 (または C T L A - 4) は、わずかな割合の C D 8 + T 細胞にのみ発現し、有意に上方制御されなかった。P D - 1 + L a g - 3 + 二重陽性 C D 8 + T 細胞及びそれらの増殖は、A M 0 0 1 0 処置の間に連続的に増加し、これらの細胞の疲弊よりむしろ持続的な活性化を示した。

【 0 3 5 7 】

この活性化特性は、臨床応答と相関していた。遅延応答を有する R C C 患者では、P D - 1 + L a g - 3 + C D 8 + T 細胞の増殖が客観的な腫瘍縮小効果と同時に起こり、縮小効果に関与していることが示唆された。実際、2 か月の治療後の患者における L a g - 3 + P D - 1 + C D 8 + T 細胞の有病率及びそれらの増殖は、客観的な腫瘍縮小効果と相関していた。血中の活性化 C D 8 + T 細胞の罹患率の増加に加えて、A M 0 0 1 0 は、患者の腫瘍における活性化 C D 8 + T 細胞の数及びグランザイム B + C D 8 + T 細胞の数も増加させた。

【 0 3 5 8 】

〔実施例 9：増大 T 細胞クローンの配列同定及び特徴付け〕

患者における Lag - 3 + PD - 1 + CD 8 + T 細胞の増殖の増加及び増大は、別個の抗原チャレンジしたクローン T 細胞集団の増大及び / または末梢 T 細胞の既存のサブセットの機能的成熟を示す。各集団の寄与を評価するために、末梢血由来の TCR ディープシーケンシングにより、AM0010 処置患者の T 細胞レパートリーの組成を分析した。DNeasy キット (Qiagen) を用いて EDTA 血液試料から DNA を単離し、TCR ディープシーケンシングを行った。増大及び収縮クローンを、前処置及び処置中の試料の間に 10 倍超の変化を有する T 細胞クローンとして定義した。

【0359】

処置前及び処置中のクローン T 細胞レパートリーの比較により、AM0010 処置した患者において T 細胞クローンの強い増大があることが明らかになった。配列決定は 2,952 個のユニークな TCR CDR3V 拡張配列の存在を示した。T 細胞の増大には、治療前または既存のレパートリーにおいて検出可能なクローン及び治療前の患者において検出不可能であったクローン (新規クローン) が含まれていた。この新規増大は、多種多様ながんのタイプの患者において観察された。

【0360】

ベースラインから 10 倍を超えて変化したクローンを分析した。AM0010 は、1 患者あたり中央値 240 個 (17 ~ 786 の範囲) の T 細胞クローンに対し、10 倍超の増大をもたらしたが、一方、1 患者あたり中央値 18 個 (0 ~ 150) の T 細胞クローンのみが、10 倍を超えて収縮した。平均すると、治療前の患者の T 細胞レパートリーの 0.06 % に相当する T 細胞クローンは、末梢 T 細胞レパートリー全体の 6 % に増大した。血中の T 細胞の増大率は、縮小効果と相関していた。客観的な腫瘍縮小効果を有する患者は、中央値 15 % の T 細胞クローンの増大を有し (範囲 4.3 ~ 43 % ; > 10 倍の増大 / クローン)、それに対し、安定疾患を有する患者ではわずか 2.9 % (0.99 ~ 4.3) であり、進行性疾患を有する患者では 1.8 % (0.78 ~ 3.1) であった。さらに、客観的な腫瘍縮小効果を有する患者は、個々のクローンの中央値 761 (524 ~ 786) の増大を有していたのに対し、安定疾患を有する患者では 194 クローン (81 ~ 519) 及び進行性疾患を有する患者では 164 クローン (17 ~ 328) であった。

【0361】

抗 PD - 1 に対する腫瘍縮小効果は、腫瘍における高い遺伝子変異量と相関し、結果として生じる新抗原に対する既存の T 細胞応答が腫瘍縮小効果を促進し得ることを示唆する。希少または新規 T 細胞のクローン増大が、予測される遺伝子変異量が高いかまたは低い、及び腫瘍組織内に既存の CD 8 + T 細胞が多いかまたは少ないすべての腫瘍タイプで観察された。新規 T 細胞増大の大きさが AM0010 単独療法の患者における腫瘍縮小効果と相関していたが、一方、自己免疫関連 AE は観察されなかった。抗 CTLA - 4 療法を受けている前立腺癌患者では、患者 1 人あたり 55 を上回る CD 8 + T 細胞クローンの増大が、重篤な免疫関連有害事象 (irAE) に先行しており、このことは、これらの増大する T 細胞クローンの自己反応性を示唆している (Subudhi, S. K. et al. (2016) PNAS (USA) 113 (42) : 11919 - 11924)。

