

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7098615号
(P7098615)

(45)発行日 令和4年7月11日(2022.7.11)

(24)登録日 令和4年7月1日(2022.7.1)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/078(2010.01)	C 1 2 N	5/078
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 N	9/99 (2006.01)	C 1 2 N	9/99
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85
			Z
請求項の数 30 (全63頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2019-529896(P2019-529896)	(73)特許権者	312000284 フェイト セラピューティクス, 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 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジェネラル アトミクス コート 3 5 3 5, スイート 2 0 0
(86)(22)出願日	平成29年12月4日(2017.12.4)	(74)代理人	110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
(65)公表番号	特表2020-513243(P2020-513243 A)	(72)発明者	ローゼン, ジョナサン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジェネラル アトミクス コート 3 5 3 5, スイート 2 0 0
(43)公表日	令和2年5月14日(2020.5.14)	(72)発明者	レズナー, ベッツィ, デニス 最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/US2017/064507		
(87)国際公開番号	WO2018/106595		
(87)国際公開日	平成30年6月14日(2018.6.14)		
審査請求日	令和2年7月6日(2020.7.6)		
(31)優先権主張番号	62/430,263		
(32)優先日	平成28年12月5日(2016.12.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 養子免疫療法における免疫細胞調節のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫細胞の集団又は亜集団、及びBCR-ABLチロシンキナーゼ阻害剤を含む1つ以上の調節剤を含み、前記免疫細胞の集団又は亜集団は、

(a) 養子細胞療法に用いられるものであり、

(b) T細胞受容体(TCR)及び/又はキメラ抗原受容体(CAR)をコードする外因性核酸を含み、

(c) CD62L、CCR7及びCD27の発現が、未調節のCD8[±]T細胞と比較して増大しているCD8[±]T細胞集団を含む、

養子細胞療法用組成物。

【請求項 2】

前記1つ以上の調節剤が、

(a) 養子細胞療法のための免疫細胞の治療可能性を改善し、

(b) 免疫細胞の細胞拡大、維持、及び/又は分化特性を改善し、

(c) 免疫細胞の細胞増殖、細胞毒性、持続性、サイトカイン応答及び分泌、及び/又は細胞想起応答を改善し、及び/又は

(d) 所望の免疫細胞亜集団の数又は比率を増加させる、

請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

数又は比が増加した免疫細胞の所望の亜集団が、以下

(a) ナイーブT細胞、幹細胞メモリーT細胞、及び/又は中央メモリーT細胞、
 (b) I型NKT細胞、又は
 (c) 適応NK細胞、
 を含む、請求項2記載の組成物。

【請求項4】

免疫細胞の集団又は亜集団が、T細胞、NKT細胞、及び/又はNK細胞を含む、請求項1記載の組成物。

【請求項5】

免疫細胞の集団又は亜集団が、末梢血、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、又は腫瘍から単離又は含まれる、請求項1記載の組成物。

10

【請求項6】

免疫細胞の集団又は亜集団が

(a) 健康な被験者、又は
 (b) 自己免疫疾患、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染又は固形腫瘍を有する対象、
 から単離される、請求項1記載の組成物。

【請求項7】

免疫細胞の集団又は亜集団が、

(a) ゲノム操作され、挿入、欠失、又は核酸置換を含む、
 (b) 幹細胞、造血幹細胞又は前駆細胞、又は前駆細胞から分化している、及び/又は
 (c) 非造血系の非多能性細胞から分化転換している、
 請求項1記載の組成物。

20

【請求項8】

幹細胞が人工多能性幹細胞(iPSC)又は胚性幹細胞(ESC)を含む、請求項7記載の組成物。

【請求項9】

前駆細胞が、多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK前駆細胞、又はNK前駆細胞である、請求項7に記載の組成物。

【請求項10】

幹細胞、造血幹細胞又は前駆細胞、又は前駆細胞が、ゲノム操作され、挿入、欠失、又は核酸置換を含む、請求項7に記載の組成物。

30

【請求項11】

ペプチド、抗体、抗体断片、サイトカイン、マイトジェン、成長因子、低分子RNA、dsRNA、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分又は置換因子、及び1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクターからなる群から選択される1つ以上の添加物を更に含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項12】

Bcr-Abl阻害剤が、DCC-2036(レバチニブ)、イマチニブ(STI571)、ニロチニブ(AMN107)、ダサチニブ(BMS-345825)、ボスチニブ(SKI-606)、ポナチニブ(AP-24534)、パフェチニブ(INNO-406)、PD173955、及びその類似体又は誘導体を含む、請求項1に記載の組成物。

40

【請求項13】

Bcr-Abl阻害剤がDCC-2036を含む、請求項12記載の組成物。

【請求項14】

BCR-ABLチロシンキナーゼ阻害剤を含む1つ以上の調節剤を含む組成物で調節された免疫細胞の単離された集団を含む養子細胞療法用組成物であって、前記調節された細胞集団は、(a)調節されていない集団と比較して養子細胞療法のための改善された治療可能性を有する免疫細胞を含み、

(b) 養子細胞療法に用いられるものであり、

(c) T細胞受容体(TCR)及び/又はキメラ抗原受容体(CAR)をコードする外因性核酸

50

を含み、

(d) CD62L、CCR7及びCD27の発現が、未調節のCD8⁺T細胞と比較して増大しているCD8⁺T細胞集団を含む、

養子細胞療法用組成物。

【請求項 15】

調節された集団が以下

(a) 免疫細胞の改善された細胞拡大、維持、分化、及び/又は脱分化特性、

(b) 細胞増殖、細胞毒性、持続性、サイトカイン応答、サイトカイン放出、及び/又は免疫細胞の想起の改善、又は

(c) 1つ以上の調節剤による調節のない集団と比較して、免疫細胞の1つ以上の望ましい亜集団の数又は比率の増加、

を有する免疫細胞を含む、請求項14記載の組成物。

【請求項 16】

増加した数又は比を有する免疫細胞の1つ以上の所望の亜集団が以下

(a) ナイーブT細胞、幹細胞メモリーT細胞、及び/又は中央メモリーT細胞；

(b) I型NKT細胞；又は

(c) 適応NK細胞。

を含む、請求項15に記載の組成物。

【請求項 17】

免疫細胞の単離された集団が、末梢血、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、又は脾臓組織又は腫瘍から単離される、請求項14記載の組成物。

【請求項 18】

免疫細胞の単離された集団が

(a) 健康な被験者、又は

(b) 自己免疫疾患、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染又は固形腫瘍を有する対象から得られる、請求項14記載の組成物。

【請求項 19】

免疫細胞の単離された集団が、

(a) ゲノム操作され、挿入、欠失、及び/又は核酸置換を含む、

(b) 生体内で幹細胞、造血幹細胞又は前駆細胞、又は前駆細胞から分化している、又は

(c) 非造血系の非多能性細胞から生体内で分化転換している、

請求項14記載の組成物。

【請求項 20】

幹細胞が人工多能性幹細胞 (iPSC) 又は胚性幹細胞 (ESC) を含む、請求項19記載の組成物。

【請求項 21】

前駆細胞が多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK前駆細胞、又はNKT前駆細胞である、請求項19記載の組成物。

【請求項 22】

前記幹細胞、造血幹細胞若しくは前駆細胞、又は前駆細胞が、

(a) ゲノム操作され、挿入、削除、及び/若しくは核酸置換を含む、又は

(b) CD16を過剰発現する、

請求項19記載の組成物。

【請求項 23】

前記Bcr-Abl阻害剤が、DCC-2036 (レバステニブ)、イマチニブ (STI571)、ニロチニブ (AMN107)、ダサチニブ (BMS-345825)、ボスチニブ (SKI-606) の少なくとも1つを含む、ポナチニブ (AP-24534)、パフェチニブ (INNO-406)、PD173955、及びその類似体又は誘導体を含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

前記組成物がDCC-2036を含む、請求項23に記載の組成物。

【請求項25】

免疫細胞の単離された集団が、DCC-2036、又はその類似体もしくは誘導体を含む組成物で調節されていないT細胞と比較して、以下

(a) PD-1及びTim-3の少なくとも1つの遺伝子発現の減少、

(b) 増加した中央記憶T細胞亜集団、

(c) エフェクターT細胞亜集団の減少、

(d) 拡張と実行可能性の改善、及び

(e) 腫瘍のクリアランスと持続性の改善された能力、

の少なくとも1つを有するT細胞を含む、請求項24記載の組成物。

10

【請求項26】

請求項14～25のいずれか1項に記載の組成物を得る方法であって、調節されていない細胞と比較して、免疫細胞の集団を十分な時間、BCR-ABLチロシンキナーゼ阻害剤を含む少なくとも1つの薬剤を含む十分な量の組成物と生体外で接触させて、養子細胞療法のために改善された治療可能性を有する調節された免疫細胞の集団又は亜集団を得ることによって、免疫細胞の集団を調節することを含む方法。

【請求項27】

生体外で1つ以上の調節剤と接触した免疫細胞の前記1つ以上の所望の亜集団を単離することをさらに含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

免疫細胞と接触するための組成物が、DCC-2036（レバチニブ）、イマチニブ（STI571）、ニロチニブ（AMN107）、ダサチニブ（BMS-345825）、ボスチニブ（SKI-606）、ポナチニブ（AP-24534）、パフェチニブ（INNO-406）、PD173955、及びその類似体又は誘導体の少なくとも1つを含む、請求項26記載の方法。

20

【請求項29】

前記免疫細胞と接触するための組成物がDCC-2036を含む、請求項30記載の方法。

【請求項30】

対象は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、癌、又はHIV、RSV、EBV、CMV、アデノウイルス、又はBKポリオーマウイルスに関連する感染症を有する、細胞療法が自己又は同種異系である養子細胞療法で使用するための、請求項14～29のいずれか一項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2016年12月5日に出願された米国仮特許出願シリアル番号62/430,263号の優先権を主張し、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、養子免疫細胞療法の分野に関するものである。より具体的には、本開示は、養子細胞療法に適した免疫細胞を調節するための小分子の使用に関する。

40

【背景技術】

【0003】

養子免疫療法は、一般に、癌、腫瘍、または感染症を有する患者に免疫細胞の投与を含み、それによって投与された免疫細胞は、患者に治療上の利益を提供する。一般的に言えば、免疫療法に適した免疫細胞には、B細胞、樹状細胞（DC）、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK T（ナチュラルキラーT）細胞、および造血幹細胞または前駆細胞が含まれるがこれらに限定されない。患者における完全で永続的な疾患反応を媒介することは、これらの細胞ベースの免疫療法の中心的な目標である。

【0004】

養子T細胞療法の有効性の背後にある、CAR-T細胞、TCR-T細胞、ウイルス特異的

50

T細胞（VST）、および腫瘍浸潤性T細胞（TIL）を含むこれらに限定されない生物学的メカニズムの考察は、いくつかの背景において、癌の治療における最適な成功のために克服される必要があるかもしれない導入されたT細胞ならびに宿主および腫瘍細胞によってもたらされる特定の障害障壁に関連する特定の属性の重要性を強調する。T細胞因子のうち、T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）の結合力、増殖能および生存能、腫瘍部位への移動、および腫瘍内でのエフェクター機能の持続能力は、例えば、ある特定の相関研究からの情報に基づくと、悪性細胞の根絶を引き起こすためのいくつかの状況において重要であり得る。他の複雑な層を追加すると、特定の望ましい属性が認識される一方で、これらの属性に影響を与える経路または要因が完全には明らかにならない可能性があり、このことが、場合によっては特定の治療的使用に対する所望の量および質を有した細胞の取得能を制限するかもしれない。

10

【0005】

当技術分野では、改善された治療効果を有する免疫細胞サブセットが必要とされている。量および質の両方において所望のT、NKまたはNK細胞サブセットを増強することができる製造方法は、それらの治療的有効性の有意な増強を提供し得る。そのような必要性に取り組み、そして免疫細胞療法の分野において他の関連する利点を提供する方法および組成物が提供される。

【発明の概要】

【0006】

一例としてCAR-T細胞療法を使用すると、治療組成物は、CAR-Tの効力および持続性、腫瘍への移動、免疫抑制性腫瘍微小環境、腫瘍の不均一性および患者の安全性に関連するものなどの1つ以上の問題に直面し得る。治療的使用のための特定のT細胞サブセットの選択およびCARのさらなる操作は、腫瘍標的化、CAR効力および標的内外の安全性問題を改善するために使用され得る。

20

【0007】

追加の方法、例えば、エフェクター細胞の治療効果を増強すること、および/または投与後に操作されたエフェクター細胞の持続性および/または遊走を改善することができるものもまた必要とされる。例えば、所望の免疫細胞サブセットを維持および拡大するために有用な組成物および方法だけでなく、拡大中の細胞分化を減少させるために有用なもの、ならびに、より分化していない表現型の細胞（または操作された細胞）、および/または、例えば様々な養子免疫療法の状況において1つ以上の治療結果を増大し持続させる、および/または改善するより大きな能力を有するような1つ以上の所望の免疫細胞サブセットを含有する、または濃縮した細胞、あるいは、操作された細胞若しくは治療用細胞が濃縮された細胞を有した、または濃縮した治療用組成物を生成するのに有用なものの需要がある。提供される実施形態の中には、そのような必要性に対処するものがある。

30

【0008】

NK細胞に基づく療法の文脈において、さらなる方法および組成物が必要とされる。ナチュラルキラー細胞は、一般的に、比較的短命であり、刺激への二次曝露に応答して最小の変化を示す、すなわち限られた標的記憶応答を示すことを特徴とする自然免疫細胞として分類される。しかしながら、活性化および抑制性NK細胞受容体の両方が、自己寛容性および持続性NK細胞活性などにおいて重要な役割を果たすことがある。状況によっては、NK細胞はすぐに周囲の環境に適応し、抗原特異的な免疫学的記憶を構築することができ、これは同様の抗原への二次曝露に応答するための基本である。例えば、適応NK細胞または記憶NK細胞と呼ばれてもよいNK細胞の亜集団は、より長い寿命であり、そして初期露光エラー！ブックマークが定義されていません。2013）。そのような特性を有する細胞について富化された組成物を強化または提供することは、標準的なNK細胞と比較して、より有効な細胞療法戦略をもたらし得る。インビボで耐久性のある抗原特異的認識を媒介する適応/記憶NK細胞を拡大および維持することは、NK細胞に基づく養子免疫療法を改善するための鍵となるだろう。提供される実施形態の中には、そのような必要性に対処するものがある。

40

50

【 0 0 0 9 】

さらに、T細胞およびNK細胞と同様に、先天的および適応的免疫系の両方において役割を果たす、より有効なNK細胞、細胞療法を改善する調節の標的となり得る一種のCD1d拘束性T細胞を単離するための改良がなされ得ると考えられる。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態における本発明は、養子免疫療法に対するそれらの治療的可能性を改善するために免疫細胞の1つ以上の集団または亜集団を調節するための組成物および方法を提供する。本発明の実施形態の目的は、例えば、より良い免疫療法的結果をもたらすと期待される以下の性質、すなわち遊走、ホーミング、細胞毒性、維持、拡大、持続性、寿命および所望の分化状態のうち少なくとも1つにおいて改善を示す細胞の亜集団の数または比率を増加させることによって治療用免疫細胞の増殖、持続性、細胞毒性、および/または細胞想起/記憶を改善するための単独または組み合わせの1種以上の化合物を提供することである。

10

【 0 0 1 1 】

本発明の一態様は、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物を提供し、その組成物は表1に列挙される化合物、すなわちドルソモルフィン；ヘプテリジン酸；1-ピロリジンカルボジチオ酸、アンモニウム塩；2-デオキシグルコース(2-DG)；GSK3 阻害剤；Rhoキナーゼ阻害剤；MEK阻害剤；PDK1アゴニスト；TGF 阻害剤；6-メルカプトプリン；AC-93253ヨウ化物；チラトリコール；PI-103；；フルベストラント；タブシガルギン；SU4312；テルミサルタン；シクロスポリンA；1、3、5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール；BAY61-3606；プロトポルフィリンIXニナトリウム；ラパマイシン；HS173；LY294002；ピクチリシブ；DCC-2036(レバステニブ)；5-アザシチジン；フルダラビン；ロスコピチン、(S)-異性体；PAC-1；8-キノリノール、5、7-ジクロロ-；ニトロフラントイン；8-キノリノール、5-クロロ-7-ヨード-；2-ナフタセンカルボキサミド、7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1、4、4a、5、5a、6、11、12a-オクタフ；ニフロキサジド；トスフロキサシン塩酸塩；セルトラリン；ジエチレントリアミン五酢酸、ペンタナトリウム；塩化エドロフォニウム；BIX01294；テルフェナジン；dmPGE2からなる群から選択される1種以上の調節剤を含む。表1に列挙した化合物からなる群から選択される1つ以上の調節剤は、免疫細胞と接触すると、免疫細胞またはその1つ以上の亜集団の治療的可能性を改善する。いくつかの実施形態では、免疫細胞の調節はエキスピボである。いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤は、表1の化合物、またはそれらの塩、エステル、エーテル、溶媒和物、水和物、立体異性体、およびプロドラッグの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤は、DCC-2036(レバステニブ)、イマチニブ(STI571)、ニロチニブ(AMN107)、ダサチニブ(BMS-345825)、ボスチニブ(SKI-606)、ボナチニブ(AP-24534)、パフェチニブ(INNO-406)、およびPD173955の少なくとも1つを含む。

20

30

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、表1に列挙される1つ以上の調節剤は、細胞増殖、維持および/または分化を調節し、それによって免疫細胞またはその1つ以上の亜集団の増殖、細胞毒性、サイトカイン応答および分泌、細胞想起応答、および/または持続性を改善する。一の実施形態では、表1に列挙された一つ以上の調節剤は、エキスピボおよびインピボの両方で免疫細胞またはその1つ以上の亜集団の細胞生存率を向上させる。一実施形態では、表1に列挙されている1つ以上の調節剤は、免疫細胞の1つ以上の所望の細胞亜集団の数または比率を増加させる。いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤は、DCC-2036(レバステニブ)、イマチニブ(STI571)、ニロチニブ(AMN107)、ダサチニブ(BMS-345825)、ボスチニブ(SKI-606)、ボナチニブ(AP-24534)、パフェチニブ(INNO-406)、およびPD173955の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、調節剤はDCC-2036を含む。

40

50

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、本発明は、T細胞、NK細胞およびNK T細胞を含むがこれらに限定されない免疫細胞の集団または亜集団の治療効果を改善するための本明細書中の1つ以上の選択された薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞は、T細胞、NK T細胞、またはNK細胞を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の調節剤による処理を受けた免疫細胞はT細胞を含み、したがって、1つ以上の所望の細胞亜集団は増加した数または相対比を有するが、ナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および/または中心記憶T細胞を含む。いくつかの実施形態では、薬剤を用いた治療に供される免疫細胞はNK T細胞を含み、したがって、1つ以上の所望の細胞亜集団は増加した数または相対比を有するがI型NK T細胞を含む。いくつかの他の実施形態では、薬剤を用いた治療に供される免疫細胞はNK細胞を含み、1つ以上の所望の細胞亜集団は増加した数または相対比を有するが適応NK細胞を含む。

10

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、表1に列挙された化合物からなる群から選択される1つ以上の調節剤を含む組成物は、表1の薬剤の塩、エステル、エーテル、溶媒和物、水和物、立体異性体、およびプロドラッグからなる群から選択されたそれらの誘導體、類似体、又は薬剤的に許容できる塩を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤は、DCC-2036 (レバステニブ)、イマチニブ (STI571)、ニロチニブ (AMN107)、ダサチニブ (BMS-345825)、ボスチニブ (SKI-606)、ポナチニブ (AP-24534)、パフェチニブ (INNO-406)、およびPD173955の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、調節剤はDCC-2036を含む。

20

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群Iから選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに群II、群III、群IV、および/または群Vから選択される1つ以上の調節剤を含む

【 0 0 1 6 】

群Iは、ドルソモルフィン、ヘプテリジン酸、1-ピロリジンカルボジチオ酸、および2-DGを含む。理論に限定されることなく、群Iの薬剤は、他の潜在的な役割の中でもとりわけ、細胞代謝および栄養素感知に影響を与える。

【 0 0 1 7 】

群IIは、GSK3 阻害剤、ROCK阻害剤、TGF 受容体阻害剤、MEK阻害剤、PDK1アゴニスト、6-メルカプトプリン AC-93253ヨウ化物、チラトリコール、PI-103、フルベストラント、タプシガルギン、SU 4312、U0126、テルミサルタン、シクロスポリンA、1, 3, 5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール、BAY 61-3606、プロトポルフィリンIXニナトリウム、ラパマイシン、TWS119、HS173、LY294002、ピクチリシブ、およびDCC-2036 (レバステニブ)を含む。理論に限定されることなく、他の潜在的な役割の中でも特に、群IIの薬剤は、様々な機能的経路におけるシグナル伝達に影響を与える。

30

【 0 0 1 8 】

群IIIは、5-アザシチジン、フルダラビン、ロスコピチン、およびPAC-1を含む。理論に限定されることなく、他の潜在的な役割の中でも、群IIIの薬剤は細胞増殖およびアポトーシスに影響を与える。

40

【 0 0 1 9 】

群IVは、5, 7-ジクロロ-8-キノリノール、2-ナフタセンカルボキサミド、7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-オクタフ、ニフロキサジド、およびトスフロキサシン塩酸塩を含む。理論に限定されることなく、他の潜在的な役割の中でも、群IVの薬剤は感染プロセスに関連する細胞特性に影響を与える可能性がある。

【 0 0 2 0 】

群Vは、セルトラリン、ジエチレントリアミン五酢酸、エドロホニウムクロリド、BIX

50

01294、テルフェナジン、およびdmPGE₂を含む。理論に限定されないが、他の潜在的な役割の中でも、群Vの薬剤は一般に、拡大、維持、細胞分化、および増殖、細胞毒性、細胞想起応答、および/または持続性に関する他の細胞特性に影響を及ぼす。

【0021】

いくつかの他の実施形態において、免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群IIから選択される少なくとも1つの薬剤と、群I、群III、群IV、および/または群Vから選択される1つ以上の調節剤とを含む

【0022】

さらに他の実施形態では、免疫細胞の治療的可能性を向上させるための組成物は、群IIIから選択される少なくとも1つの薬剤と、群I、群II、群IV、および/または群Vから選択される1つ以上の調節剤とを含む。

10

【0023】

さらに他の実施形態では、免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群IVから選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに群I、群II、群III、および/または群Vから選択される1つ以上の調節剤を含む

【0024】

さらに他の実施形態では、免疫細胞の治療的可能性を向上させるための組成物は、群Vから選択される少なくとも1つの薬剤と、群I、群II、群III、および/または群IVから選択される1つ以上の調節剤とを含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤は、DCC-2036（レバステニブ）、イマチニブ（STI571）、ニロチニブ（AMN107）、ダサチニブ（BMS-345825）、ボスチニブ（SKI-606）、ボナチニブ（AP-24534）、パフェチニブ（INNO-406）、およびPD173955の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、調節剤はDCC-2036を含む。いくつかの実施形態において、免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、TWS119、HS173、LY294002、ピクチリシブ、および2-DGからなる群から選択される少なくとも1つの薬剤と、DCC-2036（レバステニブ）、イマチニブ（STI571）、ニロチニブ（AMN107）、ダサチニブ（BMS-345825）、ボスチニブ（SKI-606）、ボナチニブ（AP-24534）、パフェチニブ（INNO-406）、およびPD173955のうちの少なくとも1つを含む、表1に記載の化合物からなる群から選択される1つ以上の追加の薬剤を含む組み合わせを含む。いくつかの特定の実施形態において、組成物は、TWS119、HS173、LY294002、ピクチリシブ、および2-DGからなる群から選択される2つ以上の薬剤の相乗的組み合わせを含む。

20

30

【0026】

いくつかの実施形態において、表1に列挙される化合物からなる群から選択される1つ以上の調節剤を含む組成物は、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N、N-ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメトキシエタン（DME）、ジメチルアセトアミド、エタノールおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの有機溶媒をさらに含む。

40

【0027】

本発明の別の態様は、免疫細胞の集団または亜集団、および表1に列挙されている化合物からなる群から選択される1つ以上の調節剤を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤は、DCC-2036（レバステニブ）、イマチニブ（STI571）、ニロチニブ（AMN107）、ダサチニブ（BMS-345825）、ボスチニブ（SKI-606）、ボナチニブ（AP-24534）、パフェチニブ（INNO-406）、およびPD173955の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、調節剤はDCC-2036を含む。いくつかの実施形態において、免疫細胞の集団または亜集団は、そのような非接触の免疫細胞と比較して養子細胞療法のための免疫細胞の治療的可能性を改善するために、1つ以上の前記調節剤と接触される。いくつかの実施形態では、免

50

疫細胞は、同じ処置をしていない免疫細胞と比較して、細胞増殖、維持、分化、および/または生存率を改善するために、1つ以上の調節剤と接触される。さらにいくつかの他の実施形態では、免疫細胞を1つ以上の前記調節剤と接触させて、同じ処置をしていない免疫細胞と比較して細胞増殖、細胞毒性、持続性、および/または想起を改善させる。

【0028】

いくつかの実施形態では、1つ以上の前記調節剤と接触させた免疫細胞は、同じ処置をしていない免疫細胞と比較して、免疫細胞の所望の亜集団の数または相対比が増加する。いくつかの態様において、免疫細胞はT、NKまたはNK T細胞を含む。一実施形態では、組成物はT細胞の集団を含み、したがって薬剤と接触した後の免疫細胞の所望の亜集団がナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および/または中枢記憶T細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物はNK T細胞の集団を含み、したがって薬剤と接触した後の免疫細胞の所望の亜集団がI型NK T細胞を含む。さらにいくつかの他の実施形態では、免疫細胞はNK細胞の集団を含み、したがって薬剤と接触した後の免疫細胞の所望の亜集団が適応NK細胞を含む。他の実施形態では、適応NK細胞は、CD57+含と、NKG2C+、低PLZF、低SYK、低FcR、低EAT-2、低TIGIT、低PD1、低CD7、低CD161、高LILRB1、高CD45RO、低CD45RAのうちの少なくとも1つを含む。

