

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7447011号  
(P7447011)

(45)発行日 令和6年3月11日(2024.3.11)

(24)登録日 令和6年3月1日(2024.3.1)

|                         |                |       |  |  |
|-------------------------|----------------|-------|--|--|
| (51)国際特許分類              | F I            |       |  |  |
| C 1 2 N 5/0783(2010.01) | C 1 2 N 5/0783 | Z N A |  |  |
| A 6 1 K 35/17 (2015.01) | A 6 1 K 35/17  |       |  |  |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00  |       |  |  |
| 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 |  |  |
| 請求項の数 20 (全55頁)         |                |       |  |  |

|                   |                               |          |  |
|-------------------|-------------------------------|----------|--|
| (21)出願番号          | 特願2020-551874(P2020-551874)   | (73)特許権者 | 518256430  |
| (86)(22)出願日       | 平成31年3月28日(2019.3.28)         |          | ボード オブ リージェンツ ザ ユニヴァーシティ オブ テキサス システム            |
| (65)公表番号          | 特表2021-519087(P2021-519087 A) |          | アメリカ合衆国 テキサス州 7 8 7 0 1                          |
| (43)公表日           | 令和3年8月10日(2021.8.10)          |          | オースティン ウェスト セブンス ストリート 2 1 0                     |
| (86)国際出願番号        | PCT/US2019/024693             | (74)代理人  | 110000109  |
| (87)国際公開番号        | WO2019/191501                 |          | 弁理士法人特許事務所サイクス                                   |
| (87)国際公開日         | 令和1年10月3日(2019.10.3)          | (72)発明者  | イー カッシアン   |
| 審査請求日             | 令和4年3月25日(2022.3.25)          |          | アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0                          |
| (31)優先権主張番号       | 62/649,265                    |          | ヒューストン ホルコム ブールヴァード                              |
| (32)優先日           | 平成30年3月28日(2018.3.28)         |          | 1 5 1 5 ユニヴァーシティ オブ テキサス エムディー アンダーソン キャンサー センター |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                        | (72)発明者  | ワン ジュンメイ   |
| 前置審査              |                               |          | 最終頁に続く   |

(54)【発明の名称】 エフェクターT細胞をリプログラムするためのヒストン修飾因子の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原特異的エフェクターT細胞(T<sub>EFF</sub>細胞)をセントラルメモリーT細胞(T<sub>CM</sub>細胞)にリプログラミングするための方法であって:

(a)腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の試料から得られたT<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団、又は

(b)末梢血単核細胞(PBMC)を含む試料から得られたT<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団、又は

(c)T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団から得られたT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料、を培養することを含み、

培養が、それぞれT<sub>EFF</sub>細胞をT<sub>CM</sub>細胞にリプログラムするのに十分な量のヒストンデアセチラーゼ阻害剤(HDACi)及びインターロイキン-21(IL-21)の存在下においてであり、

前記リプログラミングにより、対象から得たT<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団におけるT<sub>CM</sub>細胞の数と比較して、T<sub>CM</sub>細胞に富むリンパ球の集団が生成され、前記HDACiがクラスIまたはクラスIIのHDACiである、方法。

【請求項2】

前記T<sub>EFF</sub>細胞に富む試料が、前記T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団からCD8<sup>+</sup>T<sub>EF</sub>F細胞を単離することによって得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

$T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を得ることが、前記 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から骨髄由来サブレッサー細胞(MDSC)、 $T_{REGs}$ 、NK細胞、及びマクロファージを枯渇させることをさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記 $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞が $CD45RO$ を発現する、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記 $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞が、 $IL-21$ を添加する前に $HDACi$ の存在下で培養される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記 $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞が、 $HDACi$ を添加する前に $IL-21$ の存在下で培養される、請求項4に記載の方法。

10

【請求項7】

前記 $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞が、 $HDACi$ 及び $IL-21$ の存在下で同時に培養される、請求項4に記載の方法。

【請求項8】

前記 $IL-21$ が $10ng/mL \sim 50ng/mL$ の濃度で存在する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記 $HDACi$ が $1nM \sim 5nM$ の濃度で存在する、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記 $IL-21$ が $20ng/mL \sim 40ng/mL$ の濃度で存在し、前記 $HDACi$ が $2nM \sim 4nM$ の濃度で存在する、請求項1に記載の方法。

20

【請求項11】

前記 $HDACi$ が古典的な $HDACi$ である、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記古典的な $HDACi$ が、トリコスタチンA、トラボキシニンB、フェニルブチレート、バルプロ酸、ポリノスタット(スベラニロヒドロキサム酸又はSAHA、Zolinza(登録商標)として販売されている)、ペリノスタット(PXD101、Beleodaq(登録商標)として販売されている)、パノビノスタット(Farydaq(登録商標)として販売されている)、ダシノスタット(LAQ824)、エンチノスタット(SNDX-275又はMS-275)、タセジナリン(CI994)、及びモセチノスタット(MGCD0103)からなる群から選択される、請求項11に記載の方法。

30

【請求項13】

前記 $HDACi$ がSAHAである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記 $HDACi$ がパノビノスタットである、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

得られる $T_{CM}$ 細胞が $CD8^+$ であり、また、 $CD45RO$ 、 $CD28$ 、 $CD62L$ 、及び $CCR7$ のうちの少なくとも2つを発現する、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項16】

$T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団における前記 $T_{CM}$ 細胞がまた、増加したレベルのグランザイムB及びパーフォリン1を発現する、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

それぞれ $T_{EFF}$ 細胞を $T_{CM}$ 細胞にリプログラムするのに十分な量の $HDACi$ 及び $IL-21$ の存在下で、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団又は $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を培養するステップの前に、又はそれと同時に、前記 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団又は前記 $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を $IL-2$ と接触させるステップをさらに含む、請求項1~16のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 18】

前記 T<sub>CM</sub>細胞に富むリンパ球の集団が、前記 T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団よりも少なくとも5倍多い T<sub>CM</sub>細胞を含む、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

T<sub>EFF</sub>細胞から T<sub>CM</sub>細胞を生成するための方法であって：

(a) 2 nM ~ 4 nM の濃度の HDACi と 20 ng / mL ~ 40 ng / mL の濃度の IL - 21 を、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団に同時に添加すること；並びに

(b) 前記 T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団を 12 ~ 16 日間培養し、それにより、前記 T<sub>EFF</sub>細胞をリプログラミングして、前記 T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団における T<sub>CM</sub>細胞の数と比較して T<sub>CM</sub>細胞に富むリンパ球の集団を生成することを含み、前記 HDACi がクラス I またはクラス II の HDACi である、方法。

10

## 【請求項 20】

請求項 1 から 18 の何れか一項に記載の方法により製造された組成物であって、T細胞の少なくとも 20% が CD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>T細胞である、ヒトセントラルメモリー様 CD8<sup>+</sup>T細胞の集団を含む組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2018年3月28日に出願された米国仮特許出願第 62 / 649 , 265 号の利益を主張する。

20

## 【0002】

配列表の組み込み

「UTF8.P1311WO\_\_ST25.txt」という名称のファイルに含まれる、3.81KB (Microsoft Windows で測定) である、2019年3月28日に作成された配列表は、電子提出によって本明細書と共に出願され、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0003】

本発明は、一般に、医学及び免疫学の分野に関する。より詳細には、本発明は、セントラルメモリー表現型 (central memory phenotype) を有する T細胞を生成する方法に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0004】

エクスピボで活性化され、増殖された自己腫瘍特異的 Tリンパ球の投与である養子 T細胞療法 (ACT) は、従来の療法に対して以前は抵抗性であった転移性黒色腫患者において臨床応答を誘導することが示されている。患者の応答率は、インピボで注入された T細胞の持続性と相関している。しかしながら、多くの場合、末梢血及び腫瘍部位に見られる抗原特異的 T細胞は、高分化型エフェクター、エフェクターメモリー、及び時には増殖能力が非常に限られた末端エフェクター細胞である。セントラルメモリー CD8<sup>+</sup>T細胞は、自己複製が可能であり、共刺激受容体 CD28 及びその他のメモリー関連マーカー (例えば、CD127 及び CD62L) を高度に発現する (Klebanoff et al., 2005)。従って、高分化型エフェクター細胞から自己複製することができるセントラルメモリー T細胞を生成する方法には満たされていない要求がある。セントラルメモリー表現型を有するこれらの T細胞は、インピボでの持続性が高いため、高い応答率で ACT に使用できる。

40

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

本開示のある実施形態は、リプログラミング又は脱分化などによって、エフェクター表現型を有する T細胞からセントラルメモリー表現型を有する T細胞を生成するための方法 (例えば、インピトロ又はエクスピボ) を提供する。

50

## 【 0 0 0 6 】

一実施形態では、抗原特異的エフェクターT細胞（ $T_{EFF}$ 細胞）をセントラルメモリーT細胞（ $T_{CM}$ 細胞）にリプログラミングするための方法が提供され、この方法は、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団を対象から得ること；所望により、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を調製すること；並びにそれぞれ $T_{EFF}$ 細胞を $T_{CM}$ 細胞にリプログラムするのに十分な量のヒストンデアセチラーゼ阻害剤（ $HDAci$ ）及びインターロイキン-21（ $IL-21$ ）の存在下で、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団又は $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を培養することを含み、このリプログラミングにより、対象から得た $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団における $T_{CM}$ 細胞の数と比較して $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団が生成される。

10

## 【 0 0 0 7 】

いくつかの態様では、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団を得ることは、腫瘍浸潤リンパ球（ $TIL$ ）の試料又は末梢血単核細胞（ $PBMC$ ）を含む試料を対象から採取することを含む。追加の態様では、この方法は、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から、 $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を調製するステップをさらに含む。いくつかの態様では、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を調製するステップは、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞を単離することを含む。

## 【 0 0 0 8 】

ある態様では、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を調製するステップは、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から骨髄由来サブレッサー細胞（ $MDS$ ）、 $T_{REGs}$ 、NK細胞、及びマクロファージを枯渇させることをさらに含む。いくつかの態様では、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を調製するステップは、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から骨髄由来サブレッサー細胞（ $MDS$ ）、 $T_{REGs}$ 、NK細胞、及びマクロファージを枯渇させることを含む。いくつかの態様では、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を調製するステップは、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞を単離することをさらに含む。

20

## 【 0 0 0 9 】

いくつかの態様では、 $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞は $CD45RO$ を発現する。ある態様では、 $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞は $CD45RO$ を高発現する。特定の態様では、細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の陽性発現、高発現、又は低発現は、対照集団における前記細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の発現レベルと比較して定義される。特定の態様では、対照集団は、細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の検出不可能なレベルが陰性であるか、又はそれらを有する集団である。いくつかの態様では、対照集団は、陽性発現、高発現、又は低発現の集団と同じ試料中にある。他の態様では、対照集団は、陽性発現、高発現、又は低発現の集団を含む試料と実質的に同様の試料中にある。例えば、 $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞での $CD45RO$ の高発現は、対照集団の $CD8^+$   $T_{EFF}$ 細胞における $CD45RO$ の発現レベルと比較して高い発現レベルとして定義することができる。相対的発現レベルは、特にフローサイトメトリーによって測定されるように、細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の相対的蛍光シグナルとして測定することができる。

30

40

## 【 0 0 1 0 】

特定の例では、細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の高発現は、低発現集団で決定された発現レベルよりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、又は10倍（又はこれらから導き出せる任意の値）高い発現に相当し得る。具体的には、細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の高発現は、対照細胞集団の蛍光シグナルと比較して、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、又は10倍（又はこれらから導き出せる任意の値）高い蛍光シグナルに相当し得る。対照細胞集団は、細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の発現が低い、検出できない、又は正常な細胞集団であり得る。他の例では、細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の高発現は、低発現集団で決定された発現レベルよりも20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、

50

100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍、又は10,000倍（又はこれらから導き出せる任意の値）高い発現に相当し得る。細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の高発現は、対照細胞集団の蛍光シグナルと比較して20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍、又は10,000倍（又はこれらから導き出せる任意の値）高い蛍光シグナルに相当し得る。

【0011】

細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の低発現は、前記表面マーカー又は抗原についての陰性又は検出不可能な発現レベルに対応する蛍光シグナルと比較して2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、又は10倍（又はそこから導き出せる任意の値）高い蛍光シグナルに相当し得る。細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の低発現は、前記表面マーカー又は抗原についての陰性又は検出不可能な発現レベルに対応する蛍光シグナルと比較して20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍、又は10,000倍（又はそこから導き出せる任意の値）高い蛍光シグナルに相当し得る。

【0012】

陽性発現は、蛍光シグナルの検出などの所与の検出方法によって検出可能な細胞表面マーカー、抗原、又はタンパク質の発現レベルを指す。本明細書で使用される高発現レベル及び低発現レベルの両方が陽性発現と見なされ得る。

【0013】

ある態様では、 $CD8^+ T_{EFF}$ 細胞は、IL-21を添加する前にHDACiの存在下で培養される。特定の態様では、 $CD8^+ T_{EFF}$ 細胞は、IL-21を添加する12~48時間（例えば、12~15時間、15~20時間、20~25時間、25~30時間、30~35時間、35~40時間、又は40~48時間）前にHDACiの存在下で培養される。ある態様では、 $CD8^+ T_{EFF}$ 細胞は、IL-21を添加する1~3日（例えば、1日、2日、又は3日）前にHDACiの存在下で培養される。具体的な態様では、 $CD8^+ T_{EFF}$ 細胞は、HDACiを添加する前にIL-21の存在下で培養される。いくつかの態様では、 $CD8^+ T_{EFF}$ 細胞は、HDACiを添加する12~48時間（例えば、12~15時間、15~20時間、20~25時間、25~30時間、30~35時間、35~40時間、又は40~48時間）前にIL-21の存在下で培養される。特定の態様では、 $CD8^+ T_{EFF}$ 細胞は、HDACiを添加する1~3日、例えば1日、2日、又は3日前にIL-21の存在下で培養される。いくつかの態様では、 $CD8^+ T_{EFF}$ 細胞は、HDACi及びIL-21の存在下で同時に培養される。ある態様では、培養は、7~20日間（例えば、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、又は20日間）である。いくつかの態様では、培養は、12~16日間（例えば、12日間、13日間、14日間、15日間、又は16日間）である。具体的な態様では、IL-21は、10ng/mL~50ng/mL（例えば、10~20ng/mL、20~30ng/mL、30~40ng/mL、又は40~50ng/mL）の濃度で存在する。特定の態様では、IL-21は、20ng/mL~40ng/mL（例えば、20~25ng/mL、25~30ng/mL、30~35ng/mL、又は35~40ng/mL）の濃度で存在する。いくつかの態様では、HDACiは、1nM~5nM（例えば、1~2nM、2~3nM、3~4nM、又は4~5nM）の濃度で存在する。特定の態様では、HDACiは、2nM~4nM（例えば、2nM、3nM、又は4nM）の濃度で存在する。いくつかの態様では、IL-21は、10ng/mL~50ng/mL（例えば、10~20ng/mL、20~30ng/mL、30~40ng/mL、又は40~50ng/mL）の濃度で存在し、HDACiは、1nM~5nM（例えば、1~2nM、2~3nM、3~4nM、又は4~5nM）の濃度で存在する。ある態様では、IL-21は、20ng/mL~40ng/mL（例えば、20~25ng/mL、25~30ng/mL、30~35ng/mL、又は35~40ng/mL）の濃度で存在し、HDACiは、2nM~4nM（

10

20

30

40

50

例えば、2 nM、3 nM、又は4 nM)の濃度で存在する。

【0014】

ある態様では、HDACiは古典的なHDACiである。いくつかの態様では、古典的なHDACiは、トリコスタチンA、トラポキシンB、フェニルブチレート、バルプロ酸、ポリノスタット(スベラニロヒドロキサム酸又はSAHA、Zolinza(登録商標)として販売されている)、ベリノスタット(PXD101、Beleodaq(登録商標)として販売されている)、パノピノスタット(Farydaq(登録商標)として販売されている)、ダシノスタット(dacinostat)(LAQ824)、エンチノスタット(SNDX-275又はMS-275)、タセジナリン(tacedinalin)(CI994)、及びモセチノスタット(MGCD0103)からなる群から選択される。特定の態様では、HDACiはSAHAである。他の態様では、HDACはパノピノスタットである。

10

【0015】

いくつかの態様では、得られるTCM細胞はCD8<sup>+</sup>であり、また、CD45RO、CD28、CD62L、及びCCR7のうち少なくとも2つを発現する。いくつかの態様では、得られるTCM細胞はCD8<sup>+</sup>であり、CD45RO、CD28、CD62L、及びCCR7の少なくとも2つを高発現する。ある態様では、得られるTCM細胞はCD8<sup>+</sup>であり、また、CD45RO、CD28、CD62L、及びCCR7の少なくとも3つを発現する(即ち、CD8<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>である)。いくつかの態様では、得られるTCM細胞はCD8<sup>+</sup>であり、また、CD45RO、CD28、CD62L、及びCCR7を高発現する。ある態様では、得られるTCM細胞はまた、高レベルのグランザイムB及びパーフォリン1を発現する。

20

【0016】

追加の態様では、この方法は、TCM細胞を増殖させるステップをさらに含む。いくつかの態様では、増殖は、TCM細胞を抗CD3、抗CD28、及び抗CD137/4-1BBのうち少なくとも1つで処理することを含む。ある態様では、増殖させることは、TCM細胞を抗CD3及び抗CD28で処理することを含む。具体的な態様では、増殖させることは、TCM細胞を抗CD3、抗CD28、及び抗CD137/4-1BBで処理することを含む。

【0017】

さらなる態様では、この方法は、それぞれTEFF細胞をTCM細胞にリプログラムするのに十分な量のHDACi及びIL-21の存在下で、TEFF細胞を含むリンパ球の開始集団又はTEFF細胞に富む試料を培養するステップの前に、又はそれと同時に、TEFF細胞を含むリンパ球の開始集団又はTEFF細胞に富む試料をIL-2と接触させるステップをさらに含む。いくつかの態様では、TCM細胞に富むリンパ球の集団は、TEFF細胞を含むリンパ球の開始集団よりも少なくとも5倍(例えば、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、21倍、22倍、23倍、24倍、25倍、26倍、27倍、28倍、29倍、30倍以上)多いTCM細胞を含む。ある態様では、TCM細胞に富むリンパ球の集団は、TEFF細胞を含むリンパ球の開始集団よりも少なくとも10倍多いTCM細胞を含む。具体的な態様では、TCM細胞に富むリンパ球の集団は、TEFF細胞を含むリンパ球の開始集団よりも少なくとも30倍多いTCM細胞を含む。いくつかの態様では、TCM細胞に富むリンパ球の集団は、IL-2及び/又はIL-15での処理に応答したTEFF細胞を含むリンパ球の開始集団と比較して、IL-2及び/又はIL-15での処理に応答した高い増殖を示す。

30

40

【0018】

別の実施形態では、実施形態(例えば、TEFF細胞を含むリンパ球の開始集団を対象から得ること; 所望により、TEFF細胞を含むリンパ球の開始集団からTEFF細胞に富む試料を調製すること; 並びにそれぞれTEFF細胞をTCM細胞にリプログラムするのに十分な量のヒストンデアセチラーゼ阻害剤(HDACi)及びインターロイキン-21(IL-21)の存在下で、TEFF細胞を含むリンパ球の開始集団又はTEFF細胞に富む試料を培養する

50

こと、ここで、リプログラミングにより、対象から得られた $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団における $T_{CM}$ 細胞の数と比較して $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団が生成される)に従って生成された $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団を含む医薬組成物が提供される。本明細書では、癌の処置に使用するための実施形態の医薬組成物がさらに提供される。

【0019】

さらなる実施形態は、癌の処置のための、実施形態(例えば、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団を対象から得ること; 所望により、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を調製すること; 並びにそれぞれ $T_{EFF}$ 細胞を $T_{CM}$ 細胞にリプログラムするのに十分な量のヒストンデアセチラーゼ阻害剤( $HDACi$ )及びインターロイキン-21( $IL-21$ )の存在下で、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団又は $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を培養すること、ここで、リプログラミングにより、対象から得られた $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団における $T_{CM}$ 細胞の数と比較して $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団が生成される)に従って生成された、治療有効量の $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団の使用をさらに提供する。

10

【0020】

別の実施形態では、対象の癌の処置のため、実施形態(例えば、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団を対象から得ること; 所望により、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団から $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を調製すること; 並びにそれぞれ $T_{EFF}$ 細胞を $T_{CM}$ 細胞にリプログラムするのに十分な量のヒストンデアセチラーゼ阻害剤( $HDACi$ )及びインターロイキン-21( $IL-21$ )の存在下で、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団又は $T_{EFF}$ 細胞に富む試料を培養すること、ここで、リプログラミングにより、対象から得られた $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団における $T_{CM}$ 細胞の数と比較して $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団が生成される)の方法によって生成された、治療有効量の $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団を含む組成物が提供される。

20

【0021】

さらなる実施形態は、実施形態の方法によって生成された治療有効量の $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団又は実施形態の医薬組成物を対象に投与することを含む、対象の癌を処置する方法を提供する。いくつかの態様では、この方法は、治療有効量の $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団を投与する前に、対象に対してリンパ球枯渇を行うステップをさらに含む。ある態様では、治療有効量の $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団は、抗腫瘍活性を有する自己腫瘍浸潤リンパ球( $TIL$ )の試料に由来する。いくつかの態様では、 $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団は、対象に静脈内投与、腹腔内投与、又は腫瘍内投与される。特定の態様では、対象はヒトである。

30

【0022】

さらなる態様では、この方法は、少なくとも1つの追加の治療薬を対象に投与するステップをさらに含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの追加の治療薬は、化学療法、放射線療法、及び免疫療法からなる群から選択される。特定の態様では、少なくとも1つの追加の治療薬は免疫療法である。具体的な態様では、免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤である。いくつかの態様では、免疫チェックポイント阻害剤は、 $CTLA-4$ 、 $PD-1$ 、 $PD-L1$ 、 $PD-L2$ 、 $LAG-3$ 、 $BTLA$ 、 $B7H3$ 、 $B7H4$ 、 $TIM3$ 、 $KIR$ 、又はアデノシン $A2a$ 受容体( $A2aR$ )からなる群から選択される免疫チェックポイントタンパク質又はそのリガンドを阻害する。特定の態様では、免疫チェックポイント阻害剤は、 $PD-1$ を阻害する。ある態様では、免疫チェックポイント阻害剤は $CTLA-4$ を阻害する。

40

【0023】

さらに別の実施形態では、 $T_{EFF}$ 細胞から $T_{CM}$ 細胞を生成するための方法が提供され、この方法は、対象からの $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団を得ること;  $2nM \sim 4nM$ の濃度の $HDACi$ と $20ng/mL \sim 40ng/mL$ の濃度の $IL-21$ を、 $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団に同時に添加すること;  $T_{EFF}$ 細胞を含むリンパ球の開始集団を12~16日間培養し、それにより、 $T_{EFF}$ 細胞をリプログラミングして、 $T_{EFF}$ 細胞を含

50

むリンパ球の開始集団における $T_{CM}$ 細胞の数と比較して $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団を生成することを含む。

【0024】

別の実施形態では、ヒトセントラルメモリー様 $CD8^+$  T細胞の集団を含む組成物が提供され、T細胞の少なくとも20%（例えば、少なくとも25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、又はそれ以上）は、 $CD127$ 及び $CCR7$ を低発現すると共に、 $CD28$ 及び $CD62L$ を高発現する $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T細胞である。いくつかの態様では、T細胞の少なくとも50%又は60%は、 $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T細胞である。ある態様では、 $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T細胞は、 $Leff1$ 及び/又は $Tcf1$ をさらに発現するか、又はこれらを高発現する。特定の態様では、 $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T細胞は、 $CD45RA$ 及び/又は $CD45RO$ の発現を本質的に有さない。いくつかの態様では、 $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T細胞は、 $CD45RA$ 及び/又は $CD45RO$ を低発現する。

10

【0025】

以下の図面は、本明細書の一部を構成し、本発明のある態様をさらに実証するために含まれている。本発明は、本明細書に提示される具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせ、これらの図面の1つ又は複数を参照することによってよりよく理解することができる。

【図面の簡単な説明】

20

【0026】

【図1A-1C】図1A~図1C：エフェクターメモリー( $CD45RA^-CCR7^-$ ) $CD8^+$  T細胞における $CD28$ プロモーター上の $AcH3$ レベルの低下。(A) $CD28$ プロモーター上の $AcH3$ レベルの $ChIP$ 結果。プライマー8~10は、転写開始部位の下流のゲノムDNA領域にまたがっている。結果を、入力量のパーセンテージに対して正規化した。ナイーブ( $CD45RA^+CCR7^+$ ) $CD8^+$  T細胞を比較に使用した。(B)S A H Aによる $AcH3$ レベルの用量依存的増加のウェスタンブロットの結果。 $H3$ 及び $\alpha$ -アクチンをローディング対照として使用した。(C)CTLにおける $IL-21$ 誘導 $pSTAT3$ のウェスタンブロットの結果。 $STAT3$ 及び $\alpha$ -アクチンをローディング対照として使用した。2つの独立した実験の代表的な結果を示す。