【0362】

本発明を実施するために本発明者らが知る最良の形態を含む、本発明の特定の実施形態を本明細書に記載する。上記を読むことにより、開示する実施形態の記載、変形が、当業者に明らかになる可能性があり、当業者は、そのような変形を適切に用い得ると予想される。したがって、本発明は、本明細書に具体的に記載されているものとは別の方法で実施されること、及び本発明が、適用法によって許容される通り、添付の特許請求の範囲に記載される主題のすべての改変及び均等物を含むことを意図している。さらに、本明細書中で他に指示されない限り、あるいは文脈によって明らかに否定されない限り、それらのすべての可能な変形における上記の要素の任意の組合せが本発明に包含される。

【0363】

本明細書中に引用するすべての刊行物、特許出願、受託番号、及び他の参考文献は、あ

10

20

30

40

50

たかも個々の刊行物または特許出願を具体的かつ個別に参照として援用することを示すように、参照として本明細書に援用する。

本発明は以下の態様を含む。

< 1 >

疾患抗原特異的 T 細胞の T C R の可変 (V) T 細胞受容体 (T C R) ポリペプチド及び / または可変 (V) T C R ポリペプチドの同定方法であって、

I L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な疾患を有する被験体に I L - 1 0 剤を投与すること

；
前記被験体から採取した 1 つ以上の C D 8 + T 細胞を含有する試料由来の核酸配列を配列決定すること；及び

前記 V T C R ポリペプチドをコードする前記核酸及び / または前記 V T C R ポリペプチドをコードする前記核酸の存在量を、I L - 1 0 剤療法に先立って、または I L 1 0 剤療法中のより早い時点で、I L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な前記疾患を有する 1 人以上の患者から採取した参照試料中の前記 V T C R ポリペプチドをコードする前記核酸及び / または V T C R ポリペプチドをコードする核酸の存在量と比較すること

を含み；

前記配列決定が、核酸可変 (V) T C R ポリペプチドをコードする核酸及び / または可変 (V) T C R ポリペプチドをコードする核酸を配列決定することを含み

前記参照試料中よりも多量に前記試料中に存在する前記 V 及び / または V T C R ポリペプチドが、疾患抗原特異的 C D 8 + T 細胞に特異的な V / V T C R ポリペプチド対を表す、同定方法。

< 2 >

前記被験体が、I L - 1 0 剤治療に対して、少なくとも安定または少なくとも部分奏効を示す、< 1 > に記載の方法。

< 3 >

前記被験体が、I L - 1 0 剤療法に対する少なくとも部分奏効を示す、< 2 > に記載の方法。

< 4 >

前記試料を、P D 1 +、C D 8 + T 細胞について富化する、< 1 > ~ < 3 > のいずれかに記載の方法。

< 5 >

前記 P D 1 +、C D 8 + T 細胞が、少なくとも P D 1 + m i d のレベルで細胞表面 P D 1 を発現する、< 4 > に記載の方法。

< 6 >

前記 P D 1 +、C D 8 + T 細胞が、少なくとも P D 1 + h i g h のレベルで細胞表面 P D 1 を発現する、< 4 > に記載の方法。

< 7 >

前記試料を、C D 4 5 R O +、C D 8 + T 細胞について富化する、< 1 > ~ < 6 > のいずれかに記載の方法。

< 8 >

前記試料を、I F N + C D 8 + T 細胞について富化する、< 1 > ~ < 7 > のいずれかに記載の方法。

< 9 >

前記 C D 8 + T 細胞を C D 3 アゴニストと接触させて I F N 発現を刺激することを含む、< 8 > に記載の方法。

< 1 0 >

前記 C D 3 アゴニストが抗 C D 3 抗体である、< 9 > に記載の方法。

< 1 1 >

前記試料を、P D 1 +、I F N +、C D 4 5 R O +、グランザイム B +、及び / またはパーフォリン + である C D 8 + T 細胞について富化する、< 1 > ~ < 3 > のいずれかに

10

20

30

40

50

記載の方法。

< 1 2 >

前記 1 人以上の患者に前記被験体が含まれる、< 1 > ~ < 1 1 > のいずれかに記載の方法。

< 1 3 >

前記被験体が腫瘍を有し、

前記 C D 8 + T 細胞が腫瘍抗原に特異的である、< 1 > ~ < 1 2 > のいずれかに記載の方法。

< 1 4 >

前記被験体が腫瘍を有し、

前記 C D 8 + T 細胞が腫瘍浸潤性リンパ球である、< 1 > ~ < 1 2 > のいずれかに記載の方法。

< 1 5 >

前記腫瘍が固形腫瘍である、< 1 3 > または < 1 4 > に記載の方法。

< 1 6 >

前記腫瘍が、子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、胃腸管、腎臓、腎細胞、膀胱、骨、骨髓、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、膵臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳、神経節、中枢神経系 (C N S) 及び末梢神経系 (P N S) の癌、または造血系、脾臓、もしくは胸腺の癌から選択されるがんの腫瘍である、< 1 3 > または < 1 4 > に記載の方法。