10

【0029】

いくつかの実施形態では、組成物の免疫細胞の集団または亜集団は、対象の末梢血、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織または腫瘍から単離されるかまたはそれらに含まれる。対象は健康であり得、自己免疫障害、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染または固形腫瘍を有し得るか、または以前に遺伝子改変免疫細胞を投与されたことがあり得る。いくつかの実施形態において、対象は、CMV血清反応陽性であり得る。いくつかの他の実施形態では、調節のために単離された免疫細胞は、遺伝子改変されている（遺伝子改変されているか、または再配列、突然変異、遺伝子インプリンティングおよび/または後成的改変から自然に誘導されている）。いくつかの実施形態において、調節のための単離された免疫細胞は、少なくとも1つの遺伝的に改変された様式を含む。いくつかの実施形態では、単離された免疫細胞集団はゲノム操作されており、挿入、欠失、および/または核酸置換を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、T細胞受容体(TCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、および/またはCD16もしくはその変異体の過剰発現をコードする外因性核酸を含む。そのように、遺伝子改変免疫細胞は、開示されているような本組成物および方法を用いてエクスピボ調節のために単離される。いくつかの実施形態では、調節後、被験体から単離された遺伝子改変免疫細胞を同じドナーまたは異なる患者に投与することができる。

20

30

【0030】

さらに別の実施形態では、免疫細胞はインビトロで幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆細胞から分化する。またはインビトロで造血系または非造血系の非多能性細胞から分化転換される。いくつかの実施形態では、組成物の免疫細胞はゲノム操作されており、挿入、欠失、または核酸置換（置換またはインデル）を含む。いくつかの実施形態では、組成物の免疫細胞は、T細胞受容体(TCR)および/またはキメラ抗原受容体(CAR)をコードする外因性核酸を含む。いくつかの実施形態では、被験体の組織から単離された免疫細胞は遺伝子操作されており、そしてTCRまたはCARを含み得る。いくつかの態様において、組織または対象から単離された免疫細胞はCAR-T細胞である。

40

【0031】

さらにいくつかの他の実施形態では、組成物の免疫細胞はインビトロで幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆細胞から分化する。一実施形態では、幹細胞は人工多能性幹細胞(iPSC)または胚性幹細胞(ESC)である。一の実施形態では、前駆細胞は、CD34+造血内皮細胞、多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK前駆細胞、又はNK T前駆細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆細胞はゲノム操作されており、挿入、欠失、もしくは核酸置換を含むか、また

50

は少なくとも1つの遺伝子改変様式を含む。特定の一実施形態では、幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆細胞は、T細胞受容体(TCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、および/またはCD16の過剰発現をコードする外因性核酸を含む。いくつかの他の実施形態では、組成物の免疫細胞は、造血系または非造血系の非多能性細胞からインビトロでトランス分化する。いくつかの実施形態において、調節後の免疫細胞の所望の亜集団は、少なくとも1つの遺伝的に改変された様式を有する免疫細胞を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子組み換え様式は以下、安全スイッチタンパク質、ターゲティング様式、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的活性タンパク質およびペプチド、薬剤標的候補者；または免疫細胞の生着、輸送、ホーミング、生存率、自己複製、持続性、免疫反応制御および調節、および/または生存を促進するタンパク質のうちから少なくとも1つを含む。いくつかの他の実施形態では、遺伝的に改変された様式は、(i)染色体6p21領域におけるB2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、またはRFXAP、および任意のHLA遺伝子の欠失または発現低下、および(ii)HLA-E、HLA-G、HACD16、hnCD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、Fc受容体、または二重もしくは多重特異的または普遍的なエンゲージャーとの結合のための表面誘発受容体の発現の導入または増加のうちの1つ以上を含む。

10

【0032】

いくつかの実施形態では、免疫細胞および1つ以上の前記調節剤を含む組成物は、ペプチド、サイトカイン、マイトジェン、成長因子、小RNA、dsRNA(二本鎖RNA)、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分または置換因子、目的の1つ以上のポリ核酸を含むベクター；抗体または抗体断片；および化学療法剤、放射性部分または免疫調節薬(IMiD)からなる群から選択される1つ以上の付加的な薬剤または他の添加剤/薬剤をさらに含む。これらの実施形態のいくつかにおいて、抗体または抗体断片はウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態では、抗体または抗体断片は腫瘍抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、追加の添加剤は、化学療法剤、放射性部分、および免疫調節薬(IMiD)のうちの1つ以上を含む。化学療法剤は、細胞毒性抗腫瘍薬を指し、すなわち、新生細胞を優先的に死滅させる、または急速に増殖する細胞の細胞周期を破壊する、または幹癌細胞を根絶することが見い出される、そして新生細胞の増殖を防止または抑制するために治療的に用いられる化学薬品である。化学療法剤はまた、抗腫瘍薬または細胞毒性薬または薬剤とも呼ばれ、そして当該分野において周知である。

20

30

【0033】

特定の一実施形態では、組成物は、免疫細胞の集団もしくは亜集団と、(i)表1の化合物またはそれらの塩、エステル、エーテル、溶媒和物、水和物、立体異性体およびプロドラッグの少なくとも1つ、または(ii)GSK3 阻害剤、TGF 受容体阻害剤、ROCK阻害剤、MEK阻害剤、PDK1アゴニスト、およびラパマイシンのうちの少なくとも1つを含む1つ以上の調節剤との混合物を含み、ここで免疫細胞はNK細胞を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤は、DCC-2036(レバステニブ)、イマチニブ(STI571)、ニロチニブ(AMN107)、ダサチニブ(BMS-345825)、ボスチニブ(SKI-606)、ボナチニブ(AP-24534)、パフェチニブ(INNO-406)、およびPD173955の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、調節剤はDCC-2036を含む。

40

【0034】

別の実施形態では、免疫細胞の集団または亜集団と1つ以上の前記調節剤との混合物を含む組成物は、ペプチド、抗体、抗体断片、サイトカイン、マイトジェン、増殖因子、小RNA、dsRNA、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分または置換因子、目的の1つ以上のポリ核酸を含むベクター、化学療法剤または放射性部分、および免疫調節薬(IMiD)からなる群から選択される1つ以上の添加剤をさらに含む。さらに別の実施形態では、免疫細胞の集団または亜集団と1つ以上の前記調節剤との混合物を含む組成

50

物は、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N、N-ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメトキシエタン（DME）、ジメチルアセトアミド、エタノールおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの有機溶媒も含む一実施形態では、組成物中の免疫細胞の集団または亜集団はT細胞を含む。いくつかの態様において、細胞集団中のT細胞はCAR-T細胞を含む。

【0035】

いくつかの局面において、表1に列挙される化合物からなる群より選択される1つ以上の調節剤を含む組成物と接触した調節された免疫細胞の集団を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態において、調節された免疫細胞は、DCC-2036（レバステニブ）、イマチニブ（STI571）、ニロチニブ（AMN107）、ダサチニブ（BMS-345825）、ボスチニブ（SKI-606）、ボナチニブ（AP-24534）、パフェチニブ（INNO-406）、およびPD173955を含む1つ以上の調節剤と接触されている。いくつかの態様において、調節された免疫細胞はDCC-2036と接触されている。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、T、NK、およびNKT細胞を含むがこれらに限定されない、調節された免疫細胞の集団または亜集団を有する治療用組成物である。いくつかの実施形態では、治療用組成物は調節剤を実質的に含まない緩衝液で洗浄することができる。

【0036】

いくつかの実施形態において、調節された細胞集団は、調節されていない細胞集団と比較して養子細胞療法のための改善された治療的可能性を有する免疫細胞を含む。いくつかの実施形態では、単離された免疫細胞集団は、1つ以上の調節剤による処理を受けない免疫細胞と比較して、細胞増殖、維持、分化、脱分化、および/または生存率が向上している。いくつかの態様において、単離された免疫細胞集団は、1つ以上の調節剤による処理をしていない免疫細胞と比較して、そしてそうでなければ、1つ以上の調節剤などを含まないが類似した条件下でインキュベートまたは処理された、いくつかの態様において、細胞増殖、細胞毒性、サイトカイン応答および分泌、細胞想起応答、ならびに持続性を改善している。いくつかの他の実施形態では、単離された免疫細胞集団は、同じ処理をしていない免疫細胞と比較して、免疫細胞の1つ以上の所望の亜集団の数または相対比が増加している。

【0037】

いくつかの実施形態では、表1に記載の化合物からなる群から選択される1種以上の前記調節剤で処理された単離された免疫細胞集団はT細胞を含み、したがって免疫細胞の取得された1つ以上の所望の亜集団がナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および/または中枢記憶T細胞を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤で処理された免疫細胞の単離された集団は、NKT細胞を含み、したがって得られた免疫細胞の1つ以上の望ましい亜集団はI型NKT細胞を含む。さらにいくつかの他の実施形態において、1つ以上の調節剤で処理された免疫細胞の単離された集団は、NK細胞を含み、したがって免疫細胞の1つ以上の所望の亜集団は適応NK細胞を含む。いくつかの実施形態において、調節された免疫細胞は、DCC-2036（レバステニブ）、イマチニブ（STI571）、ニロチニブ（AMN107）、ダサチニブ（BMS-345825）、ボスチニブ（SKI-606）、ボナチニブを含む1つ以上の調節剤と接触されている（AP-24534）、パフェチニブ（INNO-406）、およびPD173955を含む1つ以上の調節剤と接触されている。いくつかの態様において、調節された免疫細胞はDCC-2036と接触されている。

【0038】

提供される組成物のいくつかの実施形態では、単離された免疫細胞集団は、対象の末梢血、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、または腫瘍から単離されてもよい。対象は健康であり得、自己免疫障害、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染または固形腫瘍を有し得るか、または以前に遺伝子改変免疫細胞を投与されたことがあり得る。いくつかの実施形態において、対象は、CMV血清反応陽性であ

10

20

30

40

50

り得る。いくつかの他の実施形態では、調節のために単離された免疫細胞は、遺伝子改変されている（遺伝子改変されているか、または再配列、突然変異、遺伝子インプリンティングおよび/または後成的改変から自然に誘導されている）。いくつかの実施形態において、調節のための単離された免疫細胞は、少なくとも1つの遺伝的に改変された様式を含む。いくつかの実施形態では、単離された免疫細胞集団はゲノム操作されており、挿入、欠失、および/または核酸置換を含む。いくつかの特定の実施形態において、免疫細胞は、T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、および/またはCD16もしくはその変異体の過剰発現をコードする外因性核酸を含む。そのように、遺伝子改変免疫細胞は、開示されているような本組成物および方法を用いてエクスピボ調節のために単離される。いくつかの実施形態では、調節後、被験体から単離された遺伝子改変免疫細胞を同じドナーまたは異なる患者に投与することができる。いくつかの実施形態では、免疫細胞の集団は、薬剤による治療の前に単離されてもよい。いくつかの実施形態では、単離された免疫細胞集団はゲノム操作されており、挿入、欠失、および/または核酸置換を含む。いくつかの特定の態様において、免疫細胞は、T細胞受容体（TCR）および/またはキメラ抗原受容体（CAR）をコードする外因性核酸を含む。

10

【0039】

提供される組成物のいくつかの実施形態において、単離された免疫細胞集団は、幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆細胞から分化させることができる。いくつかの実施形態では、単離された免疫細胞集団は、薬剤による治療の前または最中に幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆細胞から分化させることができる。いくつかの実施形態では、幹細胞は人工多能性幹細胞（iPSC）または胚性幹細胞（ESC）である。いくつかの実施形態では、前駆細胞は、CD34+造血内皮細胞、多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK前駆細胞、又はNK前駆細胞である。いくつかのさらなる実施形態では、幹細胞、造血幹細胞または前駆細胞、前駆体、調節のための誘導免疫細胞、または調節された誘導免疫細胞は、例えば挿入、欠失、および/または核酸置換を含むようにゲノム工学的に操作される。特定の一実施形態では、幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆体は、T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、および/またはCD16の過剰発現をコードする外因性核酸を含む。

20

【0040】

提供される組成物のいくつかの他の実施形態において、単離された免疫細胞集団は、造血系または非造血系の非多能性細胞から分化転換されてもよい。いくつかの実施形態では、単離された免疫細胞集団は、薬剤による治療の前またはその間に、造血系または非造血系の非多能性細胞から分化転換されてもよい。

30

【0041】

本発明の一態様は、養子療法のために免疫細胞の集団を調節する方法を提供し、この方法は、一般に、表1の薬剤に接触していない非調節免疫細胞と比較して養子細胞療法のための改善された治療的可能性を有する調節免疫細胞集団を得るため、免疫細胞の集団を表1に記載の1つ以上の調節剤を含む組成物の十分な量と接触させて集団を得ることを含む。いくつかの実施形態において、養子療法のための調節された免疫細胞は自己由来である。いくつかの実施形態において、養子療法のための調節された免疫細胞は同種異系である。いくつかの実施形態において、調節剤は、DCC-2036（レバスチニブ）、イマチニブ（STI571）、ニロチニブ（AMN107）、ダサチニブ（BMS-345825）、ボスチニブ（SKI-606）、ポナチニブ（AP-24534）、パフェチニブ（INN0-406）、およびPD173955の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、調節剤はDCC-2036を含む。

40

【0042】

本方法のいくつかの実施形態では、免疫細胞の集団を1つ以上の調節剤と接触させることは、表1の1つ以上の前記調節剤による処置をしていない免疫細胞と比較して、増殖、細胞傷害性、サイトカイン応答、サイトカイン放出、細胞想起応答、および/または持続性を改善する；および/または細胞増殖、維持、分化、脱分化、および/または生存率を改

50

善する。本方法のいくつかの実施形態において、免疫細胞の集団を表1の1つ以上の前記調節剤と接触させることは、同じ1つ以上の調整剤による処置をしていない免疫細胞と比較して、免疫細胞の1つ以上の所望の亜集団の数または比率を増加させる。いくつかの実施形態において、上記の方法は、表1の1つ以上の前記調節剤と接触させた免疫細胞の1つ以上の所望の亜集団を単離することをさらに含む。いくつかの実施形態において、調節剤は、DCC-2036（レバステニブ）、イマチニブ（STI571）、ニロチニブ（AMN107）、ダサチニブ（BMS-345825）、ボスチニブ（SKI-606）、ポナチニブ（AP-24534）、パフェチニブ（INNO-406）、およびPD173955の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、調節剤はDCC-2036を含む。

10

【0043】

いくつかの実施形態では、上記方法は、処理された免疫細胞の集団もしくは亜集団、または処理された免疫細胞の単離された1つ以上の所望の亜集団、またはその治療用組成物を細胞療法を必要とする対象に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、対象は自己免疫障害、血液悪性腫瘍、充実性腫瘍、または感染症を患っている。いくつかの実施形態では、対象は化学療法または放射線療法を受けた、受けている、または化学療法または放射線療法で治療される。

【0044】

いくつかの態様において、免疫細胞の集団はT細胞、NK細胞、またはNK細胞を含む。本方法の一実施形態では、免疫細胞の集団はT細胞を含み、治療後の1つ以上の所望の亜集団はナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および/または中枢記憶T細胞を含む。この方法の一実施形態では、免疫細胞の集団はNK細胞を含み、治療後の1つ以上の所望の亜集団はI型NK細胞を含む。この方法の一実施形態では、免疫細胞の集団はNK細胞を含み、治療後の1つ以上の所望の亜集団は適応NK細胞を含む。

20

【0045】

前記一般的方法のいくつかの実施形態において、調節のための免疫細胞は、末梢血、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織または腫瘍から単離されるかまたはそれらに含まれる。いくつかの実施形態では、調節用の免疫細胞は健康な対象；自己免疫障害、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染または固形腫瘍を有する対象；以前に遺伝子改変免疫細胞を投与された対象；またはCMV血清反応陽性の対象から単離される。いくつかの他の実施形態では、調節のために単離された免疫細胞は、遺伝子改変されている（遺伝子改変されているか、または再配列、突然変異、遺伝子インプリンティングおよび/または後成的改変から自然に誘導されている）。いくつかの実施形態において、調節のための単離された免疫細胞は、少なくとも1つの遺伝的に改変された様式、)、キメラ抗原受容体（CAR）、および/またはCD16もしくはその変異体の過剰発現を含む。そのように、いくつかの態様において、ゲノム改変免疫細胞は、開示の本組成物および方法を用いてエクスピボ調節のために単離される。いくつかの実施形態では、調節後、対象から単離されたゲノム改変免疫細胞は、同じドナーまたは異なる患者に投与され得る。

30

【0046】

いくつかの実施形態において、調節のための免疫細胞は、インビトロで幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆細胞から分化する。いくつかの実施形態において、調節のための免疫細胞は、インビトロで造血系または非造血系の非多能性細胞から分化転換される。いくつかの実施形態において、前記幹細胞は人工多能性幹細胞（iPSC）または胚性幹細胞（ESC）を含む。いくつかの実施形態では、前駆細胞は、CD34+造血内皮細胞、多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK前駆細胞、又はNK前駆細胞である。さらにいくつかの他の実施形態では、幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆細胞はゲノム操作されており、挿入、欠失、または核酸置換を含み、かつ/または少なくとも1つの遺伝子改変様式を含む。それ自体、それに由来する調節された免疫細胞の所望の亜集団は、少なくとも1つの遺伝的に改変された様式を有する免疫細胞を含む。

40

50

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態において、前記遺伝子組み換え様式は、以下、すなわち安全スイッチタンパク質、ターゲティング様式、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的活性タンパク質およびペプチド、薬剤標的候補者；または免疫細胞の生着、輸送、ホーミング、生存率、自己複製、持続性、免疫反応制御および調節、および/または生存を促進するタンパク質のうちから少なくとも1つを含む。いくつかの他の実施形態では、遺伝的に改変された様式は、染色体6p21領域におけるB2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、またはRFXAP、および任意のHLA遺伝子の1つ以上の欠失または発現低下を含む。いくつかの他の実施形態では、遺伝的に改変された様式は、HLA-E、HLA-G、HACD16、hnCD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、Fc受容体、または二重もしくは多重特異的または普遍的なエンゲージャーとの結合のための表面誘発受容体の発現の導入または増加のうちの1つ以上を含む。

10

【 0 0 4 8 】

免疫細胞を調節する方法のいくつかの実施形態において、前記「十分な時間」または「十分な時間の長さ」は、16時間、14時間、12時間、10時間、8時間、6時間、4時間、2時間である。1時間、0.5時間、0.1時間以上、またはその間の任意の長さである。したがって、前記十分な時間の長さは、例えば、少なくとも15、13、11、9、7、5、3、1、0.5、または0.1時間以上である。方法のいくつかの他の実施形態では、前記十分な時間の長さは、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間以上、またはその間の任意の長さの時間である。そのように、前記十分な時間の長さは、例えば、30、42、54、66、78、または90時間以上である。

20

【 0 0 4 9 】

前記方法のいくつかの実施形態では、免疫細胞は、調節中および/または調節後に、フィーダーを含まない環境にある。フィーダーを含まない条件は、フィーダー細胞を含まない、およびフィーダー馴化培地を含まない、を含む。前記方法のいくつかの実施形態では、免疫細胞は、調節中に、フィーダー細胞と共培養される。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、対象は養子細胞移入の候補者となりうる。いくつかの実施形態では、対象は骨髄または幹細胞移植の候補者であり得る。いくつかの実施形態では、対象は以前に骨髄または幹細胞移植を受けている。いくつかの実施形態では、対象は、骨髄切除または非骨髄破壊化学療法または放射線療法を受けている。

30

【 0 0 5 1 】

本発明の態様は、免疫細胞の集団を調節するための上記の方法のいずれかによる細胞療法のための治療用組成物を製造する方法を提供する。

【 0 0 5 2 】

本発明の態様は、細胞療法のための調節された免疫細胞を含む治療用組成物を製造するための上記の免疫細胞調節方法の使用を提供する。いくつかの実施形態において、調節された免疫細胞は、T細胞、NK細胞および/またはNKT細胞を含む。いくつかの実施形態では、調節されたNK細胞は適応NK細胞を含む。本発明のさらなる態様は、本明細書に提供される方法によって作製された選択的に増殖したNK細胞を含む調節された免疫細胞の集団を提供する。

40

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に開示される方法および組成物を用いて得られた調節細胞と治療上許容される媒体とを含む治療組成物を提供する。治療用組成物のいくつかの実施形態では、組成物は、ペプチド、サイトカイン、マイトジェン、成長因子、小RNA、dsRNA(二本鎖RNA)、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分または置換因子、目的の1つ以上のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤または放射性部分、および免疫調節薬(IMiD)からなる群から選択される1つ以上の

50

追加の添加剤をさらに含む。

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態において、養子細胞療法を必要とする対象に治療上十分な量の上記治療用組成物を投与することによって対象を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態では、細胞療法は自己由来である。いくつかの他の実施形態では、細胞療法は同種異系である。いくつかの実施形態では、治療を必要とする対象は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、癌、またはH I V、R S V、E B V、C M V、アデノウイルスもしくはB K ポリオーマウイルスに関連する感染症を有する。いくつかの実施形態では、調節された免疫細胞を使用して対象を治療する方法は、抗体、化学療法薬、または放射性治療と組み合わせて前記治療用組成物を投与することによって行われ、ここでは抗体、化学療法剤、または放射線治療は治療用組成物の投与前、投与と同時にまたは投与後である。

10

【 0 0 5 5 】

この使用の様々な目的および利点は、例示および例として本発明の特定の実施形態として記載されている添付の図面と併せて、以下の説明から明らかになるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 6 】

【 図 1 A 】 図 1 は、(A) 生存 C D 8 + 細胞集団および(B) 生存 C D 4 + 細胞集団における C C R 7 と C D 6 2 L 共発現細胞パーセンテージの Z スコアおよび C C R 7 と C D 6 2 二重陽性 T 細胞絶対数の Z スコアのグラフ表示である。

【 図 1 B 】 同上。

20

【 0 0 5 7 】

【 図 2 】 図 2 は、研究に用いた様々な C A R 構築物を示す。

【 0 0 5 8 】

【 図 3 - 1 】 図 3 は、D C C - 2 0 3 6 は、(A) C A R - T 細胞の生存性維持；(B) C A R - T 細胞の拡大強化が可能であることを示す。D C C - 2 0 3 6 がビヒクルと比較して C A R - T 細胞の細胞拡大を改善することを示すために連続再刺激アッセイを行った。(C) 照射された標的細胞を用いた 4 ラウンドの連続殺傷アッセイのラウンドごとの相対増殖；(D) 連続殺傷アッセイの 4 ラウンド全体を通した C A R - T 細胞数の総増殖。

【 図 3 - 2 】 同上。

【 0 0 5 9 】

【 図 4 】 図 4 は、化合物処理後の C D 8 + T 細胞の表現型の特徴付けを示す。A : C C R 7 + C D 6 2 L + 表面発現を有する T 細胞サブセット。B : T c m 表現型を反映する C D 2 7 発現レベル。

30

【 0 0 6 0 】

【 図 5 】 図 5 は、T 細胞分化に関連する遺伝子発現を示し、C D 6 2 L および C C R 7 を含むいくつかの T c m 関連遺伝子は、D C C - 2 0 3 6 (F T - 6 1 3 1 4) 処理後に発現が増加した。

【 0 0 6 1 】

【 図 6 】 図 6 は、C A R - T 細胞生成中に D M S O、T W S 1 1 9、D C C - 2 0 3 6 で処理した C D 8 C A R - T 細胞中での発現の消耗マーカー、T I M - 3 (A) および P D - 1 (B) を示す。

40

【 0 0 6 2 】

【 図 7 】 図 7 は、D C C - 2 0 3 6 で処理した C A R - T 細胞の改善されたインビボ有効性を示す。D C C - 2 0 3 6 で処理した C A R - T 細胞は大多数のマウスから腫瘍を除去することができたが、形質導入されていない T 細胞、または D M S O もしくは T W S 1 1 9 で処理した C A R - T 細胞は最小の腫瘍制御を示した。

【 0 0 6 3 】

【 図 8 】 図 8 は、(A) D M S O、(B) T W S 1 1 9、(C) D C C - 2 0 3 6 で処理した C A R - T 細胞のインビボでの腫瘍クリアランスおよび持続性を示す。

【 発明を実施するための形態 】

50

【 0 0 6 4 】

T細胞療法のインビボ有効性は、処理過程または供給原料に入るT細胞の開始集団、ならびに利用されるエクスピボ増殖および活性化方法の両方に依存する製造プロセスによって強く影響され得る。投与されたT細胞の分化状態は、インビボ持続性および抗腫瘍活性に著しく影響を及ぼし得る。CCR7およびCD62Lマーカーの発現を特徴とするTヘルパー(CD4+T細胞)および細胞傷害性T細胞(CD8+)、具体的にはナイーブ(Tn)、幹細胞記憶(Tscm)および中枢記憶(Tcm)T細胞は、マウスモデル(Sommermeierら2015)および非ヒト霊長類モデル(Bergerら、2008)で優れた抗腫瘍活性を媒介する。

【 0 0 6 5 】

製造工程の間、治療用細胞(または細胞集団)は典型的には活性化され、場合により形質導入されるかまたはそうでなければ組換え受容体を発現するように操作され、そして増殖される。この過程は一般に細胞の分化を促進し、より分化した状態の細胞の割合の増加をもたらす-T細胞の場合、より分化した細胞は表現型的にエフェクター記憶またはエフェクターT細胞として特徴付けられる。一旦患者に注入されると、これらのより分化した細胞は、より分化していない状態の細胞と比較して、増殖能力がより低く、長い寿命または持続した集団として存続する可能性がより低い。

【 0 0 6 6 】

さらに、患者の体内に入る細胞の最終的な状態、具体的には細胞サブタイプは、製造プロセスによって大部分定義され得るので、そのプロセスの重要性を誇張することはできない。細胞の培養および増殖中に所望の分化状態および/または適応免疫細胞特性を有する細胞亜集団を優先的に維持または増殖させることは、細胞に基づく治療の有効性を高めるのに極めて有益であり得る。

【 0 0 6 7 】

改善された細胞製造プロセスは、投与時間の短縮、細胞の均一性の増加、または所望の投与量に達する患者の割合の増加など、複数の潜在的な利点を有する。加えて、持続性の増加および毒性の減少などの製造プロセス中の細胞に対する機能的改善もまた、細胞治療の改善をもたらし得る。