30

【0027】

【図2A-2C】図2A~図2C： $IL-21$ とS A H Aは相乗作用して $CD28$ 及び $CD62L$ 発現をアップレギュレートする。(A)示された条件で4日間処理したCTLにおける $CD28$ レベルの代表的なヒストグラム。各パネル内の数字は、 $CD28$ 染色のMFIを示す。(B)示された条件で2週間増殖されたTILにおける $CD28$ 及び $CD62L$ レベルの代表的なプロット。プロット内の数字は、各象限の細胞のパーセンテージを示す。(C) $CD28$ プロモーター上の $STAT$ 結合部位付近の $AcH3$ 及び $STAT3$ の濃縮の $ChIP$ 結果。結果を、入力量のパーセンテージに対して正規化した。 $IgG$ を陰性対照として使用した。2つの独立した実験のうちの代表的な結果を示す。MFI：平均蛍光強度。 $AcH3$ ： $H3$ アセチル化。 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 。

40

【0028】

【図3A-3D】図3A~図3D： $IL-21$ とパノビノスタットは相乗作用して $CD28^+CD62L^+CTL$ を誘導する。(A)パノビノスタットによる $AcH3$ レベルの用量依存的増加のウェスタンの結果。 $H3$ 及び $\alpha$ -アクチンをローディング対照として使用した。(B)示された条件で2週間増殖されたCTLのMini-REP増殖倍率。(C)Mini-REP終了時の $CD28^+CD62L^+CTL$ のパーセンテージ。(D)示された条件で2週間増殖されたCTLのREP増殖倍率。Pano：パノビノスタット。

【0029】

【図4A-4C】図4A~図4C： $IL-21$ とパノビノスタット(Pano)が協同して、セントラルメモリー様T細胞を誘導する。(A)示された条件で2週間増殖されたC

50

T LにおけるC D 2 8及びC D 6 2 Lレベルの代表的なプロット。プロット内の数字は、各象限の細胞のパーセンテージを示す。( B ) C F S E希釈によって示されるI L - 2又はI L - 1 5のいずれかで処理された場合の増殖したC T Lの増殖。ゲートは、2日間で2回以上分裂された細胞のパーセンテージを表す。( C ) 定期的には又はI L - 2 1で増殖されたC T LにおけるC D 1 3 2 ( g C )レベルの代表的なヒストグラム。示された条件で増殖されたC T LにおけるC D 1 3 2 M F Iの要約。3 ~ 5回の独立した実験の代表的な結果を示す。P a n o : パノビノスタット。M F I : 平均蛍光強度。 \*\* p < 0 . 0 1 。

【 0 0 3 0 】

【 図 5 A - 5 B 】 図 5 A 及び 図 5 B : I L - 2 1 / パノビノスタット誘導C D 2 8 + C D 6 2 L + T細胞は記憶関連遺伝子の発現の増強を示す。( A ) I L - 2 1 及びパノビノスタットで増殖されたC D 2 8 - C D 6 2 L - 及びC D 2 8 + C D 6 2 L + C T Lを選別精製し、m R N A 遺伝子発現をハウスキーピング遺伝子R P L 1 3 A 発現に対して正規化した。2つの独立した実験の代表的な結果を示す。 \*\* p < 0 . 0 1 。 n . s . : 有意ではない。( B ) T I L の C l i n i c a l G r e x R E P 増殖倍率。

10

【 0 0 3 1 】

【 図 6 A - 6 B 】 図 6 A 及び 図 6 B : I L - 2 1 / パノビノスタットで増殖されたC T Lは、増強された殺腫瘍能力を示す。( A ) 示された条件で増殖されたC T Lによる標的腫瘍細胞死滅のパーセンテージを実証するC R A 結果。( B ) 標的腫瘍細胞によって活性化された異なるC T Lにおける細胞内I F N - 及びグランザイムB発現の代表的なプロット。プロット内の数字は、各象限の細胞のパーセンテージを示す。2つの独立した実験の代表的な結果を示す。C R A : クロム放出アッセイ。P a n o : パノビノスタット。

20

【 0 0 3 2 】

【 図 7 】 図 7 : I L - 2 1 とパノビノスタット ( P a n o ) は相乗作用して、T I L におけるC D 2 8 及びC D 6 2 L の発現をアップレギュレートする。示された条件で2週間増殖されたT I L におけるC D 2 8 及びC D 6 2 L レベルの代表的なプロット。プロット内の数字は、各象限の細胞のパーセンテージを示す。T I L : 腫瘍浸潤リンパ球。

【 0 0 3 3 】

【 図 8 】 図 8 : ナイブ、セントラルメモリー、及びエフェクターT細胞のマーカーを示す概略図。ナイブT細胞は、C D 6 2 L 、 C D 1 2 7 、 C D 2 8 、 及びC D 4 5 R A を発現する。セントラルメモリーT細胞は、C D 6 2 L 、 C D 4 5 R O 、 C D 1 2 7 、 及びC D 2 8 を発現する。エフェクターT細胞はC D 4 5 R O を発現する。

30

【 0 0 3 4 】

【 図 9 A - 9 F 】 図 9 A ~ 図 9 F : I L - 2 1 は、活性化ヒトナイブC D 8 + T細胞におけるC D 2 8 発現をアップレギュレートする。( A ) M 2 7 特異的C D 8 + T細胞及びアイソタイプ対照抗体におけるC D 2 8 表面レベルの代表的なヒストグラムを陰性染色対照として使用した。( B ) M 2 7 特異的C D 8 + T細胞の表面におけるC D 2 8 タンパク質レベルのM F I。( n = 1 2 、 平均 ± S E M 、 \*\*\*\* p < 0 . 0 0 0 1 、 対応のないt検定)。M F I : 平均蛍光強度。( C ) 活性化後7日目に染色されたヒトナイブC D 8 + T細胞におけるC D 2 8 表面レベルの代表的なヒストグラム。アイソタイプ対照抗体を陰性染色対照として使用した。( D ) 示された条件で7日間活性化されたC D 8 + T細胞の表面におけるC D 2 8 タンパク質レベルのM F I。( n = 4 、 平均 ± S E M 、 \* p < 0 . 0 5 、 対応のあるt検定)。( E ) I L - 2 1 を用いて又は用いずに生成された選別精製ヒトM a r t 1 ( M 2 7 ) 特異的C D 8 + T細胞におけるC D 2 8 m R N A レベルの定量的R T - P C R 結果。I L - 2 1 を用いずに増殖された細胞における発現レベルを1に設定した。( n = 2 、 平均 ± S E M 、 \*\* p < 0 . 0 1 、 対応のないt検定)。( F ) 示された条件で7日間活性化されたヒトC D 8 + T細胞におけるC D 2 8 m R N A レベルの定量的R T - P C R 結果。抗C D 3 / C D 2 8 ビーズで7日間活性化された細胞の発現レベルを1に設定した。( n = 6 、 平均 ± S E M 、 \*\* p < 0 . 0 1 、 対応のあるt検定)。C D 2 8 遺伝子の定量的R T - P C R の結果を、R P L 1 3 A に対して正規化した。A、B、及びEの結果は、異なる健康なドナーからの細胞を使用して2つ(E)又は3つ(A ~

40

50

B)の独立した実験の代表的な結果であった。パネルCは、異なる健康なドナーからの細胞を使用した4つの独立した実験の代表的なものであった。D及びFの結果は、異なる健康なドナーからの細胞を使用した4つ(D)又は6つ(F)の独立した実験からプールしたものであった。

#### 【0035】

【図10A-10G】図10A~図10G:STAT3の活性化は、IL-21誘導CD28のアプレギュレーションに不可欠である。(A)健康なドナー又はヨブ症候群患者からの活性化ヒトCD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD28表面レベルの代表的なヒストグラム。HD:健康なドナー。(B)CD28 MFIの倍率変化であり、抗CD3/CD28のみで活性化された細胞のMFIに対する抗CD3/CD28及びIL-21で活性化された細胞のMFIの倍率として表される。(n=3、平均±SEM、\*p<0.05、対応のないt検定)。(C)抗CD3/CD28又はIL-21と一緒に7日間活性化された、健康なドナー又はヨブ症候群患者からのヒトCD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD28 mRNAレベルの定量的RT-PCR結果の倍率変化。抗CD3/28ビーズのみで7日間活性化された、健康なドナー又はヨブ症候群患者からの細胞における発現レベルを1に設定した。(n=3、平均±SEM、\*\*p<0.01、対応のないt検定)。(D)対照、STAT1、又はSTAT3 shRNAでトランスフェクトされ、示された条件で7日間活性化されたヒトCD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD28表面レベルの代表的なヒストグラム。(E)陰性対照(対照)又は示された条件で7日間活性化されたSTATノックダウンCD8<sup>+</sup>T細胞の表面におけるCD28 MFIの倍率変化。データは、抗CD3/CD28のみで活性化された細胞のMFIに対する、抗CD3/CD28及びIL-21で活性化された細胞のMFIの倍率として表される。(n=6、平均±SEM、\*p<0.05、一元配置分散分析)。(F)対照、STAT1、又はSTAT3 shRNAでトランスフェクトされ、抗CD3/CD28又はIL-21と一緒に7日間活性化されたヒトCD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD28 mRNAレベルの定量的PCR結果の倍率変化。CD3/28ビーズのみで7日間活性化された細胞の発現レベルを1に設定した。(n=4、平均±SEM、\*p<0.05、一元配置分散分析)。(G)ヒトCD28プロモーター上の近位及び遠位STAT部位へのSTAT3の結合のChIP結果。(n=6、平均±SEM、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、二元配置分散分析)。結果は、代表的(A、D、G)なものであるか、又は様々なドナーからの細胞を使用した3つ(B、C、G)、4つ(F)、又は6つ(E)の独立した実験からプールしたものであった。

#### 【0036】

【図11A-11F】図11A~図11F:IL-21に応答したCD28の分化誘導は、ナイーブ及びエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞におけるヒストンH3アセチル化レベルと関連している。(A~B)IL-21の存在下又は非存在下で4日間、M27パルス成熟樹状細胞で活性化されたM27特異的エフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD28レベルの代表的なヒストグラム及び要約。アイソタイプ抗体を陰性染色対照として使用した。[n=3;平均±SEM;ns:有意ではない;対応のあるt検定]。(C)ナイーブ及びM27特異的エフェクターCTLにおけるIL-21誘導pSTAT3のウェスタンプロットの結果。STAT3及び-アクチンをローディング対照として使用した。バンドをImageJを使用して定量し、対応する試料中のアクチンの密度に対して正規化した。分子量はキロダルトンで示す。UT:未処理。(D)ナイーブをCD45RA<sup>+</sup>EM(TEMRA)CD8<sup>+</sup>T細胞と比較しているCD28プロモーター上のH3アセチル化レベルのChIP結果。結果を入力量のパーセンテージに対して正規化した。TSS:転写開始部位。[n=3;平均±SEM;\*p<0.05、\*\*\*p<0.001;二元配置分散分析]。(E)抗CD3/CD28又はIL-21と一緒に4日間活性化されたナイーブ及びTEMRA CD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD28レベルの代表的なヒストグラム。(F)ナイーブT細胞をM27特異的エフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞と比較しているCD28プロモーターにおけるH3アセチル化レベルのChIP結果。結果を入力量のパーセンテージに対して正規化した。[n=3;平均±SEM;\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001;二元配置

分散分析]。結果は、2つ(C、E、F)又は3つ(A、D)のうちの代表的なものであるか、又は異なるドナーからの細胞を使用した3つ(B)の独立した実験からプールしたものであった。

【0037】

【図12A - 12F】図12A ~ 図12F: SAHAは、IL-21誘導pSTAT3がCD28プロモーターにアクセスしてエフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞におけるCD28発現をアップレギュレートすることを可能にする。(A)未処理のまま(なし)又はSAHAで24時間処理したM27特異的エフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞のCD28プロモーターにおけるH3アセチル化レベルのChIP結果。[n = 3; 平均 ± SEM; \*\*\* p < 0.001; 二元配置分散分析]。(B)未処理のまま又はSAHAで24時間処理し、続いてIL-21で30分間刺激したM27特異的エフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞のCD28プロモーターへのSTAT3結合のChIP結果。[n = 3; 平均 ± SEM; ns: 有意ではない、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01; 二元配置分散分析]。(C)示された条件で4日間処理されたCTLにおけるCD28レベルの代表的なヒストグラム。ヒストグラムグラフ内の数字は、各条件での代表的なCD28 MFIを示し、垂直線はCD28<sup>-</sup>集団とCD28<sup>+</sup>集団を分離している。(D)独立した実験からのCTLにおけるCD28のMFI (n = 4; 平均 ± SEM; \* p < 0.05; 一元配置分散分析、IL-2 + SAHAを他の条件と比較)。(E)示された条件で2週間増殖されたTILにおけるCD28及びCD62Lレベルの代表的なプロット。プロット内の数字は、各象限の細胞のパーセンテージを示す。(F)独立した実験からの、示された条件で増殖されたTILのCD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>細胞のパーセンテージ (n = 4; \* p < 0.05; 一元配置分散分析)。2つ(B)、3つ(A)、又は4つ(C、E)の独立した実験の代表的な結果を示す。

10

20

【0038】

【図13A - 13B】図13A及び図13B: IL-21とパノピノスタット(Pano)が協同してCD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>細胞を誘導する。(A)示された条件で2週間増殖されたCTLにおけるCD28及びCD62Lレベルの代表的なプロット。プロット内の数字は、各象限の細胞のパーセンテージを示す。(B)独立した実験による、示された条件で増殖されたCTL中のCD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>細胞のパーセンテージ (n = 3; \* p < 0.05; 一元配置分散分析、通常のプロトコルで増殖されたCTLと比較)。3つ(A)の独立した実験の代表的な結果を示す。

30

【0039】

【図14A - 14D】図14A ~ 図14D: IL-21/パノピノスタットで増殖されたCTLは、インビトロでセントラルメモリーのような特徴を示す。(A)CFSE希釈によって示されるIL-2又はIL-15のいずれかで処理された場合の増殖されたCTLの増殖。数字は、2日間で2回以上分裂した細胞のパーセンテージを示す。(B)示された条件で増殖されたCTLにおけるCD132 (C)レベルの代表的なヒストグラム。数字は、各条件でのCD132の代表的なMFIを示す。(C)独立した実験による、示された条件で増殖されたCTLにおけるCD132 MFIの要約 (n = 6; 平均 ± SEM; \* p < 0.05、\*\* p < 0.01; 一元配置分散分析、通常のプロトコルで増殖されたCTLと比較)。(D)IL-21及びパノピノスタットで増殖されたCTLから選別されたCD28<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>及びCD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>細胞におけるmRNA遺伝子発現の代表的な結果。遺伝子発現を、ハウスキーピング遺伝子RPL13A発現に対して正規化した。(n = 2; 平均 + SD; \*\* p < 0.01、ns: 有意ではない; 両側t検定)。2つ(A)、3つ(D)、又は6つ(B)の独立した実験の代表的な結果を示す。

40

【0040】

【図15A - 15B】図15A及び図15B: STAT3は、ヒトナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞におけるIL-21媒介CD28のアップレギュレーションに必要である。(A)細胞処理の30分後のpSTAT1、pSTAT3、及びpSTAT5レベルの代表的なウェスタンの結果。(B)陰性対照、STAT1、又はSTAT3 shRNAでトランスフェクトされたヒトCD8<sup>+</sup> T細胞における総STAT1及びSTAT3レベルのウェスタ

50

ンの結果。 - アクチンをローディング対照として使用した。バンドを、Image Jを使用して定量し、対応する試料中のアクチンの密度に対して正規化した。分子量はキロダルトンで示す。2つ(B)又は3つ(A)の独立した実験の代表的な結果を示す。UT: 未処理。Ctl: 対照。

【0041】

【図16】図16: SAHAは、用量依存的にH3アセチル化を増加させる。SAHAによるH3アセチル化(AcH3)レベルの用量依存的増加のウェスタンプロットの結果。H3及び - アクチンをローディング対照として使用した。バンドを、Image Jを使用して定量し、対応する試料中のアクチンの密度に対して正規化した。分子量はキロダルトンで示す。2つの独立した実験の代表的な結果を示す。

10

【0042】

【図17A-17B】図17A及び図17B: IL-21とパノピノスタット(Pano)は相乗作用してCD28及びCD62L発現をアップレギュレートする。(A)示された条件で2週間増殖されたTILにおけるCD28及びCD62Lレベルの代表的なプロット。プロット内の数字は、各象限の細胞のパーセンテージを示す。(B)パノピノスタットによるAcH3レベルの用量依存的増加のウェスタンの結果。H3及び - アクチンをローディング対照として使用した。バンドを、Image Jを使用して定量し、対応する試料中のアクチンの密度に対して正規化した。分子量はキロダルトンで示す。2つの独立した実験の代表的な結果を示す。

20

【0043】

【図18A-18C】図18A~図18C: IL-21とパノピノスタットが相乗作用してCD28+CD62L+細胞を誘導する。(A)示された条件で2週間増殖されたTILにおけるCD28及びCD62Lレベルの代表的なプロット。プロット内の数字は、各象限の細胞のパーセンテージを示す。(B)独立した実験による、REP終了時のCD28+CD62L+TILのパーセンテージ(n=7; \*p<0.05; 一元配置分散分析)。(C)4つの独立した実験による、示された条件で2週間増殖されたCTLのREP増殖倍率。棒グラフは、各条件の平均±SEMを示す。2つの(A)独立した実験の代表的な結果を示す。

【0044】

【図19】図19: IL-21/パノピノスタット-増殖CTLは、IL-21で増殖されたCTLと同等の殺腫瘍能力を示す。クロム放出アッセイの結果は、示された条件で増殖されたCTLによる標的腫瘍細胞死滅のパーセンテージを実証する(n=5; 平均+SD; ns: 有意ではない; 両側t検定)。

30

【発明を実施するための形態】

【0045】

I. 定義

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」という単数形の用語は、文脈が明らかにそうではないことを示さない限り、複数の指示対象を含む。従って、例えば、「細胞」への言及は、複数のそのような細胞を含み、「ペプチド」への言及は、当業者に公知である1つ又は複数のペプチド及びその同等物(例えば、ポリペプチド)への言及を含む。

40

【0046】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される「又は」という用語は、代替物のみを指すように明示的に示されない限り、又は代替物が互いに矛盾する場合を除き、「及び/又は」を意味する。

【0047】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される「別の」という用語は、少なくとも第2以上を意味し得る。

【0048】

本明細書で使用される「約」という用語は、特定の値又は測定値が、測定値を得るため

50

、値を計算するために使用される装置に関連する固有の変動、又は試験対象間に存在する自然の変動を含むことを示す。

【0049】

溶液の成分（例えば、1つ又は複数のタンパク質、ポリマー、又は小分子の調製物）に関して本明細書で使用される「本質的に含まない」という用語は、調製物はその成分を含むように製剤化されなかったこと、又はそのような成分が（例えば、汚染物質として）微量しか存在しないことを意味する。ある実施形態では、目的の分子の調製物は、この調製物が0.05%（w/w）未満の特定の成分を含む場合、本質的にその成分を含まない。ある実施形態では、目的の分子の調製物は、この調製物が0.01%（w/w）未満の特定の成分を含む場合、本質的にその成分を含まない。ある実施形態では、目的の分子の調製物は、標準的な分析方法（例えば、UV分光光度法、質量分析法、核磁気共鳴分光法など）を用いてこの調製物で特定の成分が一切検出できない場合は、この特定の成分を本質的に含まない。

10

【0050】

溶液又は懸濁液の成分（例えば、1つ又は複数の細胞型、タンパク質、ポリマー、又は小分子の調製物）に関して本明細書で使用される「～に富む」という用語は、この調製物が、通常の濃度よりも高く、又は通常の数よりも多く成分を含むように製剤化されたことを意味する（例えば、リンパ球の懸濁液はエフェクターTリンパ球に富み得る）。

【0051】

本明細書で使用される「T細胞」又は「Tリンパ球」という用語は、胸腺によって産生又は処理され、適応免疫応答に積極的に関与するタイプのリンパ球又は白血球を指す。この用語には、限定されるものではないが、エフェクターT細胞（ $T_{EFF}$ 細胞）、 $CD4^+$ ヘルパーT細胞（ $CD4^+$ T細胞又は $T_H$ 細胞）、 $CD8^+$ 細胞毒性又はキラーT細胞（ $CD8^+$ 又はCTL）、メモリーT細胞、制御性又はサプレッサーT細胞（ $T_{REGs}$ ）、ナチュラルキラーT細胞（ $T_{NK}$ ）、粘膜関連不変T細胞、及びガンマデルタ又は $\gamma\delta$ T細胞（ $T_{\gamma\delta}$ ）が含まれる。

20

【0052】

各T細胞は、T細胞受容体（TCR）を発現し、このT細胞受容体は、抗原提示細胞又は病原体感染細胞の表面に表示される主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子との関連でペプチド抗原を認識する。主要なTCR種は、アルファ（ $\alpha$ ）サブユニット及びベータ（ $\beta$ ）サブユニットを含み、それぞれのサブユニットは、体細胞V（D）J組み換えされて、それぞれ個々に最大で可能な $10^{14}$ 個のユニークなTCRヘテロ二量体が存在する抗原反応性T細胞の多様なレパートリーを産生する遺伝子によってコードされる。非主要なTCR種（ $T_{\gamma\delta}$ ）もまた、体細胞V（D）J組換えによって生成される。機能的なTCRの組換え及び胸腺からの発現が成功すると、主に二次リンパ組織（リンパ節と脾臓）及び末梢循環を介して移動できるが、まだ感染性の課題に対処できるいかなる種類の応答も生成できない休止状態の「ナイーブ」T細胞が得られる。

30

【0053】

免疫保護を媒介することができるT細胞を生成することは、最初に、ナイーブT細胞の「活性化」を必要とする。これには、T細胞上の多数の分子と、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI又はクラスII分子に非共有結合した感染因子に由来する抗原ペプチドを有する細胞である抗原提示細胞（APC）との間の協調的相互作用が含まれる。TCRは、2つの鎖（ $\alpha$ 及び $\beta$ ）から構成され、適切なクラスI又はクラスII MHC分子との関連で結合した場合にのみペプチド抗原を認識する。T細胞上で、TCRは、 $CD3$ （ $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\epsilon$ 、 $\delta$ サブユニットから構成される）と総称される膜タンパク質の複合体と結合し、この複合体の細胞質領域が、TCRライゲーション後の細胞内シグナルの伝播を担っている。各TCRは、T細胞のタイプに応じて、 $CD4$ 又は $CD8$ 補助受容体にも結合する。これらの2つの分子は、MHC（ $CD8$ のクラスI及び $CD4$ のクラスII）に結合し、T細胞とAPCとの間の相互作用をさらに安定させる。

40

【0054】

50

$T_{EFF}$ のカテゴリーは、 $T_H$ 、 $CTL$ 、 $T_{REGs}$ 、及び可能性のある他の $T$ 細胞型を含む、免疫刺激（例えば、共刺激）に能動的に応答する様々な $T$ 細胞型を含む。 $T_H$ 細胞は、 $B$ 細胞の形質細胞及び記憶 $B$ 細胞への成熟、並びに $CTL$ 及びマクロファージの活性化を含む免疫学的プロセスにおいて他のリンパ球を支援する。 $T_H$ 細胞は、抗原提示細胞（ $APC$ ）の表面に発現する $MHC$ クラスII分子に結合した細胞外タンパク質に由来するペプチド抗原が提示されると活性化される。 $T_H$ 細胞には、限定されるものではないが、 $T_H1$ 、 $T_H2$ 、 $T_H3$ 、 $T_H9$ 、 $T_H17$ 、 $T_H22$ 、及び $T$ 濾胞ヘルパー細胞（ $T_{FH}$ ）を含む $T_H$ 細胞のいくつかのサブタイプが存在し、それぞれが1つ又は複数の異なるシグナル伝達タンパク質（即ち、サイトカイン）を分泌して、適応免疫応答の様々な側面をアップレギュレート又はダウンレギュレートする。 $CTL$ は、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞を殺すことができ、移植された組織の拒絶に関与している。 $CTL$ は、標的細胞の表面に発現する $MHC$ クラスI分子に結合した非自己細胞内タンパク質に由来するペプチドが提示されると活性化される。 $T_{REGs}$ は、免疫反応の終了に向かって $T$ 細胞性免疫を止める又は抑制すること、及び胸腺での陰性選択を回避した自己応答性 $T$ 細胞を抑制することによって、免疫寛容の維持に重要な役割を果たす。 $T_{REGs}$ の少なくとも3つの主要なクラス： $CD4^+FoxP3^+$ 、 $CD4^+FoxP3^-T_{REGs}$ 、及びタイプ1制御性 $T$ 細胞（ $T_{r1}$ 細胞）が存在し、これらは $CD4^+CD49b^+LAG-3^+CD226^+$ である。

