

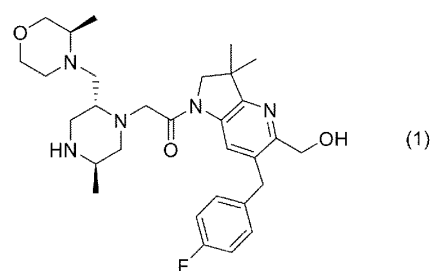
明 細 書

発明の名称： 組み合わせ医薬

技術分野

[0001] 下記式(1)：

[化1]



で表される化合物(トリナパント、IUPAC名：1-[6-[(4-fluorophenyl)methyl]-5-(hydroxymethyl)-3,3-dimethyl-2H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-1-yl]-2-[(2R,5R)-5-methyl-2-([(3R)-3-methylmorpholin-4-yl]methyl)piperazin-1-yl]ethanone)、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物(以下、「トリナパント系薬剤」と称する。)、或いは、改変免疫細胞を含有する医薬組成物、並びに、それに関連する主題が開示される。

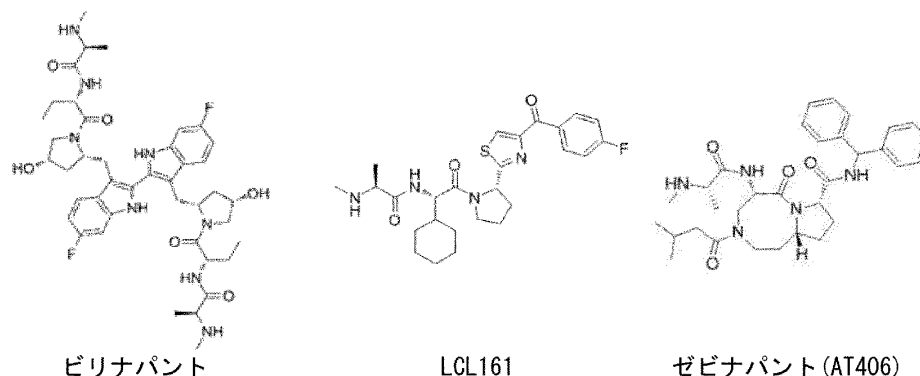
背景技術

[0002] アポトーシス阻害タンパク質(IAP)は、多くの悪性腫瘍で過剰発現され、腫瘍増殖などに関与している。IAPファミリーは、8つのメンバー、すなわち、XIAP、cIAP1、cIAP2、NAIP、ILP2、ML-IAP、survivin(サバイビン)、及びBRUCEを含む。IAPファミリーのメンバーは、共通して、バキュロウイルスIAPリピーター(BIR)ドメインと呼ばれる、約70個のアミノ酸で構成される亜鉛配位ドメインを1~3コピー有している。BIRドメインは、カスパーゼ3、7、9などのカスパーゼと結合し、アポトーシスを阻害する作用を有する。

[0003] IAPアンタゴニストは、カスパーゼのBIRドメインに対する結合を阻害してアポトーシスを誘導することで腫瘍を治療し得る。IAPアンタゴニストとしては、トリナパント(ASTX660)などの非ペプチド模倣物小分子アンタゴニスト(

例えば特許文献1)、およびピリナパント、LCL161、AT406などの第2ミトコンドリア由来カスパーゼ活性化因子(SMAC)模倣物が知られている。

[化2]



[0004] 腫瘍を治療するための別のアプローチとして、遺伝子改変免疫細胞を用いた養子免疫療法が知られている。

[0005] 例えば、生体から採取したT細胞にキメラ抗原受容体をコードする核酸を導入し、得られたT細胞を体外で増殖させて輸注する方法が知られている(例えば特許文献2)。第1世代のキメラ抗原受容体は、腫瘍細胞の表面抗原を認識し得る単鎖抗体、膜貫通ドメイン、及びT細胞を活性化させるTCR複合体CD3ζの細胞内シグナル伝達ドメインで構成される。第1世代のキメラ抗原受容体のT細胞活性化を増強する目的で、T細胞の共刺激分子であるCD28の細胞内シグナル伝達ドメインを連結した第2世代のキメラ抗原受容体が開発されている。さらに、腫瘍壊死因子(TNF)受容体スーパーファミリーであるCD137(4-1BB)又はCD134(OX40)由来の細胞内シグナル伝達ドメインをタンデムに連結した第3世代のキメラ抗原受容体も開発されている。

[0006] また、生体から採取したT細胞に、特定の抗原を認識し得るT細胞受容体をコードする核酸を導入し、得られたT細胞を体外で増殖させて輸注する方法も知られている。T細胞受容体をコードする核酸としては、例えばgp100、MART-1、CEA、MAGE-A4、WT1、NY-ESO-1などの腫瘍抗原を標的としたTCR遺伝子が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2015/092420号

特許文献2：国際公開第1993/019163号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本開示は、遺伝子改変免疫療法における治療効果を改善することを課題の1つとする。

課題を解決するための手段

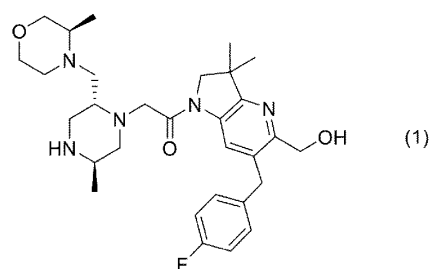
[0009] 上記の課題を解決するため鋭意検討した結果、トリナパント系薬剤を含有する医薬組成物を改変免疫細胞と組み合わせて投与することにより、或いは、改変免疫細胞を含有する医薬組成物をトリナパント系薬剤と組み合わせて投与することにより、効能が顕著に増大し、相乗的効果を発揮することを見出した。

[0010] 本開示は、代表的には、下記の態様を包含する。

項1.

下記式(1)：

[化3]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を含有する医薬組成物(又は薬剤、医薬、もしくはIAP阻害剤)であって、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞と組み合わせて投与される、前記医薬組成物(又は薬剤、医薬、もしくはIAP阻害剤)。

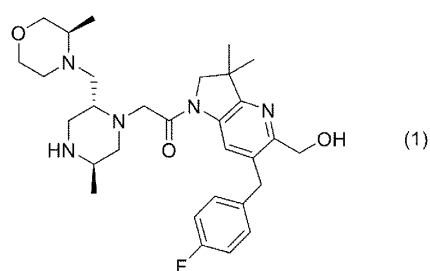
項1a.

前記免疫細胞の投与の前、同時、又は後に投与される、項1に記載の医薬組成物(又は薬剤、医薬、もしくはIAP阻害剤)。

項2.

キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞を含有する医薬組成物であって、下記式(1)：

[化4]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物と組み合わせて投与される、前記医薬組成物。

項2a.

前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物の投与の前、同時、又は後に投与される、項2に記載の医薬組成物。

項3.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、CD19、インテグリン $\beta 7$ 、及びNY-ESO-1から選択される抗原を特異的に認識する、項1又は2、或いは、項1a又は2aに記載の医薬組成物。

項4.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、活性型インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識する、項1又は2、或いは、項1a又は2aに記載の医薬組成物。

項5.

前記免疫細胞がキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記キメラ抗原受容体が、

- (1) 抗原を認識可能な細胞外ドメイン、
 - (2) 膜貫通ドメイン、
 - (3) 共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメイン、及び
 - (4) CD3 ζ の細胞内シグナル伝達ドメイン
- を含有する、項1～4、1a、及び2aのいずれかに記載の医薬組成物。

項6.

前記細胞外ドメインが、CD19又はインテグリン $\beta 7$ を認識可能な細胞外ドメインである、項5に記載の医薬組成物。

項7.

前記膜貫通ドメインが、CD28又はCD8の膜貫通ドメインである、項5又は6に記載の医薬組成物。

項8.

前記共刺激分子が、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、又はCD278(ICOS)である、項5～7のいずれかに記載の医薬組成物。

項9.

前記免疫細胞が組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記組換えT細胞受容体が、NY-ESO-1を認識可能な可変ドメインを有する、項1又は2、或いは、項1a又は2aに記載の医薬組成物。

項10.

前記免疫細胞が、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたNK細胞、又はNY-ESO-1を特異的に認識する組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞である、項1又は2、或いは、項1a又は2aに記載の医薬組成物。

項11.

癌を予防及び／又は治療するための、項1～10、1a、及び2aのいずれかに記

載の医薬組成物。

項12.

前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物が、10mg～180mg/日で投与される、項1～11、1a、及び2aのいずれかに記載の医薬組成物。

項12a.

前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物が、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与される、項1～11、1a、及び2aのいずれかに記載の医薬組成物。

項13.

前記免疫細胞が、 1×10^3 個～ 1×10^8 個(生細胞数)/kg体重/日で投与される、項1～12、1a、2a、及び12aのいずれかに記載の医薬組成物。

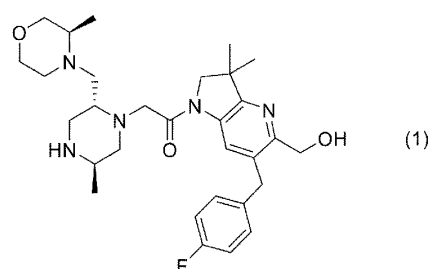
項13a.

前記免疫細胞が、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与される、項1～12、1a、2a、及び12aのいずれかに記載の医薬組成物。

項14.

下記式(1)：

[化5]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を含有する第一剤、並びに、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受

容体を発現するように改変された免疫細胞を含有する第二剤を備えるキット。

項14a.

前記第一剤及び第二剤は、同一の製剤にあり、同時に投与される、或いは前記第一剤及び第二剤は、異なる製剤にあり、同時に、別々に、又は連続的に投与される、

項14に記載のキット。

項14b.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、CD19、インテグリン $\beta 7$ 、及びNY-ESO-1から選択される抗原を特異的に認識する、項14又は14aに記載のキット。

項14c.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、活性型インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識する、項14又は14aに記載のキット。

項14d.

前記免疫細胞がキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記キメラ抗原受容体が、

- (1) 抗原を認識可能な細胞外ドメイン、
- (2) 膜貫通ドメイン、
- (3) 共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメイン、及び
- (4) CD3 ζ の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含有する、項14及び14a～14cのいずれかに記載のキット。

項14e.

前記細胞外ドメインが、CD19又はインテグリン $\beta 7$ を認識可能な細胞外ドメインである、項14dに記載のキット。

項14f.

前記膜貫通ドメインが、CD28又はCD8の膜貫通ドメインである、項14d又は14eに記載のキット。

項14g.

前記共刺激分子が、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、又はCD278(ICOS)である、項14d～14fのいずれかに記載のキット。

項14h.

前記免疫細胞が組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記組換えT細胞受容体が、NY-ESO-1を認識可能な可変ドメインを有する、請求項14又は14aに記載のキット。

項14i.

前記免疫細胞が、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたNK細胞、又はNY-ESO-1を特異的に認識する組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞である、請求項14又は14aに記載のキット。

項14j.

癌を予防及び／又は治療するための、項14及び14a～14iのいずれかに記載のキット。

項14k.

前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物が、10mg～180mg/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与される、項14及び14a～14jのいずれかに記載のキット。

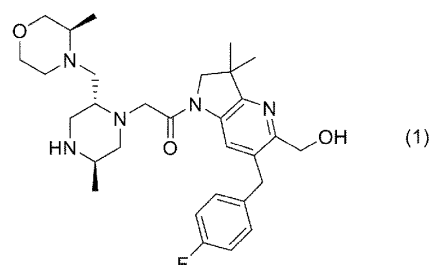
項14l.

前記免疫細胞が、 1×10^3 個～ 1×10^8 個(生細胞数)/kg体重/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与される、項14及び14a～14kのいずれかに記載のキット。

項15.

癌を予防及び／又は治療する方法であって、
癌の予防及び／又は治療を必要とする対象に、下記式(1)：

[化6]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞と組み合わせて投与することを含む、方法。

項15a.

前記投与することが、前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を、前記免疫細胞の投与の前、同時、又は後に投与することである、項15に記載の方法。

項15b.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、CD19、インテグリン $\beta 7$ 、及びNY-ESO-1から選択される抗原を特異的に認識する、項15又は15aに記載の方法。

項15c.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、活性型インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識する、項15又は15aに記載の方法。

項15d.

前記免疫細胞がキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記キメラ抗原受容体が、

- (1) 抗原を認識可能な細胞外ドメイン、
- (2) 膜貫通ドメイン、
- (3) 共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメイン、及び

(4) CD3ζの細胞内シグナル伝達ドメイン

を含有する、項15及び15a～15cのいずれかに記載の方法。

項15e.

前記細胞外ドメインが、CD19又はインテグリン $\beta 7$ を認識可能な細胞外ドメインである、項15dに記載の方法。

項15f.

前記膜貫通ドメインが、CD28又はCD8の膜貫通ドメインである、項15d又は15eに記載の方法。

項15g.

前記共刺激分子が、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、又はCD278(ICOS)である、項15d～15fのいずれかに記載の方法。

項15h.

前記免疫細胞が組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記組換えT細胞受容体が、NY-ESO-1を認識可能な可変ドメインを有する、項15又は15aに記載の方法。

項15i.

前記免疫細胞が、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたNK細胞、又はNY-ESO-1を特異的に認識する組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞である、項15又は15aに記載の方法。

項15j.

前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を、10mg～180mg/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与する、項15及び15a～15iのいずれかに記載の方法。

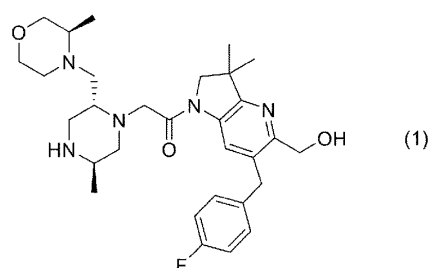
項15k.

前記免疫細胞を、 1×10^3 個 $\sim 1 \times 10^8$ 個(生細胞数)/kg体重/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与する、項15及び15a $\sim 15j$ のいずれかに記載の方法。

項16.

キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞と組み合わせて投与するための医薬の調製のための、下記式(1)：

[化7]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物の使用。

項16a.

前記医薬が、前記免疫細胞の投与の前、同時、又は後に投与するための医薬である、項16に記載の使用。

項16b.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、CD19、インテグリン $\beta 7$ 、及びNY-ESO-1から選択される抗原を特異的に認識する、項16又は16aに記載の使用。

項16c.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、活性型インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識する、項16又は16aに記載の使用。

項16d.

前記免疫細胞がキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記キメラ抗原受容体が、

- (1) 抗原を認識可能な細胞外ドメイン、
 - (2) 膜貫通ドメイン、
 - (3) 共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメイン、及び
 - (4) CD3 ζ の細胞内シグナル伝達ドメイン
- を含有する、項16及び16a～16cのいずれかに記載の使用。

項16e.

前記細胞外ドメインが、CD19又はインテグリン $\beta 7$ を認識可能な細胞外ドメインである、項16dに記載の使用。

項16f.

前記膜貫通ドメインが、CD28又はCD8の膜貫通ドメインである、項16d又は16eに記載の使用。

項16g.

前記共刺激分子が、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134(0X40)、CD137(4-1BB)、又はCD278(ICOS)である、項16d～16fのいずれかに記載の使用。

項16h.

前記免疫細胞が組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記組換えT細胞受容体が、NY-ESO-1を認識可能な可変ドメインを有する、項16又は16aに記載の使用。

項16i.

前記免疫細胞が、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたNK細胞、又はNY-ESO-1を特異的に認識する組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞である、項16又は16aに記載の使用。

項16j.