【 0 0 6 8 】

養子免疫療法のための改善された治療能力を有する細胞の集団または亜集団を得るために免疫細胞を調節する組成物および方法が本明細書に提供される。改善された治療的可能性を有する調節された免疫細胞を含む組成物もまた提供される。疾患および状態を治療するための改善された治療能力を有する調節された免疫細胞を使用する方法もまた提供される。いくつかの実施形態では、改善された治療的可能性を有する免疫細胞は、以下、すなわち増殖、生存力、持続性、細胞毒性および/または細胞想起/記憶の向上のうちの少なくとも1つ、または少なくとも2つもしくは少なくとも3つ以上を示す。治療用細胞組成物におけるように、上記の性質のうちの少なくとも1つを示す細胞の数または相対比を増加させるかまたは亜集団を濃縮することによって免疫細胞治療能力を向上させるための方法および組成物も提供される。

【 0 0 6 9 】

定義

【 0 0 7 0 】

本明細書で他に定義されない限り、本出願に関して使用される科学的小および技術的用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈によって別段の要求がない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。

【 0 0 7 1 】

本発明は、本明細書に記載された特定の方法論、プロトコル、および試薬などに限定されず、したがって変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、特許請求の範囲によってのみ定義される本

10

20

30

40

50

発明の範囲を限定することを意図していない。

【0072】

本明細書で使用するとき、冠詞「a」、「an」、および「the」は、冠詞の文法上の目的語の1つ以上を指す。例として、T細胞は、1つのT細胞または2つ以上のT細胞を意味する。

【0073】

本明細書で使用されるとき、用語「Tリンパ球」および「T細胞」は互換的に使用され、胸腺における成熟を完了し、そして免疫系において、体内での特定の外来抗原の同定、ならびに他の免疫細胞の活性化および失活を含む様々な役割を有する主要タイプの白血球を指す。T細胞は、培養T細胞、例えば初代T細胞、または培養T細胞株からのT細胞、例えばJurkat、SupT1など、または哺乳動物から得られるT細胞などの任意のT細胞であり得る。T細胞はCD3+細胞であり得る。T細胞は、任意の種類T細胞であり得、そして任意の発達段階のものでよく、限定されないが、CD4+/CD8+二重陽性T細胞、CD4+ヘルパーT細胞（例えば、Th1およびTh2細胞）、CD8+T細胞（例えば、細胞毒性T細胞）、末梢血単核球（PBMC）、末梢血白血球（PBL）の中にあるT細胞、腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）の中にあるT細胞、記憶T細胞、ナイーブT細胞、制御性T細胞、ガンマデルタT細胞（ γ T細胞）を含む。さらなるタイプのヘルパーT細胞には、Th3、Th17、Th9、またはTfh細胞などの細胞が含まれる。さらなるタイプの記憶T細胞には、中枢記憶T細胞（Tcm細胞）、エフェクター記憶T細胞（Tem細胞およびTEMRA細胞）などの細胞が含まれる。T細胞はまた、T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように改変されたT細胞などの遺伝子操作されたT細胞を指すこともできる。T細胞は幹細胞または前駆細胞から分化することもできる。

10

20

【0074】

本明細書中で使用される場合、用語「ナイーブT細胞」またはTnは、活性化T細胞または記憶T細胞とは異なり、末梢内でそれらの同種抗原に遭遇していない成熟T細胞を指す。ナイーブT細胞は通常、L-セレクチン（CD62L）の表面発現、活性化マーカーCD25、CD44またはCD69の不在、および記憶CD45ROアイソフォームの不在を特徴とする。それらはまた、サブユニットIL-7受容体、CD127、および共通鎖、CD132からなる機能的IL-7受容体を発現する。ナイーブ状態では、T細胞は静止状態で分裂していないと考えられ、恒常的な生存メカニズムのために共通のガンマ鎖サイトカインIL-7とIL-15が必要である。

30

【0075】

本明細書中で使用される場合、用語「中枢記憶T細胞」またはTcmは、CD45ROおよびCD25を発現するがCD45RAを発現しないT細胞のサブ群または亜集団をいう。Tcmはまた、CD62L、CXCR3、CCR7を含む二次リンパ器官への輸送に関連する遺伝子も発現し、これらの遺伝子産物の発現を失うエフェクター記憶T細胞、またはTemとは異なる。

【0076】

本明細書中で使用される場合、用語「幹記憶T細胞」または「幹細胞記憶T細胞」またはTscmは、Tcm、TemおよびTeff（エフェクターT細胞）を自己再生および生成することができるT細胞のサブ群または亜集団を指す。Tscmは、Tnと同様の発現パターンを有するが、Tnとは異なり、CD95も発現する。

40

【0077】

本明細書で使用されるとき、用語「NK細胞」または「ナチュラルキラー細胞」は、CD56またはCD16の発現およびT細胞受容体（CD3）の非存在によって定義される末梢血リンパ球のサブセットを指す。

【0078】

本明細書中で使用される場合、用語「適応NK細胞」および「記憶NK細胞」は交換可能であり、表現型的にCD3- およびCD56+を発現し、そしてNKG2CおよびCD5

50

7の少なくとも1つ、および任意にCD16を有するが、以下、低PLZF、低SYK、FcεR、および低FcγR、低EAT-2、低TIGIT、低PD1、低CD7、低CD161、高LILRB1、高CD45RO、および低CD45RAのうちの1つまたは複数を欠くNK細胞のサブセットをいう。いくつかの態様において、CD56+ NK細胞の単離された亜集団はNKG2CおよびCD57の発現を含む。いくつかの他の実施形態において、CD56+ NK細胞の単離された亜集団は、CD57、CD16、NKG2C、CD57、NKG2D、NCRリガンド、NKp30、NKp40、NKp46、活性化および抑制KIR、NKG2Aおよび/またはDNAM-1の発現を含む。CD56+は弱い発現または強い表現であってもよい。

【0079】

本明細書で使用される時、用語「NK T細胞」または「ナチュラルキラー T細胞」は、T細胞受容体(TCR)を発現するCD1d拘束性T細胞を指す。従来の主要組織適合性(MHC)分子によって提示されるペプチド抗原を検出する従来のT細胞とは異なり、NK T細胞は、非古典的MHC分子であるCD1dによって提示される脂質抗原を認識する。2種類のNK T細胞が認識されている。不変又はI型NK T細胞の種類は非常に限られたTCRレパートリー-鎖(ヒトではV11)の制限スペクトルと関連付けられている。正規のβ鎖(ヒトではV24-J18)を発現する。非古典的又は非不変的II型NK T細胞とも呼ばれるNK T細胞の第二集団はより異種TCRβを利用を表示する。I型NK T細胞は免疫療法に適していると考えられる。適応又は不変(I型)NK T細胞は、以下のマーカー、TCR Va24-Ja18、VB11、CD1d、CD3、CD4、CD8、αGalCer、CD161及びCD56のうちの少なくとも1つ以上の発現を同定することができる。

【0080】

本明細書中で使用される場合、用語「単離された」などは、その元の環境から分離された細胞、または細胞の集団を指し、すなわち単離された細胞の環境は、「分離されていない」標準細胞が存在する環境で見出されるような少なくとも1つの成分を実質的に含まない。この用語は、それがその天然の環境において見いだされる時、例えば、組織または生検サンプルから単離されるときに、いくつかまたはすべての成分から除去された細胞を含む。この用語はまた、細胞が非自然発生環境で見出される、例えば細胞培養物または細胞懸濁液から単離されるように、少なくとも1つの、いくつかのまたはすべての成分から除去される細胞も含む。したがって、単離された細胞は、それが天然に見られるように、またはそれが非天然環境において増殖、貯蔵または生存するにつれて、他の物質、細胞または細胞集団を含む少なくとも1つの成分から部分的または完全に分離される。単離された細胞の具体例には、部分的に純粋な細胞組成物、実質的に純粋な細胞組成物および天然に存在しない培地中で培養された細胞が含まれる。単離された細胞は、所望の細胞またはその集団を環境中の他の物質または細胞から分離して得られる場合、あるいは環境から1つ以上の他の細胞集団または亜集団を除去することから得られる場合がある。

【0081】

本明細書で使用される時、用語「精製する」などは、純度を高めることを指す。例えば、純度は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%に高めることができる。

【0082】

本明細書で使用される時、用語「集団」は、T、NKまたはNK T細胞に関して使用される時、それぞれ2つ以上のT、NKまたはNK T細胞を含む細胞の群をいう。例としてT細胞を使用すると、単離された、または濃縮されたT細胞集団は、1種類のT細胞のみを含んでもよく、または2種類以上のT細胞の混合物を含んでもよい。単離されたT細胞集団は、1種類のT細胞の同種集団または2種類以上のT細胞の不均一集団であり得る。単離されたT細胞集団はまた、T細胞および少なくともT細胞以外の細胞、例えばB細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋細胞、脳細胞などを有する不均一集団であり得る。不均一集団は0.01%~約100%のT細胞を有す

10

20

30

40

50

ることができる。したがって、単離されたT細胞集団は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%のT細胞を有することができる。単離されたT細胞集団は、本明細書に開示されるものを含むがこれらに限定されない、1つ以上の、またはすべての異なるタイプのT細胞を含むことができる。2種類以上のT細胞を含む単離されたT細胞集団において、各種類のT細胞の相対比は0.01%から99.99%の範囲であり得る。単離された集団はまた、T細胞のクローン集団であり得、その集団のすべてのT細胞は単一のT細胞のクローンである。

【0083】

T、NKまたはNK T細胞の単離された集団は、ヒト末梢血または臍帯血などの天然の供給源から得ることができる。組織または細胞混合物から細胞を解離させて様々な細胞型を分離する様々な方法が当技術分野において開発されている。いくつかの場合において、これらの操作は比較的均質な細胞集団をもたらす。T細胞は、本明細書中に記載されるようなソーティングまたは選択プロセスによって、または当該分野で公知の他の方法によって単離され得る。単離された集団におけるT細胞の割合は、天然供給源におけるT細胞の割合より少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、または約95%高くてもよい。単離されたT細胞集団は、T細胞全般、または1つもしくは複数の特定の種類のT細胞に対するものであり得る。

10

【0084】

本明細書中で使用される用語「亜集団」は、T、NKまたはNK T細胞に関して使用される場合、自然界で見られるそれぞれ全ての種類より少ない種類のT、NKまたはNK T細胞を含む集団をいう。

20

【0085】

本明細書中で使用される場合、用語「多能性」とは、身体または体細胞のすべての系統（すなわち、胚本体）を形成する細胞の能力をいう。例えば、胚性幹細胞は、3つの胚葉、外胚葉、中胚葉、および内胚葉のそれぞれから細胞を形成することができる一種の多能性幹細胞である。多能性は、完全な生物を生み出すことができない不完全または部分的な多能性細胞（例えば、エピプラスト幹細胞またはEpiSC）から、完全な生命体（例えば、胚性幹細胞）を生み出すことができるより原始的でより多能性の細胞までの範囲の発達能力の連続体である。

30

【0086】

本明細書中で使用される場合、用語「人工多能性幹細胞」または「iPSC」とは、3つの胚葉または皮層、すなわち中胚葉、内胚葉、および外胚葉のすべての組織に分化し得る細胞に誘導または変化（すなわち再プログラム化）された分化成人細胞から産生される幹細胞をいう。

【0087】

本明細書で使用されるとき、用語「胚性幹細胞」は、胚性胚盤胞の内部細胞塊の天然に存在する多能性幹細胞を指す。胚性幹細胞は多能性であり、発生中に3つの一次胚葉：外胚葉、内胚葉および中胚葉の全ての派生物を生じる。それらは、胚体外膜または胎盤には寄与せず、全能性ではない。

40

【0088】

本明細書中で使用される場合、用語「前駆細胞」とは、より大きな発生能を有する細胞、すなわち、それが分化によってできる細胞と比較してより原始的（例えば、発生経路または進行に沿った初期段階にある）である細胞表現型を意味する。多くの場合、前駆細胞は有意なまたは非常に高い増殖能力を有する。前駆細胞は、発生経路および細胞が発生し分化する環境に応じて、より低い発生能を有する複数の異なる細胞、すなわち分化細胞型、または単一の分化細胞型を生じ得る。

【0089】

本明細書中で使用される場合、用語「再プログラミング」または「脱分化」または「細胞効力の増大」または「発生能の増大」は、細胞の効力を増大させるかまたは細胞をより分

50

化していない状態に分化させる方法を指す。例えば、増加した細胞効力を有する細胞は、非再プログラム化状態の同じ細胞と比較して、より発達上の柔軟性を有する（すなわち、より多くの細胞型に分化することができる）。言い換えれば、再プログラム化細胞は、非再プログラム化状態の同じ細胞よりも分化度の低い状態にある。

【0090】

本明細書で使用される、用語「分化」は、未分化（「非抑制（uncommitted）」）または低未分化細胞が、例えば血液細胞または筋細胞のような特殊化した細胞の特性を獲得する過程である。分化細胞または分化誘導細胞は、細胞の系統内でより特殊化された（「抑制された」）位置を占める細胞である。分化過程に適用される場合、用語「抑制（committed）」は、通常の場合でそれが特定の細胞型または細胞型のサブセットに分化し続ける点まで分化経路において進行した細胞を指し、通常の場合では、異なる細胞型に分化することも、分化度の低い細胞型に戻ることもできない。

10

【0091】

本明細書中で使用される場合、用語「コードする」とは、規定されたヌクレオチド配列（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）または規定されたアミノ酸配列およびそれらから生じる生物学的特性のいずれかを有する生物学的過程における高分子および巨大分子の合成のための鋳型として機能する、遺伝子、cDNA、またはmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性をいう。従って、仮にその遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が細胞または他の生物系においてタンパク質を産生する場合、遺伝子はタンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、通常は配列表に提供されているコード鎖、および遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として使用される非コード鎖の両方とも、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードすると称される。

20

【0092】

本明細書中で使用される場合、用語「外因性」は、言及された分子または言及された活性が宿主細胞に導入されるか、または宿主細胞に対して非天然であることを意味することを意図する。分子は、例えば、宿主染色体への組み込みなどによる宿主遺伝物質へのコード核酸の導入によって、またはプラスミドなどの非染色体遺伝物質として導入され得る。したがって、コード核酸の発現に関して使用される用語は、発現可能な形態のコード核酸の細胞への導入を指す。「内因性」という用語は、宿主細胞に存在する言及された分子または活性を指す。同様に、コード核酸の発現に関して使用される場合のこの用語は、細胞内に含まれ外因的に導入されていないコード核酸の発現を指す。

30

【0093】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」とは、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れらの類似体のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態をいう。ポリヌクレオチドの配列は4つのヌクレオチド塩基、すなわちアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）からなり、ポリヌクレオチドがRNAである場合はチミンがウラシル（U）となる。ポリヌクレオチドは、遺伝子または遺伝子フラグメント（例えば、プローブ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブおよびプライマーを含めてもよい。ポリヌクレオチドはまた、二本鎖および一本鎖分子の両方を指す。

40

【0094】

本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は交換可能に使用され、そしてペプチド結合によって共有結合したアミノ酸残基を有する分子をいう。ポリペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含まなければならず、そしてポリペプチドの最大アミノ酸数に制限はない。本明細書中で使用される場合、この用語は、当技術分野で一般に例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも呼ばれる

50

短鎖と、当技術分野で一般にポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれる長鎖の両方を指す。「ポリペプチド」は、例えば、とりわけ、生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変異体、修飾ポリペプチド、誘導體、類似体、融合タンパク質を含む。ポリペプチドは、天然ポリペプチド、組換えポリペプチド、合成ポリペプチド、またはそれらの組み合わせを含む。

【0095】

本明細書で使用される場合、「エクスピボ」という用語は、好ましくは自然条件の最小限の変更で、生物外の人工環境内の生体組織内または生体組織上で行われる実験または測定など、生物外で起こる活動を指す。「エクスピボ」手順は、生物から採取され、通常無菌条件下で、典型的には数時間または最大で約24時間、ただし状況に応じて最大2日~28日を含め、実験装置で培養される生細胞または組織を伴う。そのような組織または細胞はまた、収集および凍結され得、そして後にインビトロ、エクスピボ、またはインビボのいずれかでさらなる実験のために解凍され得る。数日間より長く生細胞または組織を使用し続ける組織培養実験または手順は、典型的には「インビトロ」と見なされるが、特定の実施形態では、この用語はエクスピボと互換的に使用され得る。一方、「インビボ」活性は生物、例えばマウスにおいて起こり、そのような活性は細胞生着、細胞ホーミング、細胞の自己複製、および細胞の拡大を含み得る。

10

【0096】

本明細書中で使用される場合、用語「インビトロ」とは、試験管、培養皿、または生物の外部の他の場所で行われるかまたはは起こる活性をいう。

20

【0097】

本明細書中で使用される場合、用語「薬剤」、「調節剤」、および「モジュレーター」は、本明細書中で互換的に使用され、遺伝子発現プロファイルまたは免疫細胞の生物学的特性を改変し得る化合物または分子をいう。薬剤は、単一の化合物もしくは分子、または複数の化合物もしくは分子の組み合わせであり得る。例示的な薬剤としては、例えばプロスタグランジン経路を刺激することができる化合物、例えばプロスタグランジン経路アゴニスト、グルココルチコイドまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0098】

本明細書で使用される「接触する」、「治療する」、または「調節する」という用語は、免疫細胞に対して行われる作用に関して使用される場合は互換的に使用され、本明細書に開示されている1つ以上の薬剤で免疫細胞を培養し、インキュベートし、または曝露することを意味する。

30

【0099】

本明細書中で使用される場合、「非接触」または「未処理」細胞は、処理されていない細胞、例えば、対照剤またはビヒクル剤以外の薬剤と培養、接触、またはインキュベートされていない細胞である。DMSOなどの制御剤と接触した細胞、または他の媒体と接触した細胞は、非接触細胞の例である。

【0100】

本明細書で使用されるとき、「フィーダー細胞」または「フィーダー」は、フィーダー細胞が第二の細胞型の支持のための刺激、成長因子および栄養素を提供するため、第2の種類の細胞が増殖、拡大または分化することができる環境を提供するために第2の種類の細胞と共培養される1種類の細胞を表す用語である。フィーダー細胞は場合によりそれらが支持している細胞とは異なる種に由来する。例えば、幹細胞を含む特定の種類のヒト細胞は、マウス胚性線維芽細胞、または不死化マウス胚性線維芽細胞の初代培養によって支持され得る。別の例において、末梢血由来細胞または形質転換白血病細胞は、ナチュラルキラー細胞の増殖および成熟を支持する。支持細胞が増殖するのを防ぐために、照射またはマイトマイシンなどの抗有糸分裂剤での処理によって他の細胞と共培養すると、フィーダー細胞は通常不活性化され得る。フィーダー細胞は、内皮細胞、間質細胞(例えば、上皮細胞または線維芽細胞)、および白血病細胞を含み得る。上記を限定することなく、1つの特定のフィーダー細胞型は、ヒト皮膚線維芽細胞などのヒトフィーダーであり得る。別

40

50

のフィーダー細胞型は、マウス胚性線維芽細胞（MEF）であり得る。一般に、多能性を維持し、特定の系統への分化を誘導し、増殖能力を増強し、そしてエフェクター細胞のような特殊化した細胞型への成熟を促進するために、様々なフィーダー細胞を一部使用することができる。

【0101】

本明細書中で使用される場合、「フィーダーフリー」（FF）環境とは、本質的にフィーダー細胞または間質細胞を含まない、および/またはフィーダー細胞の培養によって前もって調整されていない培養条件、細胞培養または培地などの環境をいう。「予備馴化」培地とは、フィーダー細胞が少なくとも1日などの期間にわたって培地内で培養された後に収穫された培地を指す。前調整培地は、培地中で培養されたフィーダー細胞によって分泌される増殖因子およびサイトカインを含む、多くのメディエーター物質を含有する。いくつかの実施形態では、フィーダーフリー環境は、フィーダー細胞または間質細胞の両方を含まず、そしてまたフィーダー細胞の培養によって前処理されない。

10

【0102】

本明細書中で使用される場合、用語「類似体」とは、構造および機能において他の化学物質と類似し、1つの単一の元素もしくは基、または、同じ化学的足場を保持し、親の化学物質と同様に機能する場合は2つ以上の基（例えば2、3または4基）によって構造的に異なる化学分子をいう。そのような修飾は当業者にとって日常的であり、例えば、酸のエステルまたはアミドのような追加のまたは置換された化学部分、アルコールまたはチオールのためのベンジル基、およびアミン用のtert-ブトキシカルボニル基のような保護基を含む。アルキル置換（例えば、メチル、ジメチル、エチルなど）などのアルキル側鎖への修飾、ハロゲン付加、側鎖の飽和または不飽和のレベルの修飾、および置換フェニルとフェノキシなどの修飾基の付加も含まれる。類似体はまた、ビオチンまたはアビジン部分などのコンジュゲート、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素、および放射性標識、生物発光、化学発光、または蛍光部分を含み得る。また、モイエティ（moiety）は、インビボまたはエクスピボで半減期を増加させるために、または他の望ましい特性のうち、それらの細胞浸透性を増加させるように、本明細書にそれらの薬物動態学的特性を変更するために記載された薬剤に添加することができる。プロドラッグも含まれ、それは医薬品の多数の望ましい品質（例えば、溶解度、バイオアベイラビリティ、製造など）を向上させることが知られている。

20

30

【0103】

本明細書中で使用される場合、用語「増加する」は、ビヒクルまたは対照分子/組成物のいずれかによって引き起こされる応答と比較して、細胞においてより大きな生理学的応答（すなわち下流効果）を生じるまたは引き起こす作用物質の能力をいう。例えば、単離されたT細胞集団によるインターロイキン2またはTNFの産生の増加をいう。増加は、特定の細胞シグナル伝達経路を介するシグナル伝達の増加の結果としての遺伝子発現の増加であり得る。「増加した」量は典型的には統計的に有意な量であり、ビヒクル（薬剤の不在）または対照組成物によって生じる応答と比較して1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍以上（例：500、1000倍）（1以上、例えば1.5、1.6、1.7、1.8などのすべての整数および小数点を含む）の増加を含み得る。

40

【0104】

本明細書中で使用される場合、用語「減少する」とは、ビヒクルまたは対照分子/組成物のいずれかによって引き起こされる応答と比較して、細胞においてより低い生理学的応答（すなわち下流効果）を生じるまたは引き起こす作用物質の能力をいう。減少は、遺伝子発現の減少、細胞シグナル伝達の減少、または細胞増殖の減少であり得る。「減少した」量は、典型的には「統計的に有意な」量であり、ビヒクル（薬剤の不在）または対照組成物によって生じる応答の1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍以上（例、500、1000倍）（1以上、例えば1、5、1、6、1.7、1.8などのすべての整数および小数点を含む）の減少を含み得る。

50

【0105】

本明細書で使用される時、用語「相乗効果」または「相乗的」は、組み合わせの中の2つ以上の実体が互いの効果を打ち消すか中和する時に使用される「拮抗的」、および組み合わせに含まれる2つ以上の実体が、個々の効果の合計にほぼ等しい効果を生み出すときに使用される「加法的」と比較して、2つ以上の実体の共同作業がそれらの個々の効果の合計よりも大きい効果を生み出すような、増強された効果に関する2つ以上の実体の組み合わせを指す。

【0106】

本明細書中で使用される場合、用語「実質的に含まない」とは、細胞集団または培地などの組成物を記載するために使用される場合、例えば、特定の物質が95%フリー、96%フリー、97%フリー、98%フリー、99%フリー、または従来の手段で測定して検出不能であるなど、任意の起源の特定物質を含まないことをいう。特定の物質または組成物の成分が存在しないことを指す場合、「存在しない」という用語にも同様の意味が適用され得る。

10

【0107】

本明細書で使用される時、用語「約」または「およそ」は、基準の数量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量または長さに対して、最大で15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%または1%変化する数量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量または長さを指す。数量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量または長さの範囲は、基準の数量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量、または長さの±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、または±1%であり得る。

20

【0108】

本明細書で使用される時、用語「被験体」は哺乳動物を指す。対象は、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、マウス、ラット、ウサギ、またはそれらのトランスジェニック種であり得る。

【0109】

本明細書で使用される治療用組成物または方法を必要とする対象に関連して使用される場合、用語「治療する(treat)」「治療(treatment)」および「治療される(treated)」は、限定されるものではないが、疾患の1つ以上の徴候または症状の改善または排除または回復または予防の達成を含む、所望の薬理学的および/または生理学的効果を意味する。効果は、予防的であり得、および/または疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に防止することを含み得、そして/または症状の改善もしくは排除を達成する、あるいは疾患および/または疾患に起因する有害作用に対して部分的もしくは完全な治療を提供することに関して治療的であり得る。用語「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を含み、いくつかの実施形態では、(a)疾患にかかりやすいが、まだ罹っていると診断されていない対象における疾患の発生の予防すること、(b)疾患を抑制すること、またはその発症を停止すること、(c)疾患を軽減すること、または疾患の退行を誘導すること、または完全にまたは部分的に疾患の症状を排除すること、(d)造血系を再構成するなど、個体を疾患前の状態に回復させることを含む。

30

40

【0110】

本明細書中で使用される場合、「遺伝子改変」とは、遺伝子編集をいい、(1)天然の再配列、突然変異、遺伝子インプリンティングおよび/またはエピジェネティック改変に由来する改変、または(2)細胞のゲノムにおける挿入、欠失または置換による遺伝子操作によって得られる改変を含み得る。本明細書で使用される場合、遺伝子改変はまた、ドナー特異的、疾患特異的、または治療反応特異的、または治療反応特異的である供給源特異的免疫細胞の1つ以上の保持可能な治療属性を含み得る。

【0111】

本明細書中で使用される場合、用語「遺伝的刷り込み」とは、起源細胞における優先的治療特性に寄与する遺伝的または後成的情報をいう。特に選択されたドナー、疾患または治

50

療の文脈から得られる起源細胞の局面において、優先的治療属性に寄与する遺伝的刷り込みは、根底にある分子事象が同定されているかどうかにかかわらず、保持可能な表現型、すなわち優先的治療属性を明示する任意の文脈特異的遺伝子またはエピジェネティック修飾を含み得る。ドナー特異的、疾患特異的、または治療反応特異的な供給源細胞は、i P S C および i P S C 由来の造血系統細胞において保持可能な遺伝的刷り込みを含み得る。そのような遺伝的刷り込みには、限定はされないが、例えばウイルス特異的 T 細胞またはインバリアントナチュラルキラー T (i N K T) 細胞由来の単一特異的 T C R ; 追跡可能な所望の遺伝的多型、例えば、選択されたドナーにおける高親和性 C D 1 6 受容体をコードする点突然変異についてホモ接合性 ; 所定の H L A 要件、すなわち共通のハプロタイプを示す選択された H L A 適合ドナー細胞が含まれる。本明細書中で使用される場合、優先的治療特性には、誘導細胞の生着、輸送、ホーミング、生存率、自己複製、持続性、免疫応答の調節および調節、生存、ならびに細胞毒性の改善が含まれる。優先的治療特性はまた、抗原標的化受容体発現 ; H L A の提示またはその欠如、腫瘍微小環境の免疫抑制作用に対する抵抗性 ; 傍観者の免疫細胞の誘導および所望の免疫調節 ; 腫瘍外効果の減少を伴う標的特異性の改善 ; 化学療法などの治療に対する耐性に関連している。