#### 【0055】

$CD4^+$ 及び $CD8^+$  $T$ 細胞は、メモリー $T$ 細胞（ $T_{MEM}$ ）及び $T_{EFF}$ 細胞を含む、ナイーブ又は抗原を経験した集団として最も単純に分類される。 $T_{MEM}$ 細胞の2つの主要なサブタイプである $T_{CM}$ 細胞及び $T_{EM}$ 細胞は、それらのエフェクター機能及び様々な解剖学的部位に帰巢する能力が異なることが知られている。 $T$ 細胞の様々なタイプ及びサブタイプ、例えば、ナイーブ $T$ 細胞、 $T_{CM}$ 細胞、 $T_{EM}$ 細胞、 $T_{EFF}$ 細胞は、各タイプに特徴的な1つ又は複数の細胞表面タンパク質の発現を分析することによって区別することができる。例えば、 $src$ ファミリーキナーゼを調節するタンパク質チロシンホスファターゼである $CD45$ を含む標準的なマーカーは、すべての造血細胞で発現する。ヒト $CD45$ は、細胞外ドメインの一部を構成する3つのエクソンの選択的スプライシングによって、いくつかのアイソフォームの1つとして発現させることができる。ヒトでは、選択的にスプライシングされたエクソン： $CD45RA$ 、 $CD45RO$ 、 $CD45RB$ 、 $CD45RAB$ 、 $CD45RBC$ 、及び $CD45RABC$ のうちの1つ、2つ、又は3つのいずれかを有する変異体を含む6つのアイソフォームが従来同定されている。

#### 【0056】

ナイーブ $T$ 細胞は、 $CD45RA$ 、 $L$ -セレクトリン（ $CD62L$ ）、インターロイキン受容体7-アルファサブユニット（ $IL7R$ ； $CD127$ ）、及び $CD28$ を発現する。メモリー $T$ 細胞（ $T_{MEM}$ ）のカテゴリーは、限定されるものではないが、セントラルメモリー $T$ 細胞（ $T_{CM}$ 細胞）及びエフェクターメモリー $T$ 細胞（ $T_{EM}$ 及び $T_{EMRA}$ 細胞）を含め、様々なサブタイプを含む。 $T_{CM}$ 細胞は、 $CD45RO$ 、 $L$ -セレクトリン（ $CD62L$ ）、インターロイキン受容体7-アルファサブユニット（ $IL7R$ ； $CD127$ ）、 $CD28$ 、及び $C$ -ケモカイン受容体7型（ $CCR7$ ）を発現する。 $T_{EM}$ 細胞は、 $CD45RO$ 、低レベルでやや不均一なレベルの $L$ -セレクトリン（ $CD62L$ ）、インターロイキン受容体7-アルファサブユニット（ $IL7R$ ； $CD127$ ）、及び $CD28$ を発現するが、 $CCR7$ は発現しない。 $T_{EMRA}$ 細胞（ $CD45RA$ を再発現する最終分化エフェクターメモリー細胞）は、 $CD45RA$ 、低レベルでやや不均一なレベルの $L$ -セレクトリン（ $CD62L$ ）、インターロイキン受容体7-アルファサブユニット（ $IL7R$ ； $CD127$ ）、及び $CD28$ を発現するが、 $CCR7$ は発現しない。

#### 【0057】

本明細書で使用される「腫瘍浸潤リンパ球」又は「 $TIL$ 」という用語は、細胞傷害性 $T$ 細胞（ $CTL$ ）とヘルパー $T$ 細胞（ $T_H$ 細胞）、並びに $B$ 細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、及びプロフェッショナル抗原提示細胞（ $APC$ ）、例えば樹状細胞などとの混合物を含む、多数の異なるタイプの固形腫瘍で観察された又は該固形腫瘍から単

10

20

30

40

50

離された免疫細胞の複雑な混合物を指す。

【0058】

本明細書で使用される「抗原」という用語は、脊椎動物、例えば、ヒトにおいて体液性又は細胞性免疫応答、特に抗体の産生、B細胞の活性化、及び/又はT細胞の活性化を誘導する毒素、タンパク質、又は他の外来物質を指す。抗原は、1つ又は複数のエピトープを含む。

【0059】

本明細書で使用される「エピトープ」又は「抗原決定基」という用語は、免疫系によって、例えば、抗体、B細胞、又はT細胞などによって認識される特定の抗原の1つ又は複数の部分を指す。従って、エピトープは、抗体が結合する抗原の特定の部分、又はT細胞受容体が結合する主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子に結合する特定のペプチドである。抗体によって認識されるエピトープは、線状又は立体構造であり得る。線状エピトープは、その一次アミノ酸配列を介して抗体と相互作用するエピトープであり、例えば、抗原中のアミノ酸の連続的な線状配列によって形成される。立体構造エピトープは、抗原の三次元構造又は形状(即ち、その三次構造)に基づいて抗体と相互作用するエピトープであり、例えば、抗原中のアミノ酸の不連続又は非線形セグメントによって形成される。

10

【0060】

本明細書で使用される「ネオエピトープ」という用語は、新しいエピトープ、又は、例えば癌細胞又は癌性組織に存在するが健康な組織には存在しない非自然発生の突然変異の結果として癌細胞又は癌性組織に存在する抗原などの新しい抗原(「ネオ抗原」)上のエピトープを指す。

20

【0061】

「腫瘍関連抗原」、「腫瘍抗原」、「腫瘍特異的抗原」、又は「癌細胞抗原」という用語は、本明細書では互換的に使用され、正常な非癌性組織と比較して1つ又は複数の特定の腫瘍型で独自に又はより豊富に発現し、癌患者の抗原特異的な体液性及び/又は細胞性免疫応答を刺激することができるタンパク質、炭水化物、又は他の分子を指す。

【0062】

本明細書で使用される「キメラ抗原受容体」、「CAR」、「キメラT細胞受容体」、「人工T細胞受容体」、又は「キメラ免疫受容体」という用語は、所望の非MHC制限抗原結合特異性を免疫エフェクター細胞、例えばエフェクターT細胞に移植する、エンジニアリングされたキメラ受容体構築物を指す。CARは、例えば、細胞外抗原結合ドメイン(例えば、抗体又は抗体断片、例えば所望の抗原特異性を有する一本鎖可変断片(scFv)など)、スペーサー配列、膜貫通ドメイン、及び1つ又は複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。例示的な細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ(CD3)などの1つ又は複数の細胞内チロシンベースの活性化モチーフ(「ITAM」)、及び/又は1つ又は複数の共刺激シグナル伝達ドメイン、例えばCD28、4-1BB/CD137、ICOS、OX40、又はそれらの組み合わせなどを含み得る。

30

【0063】

本明細書で使用される「抗原提示細胞」又は「APC」という用語は、抗原提示することができる、即ち、細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体分子によって1つ又は複数の他の免疫細胞、例えばT細胞に結合された抗原ペプチドを提示することができる免疫細胞のクラスを指す。ほとんどの免疫細胞型は、ある種のAPCとして機能し得るが、プロフェッショナルAPC、例えばマクロファージ、B細胞、及び樹状細胞は、T<sub>H</sub>細胞に外来抗原を提示し、他の細胞型は、細胞内抗原をCTLに提示することができる。CTL及びT<sub>H</sub>細胞の両方の機能がAPC活性に依存するため、APCは適応免疫応答の必須の要素である。抗原提示は、適応免疫の特異性を可能にし、細胞内及び細胞外病原体の両方に対する適応免疫応答を可能にし、且つ腫瘍に対する防御に関与する。

40

【0064】

本明細書で使用される「ヒストンデアセチラーゼ」、「HDAC酵素」、又は「HDAC」という用語は、例えば、ヒストン上の-N-アセチル-リジンアミノ酸からのアセ

50

チル基 (  $\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{R}$  ) の除去を触媒する酵素のクラス (  $\text{EC } 3.5.1.98$  ) を指す。例えば、Seto and Yoshida, 2014 を参照されたい。ヒストンのアセチル化及び脱アセチル化は、遺伝子発現の調節に重要な役割を果たす。ヒストンのアセチル化は、それらの正電荷を中和し、負電荷を帯びた DNA との相互作用を緩めると考えられている。これにより、クロマチン構造が開き、転写因子の結合が促進され、続いて遺伝子の転写が促進される。HDAC によるヒストンの脱アセチル化は、DNA との相互作用を強化し、閉じたクロマチン構造及び遺伝子転写の阻害をもたらす。ヒストンリジンのアセチル化は非常に可逆的である。リジン残基は、ヒストン/リジンアセチルトランスフェラーゼ酵素 ( HAT ) の作用によってアセチル化され、ヒストンデアセチラーゼ ( HDAC ) によって脱アセチル化される。

10

#### 【 0 0 6 5 】

本明細書で使用される「HDAC 阻害剤」又は「HDAC i」という用語は、1つ又は複数のHDAC 酵素のヒストンデアセチラーゼ活性を強力且つ特異的に阻害することができる広範な化合物のクラスを指す。古典的なHDAC i は、デアセチラーゼ活性の補因子として  $\text{Zn}^{2+}$  を必要とするHDAC を含む、クラス I、II、及びIVの従来のHDAC のみに作用する。古典的なHDAC i は、典型的には、チオール基で亜鉛イオンに結合する環状テトラペプチドを除いて、亜鉛イオンへの結合に関与する化学部分に従って分類される。例示的で古典的なHDAC i には、ヒドロキサム酸又はヒドロキサメート (例えば、トリコスタチンA)、環状テトラペプチド (例えば、トラポキシニンB) 及びデブシペプチド、ベンズアミド、求電子性ケトン、及び脂肪酸 (例えば、フェニルブチレート及びバルプロ酸) が含まれる。第2世代の古典的なHDAC i には、ヒドロキサム酸ポリノスタット (スベラニロヒドロキサム酸又はSAHA、Zolinza (登録商標) として販売されている)、ベリノスタット (PXD101、Beleodaq (登録商標) として販売されている)、パノピノスタット (Farydaq (登録商標) として販売されている)、及びダシノスタット (LAQ824)、及びベンズアミドエンチノスタット (SNDX-275 又はMS-275)、タセジナリン (CI994)、及びモセチノスタット (MGCD0103) が含まれる。

20

#### 【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される「抗体」又は「免疫グロブリン」という用語は、互換的に使用され、典型的には、ジスルフィド結合によって連結された4つの別個のポリペプチド (2つの重鎖及び2つの軽鎖) を含む、いくつかの高分子量糖タンパク質のいずれかを指す。抗体は通常、抗原刺激後にB細胞と呼ばれる特殊なリンパ球によって産生される。抗体は、体液性免疫応答の一部としてB細胞を刺激した抗原上の特定のエピトープに特異的に結合することができる。抗体は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、アイソタイプと呼ばれる5つの異なる形態で発生し、それぞれが異なる重鎖: IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMの存在によって区別される。抗体は、例えば、Fab (断片、抗原結合)、抗原特異性を決定する相補性決定領域 (CDR) を含むFv (断片、可変領域)、及びFc (断片、定常領域) を含む一連の断片を放出させるために、プロテアーゼ酵素によって切断することができる。

30

#### 【 0 0 6 7 】

抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであり得る。ポリクローナル抗体は、体内の異なるB細胞系統によって分泌される抗体の混合物であり、同じ抗原に対して反応し、それぞれが異なるエピトープに結合する抗体のコレクションを含む。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株などの細胞の単一クローンによって産生される抗体であり、同一の特異性 (即ち、それぞれが同じエピトープに結合する) を有する抗体を含む。「抗体」という用語は、所望の生物学的活性、例えば、抗原結合、補体結合、及びFc受容体結合などを保持する、すべての天然に存在するエンジニアリングされた抗体断片を包含する。エンジニアリングされた抗体及び抗体断片には、例えば、二重特異性抗体、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、単一特異性Fab<sub>2</sub>、二重特異性Fab<sub>2</sub>、三重特異性Fab<sub>3</sub>、一価IgG、scFv、二重特異性ダイアボディ、三重特異性ダイアボディ、及びscFv-Fcな

40

50

どが含まれる。抗体の供給源及び所望の用途（即ち、ヒト治療薬として使用するためのマウスモノクローナル抗体）に応じて、結合親和性を改善するか、又は「ヒト化」と呼ばれるプロセスによって免疫原性を低下させるようにさらにエンジニアリングすることができる。

【0068】

本明細書で使用される「免疫療法 (immunotherapy)」又は「免疫療法 (immune therapy)」という用語は、癌を予防又は検出又は処置するためのあらゆるアプローチを指し、このようなアプローチは、ワクチン、細胞療法、並びに細胞療法、腫瘍溶解性ウイルス、抗体（例えば、裸抗体、薬物結合抗体、及び二重特異性抗体など）、免疫調節剤（例えば、アジュバント、サイトカイン、増殖因子など）、及び免疫抑制を低減し、免疫細胞の輸送及び/又は活性化を増強し、又は腫瘍微小環境を有利に変化させる他のカテゴリーの薬剤の生成及び使用に関する任意のベクター又は関連成分などの免疫系が関与するメカニズム、並びに癌又はその影響に対する免疫応答の特性評価に関連する任意の実験技術に依存する。

10

【0069】

本明細書で使用される「免疫チェックポイント」又は「免疫チェックポイントタンパク質」という用語は、免疫応答の1つ又は複数の態様、例えば、細胞性免疫応答を負に調節するプロセス又は経路に関与する多数のタンパク質のいずれかを指し、自己免疫寛容の維持、自己免疫の予防、末梢組織における生理的免疫応答の持続時間と大きさの調節、及び側副組織損傷の最小化において重要な役割を果たす。免疫チェックポイントタンパク質には、例えば、プログラムされた細胞死経路1 (PD-1/CD279) とそのリガンド (PD-L1/CD274 及び PD-L2/CD273)、細胞毒性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA-4/CD152)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG-3/CD223)、B及びTリンパ球アテニューエーター (BTLA)、Ig及び免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ (ITIM) ドメインを含むT細胞免疫受容体 (TIGIT)、T細胞免疫グロブリンドメイン、及びムチンドメイン3 (TIM-3/HAVcr2)、キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR/CD158)、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサブレッサー (VISTA)、並びにアデノシンA2a受容体 (A2aR) が含まれる。

20

【0070】

本明細書で使用される「免疫チェックポイント阻害剤」という用語は、免疫チェックポイントタンパク質に結合することができ、且つ免疫応答のそれらの負の調節を軽減することができる治療薬のクラスを指す。例示的な免疫チェックポイント阻害剤には、例えば、イピリマブ (CTLA-4を標的とし、Yervoy (登録商標) として販売されている)、ペンブロリズマブ (PD-1を標的とし、Keytruda (登録商標) として販売されている)、ニボルマブ (PD-1を標的とし、Opdivo (登録商標) として販売されている)、アテゾリズマブ (PD-L1を標的とし、Tecentriq (登録商標) として販売されている)、アベルマブ (PD-L1を標的とし、Bavencio (登録商標) として販売されている)、及びデュルバルマブ (PD-L1を標的とし、Imfinzi (登録商標) として販売されている) が含まれる。免疫チェックポイント阻害は、機能の低下及び完全な遮断の両方を包含する。

30

40

【0071】

本明細書で使用される「抗癌剤」及び「化学療法剤」などの用語は、癌性又は悪性の細胞又は組織、即ち、高い増殖率の細胞又は組織に対して選択的に毒性である化学物質又は化合物のあらゆるクラスを指す。化学療法剤は、対象の癌を治療、制御、又は緩和するために使用することができる。化学療法剤には、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤 (上記参照)、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、キナーゼ阻害剤、ヌクレオチド類似体及びヌクレオチド前駆体類似体、ペプチド抗生物質、プラチナベースの化合物、レチノイド、並びにピンカアルカロイド及び誘導體などを含む多数の異なるクラスが存在する。アルキル化剤には、限定されるものではないが、シクロホスファミド、メクロロエタミン、クロラ

50

ムブシル、メルファラン、ダカルバジン、ニトロソウレア、及びテモゾロミドが含まれる。アントラサイクリンには、限定されるものではないが、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、及びバルルピシンが含まれる。細胞骨格破壊剤（例えば、タキサン）には、限定されるものではないが、パクリタキセル、ドセタキセル、アブラキサン（nab-パクリタキセル）、及びタキソテールが含まれる。トポイソメラーゼⅠの阻害剤には、限定されるものではないが、イリノテカン及びトポテカンが含まれる。トポイソメラーゼⅡの阻害剤には、限定されるものではないが、エトポシド、テニポシド、及びタフルポシドが含まれる。キナーゼ阻害剤には、限定されるものではないが、ボルテゾミブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ベムラフェニブ（venurafenib）、及びビスモデギブが含まれる。ヌクレオチド類似体及びヌクレオチド前駆体類似体には、限定されるものではないが、アザシチジン、アザチオプリン、カペシタピン、シタラピン、ドキシフルリジン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素、メルカプトプリン、メトトレキサート、及びチオグアニンが含まれる。ペプチド抗生物質には、限定されるものではないが、プレオマイシン及びアクチノマイシンが含まれる。プラチナベースの薬剤には、限定されるものではないが、カルボプラチン、シスプラチン、及びオキサリプラチンが含まれる。レチノイドには、限定されるものではないが、トレチノイン、アリトレチノイン、及びベキサロテンが含まれる。ピンカアルカロイド及び誘導体には、限定されるものではないが、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、及びピノレルピンが含まれる。

#### 【0072】

本明細書で使用される「処置する（treat）」、「処置（treatment）」、及び「処置（treating）」などの用語は、例えば、治療薬を対象に投与することによって、又は外科的、臨床的、若しくは他の医療処置を対象に対して実行することによって、対象の疾患の症状又は状態を改善する、軽減する、又は他の方法で緩和するプロセスを指す。

#### 【0073】

本明細書で使用される「対象」又は「患者」という用語は、本明細書で互換的に使用され、個体、例えば、ヒト、又は霊長類、哺乳動物、若しくは脊椎動物などの非ヒト生物を指す。

#### 【0074】

本明細書で使用される「治療的に有効な」又は「治療的に有益な」などの用語は、治療薬、又は他の方法で疾患、障害、若しくは状態の1つ若しくは複数の症状を改善、緩和、若しくは軽減し、これにより、例えば、疾患、障害、若しくは状態の徴候若しくは症状の頻度若しくは重症度を低下させることによって疾患、障害、又は状態を有する対象の幸福度を高める外科的、臨床的、若しくは他の医学的処置を指す。従って、治療的に有効な又は治療的に有益な癌処置は、例えば、腫瘍のサイズを縮小し、腫瘍の成長速度を低下させ、腫瘍の播種又は転移の可能性を低下させ得る。

#### 【0075】

本明細書で使用される「薬学的に許容される」又は「薬理的に許容される」という用語は、哺乳動物又は脊椎動物の対象に投与されたときに有害、アレルギー、又は他の望ましくない応答を生じさせない治療薬の医薬製剤を指す。このような製剤は、無菌性、発熱性、純度に関する適正製造基準（GMP）、及びFDA事務所の生物学的基準によって要求されるその他の関連基準に準拠して製剤化する必要がある。

#### 【0076】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という用語は、哺乳動物又は脊椎動物の対象に送達するための治療薬を製剤化するために使用されるありとあらゆる化合物又は溶媒を指し、このような溶媒には、例えば、水性溶媒（例えば、水、アルコール/水溶液、食塩水、塩化ナトリウムなどの非経口ビヒクル、リンガーデキストロースなど）、非水性溶媒（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、及びエチルオレイン酸などの注射可能な有機エステル）、分散媒、コーティング、界面活性剤、抗

10

20

30

40

50

酸化剤、保存剤（例えば、抗菌剤又は抗真菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス）、等張剤、吸収遅延剤、塩、薬物、薬物安定剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味料、香料、染料、液体及び栄養補給剤、並びにこれらの任意の組み合わせなどが含まれ、これらは当業者には公知であろう。

【0077】

本明細書で使用される「単位用量」、「用量」、又は「薬用量」という用語は、適切な経路で、所望の治療計画に従って投与されたときに対象において治療上有効であると予想される所定量の薬剤を含む、哺乳動物又は脊椎動物の対象への投与に適した治療薬の製剤を指す。対象に投与される特定の治療薬の実際の薬用量は、例えば、対象の体重、年齢、健康、及び性別、治療される疾患の種類、疾患の進行の程度、事前又は同時の治療的介入、投与経路、及び特定の治療剤の効力、安定性、及び毒性を含む様々な身体的及び生理学的パラメーターに照らして医療提供者によって経験的に決定することができる。

10

【0078】

II. T<sub>EFF</sub>細胞をリプログラミングする方法

一態様では、本開示は、抗原特異的エフェクターT細胞（T<sub>EFF</sub>細胞）を、例えば、セントラルメモリーT細胞（T<sub>CM</sub>細胞）などの別の所望のタイプのT細胞にリプログラミングするための方法を提供する。従って、本明細書では、抗原特異的エフェクターT細胞（T<sub>EFF</sub>細胞）をセントラルメモリーT細胞（T<sub>CM</sub>細胞）にリプログラミングするための方法が提供される。

【0079】

ある実施形態では、この方法は：T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団を対象から得るステップ；所望により、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団からT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料を調製するステップ；並びにそれぞれT<sub>EFF</sub>細胞をT<sub>CM</sub>細胞にリプログラムするのに十分な量のヒストンデアセチラーゼ阻害剤（HDACi）及びインターロイキン-21（IL-21）の存在下で、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料を培養するステップを含み、このリプログラミングにより、対象から得られたT<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団におけるT<sub>CM</sub>細胞の数と比較してT<sub>CM</sub>細胞に富むリンパ球の集団が生成される。

20

【0080】

ある実施形態では、CD8<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>細胞は、IL-21を添加する前にHDACiの存在下で培養される。ある実施形態では、CD8<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>細胞は、IL-21を添加する前に、HDACiの存在下で12~48時間培養される。ある実施形態では、CD8<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>細胞は、IL-21を添加する前に、HDACiの存在下で1~3日間培養される。ある実施形態では、CD8<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>細胞は、HDACiを添加する前にIL-21の存在下で培養される。ある実施形態では、CD8<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>細胞は、HDACiを添加する前に、IL-21の存在下で12~48時間培養される。ある実施形態では、CD8<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>細胞は、HDACiを添加する前に、IL-21の存在下で1~3日間培養される。

30

【0081】

ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団は、対象から血液試料を採取することによって得られる。ある実施形態では、血液試料は、アフエレーシスによってさらに精製される。ある実施形態では、アフエレーシスは、白血球アフエレーシスを含み、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団を生成する。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団は、対象から採取された新鮮な腫瘍生検組織から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の試料を単離することによって得られる。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団は、対象から採取された新鮮な腫瘍生検組織から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の試料を単離し、IL-2の存在下でそれらを培養することでTILを増殖させることによって得られる。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団は、対象から末梢血単核細胞（PBMC）の試料を採取することによって得られる。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団は、対象（例えば、高齢の対象）から末梢血単核細胞（PBMC）の試料を採取し、IL-2の存在下でそれらを培養することでT<sub>EFF</sub>細胞を

40

50

増殖させることによって得られる。特定の態様では、リンパ球の開始集団の前処理（例えば、活性化）は必要ない。ある実施形態では、対象は哺乳動物である。ある実施形態では、哺乳動物は、高齢者などのヒトである。

【0082】

ある実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の試料は、対象から採取された新鮮な腫瘍生検組織から調製された細胞懸濁液を含む。ある実施形態では、細胞懸濁液は、例えば、gentleMACS（商標）Dissociator（Miltenyi Biotec, Auburn, CA）を使用する腫瘍組織の機械的な分離によって得られる。ある実施形態では、細胞懸濁液は、例えばコラゲナーゼを使用する腫瘍組織の酵素的分離によって得られる。

10

【0083】

ある実施形態では、この方法は、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団からT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料を調製するステップをさらに含む。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団からT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料を調製するステップは、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団から所望のT<sub>EFF</sub>細胞型及び亜型を単離することを含む。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団から単離された所望のT<sub>EFF</sub>細胞型又は亜型はCD8<sup>+</sup>T<sub>EFF</sub>細胞を含む。ある実施形態では、CD8<sup>+</sup>T<sub>EFF</sub>細胞はCD45ROも発現する。ある実施形態では、単離されたCD8<sup>+</sup>T<sub>EFF</sub>細胞はさらに精製される。ある実施形態では、さらなる精製は、骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）のT<sub>EFF</sub>細胞、TREG、NK細胞、及びマクロファージを含むリンパ球の開始集団を枯渇させるステップを含む。ある実施形態では、CD8<sup>+</sup>T<sub>EFF</sub>細胞は、例えば、沈降、濾過、又は異なる細胞型の物理的特性の違い（例えば、サイズ、密度）を利用する密度勾配遠心分離などの当業者に周知の免疫細胞型を分離する様々な方法のいずれかを使用して単離又はさらに精製される；表面電荷の違いを利用したプラスチック又は他のポリマー表面への付着、及び付着細胞を懸濁液中の浮遊細胞から分離するための付着；特定の細胞表面表現型に基づいて異なる細胞型を選択的に捕捉するための、細胞表面抗原の1つ又は複数の特異的結合剤（例えば、抗体、核酸アプタマー）への結合；次に、捕捉された細胞を、フローサイトメトリー、カラムクロマトグラフィー、磁気ビーズの単離、又は使用される抗体試薬に応じた他の方法によって細胞の複雑な混合物から分離することができる。