前記医薬が、癌を予防及び／又は治療するための医薬である、項16及び16a

～16iのいずれかに記載の使用。

項16k.

前記医薬が、前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を10mg～180mg/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与するための医薬である、項16及び16a～16jのいずれかに記載の使用。

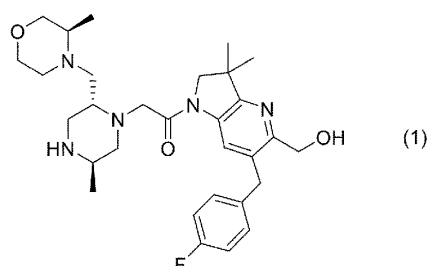
項16L.

前記医薬が、 1×10^3 個～ 1×10^8 個(生細胞数)/kg体重/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量の前記免疫細胞と組み合わせて投与するための医薬である、項16及び16a～16kのいずれかに記載の使用。

項17.

下記式(1)：

[化8]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物と組み合わせて投与するための医薬の調製のための、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞の使用。

項17a.

前記医薬が、前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物の投与の前、同時、又は後に投与するための医薬である、項17に記載の使用。

項17b.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、CD19、インテグリン $\beta 7$

、及びNY-ESO-1から選択される抗原を特異的に認識する、項17又は17aに記載の使用。

項17c.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、活性型インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識する、項17又は17aに記載の使用。

項17d.

前記免疫細胞がキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記キメラ抗原受容体が、

- (1) 抗原を認識可能な細胞外ドメイン、
- (2) 膜貫通ドメイン、
- (3) 共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメイン、及び
- (4) CD3 ζ の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含有する、項17及び17a～17cのいずれかに記載の使用。

項17e.

前記細胞外ドメインが、CD19又はインテグリン $\beta 7$ を認識可能な細胞外ドメインである、項17dに記載の使用。

項17f.

前記膜貫通ドメインが、CD28又はCD8の膜貫通ドメインである、項17d又は17eに記載の使用。

項17g.

前記共刺激分子が、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134(0X40)、CD137(4-1BB)、又はCD278(ICOS)である、項17d～17fのいずれかに記載の使用。

項17h.

前記免疫細胞が組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記組換えT細胞受容体が、NY-ESO-1を認識可能な可変ドメインを有する、項17又は17aに記載の使用。

項17i.

前記免疫細胞が、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたNK細胞、又はNY-ESO-1を特異的に認識する組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞である、項17又は17aに記載の使用。

項17j.

前記医薬が、癌を予防及び／又は治療するための医薬である、項17及び17a～17iのいずれかに記載の使用。

項17k.

前記医薬が、前記免疫細胞を 1×10^3 個～ 1×10^8 個(生細胞数)/kg体重/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与するための医薬である、項17及び17a～17jのいずれかに記載の使用。

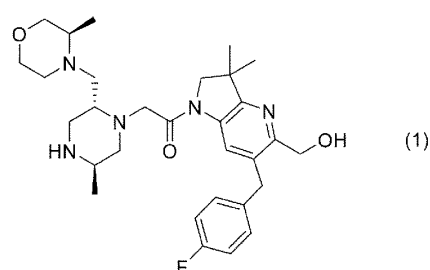
項17L.

前記医薬が、10mg～180mg/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量の、前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物と組み合わせて投与するための医薬である、項17及び17a～17kのいずれかに記載の使用。

項18.

キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞と組み合わせて投与するために用いられる、下記式(1)：

[化9]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能

な溶媒和物。

項18a.

前記免疫細胞の投与の前、同時、又は後に投与するために用いられる、項18に記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物。

項18b.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、CD19、インテグリン $\beta 7$ 、及びNY-ESO-1から選択される抗原を特異的に認識する、項18又は18aに記載の使用。

項18c.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、活性型インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識する、項18又は18aに記載の使用。

項18d.

前記免疫細胞がキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記キメラ抗原受容体が、

- (1) 抗原を認識可能な細胞外ドメイン、
- (2) 膜貫通ドメイン、
- (3) 共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメイン、及び
- (4) CD3 ζ の細胞内シグナル伝達ドメイン

を含有する、項18及び18a～18cのいずれかに記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物。

項18e.

前記細胞外ドメインが、CD19又はインテグリン $\beta 7$ を認識可能な細胞外ドメインである、項18dに記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物。

項18f.

前記膜貫通ドメインが、CD28又はCD8の膜貫通ドメインである、項18d又は18eに記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能

な溶媒和物。

項18g.

前記共刺激分子が、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134(0X40)、CD137(4-1BB)、又はCD278(ICOS)である、項18d～18fのいずれかに記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物。

項18h.

前記免疫細胞が組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記組換えT細胞受容体が、NY-ESO-1を認識可能な可変ドメインを有する、項18又は18aに記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物。

項18i.

前記免疫細胞が、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたNK細胞、又はNY-ESO-1を特異的に認識する組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞である、項18又は18aに記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物。

項18j.

癌を予防及び／又は治療するために用いられる、項18及び18a～18iのいずれかに記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物。

項18k.

10mg～180mg/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与するために用いられる、項18及び18a～18jのいずれかに記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物。

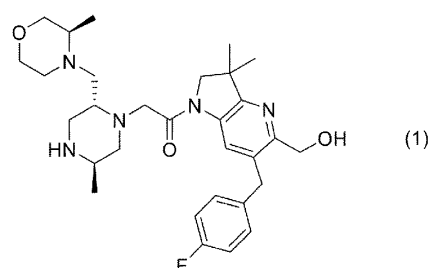
項18L.

1×10^3 個 $\sim 1 \times 10^8$ 個(生細胞数)/kg体重/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量の前記免疫細胞と組み合わせて投与するために用いられる、項18及び18a $\sim$ 18kのいずれかに記載の化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物。

項19.

下記式(1)：

[化10]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物と組み合わせて投与するために用いられる、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞。

項19a.

前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物の投与の前、同時、又は後に投与するために用いられる、項19に記載の免疫細胞。

項19b.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、CD19、インテグリン $\beta 7$ 、及びNY-ESO-1から選択される抗原を特異的に認識する、項19又は19aに記載の免疫細胞。

項19c.

前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、活性型インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識する、項19又は19aに記載の免疫細胞。

項19d.

キメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前

記キメラ抗原受容体が、

- (1) 抗原を認識可能な細胞外ドメイン、
- (2) 膜貫通ドメイン、
- (3) 共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメイン、及び
- (4) CD3ζの細胞内シグナル伝達ドメイン

を含有する、項19及び19a～19cのいずれかに記載の免疫細胞。

項19e.

前記細胞外ドメインが、CD19又はインテグリン $\beta 7$ を認識可能な細胞外ドメインである、項19dに記載の免疫細胞。

項19f.

前記膜貫通ドメインが、CD28又はCD8の膜貫通ドメインである、項19d又は19eに記載の免疫細胞。

項19g.

前記共刺激分子が、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、又はCD278(ICOS)である、項19d～19fのいずれかに記載の免疫細胞。

項19h.

前記免疫細胞が組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記組換えT細胞受容体が、NY-ESO-1を認識可能な可変ドメインを有する、項19又は19aに記載の免疫細胞。

項19i.

前記免疫細胞が、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたNK細胞、又はNY-ESO-1を特異的に認識する組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞である、項19又は19iに記載の免疫細胞。

項19j.

癌を予防及び／又は治療するために用いられる、項19及び19a～19iのいずれかに記載の免疫細胞。

項19k.

1×10^3 個～ 1×10^8 個(生細胞数)/kg体重/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量で投与するために用いられる、項19及び19a～19jのいずれかに記載の免疫細胞。

項19L.

10mg～180mg/日、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量の、前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物と組み合わせて投与するために用いられる、項19及び19a～19kのいずれかに記載の免疫細胞。

発明の効果

[0011] 本開示により、トリナパント系薬剤又は改変免疫細胞を含有する医薬組成物の効能を顕著に増大させることができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1はBirinapant(ピリナパント)とCD19 CAR-Tとの併用効果を示すグラフである。

[図2]図2はTolinapant(トリナパント)(当該図では式(1)で表される化合物の(+)-L-乳酸塩を意味する)とCD19 CAR-Tとの併用効果を示すグラフである。＊は、一元配置モデルにおける併用効果の検定を行い、対照(Tolinapant、CD19 CAR-T (1×10^5 cells/body) それぞれ)に対して、TolinapantとCD19 CAR-T (1×10^5 cells/body)との併用に有意な($p < 0.05$)効果を示したことを表す。

[図3]図3は低腫瘍量に対するTolinapant(当該図では式(1)で表される化合物の(+)-L-乳酸塩を意味する)とCD19 CAR-Tとの併用効果を示すグラフである。

[図4]図4はLCL161とCD19 CAR-Tとの併用効果を示すグラフである。

[図5]図5はAT406とCD19 CAR-Tとの併用効果を示すグラフである。

[図6]図6は投与レジメンを示す図である。

[図7]図7はTolnapantと活性型インテグリン $\beta 7$ CAR-Tとの併用効果を示すグラフである。

[図8]図8は投与レジメンを示す図である。

[図9]図9はTolnapantとCD19 CAR-KHYG-1との併用効果を示すグラフである。

[図10]図10は投与レジメンを示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] A. トリナパント系薬剤を含有する医薬組成物

本開示のトリナパント系薬剤を含有する医薬組成物(以下、「医薬組成物A」と称する。)は、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞(後述の医薬組成物Bの形態であってもよい。)と組み合わせて投与される医薬組成物であることが好ましく、具体的には、前記免疫細胞の投与の前、同時、又は後に投与される医薬組成物であることが好ましい。医薬組成物Aは、典型的にはIAPアンタゴニストであることができ、特にX IAP、cIAP1、及びcIAP2のアンタゴニストであることができる。トリナパント系薬剤は、例えば、他のIAPアンタゴニストと比較して、改変された免疫細胞と組み合わせて投与したときに、より迅速に効能を発揮し得る。

[0014] A-1. トリナパント系薬剤

式(1)で表される化合物は、総量の55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、99%以上、99.5%以上、99.9%以上、又は100%が単一の光学異性体として存在し得る。

[0015] 式(1)で表される化合物の薬学的に許容可能な塩は、酸付加塩であることが好ましい。酸付加塩は有機酸付加塩であっても無機酸付加塩であってもよい。酸付加塩の非限定的な例としては、酢酸、2,2-ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸(例:L-アスコルビン酸)、L-アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4-アセトアミド安息香酸、ブタン酸、(+)-ショウノウ酸、カンファー-スルホン酸、(+)-(1S)-カンファー-10-スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、ケイ皮酸、クエン酸、シクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒ

ドロキシエタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクトール酸、ゲンチシン酸、グルコヘプトン酸、D-グルコン酸、グルクロン酸（例：D-グルクロン酸）、グルタミン酸（例：L-グルタミン酸）、 α -オキソグルタル酸、グリコール酸、馬尿酸、ハロゲン化水素酸（例：臭化水素酸、塩酸、ヨウ化水素酸）、イセチオン酸、乳酸（例：(+)-L-乳酸、(-)-D-乳酸、(±)-DL-乳酸）、ラクトビオン酸、マレイン酸、リンゴ酸、(-)-L-リンゴ酸、マロン酸、(±)-DL-マンデル酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、ニコチン酸、硝酸、オレイン酸、オロチン酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、リン酸、プロピオン酸、ピルビン酸、L-ピログルタミン酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、硫酸、タンニン酸、(+)-L-酒石酸、チオシアン酸、p-トルエンスルホン酸、ウンデシレン酸、吉草酸、アシル化アミノ酸などが挙げられる。一実施形態において、式(1)で表される化合物の薬学的に許容可能な塩は、乳酸塩（例えば(+)-L-乳酸）、塩酸塩（二塩酸塩を含む）、硫酸塩、又はメシル酸塩であることが好ましい。

[0016] 前記薬学的に許容可能な溶媒和物の非限定的な例としては、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、酢酸、酢酸エチル、エタノールアミン、ジメチルスルホキシド(DMSO)などが挙げられる。

[0017] A-2. 他の成分

医薬組成物Aは、他の成分として、薬学的に許容可能な賦形剤を含有することが好ましい。薬学的に許容可能な賦形剤としては、例えば、担体(固体担体、半固体担体、及び液体担体を含む)、補助剤、希釈剤、充填剤又は増量剤、造粒剤、コーティング剤、放出制御剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、保存剤、抗酸化剤、緩衝剤、沈殿防止剤、増粘剤、矯味矯臭剤、安定剤、界面活性剤、キレート剤、又はその他の医薬組成物で慣用されている賦形剤などが挙げられる。薬学的に許容可能な賦形剤は1種を単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0018] A-3. 形態

医薬組成物Aは、液状製剤(例：注射剤、点眼剤、点鼻剤、懸濁剤)、固形製剤(例：錠剤、顆粒剤、散剤)、半固形製剤(例：軟膏剤、坐剤)、及びその他当業者に公知の製剤形態のいずれであってもよい。

[0019] A-4. 投与

医薬組成物Aは、経口投与用であっても非経口投与用であってもよい。医薬組成物Aは、局所投与用であってもよい。医薬組成物Aは、例えば、眼内、耳、鼻腔内、舌下、気管支内、静脈内、筋肉内、腹腔内、直腸内、腔内、又は経皮投与用であってもよい。医薬組成物Aは、注射用であってもよい。

[0020] トリナパント系薬剤の投与量は、投与目的、投与対象及びその状態などに応じて適宜選択することができる。例えば、対象の体重1kg当たりの1日投与量の下限は、0.01mg、0.05mg、0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、0.6mg、0.7mg、0.8mg、0.9mg、又は1mgであってもよい。また、対象の体重1kg当たりの1日投与量の上限も、下限と同様に適宜選択することができ、例えば、10mg、9mg、8mg、7mg、6mg、5mg、4mg、3mg、2mg、又は1mgであってもよい。例えば、対象の体重1kg当たりの1日投与量は、0.01mg～5mg、0.05mg～4mg、又は0.1mg～3mgであってもよい。1日投与量は、例えば、1mg以上、5mg以上、10mg以上、20mg以上、30mg以上、40mg以上、50mg以上、60mg以上、70mg以上、80mg以上、90mg以上、又は100mg以上であってもよく、500mg以下、400mg以下、300mg以下、200mg以下、190mg以下、180mg以下、170mg以下、160mg以下、150mg以下、140mg以下、130mg以下、120mg以下、110mg以下、又は100mg以下であってもよい。例えば、1日投与量は、1mg～300mg、5mg～200mg、又は10mg～180mgであってもよい。なお、トリナパント系薬剤の投与量は、トリナパントの塩や溶媒和物の場合、トリナパントのフリー体(上記式(1)で表される化合物)の重量に換算した量であってもよいし、塩や溶媒和物の実重量であってもよい。一実施形態において、トリナパント系薬剤の投与量は、トリナパントの塩や溶媒和物の場合、トリナパントのフリー体の重量に換算した量である。1日投与量が前記範囲になるように2回以上(例：2回又は3回)に分けて投与してもよいが、1回で投与することが好ましい。トリナパント系薬剤の投与

量は、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量であってもよい。このような量で投与した場合であっても、改変された免疫細胞の投与と相まって優れた効能を発揮し得る。