10

【 0 1 1 2 】

本明細書で使用される、用語「安全スイッチタンパク質」は、潜在的な毒性または細胞治療のそうでなければ悪影響を防止するために設計人工タンパク質を指す。いくつかの例では、安全スイッチタンパク質発現は、そのゲノムに安全スイッチのタンパク質をコードする遺伝子が恒久的に組み込まれている移植操作された細胞の安全上の懸念に対処するために条件付きで制御されている。この条件付き調節は可変的であり得、そして小分子媒介翻訳後活性化および組織特異的および / または時間的転写調節による制御を含み得る。安全スイッチは、アポトーシスの誘導、タンパク質合成または D N A 複製の阻害、増殖停止、転写および転写後の遺伝子調節および / または抗体媒介枯渇を媒介し得る。いくつかの例では、安全スイッチタンパク質は外因性分子、例えばプロドラッグによって活性化され、活性化されると治療用細胞のアポトーシスおよび / または細胞死を誘発する。安全スイッチタンパク質の例としては、例えばカスパーゼ 9 (またはカスパーゼ 3 または 7) 、 チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、B 細胞 C D 2 0 、 修飾された E G F R 、 およびそれらの任意の組合せなどの自殺遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。この戦略では、有害事象の際に投与されるプロドラッグが自殺遺伝子産物によって活性化され、形質導入細胞を死滅させる。

20

30

【 0 1 1 3 】

本明細書で使用される「治療上十分な量」は、その意味の中に、所望の治療効果を提供するために言及している特定の治療的および / または医薬組成物の十分なおよび / または有効量を含む。正確な量は、患者の一般的な健康状態、患者の年齢、ならびに病状の段階および重症度などの要因に応じて、被験体ごとに異なり得る。特定の実施形態では、治療上十分な量は、治療される対象の疾患または状態に関連する少なくとも 1 つの症状を改善、軽減、および / または改善するのに十分かつ / または有効である。

【 0 1 1 4 】

本明細書で使用される「十分な量」は、特定の転帰または結果を達成するのに十分な、本明細書で提供される薬剤または組成物の量を指す。

40

【 0 1 1 5 】

細胞に基づく養子免疫療法の有効性を改善するための調節剤

いくつかの実施形態における本発明は、養子細胞に基づく治療に適した調節免疫細胞などの免疫細胞、例えば治療的可能性など 1 つ以上の特性を改善するのに十分な量の 1 つ以上の調節剤を含む組成物を提供する。いくつかの態様では、改善された治療的可能性を有する免疫細胞は、1 つ以上の調節剤を含まない、同様の条件下などの条件下で産生または維持される細胞と比較して、増殖、持続性、細胞毒性、および / または細胞想起 / 記憶の改善を提示した。いくつかの実施形態では、調節剤を含む作用物質または組成物を用いて免疫細胞を調節することによって、得られる免疫細胞は、少なくとも 1 つの属性の改善など

50

の1つ以上のそのような改善を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの属性を含むが、これらに限定されない、および/または少なくとも1つ以上を含む表現型の歪み（例えば、TeffやTemからTnは、Tcm、および/またはTscmおよび/またはスキュー表現型を1つ以上の他のT細胞亜集団と比較してナイーブT細胞、中枢記憶T細胞および/または幹中枢記憶T細胞の相対数の増加）：細胞拡大の増加、細胞生存率の増加；および/または腫瘍クリアランスおよび持続性における能力の向上が含まれる。いくつかの実施形態では、養子細胞に基づく治療に適したものの免疫細胞は、それらのそれぞれの標的によって分類された1つ以上のクラスの調節剤と接触、処理、または調節される。いくつかの実施形態では、細胞は、組成物または調節剤または薬剤の存在下で行われるプロセスによって少なくとも1つ以上の工程で操作される。提供された各クラスの調節剤について、いくつかの非限定的で例示的な化合物を表1に列挙する。

10

【0116】

本明細書において互換的に用いられる場合、「モジュレーター」または「調節剤」は、特定の標的（タンパク質またはコードポリヌクレオチドなど）の発現または活性を調節する能力を有する阻害剤または活性化剤を指すのに用いられる。「モジュレーター」または「調節剤」は、阻害剤および活性化剤、例えばリガンド、アゴニスト、アンタゴニストを含む。本明細書で使用される調節剤またはモジュレーターは、合成または自然発生にかかわらず、有機化合物（例えば、小さな化学分子）、ポリペプチド（例えば、ペプチドまたは抗体）、核酸（例えば、DNA、RNA、二本鎖、一本鎖、オリゴヌクレオチド、アンチセンスRNA、低分子阻害性RNA、マイクロRNA、リボザイムなど）、オリゴ糖、または脂質；またはそれらの同様に機能する（例えば、同じ標的に対する阻害または活性化）ホモログ、模倣体、誘導体、類似体または塩であり得る。

20

【0117】

阻害剤は、例えば記載されている標的タンパク質または他の標的の発現を減少または排除する；または、標的タンパク質の刺激またはプロテアーゼ阻害活性を部分的もしくは全体的に遮断する；または標的タンパク質、例えばアンタゴニストの活性を低下させる、防止する、活性化を遅らせる、不活性化する、脱感作する、または下方制御することができる薬剤である。活性化剤は、例えば記載された標的タンパク質の発現を誘導もしくは活性化し、またはプロテアーゼインヒビター活性の刺激、増加、活性化、促進化、増強化、または記載の標的タンパク質、例えばアゴニストの活性を感作または上方制御し得る。阻害剤および活性化剤についてのアッセイは、例えば、記載の標的タンパク質を発現する細胞に推定モジュレーター剤を適用し、次いで記載の標的タンパク質の発現および/または活性に対する機能的効果および効果の程度を決定することを含む。一般に、対照試料（モジュレーターで未処理またはビヒクル単独で処理）には100%の比活性値が割り当てられている。記載の標的タンパク質の阻害は、対照に対する活性値が約90%、場合により80%、70%、60%、50%、25%、10%、5%または1%以下であるときに達成される。記載の標的タンパク質の活性化は、対照に対する活性値が110%、場合により150%、200%、300%、400%、500%、または1000~3000%以上であるときに達成される。

30

【0118】

免疫細胞の治療的可能性を改善するためには、一般に、免疫細胞の質の一定の改善が含まれる。本明細書で提供されるいくつかの実施形態の調節剤による処理は、例えば特定の疾患の下、または特定の疾患に対する応答において、例えば、細胞の表現型の歪み、拡大、維持、分化、脱分化、生存、増殖、細胞毒性、持続性、および/または細胞想起/記憶の少なくとも1つを調節する、またはこれらの少なくとも1つの可能性を調節することによって治療免疫細胞の特定の生物学的特性を高め、それによって免疫細胞の治療的可能性を改善することが示されている。T細胞集団において、例えば、ナイーブ、幹細胞記憶、または中枢記憶T細胞への表現型の歪みが、ナイーブ、幹細胞記憶、または中枢記憶T細胞亜集団の数または相対比の増加、および/または、維持、拡大、分化、および/またはそれらの脱分化を調節することによるエフェクター記憶またはエフェクターT細胞亜集団の

40

50

数または相対比の減少をもたらすことは、改善されたインビボ養子治療能力のためのT細胞のより良い品質を示す。一実施形態において、ナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および/または中枢記憶T細胞の数または割合は、表に列挙される少なくとも1つの化合物を含む1つ以上の調節剤を用いた治療によりT細胞集団において増加する。一実施形態では、表現型の歪み、またはナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および/または中枢記憶T細胞の数もしくは割合の増加は、薬剤処理後の表面マーカーの発現増加によって示される。一実施形態では、表現型の歪み、またはナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および/または中枢記憶T細胞の数もしくは割合の増加は、薬剤処理後のエフェクター細胞よりもむしろナイーブまたは記憶T細胞に関連するサイトカインプロファイルによって示される。

10

【0119】

いくつかの他の実施形態において、表1中の少なくとも1つの化合物は、細胞の殺傷能力を向上させることによってT細胞の治療的可能性を向上させる。さらに他の実施形態では、表1中の少なくとも1つの化合物は、細胞の生存および増殖を増大させることによってT細胞の治療的可能性を改善する。さらに他の実施形態において、表1中の少なくとも1つの化合物は、細胞の持続性および腫瘍クリアランスにおける能力を増強することによってT細胞の治療的可能性を改善する。いくつかの実施形態において、調節剤は、DCC-2036(レバステニブ)、イマチニブ(STI571)、ニロチニブ(AMN107)、ダサチニブ(BMS-345825)、ボスチニブ(SKI-606)、ポナチニブ(AP-24534)、パフェチニブ(INNO-406)、およびPD173955の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、調節剤はDCC-2036を含む。

20

【0120】

同様に、NK細胞集団において、例えば、その維持、サブタイプの歪み、増殖、分化、および/または脱分化による適応NK細胞の数または相対比の増加は、インビボ養子治療的可能性の改善のためのNK細胞のより良い品質を示す。NK細胞集団に関して、例えば、その維持、サブタイプスイッチング、増殖、分化、および/または脱分化によるI型NK細胞の数または相対比の増加は、インビボ養子治療的可能性の改善のためのNK細胞のより良い品質を示す。

【0121】

表1においてそれぞれの標的によって分類/同定されたクラスの調節剤は、養子療法のための免疫細胞の治療的可能性を改善するそれらの可能性に基づいて発見された。理論に制限されることなく、それらは、細胞代謝、栄養素感知、増殖、アポトーシス、シグナル伝達、サイトカイン産生、感染過程に関する特性、および/または細胞機能の他の局面を調節することによって治療用免疫細胞を調節および改善する。

30

【0122】

養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞は、表1に含まれる1以上の調節剤と接触させられる。薬剤下での処理は、細胞増殖、維持、分化特性の調節、および/または増殖、細胞傷害性、持続性、および/または細胞想起/記憶の増大、次いで処理される細胞の治療的可能性の増大などによって細胞の生物学特性を改変することができる。例えば、処理は、治療的免疫細胞の生存率をエクスピボおよびインビボで向上を図ることができる。さらに、処理は、処理された細胞集団の異なる亜集団の比率を変え得る。例えば、一実施形態では、ナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および/または中枢記憶T細胞の数および割合は、表1から選択される1種以上の薬剤を用いたエクスピボ処理時に単離されたT細胞集団においてビヒクルと比較して増加する。別の実施形態では、表1から選択される1以上の薬剤を用いたNK細胞集団のエクスピボ治療時に、集団中の適応NK細胞の数および割合が増加する。

40

【0123】

表1-養子細胞療法における免疫細胞調節剤

50

【表 1 - 1】

化合物	CAS番号	群	群記述子
ドルソモルフィン	866405-64-3	I	代謝と栄養素感知
ヘプテリジン酸	74310-84-2	I	代謝と栄養素感知
1-ピロリジンカルボジチオ酸、アンモニウム塩	5108-96-3	I	代謝と栄養素感知
2-デオキシグルコース (2-DG)	154-17-6	I	代謝と栄養素感知
GSK3 β 阻害剤	例-BIO : 667463-62-9; TWS119 : 601514-19-6; CHIR99021 : 252917-06-9	II	シグナル伝達経路
Rhoキナーゼ阻害剤	例 : チアゾピピン : 1226056-71-8	II	シグナル伝達経路
MEK阻害剤	例、PD0325901 : 391210-10-9。 U0126 : 109511-58-2	II	シグナル伝達経路
PDK1アゴニスト	例 - PS48 : 1180676-32-7	II	シグナル伝達経路
TGF β 阻害剤	例 - SB431542 : 301836-41-9	II	シグナル伝達経路
6-メルカプトプリン	6112-76-1	II	シグナル伝達経路
AC-93253ヨウ化物	108527-83-9	II	シグナル伝達経路
チラトリコール	51-24 - 1	II	シグナル伝達経路
PI-103	371935-74-9	II	シグナル伝達経路
フルベストラント	129453-61-8	II	シグナル伝達経路
タプシガルギン	67526-95-8	II	シグナル伝達経路

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

SU 4312	5812-07-7	II	シグナル伝達経路
テルミサルタン	144701-48-4	II	シグナル伝達経路
シクロスポリンA	59865-13-3	II	シグナル伝達経路
1, 3, 5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール	263717 - 53 - 9	II	シグナル伝達経路
ベイ61-3606	732983-37-8	II	シグナル伝達経路
プロトポルフィリンIX二ナトリウム	553-12-8	II	シグナル伝達経路
ラパマイシン	53123-88-9	II	シグナル伝達経路
HS173	1276110-06-5	II	シグナル伝達経路
LY294002	154447-36-6	II	シグナル伝達経路
ピクチリシブ	957054-30-7	II	シグナル伝達経路
BCR-ABLチロシンキナーゼ阻害剤	例えば、 - DCC-2036 (レバステニブ) 102017 2-07-9	II	シグナル伝達経路
5-アザシチジン	320-67-2	III	増殖とアポトーシス
フルダラビン	21679-14-1	III	増殖とアポトーシス
ロスコピチン、(S) - 異性体	186692 - 45 - 5	III	増殖とアポトーシス
PAC-1	315183-21-2	III	増殖とアポトーシス
8-キノリノール、5, 7-ジクロロ -	773 76 -76 - 2	IV	抗感染症
ニトロフラントイン	67-20-9	IV	抗感染症
8-キノリノール、5-クロロ-7-ヨード -	130-26-7	IV	抗感染症

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

2-ナフタセンカルボキサミド、7-クロロ-4- (ジメチルアミノ) -1,4,4a, 5,5a, 6,11,12a-オクタフ	64-73-3	IV	抗感染症
ニフロキサジド	965-52-6	IV	抗感染症
トスフロキサシン塩酸塩	100490-36-6	IV	抗感染症
セルトラリン	79617-96-2	V	その他
ジエチレントリアミン五酢酸、ペンタナトリウム	67-43-6	V	その他
塩化エドロフォニウム	116-38-1	V	その他
BIX01294	1392399-03-9	V	その他
テルフェナジン	50679-08-8	V	その他
dmPGE 2 (16,16-ジメチルプロスタグランジンE 2)	39746-25-3	V	その他

10

【 0 1 2 4 】

20

理論に制限されることなく、表 1 の薬剤は、細胞代謝、栄養感知、増殖、アポトーシス、シグナル伝達、感染プロセスに関する特性、および/または細胞機能の他の局面の調整を介して細胞の増殖、代謝、および/または細胞分化を調節することによって養子療法のための免疫細胞の治療的可能性を改善する。当業者によって理解されるように、本発明の範囲はまた、表 1 に列挙された薬剤の塩、エステル、エーテル、溶媒和物、水和物、立体異性体またはプロドラッグを含むがこれらに限定されない類似体または誘導体を含む。例えば、表 1 の薬剤、dmPGE 2 (16, 16-ジメチルプロスタグランジンE 2、16, 16-ジメチルPGE 2) の類似体および誘導体の例示的な例としては、これらに限定されないが、PGE 2、16, 16-ジメチルPGE 2 P- (P-アセトアミドベンズアミド) フェニルエステル、11-デオキシ-16, 16-ジメチルPGE 2、9-デオキシ-9-メチレン-16, 16-ジメチルPGE 2、9-デオキシ-9-メチレンPGE 2、9-ケトフルプロステノール、5-トランスPGE 2、17-フェニル-オメガ-トリノルPGE 2、PGE 2セリノールアミド、PGE 2メチルエステル、16-フェニルテトラノルPGE 2、15 (S) -15-メチルPGE 2、15 (R) -15-メチルPGE 2、8-イソ-15-ケトPGE 2、8-イソPGE 2イソプロピルエステル、8-イソ16シクロヘキシルテトラノルPGE 2、20-ヒドロキシPGE 2、20-エチルPGE 2、11-デオキシPGE i、ノクロプロスト、スルプロストン、ブタプロスト、15-ケトPGE 2、および19 (R) ヒドロキシPGE 2が含まれる。9-位でハロゲン置換されているPGE 2と類似の構造を有するPG類似体または誘導体 (例えば、その開示全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 2001 / 12596 参照)、ならびにその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2006 / 0247214 号明細書に記載されているもののような2-デカルボキシ-2-ホスフィニコプロスタグランジン誘導体も含まれる。

30

40

【 0 1 2 5 】

本明細書で企図される組成物での使用に適したGSK-3 (グリコーゲンシンターゼキナーゼ3ベータ) 阻害剤には、これらに限定されないが、ケンパウロン、1-アザケンパウロン、CHIR99021, CHIR98014, AR-A014418, CT99021, CT20026, SB216763, AR-A014418、リチウム、TDZD-8、BIO、BIO-アセトキシム、(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-(2-フェニルキナゾリン-4-イル)アミン、ピリドカルバゾール-シクロペンタジエニルルテニウム錯体、TDZD-84-ベンジル-2-メチル-1, 2, 4-チアジアゾリジン-3, 5-ジオン、2-チオ

50

(3-ヨードベンジル)-5-(1-ピリジル)-[1,3,4]-オキサジアゾール、OTDZT、-4-ジプロモア-セトフェノン、AR-AO144-18、3-(1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)-4-ピラジン-2-イル-ピロール-2,5-ジオン；TWS119、L803H-KEAPPAPPQSP-NH₂またはそのミリストイル化形態；2-クロロ-1-(4,5-ジプロモ-チオフェン-2-イル)-エタノン；GF1099203X；RO318220；TDZD-8；TIBPOおよびOTDZTが含まれる。一実施形態において、GSK-3 阻害剤は、CHIR99021、BIO、TWS119、またはケンパウロンである。一実施形態において、GSK-3 阻害剤はTWS119である。別の実施形態において、GSK-3 阻害剤はCHIR99021である。さらに別の実施形態では、GSK-3 阻害剤はBIOである。

10

【0126】

本明細書で企図される組成物における使用に適したERK/MEK阻害剤には、PD0325901、PD98059、UO126、SL327、ARRY-162、PD184161、PD184352、スニチニブ、ソラフェニブ、バンデタニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、GSK120212、ARRY-438162、RO5126766、XL518、AZD8330、RDEAI19、AZD6244、FR180204、PTK787、6-(4-ブromo-2-クロロ-フェニルアミノ)-7-フルオロ-3-メチル-3H-ベンゾイミダゾール-e-5-カルボン酸(2,3-ジヒドロキシ-プロポキシ)-アミド；6-(4-ブromo-2-クロロ-フェニルアミノ)-7-フルオロ-3-(テトラヒドロ-ピラン-2-イル-エチル)-3H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸(2-ヒドロキシ-エトキシ)-アミド、1-[6-(4-ブromo-2-クロロ-フェニルアミノ)-7-フルオロ-3-メチル-3H-ベンゾイミダゾール-5-イル]-2-ヒドロキシ-エタノン、6-(4-ブromo-2-クロロ-フェニルアミノ)-7-フルオロ-3-メチル-3H-ベンゾイミダゾール-e-5-カルボン酸(2-ヒドロキシ-1,1-ジメチル-エトキシ)-アミド、6-(4-ブromo-2-クロロ-フェニルアミノ)-7-フルオロ-3-(テトラヒドロフラン-2-イル-エチル)-3H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸(2-ヒドロキシ-エトキシ)-アミド、6-(4-ブromo-2-フルオロ-フェニルアミノ)-7-フルオロ-3-メチル-3H-ベンゾイミダゾール-e-5-カルボン酸(2-ヒドロキシ-エトキシ)-アミド、6-(2,4-ジクロロ-フェニルアミノ)-7-フルオロ-3-メチル-3H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸(2-ヒドロキシ-エトキシ)-アミド、6-(4-ブromo-2-クロロ-フェニルアミノ)-7-フルオロ-3-メチル-3H-ベンゾイミダゾール-e-5-カルボン酸(2-ヒドロキシ-エトキシ)-アミド、2-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-N-(2-ヒドロキシエトキシ)-1,5-ジメチル-6-オキソ-1,6-ジヒドロピリジン-3-カルボキサミド、以後MEK阻害剤2と称す；および4-(4-ブromo-2-フルオロフェニルアミノ)-N-(2-ヒドロキシエトキシ)-1,5-ジメチル-6-オキソ-1,6-ジヒドロピリダジン-3-カルボキサミドまたはそれらの薬剂的に許容できる塩が含まれる。さらなる例示的なMEK/ERK阻害剤としては、国際公開特許出願WO99/01426、WO02/06213、WO03/077914、WO05/051301およびWO2007/044084に開示されている化合物が挙げられる。一実施形態において、MEK阻害剤はPD0325901である。他の実施形態では、MEK阻害剤はUO126である。

20

30

【0127】

本明細書で企図される組成物での使用に適したROCK(Rho関連キナーゼ)阻害剤としては、チアゾピピン、Y27632、ファスジル、AR122-86、Y27632H-1152、Y-30141、Wf-536、HA-1077、ヒドロキシル-HA-1077、GSK269962A、SB-772077-B、N-(4-ピリジル)-N'-(2,4,6-トリクロロフェニル)尿素、3-(4-ピリジル)-1H-インドール、(R)-(+)-トランス-N-(4-ピリジル)-4-(1-アミノエチル)-シクロヘキサンカルボキサミド、および米国特許第8,044,201号に開示されているROCK阻害剤(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、ROCK阻害剤は、チアゾピピン、Y27632、またはピリンテグリンである。一実施形態では、ROCK阻害剤はチアゾピピンである。

40

50

【0128】

本明細書で企図される組成物での使用に適したTGF 受容体/A L K 5阻害剤には、S B 4 3 1 5 4 2 ; A - 8 3 - 0 1 (3 - (6 - メチル - 2 - ピリジニル) - N - フェニル - 4 - (4 - キノリニル) - 1 H - ピラゾール - 1 - カルボチオアミド ; 2 - (3 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 1 , 5 - ナフチリジン、W n t 3 a / B I O、G W 7 8 8 3 8 8 (- 4 - [3 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] ピリジン - 2 - イル } - N - (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) ベンズアミド)、S M 1 6、I N - 1 1 3 0 (3 - ((5 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 4 - (キノキサリン - 6 - イル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) メチル) ベンズアミド)、G W 6 6 0 4 (2 - フェニル - 4 - (3 - ピリジン - 2 - イル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) ピリジン)、S B - 5 0 5 1 2 4 (2 - (5 - ベンゾ [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル - 2 - t e r t - ブチル - 3 H - イミダゾール - 4 - イル) - 6 - メチルピリジン塩酸塩 ; S U 5 4 1 6 ; 2 - (5 - ベンゾ [1 , 3] ジオキソール) - 5 - イル - 2 - t e r t - ブチル - 3 H - イミダゾール - 4 - イル) - 6 - メチルピリジン塩酸塩 (S B - 5 0 5 1 2 4) ; レデリムパム (C A T - 1 5 2) ; メテリムマブ (C A T - 1 9 2) ; G C - 1 0 0 8 ; I D 1 1 ; A P - 1 2 0 0 9 ; A P - 1 1 0 1 4 ; L Y 5 5 0 4 1 0 ; L Y 5 8 0 2 7 6 ; L Y 3 6 4 9 4 7 ; L Y 2 1 0 9 7 6 1 ; S D - 2 0 8 ; S M 1 6 ; N P C - 3 0 3 4 5 ; K i 2 6 8 9 4 ; S B - 2 0 3 5 8 0 ; S D - 0 9 3 ; グリベック ; 3 , 5 , 7 , 2 ' , 4 ' - ペンタヒドロキシフラボン (モリン) ; アクチビン - M 1 0 8 A ; P 1 4 4 ; 可溶性 T B R 2 - F c ; およびピリミジン誘導體 (例えば、S t i e f l ら、W O 2 0 0 8 / 0 0 6 5 3 に列挙されているものを参照 (その全体が参照により本明細書に組み入れられる)) が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、「A L K 5 阻害剤」は非特異的キナーゼ阻害剤を包含することを意図しないが、「A L K 5 阻害剤」は A L K 5 に加えて A L K 4 および / または A L K 7 を阻害する阻害剤、例えば S B - 4 3 1 5 4 2 を包含すると理解されるべきである。 (例えば、I n m a n ら、J . M o l . P h a r m a c o l . 6 2 (1) : 6 5 ~ 7 4 (2 0 0 2 を参照) 。さらに、T G F / アクチビン経路の阻害は A L K 5 を阻害するのと同様の効果を有すると考えられる。したがって、T G F / アクチビン経路の任意の阻害剤 (例えば上流または下流) を、本明細書の各段落に記載の A L K 5 阻害剤と組み合わせて、またはその代わりに使用することができる。例示的な T G F / アクチビン経路阻害剤には、限定されないが、T G F 受容体阻害剤、S M A D 2 / 3 リン酸化の阻害剤、S M A D 2 / 3 と S M A D 4 の相互作用の阻害剤、ならびに S M A D 6 と S M A D 7 の活性化剤 / アゴニストが含まれる。さらに、以下に記載される分類は単に編成目的のためであり、当業者は化合物が経路内の 1 つ以上の点に影響を及ぼし得、従って化合物が 2 つ以上の定義されたカテゴリで機能し得ることを知っている。一実施形態において、T G F 受容体阻害剤は S B 4 3 1 5 4 2 を含む。