20

【0084】

ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団からT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料を調製するステップは、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団から骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）、TREGs、NK細胞、及びマクロファージを枯渇させることを含む。ある実施形態では、MDSC、TREGs、NK細胞、及びマクロファージが枯渇したT<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団はさらに精製される。ある実施形態では、さらなる精製は、MDSC、TREGs、NK細胞、及びマクロファージが枯渇したT<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団から所望のT<sub>EFF</sub>細胞型及び亜型を単離することを含む。ある実施形態では、MDSC、TREGs、NK細胞、及びマクロファージが枯渇したT<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団から単離された所望のT<sub>EFF</sub>細胞型又は亜型はCD8<sup>+</sup>T<sub>EFF</sub>細胞を含む。ある実施形態では、CD8<sup>+</sup>T<sub>EFF</sub>細胞はCD45ROも発現する。ある実施形態では、CD8<sup>+</sup>T<sub>EFF</sub>細胞は、例えば、沈降、濾過、又は異なる細胞型の物理的特性の違い（例えば、サイズ、密度）を利用する密度勾配遠心分離などの当業者に周知の免疫細胞型を分離する様々な方法のいずれかを使用して単離又はさらに精製される；表面電荷の違いを利用したプラスチック又は他のポリマー表面への付着、及び付着細胞を懸濁液中の浮遊細胞から分離するための付着；特定の細胞表面表現型に基づいて異なる細胞型を選択的に捕捉するための、細胞表面抗原の1つ又は複数の特異的結合剤（例えば、抗体、核酸アプタマー）への結合；次に、捕捉された細胞を、フローサイトメトリー、カラムクロマトグラフィー、磁気ビーズの単離、又は使用される抗体試薬に応じた他の方法によって細胞の複雑な混合物から分離することができる。

30

40

【0085】

50

ある実施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための1つ又は複数の所望の T<sub>EFF</sub>細胞型又は亜型は、1つ又は複数の細胞表面マーカーの存在又は非存在に基づいて、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団によって識別され、且つ/又は該開始集団から単離される。そのような識別及び/又は単離に有用な例示的な細胞表面マーカーには、限定されるものではないが、例えば、CD34、造血前駆幹細胞抗原、例えばB7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD28、及びL-セレクチン(CD62L)などの共刺激分子が含まれる。ある実施形態では、本明細書に記載の方法で使用するためのT<sub>EFF</sub>の集団は、CD45RO及び/又はCD45RAのそれらの発現に基づいて単離又は特徴付けられる。ある実施形態では、本明細書に記載の方法で使用するためのT<sub>EFF</sub>の集団は、CD28、CD62L、CCR7、及び/又はCD127の発現の欠如に基づいて単離又は特徴付けられる。ある実施形態では、単離は、所望のタイプのT<sub>EFF</sub>細胞、例えば、CD8<sup>+</sup>T<sub>EFF</sub>細胞が保持されるように、例えばCD8などの細胞表面マーカーの発現についての正の選択を含む。ある実施形態では、単離は、望ましくないタイプのT<sub>EFF</sub>細胞、例えばT<sub>REGs</sub>が除去されるように、例えばFoxp3などの細胞表面マーカーの発現についての負の選択を含む。

10

#### 【0086】

ある実施形態では、細胞表面マーカーの発現に基づくT<sub>EFF</sub>の所望の型又は亜型の識別及び/又は単離は、限定されるものではないが、例えば、蛍光活性化セルソーティング(FACS)、カラムクロマトグラフィー及び他のクロマトグラフィー法、磁気ビーズによるパンニング、ウェスタンブロッティング、オートラジオグラフィー、電気泳動、及び、例えば酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)などの他の様々な周知の免疫学的方法などを含む、当技術分野で知られている様々な標準的な方法のいずれかによって達成される。

20

#### 【0087】

ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤(HDACi)及びインターロイキン-21(IL-21)の存在下で培養される前にさらに培養又は増殖される。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、インターロイキン-2(IL-2)でさらに培養される。ある実施形態では、IL-2は、50U/ml~6000U/mlの濃度で3日ごとに投与される。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、コンフルエントになるまで、例えば、約2~約21日間、好ましくは約10~約14日間培養される。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、10<sup>10</sup>個以上の細胞などの所望の濃度に届くまで培養される。

30

#### 【0088】

ある実施形態では、培養された、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、プールされ、増殖される。ある実施形態では、増殖により、T<sub>EFF</sub>細胞の数が、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料と比較して、約10日間~約14日間の期間で少なくとも約50倍、少なくとも約60倍、少なくとも約70倍、少なくとも約80倍、少なくとも約90倍、又は少なくとも約100倍に増加する。ある実施形態では、増殖により、T<sub>EFF</sub>細胞の数が、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料と比較して、約10日間~約14日間の期間で少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約600倍、少なくとも約700倍、少なくとも約800倍、少なくとも約900倍、又は少なくとも約1000倍に増加する。

40

#### 【0089】

ある実施形態では、培養された、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料の増殖は、限定されるものではないが、例えば、フィーダーリンパ球及びインターロイキン-2(IL-2)又はインターロイキン-15(IL-15)のいずれかの存在下での非特異的T細胞受容体刺激を含む、当技術分野で公知の様々な標準的な方法のいずれかによって達成される。ある実施形態では、非特異的T細胞受容体刺激は、30ng/

50

m l の用量の O K T 3、マウスモノクローナル抗 C D 3 抗体 ( O r t h o - M c N e i l (登録商標), R a r i t a n , N J ) を含む。

【 0 0 9 0 】

ある実施形態では、本明細書で提供される方法は、1つ又は複数の細胞表面マーカーの存在又は非存在に基づいて、リプログラムされた T<sub>CM</sub>細胞を識別及び/又は単離するステップをさらに含む。そのような識別及び/又は単離に有用な例示的な細胞表面マーカーには、限定されるものではないが、例えば、C D 4 5 R O、C D 2 8、C D 6 2 L、C C R 7、C D 1 2 7、及び C D 2 7 が含まれる。ある実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成された T<sub>CM</sub>の集団は、それらの C D 2 8 及び/又は C D 6 2 L の発現に基づいて単離又は特徴付けられる。ある実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成された T<sub>CM</sub>の集団は、C D 4 5 R A の発現の欠如に基づいて単離又は特徴付けられる。ある実施形態では、この単離は、所望のタイプの T 細胞、例えば、C D 8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>細胞が保持されるように、例えば C D 8 などの細胞表面マーカーの発現についての正の選択を含む。ある実施形態では、単離は、望ましくないタイプの T 細胞、例えば T<sub>N</sub>が除去されるように、例えば C D 4 5 R A などの細胞表面マーカーの発現についての負の選択を含む。

10

【 0 0 9 1 】

ある実施形態では、細胞表面マーカーの発現に基づく T<sub>CM</sub>の識別及び/又は単離は、限定されるものではないが、例えば、蛍光活性化セルソーティング ( F A C S )、カラムクロマトグラフィー及び他のクロマトグラフィー法、磁気ビーズによるパンニング、ウェスタンブロットティング、オートラジオグラフィー、電気泳動、及び、例えば酵素結合免疫吸着測定法 ( E L I S A ) などの他の様々な周知の免疫学的方法などを含む、当技術分野で知られている様々な標準的な方法のいずれかによって達成される。

20

【 0 0 9 2 】

A . エンジニアリングされた T<sub>EFF</sub>細胞

別の態様では、本明細書で提供される、抗原特異的 T<sub>EFF</sub>細胞を T<sub>CM</sub>細胞にリプログラミングするための方法で使用するための T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団はエンジニアリングされた T 細胞を含む。ある実施形態では、エンジニアリングされた T 細胞は、キメラ抗原受容体を発現する T 細胞 ( C A R T 細胞 ) を含む。ある実施形態では、エンジニアリングされた T 細胞は、腫瘍特異的エピトープ又はネオエピトープに結合することができる組換え T 細胞受容体を発現する T 細胞を含む。

30

【 0 0 9 3 】

いくつかの実施形態では、エンジニアリングされた T 細胞は、当業者に公知の多数の十分に確立された遺伝子導入法のいずれかを使用して作製される。ある実施形態では、エンジニアリングされた細胞は、所望の標的腫瘍抗原に特異的なキメラ抗原受容体をコードするか、又は所望の腫瘍特異的エピトープ若しくはネオエピトープに特異的な組換え T C R をコードする核酸を導入するためにウイルスベクターベースの遺伝子導入法を使用して作製される。ある実施形態では、エンジニアリングされた細胞は、所望の標的腫瘍抗原に特異的なキメラ抗原受容体をコードするか、又は所望の腫瘍特異的エピトープ若しくはネオエピトープに特異的な組換え T C R をコードする核酸を導入するために非ウイルスベクターベースの遺伝子導入法を使用して作製される。ある実施形態では、ウイルスベクターベースの遺伝子導入法は、レンチウイルスベクターを含む。ある実施形態では、ウイルスベクターベースの遺伝子導入法は、レトロウイルスベクターを含む。ある実施形態では、ウイルスベクターベースの遺伝子導入法は、アデノウイルス又はアデノ随伴ウイルスベクターを含む。ある実施形態では、非ウイルスベクターベースの遺伝子導入法は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ ( Z F N )、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N )、及びクラスター化された規則的に間隔を空けた短いパンドロームリピート ( C R I S P R ) / C R I S P R 関連タンパク質 9 ( C a s 9 ) ヌクレアーゼからなる群から選択される遺伝子編集法を含む。ある実施形態では、非ウイルスベクターベースの遺伝子編集法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション、バイオリスティックス、微粒子銃、ピロソーム、リポソーム、ポリカチオン、又は脂質：核酸コンジュゲート、裸の D N A、

40

50

人工ビリオン、及び薬剤で強化されたDNAの取り込みからなる群から選択されるトランスフェクション又は形質転換法を含む。

【0094】

ある実施形態では、CAR T細胞は、細胞外抗原結合ドメイン、任意選択のスペーサー配列、膜貫通ドメイン、1つ又は複数の細胞内シグナル伝達ドメイン、及びCAR T細胞を活性化又は不活性化するための1つ又は複数の任意選択の調節配列を含むCAR構築物を発現する。

【0095】

ある実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、所望の標的に特異的に結合することができる部分を含む。ある実施形態では、所望の標的に特異的に結合することができる部分は、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を含む。ある実施形態では、その抗原結合断片は、所望の標的に特異的に結合することができるモノクローナル抗体の一本鎖可変断片(scFv)を含む。ある実施形態では、所望の標的は腫瘍特異的抗原である。ある実施形態では、腫瘍特異的抗原は、CD19、CD20、CD22、癌胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、CA-125、MUC-1、上皮腫瘍抗原、黒色腫関連抗原(MAGE)(例えば、MAGE-1、MAGE-11、又はMAGE-A)、変異p53、変異ras、HER2/Neu、ERBB2、葉酸結合タンパク質、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp41、GD2、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、メソセリン、GD3、HERV-K、IL-11R、カッパ鎖、ラムダ鎖、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII、VEGFR2、及びヒトパピローマウイルス(HPV)からなる群から選択される。ある実施形態では、所望の標的は、腫瘍特異的ネオエピトープである。ある実施形態では、腫瘍特異的ネオエピトープは、インシリコ分析によって識別される。ある実施形態では、腫瘍特異的ネオエピトープは、ヒト対象に由来する自己TILの集団から識別され、精製される。

【0096】

ある実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞膜にまたがることのできる構造を形成することのできる任意の合成又は天然アミノ酸配列を含む。ある実施形態では、細胞膜にまたがることのできる構造は、アルファヘリックスを含む。ある実施形態では、膜貫通領域は、CD3、CD3、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、4-1BB/CD137、CD154、誘導性T細胞共刺激因子(ICOS)/CD278、グルコシルチコイド誘導TNFR関連タンパク質(GITR)/CD357、NKGD2、TCR及びTCRからなる群から選択される天然に存在する膜貫通タンパク質に由来する。ある実施形態では、天然に存在する膜貫通タンパク質に由来する膜貫通領域は、他のシグナル伝達タンパク質との相互作用に関与することが知られている配列における1つ又は複数のアミノ酸置換を含む。

【0097】

ある実施形態では、1つ又は複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、1つ又は複数の細胞内チロシンベース活性化モチーフ(「ITAM」)を含む。ある実施形態では、1つ又は複数のITAMは、CD3-ゼータ(CD3)分子上に存在する。ある実施形態では、1つ又は複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28、4-1BB/CD137、ICOS、OX40、CD2、CD40L、CD27、Light-R、GITR、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0098】

B. 組換えT細胞受容体(TCR)

ある実施形態では、T細胞は、腫瘍特異的エピトープ又はネオエピトープに結合することができる組換えT細胞受容体を含む。ある実施形態では、組換えT細胞受容体は、対象から単離されたT細胞からクローニングされた天然に存在するTCRを含む。ある実施形態では、組換えTCRは、TCRアルファ(TCR)ポリペプチド及びTCRベータ(

10

20

30

40

50

T C R ) ポリペプチドを含むヘテロ二量体 ( 即ち、T C R ) を含む。ある実施形態では、組換えT C Rは、T C Rガンマ ( T C R ) ポリペプチド及びT C Rデルタ ( T C R ) ポリペプチドを含むヘテロ二量体 ( 即ち、T C R ) を含む。

【 0 0 9 9 】

ある実施形態では、組換えT C R は、対象から単離され、所望の標的に由来するペプチド抗原に特異的なクローニングされたT C R を含む。ある実施形態では、対象は哺乳動物である。ある実施形態では、哺乳動物はヒトである。ある実施形態では、所望の標的は、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、癌胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、C A - 1 2 5、M U C - 1、上皮腫瘍抗原、黒色腫関連抗原、変異p 5 3、変異r a s、H E R 2 / N e u、E R B B 2、葉酸結合タンパク質、H I V - 1エンベローブ糖タンパク質g p 1 2 0、H I V - 1エンベローブ糖タンパク質g p 4 1、G D 2、C D 1 2 3、C D 2 3、C D 3 0、C D 5 6、c - M e t、メソセリン、G D 3、H E R V - K、I L - 1 1 R、カップ鎖、ラムダ鎖、C S P G 4、E R B B 2、E G F R v I I I、及びV E G F R 2からなる群から選択される腫瘍特異的抗原である。ある実施形態では、組換えT C R は、対象から単離され、所望の標的に由来するペプチド抗原に特異的なクローニングされたT C R を含む。ある実施形態では、対象は哺乳動物である。ある実施形態では、哺乳動物はヒトである。ある実施形態では、所望の標的は、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、癌胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、C A - 1 2 5、M U C - 1、上皮腫瘍抗原、黒色腫関連抗原、変異p 5 3、変異r a s、H E R 2 / N e u、E R B B 2、葉酸結合タンパク質、H I V - 1エンベローブ糖タンパク質g p 1 2 0、H I V - 1エンベローブ糖タンパク質g p 4 1、G D 2、C D 1 2 3、C D 2 3、C D 3 0、C D 5 6、c - M e t、メソセリン、G D 3、H E R V - K、I L - 1 1 R、カップ鎖、ラムダ鎖、C S P G 4、E R B B 2、E G F R v I I I、及びV E G F R 2からなる群から選択される腫瘍特異的抗原である。

【 0 1 0 0 】

C . ヒストンデアセチラーゼ阻害剤 ( H D A C i )

本明細書では、抗原特異的エフェクターT細胞 ( T E F F細胞 ) をセントラルメモリーT細胞 ( T C M細胞 ) にリプログラミングするための方法が提供され、この方法は、それぞれT E F F細胞をT C M細胞にリプログラムするのに十分な量のヒストンデアセチラーゼ阻害剤 ( H D A C i ) 及びインターロイキン - 2 1 ( I L - 2 1 ) の存在下で、T E F F細胞を含むリンパ球の開始集団又はT E F F細胞に富む試料を培養するステップを含み、このリプログラミングにより、対象から得られたT E F F細胞を含むリンパ球の開始集団におけるT C M細胞の数と比較してT C M細胞に富むリンパ球の集団が生成される。I L - 2 1とH D A C iの併用処置は、エフェクターT細胞からセントラルメモリー表現型を誘導して、I L - 2及びI L - 1 5への応答を増強する相加効果よりも優れている。

【 0 1 0 1 】

ある実施形態では、T E F F細胞を含むリンパ球の開始集団又はT E F F細胞に富む試料は、H D A C i及びI L - 2 1と共に連続的に培養される。ある実施形態では、T E F F細胞を含むリンパ球の開始集団又はT E F F細胞に富む試料は、最初にH D A C i ( 例えば、0 . 1 ~ 5 n M、例えば1 ~ 3 n M ) と共に培養され、次にI L - 2 1 ( 例えば、1 0 ~ 5 0 n g / m L、例えば2 0 ~ 4 0 n g / m L、具体的には約3 0 n g / m L ) と共に培養される。ある実施形態では、T E F F細胞を含むリンパ球の開始集団又はT E F F細胞に富む試料は、最初にI L - 2 1 ( 例えば、1 0 ~ 5 0 n g / m L、例えば2 0 ~ 4 0 n g / m L、具体的には約3 0 n g / m L ) と共に培養され、次にH D A C i ( 例えば、0 . 1 ~ 5 n M、例えば1 ~ 3 n M ) と共に培養される。ある実施形態では、T E F F細胞を含むリンパ球の開始集団又はT E F F細胞に富む試料は、H D A C i及びI L - 2 1の存在下で同時に培養される。ある実施形態では、T E F F細胞を含むリンパ球の開始集団又はT E F F細胞に富む試料は、T C M表現型を誘導するのに十分な期間、H D A C i及びI L - 2 1の存在下で同時に培養される。ある実施形態では、T E F F細胞を含むリンパ球の開始集団又はT E F F細胞に富む試料は、H D A C i及びI L - 2 1の存在下で7 ~ 2 0日間、同時に培養される。ある実

10

20

30

40

50

施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、HDACi及びIL-21の存在下で12～16日間、同時に培養される。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、又は20日間、HDACi及びIL-21の存在下で同時に培養される。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、HDACi及びIL-21の存在下で13日間、14日間、又は15日間同時に培養される。

#### 【0102】

ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、1つ又は複数の追加のサイトカイン、ケモカイン、又は増殖因子の存在下でさらに培養される。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、IL-2の存在下でさらに培養される。ある実施形態では、T<sub>EFF</sub>細胞を含むリンパ球の開始集団又はT<sub>EFF</sub>細胞に富む試料は、HDACi及びIL-21の存在下で同時に培養する前にIL-2の存在下で培養される。

#### 【0103】

ある実施形態では、HDACiは、そのデアセチラーゼ活性の補因子としてZn<sup>2+</sup>を必要とする古典的なHDACiを含む。ある実施形態では、古典的なHDACiは、ヒドロキサム酸又はヒドロキサメート、環状テトラペプチド及びデプシペプチド、ベンズアミド、求電子性ケトン、及び脂肪酸からなる群から選択される。ある実施形態では、HDACiは、ヒドロキサム酸又はヒドロキサメートを含む。ある実施形態では、ヒドロキサム酸又はヒドロキサメートは、ポリノスタット（スベラニロヒドロキサム酸又はSAHA、Zolinza（登録商標）として販売されている）、ベリノスタット（PXD101、Beleodaq（登録商標）として販売されている）、パノビノスタット（Farydaq（登録商標）として販売されている）、及びダシノスタット（LAQ824）からなる群から選択される。ある実施形態では、HDACiはベンズアミドを含む。ある実施形態では、ベンズアミドは、エンチノスタット（SNDX-275又はMS-275）、タセジナリン（CI994）、及びモセチノスタット（MGCD0103）からなる群から選択される。ある実施形態では、HDACiは、環状テトラペプチド又はデプシペプチドを含む。ある実施形態では、環状テトラペプチド又はデプシペプチドはトラポキシニンBである。ある実施形態では、HDACiは脂肪酸である。ある実施形態では、脂肪酸は、フェニルブチレート及びバルプロ酸からなる群から選択される。

#### 【0104】

##### D. インターロイキン-21 (IL-21)

ヒトインターロイキン21 (IL-21) は、ナチュラルキラー (NK) 細胞及びウイルス感染又は癌性細胞を破壊することができる細胞傷害性T細胞を含む免疫系の細胞に対して強力な調節効果を有するIL-21遺伝子によってコードされるサイトカインタンパク質である。162個のアミノ酸のヒトIL-21タンパク質 (GenBankアクセッション番号BBAA22643; 配列番号1) は、共にあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,307,024号明細書及び同第6,686,178号明細書に記載されている。本方法は、セントラルメモリーT細胞の生成のためのHDACiと組み合わせたIL-21によるエフェクターT細胞の処理に関する。いくつかの態様では、IL-21は、10ng/mL～50ng/mL、例えば15ng/mL～60ng/mL、例えば20ng/mL～40ng/mL、特に約25ng/mL、30ng/mL、又は35ng/mLの濃度で培地中に存在する。

#### 【0105】

##### III. 使用方法

別の態様では、対象における癌又は感染症を処置するための方法が本明細書で提供され、この方法は、本明細書で提供されるいずれかの方法によって生成された、治療有効量のTCM細胞に富むリンパ球の集団を対象に投与することを含む。この細胞を、TILを培養

することができる癌を有する対象に養子移入してもよいし、又は腫瘍抗原特異的CTLをインビトロで生成してもよい。

【0106】

本処置法が有用である腫瘍には、固形腫瘍又は血液腫瘍に見られる癌などのあらゆる悪性細胞型が含まれる。例示的な固形腫瘍には、限定されるものではないが、膵臓、結腸、盲腸、胃、脳、頭、首、卵巣、腎臓、喉頭、肉腫、肺、膀胱、黒色腫、前立腺、及び乳房からなる群から選択される器官の腫瘍が含まれ得る。例示的な血液腫瘍には、骨髓の腫瘍、T細胞又はB細胞の悪性腫瘍、白血病、リンパ腫、芽細胞腫、及び骨髓腫などが含まれる。本明細書で提供される方法を使用して処置することができる癌のさらなる例には、限定されるものではないが、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、及び肺扁平上皮癌を含む）、腹膜癌、胃癌（gastric cancer）又は胃癌（stomach cancer）（消化管癌及び消化管間質癌を含む）、膵臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌又は腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、様々な種類の頭頸部癌、及び黒色腫が含まれる。

10

【0107】

癌は、限定されるものではないが、特に以下の組織型の癌であり得る：新生物、悪性；癌腫；未分化癌；巨大及び紡錘細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；毛母癌；移行上皮癌；乳頭状移行上皮癌（papillary transitional cell carcinoma）；腺癌；ガストリノーマ、悪性；胆管癌；肝細胞癌；肝細胞癌と胆管癌の混合型；索状腺癌（trabecular adenocarcinoma）；腺様嚢胞癌；腺腫性ポリプ腺癌；腺癌、家族性大腸ポリポシス腺癌；固形癌；カルチノイド腫瘍、悪性；気管支・肺胞腺癌；乳頭腺癌；色素嫌性癌；好酸性癌；好酸性腺癌；好塩基性癌；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞腺癌；乳頭状及び濾胞腺癌；非被包性硬化性癌；副腎皮質細胞癌；子宮内膜癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳垢腺癌；粘表皮癌；嚢胞腺癌；乳頭状嚢胞腺癌；乳頭状漿液嚢胞腺癌；粘液性嚢胞腺癌；粘液癌；印環細胞癌；浸潤性乳管癌；髓様癌；小葉癌；炎症性癌；パジェット病、乳房；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌；扁平上皮化生を伴う腺癌；胸腺腫、悪性；卵巣間質腫瘍、悪性；莢膜細胞腫、悪性；顆粒膜細胞腫、悪性；セルトリ間質細胞腫瘍、悪性；セルトリ細胞癌；ライディッヒ細胞腫瘍、悪性；脂質細胞腫瘍、悪性；傍神経節腫、悪性；乳房外傍神経節腫、悪性；褐色細胞腫；血管球血管肉腫；悪性黒色腫；無色素性黒色腫；表在性大型黒色腫；悪性黒子黒色腫；末端黒子型黒色腫；結節型黒色腫；巨大色素性母斑における悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；青色母斑、悪性；肉腫；線維肉腫；線維性組織球腫、悪性；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；胞巣状横紋筋肉腫；間質肉腫；混合腫瘍、悪性；ミューラー混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；癌肉腫；間葉腫、悪性；ブレンナー腫瘍、悪性；葉状腫瘍、悪性；滑膜肉腫；中皮腫、悪性；未分化胚細胞腫；胚性癌腫；奇形腫、悪性；卵巣甲状腺腫、悪性；絨毛癌；中腎腫、悪性；血管肉腫；血管内皮腫、悪性；カポジ肉腫；血管外皮腫、悪性；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性肉腫；軟骨肉腫；軟骨芽細胞腫、悪性；間葉性軟骨肉腫；骨の巨細胞瘍；ユーイング肉腫；歯原性腫瘍、悪性；骨髓芽球性歯肉肉腫；エナメル上皮歯牙肉腫、悪性；エナメル上皮線維肉腫；松果体腫瘍、悪性；脊索腫；神経膠腫、悪性；上衣腫；星状細胞腫；原形質星状細胞腫；線維性星細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起神経膠腫；乏突起膠芽細胞腫；原始神経外胚葉；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽細胞腫；網膜芽細胞腫；嗅神経腫瘍；髄膜腫、悪性；神経線維肉腫；神経鞘腫、悪性；顆粒細胞腫瘍、悪性；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン側肉芽腫；悪性リンパ腫、小リンパ球性；悪性リンパ腫、大細胞、びまん性；悪性リンパ腫、濾胞性；菌状息肉腫；その他の特定の非ホジキンリンパ腫；B細胞リンパ腫；低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非開裂細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；エイズ関連リンパ腫；ワルデンストレームマクログロブリン血症；悪性組織球増殖症；多発性骨髓腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；

20

30

40

50

白血病；リンパ性白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞白血病；巨核芽球性白血病；骨髄肉腫；有毛細胞白血病；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；急性骨髄性白血病（AML）；及び慢性骨髄芽球性白血病。