< 1 7 >

前記腫瘍が、食道、咽頭、胃、小腸、大腸、結腸、または直腸の癌の腫瘍である、< 1 3 > または < 1 4 > に記載の方法。

< 1 8 >

前記腫瘍が、メラノーマ、結腸直腸癌、または腎臓癌である、< 1 3 > または < 1 4 > に記載の方法。

< 1 9 >

前記被験体が、ウイルス感染を有し、

前記 C D 8 + T 細胞が感染ウイルスの抗原に特異的である、< 1 > ~ < 1 2 > のいずれかに記載の方法。

< 2 0 >

前記ウイルスが、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスである、< 1 9 > に記載の方法。

< 2 1 >

前記ウイルスが、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス (C M V) またはヒト免疫不全ウイルス (H I V) である、< 2 0 > に記載の方法。

< 2 2 >

前記 I L - 1 0 剤がヒト I L - 1 0 である、< 1 > ~ < 2 1 > のいずれかに記載の方法。

< 2 3 >

前記 I L - 1 0 剤がペグ化 I L - 1 0 (P E G - I L - 1 0) である、< 1 > ~ < 2 2 > のいずれかに記載の方法。

< 2 4 >

前記 P E G - I L - 1 0 が、I L - 1 0 の少なくとも 1 つのモノマーの N 末端アミノ酸残基に共有結合した少なくとも 1 つの P E G 分子を含む、< 2 3 > に記載の方法。

< 2 5 >

前記 P E G - I L - 1 0 が、モノペグ化 I L - 1 0 及びジペグ化 I L - 1 0 の混合物を含む、< 2 3 > に記載の方法。

< 2 6 >

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が、5 k D a ~ 3 0 k D a の分子量を有する、< 2 3 > ~ < 2 5 > のいずれかに記載の方法。

< 2 7 >

10

20

30

40

50

前記 I L - 1 0 剤を、被験体に皮下投与する、＜ 1 ＞～＜ 2 6 ＞のいずれかに記載の方法。

＜ 2 8 ＞

前記被験体がヒト被験体である、＜ 1 ＞～＜ 2 7 ＞のいずれかに記載の方法。

＜ 2 9 ＞

前記 V T C R ポリペプチドをコードする核酸及び／または前記 V T C R ポリペプチドをコードする核酸を配列決定すること；及び

前記 V T C R ポリペプチド及び／または前記 V T C R ポリペプチドの少なくとも前記相補性決定領域（C D R）の前記アミノ酸配列を決定すること；

前記 V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列及び／または前記 V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列の存在量を、I L - 1 0 剤療法に先立って、または I L 1 0 剤療法中のより早い時点で、I L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な前記疾患を有する 1 人以上の患者から採取した参照試料中の前記 V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列及び／または前記 V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列と比較すること

を含む、＜ 1 ＞～＜ 2 8 ＞のいずれかに記載の方法。

＜ 3 0 ＞

＜ 1 ＞～＜ 2 9 ＞のいずれかに記載の方法に従って単離した C D 8 + T 細胞上に発現する T C R の抗原特異性を、前記 V 及び／または V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列を前記参照試料中の V 及び／または V T C R ポリペプチドのアミノ酸配列と比較することによって評価することを含む、＜ 1 ＞～＜ 2 9 ＞のいずれかに記載の方法。

＜ 3 1 ＞

疾患抗原特異的 T 細胞の T C R の可変（V）T 細胞受容体（T C R）ポリペプチド及び可変（V）T C R ポリペプチドをコードするベクターの生成方法であって、

I L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な疾患に対して I L - 1 0 剤療法を投与した被験体から採取した 1 つ以上の C D 8 + T 細胞を含む試料由来の核酸を配列決定すること；及び

疾患抗原特異的 C D 8 + T 細胞の T C R の V 及び V T C R ポリペプチド対をコードする核酸を 1 つ以上の構築物にクローニングして、疾患抗原特異的 T C R の V 及び V T C R ポリペプチドの一方または両方をコードするベクターを作製すること

を含み、

前記 C D 8 + T 細胞が、可変（V）T C R ポリペプチド及び可変（V）T C R ポリペプチドをコードする核酸を有する疾患抗原特異的 T 細胞受容体（T C R）を発現し

—

I L - 1 0 剤に先立って、または I L 1 0 剤治療中のより早い時点で、前記 I L - 1 0 剤療法を受け入れ可能な疾患を有する 1 人以上の患者から採取した参照試料よりも豊富に存在する V 及び／または V T C R ポリペプチドが、疾患抗原特異的 C D 8 + T 細胞の前記 V / V T C R ポリペプチド対を表す、方法。

＜ 3 2 ＞

前記ベクターが、前記 V 及び V T C R ポリペプチド対の促進された発現の、C D 8 + T 細胞への安定な形質移入に適している、＜ 3 1 ＞に記載の方法。