[0021] 医薬組成物Aは任意の頻度で投与することができる。例えば、医薬組成物Aは1日に1回、2回、又は3回、2日に1回、3日に1回、4日に1回、5日に1回、6日に1回、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、又は4週間に1回の頻度で投与することができる。また、医薬組成物Aは、前記頻度(例：1日1回)で所定の期間(例：1週間、2週間、3週間、又は4週間)投与を継続してもよく、その後、所定の期間(例：1週間、2週間、3週間、又は4週間)投与を中断してもよく、投与の継続及び中断のサイクルを繰り返してもよい。例えば、医薬組成物Aを、1日に1回、7日間投与し、その後、7日間投与を中断するサイクルを、1回、又は2回以上行うことができる。

[0022] 医薬組成物Aは、改変された免疫細胞の投与の前、例えば、投与の直前、1分前、2分前、3分前、4分前、5分前、10分前、20分前、30分前、1時間前、2時間前、3時間前、4時間前、5時間前、6時間前、7時間前、8時間前、9時間前、10時間前、11時間前、12時間前、18時間前、24時間前、2日前、3日前、4日前、5日前、6日前、又は1週間前に投与してもよい。医薬組成物Aは、改変された免疫細胞の投与と同時に投与してもよい。医薬組成物Aは、改変された免疫細胞の投与の後、例えば、投与の直後、1分後、2分後、3分後、4分後、5分後、10分後、20分後、30分後、1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、5時間後、6時間後、7時間後、8時間後、9時間後、10時間後、11時間後、12時間後、18時間後、24時間後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、又は1週間後に投与してもよい。また、医薬組成物Aは、例えば、改変された免疫細胞の投与後であって、腫瘍マーカーのレベルがベースラインレベルを上回る場合に投与してもよい。

[0023] 医薬組成物Aの投与と改変された免疫細胞の投与との間に、或いは、医薬組成物Aの投与後から次の医薬組成物Aの投与までの間に、他の化学療法(他の薬剤の投与)を行ってもよく、非化学療法(例：放射線療法、光線力学療法、外

科手術、食事制限)などを行ってもよい。他の薬剤の非限定的な例としては、アルキル化剤、DNAメチル化阻害剤、代謝拮抗剤(例：ピリミジン系代謝拮抗剤、プリン系代謝拮抗剤、葉酸代謝拮抗剤)などが挙げられる。

[0024] 医薬組成物Aの投与対象としては、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、サル、ヒツジ、ウマ、ウシ、マウス、ラットなどが挙げられるが、これらに限定されない。また、医薬組成物Aの投与対象は、改変された免疫細胞を投与される又は投与された対象であってもよい。医薬組成物Aの投与対象は、IAP関連疾患、特に癌の予防及び／又は治療を必要とする対象(又は初発患者もしくは再発患者)であることが好ましい。

[0025] 医薬組成物Aの組成、製造方法、投与方法等は、例えばW02015/092420(参照することによりその全体が明細書に組み込まれる)の記載に基づいて設計することができる。

[0026] A-5. 医薬用途

医薬組成物Aは、医薬組成物Bの効果(遺伝子改変免疫療法における治療効果)を増強し得る用途で用いる限り、その用途は特に制限されない。医薬組成物Aは、例えばIAP関連疾患の予防及び／又は治療に用いることができる。本明細書において、「予防」は、例えば再発防止を包含する意味で用い、「治療」は、例えば進行の防止又は遅延、軽減、緩和、及び寛解を包含する意味で用いる。IAP関連疾患としては、例えば、細胞蓄積に関わる疾患(例：癌、自己免疫障害、炎症、再狭窄)、過剰アポトーシスが細胞の損失をもたらす障害(例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性、虚血、脳卒中、心筋梗塞、心不全、骨粗鬆症、AIDS)などが挙げられる。本明細書において、「癌」は広義的な意味で「腫瘍」を表し、「腫瘍」と同義で使用し得る。IAP関連疾患は癌であることが好ましい。癌は、XIAP、cIAP1、cIAP2、NAIP、ILP2、ML-IAP、サバイビン、及びBRUCE、より具体的にはXIAP、cIAP1、cIAP2、及びML-IAP、さらに具体的にはXIAP、cIAP1、及びcIAP2、最も具体的にはXIAPから選択される1以上のいずれかのIAPの拮抗作用に対して感受性を有する癌であり得る。癌は、再発又は難治性の

癌であってもよい。

[0027] 癌は固形癌であっても血液癌であってもよい。固形癌は、上皮由来、間充織由来、又はその他の癌であってもよい。

[0028] 一実施形態において、固形癌の非限定的な例としては、移行上皮癌；膀胱及び尿路の癌；乳癌；胃腸管(食道、胃、小腸、大腸、結腸、直腸、及び肛門を含む)の癌；肝臓癌(例：肝細胞癌、肝芽腫)；胆嚢及び胆道系癌(例：胆管癌)；膵臓癌(例：転移性膵癌などの膵臓内分泌癌、膵管腺癌などの膵臓外分泌癌)；腎臓癌(例：腎細胞癌、腎芽腫)；肺癌(例：腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、気管支肺胞上皮癌、中皮腫)；頭頸部の癌(例：舌、口腔、喉頭、咽頭、鼻咽腔、扁桃腺、唾液腺、鼻腔、副鼻腔の癌、視覚及び付属器の癌(例：網膜芽細胞腫))；卵巣、ファロピオ管、腹膜、膣、陰門、陰茎、子宮頸部、子宮筋層、又は子宮内膜の癌；甲状腺癌(例：甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、未分化甲状腺癌、甲状腺濾胞癌)；副腎癌(例：副腎皮質癌)；前立腺癌(例：ホルモン不応性前立腺癌)；皮膚癌(例：黒色腫(例：ステージ3及び4の悪性黒色腫)、基底細胞癌、扁平上皮癌、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)、角化棘細胞腫、異形成母斑、菌状息肉腫)などが挙げられる。一実施形態において、固形癌の他の非限定的な例としては、メルケル細胞癌、転移性非小細胞癌、転移性乳癌、転移性大腸癌、転移性胃癌、転移性非尿生殖器癌、転移性非小細胞肺癌、転移性性卵巣癌、転移性腎細胞癌、HBV感染症及び関連癌、外陰部疾患などが挙げられる。

[0029] 一実施形態において、固形癌の別の非限定的な例としては、軟部組織肉腫、骨肉腫、繊維肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫、カポジ肉腫、ユーイング肉腫、滑膜肉腫、類上皮肉腫、消化管間葉性腫瘍、良性及び悪性組織球腫、隆起性皮膚線維肉腫などの軟繊維、骨、又は軟骨の肉腫が挙げられる。

[0030] 一実施形態において、固形癌のまたさらに別の非限定的な例としては、中枢又は末梢神経系の腫瘍(例：星状細胞腫、神経膠腫、膠芽腫、髄膜腫、脳腫瘍、脳室上衣腫、果体部腫瘍、シュワン細胞腫)；内分泌腺の腫瘍(例：下垂

体腫瘍、副腎腫瘍、膵島腫瘍、甲状腺傍腫瘍、カルチノイド腫瘍、甲状腺の髄様癌)；生殖細胞及び栄養芽層腫瘍(例：奇形腫、精上皮腫、未分化胚細胞腫、胞状奇胎、絨毛膜癌腫)；小児及び胚芽腫(例：髄芽細胞腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、原始神経外胚葉性腫瘍)；患者が悪性腫瘍に影響を受けることになる、先天的又はそうではない症候群(色素性乾皮症)などが挙げられる。

[0031] 血液癌の非限定的な例としては、急性リンパ性白血病(ALL)(例：B-ALL、T-ALL)、慢性リンパ球性白血病(CLL)(例：ヘアリー細胞白血病、前リンパ性白血病)などのリンパ性白血病；B細胞リンパ腫(例：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫(PMBCL)、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性白血病；辺縁帯B細胞リンパ腫、高悪性度B細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁帯リンパ腫)；T細胞リンパ腫(例：末梢性T細胞リンパ腫(PTCL)、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)、成人T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、セザリー症候群)；ナチュラルキラー[NK]細胞リンパ腫；ホジキンリンパ腫(HL)；非ホジキンリンパ腫；MALTリンパ腫；原発性皮膚濾胞中心リンパ腫瘍(PCFCL)；T細胞白血病(例：成人T細胞白血病、T細胞大顆粒リンパ球性白血病、前駆Tリンパ芽球性白血病)；白血病/リンパ腫；成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)；毛様細胞白血病；意義不明の単クローン性 γ グロブリン血症；プラズマ細胞腫；多発性骨髄腫(MM)及び移植後リンパ増殖性障害；急性骨髄芽球性白血病；急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)などの骨髄性白血病；慢性骨髄単球性白血病(CMML)；好酸球増加症候群、真性赤血球増加症、本態性血小板血症及び原発性骨髄線維症などの骨髄増殖症候群、骨髄異形成症候群、及び前骨髄性白血病などが挙げられる。

[0032] 一実施形態では、癌は、急性骨髄性白血病(AML)、T細胞リンパ腫(末梢性T細胞リンパ腫(PTCL)、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)、成人T細胞白血病リンパ腫(ATLL)、慢性骨髄単球性白血病(CMML)、急性リンパ性白血病(ALL)、及びびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)を含む血液癌である。他

の実施形態では、癌は、多発性骨髄腫を含む血液癌である。

[0033] 一実施形態では、癌は、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)、前立腺癌、膵臓癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、大腸癌、黒色腫、直腸癌、膀胱、子宮頸部の癌、及び乳癌を含む固形癌である。

[0034] B. キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞を含有する医薬組成物

本開示の、キメラ抗原受容体(CAR)又は組換えT細胞受容体(TCR)を発現するように改変された免疫細胞を含有する医薬組成物(以下、「医薬組成物B」と称する。)は、トリナパント系薬剤(医薬組成物Aの形態であってもよい。)と組み合わせて投与される医薬組成物であることが好ましく、具体的には、前記トリナパント系薬剤の投与の前、同時、又は後に投与される医薬組成物であることが好ましい。

[0035] キメラ抗原受容体(CAR)又は組換えT細胞受容体(TCR)は、特定の抗原を認識し結合する。抗原は、腫瘍抗原であることが好ましい。腫瘍抗原の非限定的な例としては、5T4、 $\alpha 5\beta 1$ -インテグリン、インテグリン $\beta 7$ (例えば活性型インテグリン $\beta 7$)、707-AP、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、 β -カテニン/m、Bcr-abl、MN/C IX抗体、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD19、CD20、CD22、CD25、CDC27/m、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CD98、CDK4/m、CEA、CT、Cyp-B、DAM、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnT-V、Gp100、HAGE、HER-2/new、HLA-A*0201-R170I、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT(又はhTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、MAGE、MART-1/melan-A、MART-2/Ski、MC1R、ミオシン/m、MUC1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、NA88-A、PAP、プロテイナーゼ-3、p190 minor bcr-abl、Pml/RAR α 、PRAME、PSA、PSM、PSMA、RAGE、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-3、サバイピン、TEL/AML1、TGF β 、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、VEGF、WT1、NY-ESO-1、NY-ESO-B、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4などが挙げられる。一実施形態において、腫瘍抗原はCD19、インテグリン $\beta 7$ 、またはNY-ESO-1であることが好ましい。他の実施形態において、腫瘍抗原はCD19、活性型

インテグリン $\beta 7$ 、またはNY-ESO-1であることが好ましい。

[0036] B-1. CAR

CARは、細胞外ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含有することが好ましい。

[0037] B-1-1. 細胞外ドメイン

細胞外ドメインは、抗原を認識(又は抗原に結合もしくは特異的に結合)し得る限り、特に限定されない。細胞外ドメインは、抗体の抗原結合部位、又は受容体の抗原(リガンド)結合部位を含有することが好ましい。

[0038] 抗体の抗原結合部位は、抗体の全領域であってもよく、抗体の抗原結合フラグメントであってもよい。抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。また、抗体は、例えば、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は完全ヒト化抗体であることができる。抗原結合フラグメントは、H鎖(重鎖)及びL鎖(軽鎖)の可変領域を含有する限り、特に限定されない。抗原結合フラグメントの非限定的な例としては、Fv、Fab、Fab'、(Fab')₂、scFv、scFv-Fc、diabody、triabody、tetrabody、minibody、nanobodyなどが挙げられる。

[0039] 受容体の抗原結合部位は、受容体の全領域であってもよく、受容体の抗原結合ドメインであってもよい。受容体としては、例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ などのTCR；CD4、CD8 α 、CD8 β 、CD11A、CD11B、CD11C、CD18、CD29、CD41、CD49A、CD49B、CD49D、CD49E、CD49F、CD51、CD61などのT細胞補助受容体；NKp30、NKp44、NKp46などのNK細胞の天然細胞傷害性受容体(NCR)などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0040] 一実施形態において、細胞外ドメインは、抗体の抗原結合部位を含有することが好ましく、scFvを含有することがより好ましく、抗ヒトCD19抗体(例：FMC63)又は抗ヒト活性型インテグリン $\beta 7$ 抗体(例：MMG49)由来のscFvを含有することがさらに好ましい。scFvは、慣用の方法により調製することができる。当該方法の非限定的な例としては、米国特許第4694778号、Science, vol. 242, pp. 423-442 (1988)、Nature, vol. 334, p. 54454 (1989)、Science

, vol. 242, pp. 1038-1041 (1988)、Molecular Immunology, Vol. 34, No. 16-17, pp. 1157-1165 (1997)に記載されている方法などが挙げられる。

[0041] 細胞外ドメインが認識又は結合し得る抗原は、腫瘍抗原であることが好ましい。腫瘍抗原の非限定的な例としては、5T4、 $\alpha 5 \beta 1$ -インテグリン、インテグリン $\beta 7$ (例えば活性型インテグリン $\beta 7$)、707-AP、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、 β -カテニン/m、Bcr-abl、MN/C IX抗体、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD19、CD20、CD22、CD25、CDC27/m、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CD98、CDK4/m、CEA、CT、Cyp-B、DAM、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnT-V、Gp100、HAGE、HER-2/new、HLA-A*0201-R170I、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT (又はhTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、MAGE、MART-1/melan-A、MART-2/Ski、MC1R、ミオシン/m、MUC1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、NA88-A、PAP、プロテイナーゼ-3、p190 minor bcr-abl、Pml/RAR α 、PRAME、PSA、PSM、PSMA、RAGE、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-3、サバイビン、TEL/AML1、TGF β 、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、VEGF、WT1、NY-ESO-1、NY-ESO-Bなどが挙げられる。一実施形態において、腫瘍抗原はCD19又はインテグリン $\beta 7$ であることが好ましい。他の実施形態において、腫瘍抗原はCD19又は活性型インテグリン $\beta 7$ であることが好ましい。更に他の実施形態において、腫瘍抗原は活性型インテグリン $\beta 7$ であることが好ましい。なお、CD19を認識又は結合し得るCARを「CD19 CAR」と称し、CD19 CARを発現するように改変されたT細胞及びNK細胞をそれぞれ「CD19 CAR-T」及び「CD19 CAR-NK」と称する。CD19 CAR-NKとしては、例えば、CD19 CAR-KHYG-1などが挙げられる。活性型インテグリン $\beta 7$ を認識又は結合し得るCARとしては、例えば、活性型インテグリン $\beta 7$ CARなどが挙げられ、活性型インテグリン $\beta 7$ CARを発現するように改変されたT細胞を「活性型インテグリン $\beta 7$ CAR-T (aITGB7 CAR-T)」と称する。

[0042] 一実施形態において、細胞外ドメインは、配列番号1に示されるアミノ酸配列(GVSLPDYG)を有する重鎖CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列(IWGSETT)を有する重鎖CDR2、配列番号3に示されるアミノ酸配列(AKHYYGGSYAMDY)を