【0108】

ある実施形態では、この方法は、治療有効量の $T_{CM}$ 細胞の集団を投与する前にリンパ球枯渇を行うステップをさらに含む。ある実施形態では、リンパ球枯渇は、非骨髄破壊的リンパ球枯渇化学療法を含む。ある実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇化学療法は、シクロホスファミド及びフルダラピンの投与を含む。

【0109】

ある実施形態では、この方法は、自己T細胞と同時に又は自己T細胞の後に、自己T細胞の増殖及び活性化を促進するT細胞増殖因子を対象に投与するステップをさらに含む。ある実施形態では、T細胞増殖因子は、自己T細胞の増殖及び活性化を促進する任意の適切な増殖因子を含む。ある実施形態では、T細胞増殖因子は、インターロイキン（IL）-2、IL-7、IL-15、及びIL-12、並びにこれらの組み合わせ（例えば、IL-2とIL-7、IL-2とIL-15、IL-7とIL-15、IL-2、IL-7とIL-15、IL-12とIL-7、IL-12とIL-15、又はIL-12とIL-2）からなる群から選択される。

【0110】

ある実施形態では、本明細書で提供される方法のいずれかによって生成された、治療有効量の $T_{CM}$ 細胞に富むリンパ球の集団が、対象に静脈内、腫瘍内、又は腹腔内投与される。T細胞療法の適切な薬用量は、処置される癌の種類、疾患の重症度及び経過、個人の臨床状態、個人の病歴及び処置に対する応答、並びに主治医の判断に基づいて決定することができる。

【0111】

A．併用療法

ある実施形態では、本明細書で提供される方法は、少なくとも1つの追加の治療薬を対象に投与するステップをさらに含む。本明細書に開示されるすべての追加の治療薬は、あらゆる潜在的な毒性、起こり得る副作用、及びその他の関連する要因を考慮に入れた、特定の組成物又は療法ごとの良好な臨床診療に従って対象に投与される。

【0112】

ある実施形態では、追加の療法は、免疫療法、放射線療法、外科手術（例えば、腫瘍の外科的切除）、化学療法、骨髄移植、又は前述の組み合わせであり得る。追加の療法は、標的療法であり得る。ある実施形態では、追加の療法は、最初の処置の前に（即ち、アジュバント療法として）施される。ある実施形態では、追加の療法は、最初の処置の後に（即ち、ネオアジュバント療法として）施される。

【0113】

ある実施形態では、追加の療法は免疫療法を含む。ある実施形態では、免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤を含む。ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、プログラムされた細胞死経路1（PD-1/CD279）及びそのリガンド（PD-L1/CD274及びPD-L2/CD273）、細胞毒性Tリンパ球関連抗原4（CTLA-4/CD152）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3/CD223）、B及びTリンパ球アテニューエーター（BTLA）、Igドメイン及び免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（ITIM）ドメインを含むT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞免疫グロブリンドメイン及びムチンドメイン3（TIM-3/HAVcr2）、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR/CD158）、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサブプレッサー（VISTA）、並びにアデノシンA2a受容体（A2aR）からなる群から選択される免疫チェックポイントタンパク質を阻害する。

【0114】

ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤はPD-1結合アンタゴニストである

10

20

30

40

50

。ある実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは抗PD-1抗体である。ある実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びCT-011からなる群から選択される。ある実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、免疫アドヘシン（例えば、免疫グロブリン定常領域（例えば、免疫グロブリン配列のFc領域）に融合されたPDL1又はPDL2の細胞外又はPD-1結合部分を含む免疫アドヘシン）である。

【0115】

ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4結合アンタゴニストである。ある実施形態では、CTLA-4結合アンタゴニストは抗CTLA-4抗体である。ある実施形態では、抗CTLA-4抗体は、イピリムマブ及びトレメリムマブからなる群から選択される。

10

【0116】

ある実施形態では、追加の治療薬は、放射線療法による処置を含む。ある実施形態では、放射線療法は、ガンマ線（線）、X線、マイクロ波、陽子線照射、紫外線照射、及び腫瘍への放射性同位元素の直接送達からなる群から選択される。ある実施形態では、放射線療法はX線による処置を含む。ある実施形態では、X線は、3～4週間にわたって50～200レントゲンの1日量で投与される。ある実施形態では、X線は、2000～6000レントゲンの単回線量で投与される。ある実施形態では、放射線療法は、腫瘍への放射性同位元素の直接送達を含む。放射性同位元素の線量範囲は、同位元素の半減期、放出される放射線の強度及び種類、並びに腫瘍細胞によって取り込まれる程度によって大きく異なるが、適切な治療有効量の決定は、当業者のレベルの範囲内である。

20

【0117】

ある実施形態では、追加の治療薬は、最初の処置に関連する副作用（例えば、悪心、悪液質など）を処置するための薬剤の投与を含む。ある実施形態では、追加の療法は免疫療法を含む。ある実施形態では、追加の療法は放射線療法を含む。いくつかの実施形態では、放射線療法はガンマ線照射を含む。ある実施形態では、追加の療法は外科手術を含む。ある実施形態では、追加の療法は、放射線療法と外科手術の組み合わせを含む。ある実施形態では、追加の療法は、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、キナーゼ阻害剤、ヌクレオチド類似体及びヌクレオチド前駆体類似体、ペプチド抗生物質、プラチナベースの化合物、レチノイド、ピンカアルカロイド及びその誘導体からなる群から選択される化学療法剤のクラスによる処置を含む。

30

【0118】

本明細書で企図される追加の療法は、本明細書で提供される組成物の投与の前、後、又は同時に施すことができる。ある実施形態では、追加の療法は、本明細書で提供される組成物の前に施される。ある実施形態では、追加の療法は、本明細書で提供される組成物の後に施される。ある実施形態では、追加の療法は、本明細書で提供される組成物の投与の前又は後に、1つ又は複数の間隔で施される。処置される対象が併用療法から利益を得るような追加の療法を施すための適切な間隔の決定は、当業者のレベルの範囲内である。

【0119】

B. 医薬組成物

40

別の態様では、本明細書では、TCM細胞及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物及び製剤が提供される。

【0120】

本明細書に記載の医薬組成物及び製剤は、通常の生理食塩水（例えば、0.9%）及びヒト血清アルブミン（例えば、10%）などの水溶液の形態で、所望の純度を有する活性成分（例えば、抗体又はポリペプチドなど）を1つ又は複数の任意選択の薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 2<sup>nd</sup> edition, 2012）と混合することによって調製することができる。薬学的に許容される担体は、一般に、使用される薬用量及び濃度でレシピエントに対して無毒であり、このような担体には、限定されるものではないが：リン酸塩、クエン酸塩、及び他

50

の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸とメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10個未満の残基）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジンなどのアミノ酸；単糖、二糖、及びグルコース、マンノース、又はデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/又はポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

10

#### 【実施例】

##### 【0121】

#### IV. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において十分に機能するように本発明者によって発見された技術を表し、従って、その実施のための好ましいモードを構成すると見なすことができることを当業者は理解されよう。しかしながら、当業者は、本開示に照らして、開示される特定の実施形態において多くの変更を行うことができ、それでもなお本発明の精神及び範囲から逸脱することなく同様又は類似の結果が得られることを理解されたい。

20

##### 【0122】

#### 実施例1 - エフェクターT細胞のセントラルメモリーT細胞へのリプログラミング

高いCD28発現と一致して、ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞は、エフェクターメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞と比較して、プロモーター上及びCD28の転写開始部位の近くで劇的に増加したアセチル化ヒストンH3（AcH3）レベルを示した（図1A）。これらの結果は、CD8<sup>+</sup>T細胞の分化がヒストンのアセチル化の減少を伴い、ヒストンの脱アセチル化を阻害するとCD8<sup>+</sup>T細胞の分化が逆転し得ることを示唆した。図1Bは、1µM以上のSAHAがエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞におけるAcH3レベルを増大させたことを示し、図1Cは、IL-21がエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞におけるSTAT3リン酸化を誘導したことを示している。

30

##### 【0123】

この試験は、CD45ROを発現するエフェクターT細胞を、CD62L及びCD28を発現するセントラルメモリーT細胞にリプログラム又は脱分化する方法を開発するために行った（図8）。セントラルメモリーマーカーCD28及びCD62Lに対するIL-21及びヒストンデアセチラーゼ阻害剤（HDACi）処理の効果を評価した。MART1（M27）特異的エフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞を、未処理のまま又はSAHAで24時間前処理した後、SAHA/IL-21の存在下又は非存在下、M27パルス成熟樹状細胞で4日間活性化させた。対照細胞（SAHAなし、IL-21なし）と比較して、IL-21のみではCD28発現がわずかにしか増加しなかった。SAHAのみではCD28発現をアップレギュレートしたが、興味深いことに、SAHAとIL-21は一緒になってCD28発現を劇的に増強し、CD28発現に対するSAHAとIL-21の協同的効果を示した（図2A）。

40

##### 【0124】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を単離し、次いでサイトカインIL-2で増殖させた。TILを、IL-21（30ng/mL）又はIL-21とHDACi（SAHA）との組み合わせで2週間処理した。増殖の最後に、TILをCD8、CD28、及びCD62Lに対する抗体で染色し、CD8<sup>+</sup>ゲートを用いて分析した。結果は、HDACiとIL-21の処理の組み合わせがセントラルメモリーT細胞のパーセンテージの有意な増加をもたらしたことを示した（図2B）。

50

## 【0125】

加えて、CD28プロモーター上のSTAT結合部位の近くのAcH3及びSTAT3の濃縮のChIP結果は、HDACi(SAHA)処理がCD28プロモーター上のアセチル化H3(AcH3)レベルを増加させ、IL-21誘導STAT3の同じDNA領域への結合を可能にすることを示した(図2C)。

## 【0126】

パノピノスタットは、0.5nM以上の用量でAcH3レベルを増加させた(図3A)。パノピノスタットの有無にかかわらずIL-21をmini-REPに添加すると、細胞増殖の収量が劇的に増加し(図3B)、パノピノスタットは、IL-21によるCD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>細胞集団の誘導を有意に増強した(図3C)。通常のREPでは、パノピノスタット(Pano)のみのREPへの追加は増殖収率をわずかに低下させたが、増殖倍率は他の3つの条件で同様であった(図3D)。

10

## 【0127】

これらの結果を検証するために、セントラルメモリー及びエフェクターT細胞を含む抗原特異的CTL細胞株を増殖させ、CD8、CD28、及びCD62Lに対する抗体で染色し、CD8<sup>+</sup>ゲートで分析した。IL-21とHDACiパノピノスタットの併用処理により、セントラルメモリーT細胞を約0.5%から19%超に増加させたことが分かった(図4A)。

## 【0128】

また、増殖させたTIL/CTLをCD8及びCD132に対する抗体で染色し、そしてCD8<sup>+</sup>ゲートを用いて分析した。IL-21は、CD132(鎖)の発現をアップレギュレートすることが分かった(図4C)。加えて、増殖させたCTLをカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)で標識し、IL-2又はIL-15で2日間培養して細胞分裂を確認した。IL-21及びパノピノスタットで処理した細胞は、鎖サイトカインIL-2及びIL-15に対する応答の増強を示した。(図4B)。

20

## 【0129】

図5Aは、IL-21及びパノピノスタット誘導CD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>細胞がCD28、CD62L、Lef1、及びTcf1を高度に発現したことを示し、これらの細胞がCD28<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>細胞よりも分化していないことを示唆した。

## 【0130】

臨床関連TIL増殖におけるIL-21及びパノピノスタットの効果を評価した。パノピノスタットのみを増殖に含めると、1つのTIL株での生成物の収量が減少したが、増殖倍率は、通常の増殖及びIL-21/パノピノスタットの増殖で同様であった(図5B)。

30

## 【0131】

増殖の終了時に、クロム放出アッセイ(CRA)を行って、異なる条件下で増殖させた細胞の殺腫瘍効率を評価した。IL-21処理及びパノピノスタット+IL-21の併用処理は、腫瘍細胞の死滅を増強した(図6A)。増殖後、腫瘍抗原特異的CTL細胞を腫瘍細胞で再刺激し、続いて細胞内染色を行った。IL-21は、IFN及びグランザイムB発現を増強した(図6B)。

40

## 【0132】

別の実験では、最終分化及び非最終分化TILの不均一な集団を増殖させ、CD8、CD28及びCD62Lに対する抗体で染色し、そしてCD8<sup>+</sup>ゲートを用いて分析した。IL-21及びパノピノスタット(Pano)処理は、TIL上のセントラルメモリーマーカーCD28及びCD62L発現をアップレギュレートした(図7A)。

## 【0133】

従って、HDACiを使用して、エフェクターT細胞をリプログラムして、エフェクターT細胞がメモリーT細胞に対して感受性となるようにすることができる。結論として、IL-21とHDACiの併用処理は、エフェクターT細胞からセントラルメモリー表現型を誘導してIL-2及びIL-15への応答を増強する相乗効果を有することが示され

50

た。

【0134】

実施例2 - 材料及び方法

腫瘍抗原特異的CTL株又は腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の増殖: CTL株又はTILを、抗CD3及び照射された同種異系PBMC又はリンパ芽球様細胞株(LCL)(CTL株の場合)を急速な増殖のためのフィーダー細胞として使用して増殖させた。TILは、患者の黒色腫瘍から培養した。培養物には、50U/ml(CTL株の場合)又は6000U/ml(TILの場合)のIL-2を3日ごとにフィードした。IL-21(30ng/ml)又はHDACiパノピノスタット(3nM)(対照として)又はIL-21とHDACiの組み合わせを、0日目、4日目、及び7日目にフィードした。14日後、細胞をさらなる分析に使用した。SAHAを用いた試験(図2)では、SAHAは1~5µMで使用した。

10

【0135】

フローサイトメトリー: 細胞を、CD8、CD28、CD62L、又はCD132に対する抗体で染色した。すべてのFACSデータを、LSRIIFローサイトメーターを介して取得し、FlowJoソフトウェア(Tree Star, Inc.)によって分析した。

【0136】

細胞内染色: 細胞を、腫瘍細胞で16時間再刺激し、CD8に対する抗体で染色し、続いて固定し、透過化緩衝液中のIFN-及びグランザイムBに対する抗体で染色した。細胞を洗浄し、分析前にFACS緩衝液に再懸濁した。

20

【0137】

定量的リアルタイムPCR: 全RNAを、Qiagen RNA精製キットを用いて調製した。Superscript逆転写酵素及びオリゴ(dT)プライマー(Life Technology)を用いてcDNAを作製し、iQ SYBRグリーンリアルタイムPCRキット(Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用いてBio-Rad iCycler Optical Systemで遺伝子発現を検出した。データを、参照遺伝子RPL13Aに対して正規化した。RPL13AプライマーはQiagenから購入した。使用した他のプライマー対は: CD28 フォワード: CTCACACTTCGGGTTCCTCGG(配列番号2)、リバーズ: GACTCCACCAA CCA CCA CCA CAG(配列番号3); CD62L フォワード: ATGGAACGATGACGCCTGCC(配列番号4)、リバーズ: GGCCTCCAAAGGCTCACACT(配列番号5)であった; 追加のプライマーには、リンパ球エンハンサー結合因子1(LEF1) フォワード: CACACCCGTCACACATCCCA(配列番号6)、リバーズ: TGGGAAAACCAGCCAAGAGGTG(配列番号7); 転写因子1(TCF1) フォワード: TGCAGCTATACCCAGGCTGG(配列番号8)、リバーズ: CCTCGACCGCCTCTTCTTC(配列番号9)が含まれていた。

30

【0138】

クロマチン免疫沈降(ChIP): ChIPは、製造者の指示(Millipore)に従って、ChIPアッセイキットを用いて行った。定量的リアルタイムPCRを、プライマー: CD28プロモーター近位STAT部位: フォワード TCTGCTGGATT TCAAGCACCC(配列番号10)、リバーズ GACTGCAGCATTTACACACAGG(配列番号11); 遠位STAT部位: フォワード TGCTTGCACGTAGAATGGGT(配列番号12)、リバーズ GGATGGGGACAGGTTGTGTC(配列番号13)を用いて行った; ウサギIgGを陰性対照として使用した。

40

【0139】

クロム放出アッセイ(CRA): 腫瘍細胞を、20:1のエフェクター: 腫瘍で抗原特異的CTLと共に4時間インキュベートする前に、Cr51で標識した。上清中のCr51の量を測定し、死滅効率を死滅(%) = 100% × (試料平均 - 陰性対照の平均) / (

50

陽性対照の平均 - 陰性対照の平均)として計算した。

【0140】

Mini-REPは、T25フラスコから24ウェルプレートへのスケールダウンを適宜開始した。IL-21及びパノピノスタットの用量は変更しなかった。

【0141】

統計分析：データのグラフ表示及び統計分析を、GraphPad Prism (Version 6, GraphPad software, San Diego, CA)及びExcelを用いて行った。データは、平均及びSTDとして示される。実験群間の結果を、学生t検定を用いて比較した。p < 0.05は統計的に有意であると見なした。統計的有意性は、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001として示される。

10

【0142】

実施例3 - ヒトエフェクターのメモリーCD8<sup>+</sup> T細胞へのリプログラミング

IL-21は、活性化ヒトナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞におけるCD28発現をアップレギュレートする：CD28は、ナイーブT細胞活性化及びメモリーT細胞機能のための極めて重要な共刺激分子である。インビトロでの腫瘍抗原特異的CTLの生成に対する様々なCサイトカインの影響を比較した以前の試験で、IL-21が、養子移入後に持続性の向上及び患者の臨床反応の改善を示すCD28<sup>hi</sup> CTLを濃縮する独自の能力を有することが分かった。IL-21誘導CD28発現の分子メカニズムを調べるために、T細胞(MART1、M27)特異的CTLによって認識される黒色腫抗原を、前述のようにIL-21の非存在下又は存在下で生成した(Liet al., 2005)。IL-21で生成されたM27特異的CTLは、IL-21の非存在下で生成された細胞よりも有意に高いCD28発現を示した(図9A及び図9B)。試験結果をさらに裏付けるために、健康なドナーからの選別精製されたナイーブヒトCD8<sup>+</sup> T細胞(CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>)を、IL-21の非存在下又は存在下で抗CD3/CD28ビーズで活性化し、表面CD28発現をフローサイトメトリーによって検出した。抗原特異的CTL(図9A及び図9B)と一致して、CD28の表面レベルの発現は、ポリクローナル活性化IL-21処理ヒトナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞において有意に増加した(図9C及び図9D)。増強されたCD28タンパク質発現と一致して、大幅に増加したCD28 mRNAレベルが、IL-21の存在下で生成されたM27特異的CTL(図9E)及びIL-21処理抗CD3/CD28活性化ヒトナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞(図9F)で一貫して検出された。これらの結果を総合すると、IL-21は、CD28 mRNA発現をアップレギュレートして、CD28の表面レベルの発現を増加させることを示した。

20

30

【0143】

STAT3活性化は、IL-21が媒介するCD28発現の増強に必要である：IL-21は、ヤヌス活性化キナーゼ1(JAK1)及びJAK3の活性化、並びにその後のシグナル伝達兼転写活性化因子(STAT)-3、及び程度は低いがSTAT1とSTAT5のリン酸化によって機能する。従って、STAT1、STAT3、及びSTAT5のリン酸化を、培養条件下でナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞で調べた。健康なドナーからのヒトナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞を、IL-21の非存在下又は存在下で、様々な期間にわたって抗CD3/CD28ビーズで活性化した。IL-21刺激は、STAT1及びSTAT3の強いリン酸化を誘導したが、活性化の30分後にはSTAT5の弱いリン酸化を誘導した(図16A)。IL-21はSTAT1及びSTAT3の強い活性化を誘導するため、この試験は、STAT1及び/又はSTAT3の活性化がIL-21によるCD28のアップレギュレーションに不可欠であるかどうかを解明することが目的であった。STAT3の役割を調べるために、ヨブ症候群患者の末梢血単核細胞(PBMC)を使用した。ヨブ症候群(血中の免疫グロブリンE(IgE)の異常に高いレベルを特徴とするハイパーIgE症候群としても知られている)は、STAT3遺伝子のドミナントネガティブ変異によるSTAT3機能の低下によって引き起こされる。全CD8<sup>+</sup> T細胞を、健康なドナー又はヨブ症候群患者のPBMCから分離し、上記のように活性化した。IL-21は、健

40

50

康なドナーのCD8<sup>+</sup> T細胞におけるタンパク質レベル及びmRNAレベルの両方でCD28の発現を増加させたが、IL-21が媒介したCD28発現の増強は、ヨブ症候群患者の細胞では完全に抑制された(図17A~図17C)。これらの結果は、STAT3活性が活性化ヒトCD8<sup>+</sup> T細胞のIL-21によるCD28発現のアップレギュレーションに重要であることを示した。

#### 【0144】

試験結果をさらに確認するため、及びIL-21誘導性CD28アップレギュレーションにおけるSTAT1の役割も評価するために、ヒトSTAT1又はSTAT3遺伝子の様々な領域を標的とする異なるshRNA構築物を使用して、未処理のヒトCD8<sup>+</sup> T細胞におけるSTAT1又はSTAT3発現をノックダウンした。全STAT1及びSTAT3レベルは、STAT1又はSTAT3 shRNAがそれぞれのタンパク質の発現を特異的且つ効率的に減少させることを示した(図16B)。図10D~図10Fに示されているように、対照細胞と比較して、IL-21誘導CD28タンパク質及びmRNAのアップレギュレーションは、STAT3 shRNAをトランスフェクトして活性化したCD8<sup>+</sup> T細胞で減少したが、STAT1 shRNAをトランスフェクトして活性化した細胞では減少しなかった。これらの結果は、活性化ヒトCD8<sup>+</sup> T細胞でのCD28発現のIL-21誘導アップレギュレーションにおける、STAT1ではなくSTAT3の重要な役割を支持した。試験結果と一致して、患者のSTAT3変異細胞、STAT1変異細胞、及びIL21R変異細胞の以前の試験では、STAT1ではなくIL21/STAT3が、インビボでのCD8<sup>+</sup> セントラルメモリー(CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>)及びエフェクターメモリー細胞(CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>)の分化に必要であることを示した。

#### 【0145】

STAT3が活性化ヒトCD8<sup>+</sup> T細胞におけるCD28発現のIL-21誘導アップレギュレーションを媒介する分子メカニズムをさらに詳しく説明するために、ヒトCD28プロモーターを分析し、いくつかのコンセンサスSTAT部位が、CD28プロモーターの近位及び遠位部分でクラスター化して確認された。ChIPアッセイは、抗CD3/CD28処理のみと比較して、抗CD3/CD28及びIL-21で活性化された細胞の近位及び遠位のCD28プロモーター領域の両方でのSTAT3の2~3倍の濃縮を示した(図10G)。まとめると、これらの結果は、IL-21活性化STAT3がヒトCD28プロモーターに結合してCD28転写を促進することを示唆した。

#### 【0146】

IL-21に応答したCD28の分化誘導は、ナイーブ及びエフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞におけるヒストンH3アセチル化レベルと相関する：試験は、IL-21が、活性化後のナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞におけるCD28発現をユニークに増強することを実証した(図9)。しかしながら、IL-21によるCD28の誘導は、それらの同族ペプチドパルス成熟樹状細胞で活性化されたMART1(M27)特異的エフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞では観察されなかった(図11A及び図11B)。IL-21は、主にSTAT3のリン酸化を介して機能するため(図10)、IL-21誘導STAT3リン酸化レベルをナイーブ及びエフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞で比較し、同等であることが分かり(図11C)、IL-21がエフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞におけるCD28発現を増加させることができないことは、IL-21シグナル伝達の欠如によるものではなく、その結合部位へのpSTAT3のアクセスの欠如によるものであったことを示唆している。

#### 【0147】

クロマチンのアクセス可能性及び遺伝子発現は、ヒストンアセチル化によって調節することができる。ヒストンアセチル化レベルがCD28発現と相関するかどうかを判断するために、クロマチン免疫沈降(ChIP)を、それぞれ高レベル及び低レベルのCD28を有するナイーブ(CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>)及びTEMRAエフェクターメモリー(CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>)CD8<sup>+</sup> T細胞で行った。それらの高いCD28発現と一致して、ナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞は、TEMRA CD8<sup>+</sup> T細胞と比較して、プロモーターの遠位及び近位STAT3結合部位の周り、及びCD28遺伝子の転写開始部位(TSS)の周り

10

20

30

40

50

のアセチル化ヒストンH3 (AcH3)の増加を示した(図11D)。IL-21処理は、活性化TEMRA CD8<sup>+</sup> T細胞におけるCD28発現を最小限にアップレギュレートした(図11E)。同様に、MART1 (M27)特異的CD28negエフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞は、ナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞と比較して、CD28遺伝子座のAcH3レベルの有意な低下を示した(図11F)。これらの結果は、CD28転写がヒストンアセチル化によって調節されていることを示し、これは、ナイーブ及びエフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞におけるIL-21が媒介するCD28の分化誘導と関連している。従って、AcH3の調節は、エフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞におけるIL-21が媒介するCD28のアップレギュレーションを可能にし得る。