【0129】

P D K 1 または 3 ' - ホスホイノシチド依存性キナーゼ - 1 は、A K T / P K B および P K C、S 6 K、S G K を含む他の多くの A G C キナーゼの活性化に関連するマスターキナーゼである。P D K 1 の重要な役割は、インスリンシグナル伝達を含むいくつかの成長因子およびホルモンによって活性化されるシグナル伝達経路にある。例示的な P D K 1 アゴニストは、スフィンゴシンを含む (K i n g ら、J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y、2 7 5 : 1 8 1 0 8 ~ 1 8 1 1 3、2 0 0 0) 。P D K 1 の例示的なアロステリック活性化剤としては、P S 4 8 ((Z) - 5 - (4 - クロロフェニル) - 3 - フェニルペンタ - 2 - エン酸)、P S 0 8 ((Z) - 5 - (4 - プロモ - 2 - フルオロフェニル) - 3 - が挙げられる。フェニルペンタ - 2 - エン酸)、1 - (2 - (3 - (4 - クロロフェニル) - 3 - オキソ - 1 - フェニルプロピルチオ) 酢酸 ; 3 , 5 - ジフェニルペンタ - 2 - エン酸、例えば化合物 1 2 Z (2 -) (3 - (4 - クロロフェニル) - 3 - オキソ - 1 - フェニルプロピルチオ) 酢酸、(Z) - 5 - (ナフタレン - 2 - イル) - 3 - フェニルペンタ - 2 - エン酸)、および化合物 1 3 Z ((Z)) - 5 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 3 - フェニルペンタ - 2 - エン酸)。一実施形態では、P D K 1 アゴニストは P S 4 8 を含む。

【0130】

10

20

30

40

50

B C R - A B L チロシンキナーゼ阻害剤 (T K I) は酵素 B C R - A B L チロシンキナーゼを阻害する。本明細書で企図される組成物で使用するのに適した B C R - A B L チロシンキナーゼ阻害剤には、 D C C - 2 0 3 6 (レバステニブ)、イマチニブ (S T I 5 7 1)、ニロチニブ (A M N 1 0 7)、ダサチニブ (B M S - 3 4 5 8 2 5)、ボスチニブ (S K I - 6 0 6)、ボナチニブ (A P - 2 4 5 3 4)、パフェチニブ (I N N O - 4 0 6)、 P D 1 7 3 9 5 5 が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、 B c r - A b l チロシンキナーゼ阻害剤は D C C - 2 0 3 6 を含む。

【 0 1 3 1 】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、表 1 から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む。一実施形態では、免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、表 1 から選択される薬剤の少なくとも 2、3、4、5、もしくは 6、または任意の数の組み合わせを含む。

10

【 0 1 3 2 】

一実施形態では、表 1 から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む組成物はさらに有機溶媒を含む。特定の実施形態では、有機溶媒は酢酸メチルを実質的に含まない。特定の実施形態において、有機溶媒は、ジメチルスルホキシド (D M S O)、N、N-ジメチルホルムアミド (D M F)、ジメトキシエタン (D M E)、ジメチルアセトアミド、エタノール、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、有機溶媒は D M S O である。いくつかの実施形態では、有機溶媒はエタノールである。いくつかの他の実施形態では、有機溶媒は D M S O とエタノールの混合物である。

20

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群 I : ドルソモルフィン、ヘプテリジン酸、1-ピロリジンカルボジチオ酸、および 2 - D G から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む。理論に限定されることなく、他の潜在的な役割の中でも、群 I の薬剤は細胞代謝および栄養素感知に影響を及ぼし得る。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群 I I : G S K 3 阻害剤、R O C K 阻害剤、T G F 受容体阻害剤、M E K 阻害剤、P D K 1 アゴニスト、6-メルカプトプリン、A C - 9 3 2 5 3 ヨウ化物、チラトリコール、P I - 1 0 3、フルベストラント、タプシガルギン、S U 4 3 1 2、U 0 1 2 6、テルミサルタン、シクロスポリン A、1、3、5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1 H-ピラゾール、B A Y 6 1 - 3 6 0 6、プロトポルフィリン I X ニアトリウム、ラパマイシン (m T O R 阻害剤)、T W S 1 1 9、H S 1 7 3、L Y 2 9 4 0 0 2、ピクチリシブ、および D C C - 2 0 3 6 (レバステニブ) から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む。理論に限定されることなく、他の潜在的な役割の中でも、群 I I の薬剤は、様々な機能的経路におけるシグナル伝達に影響を及ぼし得る。

30

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群 I I I : 5-アザシチジン、フルダラビン、ロスコビチン、および P A C - 1 から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む。理論に限定されることなく、他の潜在的な役割の中でも、群 I I I の薬剤は細胞増殖およびアポトーシスに影響を及ぼし得る。

40

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群 I V : 5、7-ジクロロ-8-キノリノール、2-ナフタセンカルボキサミド、7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1、4、4 a、5、5 a、6、1 1、1 2 a-オクタフ、ニフロキサジド、およびトスフロキサシン塩酸塩から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む。理論に限定されることなく、他の潜在的な役割の中でも、群 I V の薬剤は感染プロセスに関連する細胞特性に影響を与える可能性がある。

50

【0137】

いくつかの実施形態では、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群V：セルトラリン、ジエチレントリアミン五醋酸、エドロホニウムクロリド、BIX01294、テルフェナジン、およびdmPGE2から選択される少なくとも1つの薬剤を含む。理論に限定されないが、他の潜在的な役割の中でも、群Vの薬剤は、一般に、拡大、維持、細胞分化、およびインビボ増殖、細胞毒性、細胞想起応答、および/または持続性に関する他の細胞特性に影響を及ぼし得る。

【0138】

さらに他の実施形態では、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群Iから選択される少なくとも1つの薬剤と、群II、群III、群IV、および群Vから選択される少なくとも1つ以上の調節剤を含む。

10

【0139】

いくつかの他の実施形態では、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群IIから選択される少なくとも1つの物質と、群I、群III、群IVおよびまたは群Vから選択される少なくとも1つ以上の調節剤を含む。

【0140】

さらに他の実施形態では、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群IIIから選択される少なくとも1つの薬剤と、群I、群II、群IVおよび群Vから選択される少なくとも1つ以上の調節剤を含む。

【0141】

さらに他の実施形態では、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群IVから選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに群I、群II、群IIIおよび群Vから選択される少なくとも1つ以上の調節剤を含む。

20

【0142】

さらに他の実施形態では、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、群IVから選択される少なくとも1つの薬剤、ならびに群I、群II、群IIIおよび群Vから選択される少なくとも1つ以上の調節剤を含む。

【0143】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の治療的可能性を改善するための組成物は、GSK3 阻害剤、MEK阻害剤、ROCK阻害剤、TGF阻害剤、PDK1アゴニスト、およびBCR-ABLチロシンキナーゼ阻害剤からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤を含む。

30

【0144】

いくつかの実施形態において、組成物は表1から選択される2つ以上の薬剤の組み合わせを含み、薬剤は組み合わせにおいて相加効果を有する。定義されたように、「添加剤」は、組み合わせ中の2つ以上の薬剤がそれらの個々の効果の合計にほぼ等しい効果を生み出すときを指す。いくつかの実施形態では、組み合わせ中の1つ以上の薬剤は同じ群：群I、II、III、IV、またはVからである。いくつかの実施形態では、組み合わせ中の1つ以上の薬剤は異なる群からである。

【0145】

いくつかの実施形態では、組成物は表1から選択される2つ以上の薬剤の相乗的組み合わせを含む。定義されるように、「相乗効果」は、それらの個々の効果の合計よりも大きい効果を生み出すために2つ以上の薬剤と一緒に作用させることなどの強化された効果である。一実施形態において、相乗的組み合わせを含む組成物は、TWS119、HS173、LY294002、ピクチリシブ、および2-DGからなる群から選択される少なくとも1つの薬剤を含む。一実施形態では、組成物は、TWS119、HS173、LY294002、ピクチリシブ、および2-DGからなる群から選択される少なくとも1つの薬剤と、表1に記載の化合物の群から選択される1つ以上の追加の薬剤とを含む組み合わせを含む。一実施形態において、TWS119を含む組成物は表1から選択される2つ以上の追加の薬剤をさらに含む。一実施形態では、HS173を含む組成物は表1から選択された

40

50

2つ以上の追加の薬剤をさらに含む。一実施形態において、LY294002を含む組成物は表1から選択される2つ以上の追加の薬剤をさらに含む。一実施形態において、ピクチリシブを含む組成物は、表1から選択される2つ以上の追加の薬剤をさらに含む。一実施形態において、2-DGを含む組成物は表1から選択される2つ以上の追加の薬剤をさらに含む。

【0146】

いくつかの実施形態では、表1に列挙される化合物からなる群から選択される1つ以上の調節剤を含む組成物は、ペプチド、サイトカイン、マイトジェン、成長因子、小RNA、dsRNA(二本鎖RNA)、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分もしくは置換因子、および/または目的の1つ以上のポリ核酸を含むベクターからなる群から選択される1つ以上の追加的な添加剤を含む。

10

【0147】

いくつかの実施形態では、サイトカインおよび成長因子は、以下のサイトカインまたは成長因子：上皮成長因子(EGF)、酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、白血病抑制因子(LIF)、肝細胞増殖因子(HGF)、インスリン様増殖因子1(IGF-1)、インスリン様増殖因子2(IGF-2)、ケラチノサイト増殖因子(KGF)、神経増殖因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、形質転換増殖因子ベータ(TGF-β)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)トランスフェリン、さまざまなインターロイキン(IL-1からIL-18など)、さまざまなコロニー刺激因子(顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)など)、各種インターフェロン(IFN-αなど)、幹細胞因子(SCF)およびエリスロポエチン(Epo)の1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、サイトカインは、少なくともインターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン7(IL-7)、インターロイキン-12(IL-12)、インターロイキン-15、インターロイキン18(IL-18)、インターロイキン21(IL-21)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、組成物の成長因子は線維芽細胞成長因子を含む。これらのサイトカインは、例えばR&D Systems(ミネソタ州ミネアポリス)から商業的に入手することができ、そして天然または組換えのいずれかであり得る。特定の実施形態では、成長因子およびサイトカインは、本明細書で企図されている濃度で添加され得る。特定の実施形態では、成長因子およびサイトカインは、経験的に、または確立されたサイトカイン技術によって導かれるように決定される濃度で添加され得る。

20

30

【0148】

いくつかの実施形態では、組成物の添加剤としてのマイトジェンはコンカナバリンAを含む。いくつかの他の実施形態では、組成物のフィーダー細胞は遺伝的に修飾されている。いくつかの実施形態では、組成物のフィーダー細胞は、単核血球、胸腺上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、白血病細胞K562、Raji細胞、またはそれらのフィーダー細胞成分もしくはそれらの置換因子のうちの1つ以上を含む。

【0149】

いくつかの態様において、組成物の小RNAは、siRNA、shRNA、miRNA、およびアンチセンス核酸のうちの1つまたは複数を含む。いくつかの他の実施形態では、組成物の小RNAは、miR-362~5p、miR-483~3p、miR-210およびmiR-598のうちの1つ以上を含む。

40

【0150】

いくつかの実施形態において、目的の1つ以上のポリ核酸を含む組成物のベクターは、組み込み型または非組み込み型である。いくつかの実施形態において、目的の1つ以上のポリ核酸を含む組成物のベクターは、アデノウイルスベクター、プラスミドベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクターおよびエピソーマルベクターの骨格をさらに含む。いくつかの実施形態において、動物細胞における発現のためのプラスミドベクターとしては、例えば、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが挙げら

50

れる。いくつかの態様において、ベクターに含まれる1つ以上のポリ核酸は、1つ以上のタンパク質またはポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、1つ以上のポリ核酸は、デルタ様1 (DLL1)、デルタ様3 (DLL3)、デルタ様4 (DLL4)、Jagged1 (Jag1)、またはJagged2をコードする。いくつかの実施形態では、1つ以上のポリ核酸はJagged 1をコードする。

【0151】

いくつかの実施形態では、組成物は少なくとも1つの治療薬をさらに含む。一実施形態では、治療薬は抗体または抗体断片を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体または抗体断片はウイルス抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、組成物の抗体としては、抗CD20 (レチキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ)、抗Her2 (トラスツズマブ)、抗CD52 (アレムツズマブ)、抗EGFR (セツキシマブ)、および抗CD38 (ダラツムマブ)、ならびにそれらのヒト化およびFc修飾変異体が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、抗CD19、CD20、およびCD33抗原などの腫瘍細胞抗原を標的とする抗体のFab領域を、免疫細胞の表面タンパク質を認識する別のFab領域と組み合わせて融合する、二重および三重特異性抗体の設計は細胞を刺激し、続いて腫瘍細胞を殺す。

【0152】

いくつかの実施形態において、組成物への追加の添加剤は、化学療法剤、放射性部分、および免疫調節薬 (IMiD) のうちの1つ以上を含む。サリドマイド、レナリドマイド、およびポマリドマイドなどの免疫調節薬は、NK細胞とT細胞の両方を刺激する。化学療法剤は、細胞傷害性抗悪性腫瘍剤を指し、すなわち新生細胞を優先的に殺すかまたは急速に増殖する細胞の細胞周期を破壊するか、または幹癌細胞を根絶することが見出され、そして新生細胞の増殖を予防または低減するために治療的に用いられる。化学療法剤はまた、抗新生物剤または細胞毒性剤または薬剤とも呼ばれ、そして当該分野において周知である。

【0153】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン、アルキル化剤、アルキルスルホネート、アジリジン、エチレンイミン、メチルメラミン、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、プリン類似体を含む。ピリミジン類似体、酵素、ポドフィロトキシン、白金含有剤、インターフェロン、およびインターロイキンを含む。例示的な化学療法剤は、これらに限定されないが、薬 (シクロホスファミド、メクロレタミン、メファリン、クロラムブシル、ヘマメチルメラミン、チオテパ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン)、代謝拮抗剤 (メトトレキサート、フルオロウラシル、フロキシウリジン、シタラビン、6-メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン)、ピンカアルカロイド (ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン)、エピポドフィロトキシン (エトポシド、エトポシドオルトキノン、およびテニポシド)、抗生物質 (ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、ピサントレン、アクチノマイシンD、プリカマイシン、プロマイシン、およびグラミシジンD)、パクリタキセル、コルヒチン、シトカラシンB、エメチン、マイタンシン、タンシン、およびアムサクリンが挙げられる。追加の薬剤は、アミノグルテチミド (aminoglutethimide)、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、アルトレタミン、シクロホスファミド、ロムスチン (CCNU)、カルムスチン (BCNU)、イリノテカン (CPT-11)、アレムツザマブ (alemtuzumab)、アルトレタミン、アナストロゾール、L-アスパラギナーゼ、アザシチジン、ベバシズマブ、ベキサロテン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルステロン、カペシタビン、セレコキシブ、セツキシマブ、クラドリピン、クロフラビン、シタラビン、ダカルバジン、デニロイキン・ディフティトックス、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドロモスタノロン、エピルピシン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エチニルエストラジオール、エキセメスタン、フロキシウリジン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、フ

10

20

30

40

50

ルタミド、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタピン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロンアルファ(2a、2b)、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイブロリド、レバミゾール、メクロレタミン、メゲストロール、メルファラン(melphalin)、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、ノフェツモマブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペメトレキセド、ペガデマゼ、ペガパラガス、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ポリフェプロサン、ポルフィマー、プロカルバジン、キナクリン、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニボシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテバ、トポテカン(topotecan)、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルルピシン、ビノレルピン、ゾレドロネートが挙げられる。

10

【0154】

追加の適切な治療薬は、化学療法薬または放射線療法薬として承認され、そして当技術分野において公知であるものを含む、ヒトでの使用が承認されているものである。そのような薬剤は、多数の標準的な内科医および腫瘍医の参考文献(例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, N.Y., 1995)または米国国立がん研究所ウェブサイト(fda.gov/cder/cancer/druglistfrarne.htm)のいずれによっても参照することができ、両方とも随時更新される。

20

【0155】

II. 調節のための免疫細胞および調節された免疫細胞

本発明は、表1から選択される1つ以上の調節剤とインビトロまたはエクスピボで接触させた免疫細胞の単離集団または亜集団を含む組成物を提供する。一実施形態において、免疫細胞の単離された集団または亜集団は、免疫細胞の治療的可能性を向上させるのに十分な量で表1から選択される1つ以上の調節剤とエクスピボで接触されている。いくつかの実施形態では、処理された免疫細胞は細胞に基づく養子療法に用いられる。本発明はさらに、免疫細胞の集団または亜集団、および表1に列挙された薬剤から選択される1つ以上の調節剤を提供し、ここで1つ以上の前記薬剤を用いた単離免疫細胞の集団または亜集団の接触による処理が治療養子療法のための免疫細胞の治療的可能性を改善する。当該処理は、免疫細胞の生物学的特性を改変して、細胞増殖、細胞毒性、持続性を改善し、そして/または細胞療法の再発率を低下させることができる。

30

【0156】

いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤は、表1から選択される少なくとも1つの化合物、およびそれらの誘導体または類似体を含む。いくつかの態様において、調節された免疫細胞の集団はT細胞を含む。いくつかの態様において、調節された免疫細胞の集団はNK細胞を含む。いくつかの態様において、調節された免疫細胞の集団はNK T細胞を含む。

【0157】

いくつかの実施形態では、1つ以上の調節剤と接触させたT細胞の集団または亜集団は、同じ処置をしていないT細胞と比較して、ナイーブT細胞(Tn)、幹細胞記憶T細胞(Tscm)、および/または中枢記憶T細胞(Tcm)の数および相対比の増加、および/または細胞増殖、細胞毒性、細胞想起応答、および/または持続性の改善を含む。いくつかの実施形態では、Tn、Tscm、および/またはTcmの数は、表1から選択された1つ以上の調節剤を用いた同じ処置をしていない細胞集団のTn、Tscm、および/またはTcmの数と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上増加するか、または少なくとも2、3、4、5、10、15、もしくは20倍以上増加する。

40

【0158】

50

いくつかの実施形態では、表 1 から選択される 1 つ以上の前記調節剤と接触と接触させた NK 細胞の集団または亜集団は、同じ処置をしていない NK 細胞と比較して、適応（または記憶）NK 細胞の数または相対比の増加、および / または細胞増殖、細胞毒性、細胞想起応答、および / または持続性の改善を含む。いくつかの実施形態では、適応 NK 細胞の数は、同じ処置をしていない細胞集団中の適応 NK 細胞の数と比較して、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 以上増加するか、または少なくとも 2、3、4、5、10、15、または 20 倍以上増加する。一実施形態では、1 つ以上の前記薬剤と接触させた NK 細胞の集団または亜集団は、数または相対比が増加した適応 NK 細胞を含む。1 つの実施形態では、適応 NK 細胞は CD3-および CD56+、ならびに CD57+、NKG2C+、低 PLZF、低 SYK、低 FcR、低 EAT-2、低 TIGIT、低 PD1、低 CD7、低 CD161、高 LILRB1、高 CD45RO、および低 CD45RA の少なくとも 1 つによって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、適応 NK 細胞は CD57+、NKG2C+、低 PLZF、低 SYK、低 FcR、低 EAT-2、低 TIGIT、低 PD1、低 CD7、低 CD161、高 LILRB1、高 CD45RO、および低 CD45RA のうちの少なくとも 2 つである。例えば、適応 NK 細胞は CD57+ および NKG2C+ であり得る。いくつかの実施形態では、適応 NK 細胞は CD57+、NKG2C+、低 PLZF、低 SYK、低 FcR、低 EAT-2、低 TIGIT、低 PD1、低 CD7、低 CD161、高 LILRB1、高 CD45RO、および低 CD45RA のうちの少なくとも 3 つである。例えば、適応型 NK 細胞は、SYK-、FcR-、および EAT-2- であり得る。一の実施形態では、1 つ以上の前記薬剤と接触させた NK 細胞の集団または亜集団は、GSK3 阻害剤、MEK 阻害剤、ROCK 阻害剤、TGF 阻害剤、PK1 アゴニスト、および / またはラパマイシンとさらに接触される。一実施形態において、GSK3 阻害剤は、CHIR99021、BIO、TWS119、またはケンパウロンである。一実施形態において、GSK3 阻害剤は TWS119 である。別の実施形態において、GSK3 阻害剤は CHIR99021 である。さらに別の実施形態では、GSK3 阻害剤は BIO である。

【0159】

いくつかの他の実施形態では、1 つ以上の調節剤と接触させた NK T 細胞の集団または亜集団は、表 1 から選択される 1 つ以上の前記調節剤で処置をしていない NK T 細胞の単離集団または亜集団と比較して、II 型に対する I 型 NK T の数または相対比の増加、および / または細胞増殖、細胞毒性、細胞想起応答の改善、および / または持続性の改善が含まれる。いくつかの実施形態では、I 型 NK T 細胞の数は、I 型 NK T 細胞の数は、表 1 から選択される 1 つ以上の前記調節剤で処置をしていない I 型 NK T 細胞の数と比較して、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 以上増加するか、または少なくとも 5、10、15、または 20 倍以上増加する。

【0160】

いくつかの非限定的な実施形態において、調節された免疫細胞集団のナイーブ T 細胞 (Tn)、幹細胞記憶 T 細胞 (Tscm)、中枢記憶 T 細胞 (Tcm)、適応 NK 細胞、および / または I 型 NK T 細胞の数または相対比の増加は、これらの細胞サブタイプの維持と拡大の増加、および / または、より成熟した細胞サブタイプから所望の分化状態における細胞サブタイプへの細胞脱分化 / 再プログラミングの増加、および / または一方からもう一方への表現型の歪みに起因する。

【0161】

いくつかの実施形態において、免疫細胞の集団を表 1 に含まれる 1 種以上の前記調節剤と接触させた後、調節細胞集団のナイーブ T 細胞 (Tn)、幹細胞記憶 T 細胞 (Tscm)、中枢記憶 T 細胞 (Tcm) の数は未処理免疫細胞集団と比較して増加する。ここで Tn、Tscm および Tcm は、CCR7 および / または CD62L の共発現によって特徴付けられる。

【0162】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の集団を表 1 に含まれる 1 つ以上の前記調節剤と接触

10

20

30

40

50

させた後、調節細胞集団中の適応NK細胞の数は未処理免疫細胞集団と比較して増加する。ここで適応NK細胞はCD3⁻、CD56⁺、CD16⁺、NKG2C⁺、およびCD57⁺によって特徴付けられる。いくつかの他の実施形態では、適応NK細胞はCD3⁻およびCD56⁺、ならびにCD57⁺、NKG2C⁺、低PLZF、低SYK、低FcR、低EAT-2、低TIGIT、低PD1、低CD7、低CD161、高LILRB1、高CD45RO、および低CD45RAのうちの少なくとも1つ、2つ、または3つによって特徴付けられる。

【0163】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の集団を表1に含まれる1つ以上の前記調節剤と接触させた後、調節細胞集団中のI型NKT細胞の数は未処理免疫細胞集団と比較して増加する。ここでI型NKT細胞は、表面抗原CD3⁺、CD56⁺、TCRV24⁺、および/またはTCRV11⁺によって特徴付けられる。

10

【0164】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される調節剤による処理のためのT、NKまたはNKT細胞の集団または亜集団は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物から単離することができる。そのような非ヒト哺乳動物の例には、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が含まれるがこれらに限定されない。

【0165】

調節のためのT細胞の集団または亜集団は、末梢血、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、および感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織および腫瘍を含むがこれらに限定されない多くの供給源から入手または単離することができる。骨髄は大腿骨、腸骨稜、股関節、肋骨、胸骨、その他の骨から採取できる。さらに、Jurkat、SupT1などの当技術分野で利用可能なT細胞株も使用することができる。

20

【0166】

調節のためのNK細胞の集団または亜集団は、末梢血、臍帯血、および腫瘍を含むがこれらに限定されない多数の供給源から得ることができ、または濃縮することができる。

【0167】

調節のための完全に成熟したNKT細胞は、骨髄、リンパ節組織および臍帯血、胸腺組織において潜在的に見出される成熟NKT細胞のより小さな集団を用いて、末梢血から得ることができ、または濃縮することができる。

30

【0168】

本発明の特定の実施形態では、調節のためのT、NK、および/またはNKT細胞を含む免疫細胞の単離または濃縮された集団もしくは亜集団は、当業者に公知の任意の数の技術、例えばFicoll(商標)分離を用いて血液単位から得ることができる。一実施形態では、個体の循環血液由来のT細胞、NK細胞またはNKT細胞は、アフレーシスによって得られる。アフレーシス生成物は通常、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、NK細胞、NKT細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含む細胞を含む。一実施形態では、アフレーシスによって収集された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、その後の処理工程のために細胞を適切な緩衝液または培地に入れることができる。本発明の一実施形態では、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄する。代替の実施形態では、洗浄液はカルシウムを欠き、マグネシウムを欠くことがあり、または全部ではないとしても多くの二価カチオンを欠くことがある。当業者には容易に理解されるように、洗浄工程は、製造元の指示に従って、半自動「フロースルー」遠心分離機(例えば、Cobe 2991細胞プロセッサ、Baxter Cytomate、またはHaemonetics Cell Saver 5)を使用するような当業者に公知の方法によって達成することができる。洗浄後、細胞は、例えば、Caを含まない、Mgを含まないPBS、PlasmaLyte A、または緩衝液を含むもしくは含まない他の食塩水などの様々な生体適合性緩衝液に再懸濁され得る。あるいは、アフレーシスサンプルの望ましくない成分を除去し、細胞を培地に直接再懸濁することができる。

40

50

【 0 1 6 9 】

別の実施形態では、T、NKまたはNK T細胞を含む免疫細胞の集団、または調節のためのそれらの亜集団は、例えば、PERCOLL（商標）勾配または向流遠心遠心洗浄選別によって、赤血球を溶解し、単球を除去することによって末梢血リンパ球から単離または濃縮される。