有する重鎖CDR3、配列番号4(QDISKY)に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号5(HTS)に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、及び配列番号6(QQGNTLPYT)に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含有することが好ましい。なお、本明細書において、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3はIMGT/BlastSearch(<http://www.imgt.org/blast/>)による相同性検索によって特定される。

また、当該細胞外ドメインは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR3、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、及び配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む抗体のCD19への結合を競合的に阻害する抗体の抗原結合部位（特にscFv）を含有することが好ましい。

[0043] 一実施形態において、細胞外ドメインは、配列番号7に示されるアミノ酸配列(GYTFSSYW)を有する重鎖CDR1、配列番号8に示されるアミノ酸配列(MLPGSGS)を有する重鎖CDR2、配列番号9に示されるアミノ酸配列(ARGDGNYWYFDV)を有する重鎖CDR3、配列番号10(SSVGY)に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号11(ATS)に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、及び配列番号12(QQWSSDPPT)に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含有することが好ましい。

また、当該細胞外ドメインは、配列番号7に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号8に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、配列番号9に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR3、配列番号10に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号11に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、及び配列番号12に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む抗体のCD19への結合を競合的に阻害する抗体の抗原結合部位（特にscFv）を含有することが好ましい。

[0044] 一実施形態において、細胞外ドメインは、活性型ヒトインテグリン β 7の20

～109番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する抗体の抗原結合部位を含有することが好ましい。当該抗体は、活性型ヒトインテグリン $\beta 7$ に対して親和性を有し、骨髄腫細胞には結合するが正常血液細胞には結合しないものであることが好ましい。本発明における活性型インテグリン $\beta 7$ CAR-T (aITGB7 CAR-T) は、W02017/026331またはNature Medicine 23 12 2007 143 6に記載されており、その全体が明細書に組み込まれる。

[0045] 本明細書において、アミノ酸配列の「同一性」とは、比較対象の2以上のアミノ酸配列を最適にアライメントさせたときのアミノ酸の一致の程度をいう。アミノ酸配列の同一性は、例えば、全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)の相同性アルゴリズムBLAST(Basic local alignment search tool)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)においてデフォルト(初期設定)のパラメータを用いて算出することができる。また、「保存的置換」とは、タンパク質の機能又は性質を実質的に改変しないように、1個又は複数個のアミノ酸を、別のアミノ酸に置換することを意味する。保存的置換の非限定的な例としては、非極性アミノ酸(疎水性アミノ酸)の群：アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、プロリン(P)、フェニルアラニン(F)、メチオニン(M)、トリプトファン(W)における置換、極性アミノ酸(中性アミノ酸)の群：グリシン(G)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、セリン(S)、トレオニン(T)、チロシン(Y)、システイン(C)における置換、酸性アミノ酸の群：アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)における置換、塩基性アミノ酸の群：リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)における置換などが挙げられる。

[0046] 細胞外ドメインの抗原への結合親和性を表す平衡解離定数(K_D)は、例えば、1 μ M以下、500nM以下、又は100nM以下であってもよく、0.1pM以上、0.5pM以上、又は1pM以上であってもよい。平衡解離定数は、例えばSPR測定またはBiacore(商標)分析により決定することができる。

[0047] 細胞外ドメインは、抗体の抗原結合部位、又は受容体の抗原(リガンド)結合部位に加えて、さらに他のタンパク質の細胞外ドメインを含有していてもよい。当該他のタンパク質の非限定的な例としては、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD

5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134(OX40)、CD137、CD154、CD278(ICOS)などのT細胞補助受容体などが挙げられる。一実施形態において、当該他のタンパク質の細胞外ドメインは、CD28の細胞外ドメインであることが好ましい。別の実施形態において、当該他のタンパク質の細胞外ドメインは、配列番号13に示されるアミノ酸配列：

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP、

当該アミノ酸配列に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列、或いは当該アミノ酸配列に対して1〜3個のアミノ酸が欠失、置換(例：保存的置換)、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列であることが好ましい。

[0048] B-1-2. 細胞内シグナル伝達ドメイン

細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞外ドメインが抗原を認識した際、細胞内にシグナルを伝達することが可能なものである限り、特に限定されない。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、抗原依存的な一次活性化が可能な配列（一次細胞質シグナル伝達配列）及び抗原非依存的な二次活性化又は共刺激が可能な配列（二次細胞質シグナル伝達配列）を有することが好ましい。

[0049] 一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)(Nature, vol. 338, pp. 383-384 (1989))として知られるシグナル伝達モチーフを有していてもよく、及び／又は、免疫受容体チロシンベース抑制モチーフ(ITIM)(J Immunol., vol. 162, No. 2, pp. 897-902 (1999))として知られるシグナル伝達モチーフを有していてもよい。

[0050] 一次細胞質シグナル伝達配列を有する細胞内シグナル伝達ドメインは、1以上のITAMを有することが好ましく、外因性STAT3関連モチーフを有することも好ましい。当該細胞内シグナル伝達ドメインの非限定的な例としては、CD3 δ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66dの

細胞内シグナル伝達ドメインなどが挙げられる。一実施形態において、当該細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζの細胞内シグナル伝達ドメインであることが好ましい。別の実施形態において、当該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号14に示されるアミノ酸配列：

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR、

当該アミノ酸配列に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列、或いは当該アミノ酸配列に対して1～3個のアミノ酸が欠失、置換(例：保存的置換)、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列であることが好ましい。

[0051] 二次細胞質シグナル伝達配列を有する細胞内シグナル伝達ドメインは、1以上の共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインであることが好ましい。共刺激分子の非限定的な例としては、CD2、CD4、CD5、CD8α、CD8β、CD28、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD154、CD278(ICOS)などが挙げられる。一実施形態において、当該細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28の細胞内シグナル伝達ドメイン及び／又はCD137(4-1BB)の細胞内シグナル伝達ドメインであることが好ましく、CD28の細胞内シグナル伝達ドメインであることがさらに好ましい。別の実施形態において、当該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号15に示されるアミノ酸配列：

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS、

当該アミノ酸配列に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列、或いは当該アミノ酸配列に対して1～3個のアミノ酸が欠失、置換(例：保存的置換)、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列であることが好ましい。

[0052] CARは、上記のもの以外のさらなる追加の細胞内シグナル伝達ドメインを有していてもよい。例えば、CARは、サイトカイン（例えばIL-12）の発現を誘導するドメインを有していてもよい。また、CARは、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン（例えばIL-2R β 鎖フラグメント）を含んでいてもよい。追加の細胞内シグナル伝達ドメインは、例えば、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインと一次細胞質シグナル伝達配列との間に挿入されてもよい。

[0053] B-1-3. 膜貫通ドメイン

CARは、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間に膜貫通ドメインを含有することが好ましい。膜貫通ドメインは、1以上の膜貫通配列を有する任意のポリペプチド由来の膜貫通ドメインであることができる。当該ポリペプチドは天然ポリペプチドであっても人工ポリペプチドであってもよい。

[0054] 天然ポリペプチド由来の膜貫通ドメインの非限定的な例としては、TCR α 、TCR β などのTCR；CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134(OX40)、CD137、CD154、CD278(ICOS)などのT細胞補助受容体；GITRなどのTNF受容体の膜貫通ドメインなどが挙げられる。

[0055] 人工ポリペプチド由来の膜貫通ドメインは、主として、ロイシン及びバリンなどの疎水性残基を含有するポリペプチドであることが好ましい。また、当該膜貫通ドメインは、フェニルアラニン、トリプトファン、及びバリンのトリプレットを各末端に有することが好ましい。

[0056] 一実施形態において、膜貫通ドメインは、CD28又はCD8の膜貫通ドメインであることが好ましく、CD28の膜貫通ドメインであることがさらに好ましい。別の実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号16に示されるアミノ酸配列：

FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV、

当該アミノ酸配列に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97

%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列、或いは当該アミノ酸配列に対して1〜3個のアミノ酸が欠失、置換(例：保存的置換)、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列であることが好ましい。

[0057] B-1-4. リンカー配列又はスペーサードメイン

CARは、細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間、又は、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインの間に、リンカー配列又はスペーサードメインを有していてもよい。

[0058] リンカー配列又はスペーサードメインは、2つのドメインを連結する機能を有する限り、特に限定されない。リンカー配列は、10個以下のアミノ酸を含有することが好ましく、2個以上のアミノ酸を含有することが好ましい。スペーサードメインは、300個以下、200個以下、100個以下、又は50個以下のアミノ酸を含有することが好ましく、10個以上、15個以上、20個以上、又は25個以上のアミノ酸を含有することが好ましい。

[0059] リンカー配列は、グリシンーセリン連続配列、配列番号17に示されるアミノ酸配列(GSTSGSGKPGSGEGSTKG)、及び配列番号18に示されるアミノ酸配列(GSTSGGSGGGSGGGSS)などから選択されることが好ましい。

[0060] スペーサードメインは、CARと抗原の結合を促進し、かつ、細胞へのシグナル伝達を増強する配列を有することが好ましい。当該配列は、システイン、荷電アミノ酸、潜在的グリコシル化部位内のセリン又はトレオニンなどを含有することが好ましい。スペーサードメインの非限定的な例としては、CD8 α 、CD8 β 、CD28、IgG4の一部(例：ヒンジ領域)などが挙げられる。

[0061] CARは、N末端にリーダー配列(シグナルペプチド配列)を有していてもよい。シグナルペプチド配列は、15個以上のアミノ酸を含有することが好ましく、30個以下のアミノ酸を含有することが好ましい。シグナルペプチドの非限定的な例としては、細胞内シグナル伝達ドメインを有する前記タンパク質のシグナルペプチドが挙げられる。例えば、シグナルペプチドは、GM-CSFRシグナルペプチド、オンコスタチンMシグナルペプチド、又はCD8a、IL-2、IL-3等

のシグナルペプチドであってもよい。あるいは、an Ig heavy chain signal sequence (VHCAMP) であってもよい。シグナルペプチドは、ヒト由来であってもよく、非ヒト由来、例えば、昆虫細胞又はウイルス由来であってもよい。一実施形態において、リーダー配列(シグナルペプチド配列)は、配列番号19に示されるアミノ酸配列：

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP、

当該アミノ酸配列に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列、或いは当該アミノ酸配列に対して1〜3個のアミノ酸が欠失、置換(例：保存的置換)、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列であることが好ましい。

[0062] 一実施形態において、CARは、N末端側から順に、抗ヒトCD19抗体(例：FMC63)又は抗ヒト活性型インテグリン β 7抗体(例：MMG49)由来のscFv、CD28細胞外ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CD28細胞内シグナル伝達ドメイン、及びCD3 ζ 細胞内シグナル伝達ドメインを含有することが好ましく、抗ヒトCD19抗体(例：FMC63)又は抗ヒト活性型インテグリン β 7抗体(例：MMG49)由来のscFvのN末端側にGM-CSFRシグナルペプチドをさらに含有することも好ましい。

[0063] 別の実施形態において、CARは、配列番号20に示されるアミノ酸配列(GenBank Accession No. HM852952.1)：

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL
IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKP
GSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN
SALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAIEVMYP
PPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR、

配列番号1～6に示されるアミノ酸配列を有し、且つ、配列番号20に示されるアミノ酸配列に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列、或いは配列番号1～6に示されるアミノ酸配列を有し、且つ、配列番号20に示されるアミノ酸配列に対して1～3個のアミノ酸が欠失、置換(例：保存的置換)、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列であることが好ましい。

[0064] さらに別の実施形態において、CARは、配列番号21に示されるアミノ酸配列：

MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSPGKVTMTCRASSSVGYMHWFQKPGSSPKPWI
YATSNLASGVPARFSGSESGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSDPPTFGGGTKLEIKRGSTSGSGKP
GSGEGSQVQLQQSGAELMKPGASVKISKASGYTFSSYIEWVKQRPGHGLEWIGEMPLPGSGSSNYNEK
FKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNWYFDVWGAGTTVTVSSAAAIEVMYPPPYL
DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYM
NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR、

配列番号7～12に示されるアミノ酸配列を有し、且つ、配列番号21に示されるアミノ酸配列に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列、或いは配列番号7～12に示されるアミノ酸配列を有し、且つ、配列番号21に示されるアミノ酸配列に対して1～3個のアミノ酸が欠失、置換(例：保存的置換)、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列であることが好ましい。

[0065] CARは、二量体化など多量体化されたものであってもよい。例えば、ジスルフィド結合を介してCARを二量体化する場合、CARのスペーサドメイン及び

／又は膜貫通ドメインにシステインを挿入することが好ましい。

[0066] B-2. 組換えTCR

組換えTCRは α 鎖及び β 鎖で構成されるヘテロダイマーであってもよく、 γ 鎖及び δ 鎖で構成されるヘテロダイマーであってもよい。各鎖は可変ドメイン(Vドメイン)及び定常ドメイン(Cドメイン)を有し、Vドメインに3つのCDR、すなわち、CDR1、CDR2、及びCDR3を有しており、3つのCDR配列が抗原を認識又は結合し得るように設計されている。

[0067] 組換えTCRは、任意の抗原を認識(又は結合)し得る。すなわち、組換えTCRは、抗原を認識可能な可変ドメインを有し得る。抗原としては、例えばB-1-1に記載の抗原と同じものが挙げられる。一実施形態において、抗原は腫瘍抗原であることが好ましく、gp100、MART-1、CEA、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、WT1、又はNY-ESO-1であることが好ましい。抗原はヒト白血球抗原A(HLA-A)拘束性であることが好ましく、HLA-A*02拘束性(例：HLA-A*02:01拘束性、HLA-A*02:06拘束性)又はHLA-A*24拘束性(例：HLA-A*24:02拘束性)であることがさらに好ましい。組換えTCRは、HLA-A*02拘束性gp100特異的TCR、HLA-A*02拘束性MART-1特異的TCR、HLA-A*02拘束性MAGE-A3特異的TCR、HLA-A*02拘束性NY-ESO-1特異的TCR、HLA-A*24拘束性MAGE-A4特異的TCR、又はHLA-A*24拘束性WT1特異的TCRであってもよい。なお、NY-ESO-1を認識又は結合し得るTCRを「NY-ESO-1 TCR」と称し、NY-ESO-1 TCRを発現するように改変されたT細胞を「NY-ESO-1 TCR-T」と称する。

[0068] 組換えTCRの抗原への結合親和性を表す平衡解離定数(K_D)は、例えば、 $100\mu\text{M}$ 以下、 $10\mu\text{M}$ 以下、 $1\mu\text{M}$ 以下、 500nM 以下、又は 100nM 以下であってもよく、 0.1pM 以上、 0.5pM 以上、又は 1pM 以上であってもよい。平衡解離定数は、例えばSPR測定またはBiacore(商標)分析により決定することができる。

[0069] B-3. CAR又は組換えTCRを発現するように改変された免疫細胞

CARを発現するように改変された免疫細胞(例：CAR-T細胞、CAR-NK細胞)は、CAR発現用核酸(核酸構築物を含む)を含有する免疫細胞であることが好ましい。同様に、組換えTCRを発現するように改変された免疫細胞(例：TCR-T細胞

)は、組換えTCR発現用核酸(核酸構築物を含む)を含有する免疫細胞であることが好ましい。

[0070] B-3-1. CAR又は組換えTCR発現用核酸

CAR又は組換えTCR発現用核酸は、CAR又は組換えTCRをコードする核酸に加えて、プロモーターを含有することが好ましい。プロモーターの非限定的な例としては、CMVプロモーター、EF1プロモーター、SV40プロモーター、MSCVプロモーターなどのpol II系プロモーター；trcやtacなどのトリプトファンプロモーター；lacプロモーター；T7プロモーター；T5プロモーター；T3プロモーター；SP6プロモーター；アラビノース誘導プロモーター；コールドショックプロモーター；テトラサイクリン誘導性プロモーター；ユビキチンプロモーターなどが挙げられる。