#### 【0148】

SAHAは、IL-21誘導pSTAT3がCD28プロモーターにアクセスして、エフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞におけるCD28発現をアップレギュレートすることを可能にする：上記の試験結果は、CD28転写がヒストンアセチル化によって調節されることを示し、これは、ヒストンアセチル化レベルの低下が、CD8<sup>+</sup> T細胞の分化及びナイーブ/セントラルメモリーマーカー発現の低下をもたらし得ることを示唆する。HDACiの使用によるヒストンアセチル化の増加はCD8<sup>+</sup> T細胞の分化を逆転させるとの仮説を立てた。IL-21は、ナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞における、より高いレベルのヒストンアセチル化を有する(図11D)CD28発現を有意に増強するため(図9)、HDACiとIL-21との組み合わせがCD28発現に対して相乗効果を有するであろうと推論された。仮説を検証するために、皮膚T細胞リンパ腫の処置が承認され、他の疾患の処置のための臨床試験で使用されている、臨床的に利用可能な化合物であり、広義のヒストンデアセチラーゼ阻害剤(HDACi)であるスベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA、ボリノスタット)の効果を評価した。有効量を決定するための用量調節試験は、1µM以上の濃度のSAHAがエフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞のAcH3レベルを増大させ得ることを示した(図16)。

#### 【0149】

より生理学的な抗原特異的(非特異的ポリクローナルとは対照的)刺激との関連でCD28発現に対するSAHA/IL-21の効果を評価するために、この効果を、ペプチドパルス自己樹状細胞を使用して生成したMART1 (M27)特異的エフェクター/エフェクターメモリー細胞で評価した。MART1 (M27)特異的エフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞(CD45RO<sup>+</sup>、CD28-neg、CD62L-neg)を、インビトロ刺激、M27特異的CTLの四量体誘導選別、及び均一な増殖(>95% MART-1-特異的エフェクターCTL)の反復サイクルの後に生成した。まず、CD28プロモーター領域へのpSTAT3の結合に対するSAHAの効果を評価した。SAHA処理は、CD28遺伝子のプロモーター及びTSS領域のAcH3レベルを有意に増加させた(図12A)。AcH3レベルの増加と関連して、SAHA処理は、CD28プロモーターへのIL-21誘導pSTAT3結合を増加させた(図12B)。次に、M27特異的エフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞を未処理のままか、又はSAHAで24時間前処理した後、SAHA/IL-21の存在下又は非存在下でM27パルス成熟樹状細胞で4日間活性化させた。興味深いことに、SAHAとIL-21は一緒になってCD28発現を有意に増強し(図12C及び図12D)、CD28発現に対するSAHA及びIL-21の協同的効果を示している。これらの結果は、SAHA処理がM27特異的エフェクターCD8<sup>+</sup> T細胞におけるAcH3レベル及びクロマチンのアクセス可能性を増加させることを示唆し、従って、IL-21活性化STAT3がそのプロモーター部位に結合してCD28発現を誘導することを可能にする。

#### 【0150】

IL-21とSAHAは相乗作用してCD28及びCD62L発現をアップレギュレートする：翻訳の設定におけるSAHA/IL-21の効果を評価するために、このプログラムを腫瘍浸潤リンパ球(TIL)で評価した。転移性黒色腫及び他のTIL+固形腫瘍の患者の処置のためのTIL細胞の養子移入は、浸潤リンパ球の腫瘍生検からの抽出、高用

10

20

30

40

50

量 I L - 2 によるインビトロ処理、高速増殖プロトコル ( R E P : R a p i d E x p a n s i o n P r o t o c o l ) によるインビトロ増殖、次の高用量のリンパ球枯渴コンディショニング後のエクスピボ増殖 T I L の注入を含む。T I L 療法は、転移性黒色腫患者の処置である程度の成功を収めているが、多くの患者は、1 つには注入された細胞の限定された持続性が原因で T I L 療法に应答しない。T I L 製品中の C D 8 <sup>+</sup> T 細胞は通常、高分化型エフェクター細胞、エフェクターメモリー細胞、及び増殖能が低下した末端エフェクター細胞である。H D A C 阻害剤 / I L - 2 1 の組み合わせの可能な脱分化効果を調べるために、T I L を未処理のままか、又は S A H A で 2 4 時間前処理した後、通常の R E P ( 照射された P B M C 及び L C L 細胞、抗 C D 3 及び I L - 2 ) 又は S A H A / I L - 2 1 を用いた R E P に供した。S A H A のみを R E P 培養物に加えると、劇的な細胞死が引き起こされ、血球計のカウントにより、R E P の終了時に生存細胞がほとんど存在しないことが示された。R E P のみ又は I L - 2 1 のみを用いた R E P と比較して、R E P 中に組み合わせて与えられた S A H A 及び I L - 2 1 は、C D 2 8 だけでなく C D 6 2 L 発現も増加させ ( 図 1 2 E 及び図 1 2 F ) 、2 つのマーカーが、ナイーブ及びセントラルメモリー T 細胞で高度に発現した。これらの結果は、M 2 7 エフェクター C D 8 <sup>+</sup> T 細胞の結果と同様に、S A H A 処理により、T I L の A c H 3 レベル及びクロマチンのアクセス可能性が高まり、従って、I L - 2 1 活性化 S T A T 3 がそのプロモーター部位に結合して、C D 2 8 の発現及びエフェクター C D 8 <sup>+</sup> T 細胞の脱分化の表現型の証拠を誘導できることを示唆した。

10

#### 【 0 1 5 1 】

20

I L - 2 1 及びパノピノスタット ( P a n o ) は協同してセントラルメモリー様 T 細胞を誘導する：S A H A の細胞毒性は、A C T におけるその適用を制限するため、他の薬理的に利用可能な H D A C i ( 図 1 7 A ) をスクリーニングし、パノピノスタット ( L B H 5 8 9 、 P a n o ) は、S A H A と同様の効果を有していたが、細胞毒性が最小限であったことが分かった。パノピノスタットは、0 . 5 n M 以上の用量で A c H 3 レベルを増加させた ( 図 1 7 B ) 。パノピノスタットの効果を、最初に R E P の T I L で小規模に調べ、前処理 ( P a n o 及び I L - 2 1 での急速な増殖の 2 4 時間前にパノピノスタットで細胞を前処理した ) を共処理 ( 細胞増殖を開始するときにパノピノスタット及び I L - 2 1 を追加 ) と比較した。これらの 2 つの戦略は、T I L の C D 2 8 <sup>+</sup> C D 6 2 L <sup>+</sup> 細胞集団の誘導に同等の効果があつたため ( 図 1 8 A 及び図 1 8 B ) 、単純化のためにその後の試験では同時処理スキームに従った。

30

#### 【 0 1 5 2 】

抗原特異的 A C T の設定におけるパノピノスタット ( P a n o ) の臨床的適用性を調べるために、以前に記載されたように、E T C アプローチを介して生成された M A R T 1 ( M 2 7 ) 特異的エフェクター / エフェクターメモリー細胞を使用し、R E P によってインビトロで増殖させた ( Y e e , 2 0 1 4 ) 。細胞は、4 つの異なるプロトコル ( 通常、I L - 2 1 のみの追加、P a n o のみの追加、又は I L - 2 1 + P a n o ) で増殖させた。パノピノスタットのみを R E P に添加すると、全体の収量がわずかに減少したが、増殖倍率は他の 3 つの条件でも同様であった ( 図 1 8 C ) 。パノピノスタットの添加は、I L - 2 1 の添加と組み合わせた場合にさらに増強された C D 2 8 <sup>+</sup> C D 6 2 L <sup>+</sup> 細胞集団を誘導した ( 図 1 3 A 及び図 1 3 B ) 。パノピノスタットは、S A H A と同様に、S T A T 3 及びその他の転写因子 / 補因子が結合部位にアクセスして、C D 2 8 及び C D 6 2 L の発現を誘導できるようにしたと位置づけた。

40

#### 【 0 1 5 3 】

I L - 2 1 / P a n o 誘導 C D 2 8 <sup>+</sup> C D 6 2 L <sup>+</sup> 集団に関連するセントラルメモリー機能を、I L - 7 及び I L - 1 5 に应答して恒常的増殖を受けるこれらのセントラルメモリー様 T 細胞の能力によって評価した。4 つの異なるプロトコル ( 通常、I L - 2 1 のみの追加、P a n o のみの追加、又は I L - 2 1 + P a n o ) で増殖させた E T C 細胞を、C F S E で標識し、I L - 2 、I L - 7 、又は I L - 1 5 と共に 2 日間培養した。I L - 7 は、おそらく低レベルの C D 1 2 7 発現が原因で細胞分裂を誘導しなかった。I L - 2 1

50

の存在下で増殖した細胞は、増強された I L - 2 及び I L - 1 5 誘導増殖を示した ( 図 1 4 A ) 。 パノピノスタットのみを R E P に添加すると、I L - 1 5 に応答して細胞増殖が増加したが、I L - 2 には応答しなかった。興味深いことに、I L - 2 1 とパノピノスタットの組み合わせで増殖させた細胞は、他のどのコホートよりも I L - 2 及び I L - 1 5 に対してより大きな増殖応答を示した ( 図 1 4 A ) 。 I L - 2 と I L - 1 5 は、C D 1 3 2 ( C ) 及び C D 1 2 2 受容体サブユニットを共有しているため、C D 1 3 2 及び C D 1 2 2 のレベルをこれらの細胞の表面で評価した。I L - 2 1 + / - パノピノスタットによる処理は、表面 C D 1 3 2 レベルを有意に増加させ ( 図 1 4 B 及び図 1 4 C ) 、これは、I L - 2 及び I L - 1 5 へのそれらの自己複製の増加に寄与し得る。

#### 【 0 1 5 4 】

H D A C i / I L - 2 1 で処理された C T L のセントラルメモリー様特性をさらに確認するために、関連分化遺伝子の発現を評価した。セントラルメモリー / 幹細胞メモリー C D 8 + T 細胞の分化に役割を果たすことが知られているセントラルメモリー関連転写シグネチャー ( L e f 1 <sup>hi</sup> , T c f 7 <sup>hi</sup> ) は、パノピノスタットと I L - 2 1 処理の組み合わせによって生成された C D 2 8 + C D 6 2 L + 細胞間で高度に発現することが分かった ( 図 1 4 D ) 。転写因子 T - b e t 及びエオメソデルミン ( e o m e s o d e r m i n ) ( E o m e s ) は、エフェクター及びメモリー T 細胞形成に重要な役割を担い、それらの発現は分化した C D 8 + T 細胞で増加する。興味深いことに、T b x 2 1 及び E o m e s の発現は、C D 2 8 + C D 6 2 L + 細胞と C D 2 8 - C D 6 2 L - 細胞との間で類似していた ( 図 1 4 D ) 。

#### 【 0 1 5 5 】

この試験では、I L - 2 1 と H D A C i の組み合わせを使用して、高い複製能力を有する低分化セントラルメモリー様 T 細胞になるようにエフェクター細胞をリプログラムできることが実証された。全体として、2 つの臨床的に関連する A C T モダリティへの I L - 2 1 + P a n o アプローチの潜在的な応用を実証した：E T C 及び T I L 。この試験は、臨床転帰の改善につながり得る、低分化 A C T 製品を生成するための翻訳可能なアプローチを実証した。

#### 【 0 1 5 6 】

##### 実施例 4 - 材料及び方法

腫瘍抗原特異的 C T L 株又は腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の増殖：C T L 株又は T I L を、抗 C D 3 及び照射された同種異系 P B M C 又はリンパ芽球様細胞株 ( L C L ) ( C T L 株の場合) を急速な増殖のためのフィーダー細胞として使用して増殖させた。T I L は、患者の黒色腫瘍から培養した。培養物には、5 0 U / m l ( C T L 株の場合) 又は 6 0 0 0 U / m l ( T I L の場合) の I L - 2 を 3 日ごとにフィードした。I L - 2 1 ( 3 0 n g / m l ) 又は H D A C i パノピノスタット ( 3 n M ) ( 対照として) 又は I L - 2 1 と H D A C i の組み合わせを、0 日目、4 日目、及び 7 日目にフィードした。1 4 日後、細胞をさらなる分析に使用した。S A H A を用いた試験では、S A H A は 1 ~ 5 μ M で使用した。

#### 【 0 1 5 7 】

C D 8 + T 細胞のポリクローナル刺激：ナイーブ C D 8 + T 細胞 ( C D 8 + C D 4 5 R A + C C R 7 + ) をフローサイトメトリーで選別するか、又は E a s y S e p ( 商標) ヒトナイーブ C D 8 + T 細胞濃縮キット ( S t e m C e l l ) を使用して単離した。一部の試験では、全 C D 8 + T 細胞を、E a s y S e p ( 商標) ヒト C D 8 + T 細胞濃縮キット ( S t e m C e l l ) を使用して陰性選択した。ナイーブ又は全 C D 8 + T 細胞の純度は、フローサイトメトリーで測定すると 9 5 % 超であった。C D 8 + T 細胞を、1 0 % ウシ胎児血清及びペニシリン / ストレプトマイシンを含む R P M I 1 6 4 0 で培養した。C D 8 + T 細胞を、T 細胞の増殖及び活性化用の D y n a b e a d s ( 登録商標) ヒト T 活性化因子 C D 3 / C D 2 8 ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) を使用して、1 : 1 のビーズ : 細胞比で、又は 3 0 n g / m l のヒト I L - 2 1 ( P e p r o t e c h ) と共に活性化した。示された時点で、T 細胞を回収し、下流分析の前に磁石を使用してビーズを除去

10

20

30

40

50

した。

【0158】

細胞培養及び急速増殖プロトコル (REP) : CTL株の培地は、RPMI 1640、10% FBS、4  $\mu$ M グルタミン、及び2 -メルカプトエタノールであった。TILは、RPMI 1640、10% ヒトAB血清、10mM HEPES、及び2 -メルカプトエタノールを含む50% AIM-V、50% TIL完全培地で培養した。REPでは、CTL株又はTILを、30 ng/mLの抗CD3 (OKT3) 及び200倍照射同種異系PBMC又はLCLをフィーダー細胞として使用して増殖させた。培養物には、50 U/mLのIL-2を3日ごとにフィードした。IL-21 (30 ng/mL) 又はHDACi SAHA (1~5  $\mu$ M) 又はパノピノスタット (1~3 nM) を、増殖に含んでいた場合は、0日目、4日目、及び7日目に追加した。14日後に、増殖した細胞をさらに分析した。

10

【0159】

フローサイトメトリー : 細胞を、CD8、CD28、CD62L、又はCD132に対する抗体で染色した。すべてのFACSデータを、LSR IIフローサイトメーターを介して取得し、FlowJoソフトウェア (Tree Star, Inc.) によって分析した。

【0160】

細胞内染色 : 細胞を、腫瘍細胞で16時間再刺激し、CD8に対する抗体で染色し、続いて固定し、透過化緩衝液中のIFN- $\gamma$  及びグランザイムBに対する抗体で染色した。細胞を洗浄し、分析前にFACS緩衝液に再懸濁した。

20

【0161】

定量的リアルタイムPCR : 全RNAを、Qiagen RNA精製キットを用いて調製した。Superscript 逆転写酵素及びオリゴ(dT)プライマー (Life Technology) を用いてcDNAを作製し、iQ SYBRグリーンリアルタイムPCRキット (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてBio-Rad iCycler Optical Systemで遺伝子発現を検出した。データを、参照遺伝子RPL13Aに対して正規化した。RPL13AプライマーはQiagenから購入した。使用した他のプライマー対は : CD28 フォワード : CTCACACTTCGGGTTCTCTCGG (配列番号2)、リバーズ : GACTCCACCAA CCA CCA CCA CAG (配列番号3) ; CD62L フォワード : ATGGAACGATGACGCCTGCC (配列番号4)、リバーズ : GGCCTCCAAAGGCTCACACT (配列番号5) であった ; 追加のプライマーには、リンパ球エンハンサー結合因子1 (LEF1) フォワード : CACACCCGTCACACATCCCA (配列番号6)、リバーズ : TGGGAAAACCAGCCAAGAGGTG (配列番号7) ; 転写因子1 (TCF1) フォワード : TGCAGCTATACCCAGGCTGG (配列番号8)、リバーズ : CCTCGACCGCCTCTTCTTC (配列番号9) が含まれていた。

30

【0162】

ヒトshRNAノックダウン : 全CD8<sup>+</sup> T細胞を単離し、製造者の指示 (Lonza) に従ってAmaxaヒトT細胞Nucleofectorキットを使用して、5  $\mu$ gの陰性対照、STAT1 shRNA、又はSTAT3 shRNA (Dharmacon) でトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、1~2日間静置し、さらなる分析の前に前述のように生きたGFP<sup>+</sup>細胞を免疫プロット分析のために選別精製するか、又は7日間刺激した。

40

【0163】

ウェスタンプロット分析 : 同数の細胞を、2 x SDSローディング緩衝液に溶解し、異なる抗体を用いた免疫プロット分析のためにロードした (Cell Signaling)。抗 - アクチン - HRPは、Santa Cruz Biotechから入手した。- アクチンは、すべての免疫プロット実験でローディング対照として使用した。結果を、

50

Image Jを使用して定量し、対応する試料中のアクチンの密度に対して正規化した。

【0164】

クロマチン免疫沈降 (ChIP) : ChIPを、製造者の指示 (Millipore) に従ってChIPアッセイキットを用いて行った。定量的リアルタイムPCRをプライマー : CD28プロモーター近位STAT部位 : フォワード TCTGCTGGATTTC AAGCACCC (配列番号10)、リバーズ GACTGCAGCATTTTCACAC AGG (配列番号11) ; 遠位STAT部位 : フォワード TGCTTGCACGTAG AATGGGT (配列番号12)、リバーズ GGATGGGGACAGGTTGTGT C (配列番号13) を用いて行った ; ウサギIgGを陰性対照として使用した。

【0165】

クロム放出アッセイ (CRA) : 腫瘍細胞を、20 : 1のエフェクター : 腫瘍で抗原特異的CTLと共に4時間インキュベートする前に、Cr51で標識した。上清中のCr51の量を測定し、死滅効率を死滅 (%) = 100% × (試料平均 - 陰性対照の平均) / (陽性対照の平均 - 陰性対照の平均) として計算した。

【0166】

Mini-REPは、T25フラスコから24ウェルプレートへのスケールダウンを適宜開始した。IL-21及びパノピノスタットの用量は変更しなかった。

【0167】

統計分析 : データのグラフ表示及び統計分析を、GraphPad Prism (Version 6, GraphPad software, San Diego, CA) 及びExcelを用いて行った。データは、平均及びSTDとして示される。実験群間の結果を、学生t検定を用いて比較した。p < 0.05は統計的に有意であると見なした。統計的有意性は、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001として示される。

【0168】

本明細書で開示及び請求されるすべての方法は、本開示に照らして過度の実験なしに構築し、実行することができる。本発明の組成物及び方法は、好ましい実施形態に関して説明してきたが、当業者には、本発明の概念、精神、及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法及び方法のステップ又は一連のステップを様々に変更できることは明らかであろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連する特定の薬剤が、本明細書に記載の薬剤の代わりになり得、同じ又は同様の結果を達成することになることは明らかであろう。当業者に明らかなそのようなすべての類似の代替物及び変更は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲、及び概念に含まれると見なされる。

参考文献

以下の参考文献は、これらが本明細書に記載されたものを補足する例示的な手順又は他の詳細を提供する範囲で、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

Klebanoff et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102 (27) : 9571 - 6, 2005.

Li et al., J. Immunol. 175, 2261 - 2269, 2005.

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22<sup>nd</sup> Edition, Pharmaceutical Press. 2013.

Seto and Yoshida, Cold Spring Harb Perspect Biol. 6 (4) : a018713, 2014.

米国特許第6,307,024号明細書

米国特許第6,686,178号明細書

Yee, Immunol. Rev. 257, 250 - 263, 2014.