【 0 1 7 0 】

一実施形態では、調節のためのT細胞の特定の亜集団は、例えばCD3、CD28、CD4、CD8、CD45RA、CD45RO、CD62L、CCR7、CD27、および/またはCD122抗体を使用する陽性または陰性選択技術によってさらに単離または濃縮することができる。例えば、一実施形態では、T細胞の単離または濃縮された集団または亜集団は、所望のT細胞を濃縮するための十分な期間にわたる抗CD3/抗CD28（すなわち、3×28）結合ビーズとのインキュベーションにより増殖および活性化される。一実施形態では、期間は約30分である。さらなる実施形態では、期間は30分から72時間以上、およびその間のすべての整数値の範囲である。さらなる実施形態では、期間は少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。さらに別の好ましい実施形態では、期間は10から72時間である。好ましい一実施形態では、インキュベーション期間は3～6日間である。白血病患者からT細胞を分離するためには、24時間といった長いインキュベーション時間を使用すると、細胞収量が増加する可能性がある。腫瘍組織または免疫障害を持つ個体からの腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の単離など、他の細胞型と比較してT細胞がほとんどないあらゆる状況において、より長いインキュベーション時間を用いてT細胞を単離することができる。さらに、より長いインキュベーション時間の使用はCD8+T細胞の捕捉効率を高めることができる。したがって、T細胞をCD3/CD28ビーズに結合させる時間を単純に短くするかまたは長くすることによって、および/または（本明細書でさらに記載したように）T細胞に対するビーズの比率を増加または減少させることによってT細胞の特定の集団または亜集団を培養開始時またはプロセス中の他の時点でさらにまたはそれに対して選択できる。さらに、ビーズまたは他の表面上の抗CD3抗体および/または抗CD28抗体の比率を増加または減少させることによって、T細胞の特定の集団または亜集団を培養開始時または他の所望の時点で優先的または非選択的に選択できる。当業者は、複数ラウンドの選択も本発明の文脈において使用できることを認識するであろう。特定の実施形態では、選択手順を実行し、活性化および拡大プロセスにおいて「選択されていない」細胞を使用することが望ましい場合がある。「選択されていない」細胞もまた、さらなる選択ラウンドにかけることができる。

【 0 1 7 1 】

ネガティブ選択による調節のためのT、NK、NK T細胞含む免疫細胞の集団またはそれらの亜集団の単離または濃縮は、ネガティブ選択された細胞に特有の表面マーカーに対する抗体の組み合わせを用いて達成され得る。一つの方法は、細胞選別および/または陰性磁気免疫接着または蛍光活性化選択細胞選別による選別であり、これは陰性選別された細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用する。例えば、ネガティブ選択によってCD3+細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的にはCD14、CD20、CD11b、CD16、およびHLA-DRに対する抗体を含む。特定の実施形態では、典型的にはCD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+、およびFoxP3+を発現する制御性T細胞を富化するが、またはそれを確実に選択することが望ましい場合がある。あるいは、特定の実施形態において、T調節細胞は、抗CD25コンジュゲートビーズまたは他の同様の選択方法によって枯渇される。いくつかの実施形態では、免疫療法のための所望のT細胞亜集団は、CCR7およびCD62LによってT細胞を含む調節された免疫細胞から濃縮または選択される。あるいは、関心のある細胞は、サイズの違い、密度、粒状度、変形性、抵抗または静電容量を含む物理的パラメータに従って選択されてもよい。

【 0 1 7 2 】

一の実施形態では、調節のために適応NK細胞を含む免疫細胞の集団はCD16、NK G

10

20

30

40

50

2 C および C D 5 7 の陽性発現を含むような識別子を用いて、表現型 C D 3 - および C D 5 6 + 方に N K 細胞を含む調節された免疫細胞内で選択することによって濃縮される。さらに、適応亜集団のネガティブ選択は、N K G 2 C および / または C D 5 7 の発現の欠如、ならびにさらに以下、低 P L Z F、低 S Y K、低 F c R、低 E A T 2、低 T I G I T、低 P D I、低 C D 7、低 C D 1 6 1、高 L I L R B 1、高 C D 4 5 R O、および低 C D 4 5 R A のうちの 1 つ以上の発現の欠如に基づくことができる。

【 0 1 7 3 】

一実施形態では、調節のための N K T 細胞の集団または亜集団は、不変の T C R 鎖を表現型的に発現するもの、具体的には以下のマーカー：C D 3 +、C D 5 6 +、T C R V 2 4 +、および / または T C R V 1 1 + の組み合わせのものを N K 細胞の集団内で選択することによって濃縮される。代替的に、N K T 細胞は、不変 T C R 鎖の発現と組み合わせた表現型の組み合わせに基づいて選択することができる。

10

【 0 1 7 4 】

対象からの血液試料またはアフエーシス生成物は、本明細書に記載の免疫細胞が単離される前の期間に収集することができる。それ自体、調節されるべき細胞の供給源は、任意の多数の適切な時点で収集され得、そして、例えば本明細書に記載したそのような細胞療法から利益を得るであろう任意の数の疾患または状態のための細胞ベース免疫療法で後半に使用する単離し凍結した T 細胞、N K 細胞および N K T 細胞などの所望の細胞であり得る。一実施形態では、血液サンプルまたはアフエーシス産物は、一般に健康な対象から収集される。特定の実施形態では、血液またはアフエーシス産物は、疾患を発症する危険性があるがまだ疾患を発症していない一般に健康な対象から収集され、目的の細胞は後の使用のために単離され凍結される。他の実施形態では、血液試料またはアフエーシス製品は、特定の疾患（例えば癌）を有する対象から採取される。さらに別の実施形態では、血液サンプルまたはアフエーシス産物は、遺伝子改変免疫細胞（遺伝子操作された、または再配列、突然変異、遺伝子インプリンティングおよび / またはエピジェネティック改変から天然に誘導された）を以前に投与した被験体から採取される。特定の実施形態では、T、N K、N K T または他の免疫細胞を増殖させ、凍結させ、そして後に処理および使用することができる。特定の実施形態では、本明細書に記載のように特定の疾患の診断の直後であるが任意の治療の前に、患者から試料を採取する。いくつかの実施形態では、細胞は、C M V（サイトメガロウイルス）血清反応陽性を示す被験体から単離される。さらなる実施形態において、細胞は、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤などの薬剤による治療、化学療法、放射線療法、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸塩、および F K 5 0 6、抗体などの免疫抑制薬、あるいは C A M P A T H、抗 C D 3 抗体、チトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、F K 5 0 6、ミコフェノール酸、ステロイド、F R 9 0 1 2 2 8 などの他の免疫破壊剤、ならびに照射を含むこれらに限定されない任意の数の関連治療法の前に対象からの血液またはアフエーシス産物から単離される。さらなる実施形態では、細胞は、骨髄または幹細胞移植、フルダラビンのような化学療法剤、外照射（X R T）、シクロホスファミド、または O K T 3 もしくは C A M P A T H などの抗体を使用した T 細胞除去療法と併用（例えば、併用前、同時、併用後）して後で使用するために単離し凍結される。別の実施形態では、細胞は、C D 2 0 と反応する薬剤（例えば、リツキサン）のような B 細胞除去療法後の治療で後に使用するために単離され、凍結され得る。

20

30

40

【 0 1 7 5 】

いくつかの実施形態では、T、N K または N K T 細胞、および / またはその亜集団を含む調節のための免疫細胞はゲノム工学的に操作され、これは挿入、欠失、または核酸置換を含み得る。修飾免疫細胞は、サイトカイン導入遺伝子、沈黙抑制性受容体、または過剰発現活性化受容体、または免疫細胞を再標的化するための C A R を発現し得る。いくつかの実施形態では、対象もしくはドナーから調節のために単離される免疫細胞集団、または対象 / ドナーの末梢血、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、腫瘍から単離されるかまたはそれらに含まれる免疫細胞集団は遺伝

50

子操作することができる。いくつかの実施形態では、単離された免疫細胞集団およびそれから得られた調節免疫細胞はゲノム操作されており、挿入、欠失、および/または核酸置換を含む。いくつかの実施形態において、調節のための免疫細胞およびそれから得られる調節された免疫細胞は、T細胞受容体(TCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、および/またはCD16もしくはその変異体の過剰発現をコードする外因性核酸を含む。

【0176】

一実施形態では、調節のためのゲノム操作された免疫細胞およびそれから得られる調節された免疫細胞は、安全スイッチタンパク質、ターゲティング様式、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的活性タンパク質、ペプチド、薬物標的候補；または生着、輸送、ホーミング、生存率、自己複製、持続、免疫応答の調節および調節、および/または免疫細胞の生存を促進するタンパク質のうちの1つ以上を含む遺伝子組み換え様式を1つ以上含む。いくつかの他の実施形態では、遺伝子組み換え様式には、(i) B2M、TAP1、TAP2、Tapasin、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、またはRFXAPの1つ以上の欠失または発現低下、および染色体6p21領域のあらゆるHLA遺伝子の欠失または発現低下；(ii) HLA-E、HLA-G、HACD16、hnCD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、Fc受容体、または二重もしくは多重特異的または普遍的なエンゲージャーとの結合のための表面誘発受容体の発現の導入もしくは発現増加の1つ以上が含まれる。いくつかの実施形態では、T細胞、NK細胞またはNKT細胞は、調節のため、またはそれから調節されるために、外因性核酸を含む。いくつかの実施形態において、外因性核酸は、細胞の直接ゲノム編集を介して免疫細胞に導入される。いくつかの他の実施形態では、外因性核酸は、分化によって免疫細胞を生じさせる、ゲノム操作された造血幹細胞もしくは前駆細胞またはiPSCからの免疫細胞の保持によって免疫細胞に導入される。いくつかの実施形態では、T細胞のための外因性核酸は、TCR(T細胞受容体)、CAR(キメラ抗原受容体)、二重特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)、三特異的T細胞エンゲージャー、多重特異的T細胞エンゲージャー、または複数の免疫細胞型に適合するユニバーサルエンゲージャーをコードすることができる。いくつかの実施形態では、NK細胞に対する外因性核酸は、TCR、CAR、CD16またはそれらの変異体、NY-ESO、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)、三重特異性キラー細胞エンゲージャー(TrIKE)、多重特異性キラー細胞エンゲージャー、または複数の免疫細胞型に適合したユニバーサルエンゲージャーをコードすることができる。いくつかの実施形態では、NKT細胞に対する外因性核酸は改変型TCRまたはCARであり得る。いくつかの態様において、外因性核酸CAR19をコードする。いくつかの実施形態では、CD16変異体は、高親和性CD16(HACD16)、切断不可能なCD16、および高親和性切断不可能なCD16(hnCD16)を含む。

【0177】

いくつかの実施形態において、調節のための免疫細胞の集団または亜集団は、インビトロで幹細胞または前駆細胞から分化する。いくつかの実施形態において、T、NK又はNKT細胞の単離された集団または亜集団は、幹細胞、造血幹細胞または前駆細胞(HSC)または前駆細胞から分化することができる。前駆細胞は、CD34+造血内皮細胞、多能性前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、又はNKT細胞前駆体であってもよい。幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPSC)および胚性幹細胞(ESC)などの多能性幹細胞であり得る。iPSCは、天然に存在しない再プログラムされた多能性細胞である。一旦、対象の細胞が多能性状態に再プログラムされると、その後細胞はT、NK、またはNKT細胞などの所望の細胞型またはサブタイプにプログラム化または分化され得る。

【0178】

いくつかの実施形態では、造血表現型を呈することを前提に誘導することができるiPSCは、中胚葉幹細胞から完全分化T、NKまたはNKT細胞までの範囲にわたり、多段階分化プラットフォームによってT、NKまたはNKT細胞に分化される。(例えば、米国

10

20

30

40

50

特許出願第 62 / 107 , 517 号および同第 62 / 251 , 016 号を参照 (これらの開示は、その全体が本明細書中に援用される)。いくつかの実施形態では、iPSC、HSC、または T、NK または NK T 細胞分化のための前駆体はゲノム工学的に操作され、これは挿入、欠失、または核酸置換を含み得る。

【0179】

いくつかの実施形態では、ゲノム操作された iPSC、HSC または造血前駆細胞は、安全スイッチタンパク質、標的化様式、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的活性タンパク質およびペプチド、薬物標的候補；あるいは iPSC、HSC、前駆細胞、またはそれらの由来細胞の生着、輸送、ホーミング、生存率、自己複製、持続、免疫応答の調節および調節、および/または生存を促進するタンパク質のうちの一つ以上を含む。いく

10

つかの他の実施形態では、遺伝子組み換え様式には、(i) B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFKANK、CIITA、RFX5、または RFXAP、および染色体 6p21 領域のあらゆる HLA 遺伝子の欠失または発現低下、(ii) HLA-E、HLA-G、HACD16、hnCD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、Fc 受容体、二重もしくは多重特異的または普遍的なエンゲ

20

ジャー、TCR (T 細胞受容体)、または CAR (キメラ抗原受容体) との結合のための表面誘発受容体の発現の導入もしくは発現増加の一つ以上が含まれる。いくつかの態様において、iPSC、HSC、または T、NK もしくは NK T 細胞分化のための前駆体は、

改変型 HLA クラス I および/または II を含む。いくつかの実施形態では、iPSC、HSC、または改変型 HLA クラス I および/もしくは II による T、NK もしくは NK T 細胞分化のための前駆体は、B2M、HLA-E/G、PDL1、A2AR、CD47、LAG3、TIM3、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、RFKANK、CIITA、RFX5、および RFXAP の少なくとも一つのヌルまたは低発現のものを含む。いくつかの実施形態では、iPSC、HSC、または T、NK もしくは NK T

細胞分化のための前駆体は外因性核酸を有する。いくつかの実施形態では、外因性核酸は、二重特異性 T 細胞エンゲジャー (BiTE)、三重特異性 T 細胞エンゲジャー、多重特異性 T 細胞エンゲジャー、CD16 またはその変異体、NY-ESO、二重特異性キラー細胞エンゲジャー (BiKE)、三重特異性キラー細胞エンゲジャー (TriKE)、多重特異性キラー細胞エンゲジャー、または複数の免疫細胞型と適合する普遍的エンゲジャーをコードする。いくつかの態様において、外因性核酸は、iPSC、HSC、

30

または T、NK もしくは NK T 細胞分化のための前駆体において hnCD16 をコードする。いくつかの態様において、外因性核酸は、iPSC、HSC、または T、NK もしくは NK T 細胞分化のための前駆体において CAR19 をコードする。

【0180】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の集団または亜集団は、インビトロで非造血運命の非多能性細胞から造血系統細胞へトランス分化し、または一次造血細胞型の非多能性細胞から別の造血細胞型へトランス分化されるが、この分化転換は T、NK、又は NK T 前駆細胞または T、NK、または NK T 細胞などの免疫細胞の完全に分化した特定のタイプにすることが

40

ことができる。(米国特許第 9376664 及び US 出願 15/072769 を参照 (その開示内容全体が本明細書に組み込まれる))。いくつかの実施形態において、非造血運命の非多能性細胞は、皮膚線維芽細胞、脂肪組織由来細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUEC) などの体細胞である。トランス分化に有用な体細胞は、不死化体細胞であり得る。

【0181】

種々の戦略が、細胞において、多能性を誘導する、または効力を増加させる (高橋、K.、および山中、S.、セル 126、663-676 (2006) 高橋ら、Cell 131、861-872 (2007) ; Yu ら、Science 318、1917~1920 (2007) ; Zhou ら、Cell Stem Cell 4、381~384 (2009) ; Kim ら、Cell Stem Cell 4、472~476 (2009) ; Y

50

amanakaら、2009年；Saha、K.、Jaenisch、R.、Cell Stem Cell 5、584-595(2009)、および再プログラミングの効率を改善するために追求されている(Shiら、Cell Stem Cell 2、525)。-528(2008a)；Shiら、Cell Stem Cell 3、568-574(2008b)；Huangfuら、Nat Biotechnol 26、795-797(2008a)；Huangfuら、Nat Biotechnol 26、1269-1275(2008b)；Silvaら、Plos Bio 6、e253。土井：10.1371/ジャーナル。Pbio0060253(2008)。Lyssiotisら、PNAS 106、8912~8917(2009)；M. Ichidaら、Cell Stem Cell 5、491~503(2009)；M. Mareriali、N.、Hochedlinger、K. Estebanら、Cell Stem Cell 6、71~79(2010)；M. これらの開示内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

10

【0182】

III. 養子療法のための免疫細胞の調節方法

本発明は、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法を提供し、そしてこの方法は表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と免疫細胞を接触させることを含む。

【0183】

一実施形態では、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と接触させることを含み、ここで、処理された免疫細胞は同じ組成物に接触していない免疫細胞と比較して、細胞増殖が増加し、1つ以上の所望の細胞亜集団の数または相対比が増加し、増殖、細胞毒性、または細胞想起応答が改善し、そして持続性が改善されている。

20

【0184】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と接触させることを含み、ここで、1つ以上の所望の細胞亜集団の維持または増殖が表1の薬剤と接触していない免疫細胞の集団と比較して改善されている。

【0185】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、免疫細胞を表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と接触させることを含み、ここで、所望の分化状態に再プログラム化された集団の数は比率が、表1の薬剤と接触していない免疫細胞の集団と比較して増加する。

30

【0186】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法は、細胞増殖を増大させるのに十分な量で表1から選択される少なくとも1つの薬剤を含む組成物と免疫細胞を接触させることを含み、表1の薬剤と接触していない免疫細胞の集団と比較して、1つ以上の所望の免疫細胞亜集団の数または比率が増加し、および/または免疫細胞の増殖、細胞毒性、細胞想起応答および/または持続性が改善する。一実施形態において、免疫細胞治療剤は、約0.1 nM~約50 μMである。一実施形態において、免疫細胞治療剤は、約0.1 nM、0.5 nM、1 nM、5 nM、10 nM、50 nM、100 nM、500 nM、1 μM、5 μM、10 μM、20 μM、または25である。μM、またはその間の任意の濃度である。一実施形態において、免疫細胞治療のための調節剤は、約0.1 nM~約5 nM、約1 nM~約100 nM、約50 nM~約250 nM、約100 nM~約500 nM、約250 nM~約1 μM、約500 nM~約5 μM、約3 μM~約10 μM、約5 μM~約15 μM、約12 μM~約20 μM、または約18 μM~約25 μM、またはその間の任意の範囲である。

40

【0187】

いくつかの実施形態において、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の集団または亜集

50

団を調節する方法は、免疫細胞を、表 1 から選択される少なくとも 1 つの前記調節剤を含む組成物と、同じ組成物に接触していない免疫細胞と比較して少なくとも 1 つの望ましい治療的特質を改善するのに十分な時間接触させることを含む。一実施形態では、免疫細胞を表 1 の 1 つ以上の調節剤と少なくとも 10 分、30 分、1 時間、2 時間、5 時間、12 時間、16 時間、18 時間、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、10 日、15 日、20 日、25 日、30 日、またはその間の任意の長さの期間接触させる。一実施形態において、免疫細胞は、約 0.5 時間～約 2 時間、約 1 時間～約 1.2 時間、約 1.0 時間～約 2 日、約 1 日～約 3 日、約 2 日～約 5 日、約 3 日～約 6 日、約 5 日～約 8 日、約 7 日～約 14 日、約 12 日～約 22 日、約 14 日～約 25 日、約 20 日～約 30 日の間、表 1 の 1 つ以上の調節剤と接触される。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、16 時間、14 時間、12 時間、10 時間、8 時間、6 時間、4 時間、2 時間以上、またはその間の任意の長さの時間にわたって、1 つ以上の前記薬剤と接触させられる。そのようなものとして、前記十分な時間の長さは、例えば、15、13、11、9、7、5、3、または 1 時間以上である。方法のいくつかの他の実施形態では、前記十分な時間の長さは、24 時間、36 時間、48 時間、60 時間、72 時間以上、またはその間の任意の長さの時間である。このように、前記十分な時間は、例えば、30、42、54、66、78、90 時間以上である。

10

【0188】

免疫細胞を表 1 から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む組成物と接触させることを含む、養子細胞に基づく治療に適した免疫細胞の集団または亜集団を調節する方法はさらに、接触後の免疫細胞から 1 以上の所望の亜集団を濃縮または分離することを含み、ここで、1 以上の所望の亜集団は、ナイーブ T 細胞、幹細胞記憶 T 細胞、中枢記憶 T 細胞、適応 NK 細胞、または I 型 NK T 細胞を含む。

20

【0189】

いくつかの実施形態において、調節のための免疫細胞は、CMV 血清反応陽性であるか、または遺伝子改変免疫細胞を以前に投与されたことがある対象から得られる。いくつかの実施形態では、調節後、対象から得られた遺伝的に修飾された免疫細胞は自己由来または同種異系で投与され得る。いくつかの実施形態では、調節のためのドナー由来免疫細胞は、T 細胞受容体 (TCR) および / またはキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外因性核酸を含む。

30

【0190】

処理される免疫細胞の集団は、末梢血、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、対象 / ドナーの腫瘍、または多能性幹細胞集団から単離またはそれらに含まれてもよい。対象は健康であり得るか、または自己免疫障害、造血器悪性腫瘍、ウイルス感染または固形腫瘍を有し得る。調節のための免疫細胞の集団は、ゲノム操作されてもよく、そして細胞は挿入、欠失、および / または核酸置換を含む。いくつかの特定の実施形態では、ゲノム操作された免疫細胞は、T 細胞受容体 (TCR)、キメラ抗原受容体 (CAR)、および / または CD16 もしくはその変異体の過剰発現をコードする外因性核酸を含む。

【0191】

あるいは、調節のための免疫細胞の集団は、インビトロで幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または前駆細胞から分化させることができ、造血系または非造血系の非多能性細胞からトランス分化してもよい。いくつかの実施形態では、調節のための免疫細胞が由来する幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、前駆細胞、または非多能性細胞は、挿入、欠失、および / または核酸置換を含むようにゲノム操作されており、それはまたそれから誘導された免疫細胞に含まれる。いくつかの特定の実施形態では、誘導免疫細胞は、T 細胞受容体 (TCR)、キメラ抗原受容体 (CAR)、および / または CD16 もしくはその変異体の過剰発現をコードする外因性核酸を含む。

40

【0192】

IV. 調節された免疫細胞、免疫細胞集団または亜集団の治療的使用

50

本発明は、細胞ベースの養子療法で使用時に免疫細胞の治療能力を向上させるのに十分な量で表1から選択される1つ以上の調節剤と接触、処理、または調節された免疫細胞の単離集団または亜集団を含む治療組成物を提供する。一実施形態では、接触、処理、または調節された免疫細胞は、同じ薬剤と接触していない免疫細胞と比較して、細胞増殖の増加；所望の細胞亜集団の数または相対比の増加；増殖、細胞毒性または細胞想起応答の改善；および持続性の改善を含むこれらに限定されない、少なくとも1つの望ましい治療的特質を得る。いくつかの実施形態において、1つ以上の調節剤は、表1から選択される少なくとも1つの化合物、またはその誘導体もしくは類似体を含む。一実施形態では、エクスピボで接触させた免疫細胞の単離された集団または亜集団は、数または比率が増加したナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および/または中枢記憶T細胞を含む。一実施形態では、エクスピボで接触させた免疫細胞の単離された集団または亜集団は、数または比率が増加したI型NK細胞を含む。別の実施形態では、エクスピボで接触させた免疫細胞の単離された集団または亜集団は、数または比率が増加した適応NK細胞を含む。

10

【0193】

本明細書ではまた、開示されている調節された免疫細胞と1つ以上の治療添加剤/薬剤とを含む併用治療組成物も提供されている。併用治療組成物のいくつかの実施形態において、1つ以上の治療添加剤は、ペプチド、サイトカイン、マイトジェン、成長因子、小RNA、dsRNA（二本鎖RNA）、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分またはその置換因子、目的の1つ以上のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤もしくは放射性部分、または免疫調節薬（IMiD）を含む。

20

【0194】

いくつかの実施形態では、追加の治療薬は抗体または抗体断片を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体または抗体断片はウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態では、抗体または抗体断片は腫瘍抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、腫瘍またはウイルス特異的抗原は、変調された細胞を活性化し、標的細胞をより良く認識し溶解する。いくつかの実施形態では、追加の治療薬としての抗原は、調節されたNK細胞を活性化して抗体依存性細胞傷害（ADCC）を利用する。モノクローナル抗体（mAb）は、標的細胞に結合し、さらにNK細胞および他の細胞型上のCD16を結合させ、インピボおよびインピトロの両方でADCCによって腫瘍細胞を死滅させる。mAbはまた、NK細胞阻害を遮断することによってADCCを増強し、そしてNK細胞を刺激し得る。いくつかの実施形態では、NK細胞媒介ADCCは、調節されたNK細胞によって発現されたCD16およびその遺伝子操作された変異体を介する。CD16の遺伝子操作された変異体は、非切断性CD16、高親和性CD16（hacD16）、および高親和性非切断性CD16（hncD16）を含むがこれらに限定されない。さらに、抗CD19、CD20、およびCD33抗原などの腫瘍細胞抗原を標的とする抗体のFab領域を、NK細胞上のCD16を認識する別のFab領域と組み合わせて融合する二重および三重特異性抗体の設計はNK細胞の刺激、続いての腫瘍細胞の殺傷をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される調節免疫細胞との併用治療に適した抗体は、抗CD20（レチキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ）、抗Her2（トラスツズマブ）、CD52（アレムツズマブ）、抗EGFR（セルトキシマブ）、および抗CD38（ダラツムマブ）、ならびにそれらのヒト化およびFc修飾変異体を含むが、これらに限定されない。

30

40

【0195】

いくつかの実施形態において、追加の治療薬は、化学療法薬、放射性部分、または免疫調節薬のうちの一つ以上を含む。

【0196】

化学療法剤は、細胞傷害性抗悪性腫瘍剤を指し、すなわち新生細胞を優先的に殺すかまたは急速に増殖する細胞の細胞周期を破壊するか、または幹癌細胞を根絶することが見出され、そして新生細胞の増殖を予防または低減するために治療的に用いられる。化学療法剤