[0071] CAR又は組換えTCR発現用核酸は、さらに他のエレメントを含有していてもよい。他のエレメントの非限定的な例としては、複製起点、エンハンサー配列、ターミネーター配列、レポータータンパク質コード配列、薬剤耐性遺伝子コード配列などが挙げられる。

[0072] 組換えTCR発現用核酸は、例えばW02008/153029(参照することによりその全体が明細書に組み込まれる)に記載されているように、内在性TCRの発現を抑制する配列(例：内在性TCR α 鎖及び β 鎖に対するsiRNA)を含有することが好ましい。

[0073] CAR又は組換えTCR発現用核酸は、ベクターの形態であってもよい。ベクターは非ウイルスベクターであってもよいが、ウイルスベクターであることが好ましい。

[0074] ウイルスベクターの非限定的な例としては、レトロウイルスベクター(オンコレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、及び偽型ベクターを含む)、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクター、エプスタインバーウイルス(EBV)ベクター、HSVベクターなどが挙げられる。ウイルスベクターは、感染細胞内で自己複製しないように複

製能を欠くウイルスベクターを使用することもできる。

[0075] B-3-2. 免疫細胞

免疫細胞は、CAR又は組換えTCRを発現するように改変し得るものであれば、特に限定されない。免疫細胞の非限定的な例としては、単球、マクロファージ、T細胞、B細胞、NK細胞が挙げられる。一実施形態において、免疫細胞はT細胞又はNK細胞であることが好ましい。T細胞の非限定的な例としては、CD4陽性T細胞(例：ヘルパーT細胞)、CD8陽性T細胞(例：細胞傷害性T細胞)、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞(Treg)、ナイーブT細胞、エフェクターT細胞、メモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞が挙げられる。典型的には、免疫細胞は細胞集団であることができ、当該細胞集団は、例えば末梢血単核細胞(PBMC)を含有する細胞集団であってもよい。免疫細胞は、造血幹細胞から分化させたものであってもよいが、生体に由来するもの、例えば、生体(末梢血、臍帯血、骨髓、リンパ節、脾臓など)から採取したもの、又は生体から採取して拡大培養したものであることが好ましい。免疫細胞は、自家免疫細胞(医薬組成物Bを投与する対象の免疫細胞)であってもよく、他家免疫細胞であってもよい。他家免疫細胞の場合、HLAの型が一致していることが好ましい。

[0076] 一実施形態において、免疫細胞は、形質導入の前に、可溶型又は膜結合型の抗CD3抗体(例：OKT3又はmOKT3)及び／又はAPC(例：人工APC)で刺激してもよい。APCは、膜型の抗CD3モノクローナル抗体を発現していてもよい。

[0077] B-3-3. CAR又は組換えTCR発現用核酸の免疫細胞への形質導入

CAR又は組換えTCR発現用核酸を免疫細胞に形質導入する方法としては、例えば、ウイルス感染法、カルシウムリン酸法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0078] B-3-4. 改変免疫細胞の非限定的な例

改変免疫細胞のうちCAR-T細胞の非限定的な例としては、CD19 CARを発現するように改変されたT細胞(例：ギリアド社のYescarta (axicabtagene cilole

ucel)、ノバルティス社のKymriah (tisagenlecleucel)、ブリストル・マイヤーズ スクイブ社のBreyanzi (lisocabtagene maraleucel)、タカラバイオ株式会社のTBI-1501、日本セルヴィエ社のUCART19/ALL0-501)、BCMA CARを発現するように改変されたT細胞(例:セルジーン社のbb2121, ide-cel、ヤンセンファーマ社のJNJ-68284528)、CD98 CARを発現するように改変されたT細胞(例:米国特許出願公開第2018/0230212号(参照することによりその全体が明細書に組み込まれる)に記載のCARを発現するように改変されたT細胞)、活性型インテグリン $\beta 7$ CARを発現するように改変されたT細胞(例:米国特許出願公開第2018/0230216号(参照することによりその全体が明細書に組み込まれる)に記載のCARを発現するように改変されたT細胞)が挙げられる。TCR-T細胞の非限定的な例としては、NY-ES0-1特異的TCR-T細胞(例:Tmunity社のNY-ES0-1 TCR-T Triple Knockout TCR (NYCE)、タカラバイオ株式会社のTBI-1301)、MAGE-A4特異的TCR-T細胞(例:Adaptimmune社のADP-A2M4 SPEAR T-cells)、MAGE-A3及び/又はMAGE-A6特異的TCR-T細胞(例:Kite/Gilead Sciences社のKITE-718)が挙げられる。一実施形態において、改変免疫細胞は、CD19を特異的に認識するCARを発現するように改変されたT細胞、インテグリン $\beta 7$ (例えば活性型インテグリン $\beta 7$)を特異的に認識するCARを発現するように改変されたT細胞、CD19を特異的に認識するCARを発現するように改変されたNK細胞、又はNY-ES0-1を特異的に認識する組換えTCRを発現するように改変されたT細胞であることが好ましい。

[0079] B-4. 他の成分

医薬組成物Bは、他の成分として、薬学的に許容可能な賦形剤を含有することが好ましい。薬学的に許容可能な賦形剤としては、例えばA-2に記載の賦形剤と同じものが挙げられる。一実施形態において、薬学的に許容可能な賦形剤は、担体(例:滅菌水、生理食塩水)、安定剤、抗酸化剤(例:アスコルビン酸)、緩衝剤(例:リン酸、クエン酸などの有機酸)、保存剤、界面活性剤(例:ポリエチレングリコール、Tween)、キレート剤(例:EDTA)、糖又は糖アルコール(例:グルコース、マンノース、スクロース、マンニトール)、アミノ

酸(例：グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、リシン)、ポリペプチド又はタンパク質(例：血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリン)、及びアジュバント(例：水酸化アルミニウムなどのアジュバント)からなる群より選択される少なくとも一種である。

[0080] B-5. 投与

改変された免疫細胞の投与量の下限は、投与目的、投与対象及びその状態などに応じて適宜選択することができる。例えば、1日投与量の下限は、対象の体重1kg当たり、生細胞数として、 1×10^2 個、 5×10^2 個、 1×10^3 個、 2×10^3 個、 3×10^3 個、 4×10^3 個、 5×10^3 個、 6×10^3 個、 7×10^3 個、 8×10^3 個、 9×10^3 個、 1×10^4 個、 2×10^4 個、 3×10^4 個、 4×10^4 個、 5×10^4 個、 6×10^4 個、 7×10^4 個、 8×10^4 個、 9×10^4 個、又は 1×10^5 個であってもよい。また、1日投与量の上限も、下限と同様に適宜選択することができ、例えば、対象の体重1kg当たり、生細胞数として、 1×10^9 個、 5×10^8 個、 1×10^8 個、 5×10^7 個、 1×10^7 個、 5×10^6 個、又は 1×10^6 個であってもよい。例えば、1日投与量は、対象の体重1kg当たり、生細胞数として、 1×10^3 個～ 1×10^8 個、 5×10^3 個～ 5×10^7 個、又は 1×10^4 個～ 1×10^7 個であってもよい。1日投与量が前記範囲になるように2回以上(例：2回又は3回)に分けて投与してもよいし、場合により2日に分けて投与してもよい。改変された免疫細胞の投与量は、単独で投与する場合の投与量よりも少ない量、又は単独では有効でない量であってもよい。このような量で投与した場合であっても、トリナパント系薬剤の投与と相まって優れた効能を発揮し得る。

[0081] 医薬組成物Bは任意の頻度で投与することができる。例えば、医薬組成物Bは1日に1回、2回、又は3回、2日に1回、3日に1回、4日に1回、5日に1回、6日に1回、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、又は4週間に1回の頻度で投与することができる。また、医薬組成物Bは、前記頻度(例：1日1回)で所定の期間(例：1週間、2週間、3週間、又は4週間)投与を継続してもよく、その後、所定の期間(例：1週間、2週間、3週間、又は4週間)投与を中断してもよく、投与の継続及び中断のサイクルを繰り返してもよい。

- [0082] 一実施形態において、医薬組成物B(又は改変された免疫細胞)の投与には、(1)医薬組成物B(又は改変された免疫細胞)を投与すること、(2)医薬組成物B(又は改変された免疫細胞)の投与後の対象から取得した免疫細胞を用いて作製された、新たな医薬組成物B(又は改変された免疫細胞)を投与すること、及び必要により(3)(2)を繰り返すことを含むことが好ましい。
- [0083] 医薬組成物Bは、トリナパント系薬剤の投与の前、例えば、投与の直前、1分前、2分前、3分前、4分前、5分前、10分前、20分前、30分前、1時間前、2時間前、3時間前、4時間前、5時間前、6時間前、7時間前、8時間前、9時間前、10時間前、11時間前、12時間前、18時間前、24時間前、2日前、3日前、4日前、5日前、6日前、又は1週間前に投与してもよい。医薬組成物Bは、トリナパント系薬剤の投与と同時に投与してもよい。医薬組成物Bは、トリナパント系薬剤の投与の後、例えば、投与の直後、1分後、2分後、3分後、4分後、5分後、10分後、20分後、30分後、1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、5時間後、6時間後、7時間後、8時間後、9時間後、10時間後、11時間後、12時間後、18時間後、24時間後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、又は1週間後に投与してもよい。また、医薬組成物Bは、例えば、トリナパント系薬剤の投与後であって、腫瘍マーカーのレベルがベースラインレベルを上回る場合に投与してもよい。
- [0084] 医薬組成物Bの投与とトリナパント系薬剤の投与との間に、或いは、医薬組成物Bの投与後から次の医薬組成物Bの投与までの間に、他の化学療法(他の薬剤の投与)を行ってもよく、非化学療法(例：放射線療法、光線力学療法、外科手術、食事制限)などを行ってもよい。他の薬剤の非限定的な例としては、アルキル化剤、DNAメチル化阻害剤、代謝拮抗剤(例：ピリミジン系代謝拮抗剤、プリン系代謝拮抗剤、葉酸代謝拮抗剤)などが挙げられる。
- [0085] 医薬組成物Bの投与対象としては、例えば医薬組成物Aの投与対象と同じものが挙げられる。医薬組成物Bの投与対象は、トリナパント系薬剤を投与される又は投与された対象であってもよい。医薬組成物Bの投与対象は、IAP関連疾患、特に癌の予防及び／又は治療を必要とする対象(又は初発患者もしくはは

再発患者)であることが好ましい。

[0086] 医薬組成物Bの組成、製造方法、投与方法等は、例えばW01993/019163(参照することによりその全体が明細書に組み込まれる)の記載に基づいて設計することができる。

[0087] B-6. 医薬用途

医薬組成物Bは、医薬組成物Aと組み合わせてその薬効(遺伝子改変免疫療法における治療効果)が増強し得る態様で用いられる限り、その用途は特に制限されない。医薬組成物Bは、例えば、遺伝子改変免疫療法の対象となる疾患、典型的には癌であることが好ましい。癌の非限定的な例としては、医薬組成物Aで例示したものと同様のものが挙げられる。

[0088] C. キット

本開示のキットは、式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を含有する第一剤、並びに、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞を含有する第二剤を備えることが好ましい。

[0089] 第一剤は医薬組成物Aからなることが好ましく、第二剤は医薬組成物Bからなることが好ましい。第一剤及び第二剤は、同一の製剤にあり同時に投与するものであってもよく、異なる製剤にあり同時に、別々に、又は連続的に投与するものであってもよい。

[0090] 上記の各実施形態について説明した各種構成(性質、構造、機能など)は、本開示に包含される主題を特定するにあたり、どのように組み合わせられてもよい。本開示は、上記の各実施形態に限定されるわけではなく、本明細書の開示に基づいて当業者が認識し得る全てを包含する。

実施例

[0091] 以下、本開示に包含される主題をより具体的に説明するが、当該主題は下記の例に限定されるものではない。

[0092] 1. 試験材料および試験方法

1.1 被験細胞

1.1.1 被験細胞

1-1) 細胞名 : CD19 CAR-T (タカラバイオ株式会社製)

1-2) 由来 : ヒト末梢血由来T細胞

1-3) 入手先 : ACCUCELL 等

特性 : 市販ヒトPMBCを抗CD3抗体 (Clone; OKT3) で刺激し、さらにIL-2 (250 U/mL) 含有培地で増殖させることで誘導したT細胞に、リーダー配列、抗ヒトCD19抗体 (Clone; FMC63) の重鎖及び軽鎖Variable Regionを繋げたsingle-chain variable fragment (scFv) 配列、リンカー配列、CD28分子の細胞外領域・膜貫通領域・細胞内領域を含む配列、及びCD3ζ分子の細胞内領域を繋いだ配列をレトロウイルスベクターを用いて導入し、増殖、培養後、凍結保存された細胞。

[0093] 2-1) 細胞名 : 活性型インテグリンβ7 CAR-T細胞

2-2) 由来 : ヒト末梢血由来T細胞

2-3) 入手先 : ACCUCELL 等

特性 : 市販ヒトPMBCを抗CD3抗体 (Clone; OKT3) 及び抗CD28抗体 (Clone; 28.2) で刺激し、さらにIL-2 (100 U/mL) 含有培地で増殖させることで誘導したT細胞に、抗ヒト活性型インテグリンβ7抗体 (Clone; MMG49) の重鎖及び軽鎖Variable Regionを繋げたsingle-chain variable fragment (scFv) 配列、リーダー配列、リンカー配列、CD28分子の細胞外領域・膜貫通領域・細胞内領域を含む配列、及びCD3ζ分子の細胞内領域を繋いだ配列を、レトロウイルスベクターを用いて導入し、増殖、培養後、凍結保存された細胞。

[0094] 3-1) 細胞名 : HLA-A*02:01拘束性NY-ESO-1 TCR-T (以下NY-ESO-1 TCR-T)

3-2) 由来 : ヒト末梢血由来T細胞

3-3) 入手先 : ACCUCELL 等

特性 : 市販ヒトPMBCを抗CD3抗体 (Clone; OKT3) 及び抗CD28抗体 (Clone; 28.2) で刺激し、さらにIL-2 (100 U/mL) 含有培地で増殖させることで誘導したT細胞に、HLA-A*02:01拘束性NY-ESO-1を特異的に認識するT細胞受容体 (TCR) α鎖及びβ鎖、並びに内在性のTCR α鎖及びβ鎖遺伝子に干渉するsiRNA

を発現するレトロウイルスベクターMS3II-NYES01-siTCR（特許第5969468号）を感染させることにより遺伝子改変されたT細胞（特許第5271901号、特許第5828861号）。作製後、凍結保存された細胞。

[0095] 4-1) 細胞株名：CD19 CAR-KHYG-1

4-2) 由来：ヒトNK様細胞

4-3) 入手先：JCRB

入手後CD19 CAR発現株を樹立

4-4) 培養条件：10%非働化（56℃、30分処理）ウシ胎児血清ならびに以下の添加物、サイトカインを含むRPMI1640培地、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）

a) 培養液：RPMI1640

i) 入手先：ナカライテスク株式会社

b) 血清：ウシ胎児血清

i) 濃度：10%

ii) 入手先：シグマアルドリッチ

c) 添加物：ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液

i) 濃度：100 Units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン

ii) 入手先：ナカライテスク株式会社

d) サイトカイン：Recombinant Human IL-2

i) 濃度：100 U/mL

ii) 入手先：PeproTech

特性：ヒトNK様細胞株であるKHYG-1にCD19 CARレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、増殖させたのちFCMで陽性細胞をソーティング、再度拡大培養後、凍結保存した細胞。