＜ 3 3 ＞

前記被験体が、I L - 1 0 剤治療に対して、少なくとも安定または少なくとも部分奏効を示す、＜ 3 1 ＞または＜ 3 2 ＞に記載の方法。

＜ 3 4 ＞

前記被験体が、I L - 1 0 薬剤療法に対して少なくとも部分奏効を示す、＜ 3 3 ＞に記載の方法。

＜ 3 5 ＞

前記試料を、P D 1 + , C D 8 + T 細胞について富化する、＜ 3 1 ＞～＜ 3 4 ＞のいずれかに記載の方法。

＜ 3 6 ＞

前記 P D 1 + , C D 8 + T 細胞が、少なくとも P D 1 + m i d のレベルで細胞表面 P D

10

20

30

40

50

1を発現する、＜35＞に記載の方法。

＜37＞

前記PD1+、CD8+T細胞が、少なくともPD1+highのレベルで細胞表面PD1を発現する、＜35＞に記載の方法。

＜38＞

前記試料を、CD45RO+、CD8+T細胞について富化する、＜31＞～＜37＞のいずれかに記載の方法。

＜39＞

前記試料を、IFN+CD8+T細胞について富化する、＜31＞～＜38＞のいずれかに記載の方法。

＜40＞

前記CD8+T細胞をCD3アゴニストと接触させてIFN発現を刺激することを含む、＜39＞に記載の方法。

＜41＞

前記CD3アゴニストが抗CD3抗体である、＜40＞に記載の方法。

＜42＞

前記試料を、PD1+、IFN+、CD45RO+、グランザイムB+、及び/またはパーフォリン+であるCD8+T細胞について富化する、＜31＞～＜34＞のいずれかに記載の方法。

＜43＞

前記一人以上の患者に、前記被験体が含まれる、＜31＞～＜42＞のいずれかに記載の方法。

＜44＞

前記被験体が腫瘍を有し、

前記CD8+T細胞が腫瘍抗原に特異的である、＜31＞～＜43＞のいずれかに記載の方法。

＜45＞

前記被験体が腫瘍を有し、

前記CD8+T細胞が腫瘍浸潤性リンパ球である、＜31＞～＜43＞のいずれかに記載の方法。

＜46＞

前記腫瘍が固形腫瘍である、＜44＞または＜45＞に記載の方法。

＜47＞

前記腫瘍が、子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、胃腸管、腎臓、腎細胞、膀胱、骨、骨髄、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、膵臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳、神経節、中枢神経系(CNS)及び末梢神経系(PNS)、または造血系、脾臓、もしくは胸腺の癌から選択されるがんの腫瘍である、＜44＞または＜45＞に記載の方法。

＜48＞

前記腫瘍が、食道、咽頭、胃、小腸、大腸、結腸、または直腸の癌の腫瘍である、＜44＞または＜45＞に記載の方法。

＜49＞

前記腫瘍が、メラノーマ、結腸直腸癌、または腎臓癌である、＜44＞または＜45＞に記載の方法。

＜50＞

前記被験体がウイルス感染を有し、

前記PD1+、CD8+T細胞が、前記感染性ウイルスの抗原に特異的である、＜31＞～＜43＞のいずれかに記載の方法。

＜51＞

前記ウイルスが、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスである、＜50＞に記載の方法。

10

20

30

40

50

< 5 2 >

前記ウイルスが、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）またはヒト免疫不全ウイルス（HIV）である、< 5 1 >に記載の方法。

< 5 3 >

前記IL - 10 剤がヒトIL - 10 である、< 3 1 > ~ < 5 2 >のいずれかに記載の方法。

< 5 4 >

前記IL - 10 剤がペグ化IL - 10 である、< 3 1 > ~ < 5 2 >のいずれかに記載の方法。

< 5 5 >

前記PEG - IL - 10 が、IL - 10 の少なくとも1つのモノマーのN末端アミノ酸残基に共有結合した少なくとも1つのPEG分子を含む、< 5 4 >に記載の方法。

< 5 6 >

前記PEG - IL - 10 が、モノペグ化IL - 10 及びジペグ化IL - 10 の混合物を含む、< 5 4 >に記載の方法。

< 5 7 >

前記PEG - IL - 10 の前記PEG成分が、5 kDa ~ 30 kDaの分子量を有する、< 5 4 > ~ < 5 6 >のいずれかに記載の方法。

< 5 8 >

前記IL - 10 剤を、前記被験体に皮下投与する、< 3 1 > ~ < 5 7 >のいずれかに記載の方法。

< 5 9 >

前記被験体がヒト被験体である、< 3 1 > ~ < 5 8 >のいずれかに記載の方法。

< 6 0 >

前記CD8 + T細胞のTCRの複数のV / V TCRペアの前記V 及びV TCRポリペプチドをコードする複数の核酸を複数のベクターにクローニングし、前記CD8 + T細胞の前記疾患抗原特異的TCRのV 及びV TCRポリペプチド対をコードする構築物のライブラリーを作製する、< 3 1 > ~ < 5 9 >のいずれかに記載の方法。