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

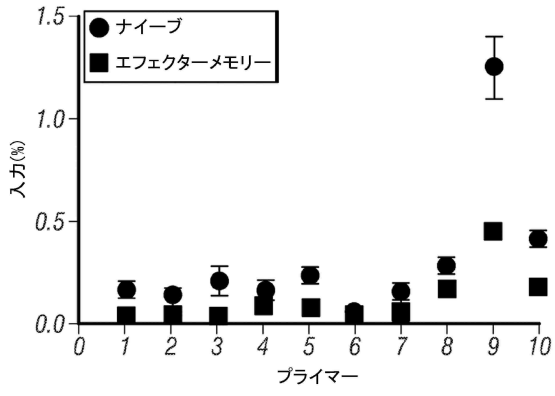


図1A

【図 1 B】

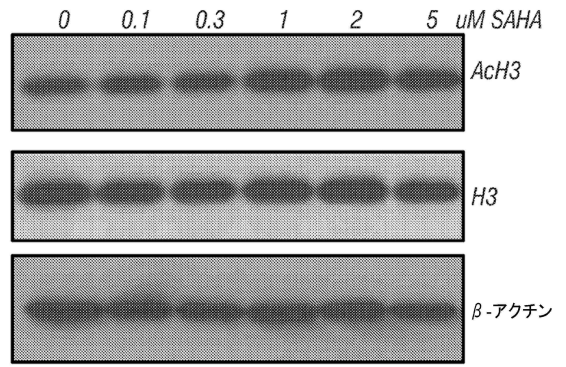


図1B

【図 1 C】

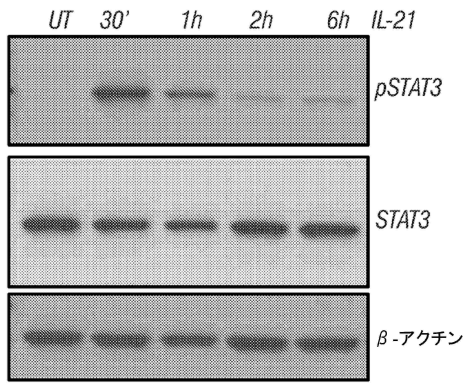


図1C

【図 2 A】

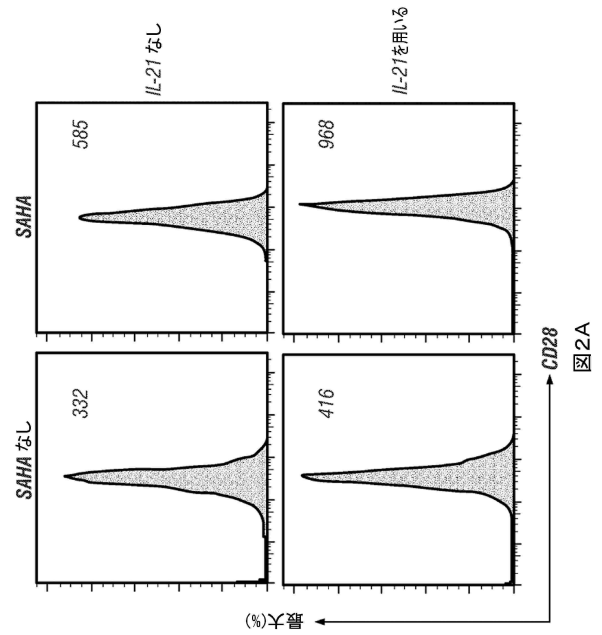


図2A

10

20

30

40

50

【 図 2 B 】

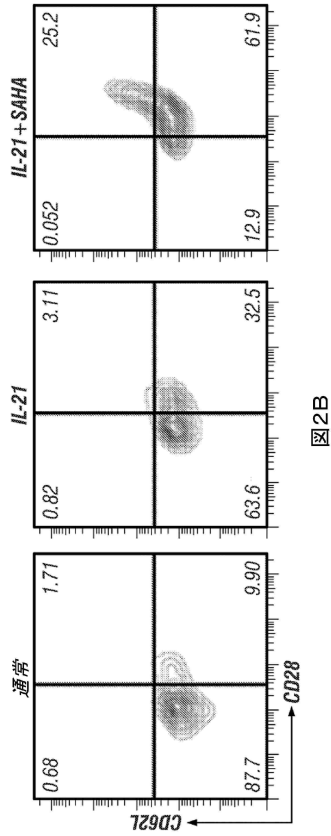


図2B

【 図 2 C 】

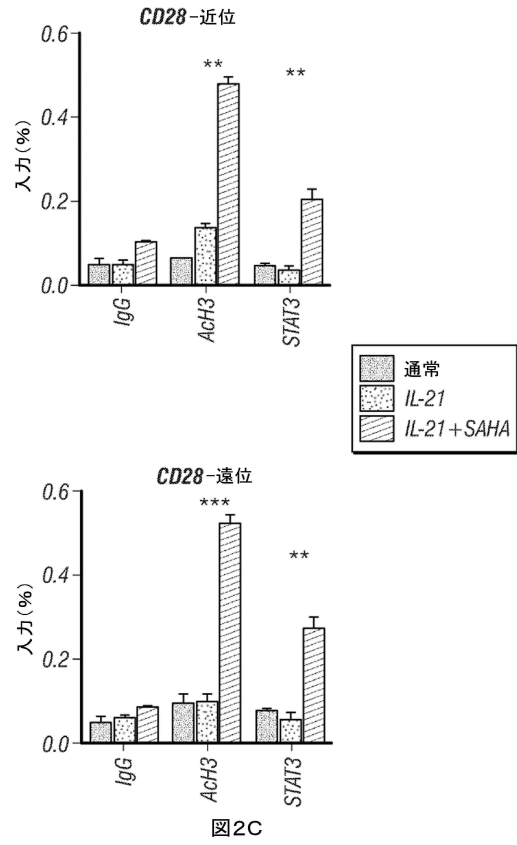


図2C

【 図 3 A 】

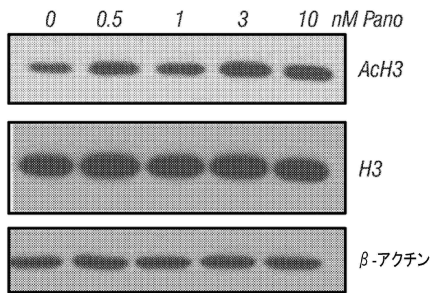


図3A

【 図 3 B 】

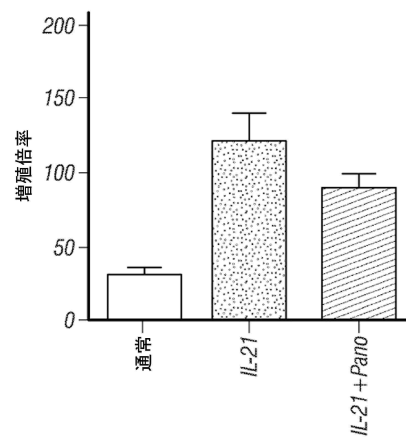


図3B

10

20

30

40

50

【 図 3 C 】

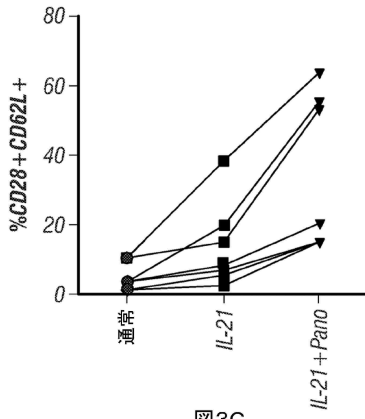


図3C

【 図 3 D 】

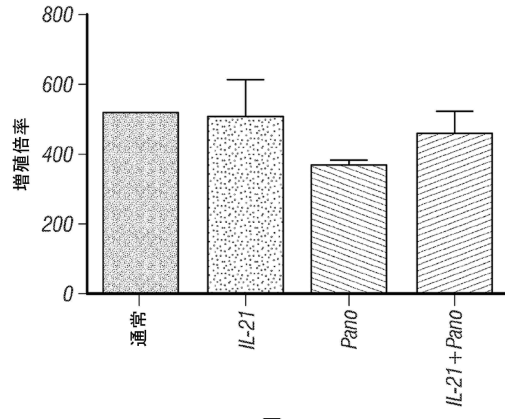


図3D

10

【 図 4 A - 1 】

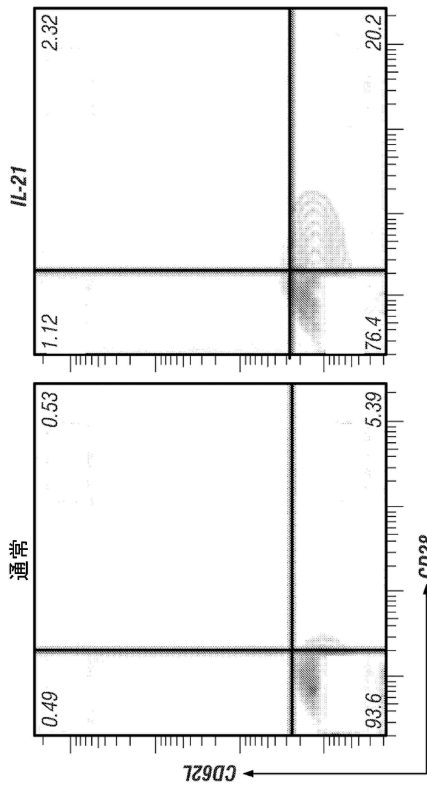


図4A

【 図 4 A - 2 】

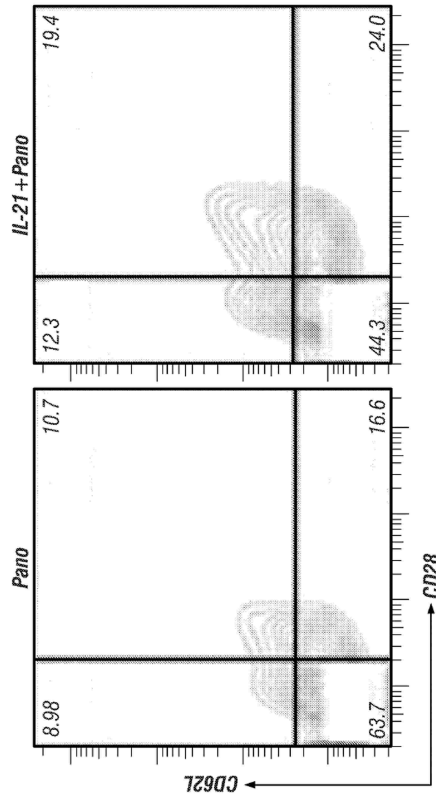


図4A (続き)

20

30

40

50

【 図 4 B 】

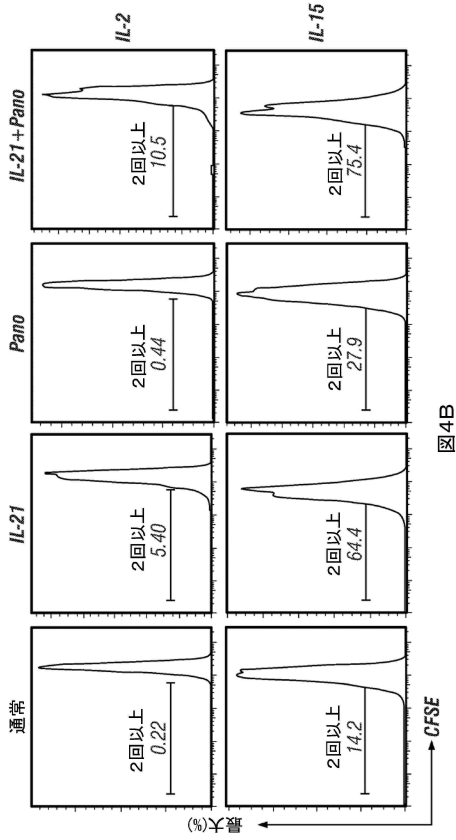


図4B

【 図 4 C 】

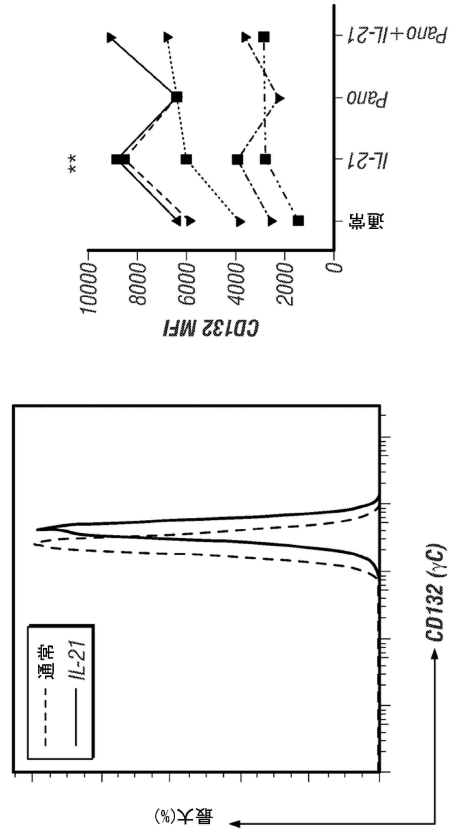


図4C

【 図 5 A - 1 】

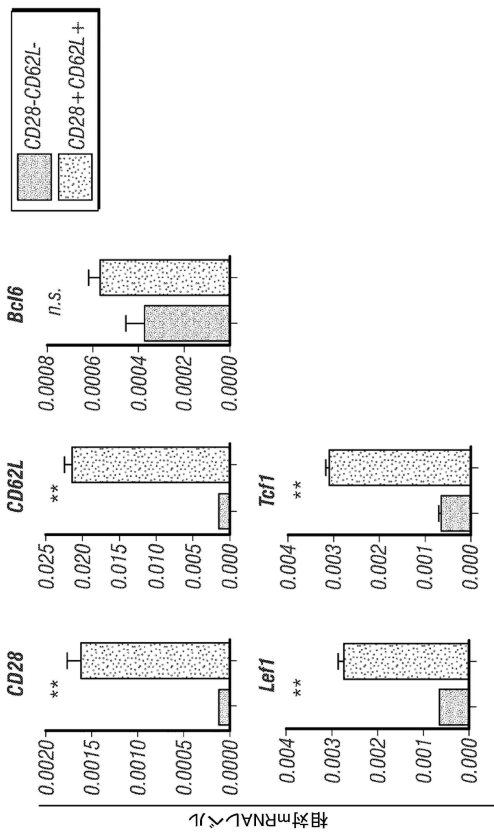


図5A

【 図 5 A - 2 】

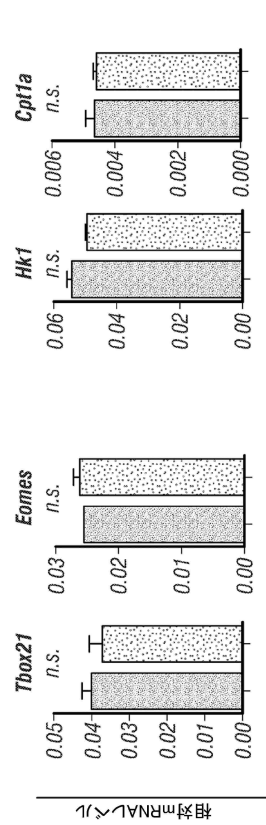


図5A (続き)

10

20

30

40

50

【 図 5 B 】

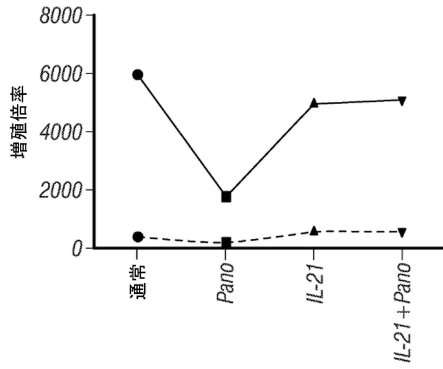


図5B

【 図 6 A 】

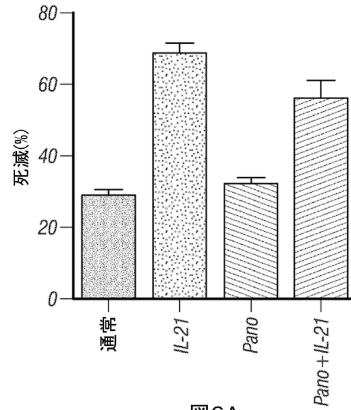


図6A

【 図 6 B 】

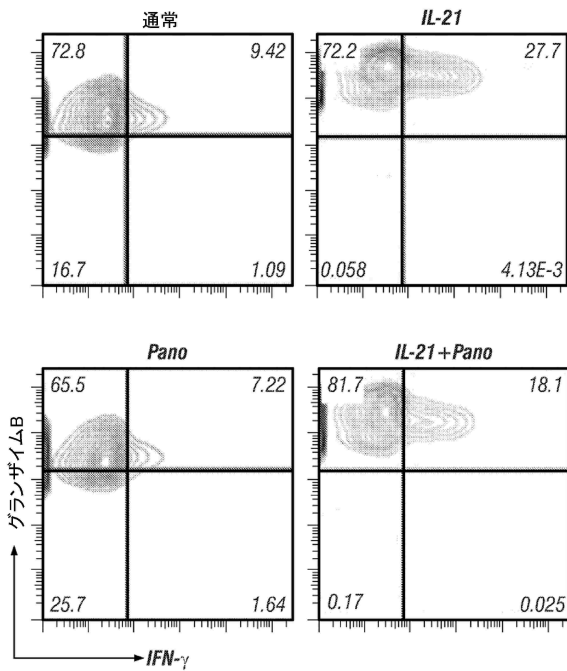


図6B

【 図 7 - 1 】

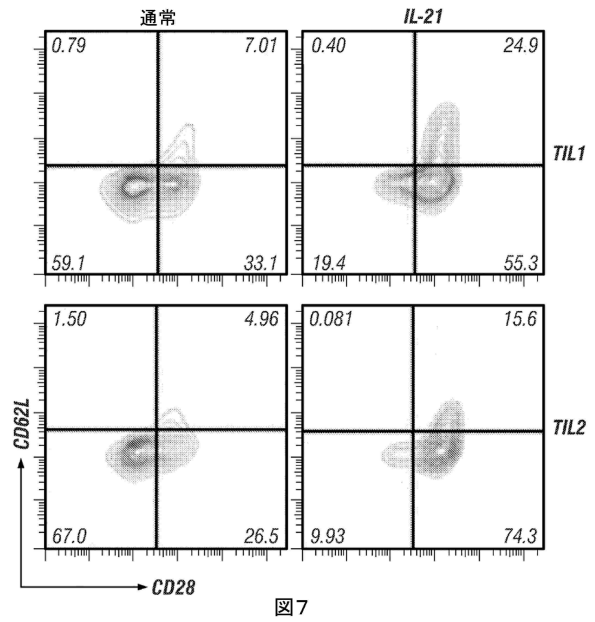


図7

10

20

30

40

50

【 図 7 - 2 】

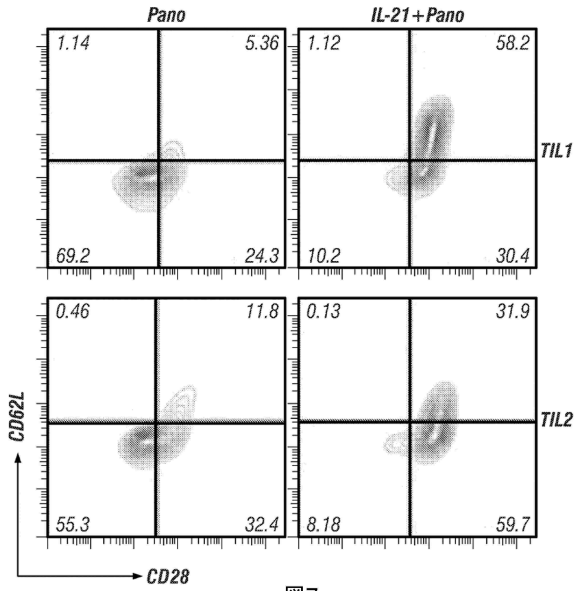


図7 (続き)