[0096] 1.1.2 対照細胞

1-1) 細胞株名：Control-T細胞（ヒトT細胞）

1-2) 由来：ヒト末梢血PBMC

1-3) 入手先：ACCUCCELL 等

特性：市販ヒトPBMを抗CD3抗体（Clone; OKT3）及び抗CD28抗体（Clone; 28.2）で刺激し、さらにIL-2（100 U/mL）含有培地で増殖、培養後、凍結保存された細胞。

[0097] 2-1) 細胞株名：KHYG-1

2-2) 由来：ヒトNK様細胞

2-3) 入手先：JCRB

2-4) 培養条件：10%非働化（56℃、30分処理）ウシ胎児血清ならびに以下の添加物、サイトカインを含むRPMI1640培地、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）

a) 培養液：RPMI1640

i) 入手先：ナカライテスク株式会社

b) 血清：ウシ胎児血清

i) 濃度：10%

ii) 入手先：シグマアルドリッチ

c) 添加物：ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液

i) 濃度：100 Units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン

ii) 入手先：ナカライテスク株式会社

d) サイトカイン：Recombinant Human IL-2

i) 濃度：100 U/mL

ii) 入手先：PeproTech

[0098] 1.1.3 細胞希釈液の調製

細胞希釈液は47%ピカーボン輸液、20%低分子デキストラン糖注、28%ヒト血清アルブミン25%、5%ジメチルスルホキシドを用いた。全ての溶液を混合後、使用するまでディープフリーザー（設定温度-80℃）に保存した。

[0099] 1.1.4 被験細胞投与液及び対照細胞投与液の調製

1) 凍結保存されたCD19 CAR-Tを37℃の恒温槽にて急速融解後、細胞希釈液に懸濁し、遠心（800×g、5分、4℃）により上清を除去した。細胞を細胞希釈液に再懸濁した後、懸濁液の一部を取りAOPI Staining Solutionにて死細胞

を染色し、血球測定装置Cellometer Auto 2000 Cell Viability Counter (Nexcelom Bioscience社製)を用いて生細胞数をカウントした。細胞の生細胞数の測定結果から群構成に従い0.1 mL/bodyとなるよう細胞希釈液で調製した。調製後の細胞懸濁液は、投与時まで氷水中で保存した。

[0100] 2) 凍結保存された活性型インテグリン β 7 CAR-Tを37℃の恒温槽にて急速融解後、細胞希釈液に懸濁し、遠心(800×g、5分、4℃)により上清を除去した。細胞を細胞希釈液に再懸濁した後、懸濁液の一部を取りAOPI Staining Solutionにて死細胞を染色し、血球測定装置を用いて生細胞数をカウントした。細胞の生細胞数の測定結果から群構成に従い0.1 mL/bodyとなるよう細胞希釈液で調製した。調製後の細胞懸濁液は、投与時まで氷水中で保存した。

[0101] 3) 凍結保存されたControl-Tを37℃の恒温槽にて急速融解後、細胞希釈液に懸濁し、遠心(800×g、5分、4℃)により上清を除去した。細胞を細胞希釈液に再懸濁した後、懸濁液の一部を取りAOPI Staining Solutionにて死細胞を染色し、血球測定装置を用いて生細胞数をカウントした。細胞の生細胞数の測定結果から群構成に従い0.1 mL/bodyとなるよう細胞希釈液で調製した。調製後の細胞懸濁液は、投与時まで氷水中で保存した。

[0102] 4) 凍結保存されたNY-ESO-1 TCR-Tを37℃の恒温槽にて急速融解後、細胞希釈液に懸濁し、遠心(800×g、5分、4℃)により上清を除去した。細胞を細胞希釈液に再懸濁した後、懸濁液の一部を取りAOPI staining solutionにて死細胞を染色し、血球測定装置を用いて生細胞数をカウントした。細胞の生細胞数の測定結果から群構成に従い0.1 mL/bodyとなるよう細胞希釈液で調製した。調製後の細胞懸濁液は、投与時まで氷水中で保存した。

[0103] 5) 凍結保存されたCD19 CAR-KHYG-1及びKHYG-1を37℃の恒温槽にて急速融解後、培地に懸濁し、遠心(150×g、5分、20℃)により上清を除去した。細胞を培地に再懸濁後、全量をフラスコに播種して、37℃、5% CO₂存在下で培養した。培養開始後、顕微鏡にて細胞の形態及び増殖状態を観察し、サブコンフルエントになるまで培養した。サブコンフルエントの細胞懸濁液を新しい培地が入った培養フラスコへ継代した。その後も同様の操作を続け拡大培養を

し、試験期間中は投与に必要な細胞を維持した。

各投与日はサブコンフルエントの状態まで培養した各細胞懸濁液を必要量回収し、遠心操作によりD-PBS (-)で3回洗浄したのち無血清のRPMI1640にて再懸濁した。再懸濁後、細胞懸濁液の一部を取りAOPI staining solutionにて死細胞を染色し、血球測定装置を用いて生細胞数をカウントした。細胞の生細胞数の測定結果から群構成に従い0.1 mL/bodyとなるよう細胞希釈液で調製した。調製後の投与液は、投与時まで氷水中で保存した。

[0104] 1.2 被験物質

1.2.1 被験物質

[表1]

表 1 被験物質

被験物質名	供給源・メーカー
Tolinapant	Astex Pharmaceuticals
Birinapant	Medchemexpress
LCL161	Medchemexpress
AT406	MedKoo Biosciences

Tolinapant：本実施例に限り式(1)で表される化合物の(+)-L-乳酸塩を表す。

保管条件：冷蔵、遮光

[0105] 1.2.2 媒体の調製

基本媒体としてTolinapantは蒸留水、Birinapantはカプチゾール、LCL161は酢酸ナトリウム、ならびにAT406はヒプロメロースを用いた。

カプチゾールは必要量を秤量後、蒸留水にて溶解、12.5%カプチゾール溶液となるよう調製しBirinapantの溶媒とした。

酢酸ナトリウムは3M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.2) に0.1 M塩酸を加えpHを4.3～4.6の範囲内になるようあわせてLCL161の溶媒とした。

ヒプロメロースは必要量を秤量後PBSにて溶解、1%ヒプロメロース溶液を調製した。溶解後、オートクレーブをかけたのち0.1%相当量のTween 80を加えて溶解しAT406の溶媒とした。

すべての媒体は薬剤調製まで低温室（設定温度4℃）に保存した。

[0106] 1.2.3 Tolinapant投与液の調製

Tolinapantの調製は既報に基づき16 mg/kgとなるよう調製した（参考文献1：Mol Cancer Ther. 2018 July; 17(7): 1381-1391；参考文献2：Oncoimmunology, 2020 January 9; 9(1):1710398）。Tolinapantは1.6 mg/mLとなるよう必要量秤量後、蒸留水で無色透明に溶解させた。投与液は滅菌済みチューブに分注し、投与まで遮光し冷凍保存した。

[0107] 1.2.4 Birinapant投与液の調製

Birinapantの調製は既報に基づき12 mg/kgとなるよう調製した（参考文献3：Jessica Michie, et al., Cancer Immunol Res. 2019;7(2):183-192）。Birinapantは1.2 mg/mLとなるよう必要量秤量後、事前に調製したカプチゾールで懸濁した。懸濁はメノウ乳鉢を用いて均一な細かい懸濁液になるまで磨りつぶし作製した。投与液は滅菌済みチューブに分注し、投与まで遮光し低温室（設定温度4℃）に保存した。

[0108] 1.2.5 LCL161投与液の調製

LCL161の調製は既報に基づき30 mg/kgとなるよう調製した（参考文献4：Peter J Houghton et al., Pediatr Blood Cancer. 2012;58(4):636-639）。LCL161は3 mg/mLとなるよう必要量秤量後、事前に調製した酢酸ナトリウム溶液で無色透明に溶解させた。投与液は滅菌済みチューブに分注し、投与まで遮光し低温室（設定温度4℃）に保存した。

[0109] 1.2.6 AT406投与液の調製

AT406の調製は既報に基づき100 mg/kgとなるよう調製した（参考文献5：Melissa K Brunckhorst et al., Cancer Biology & Therapy. 2012;13(9):804-811）。AT406は初めに200 mg/mL DMSO溶液を調製した。次に10 mg/mLとなるよう必要量を分取し、事前に調製したヒプロメロース溶液で懸濁した。懸濁はメノウ乳鉢を用いて均一な細かい懸濁液になるまで磨りつぶし作製した。投与液は滅菌済みチューブに分注し、投与まで遮光し低温室（設定温度4℃）に保存した。

[0110] 1.3 試験系

1.3.1 使用細胞

1.3.1.1 NALM6-luc2

- 1) 細胞株名 : NALM6-luc2
- 2) 由来 : Acute Lymphoblastic Leukemia
- 3) 入手先 : ATCC CRL-3273
入手後 : luc2株を樹立
- 4) 培養条件 : 10%非働化 (56°C、30分処理) ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地、CO₂インキュベーター (37°C、5% CO₂)
 - a) 培養液 : RPMI1640
 - i) 入手先 : ナカライテスク株式会社
 - b) 血清 : ウシ胎児血清
 - i) 濃度 : 10%
 - ii) 入手先 : ニチレイバイオサイエンス
 - c) 添加物 : ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液
 - i) 濃度 : 100 Units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン
 - ii) 入手先 : ナカライテスク株式会社

[0111] 1.3.1.2 MM.1S-luc2

- 1) 細胞株名 : MM.1S
- 2) 由来 : Multiple Myeloma
- 3) 入手先 : ATCC (入手後に luc2株を樹立)
- 4) 培養条件 : 10%非働化 (56°C、30分処理) ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地、CO₂インキュベーター (37°C、5% CO₂)
 - a) 培養液 : RPMI1640
 - i) 入手先 : ナカライテスク株式会社
 - b) 血清 : ウシ胎児血清
 - i) 濃度 : 10%
 - ii) 入手先 : シグマアルドリッチ
 - c) 添加物 : ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液
 - i) 濃度 : 100 Units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン

ii) 入手先：ナカライテスク株式会社

[0112] 1.3.1.3 A375

- 1) 細胞株名：A375
- 2) 由来：Malignant Melanoma
- 3) 入手先：ATCC CRL-1619
- 4) 培養条件：10%非働化（56℃、30分処理）ウシ胎児血清を含むDMEM培地、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）
 - a) 培養液：DMEM
 - i) 入手先：ナカライテスク株式会社
 - b) 血清：ウシ胎児血清
 - i) 濃度：10%
 - ii) 入手先：シグマアルドリッチ
 - c) 添加物：ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液
 - i) 濃度：100 Units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン
 - ii) 入手先：ナカライテスク株式会社

[0113] 1.3.1.4 NALM6

- 1) 細胞株名：NALM6
- 2) 由来：Acute Lymphoblastic Leukemia
- 3) 入手先：ATCC CRL-3273
- 4) 培養条件：10%非働化（56℃、30分処理）ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）
 - a) 培養液：RPMI1640
 - i) 入手先：ナカライテスク株式会社
 - b) 血清：ウシ胎児血清
 - i) 濃度：10%
 - ii) 入手先：シグマアルドリッチ
 - c) 添加物：ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液
 - i) 濃度：100 Units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン

ii) 入手先：ナカライテスク株式会社

[0114] 1.3.2 動物

- 1) 種/系統：マウス／NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO Jic (NOD)
- 2) 微生物学的グレード：specific pathogen-free (SPF)
- 3) 入手先：インビボサイエンス（株）
- 4) 週齢（入荷時）：6週齢
- 5) 飼育条件

下記の条件に設定された環境下で、動物の飼育を行った。

a) 温度：23 ± 3℃

b) 湿度：55 ± 15%

c) 照明：照明時間：午前8時 ～ 午後8時

消灯時間：午後8時 ～ 午前8時

d) 餌及び水：自由摂取、CL-2（固型飼料、放射線滅菌済、日本クレア株式会社）、オートクレーブ滅菌した水道水

[0115] 1.3.3 群構成

1.3.3.1 IAPアンタゴニストとCD19 CAR-Tの併用

各試験の群構成は以下である。

[表2]

表2 Birinapant 併用試験

群	投与1	投与1 用法用量	投与2	投与2 用法用量	n数	雌雄
1	—	—	—	—	5	♀
2	Birinapant	12 mg/kg, q3-4d, ip	—	—	5	♀
3	CD19 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	—	—	5	♀
4	CD19 CAR-T	1×10 ⁶ cells/body, iv	—	—	5	♀
5	Birinapant	12 mg/kg, q3-4d, ip	CD19 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	5	♀

[表3]

表3 Tolinapant 併用試験

群	投与1	投与1 用法用量	投与2	投与2 用法用量	n数	雌雄
1	—	—	—	—	5	♀
2	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	—	—	5	♀
3	CD19 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	—	—	5	♀
4	CD19 CAR-T	1×10 ⁶ cells/body, iv	—	—	5	♀
5	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	CD19 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	5	♀

[表4]

表4 Tolinapant 併用試験（低腫瘍量^aからの併用試験）

群	投与1	投与1 用法用量	投与2	投与2 用法用量	n数	雌雄
1	—	—	—	—	5	♀
2	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	—	—	5	♀
3	CD19 CAR-T	2×10 ⁴ cells/body, iv	—	—	5	♀
4	CD19 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	—	—	5	♀
5	CD19 CAR-T	1×10 ⁶ cells/body, iv	—	—	5	♀
6	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	CD19 CAR-T	2×10 ⁴ cells/body, iv	5	♀
7	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	CD19 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	5	♀

^a 低腫瘍量とは従来の評価系のおよそ10分の1量の腫瘍生着量(約2×10⁶ photons/secの発光量)からの併用評価

[表5]

表5 LCL161, AT406 併用試験

群	投与1	投与1 用法用量	投与2	投与2 用法用量	n数	雌雄
1	—	—	—	—	5	♀
2	LCL161	30 mg/kg, qw, po	—	—	5	♀
3	AT406	100 mg/kg, qd, po	—	—	5	♀
4	CD19 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	—	—	5	♀
5	CD19 CAR-T	1×10 ⁶ cells/body, iv	—	—	5	♀
6	LCL161	30 mg/kg, qw, po	CD19 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	5	♀
7	AT406	100 mg/kg, qd, po	CD19 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	5	♀

[0116] 1.3.3.2 IAPアンタゴニストと活性型インテグリンβ7 CAR-T (aITGB7 CAR-T)の併用

本試験の群構成は以下である。

[表6]

表6 Tolinapant併用試験

群	投与1	投与1 用法用量	投与2	投与2 用法用量	n数	雌雄
1	—	—	—	—	5	♀
2	—	—	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	5	♀
3	Control-T	3×10 ⁴ cells/body, iv	—	—	5	♀
4	Control-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	—	—	5	♀
5	aITGB7 CAR-T	3×10 ⁴ cells/body, iv	—	—	5	♀
6	aITGB7 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	—	—	5	♀
7	Control-T	3×10 ⁴ cells/body, iv	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	5	♀
8	Control-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	5	♀
9	aITGB7 CAR-T	3×10 ⁴ cells/body, iv	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	5	♀
10	aITGB7 CAR-T	1×10 ⁵ cells/body, iv	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	5	♀