< 6 1 >

前記V TCRポリペプチド及び前記V TCRポリペプチドを、同一ベクター中にクローニングする、< 3 1 > ~ < 5 9 >のいずれかに記載の方法。

< 6 2 >

前記V TCRポリペプチド及び前記V TCRポリペプチドをベクターにクローニングし、それによって全長 TCRポリペプチドをコードする核酸及び全長 TCRポリペプチドをコードする核酸を提供する、< 6 1 >に記載の方法。

< 6 3 >

前記V TCRポリペプチド及び前記V TCRポリペプチドをベクターにクローニングし、それによって一本鎖T細胞受容体（scTv）をコードする核酸を提供する、< 6 1 >に記載の方法。

< 6 4 >

前記scTvが、N末端からC末端方向に、前記V TCRポリペプチド、リンカー、及び前記V TCRポリペプチドを含む、< 6 3 >に記載の方法。

< 6 5 >

前記ベクターが発現ベクターである、< 3 1 > ~ < 6 4 >のいずれかに記載の方法。

< 6 6 >

< 6 0 >に記載の方法によって作製する核酸ベクターのライブラリー。

< 6 7 >

遺伝子改変T細胞の生成方法であって、

< 3 1 > ~ < 5 9 >のいずれかに記載の方法によって得られた構築物をCD8 + T細胞内に導入して、疾患抗原特異的TCRの前記V 及びV TCRポリペプチド対を発現す

10

20

30

40

50

る遺伝子改変 T 細胞を産生することを含む、生成方法。

< 6 8 >

前記 V T C R ポリペプチド及び前記 V T C R ポリペプチドが、同一または異なる発現構築物上の別個の発現カセットにコードされる、< 6 7 > に記載の方法。

< 6 9 >

前記構築物によりコードされる前記 V T C R ポリペプチドが、その C 末端で、定常 T C R ポリペプチドに作動可能に連結する、< 6 7 > または < 6 8 > に記載の方法。

< 7 0 >

前記構築物によりコードされる前記 V T C R ポリペプチドが、その C 末端で、定常 T C R ポリペプチドに作動可能に連結する、< 6 7 > または < 6 8 > に記載の方法。

< 7 1 >

前記構築物が、V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチドを含む一本鎖 T C R (s c T v) をコードする核酸を含む、< 6 7 > に記載の方法。

< 7 2 >

前記 s c T v が、N 末端から C 末端方向に、前記 V T C R ポリペプチド、リンカー、及び前記 V T C R ポリペプチドを含む、< 7 1 > に記載の方法。

< 7 3 >

< 6 7 > ~ < 7 2 > のいずれかに記載の方法によって産生する遺伝子改変 C D 8 + T 細胞の集団。

< 7 4 >

C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患を有する被験体の治療方法であって、
遺伝子改変 C D 8 + T 細胞を前記被験体に投与すること
を含み、

前記 T 細胞が、前記被験体の前記疾患の抗原に特異的である疾患抗原特異的 T C R の V / V ペアの V T C R ポリペプチド及び V T C R ポリペプチドを含む組換え T C R を発現するように遺伝子改変されており、

前記投与が、前記被験体の前記疾患を治療するのに有効である、治療方法。

< 7 5 >

前記 V T C R ポリペプチドの前記 C D R 及び前記 V T C R ポリペプチドの前記 C D R の前記アミノ酸配列を、< 1 > ~ < 2 6 > のいずれかに記載の方法に従って同定する、
< 7 4 > に記載の方法。

< 7 6 >

前記 V T C R ポリペプチド及び前記 V T C R ポリペプチドの前記アミノ酸配列を、
< 2 5 > の方法に従って同定する、< 7 4 > に記載の方法。

< 7 7 >

前記遺伝子改変 T 細胞の前記 V T C R ポリペプチド及び前記 V T C R ポリペプチドが、同一または異なる発現構築物の別々の発現カセットにコードされる、< 7 4 > ~ < 7 6 > のいずれかに記載の方法。

< 7 8 >

前記遺伝子改変 T 細胞の前記 V T C R ポリペプチドが、前記構築物にコードされ、その C 末端で定常 T C R ポリペプチドに作動可能に連結する、< 7 4 > ~ < 7 7 > のいずれかに記載の方法。

< 7 9 >

前記遺伝子改変 T 細胞の前記 V T C R ポリペプチドが、前記構築物にコードされ、その C 末端で定常 T C R ポリペプチドに作動可能に連結する、< 7 4 > ~ < 7 8 > のいずれかに記載の方法。

< 8 0 >

前記遺伝子改変 T 細胞の前記 V T C R ポリペプチド及び前記 V T C R ポリペプチドが、前記 V T C R ポリペプチド及び前記 V T C R ポリペプチドを含む一本鎖 T C R (s c T v) をコードする核酸を含む構築物にコードされる、< 7 4 > ~ < 7 6 > のいずれ

10

20

30

40

50

かに記載の方法。

< 8 1 >

前記 s c T v が、N - 末端から C - 末端方向に、前記 V T C R ポリペプチド、リンカー、及び前記 V T C R ポリペプチドを含む、< 8 0 > に記載の方法。