50

はまた、抗腫瘍薬または細胞毒性薬または薬剤とも呼ばれ、そして当該分野において周知である。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン、アルキル化剤、アルキルスルホネート、アジリジン、エチレンイミン、メチルメラミン、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、酵素、ポドフィロトキシン、白金含有剤、インターフェロン、ピンカアルカロイド、エポドフィロトキシン、またはインターロイキンを含む。例示的な化学療法剤としては、シクロホスファミド、メクロレタミン、メファリン、クロラムブシル、ヘマメチルメラミン、チオテパ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、メトトレキサート、フルオロウラシル、フロキシリジン、シタラビン、シタラビン、6-メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、エトポシド、エトポシドオルトキノン、テニポシド、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、ピサントレン、アクチノマイシンD、プリカマイシン、プロマイシン、グラミシジンD、パクリタキセル、コルヒチン、シトカラシンB、エメチン、マイタンシン、およびアムサクリンが挙げられるが、これらに限定されない。追加の薬剤は、アミノグルテチミド (aminoglutethimide)、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、アルトレタミン、シクロホスファミド、ロムスチン (CCNU)、カルムスチン (BCNU)、イリノテカン (CPT-11)、アレムツザマブ (alemtuzumab)、アルトレタミン、アナストロゾール、L-アスパラギナーゼ、アザシチジン、ベバシズマブ、ベキサロテン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルステロン、カペシタビン、セレコキシブ、セツキシマブ、クラドリビン、クロフラピン、シタラビン、ダカルバジン、デニロイキン・ディフティトックス、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドロモスタノロン、エピルピシン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エチニルエストラジオール、エキセメスタン、フロキシウリジン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、フルタミド、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロンアルファ (2a, 2b)、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミゾール、メクロレタミン、メゲストロール、メルファラン (melphalin)、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、ノフェツモマブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペメトレキセド、ペガデマーゼ、ペガバラガス、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ポリフェプロサン、ポルフィマー、プロカルバジン、キナクリン、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、トポテカン (topotecan)、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルルピシン、ピノレルピン、ゾレドロネートが挙げられる。他の適切な薬剤は、化学療法剤または放射線療法剤として承認され、そして当該分野で公知のものを含む、ヒトでの使用が承認されているものである。そのような薬剤は、多数の標準的な内科医および腫瘍医の参考文献 (例えば、グッドマンおよびギルマンの *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第9版, McGraw-Hill, NY, 1995) または米国国立がん研究所のウェブサイト (fda.gov/cder/cancer/druglistfrarne.htm) のいずれによっても参照することができ、両方とも随時更新される。サリドマイド、レナリドマイド、およびボマリドマイドなどの免疫調節薬 (IMiD) は、NK細胞とT細胞の両方を刺激する。本明細書中に提供されるように、IMiDは癌治療のための調節された治療用免疫細胞と共に使用され得る。

【0197】

一態様では、調節免疫細胞は、養子細胞療法に適した対象に調節免疫細胞を導入または投与することによって、対象における血液悪性腫瘍、固形癌、前癌状態、自己免疫障害、ウイルス感染を治療、予防または改善するために使用できる。別の態様において、調節された免疫細胞は、そのような治療を必要とする対象に細胞を導入することによって抗腫瘍免

10

20

30

40

50

疫応答を増強するために使用され得る。

【0198】

用語「治療する」、「治療」は、所望の薬理学的および/または生理学的効果を得ることを一般的に意味するために本明細書で使用される。効果は、疾患を完全にまたは部分的に予防することに関して予防的であり得、および/または疾患に対する部分的または完全な治療および/または疾患に起因する有害作用に関して治療的であり得る。本明細書で使用される「治療」は、哺乳動物における疾患のあらゆる治療を含み、そして、疾患にかかりやすいが、まだ罹っていると診断されていない場合の対象で発症する疾患を予防すること、疾患を抑制すること、すなわちその発症を阻止すること、または病気を軽減すること、すなわち病気の後退を引き起こすことを含む。治療薬または組成物は、疾患または損傷の発症前、発症中または発症後に投与することができる。治療が患者の望ましくない臨床症状を安定化または軽減する進行中の疾患の治療も特に興味深い。特定の実施形態では、病気、疾患、および/または傷害をもつ治療を必要とする対象は、細胞療法によって少なくとも1つの関連症状において治癒し、快方し、および/または改善し得る。特定の実施形態は、細胞療法を必要とする対象は、これらに限定されないが、骨髄または幹細胞移植の候補者、化学療法または放射線療法を受けたことがある対象、過剰増殖性障害または癌、例えば造血系の過剰増殖性障害または癌有するかまたは有する危険性がある対象、固形腫瘍などの腫瘍を有するかまたは発症する危険性がある対象、ウイルス感染またはウイルス感染症に関連する疾患を有するかまたは有する危険性がある対象を含むことを意図する。

10

【0199】

血液悪性腫瘍の例には、急性および慢性白血病（急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ホジキン病、多発性骨髄腫、および骨髄異形成症候群を含まれるが、これらに限定されない。固形癌としては、脳、前立腺、乳房、肺、結腸、子宮、皮膚、肝臓、骨、膵臓、卵巣、精巣、膀胱、腎臓、頭、首、胃、頸部、直腸、喉頭、食道の癌が挙げられるが、これらに限定されない。様々な自己免疫障害の例としては、円形脱毛症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、皮膚筋炎、糖尿病（1型）、いくつかの形態の若年性特発性関節炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、いくつかの形態の心筋炎、多発性硬化症、天疱瘡/類天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、関節リウマチ、強皮症/全身性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、いくつかの形態の甲状腺炎、いくつかの形態のブドウ膜炎、白斑、多発性血管炎を伴う肉芽腫症（ウェゲナー）が挙げられるが、これらに限定されない。ウイルス感染症の例としては、これらに限定されない、HIV-（ヒト免疫不全ウイルス）、HSV-（単純ヘルペスウイルス）、KSHV-（カボジ肉腫関連ヘルペスウイルス）、RSV-（呼吸器合胞体ウイルス）、EBV-（エプスタイン-バーウイルス）、CMV-（サイトメガロウイルス）、VZV（水痘帯状疱疹ウイルス）、アデノウイルス-、レンチウイルス-、BKポリオマウイルス関連障害が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0200】

開示されている調節された免疫細胞を含む治療用組成物は、他の治療の前、最中、および/または後に対象に投与することができる。したがって、併用療法の方法は、追加の治療薬の使用前、使用中、および/または使用後に調節細胞を投与または調製することを含み得る。上記のように、1つ以上の治療添加剤は、ペプチド、サイトカイン、マイトジェン、成長因子、小RNA、dsRNA（二本鎖RNA）、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分またはそれらの置換因子、目的の1つ以上のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤もしくは放射性部分、または免疫調節薬（IMiD）を含む。調節された免疫細胞の投与は、数時間、数日、さらには数週間で追加の治療薬の投与から時間的に隔てることができる。追加的にまたは代替的に、投与は、抗新生物剤、手術などの非薬物療法などであるがこれらに限定されない他の生物学的に活性な薬剤または様式と組み合わせることができる。

40

50

【0201】

自己免疫細胞および同種異系免疫細胞の両方を調節し、そして上記のように細胞療法において使用することができる。

【0202】

いくつかの実施形態において、治療組成物中の調節された免疫細胞の数は、少なくとも 0.1×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^5 個の細胞、少なくとも 5×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^6 個の細胞、少なくとも 5×10^6 個の細胞、少なくとも 1×10^7 個の細胞、少なくとも 5×10^7 個の細胞、少なくとも 1×10^8 個の細胞、少なくとも 5×10^8 個の細胞、少なくとも 1×10^9 個の細胞、または少なくとも 5×10^9 個の細胞である。

10

【0203】

いくつかの実施形態において、治療用組成物中の調節された免疫細胞の数は、約 0.1×10^5 ~ 約 1×10^6 個の細胞、約 0.5×10^6 ~ 約 1×10^7 個の細胞、約 0.5×10^7 ~ 約 1×10^8 個の細胞、約 0.5×10^8 ~ 約 1×10^9 個の細胞、約 1×10^9 ~ 約 5×10^9 個の細胞、約 0.5×10^9 ~ 約 8×10^9 個の細胞、またはその間の任意の範囲である。

【0204】

いくつかの実施形態において、治療用組成物中の調節された免疫細胞の数は、約 0.5×10^6 ~ 約 1×10^6 個の細胞、約 0.5×10^7 ~ 約 1×10^7 個の細胞、約 0.5×10^8 ~ 約 1×10^8 個の細胞、約 0.5×10^9 ~ 約 5×10^9 個の細胞、約 1×10^9 ~ 約 8×10^9 個の細胞、またはその間の任意の範囲である。

20

【0205】

いくつかの他の実施形態において、治療用組成物中の調節された免疫細胞の数は、約 0.1×10^5 ~ 約 0.5×10^6 個の細胞、約 0.5×10^6 ~ 約 0.5×10^7 個の細胞、約 0.5×10^7 ~ 約 0.5×10^8 個の細胞、約 0.5×10^8 ~ 約 0.5×10^9 個の細胞、約 0.5×10^9 ~ 約 8×10^9 個の細胞、またはその間の任意の範囲である。

【0206】

一実施形態では、治療用組成物中の調節された免疫細胞の数は、部分的または単一の臍帯血中の免疫細胞の数であるか、または少なくとも 0.1×10^5 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 0.5×10^5 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 1×10^5 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 5×10^5 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 10×10^5 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 0.75×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 1.25×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 1.5×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 1.75×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 2×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 2.5×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 3×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 4×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 5×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 10×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 15×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 20×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 25×10^6 個の細胞 / kg 体重、少なくとも 30×10^6 個の細胞 / kg 体重、 1×10^8 個の細胞 / kg 体重、 5×10^8 個の細胞 / kg 体重、または体重 1×10^9 個の細胞 / kg 体重、または 8×10^9 個の細胞 / kg 体重である。

30

40

【0207】

本発明によって提供される調節された免疫細胞は、投与前にエクスピボまたはインビトロで増殖させることなく対象に投与することができる。特定の実施形態では、調節された免疫細胞集団は、調節剤を除去するために洗浄することができる。いくつかの実施形態において、造血系統細胞由来の調節された免疫細胞の単離された集団は、TCR、CARまたは他のタンパク質を発現するように組換え的に生成され得る。

【0208】

患者への投与に適した治療組成物は、1つ以上の薬剂的に許容できる担体（添加剤）および/または希釈剤（例えば薬剂的に許容できる培地、例えば細胞培養培地）、または他の

50

薬剂的に許容できる成分を含み得る。薬剂的に許容できる担体および/または希釈剤は、投与される特定の組成物、ならびに治療用組成物を投与するために使用される特定の方法によって部分的に決定される。したがって、本発明の治療用組成物の多種多様な適切な製剤がある(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第17、1985を参照(その開示はその全体が参照により本明細書に援用される))。

【0209】

特定の実施形態では、調節された細胞の単離された集団を有する治療用細胞組成物はまた、薬剂的に許容できる細胞培養培地、または薬剂的に許容できる担体および/または希釈剤を有する。本明細書に開示されるような調節された免疫細胞の集団を含む治療用組成物は、静脈内、腹腔内、経腸、もしくは気管投与方法または所望の治療目標に影響を及ぼす他の好適な化合物と組み合わせて別々に投与され得る。

10

【0210】

これらの薬剂的に許容できる担体および/または希釈剤は、治療用組成物のpHを約3~約10に維持するのに十分な量で存在することができる。そのようなものとして、緩衝剤は、全組成物の重量を基準にして約5%程度であり得る。塩化ナトリウムおよび塩化カリウムなどであるがこれらに限定されない電解質も治療用組成物中に含めることができる。一態様では、治療用組成物のpHは約4~約10の範囲内にある。あるいは、治療用組成物のpHは、約5~約9、約6~約9、または約6.5~約8の範囲である。別の実施形態では、治療用組成物は、前記PH範囲のうちの1つにPHを有する緩衝剤を含む。別の実施形態では、治療用組成物は約7のPHを有する。あるいは、治療用組成物は、約6.8~約7.4の範囲のPHを有する。さらに別の実施形態では、治療用組成物は約7.4のPHを有する。

20

【0211】

本発明はまた、部分的には、本発明の特定の組成物および/または培養物における薬剂的に許容できる細胞培養培地の使用も提供する。そのような組成物はヒト対象への投与に適している。一般的に言えば、本発明の調節された免疫細胞の維持、増殖、および/または健康を支持する任意の培地が医薬用細胞培養培地としての使用に適している。特定の実施形態では、薬剂的に許容できる細胞培養培地は無血清および/またはフィーダーフリー培地である。

30

【0212】

・様々な実施形態において、無血清培地は動物を含まず、そして任意にタンパク質を含まなくてもよい。場合により、培地は生物薬剂的に許容される組換えタンパク質を含み得る。無動物培地とは、成分が非動物起源に由来する培地を指す。組換えタンパク質は、動物を含まない培地中で天然の動物性タンパク質に取って代わるものであり、栄養素は合成、植物または微生物の供給源から得られる。対照的に、無タンパク質培地は、実質的にタンパク質を含まないと定義される。当業者であれば、上記の媒体の例は例示的なものであり、本発明での使用に適した媒体の処方限定するものではなく、当業者に公知の利用可能な多くの適切な媒体があることを理解するであろう。

【実施例】

40

【0213】

以下の実施例は例示のために提供され、そして限定のために提供されない。

【0214】

実施例1-方法および材料

インビトロT細胞培養。新鮮な白血球(All Cells、アラメダ、カリフォルニア州)を健康なドナーから入手し、そこからEasy SepヒトT細胞濃縮キット(Stem Cell Technologies、バンクーバー、カナダ)を用いてT細胞をネガティブ選択した。新たに単離したT細胞を等分して凍結保存した。スクリーニングを開始した日に、T細胞を解凍し、5%ヒトAB血清、IL-2、pen/strep、および追加のサプリメントと共にX-Vivo 15に入れて洗浄した。細胞を、抗CD3/抗CD28

50

ビーズと共に 5×10^5 細胞 / ml で平底 384 ウェルプレートに分注した。個々の化合物を各プレートの列 3 から列 22 までの各ウェルに最終濃度 $10 \mu\text{M}$ で添加した。陽性対照および陰性対照をさらなるウェルに加えた。細胞を $5\% \text{CO}_2$ で 37°C で約 6 日間インキュベートした。

【0215】

フローサイトメトリー培養 6 日目に、細胞を固定生存可能性マーカーおよびフルオロフォアコンジュゲート抗体：CD3、CD4、CD8、CD45RA、CD45RO、CD62L、CCR7、CD27、およびCD122 (BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ、およびBioLegend、カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて染色した。蛍光絶対対数用ビーズ (Spherotech、Lake Forest、IL) を取得直前に加えた。データ取得はBD Fortessa X-20 (BD Biosciences) で行い、データはTreeStarソフトウェア (FlowJo、Ashland、OR) およびSpotfire (Tibco、Boston、MA) を用いて分析した。

10

【0216】

表現型および消耗マーカー評価のための大規模培養細胞。IL-2 を補充した T 細胞培地中の抗 CD3 / 抗 CD28 ビーズを使用して、単離した CD8⁺ T 細胞を 0 日目に大量に活性化した。1 日目に、細胞を CAR 構築物で形質導入し、そして細胞密度を 0.5×10^6 / ml に調整し、 10^6 個の細胞を、ピヒクル、TWS119、または DCC-2036 の存在下で 12 ウェルプレートに播種した。4 日目に、細胞を 6 ウェルプレートに移し、そして 2 ml の T 細胞培地を各ウェルに添加した。6 日目にさらに 2 ml の培地を各ウェルに加えた。8 日目に、表現型マーカー (CD62L、CCR7、および CD27) および消耗マーカー (PD-1 および Tim-3) の表面発現について CAR⁺ T 細胞をフローサイトメーターで分析した。

20

実施例 2 - 免疫細胞調節剤

【0217】

データを分析して、表現型的に同定されたナイーブ、幹細胞記憶、または中枢記憶 T 細胞のより高い割合またはより高い絶対数を産生する化合物を同定した。これらの細胞は、CCR7 および CD62L の発現によって特徴付けられる。したがって、これらの識別マーカーの両方を共発現する細胞を評価した。生存 CD4⁺ 集団および生存 CD8⁺ 集団内で、CCR7 と CD62L を同時発現する細胞の割合を決定した。所望の T 細胞サブセットを示す、T 細胞上の CD62L または CCR7 のいずれかの発現は、CAR-T 細胞療法、および潜在的に他の養子 T 細胞療法にとって好ましい機能的特徴を有すると記載されている。ドルソモルフィン、ヘプテリジン酸、GSK-3 阻害剤 IX、6-メルカプトプリン、AC-93253 ヨウ化物、チラトリコール、PI-103、5-アザシチジン、5,7-ジクロロ-8-キノリノール、ニトロフラントイン、5-クロロ7-ヨード-8-キノリノール、またはジエチレントリアミン五酢酸の処理の下では、CCR7 および CD62L を共発現する細胞の数または比率は、生存 CD4⁺ 集団および生存 CD8⁺ 集団の両方において増加した (表 2)。フルベストラント、タブシガルギン、SU4312、フルダラビン、2-ナフタセンカルボキサミド、7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-オクタフ、ニフロキサジド、エドロホニウムクロリドの処理の下では、CCR7 および CD62L を同時発現する細胞の数または比率は少なくとも生存可能な CD8⁺ 集団において増加した (表 2)。1-ピロリジンカルボジチオ酸、アンモニウム塩、U0126、テルミサルタン、シクロスポリン A、1,3,5-トリス(4-ヒドロキシフェニル)-4-プロピル-1H-ピラゾール、BAY 61-3606、プロトポルフィリン IX ニアトリウム、ラパマイシン、ロスコビチン、PAC-1、塩酸トスフロキサシン、BIX01294、およびテルフェナジンの処理の下では、CCR7 および CD62L を共発現する細胞の数または比率は少なくとも生存 CD4⁺ 集団において増加した (表 2)。

30

40

【0218】

さらに、GSK3 (グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ベータ) 阻害剤は、CD37-C

50

D19-CD56+NK細胞を保存し、そしてCD57+およびNKG2C+発現を含むがこれに限定されない観察に基づいて細胞成熟およびサブタイプスキューに影響を与えることによって適応NK細胞亜集団を増加させることが示された。

【0219】

各試料中の絶対計数ビーズの数に対するこれらのゲートの各々における事象の数を計算し、CD4+および/またはCD8+集団内のナイーブ、幹細胞記憶、または中枢記憶T細胞の絶対数の尺度を定義した。各384ウェルプレート内のスクリーニングされた化合物サンプルに対するzスコアをこれら4つの値のそれぞれについて計算した：1) CD4+中のパーセントCCR7+CD62L+、2) CD8+中のパーセントCCR7+CD62L+、3) CD4+中のCCR7+CD62L+の絶対相対数、および4) CD8+中のCCR7+CD62L+の絶対数(図1Aおよび1B)。各サンプル内の全細胞の生存率パーセントおよび各サンプル内の細胞の相対絶対数についてもZスコアを計算した。「Zスコア」は、スコアの群における平均に対するスコアの関係の統計的測定値である。Zスコア0は、スコアが平均と同じであることを意味する。Zスコアも正または負になることがあり、それが平均より上か下か、そして標準偏差の数値によって示される。

10

【0220】

T細胞増殖または生存率に有害な影響を与える化合物を排除することは、T細胞製造戦略に適している可能性が最も高い化合物に努力を集中する。一次ヒット化合物は以下の基準により選択された：「生存率パーセント」-1より大きいZスコア、「絶対細胞数」-1より大きいZスコア、および4つの値のうちの1つのZスコアは+2よりも大きい。34個の化合物(表2)は、はるかに高いZスコアを有し、4つの主要値のうちの1つ以上について上記の基準を満たすために選択された。T細胞を調節するそれらの能力に対してさらに5つの化合物も含まれる(表3)。

20

表2-養子細胞療法におけるT細胞調節のための薬剤

30

40

50

【表 2 - 1】

化合物	CAS番号	化合物情報	群	群記述子	CD8 ヒット	CD4 ヒット
ドルソモルフィン	866405-6 4-3	AMPK阻害剤	I	代謝と栄養素感知	CD8	CD4
ヘプテリジン酸	74310-84 -2	GAPDH阻害剤	I	代謝と栄養素感知	CD8	CD4
1-ピロリジンカルボジチオ酸、アンモニウム塩	5108-96- 3	一酸化窒素合成酵素の誘導を妨げる	I	代謝と栄養素感知		CD4
GSK3 β 阻害剤	例えば- BIO ; 66 7463-62- 9	GSK-3 α / β 阻害剤	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
6-メルカプトプリン	6112-76- 1	酵素HGPRTについてプリン誘導体ヒポキサンチンおよびグアニンと競合する	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
AC-93253 ヨウ化物	108527-8 3-9	サブタイプ選択的RAR (RAR α) アゴニスト	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
チラトリコール	51-24-1	甲状腺ホルモン類似体	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
PI-103	371935-7 4-9	mTOR / PI3K阻害剤	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
DCC-2036 (レバステニブ)	1020172- 07-9	Bcr-Abl阻害剤	II	シグナル伝達経路	CD8	CD4
フルベストラント	129453-6 1-8	エストロゲン受容体拮抗薬	II	シグナル伝達経路	CD8	
タプシガルギン	67526-95 -8	サルコ/ ER Ca ²⁺ -ATPアーゼ拮抗薬	II	シグナル伝達経路	CD8	
SU 4312	5812-07- 7	VEGF受容体タンパク質チロシンキナーゼ1/2およびPDGF受容体阻害剤	II	シグナル伝達経路	CD8	

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

U0126	109511-5 8-2	MAPK / ERKキナーゼ; AP-1転写活性に拮抗する	II	シグナル伝達経路		CD4
テルミサルタン	144701-4 8-4	ミカルディス; アンジオテンシンII受容体拮抗薬	II	シグナル伝達経路		CD4
シクロスポリンA	59865-13 -3	ネオオーラル; 免疫抑制薬	II	シグナル伝達経路		CD4
1, 3, 5-トリス (4-ヒドロキシフェニル) -4-プロピル-1H-ピラゾール	263717-5 3-9	PPT; 特定のエストロゲン受容体 α (ER α) アゴニスト	II	シグナル伝達経路		CD4
BAY 61-3606	732983-3 7-8	脾臓チロシンキナーゼ (Syk) 阻害剤	II	シグナル伝達経路		CD4
プロトポルフィリンIX二ナトリウム	553-12-8	GCS (グアニル酸シクラーゼ) 活性化剤	II	シグナル伝達経路		CD4
ラパマイシン	53123-88 -9	シロリムス。免疫抑制剤	II	シグナル伝達経路		CD4
5-アザシチジン	320-67-2	核酸合成を妨害するシトシンヌクレオシド類似体	III	増殖とアポトーシス	CD8	CD4
フルダラビン	21679-14 -1	核酸合成を妨害するプリン類似体	III	増殖とアポトーシス	CD8	
ロスコピチン、(S) - 異性体	186692-4 5-5	サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) 阻害剤	III	増殖とアポトーシス		CD4
PAC-1	315183-2 1-2	プロカスパーゼ-3活性化化合物。	III	増殖とアポトーシス		CD4

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

8-キノリノール、5,7-ジクロロ-	773-76-2	カプトプリル (Captopril); 抗生物質	IV	抗感染症	CD8	CD4
ニトロフラントイン	67-20-9	抗生物質	IV	抗感染症	CD8	CD4
8-キノリノール、5-クロロ-7-ヨード-	130-26-7	クリオキノール; 抗生物質	IV	抗感染症	CD8	CD4
2-ナフタセンカルボキサミド、7-クロロ-4-(ジメチルアミノ)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-オクタフ	64-73-3	リボソームタンパク質合成阻害剤	IV	抗感染症	CD8	
ニフロキサジド	965-52-6	ニトロフラン抗生物質	IV	抗感染症	CD8	
トスフロキサシン塩酸塩	100490-36-6	オゼックス; フルオロキノロン系抗生物質	IV	抗感染症		CD4
セルトラリン	79617-96-2	ゾロフト抗うつ薬	V	その他	CD8	CD4
ジエチレントリアミン五酢酸、ペンタナトリウム	67-43-6	鉄キレート剤	V	その他	CD8	CD4
塩化エドロフォニウム	116-38-1	可逆的アセチルコリンエステラーゼ阻害剤	V	その他	CD8	
BIX01294	1392399-03-9	GLPおよびG9aヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ阻害剤	V	その他		CD4
テルフェナジン	50679-08-8	抗ヒスタミン薬	V	その他		CD4
dmPGE2	39746-25-3	プロスタグランジン分子	V	その他		

表3-養子細胞療法におけるT細胞調節のための追加の薬剤

10

20

30

40

50

【表 3】

化合物	CAS番号	化合物情報	群	群記述子
2-DG	154-17-6	解糖を阻害する	I	代謝と栄養素感知
GSK3β阻害剤	例えば-TWS119 : 601514-19-6	GSK3β阻害剤	II	シグナル伝達経路
HS173	1276110-06-5	PI3K阻害剤	II	シグナル伝達経路
LY294002	154447-36-6	PI3K阻害剤	II	シグナル伝達経路
ピクチリシブ	957054-30-7	PI3K阻害剤	II	シグナル伝達経路

10

【0221】

実施例3-選択された化合物のインビトロトリアージ実験

インビトロ実験は、化合物曝露のための方法を最適化しそしてT細胞機能に有害な影響を与える化合物を排除するために行われる。初期テストでは、個々の化合物の最適用量を決定しながら、以前に観察されたナイーブT細胞、幹細胞記憶T細胞、および中枢記憶T細胞に対する影響が追加のドナーにも反映されているかどうかを評価する。T細胞に有害な機能的影響を与える可能性のある化合物を同定するために、増殖能力、Th1およびTh17に分化する能力、凍結保存/解凍サイクルによる生存、形質導入効率、ならびにCAR形質導入T細胞の殺腫瘍活性についてのインビトロ評価を行う。T細胞機能に有意な悪影響を及ぼすことなく、増殖中のナイーブ、幹細胞記憶、または中枢記憶T細胞の比率または数を再現可能に改善する化合物を組み合わせで試験し、相加的または相乗的効果について評価する。これらの評価を通じて、リード候補者または組み合わせがインビボでのさらなる試験のために優先される。

20

30

【0222】

実施例4-選択された化合物を用いた養子細胞療法のインビボモデル

インビトロスクリーニングの結果を翻訳し、インビトロトリアージ実験を追跡するために、選択された化合物の主要候補を養子細胞療法のインビボモデルに適用する。具体的には、低分子モジュレーションの影響は、生着、殺腫瘍活性、二次殺腫瘍反応、遊走、細胞持続性、および移植片対宿主病に関して養子細胞療法で調べる。診療所での効果的な反応と相関することが判明している、耐久性のある養子細胞療法の特徴である他の情報もまた調べる。

【0223】

これらの実験は、ヒト細胞がヒト腫瘍を有する免疫不全NSGマウスに養子的に移植されるヒト化系、または免疫適格動物が同系腫瘍を担い同系細胞療法で治療される代用マウスモデルのいずれかで行われる。

40

【0224】

代用モデル系またはヒト化モデル系のいずれにおいても、マウスにルシファリン化リンパ腫または他の目的の腫瘍を注射する。その後すぐに、本明細書に開示されるビヒクルまたは調節化合物で前処理されている養子細胞療法が施される。細胞療法および腫瘍の両方の用量は、化合物治療の好ましいまたは有害な効果が観察され得る範囲を可能にするように最適化される。ビヒクルまたは化合物で処理した細胞を投与前に特徴付けし、動物の体重および腫瘍量は、試験期間を通して定期的に測定した。