【 図 8 】

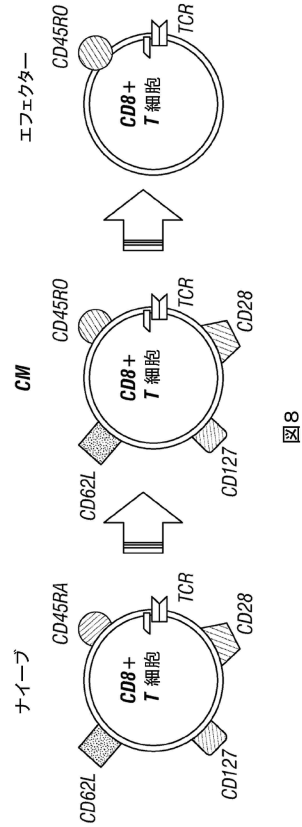


図8

10

20

【 図 9 A 】

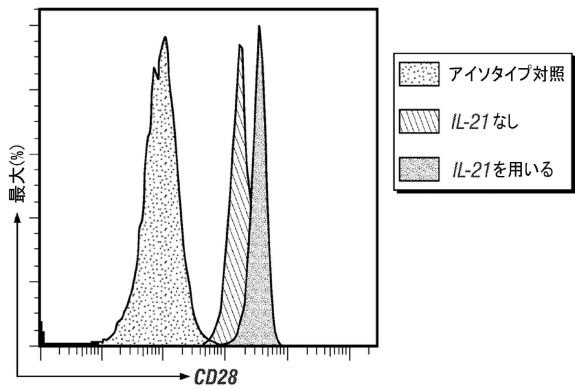


図9A

【 図 9 B 】

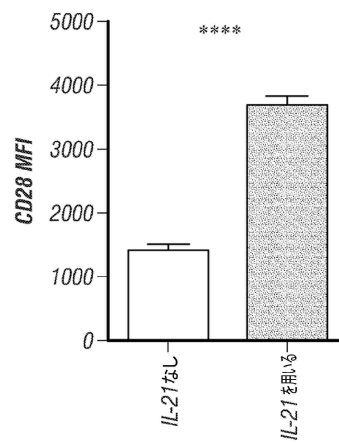


図9B

30

40

50

【 図 9 C 】

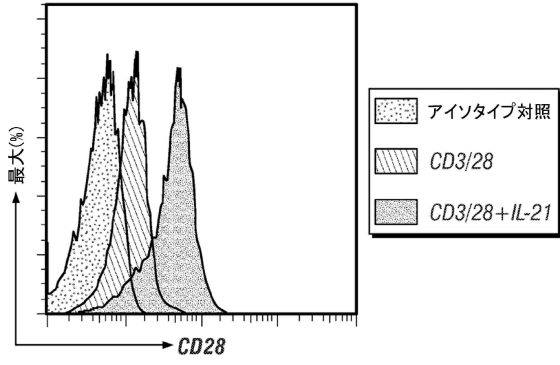


図9C

【 図 9 D 】

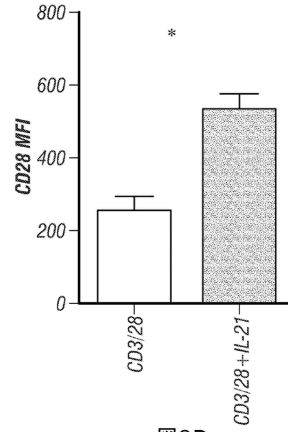


図9D

10

【 図 9 E 】

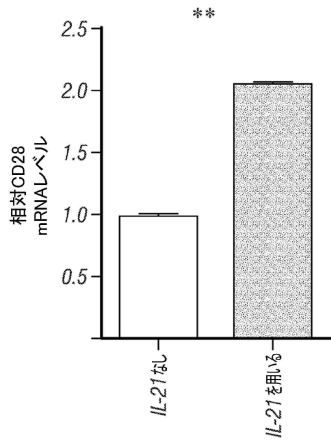


図9E

【 図 9 F 】

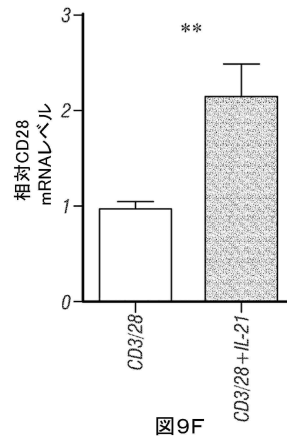


図9F

20

30

40

50

【図10A】

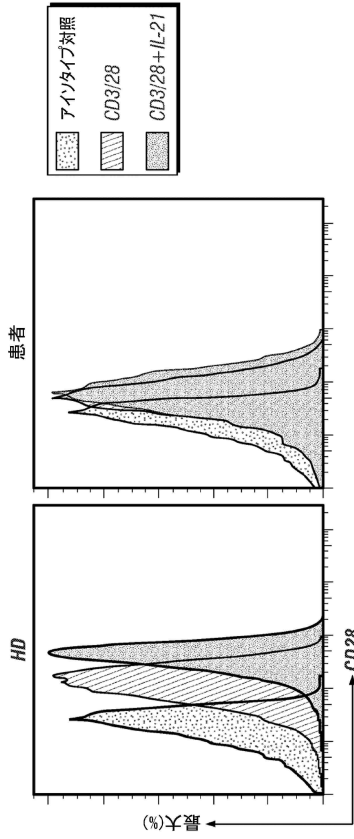


図10A

【図10B】

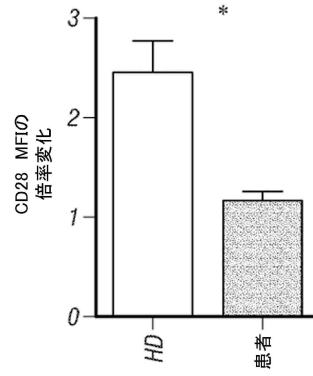


図10B

【図10C】

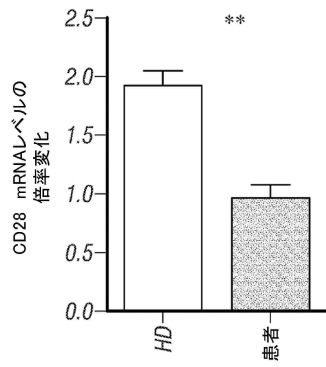


図10C

【図10D】

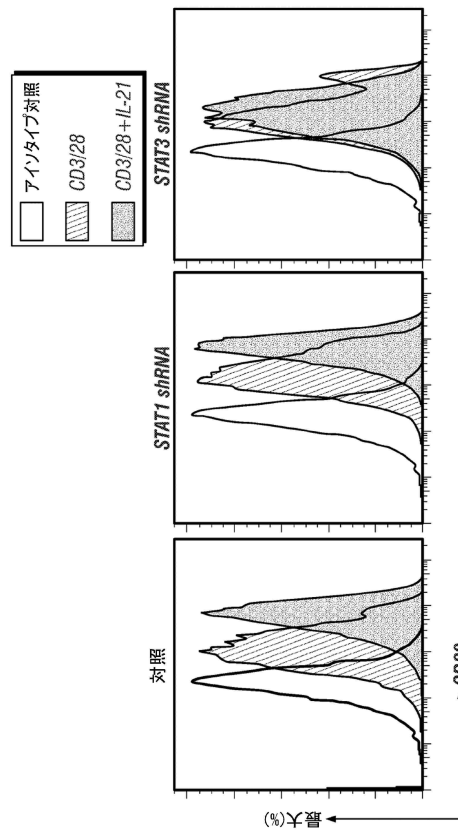


図10D

10

20

30

40

50

【図10E】

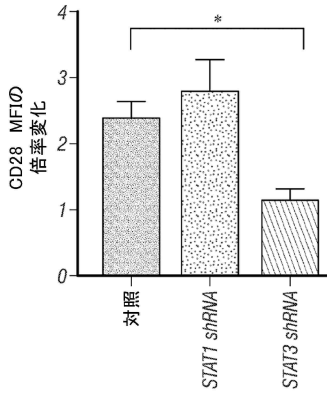


図10E

【図10F】

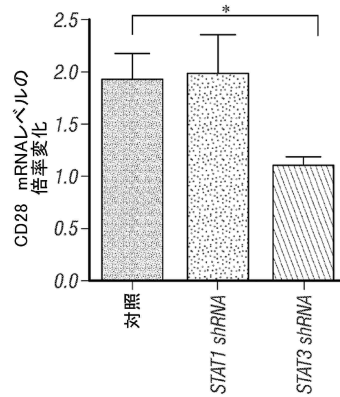


図10F

10

【図10G】

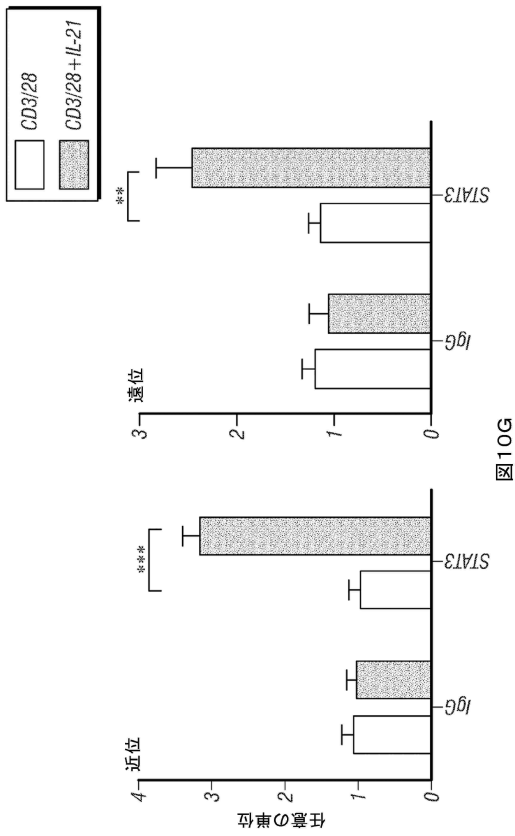


図10G

【図11A】

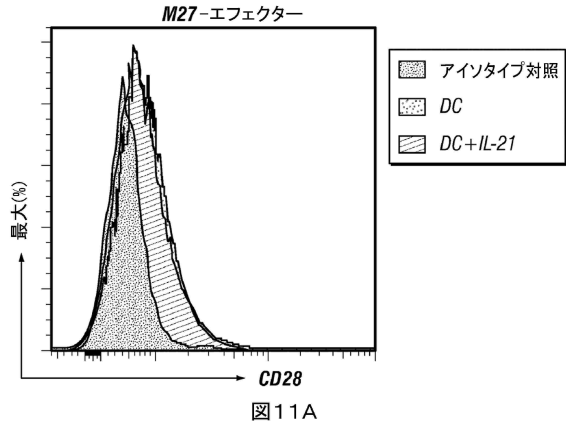


図11A

20

30

40

50

【図11B】

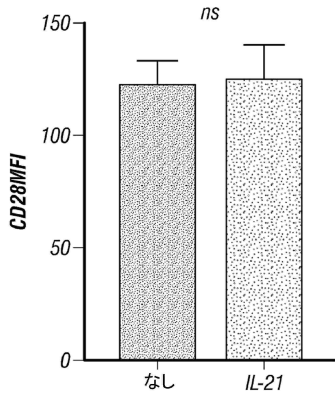


図11B

【図11C】

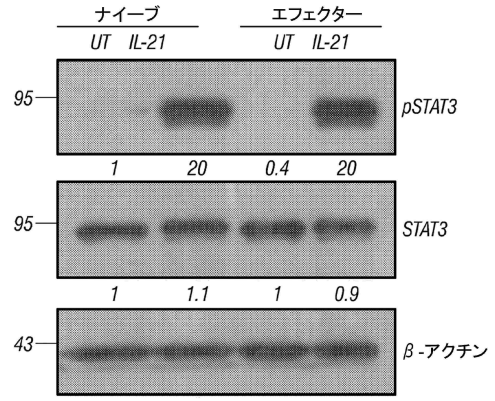


図11C

【図11D】

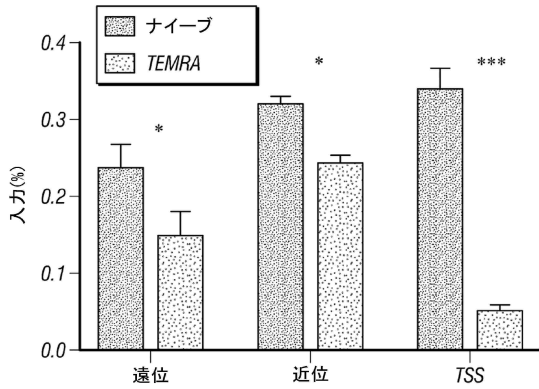


図11D

【図11E】

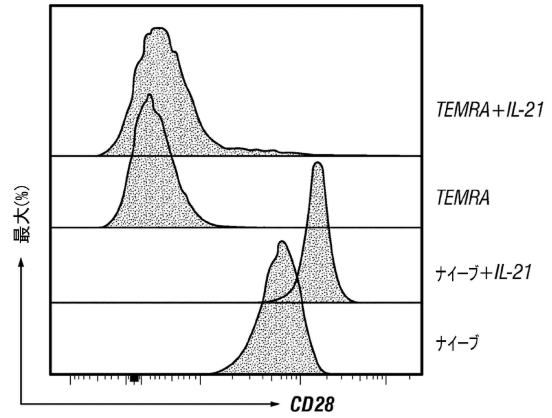


図11E

10

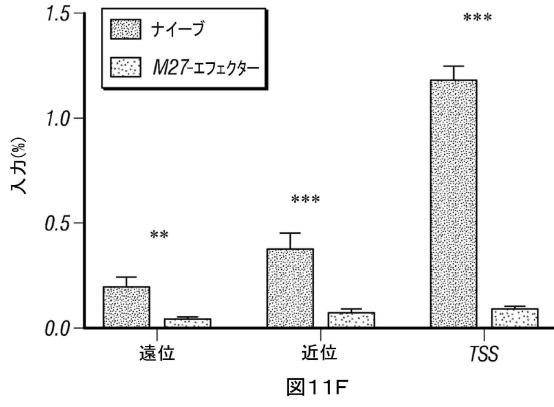
20

30

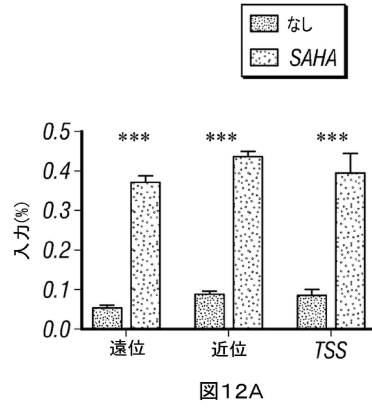
40

50

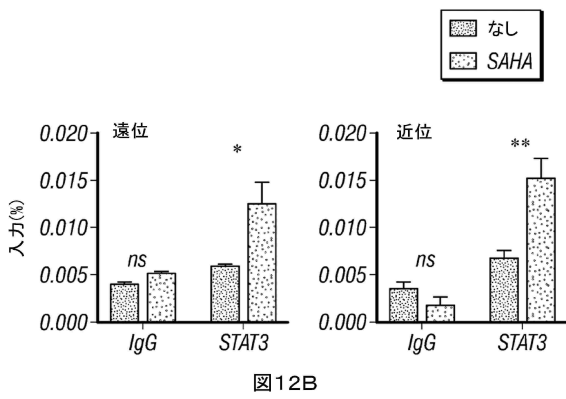
【図11F】



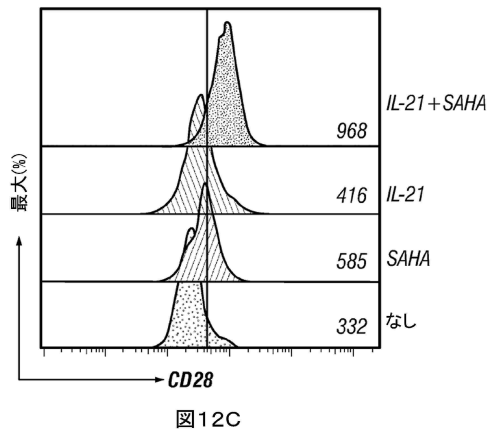
【図12A】



【図12B】



【図12C】



10

20

30

40

50

【 図 1 2 D 】

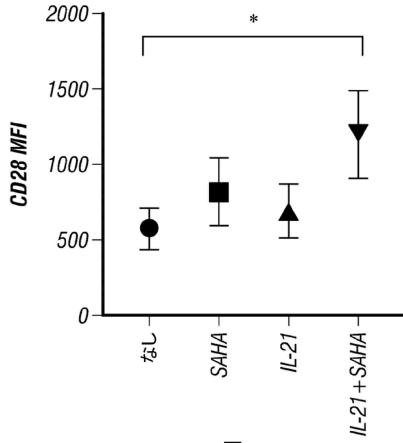


図 12D

【 図 1 2 E - 1 】

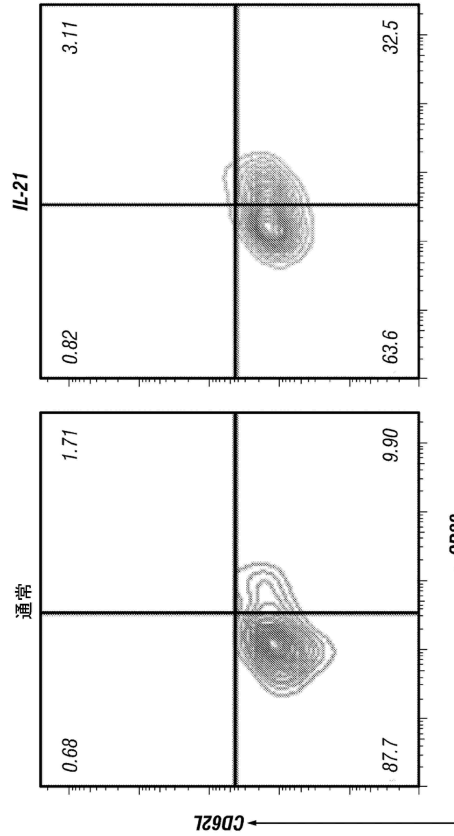


図 12E

【 図 1 2 E - 2 】

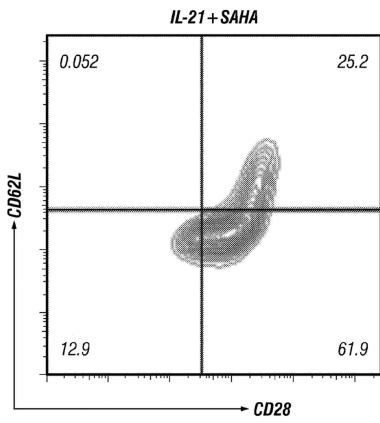


図 12E (続き)

【 図 1 2 F 】

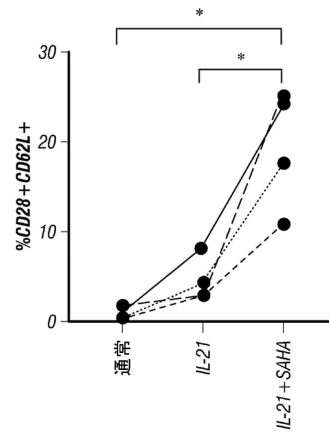


図 12F

10

20

30

40

50

【 図 1 3 A 】

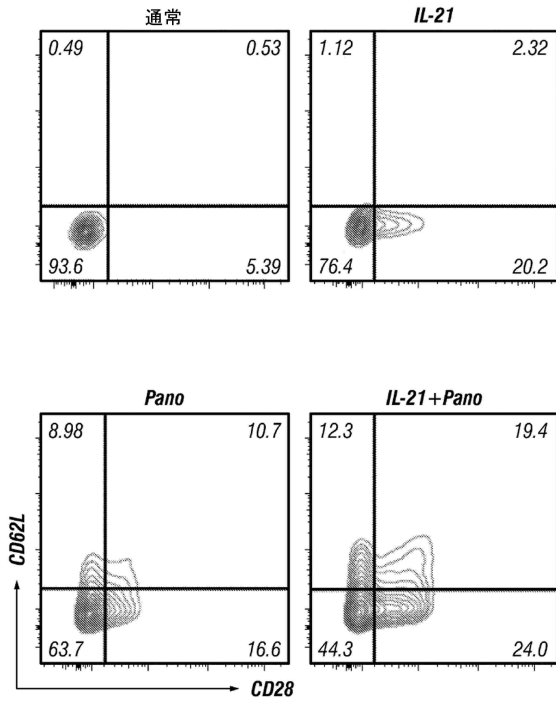


図13A

【 図 1 3 B 】

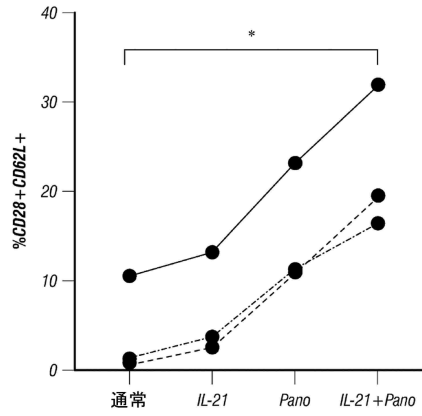


図13B

10

20

【 図 1 4 A 】

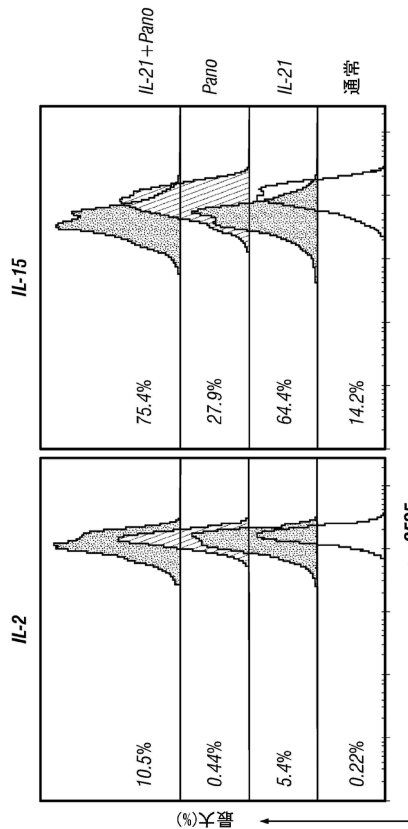


図14A

【 図 1 4 B 】

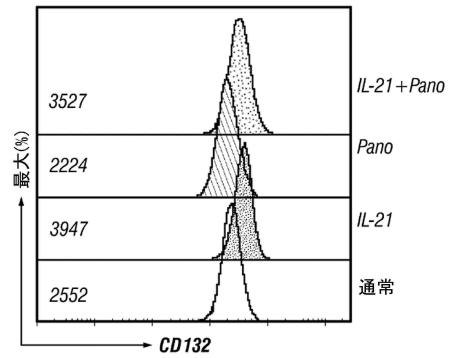


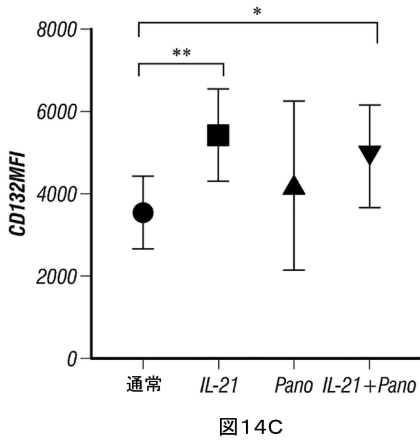
図14B

30

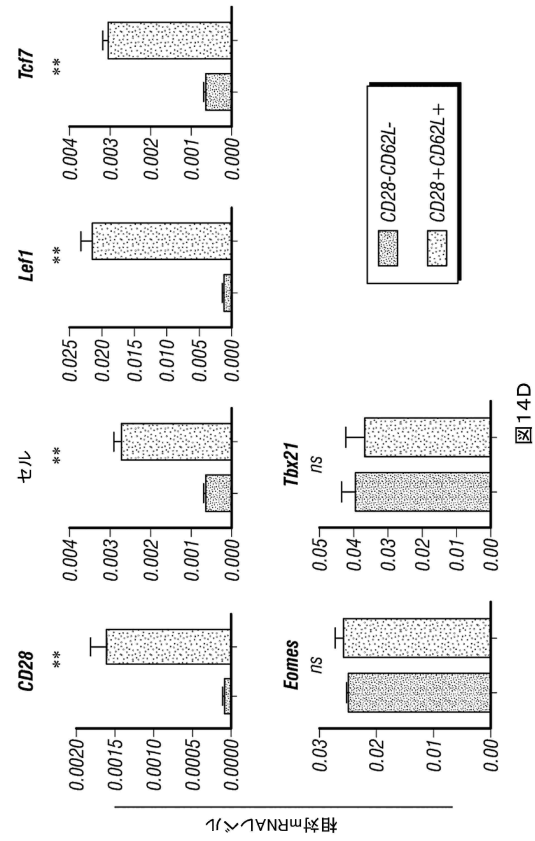
40

50

【 図 1 4 C 】



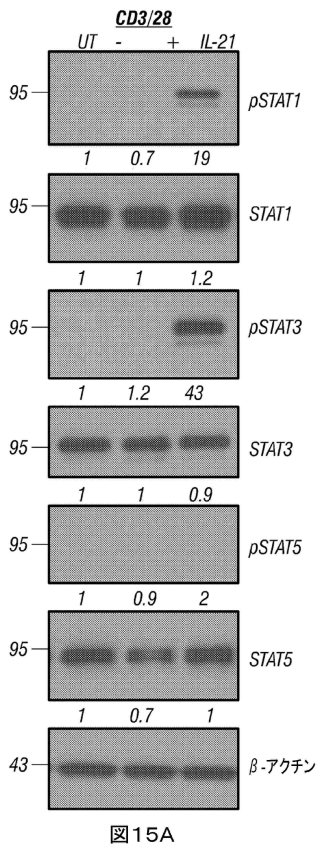
【 図 1 4 D 】



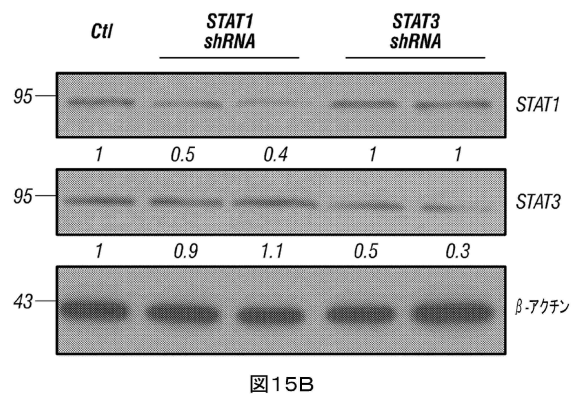
10

20

【 図 1 5 A 】



【 図 1 5 B 】



30

40

50

【 図 16 】

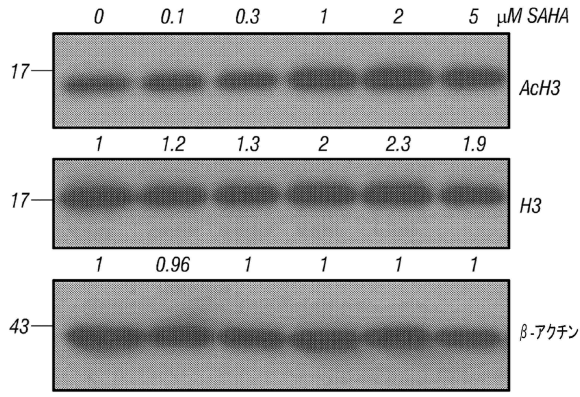


図16

【 図 17 A - 1 】

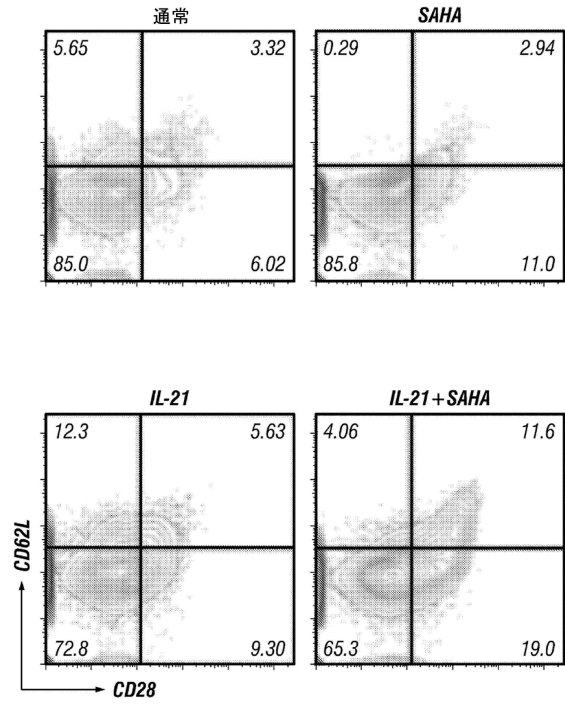


図17A

【 図 17 A - 2 】

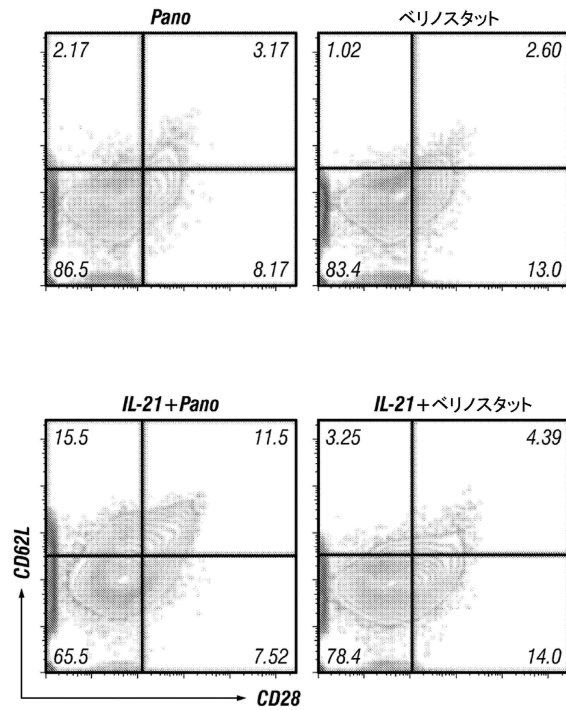


図17A (続き)

【 図 17 B 】

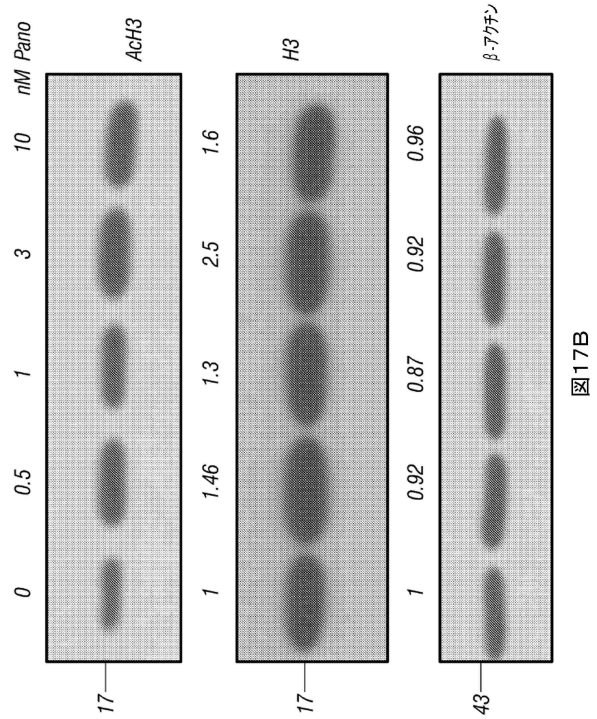


図17B

10

20

30

40

50

【图 18 A】

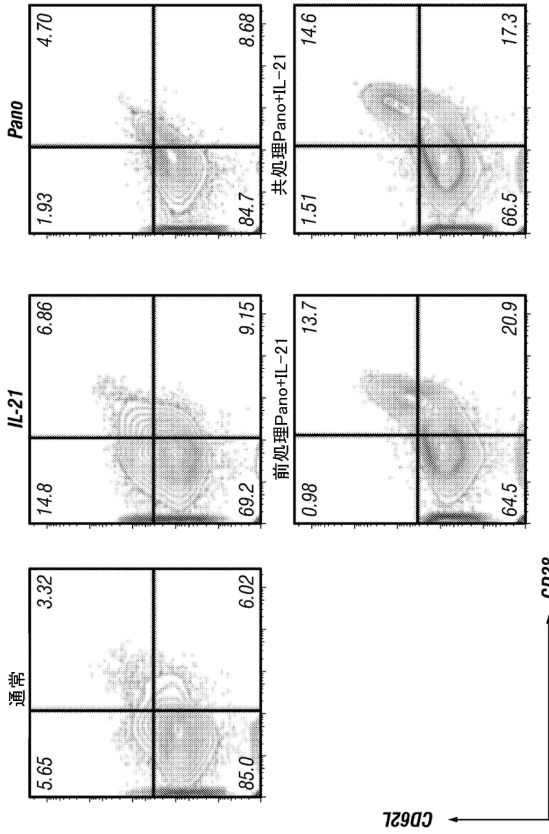


图18A

【图 18 B】

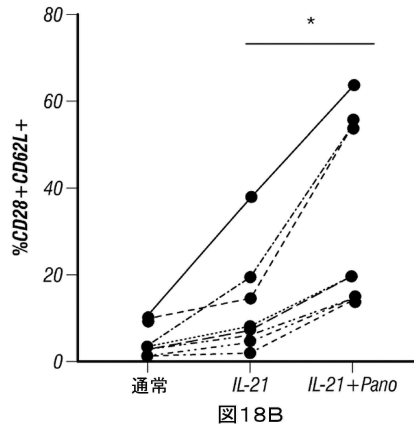


图18B

【图 18 C】

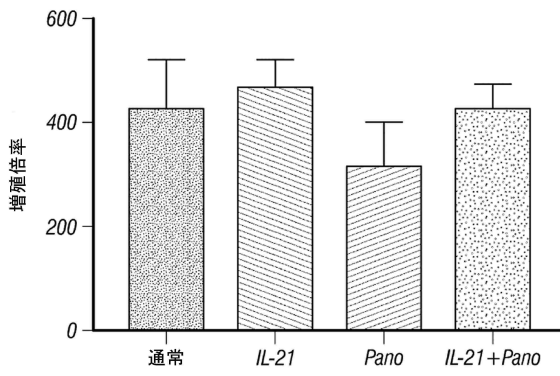


图18C

【图 19】

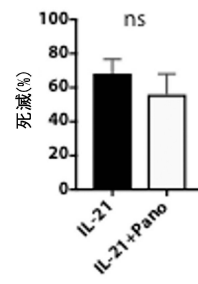


图19

【配列表】

0007447011000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

アメリカ合衆国 テキサス州 77030 ヒューストン ホルコム ブールヴァード 1515 ユニ  
ヴァーシティ オブ テキサス エムディー アンダーソン キャンサー センター

審査官 西澤 龍彦

## (56)参考文献

国際公開第2017/219150 (WO, A1)

HO, LP et al. , The Road to Memory: An Early Rest for the Long Journey , The Journal of I  
mmunology , 2013年 , Vol. 191, No. 11 , pp. 5603-5614

LOSCHINSKI, R et al. , IL-21 modulates memory and exhaustion phenotype of T-cells in a fa  
tty acid oxidation-dependent manner , Oncotarget , 2018年02月 , Vol. 9, No. 17 , pp. 131  
25-13138

BAE, J et al. , Histone deacetylase (HDAC) inhibitor ACY241 enhances anti-tumor activities  
of antigen-specific central memory cytotoxic T lymphocytes against multiple myeloma and  
solid tumors , Leukemia , 2018年02月 , Vol. 32 , pp. 1932-1947

SODRE, AL et al. , Abstract 638: Epigenetic reprogramming of immune cells through selective  
inhibition of HDAC6 reduces suppressive phenotypes and augments anti-tumor properties  
of T-cells , Cancer Res , 2017年 , Vol. 77, 13\_Supplement , 638

McCAY, TR et al. , Modulation of antitumor immunity with histone deacetylase inhibitors  
, Immunotherapy , 2017年 , Vol. 9, No. 16 , pp. 1359-1372

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N

A 6 1 K

A 6 1 P

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 )