< 8 2 >

前記 C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患ががんであり、

前記遺伝子改変 C D 8 + T 細胞の前記疾患抗原特異的 T C R ががんの抗原に特異的である、< 7 4 > ~ < 8 1 > のいずれかに記載の方法。

< 8 3 >

前記がんが固形腫瘍である、< 8 2 > に記載の方法。

10

< 8 4 >

前記腫瘍が、子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、胃腸管、腎臓、腎細胞、膀胱、骨、骨髓、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、膵臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳、神経節、中枢神経系 (C N S) 及び末梢神経系 (P N S) 、または造血系、脾臓、もしくは胸腺の癌から選択されるがんの腫瘍である、< 8 2 > または < 8 3 > に記載の方法。

< 8 5 >

前記がんが、食道、咽頭、胃、小腸、大腸、結腸、または直腸の癌である、< 8 2 > または < 8 3 > に記載の方法。

< 8 6 >

前記がんが、メラノーマ、結腸直腸癌、または腎臓癌である、< 8 2 > または < 8 3 > に記載の方法。

20

< 8 7 >

前記 C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患がウイルス感染であり、

前記遺伝子改変 C D 8 + T 細胞の前記疾患抗原特異的 T C R が前記ウイルスの抗原に特異的である、< 7 4 > ~ < 8 1 > のいずれかに記載の方法。

< 8 8 >

前記ウイルスが、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスである、< 8 7 > に記載の方法。

< 8 9 >

前記ウイルスが、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス (C M V) またはヒト免疫不全ウイルス (H I V) である、< 8 7 > に記載の方法。

30

< 9 0 >

さらなる治療剤を投与することを含む、< 7 4 > ~ < 8 9 > のいずれかに記載の方法。

< 9 1 >

前記治療剤が I L - 1 0 剤である、< 9 0 > に記載の方法。

< 9 2 >

前記 C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患ががんであり、

前記治療剤が化学療法剤である、< 9 0 > または < 9 1 > に記載の方法。

< 9 3 >

前記 C D 8 + T 細胞療法を受け入れ可能な疾患がウイルス感染であり、

前記治療剤が抗ウイルス剤である、< 9 0 > または < 9 1 > に記載の方法。

40

< 9 4 >

前記投与が、複数の遺伝子改変 C D 8 + T 細胞を投与することを含み、

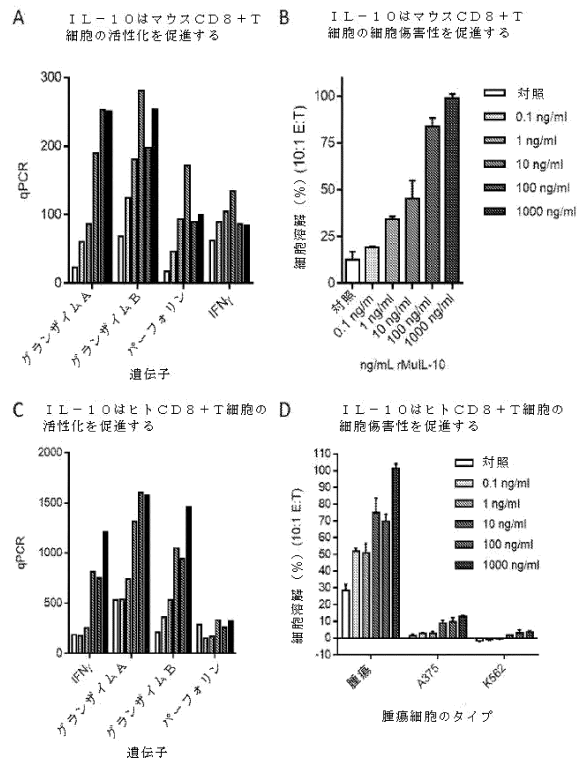
前記複数の前記遺伝子改変 C D 8 + T 細胞が、異なる疾患抗原特異的 T C R を有する遺伝子改変 C D 8 + T 細胞を含む、< 7 4 > ~ < 9 3 > のいずれかに記載の方法。

< 9 5 >

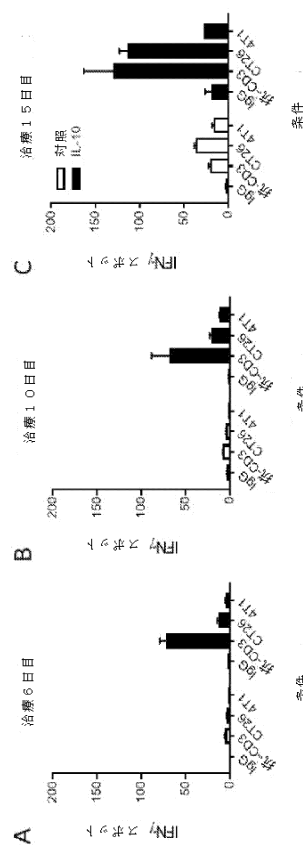
前記遺伝子改変 C D 8 + T 細胞が、前記被験体に対して自己由来である、< 7 4 > ~ < 9 4 > のいずれかに記載の方法。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