[0117] 1.3.3.3 IAPアンタゴニストとNY-ESO-1 TCR-Tの併用

本試験の群構成は以下である。

[表7]

表7 Tolinapant併用試験

群	投与1	投与1 用法用量	投与2	投与2 用法用量	n数	雌雄
1	—	—	—	—	5	♀
2	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	—	—	5	♀
3	—	—	NY-ESO-1 TCR-T	3×10 ⁶ cells/body, iv	5	♀
4	—	—	NY-ESO-1 TCR-T	1×10 ⁷ cells/body, iv	5	♀
5	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	NY-ESO-1 TCR-T	3×10 ⁶ cells/body, iv	5	♀
6	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	NY-ESO-1 TCR-T	1×10 ⁷ cells/body, iv	5	♀

[0118] 1.3.3.4 IAPアンタゴニストとCD19 CAR-KHYG-1の併用

本試験の群構成は以下である。

[表8]

表8 Tolinapant併用試験

群	投与1	投与1 用法用量	投与2	投与2 用法用量	n数	雌雄
1	—	—	—	—	5	♀
2	—	—	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	5	♀
3	KHYG-1	1×10 ⁷ cells/body, it Day 0, 4, 7, 11	—	—	5	♀
4	CD19 CAR-KHYG-1	1×10 ⁷ cells/body, it Day 0, 4, 7, 11	—	—	5	♀
5	KHYG-1	1×10 ⁷ cells/body, it Day 0, 4, 7, 11	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	5	♀
6	CD19 CAR-KHYG-1	1×10 ⁷ cells/body, it Day 0, 4, 7, 11	Tolinapant	16 mg/kg, qd, po	5	♀

it: intratumoral injection (腫瘍内注入)

[0119] 1.3.4 用法用量の設定根拠

1.3.4.1 Tolinapant

IAPアンタゴニストの試験で一般的に用いられるヒト乳癌細胞株MDA-MB-231異種移植マウス系において効果を示す用法用量（16 mg/kg、連日経口投与）から設定した（参考文献1及び2）。また本試験系であるNALM6-luc2においては、同じレジメンで効果を全く示さなかったことを確認した。

[0120] 1.3.4.2 Birinapant

CAR-TとBirinapantの併用論文より用法用量を設定（12 mg/kg、週2回腹腔

内投与)した(参考文献3)。また本試験系であるNALM6-luc2においては、同じレジメンで効果を全く示さなかったことを確認した。

[0121] 1.3.4.3 LCL161

既報の最低用量(30 mg/kg、週2回経口投与)を参考にした(参考文献4)。本試験系であるNALM6-luc2においては30 mg/kg、週2回経口投与で効果を示さない一方、半数以上の死亡例が認められたことを確認した。このことから用法用量を週1回経口投与に下げた設定(30 mg/kg、週1回経口投与)とした。

[0122] 1.3.4.4 AT406

既報よりヒト卵巣がん細胞株OVCAR異種移植マウス系、ならびにヒト乳癌細胞株MDA-MB-231異種移植マウス系において効果を示す用法用量から休薬なしの最大投与量(100 mg/kg、連日経口投与)を設定した(参考文献5;参考文献6: Qian Cai, et al., Med Chem. 2011;54(8):2714-2726)。また本試験系であるNALM6-luc2においては、同じレジメンで効果を全く示さなかったことを確認した。

[0123] 1.3.4.5 CD19 CAR-KHYG-1及びKHYG-1

膠芽腫細胞株の皮下腫瘍マウスモデルにおいて、KHYG-1を用いたEv CAR-KHYG-1の薬理試験では 1×10^7 cells/body、週2回(計3回)の腫瘍内投与が実施され(参考文献7: Nakazawa T, et al., Anticancer Res. 2020;40(6):3231-3237)、また胃がん細胞株を用いたFOLR1 CAR-KHYG-1では週1回(計2回)の腫瘍内投与が実施されている(参考文献8: Minsung Kim, et al., PLoS One. 2018;13(6):e0198347)。

[0124] 1.4 試験方法

1.4.1 IAPアンタゴニストとCD19 CAR-Tの併用試験方法

インビボサイエンス株式会社で生産されたNOGマウスを6週齢で入荷し、7週齢で腫瘍細胞を静脈内移植して担癌マウスを作製した。移植の前日に20 mg/kgのブスルフェクス(BSF)を腹腔内投与した。飼育期間中は、5匹ずつ収容し、温度24℃(実測: 19.7~25.0℃)、湿度50%(実測: 38.6~58.5%)、照明

12時間／1日（8:00AMから8:00PM）に設定したP2A飼育室で飼育した。その間、放射線滅菌したマウス用固型飼料（日本クレア、CL-2）および給水瓶に入れたオートクレーブ滅菌水道水を自由に摂取させた。

投与するCD19 CAR-T細胞は群構成に従い、1回、群分けと同一日にiv投与した。IAPアンタゴニストにおいても群分けと同一日に投与を開始し、群構成表に従ってpoまたはip投与した。

評価期間は3週ないし4週間とし、IVIS（商標）による腫瘍発光値を指標に群分けと薬理評価を行った。IVIS（商標）での発光値の測定ならびに体重測定は週2回実施した。

[0125] 1.4.2 IAPアンタゴニストと活性型インテグリン β 7 CAR-Tの併用試験方法

インビボサイエンス株式会社で生産されたN0Gマウスを6週齢で入荷し、7週齢で腫瘍細胞を静脈内移植して担癌マウスを作製した。マウスは尾に番号を付けて識別した。飼育期間中は、5匹ずつ収容し、温度24℃（実測：19.7～25.0℃）、湿度50%（実測：38.6～58.5%）、照明12時間／1日（8:00AMから8:00PM）に設定したP2A飼育室で飼育した。その間、放射線滅菌したマウス用固型飼料（日本クレア、CL-2）および給水瓶に入れたオートクレーブ滅菌水道水を自由に摂取させた。

投与するControl-T細胞ならびに活性型インテグリン β 7 CAR-T（aITGB7 CAR-T）細胞は群構成に従い、1回、群分けと同一日にiv投与した。Tolnapantにおいても群分けと同一日に投与を開始し、群構成表に従って連日po投与した。

評価期間はDay 14またはDay 21までとし、IVISによる腫瘍発光値を指標に群分けと薬理評価を行った。IVISでの発光値の測定ならびに体重測定は週2回実施した。

[0126] 1.4.3 IAPアンタゴニストとNY-ESO-1 TCR-Tの併用試験方法

インビボサイエンス株式会社で生産されたN0Gマウスを6週齢で入荷し、7週齢で腫瘍細胞を皮下移植して担癌マウスを作製した。マウスは尾に番号を付けて識別した。飼育期間中は、5匹ずつ収容し、温度23℃、湿度55%、照明12

時間／1日（8:00AMから8:00PM）に設定したP2A飼育室で飼育した。その間、放射線滅菌したマウス用固型飼料（日本クレア、CL-2）および給水瓶に入れたオートクレーブ滅菌水道水を自由に摂取させた。

投与するNY-ES0-1 TCR-T細胞は群構成に従い、1回、群分けと同一日にiv投与した。Tolnapantにおいても群分けと同一日を投与開始日とし、群構成表に従ってpo投与した。

評価期間は2週間とし、ノギスを用いた腫瘍径測定の結果から群分けと薬理評価を行った。腫瘍径測定ならびに体重測定は週2回実施した。

[0127] 1.4.4 IAPアンタゴニストとCD19 CAR-KHYG-1の併用試験方法

インビボサイエンス株式会社で生産されたN0Gマウスを6週齢で入荷し、7週齢で腫瘍細胞をマトリゲルを用いて皮下移植し担癌マウスを作製した。マウスは尾に番号を付けて識別した。飼育期間中は、5匹ずつ収容し、温度24℃（実測：19.7～25.0℃）、湿度50%（実測：38.6～58.5%）、照明12時間／1日（8:00AMから8:00PM）に設定したP2A飼育室で飼育した。その間、放射線滅菌したマウス用固型飼料（日本クレア、CL-2）および給水瓶に入れたオートクレーブ滅菌水道水を自由に摂取させた。

投与するCD19 CAR KHYG-1細胞ならびにKHYG-1細胞は群構成に従い、群分け後、計4回、腫瘍内投与した。Tolnapantにおいても群分けと同一日に投与を開始し、群構成表に従って連日経口投与した。

評価期間はDay 17までとし、ノギスによる腫瘍体積を指標に群分けと薬理評価を行った。腫瘍体積測定ならびに体重測定は週2回、各投与前に実施した。

[0128] 1.4.1 培養用培地の調製

1.4.1.1 RPMI1640培地の調製

500 mLのRPMI1640培地に、非働化（56℃、30分処理）したウシ胎児血清を50 mL、抗生物質を5 mL加え培養用培地とした。一方、KHYG-1細胞ならびにCD19 CAR-KHYG-1細胞は、さらにIL-2を終濃度が100 U/mLとなるよう加えたものを培養用培地とした。それぞれは使用するまで低温室（設定温度4℃）に保存

した。

[0129] 1.4.1.2 DMEM培地の調製

500 mLのDMEM培地に、非働化（56℃、30分処理）したウシ胎児血清を50 mL、及び抗生物質を5 mL加え、使用するまで低温室（設定温度4℃）に保存した。

[0130] 1.4.2 移植用細胞懸濁液の調製

1.4.2.1 移植用NALM6-luc2、MM.1S-luc2、及びNALM6細胞懸濁液の調製

細胞の培養は、培養用培地（以下、培地）を用いてCO₂インキュベーター内（5% CO₂、37℃）で培養した。凍結保存された細胞株を37℃の恒温槽にて急速融解後、培地に懸濁し、遠心（150×g、5分、20℃）により上清を除去した。細胞を培地に再懸濁後、全量をフラスコに播種して、37℃、5% CO₂存在下で培養した。培養開始後、顕微鏡にて細胞の形態及び増殖状態を観察し、サブコンフルエントになるまで培養した（継代1回目）。サブコンフルエントの細胞懸濁液を新しい培地が入った培養フラスコへ継代した（継代2回目）。融解後、3回以上継代培養した細胞を移植に使用した。継代する培養液量は、新しい培地の液量に対して1/10～1/3量の培養液とした。

サブコンフルエントの状態まで培養した細胞懸濁液を遠心操作によりD-PBS（-）で3回洗浄したのち無血清のRPMI1640にて再懸濁した。

NALM6-luc2の場合、再懸濁後、細胞懸濁液の一部を取りAOPI Staining Solutionにて死細胞を染色し、血球測定装置にて生細胞数をカウントした。細胞の生細胞数の測定結果から 1×10^7 cells/mLとなるようRPMI1640で希釈し調製した。同様に、低腫瘍量の系においては 1×10^6 cells/mLとなるよう無血清のRPMI1640で希釈し調製した。

MM.1S-luc2の場合、再懸濁後、細胞懸濁液の一部を取りAOPI Staining Solutionにて死細胞を染色し、血球測定装置にて生細胞数をカウントした。細胞の生細胞数の測定結果から 3×10^7 cells/mLとなるようRPMI1640で希釈し調製した。

NALM6の場合、再懸濁後、細胞懸濁液の一部を取りAOPI Staining Solution

にて死細胞を染色し、血球測定装置にて生細胞数をカウントした。細胞の生細胞数の測定結果から 1×10^8 cells/mLとなるようRPMI1640で希釈し調製した。調製した細胞懸濁液は足場となるマトリゲル (Corning(商標) 高濃度マトリゲル基底膜マトリックス) と等量混和し、最終的な移植用懸濁液 (5×10^7 cells/mL) とした。

調製後の細胞懸濁液は、移植時まで氷水中で保存した。

[0131] 1.4.2.2 移植用A375細胞懸濁液の調製

細胞の培養は、培養用培地 (以下、培地) を用いてCO₂インキュベーター内 (5% CO₂、37℃) で培養した。凍結保存されたA375細胞株を37℃の恒温槽にて急速融解後、培地に懸濁し、遠心 (150×g、5分、20℃) により上清を除去した。細胞を培地に再懸濁後、全量をディッシュに播種して、37℃、5% CO₂存在下で培養した。培養開始後、顕微鏡にて細胞の形態及び増殖状態を観察し、サブコンフルエントになるまで培養した (継代1回目)。サブコンフルエントのディッシュの上清を除き、D-PBS(-)(ナカライテスク)を用いて洗浄し、トリプシン-EDTA(ナカライテスク)を加え、細胞を剥離回収し、遠心処理 (4℃、1200 rpm、5分間) した。DMEM培地で懸濁し、A0PI staining solutionを用いて生細胞数を測定した。そしてディッシュサイズに適した細胞密度で播種し、CO₂インキュベーターで培養した (継代2回目)。3回以上継代培養した細胞を移植に使用した。

培養した細胞をトリプシン-EDTAで剥離回収し、遠心処理 (4℃、1200 rpm、5分間) した。上清を除去後、D-PBS(-)を加えて再懸濁し、同様に遠心分離して細胞を洗浄した。この洗浄操作を更に2回繰り返した。細胞懸濁液の一部をA0PI staining solutionを用いて生細胞数を測定後、D-PBS(-)を用いて 1×10^7 cells/mLの細胞懸濁液を調製した。調製後の細胞懸濁液は、移植時まで氷水中で保存した。

[0132] 1.4.3 移植

1.4.3.1 NALM6-luc2移植

保定器具を用いてマウスを保定後、無麻酔下の動物の尾静脈に27Gのマイジ

エクター（1 mL、テルモ株式会社）を用いて 1×10^6 cells/0.1 mL/bodyの細胞懸濁液を移植した。また低腫瘍量の系においては 1×10^5 cells/0.1 mL/bodyの細胞懸濁液を移植した。

[0133] 1.4.3.2 MM.1S-luc2移植

保定器具を用いてマウスを保定後、無麻酔下の動物の尾静脈に27Gのマイジェクター（1 mL、テルモ株式会社）を用いて 3×10^6 cells/0.1 mL/bodyの細胞懸濁液を移植した。

[0134] 1.4.3.3 A375移植

皮下移植群は、移植操作、及びその後の腫瘍増殖の観察を容易にするために、腫瘍移植前日までに安全剃刀を用いて移植部位（右腋窩部）を剃毛した。担癌マウスを作製するため、無麻酔下で細胞懸濁液を腋窩皮下へ26G注射針付きインスリン用注射筒（1 mL、テルモ株式会社）を用いて 1×10^6 cells/0.1 mL/bodyの細胞懸濁液を移植した。

[0135] 1.4.3.4 NALM6移植

皮下移植群は、移植操作、及びその後の腫瘍増殖の観察を容易にするために、腫瘍移植前日までに安全剃刀を用いて移植部位（右腋窩部）を剃毛した。担癌マウスを作製するため、無麻酔下で細胞懸濁液を腋窩皮下へ26G注射針付きインスリン用注射筒（1 mL、テルモ株式会社）を用いて 5×10^6 cells/0.1 mL/bodyの細胞懸濁液を移植した。

[0136] 1.4.4 群分け

1.4.4.1 NALM6-luc2移植後の群分け

図6の投与レジメンに従い、ブスルフェクスで処置した翌日にNALM6-luc2を移植し、3日目にIn-VivoイメージングシステムIVIS（商標） Lumina X5（Perkin Elmer社）を用いて発光値を測定し、その発光値を指標にSAS software R 9.4（SAS Institute Japan）を用い、層別無作為抽出法にて1群5匹に割り付けた。