【0225】

50

インビボで1つ以上の腫瘍関連パラメータを改善することができる化合物は、有効な腫瘍クリアランスに必要な細胞療法用量の減少、末梢血における養子細胞療法の持続性の増加、腫瘍部位への遊走の増強、および/または高い腫瘍線量による攻撃に対する生存率の増加を含むがこれらに限定されない期待効果を有する。

実施例5-DCC-2036はTcm表現型に偏る

【0226】

CD27はTRA結合TNF(腫瘍壊死因子)受容体ファミリーのメンバーで、4-1BBとOX-40も含まれる。これらの膜貫通タンパク質はリンパ球機能の調節に關与する。ヒトでは、ほとんどのナイーブ末梢T細胞(Tn)がCD27を発現する。一旦、ナイーブ末梢T細胞が活性化されると、CD27の発現は著しく増加する。しかしながら、T細胞の末端エフェクター分化は、CD27の不可逆的な喪失と關連している(Hintzenら、1994)。CD27の役割のさらなる解明は、それがT細胞免疫の発生および長期維持に必要であることを証明した(Hendriksら、2000年)。さらに、CCR7およびCD62Lマーカーの発現を特徴とするナイーブ(Tn)、幹細胞記憶(Tscm)および中枢記憶(Tcm)T細胞は、マウスモデル(Sommermeierら2015)と非ヒト霊長類モデル(Bergerら2008)の両方で優れた抗腫瘍活性を媒介する。

10

【0227】

中枢記憶表現型への歪みに対する化合物処理の効果を決定するために、単離されたCD8T細胞を、IL-2を添加したT細胞培地中で抗CD3/抗CD28ビーズを用いて0日目にまとめて活性化した。1日目に、細胞を、図2に示すCAR構築物1で形質導入し、細胞密度を 0.5×10^6 個/mlに調整し、 10^6 個の細胞を、ビヒクル(DMSO)、TWS119またはDCC-2036の存在下で12ウェルプレートに同じ濃度で播種した。4日目に、細胞を6ウェルプレートに移し、2mlの培地を各ウェルに加えた。6日目にさらに2mlの培地を各ウェルに加えた。8日目に、細胞をCD27の細胞表面発現についてフローサイトメーターで分析した。

20

【0228】

化合物処理T細胞および対照処理T細胞におけるCD27の発現を図4Bに示す。ビヒクル処理で観察されたCD27の発現は、1のMFI(平均蛍光強度)として定義され、化合物で処理された細胞の相対MFIが計算された。

30

【0229】

ビヒクルと比較して、DCC-2036処理はCD62LおよびCCR7の両方を発現するCAR-T細胞の頻度で2.3倍の増加をもたらしたのに対し、TWS119処理はCD62LおよびCCR7二重陽性細胞で1.7倍の増加をもたらした(図4A)。CD62LおよびCCR7の発現を変化させることに加えて、DCC-2036はまた、ビヒクルと比較して分化マーカーCD27の発現において2.2倍の増加を引き起こした(図4B)。対照的に、TWS119はCD27発現に影響を及ぼさなかった。

【0230】

実施例6-DCC-2036処理はT細胞消耗マーカー発現を減少させる

「消耗」によるT細胞機能不全は、癌や感染症の適切な制御を妨げ得る状態である。T細胞消耗は、PD-1およびTim-3を含む消耗マーカーと集合的に称され、エフェクター細胞機能の低下および複数の細胞表面タンパク質の発現増加を特徴とする(Wheery and Kurachi 2015)。

40

【0231】

消耗マーカー発現に対するCAR-T細胞の化合物処理の効果を決定するために、3人の異なるドナーからの細胞を調製し、そして上記のプロトコルに記載されるように処理した。フローサイトメトリーを用いてPD-1およびTim-3の発現を測定した。TWS119対照はビヒクルと比較してPD-1発現を3.3倍減少させたが、DCC-2036処理はPD-1表面発現で4.5倍の減少をもたらした(図6B)。Tim-3発現は、TWS119で2倍、そしてDCC-2036処理で3.7倍減少した(図6A)。このデータは、

50

DCC-2036によるT細胞の処理が、免疫機能障害に寄与するT細胞の消耗を減少させることによって細胞の抗腫瘍能力を増強することを示した。

【0232】

実施例7-DCC-2036で処理したCD8+T細胞の遺伝子発現の特徴付け
記憶細胞の歪みにおけるDCC-2036の影響を特徴付けるために、記憶T細胞において高度に発現されることが以前に知られている重要な遺伝子のパネル(すなわちCCR7、CD62Lなど)についての遺伝子発現変化を調べた。5人の異なるドナーからの凍結保存されたCD8+T細胞を解凍し、5%ヒトAB血清、IL-2、pen/strep、および追加のサプリメントを含むX-Vivo 15中に洗浄した。細胞を、抗CD3/抗CD28ビーズと共に 5×10^5 細胞/mlで平底384ウェルプレートに分注した。細胞を1 μ Mの最終濃度のDCC-2036、10 μ MのTWS-119で処理するか、またはピヒクル(DMSO)のみの対照処理を受けた。細胞を5%CO₂下、37°Cでおよそ6日間インキュベートした。

【0233】

・インキュベーション後、細胞を溶解し、RNAを単離し、断片化し、cDNAを適切なシーケンシングアダプターの存在下で生成し、イルミナの次世代シーケンシング技術(NGS)を用いてシーケンシングを行った。RNAシーケンシング(RNA-Seq)は、ヌクレオチド配列情報を取得するだけでなく、所定のサンプルのトランスクリプトームから定量的な遺伝子発現測定を提供するためにNGSの機能を利用する。遺伝子転写物を試料あたりのカウント/百万reads(CPM)に正規化し、各遺伝子転写物の相対定量を、対応するピヒクル対照処理試料と比較してそれぞれの処理において決定した。図5は、DCC-2036処理がTWS-119(既知の中樞記憶歪み制御化合物)と同様またはそれ以上のレベルで発現の増加を誘導した場合のいくつかの重要な記憶T細胞遺伝子の遺伝子発現の相対的定量化を示す。観察された結果は、DCC-2036による処理が、中樞記憶T細胞発現パターンの方への歪みと一致するバルクCD8+細胞集団における発現変化を促進することを意味する。

表5-DCC-2036および対照治療下で差次的に発現される関連遺伝子

【表4】

	遺伝子	タンパク質名	UniProtKB / Swiss-Protエントリ識別子		遺伝子	タンパク質名	UniProtKB / Swiss-Protエントリ識別子
1	BACH2	転写調節タンパク質BACH2	Q9BYV9	7	LRRN 3	ロイシンリッチリピートニューロンタンパク質3	Q9H3W5
2	CCR7	CCケモカイン受容体7型	P32248	8	NELL2	プロテインキナーゼC結合タンパク質NELL2	Q99435
3	CD27	CD27抗原	P26842	9	PRKCA	プロテインキナーゼCアルファ型	P17252
4	FAM129A	タンパク質ニバン	Q9BZQ8	10	CD62L	白血球接着分子1	P14151
5	ICOS	誘導性T細胞共刺激因子	Q9Y6W8	11	TCF7	転写因子7	P36402
6	LEF1	リンパ球エンハンサー結合因子1	Q9UJU2	12	TESPA1	胸腺細胞発現陽性選択関連タンパク質1	A2RU30

10

20

30

40

50

【0234】

実施例8-大規模培養形式におけるDCC-2036によるCAR-T細胞表現型の改善の実証

CD8 T細胞に対するDCC-2036の効果を決定するため、およびDCC-2036の拡大の増加がより大きな拡大フォーマットに拡大することを実証するために、CD8 T細胞を別々にインビトロで活性化し増殖させた。細胞を活性化の1日後にCAR-2構築物(図2)で形質導入し、次いで化合物ありまたはなしで24ウェルGEXプレートに蒔いた。活性化後1週間で採取するまで、培地の半分をその後2日毎に交換した。細胞を、化合物またはビヒクルの存在下で6日間活性化および増殖させた。DCC-2036は、CAR-T細胞生存率(図3A)および増殖(図3B)を改善することが示された。

10

【0235】

いくつかの文脈で臨床試験における養子細胞療法成功の可能性を示すことができる有益な臨床パラメータは、治療後の患者における移植細胞の拡大の能力および程度、ならびに/または、例えば、抗原への連続的暴露の文脈における初期拡大後の持続性および継続的な機能性である。操作されたT細胞が持続し、そして複数ラウンドの抗原刺激にわたって増殖し続ける能力は、そのような特徴および/またはインビボ機能もしくは臨床反応の可能性を示し得る。各化合物によって処理されたT細胞を、抗原への複数回の曝露および抗原からの撤退に亘ってインビトロで標的抗原を発現する腫瘍細胞を死滅させる能力および増殖を含む様々な機能について評価するインビトロ連続殺傷/再刺激アッセイをモデル系として使用した。このようなアッセイは、抗原との反復遭遇後の細胞機能に対する個々の化合物の影響、およびそのような文脈における細胞増殖または持続性を評価するために、化合物ありまたはなしで処理した細胞に対して実施した。

20

【0236】

CD8 T細胞をDMSO、TWS119、またはDCC-2036の存在下で活性化し、形質導入し、そして増殖させた。増殖の終わりに、CAR-T細胞を凍結保存した。CAR-T細胞を解凍し、CD19(CARによって認識される抗原)を発現する照射されたK562腫瘍細胞と共培養することによって連続再刺激アッセイを行った。各ラウンドの殺傷を開始する前に、CAR-T細胞数がそれぞれDMSO、TWS119、およびDCC-2036処理で生成された培養物から実質的に同じになるように細胞数を調整した。同数の照射CD19発現K562標的細胞を異なるCAR-T培養物に添加した。

30

【0237】

図3Cは、連続再刺激アッセイのラウンド3およびラウンド4において、DCC-2036で処理したCAR-T細胞の細胞数の増加がビヒクル対照よりはるかに高いことを示す。ビヒクル処理細胞は有意に減少した拡大を示し、一方TWS119処理細胞はビヒクルと比較して中程度の拡大の増加を示す(図3C)。したがって、DCC-2036による処理は、複数ラウンドの殺傷/再刺激を通してCAR-T細胞の増大した増殖を可能にする。各化合物処理下での4ラウンド全てにわたるCAR-T細胞数の総拡大もまた決定され、そしてDCC-2036処理CAR-T細胞はビヒクル対照と比較してはるかに大きい拡大を示す(図3D)。まとめると、これらのデータは、DCC-2036処置が、標的腫瘍細胞への反復曝露にもかかわらず、処置されたCAR-T細胞の継続的に増加した増殖の望ましい効果を与え得ることを示す。より長期間にわたって示される細胞増殖と共に殺傷能力は、処理されたCAR-T生成物の細胞持続性の指標である。

40

【0238】

TWS119またはDCC-2036を添加すると、活性化後1週間で、DMSOと比較してCD8 T細胞上のT細胞消耗マーカーTim-3(図6A)およびPD-1(図6B)の発現が減少することがさらに示された。

【0239】

実施例9-低温保存DCC-2036処理CAR-T細胞の改善されたインビボ有効性
DCC-2036処置がインビボでの腫瘍クリアランスおよびCAR-T細胞の持続性を増大させるかどうかを決定するために、CD19 CAR-T細胞およびNALM-6-1uc

50

腫瘍細胞を用いてNSGマウスにおいて化合物処置CAR-T細胞を評価した。NSGマウスに、ホタルルシフェラーゼを発現するように操作されたCD19+ヒト腫瘍株であるNa1m-6-lucを注射した。CAR-T細胞は、インビトロで別々に活性化され増殖されたCD4+およびCD8+T細胞から生成された。細胞を活性化の1日後にCAR-2構築物(図2)で形質導入し、次いで化合物ありまたはなしで24ウェルGREXプレートに蒔いた。活性化後1週間の採取まで、培地の半分をその後2日毎に交換した。細胞を凍結保存し、次いで使用のために解凍した。NSGマウスに腫瘍細胞を注入し、1週間後に眼窩後注射を介したCAR-T移植を行った。Na1m-6-luc細胞をIV注射した4日後、マウスを動物1匹あたり 2.0×10^5 個のCAR-T細胞(1:1のCD4:CD8)で処置した。腫瘍量を決定するためにマウスを定期的に画像化した。図7および8は、DCC-2036処置群のマウスが、TWS119またはDMSOの存在下で増殖したCAR-T細胞を受けたマウスと比較して、腫瘍量が劇的に減少したことを示す。TWS119またはDMSOの存在下で増殖したCAR-T細胞を受けたマウスは、最小限の腫瘍制御を示した。

10

【0240】

当業者であれば、本明細書に記載の方法、組成物、および製品は例示的な実施形態を代表するものであり、本発明の範囲に対する限定として意図されていないことを容易に理解するであろう。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示された本開示に対して様々な置換および改変がなされ得ることが当業者には容易に明らかであろう。

【0241】

本明細書で言及されているすべての特許および刊行物は、本開示が関連する当業者のレベルを示している。すべての特許および刊行物は、あたかも各個々の刊行物が具体的かつ個別に参考として援用されると示されるのと同程度に、参考として本明細書に援用される。

20

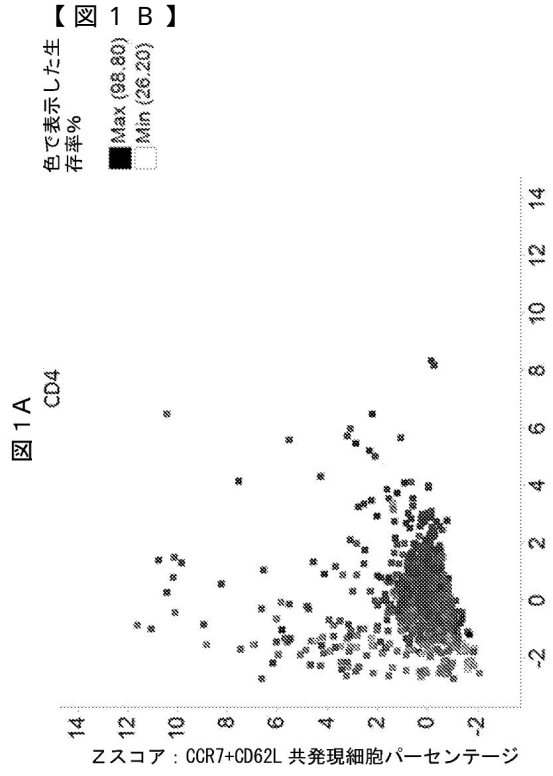
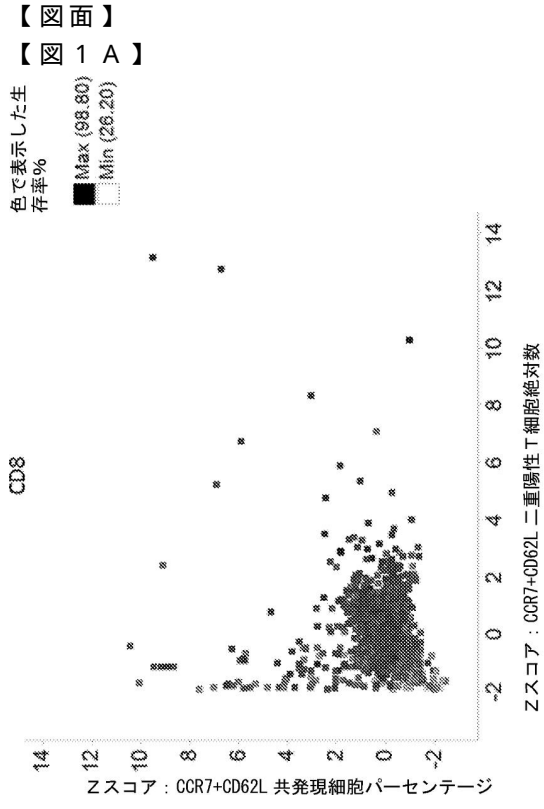
【0242】

本明細書に例示的に記載された本開示は、本明細書に具体的に開示されていないいずれかの要素、限定がない場合にも適切に実施され得る。したがって、例えば、本明細書の各例において、「含む」、「から本質的になる」、および「からなる」という用語はいずれも、他の2つの用語のいずれかと置き換えられてもよい。使用されている用語および表現は、説明の用語として使用され、限定のためではなく、そのような用語および表現の使用において、示され、説明された特徴またはその一部の均等物を除外する意図はなく、特許請求の範囲に記載の本開示の範囲内で様々な修正が可能であることを認識されたい。したがって、本開示は好ましい実施形態および任意選択の特徴によって具体的に開示されているが、本明細書に開示されている概念の修正および変形は当業者によって頻繁に行われ得るものであり、そのような改変およ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範囲内であるとみなされる。

30

40

50



【図 2】

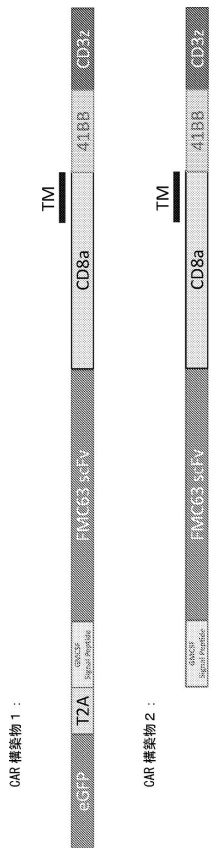


図 2

【図 3 - 1】

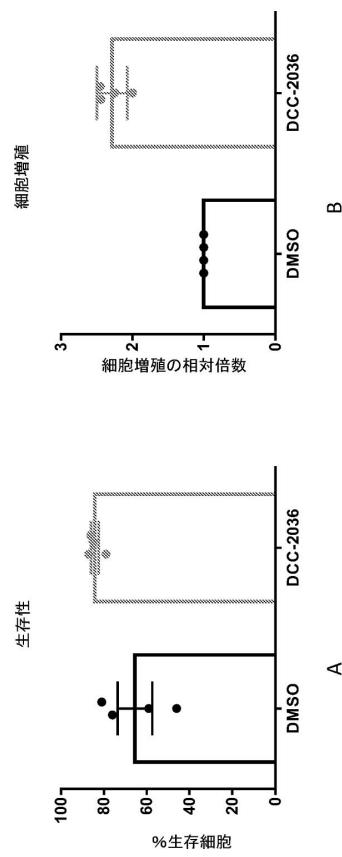


図 3 A 及び 3 B

10

20

30

40

50

【図 3 - 2】

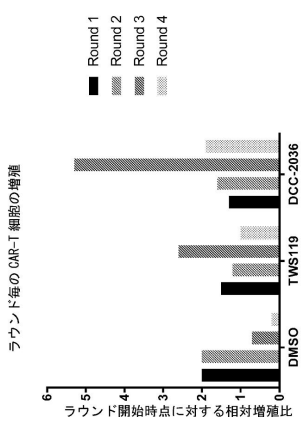
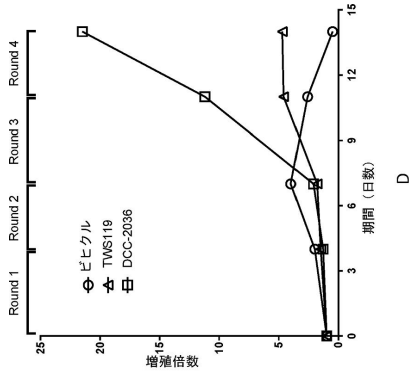


図 3C 及び 3D

【図 4】

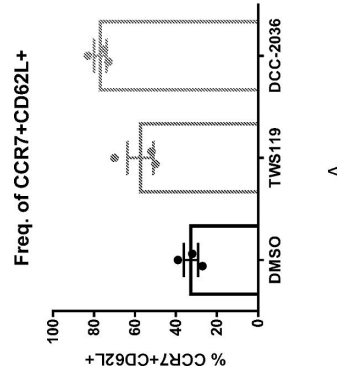
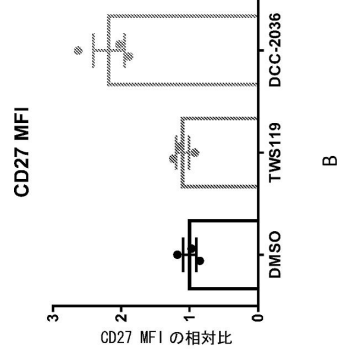


図 4

【図 5】

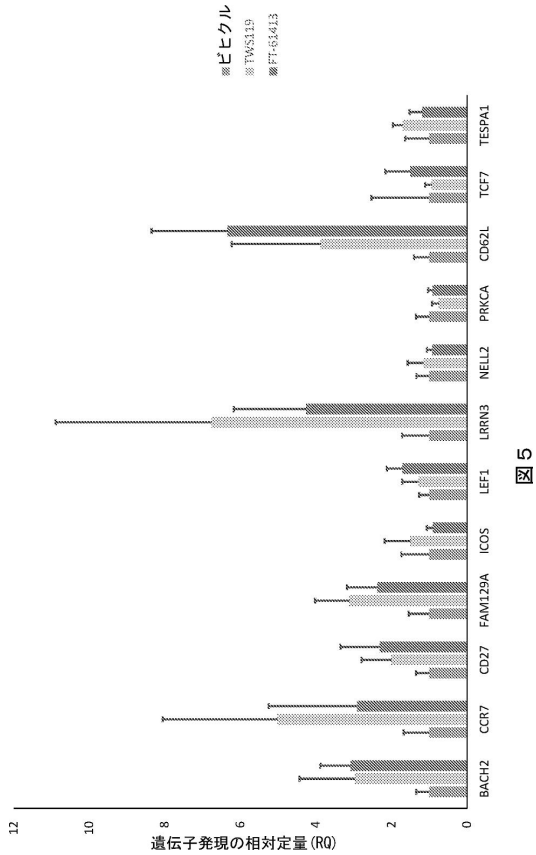


図 5

【図 6】

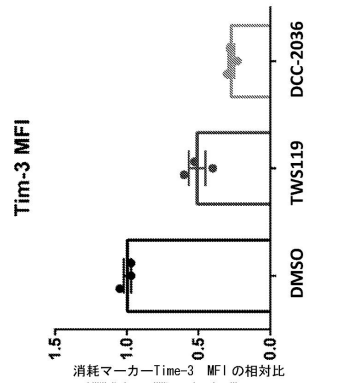
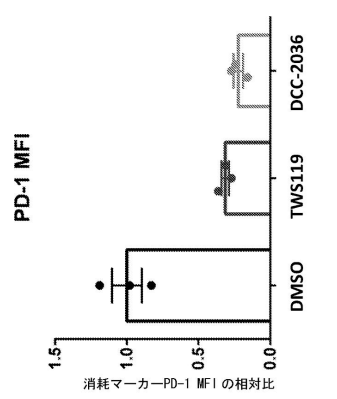


図 6

10

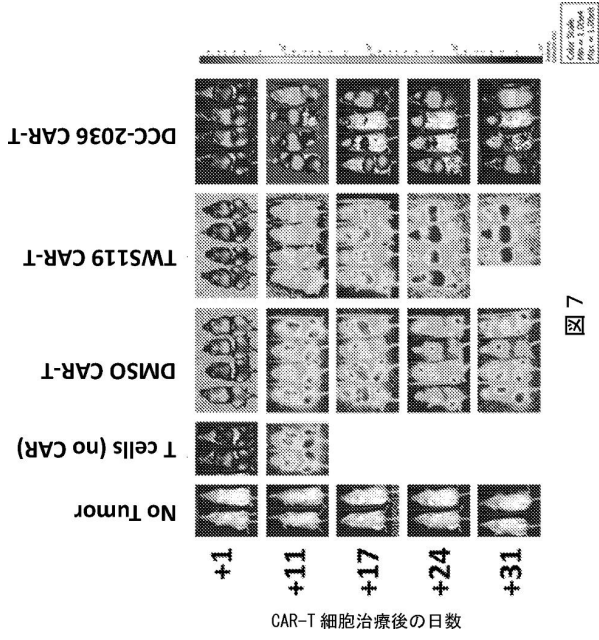
20

30

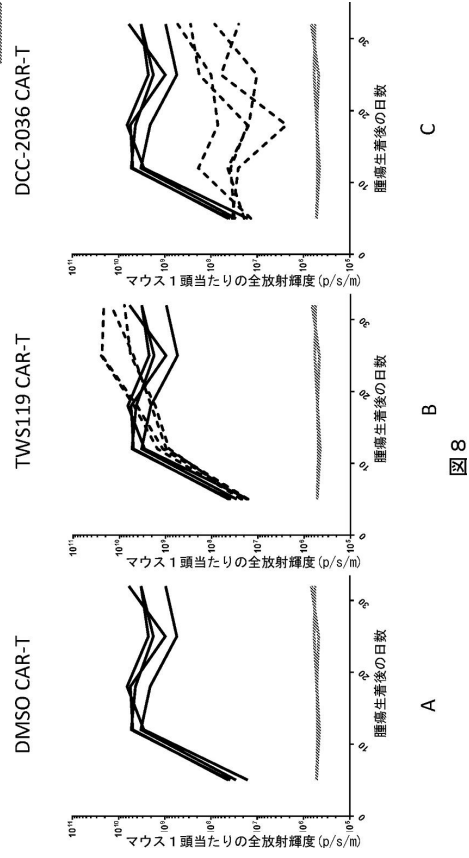
40

50

【 図 7 】



【 図 8 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
C 0 7 K 14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1、サン ディエゴ、ジェネラル アトミクス コート
3 5 3 5、スイート 2 0 0

(72)発明者

ハーディ, イアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1、サン ディエゴ、ジェネラル アトミクス コート
3 5 3 5、スイート 2 0 0

(72)発明者

ペラルタ, アイゲン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1、サン ディエゴ、ジェネラル アトミクス コート
3 5 3 5、スイート 2 0 0

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献

Experimental Hematology, 2013年, Vol.41, P.604-614

blood, 2012年, Vol.120, No.21, Abstract No.1045, [retrieved on 2021.08.11], Retrieved
from the Internet: URL [https://ashpublications.org/blood/article/120/21/1045/89215/
FLT3-Kinase-Inhibitors-Quizartinib-and-Midostaurin](https://ashpublications.org/blood/article/120/21/1045/89215/FLT3-Kinase-Inhibitors-Quizartinib-and-Midostaurin)

Cancer Immunol. Immunother., 2012年, Vol.61, P.193-202

(58)調査した分野

(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

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

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)