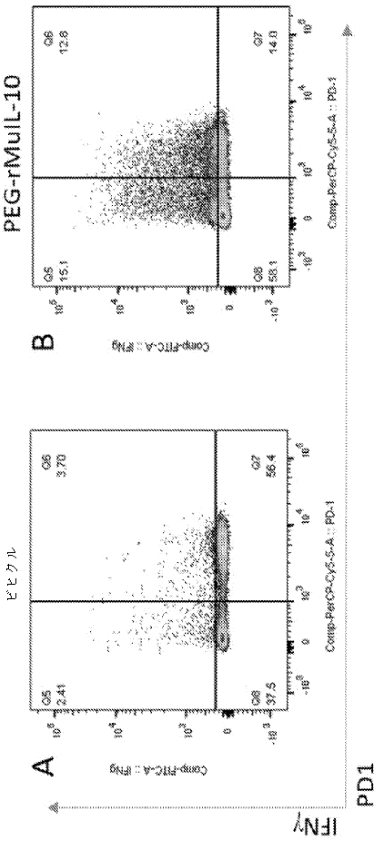
20

30

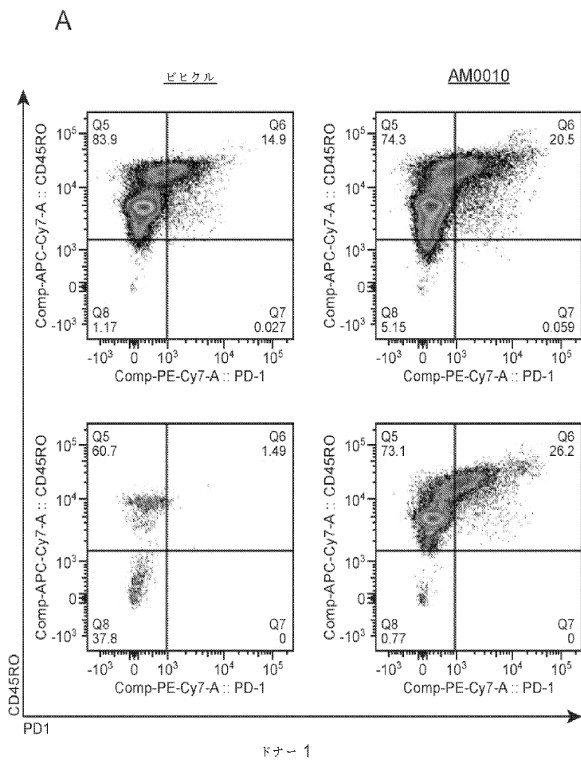
40

50

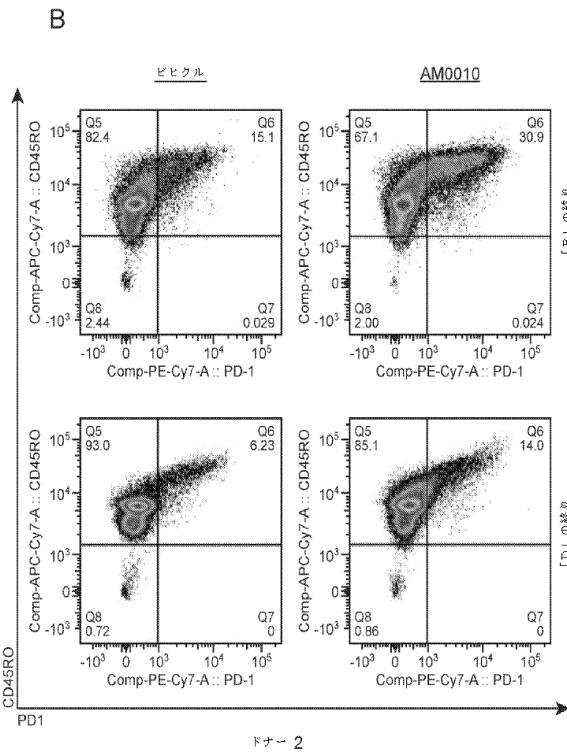
【図 3】



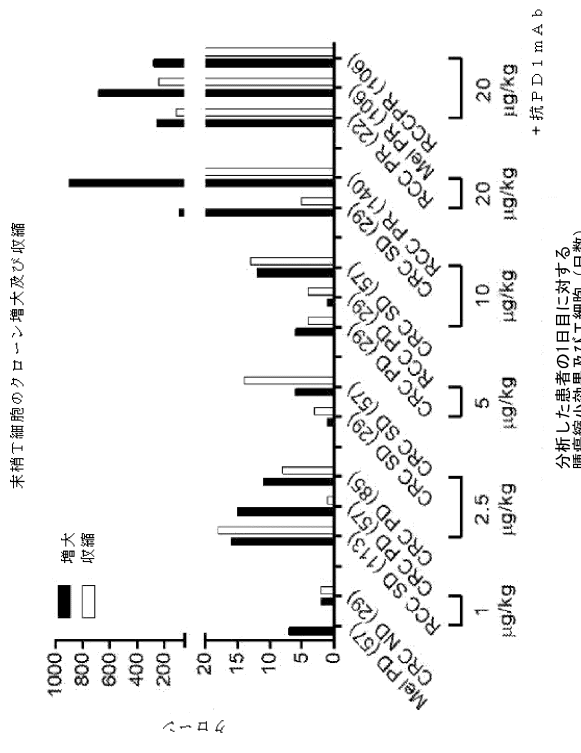
【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



【図 5】



10

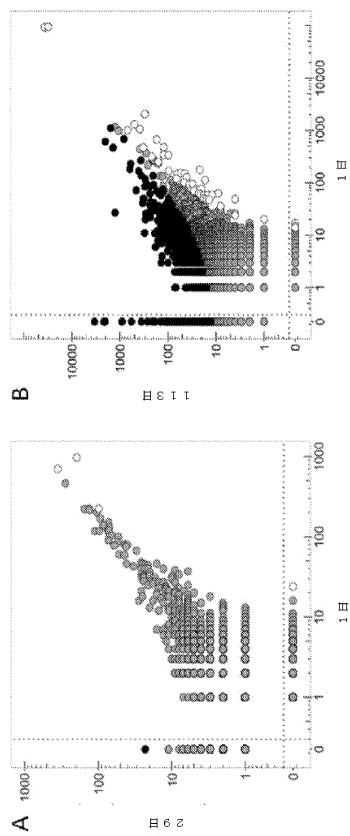
20

30

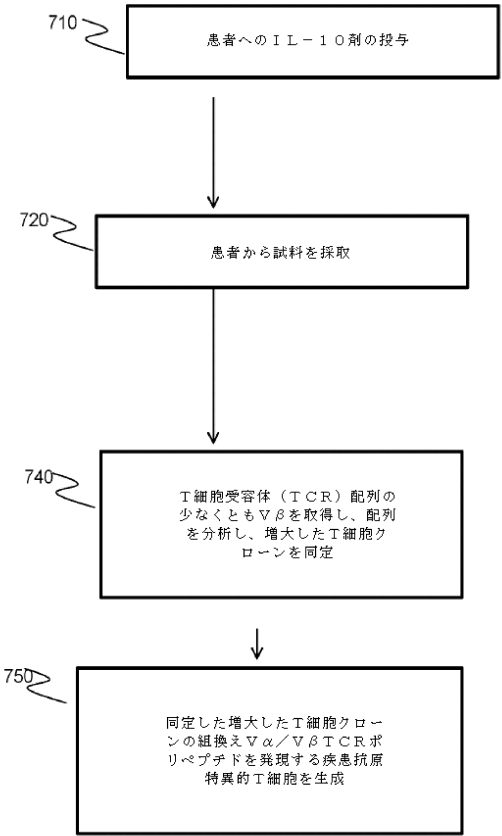
40

50

【図 6】



【図 7】



【配列表】

0007082051000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/22 (2006.01)	A 6 1 P	31/22	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	31/20 (2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18	
C 4 0 B	40/02 (2006.01)	C 4 0 B	40/02	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z Z N A
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	A 6 1 K	39/395	S
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/60	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 Q	1/6883(2018.01)	G 0 1 N	33/50	Z
		G 0 1 N	33/15	Z
		C 1 2 Q	1/6883	Z

アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 2、ロス・アルトス・ヒルズ、ページ・ミル・ロード
・ 1 2 1 2 1

(72)発明者 チャン，アイヴァン・ホー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 6 3、レッドウッド・シティ、ベラ・アベニュー・ 1 2
4 エー

(72)発明者 マコーリー，スコット

アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 0 5、プリズベン、サン・ベニート・ロード・ 2 6 5

(72)発明者 オッグ，スコット

アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 1 1 4、サン・フランシスコ、 2 0 ・ストリート・ 3 9 7
4

(72)発明者 オフト，マーティン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 3 0 3、パロ・アルト、チャニング・アベニュー・ 1 6 3
0

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 ABATE-DAGA, Daniel et al. , Development of a T cell Receptor Targeting an HLA-A*0201 Re-
stricted Epitope from the Cancer-Testis Antigen SSX2 for Adoptive Immunotherapy of Canc-
er , PLOS ONE , 2014年 , Vol. 9, No. 3 , e93321

MUMM, John B. and Oft, Martin , Pegylated IL-10 induces cancer immunity The surprising
role of IL-10 as a potent inducer of IFN- -mediated CD8+T cell cytotoxicity , Bioessays , 2
013年 , Vol. 35 , p. 623-631

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 P 3 5 / 0 0
A 6 1 K 3 5 / 1 7
A 6 1 P 4 3 / 0 0
A 6 1 K 4 8 / 0 0
A 6 1 K 3 8 / 2 0
C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3

C 4 0 B 4 0 / 0 2

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)