[0137] 1.4.4.2 MM.1S-luc2移植後の群分け

図9の投与レジメンに従い、移植後、7日目にIn-Vivoイメージングシステム

IVIS（商標） Lumina X5（Perkin Elmer社）を用いて発光値を測定し、その発光値を指標にSAS software R9.4（SAS Institute Japan）を用い、層別無作為抽出法にて1群5匹に割り付けた。群分け後は、マウス尾部へのマーキングを行うことによって個体識別を行った。

[0138] 1.4.4.3 A375移植後の群分け

移植後、8日目に腫瘍の長径と短径を測定し、腫瘍体積を算出した。SAS software R9.4（SAS Institute Japan）を用い、腫瘍サイズ指標にして、層別無作為抽出法にて1群5匹に割り付けた。群分け後は、マウス尾部へのマーキングを行うことによって個体識別を行った。

[0139] 1.4.4.4 NALM6移植後の群分け

移植後、21日目に腫瘍の長径と短径を測定し、腫瘍体積を算出した。SAS software R9.4（SAS Institute Japan）を用い、腫瘍サイズ指標にして、層別無作為抽出法にて1群5匹に割り付けた。群分け後は、マウス尾部へのマーキングを行うことによって個体識別を行った。

[0140] 1.4.5 投与方法

1) CD19 CAR-T細胞の懸濁液は尾静脈へ群分け時に投与した。投与量はCD19 CAR-T生細胞数をカウントし、群構成表に従い0.1 mL/bodyで1回投与した。投与には27Gのマイジェクターを用いた。

[0141] 2) 活性型インテグリン β 7 CAR-T（aITGB7 CAR-T）細胞及びControl-T細胞の懸濁液は尾静脈へ群分け時に投与した。投与量はaITGB7 CAR-T生細胞数をカウントし、群構成表に従った細胞密度の懸濁液を調製し、0.1 mL/bodyで1回投与した。投与には27Gのマイジェクターを用いた。

[0142] 3) NY-ESO-1 TCR-T細胞の懸濁液は尾静脈から投与した。投与量はNY-ESO-1 TCR-T生細胞数をカウントし、群構成表に従った細胞密度の懸濁液を調製し、0.1 mL/bodyで1回投与した。投与には27Gのマイジェクターを用いた。

[0143] 4) KHYG-1細胞及びCD19 CAR-KHYG-1細胞の投与液は、生細胞数をカウントし群構成表に従った細胞密度の懸濁液を調製し、0.1 mL/bodyで腫瘍内に週2回投与（計4回）した。投与には27Gのマイジェクターを用いた。

[0144] 5) Birinapantは腹腔内へ群構成表に従い10 mL/kgで投与、Tolinapant、LCL161ならびにAT406は同様にゾンデを用いて群構成表に従い10 mL/kgで経口投与した。腹腔内投与には26G注射針付きインスリン用注射筒を、経口投与は注射針をゾンデに置き換えて投与した。

[0145] 1.4.6 腫瘍測定

1.4.6.1 腫瘍発光値 (Photones/sec) の測定

VivoGlo™-luciferin(プロメガ)をD-PBS(-)で30 mg/mLになるように溶解後、-20℃で遮光冷凍保存した。測定当日、溶解させたVivoGlo™-luciferin を等量のD-PBS(-)で希釈した。試験に用いるまで遮光下室温で保存した。予め測定した体重を基に、VivoGlo™-luciferinを10 mL/kgの容量で腹腔内投与し、投与20分後にIVIS (商標) Imaging Systemを用いて腫瘍の発光値を測定した。測定にはIVIS (商標) Lumina X5を用いた。図1～5及び7において、縦軸のTotal Flux [p/s]は、腫瘍発光値 (Photones/sec) を意味する。

[0146] 1.4.6.2 腫瘍径の測定

腫瘍径の測定は、電子ノギス (ミットヨ) を用いて短径と長径を測定した。腫瘍細胞移植後、週2回腫瘍径の測定を行った。

[0147] 1.4.6.3 腫瘍体積の測定

腫瘍径の測定結果を基に、次式を用いて腫瘍体積 (TV : tumor volume) を算出した。

$$TV = L \times W^2 \times 1/2$$

ただし

TV : 腫瘍体積 (mm³)

L : 長径 (mm)

W : 短径 (mm)

[0148] 1.4.7 体重

体重は、群分け日と剖検日、投与期間中は週2回、測定を行った。

[0149] 1.5 評価項目

腫瘍発光値又は腫瘍体積

体重

体重変化

[0150] 1.6 統計解析方法

各データは、Microsoft Excel 2013を用いて、要約統計量（平均値及び標準偏差および標準誤差）を算出した。統計解析を伴うデータはSASソフトウェアR9.4（SAS Institute Japan）を用いて行った。有意性は $p < 0.05$ と定義した。

[0151] 2. 結果

2.1 IAPアンタゴニストとCD19 CAR-Tの併用試験

2.1.1 BirinapantとCD19 CAR-Tの併用試験

CD19 CAR-T単独と比較して、BirinapantとCD19 CAR-Tの併用で抗腫瘍効果を高めることはなかった（図1）。

[0152] 2.1.2 TolinapantとCD19 CAR-Tの併用試験

TolinapantとCD19 CAR-Tの併用によりDay7以降で有意な併用効果を認めた。 1×10^5 cellsのCD19 CAR-TにTolinapantを併用した際、Day14で 1×10^6 cells CD19 CAR-T単独効果と同等、それ以降ではさらに上回る腫瘍の退縮を認めた（図2）。

[0153] 2.1.3 低腫瘍に対するTolinapantとCD19 CAR-Tの併用試験

TolinapantとCD19 CAR-Tの併用により強い併用効果を認めた。 1×10^5 cellsのCD19 CAR-TにTolinapantを併用した際、Day17で 1×10^6 cells CD19 CAR-T単独と同等の効果を示し、 2×10^4 cellsのCD19 CAR-TにTolinapantを併用した際には、Day21で 1×10^6 cells CD19 CAR-T単独と同等の効力が得られ、実質50倍以上のCAR-T細胞数削減の可能性を示唆する結果であった（図3）。

[0154] 2.1.4 LCL161, AT406とCD19 CAR-Tの併用試験

LCL161とCD19 CAR-Tの併用によりDay7以降で併用効果を認めた。ただしLCL161の毒性が高く、半数以上の動物がLCL161によって死亡した。 1×10^5 cellsのCD19 CAR-TにLCL161を併用した際、Day14以降で 1×10^6 cells CD19 CAR-T単独効果と同等になり、最大効力においてもTolinapantに比べ乏しかった（図4

）。

一方、AT406はCD19 CAR-Tの併用によりDay10以降で併用効果を認めた。1×10⁵ cellsのCD19 CAR-TにAT406を併用した際、Day14以降で1×10⁶ cells CD19 CAR-T単独効果と同等になった（図5）。

[0155] 2.2 Tolinapantと活性型インテグリンβ7 CAR-T (aITGB7 CAR-T) の併用試験

Tolinapantと3×10⁴ cells aITGB7 CAR-Tの組み合わせの効果について21日間の評価を行い有意な併用効果を認めた。3×10⁴ cells aITGB7 CAR-T単独投与群においてDay 14以降で抗腫瘍効果を示し始めた一方、Tolinapantとの組み合わせにおいてはDay 11以降、明らかな退縮を示し、有意な相乗効果を認めた（図7）。

[0156] 2.3 TolinapantとNY-ESO-1 TCR-Tの併用試験

3×10⁶ cells/bodyのNY-ESO-1 TCR-TとTolinapantの併用群は、Day 15の腫瘍体積について、それぞれの単剤群に対して有意差が認められた。1×10⁷ cells/bodyのNY-ESO-1 TCR-T単独投与群は、3×10⁶ cells/bodyのNY-ESO-1 TCR-T単独投与群よりも高い抗腫瘍効果を示し、Day 7以降においては、Day 0を下回る腫瘍量となったものの、その組み合わせ群においては、さらに高い退縮が確認され、併用することによる相乗効果が示された。

[0157] 2.4 TolinapantとCD19 CAR-KHYG-1の併用試験

TolinapantとCD19 CAR-KHYG-1の組み合わせの効果について17日間の評価を行い有意な併用効果を認めた。CD19 CAR-KHYG-1ならびにTolinapantの単独投与では抗腫瘍効果を示さない一方、2製剤の組み合わせにおいてはDay 7以降明らかな増殖抑制効果を示し、Day 17では有意な併用効果を認めた（図9）。

[0158] 3 結論

Tolinapantを含むIAPアンタゴニスト単独ではNALM6 (B-ALL) 及びMM.1S (MM) に対する効力は認められなかった。一方、Tolinapant + CD19 CAR-T、Tolinapant + 活性型インテグリンβ7 CAR-T (aITGB7 CAR-T)、Tolinapant + NY-ESO-1 TCR-T、及びTolinapant + CD19 CAR-KHYG-1の併用活性は再現性の高い有意な結果を得た。他のIAPアンタゴニストであるAT406、LCL161もCD19 CA

R-Tとの併用効果を認めたが、LCL161においては体重減少及び死亡例が確認できる毒性が認められた。また最大効果においてもTolnapantの併用が優位であった。次いでAT406はTolnapantと似た併用効果推移を示したが、効果のスピードが異なることから併用結果のAUC、ならびに最大腫瘍量（発光値）によってAT406とTolnapantの差別化を検証した。その解析で、Day17までの併用データのAUCにおいて、Tolnapant併用に伴う有意性を得ることができ、Day14でも同様の結果が得られた（表9、表10）。同じく最大腫瘍量においてもAT406とTolnapantで有意差を得ることができた（表11）。

以上より、Tolnapantが他のIAPアンタゴニストよりも高いCAR-T細胞との併用における薬効増強作用を示すことが確認された。これにより、トリナパント系薬剤が、CAR-T細胞、TCR-T細胞、及びCAR-NK細胞を含む改変免疫細胞との併用における薬効増強作用においても顕著に優れることが示唆された。

また、in vitroにおいて、本実施例のCAR-Tが標的CAR抗原発現腫瘍細胞（例えばCD19陽性NALM6）と反応することで、サイトカイン（例えばTNF- α ）が産生されることを確認している。さらに、CAR-Tから産生されるサイトカインとTolnapantが共存した場合、抗原発現細胞だけでなく抗原陰性腫瘍細胞（例えばCD19陰性NALM6）に対しても細胞死（例えばアポトーシス）を誘導させることが確認されている。このような腫瘍細胞に対する非接触的な細胞死の誘導により、抗原エスケープが生じた腫瘍細胞や、改変免疫細胞がアプローチできない部位に転移した腫瘍細胞に対しても、抗腫瘍効果を発揮することが期待される。

[0159] [表9]

表 9 AUC を指標とした t 検定 (Day17)			
	AT406	LCL161	Birinapant
Tolnapant	< 0.05	< 0.05	< 0.05

[0160] [表10]

表 10 AUC を指標とした t 検定 (Day14)			
	AT406	LCL161	Birinapant
Tolnapant	< 0.05	< 0.05	< 0.05

[0161] [表11]

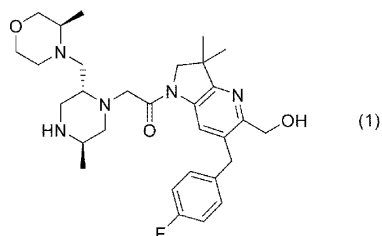
表 11 最大腫瘍量を指標とした t 検定

	AT406	LCL161	Birinapant
Tolinapant	< 0.05	< 0.05	< 0.05

請求の範囲

[請求項1] 下記式(1)：

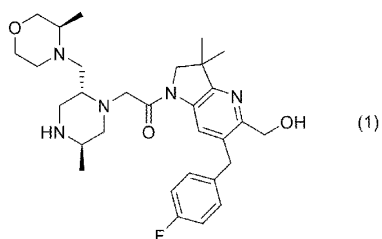
[化1]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を含有する医薬組成物であって、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞と組み合わせて投与される、前記医薬組成物。

[請求項2] キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞を含有する医薬組成物であって、下記式(1)：

[化2]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物と組み合わせて投与される、前記医薬組成物。

[請求項3] 前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、CD19、インテグリン $\beta 7$ 、及びNY-ESO-1から選択される抗原を特異的に認識する、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

[請求項4] 前記キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体が、活性型インテグリン $\beta 7$ を特異的に認識する、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

[請求項5] 前記免疫細胞がキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞

胞又はNK細胞であり、前記キメラ抗原受容体が、

- (1) 抗原を認識可能な細胞外ドメイン、
- (2) 膜貫通ドメイン、
- (3) 共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメイン、及び
- (4) CD3ζの細胞内シグナル伝達ドメイン

を含有する、請求項1～4のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項6] 前記細胞外ドメインが、CD19又はインテグリンβ7を認識可能な細胞外ドメインである、請求項5に記載の医薬組成物。

[請求項7] 前記膜貫通ドメインが、CD28又はCD8の膜貫通ドメインである、請求項5又は6に記載の医薬組成物。

[請求項8] 前記共刺激分子が、CD2、CD4、CD5、CD8α、CD8β、CD28、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、又はCD278(ICOS)である、請求項5～7のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項9] 前記免疫細胞が組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞又はNK細胞であり、前記組換えT細胞受容体が、NY-ES0-1を認識可能な可変ドメインを有する、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

[請求項10] 前記免疫細胞が、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、インテグリンβ7を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたT細胞、CD19を特異的に認識するキメラ抗原受容体を発現するように改変されたNK細胞、又はNY-ES0-1を特異的に認識する組換えT細胞受容体を発現するように改変されたT細胞である、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

[請求項11] 癌を予防及び／又は治療するための、請求項1～10のいずれかに記載の医薬組成物。

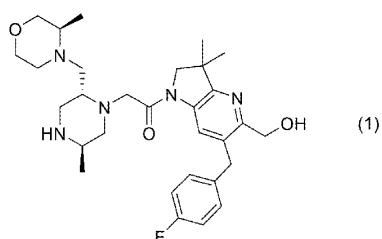
[請求項12] 前記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物が、10mg～180mg/日で投与される、請求項1～11のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項13] 前記免疫細胞が、 1×10^3 個～ 1×10^8 個(生細胞数)/kg体重/日で投

与される、請求項1～12のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項14] 下記式(1)：

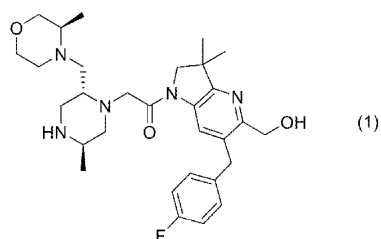
[化3]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を含有する第一剤、並びに、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞を含有する第二剤を備えるキット。

[請求項15] 癌を予防及び／又は治療する方法であって、
癌の予防及び／又は治療を必要とする対象に、下記式(1)：

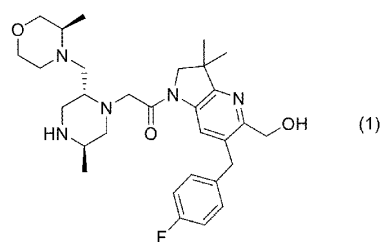
[化4]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物を、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞と組み合わせて投与することを含む、方法。

[請求項16] キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞と組み合わせて投与するための医薬の調製のための、下記式(1)：

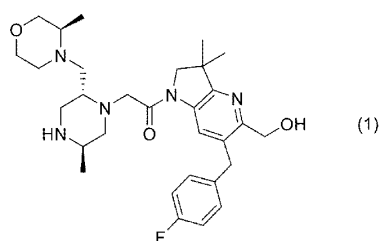
[化5]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物の使用。

[請求項17] 下記式(1)：

[化6]



で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、又はその薬学的に許容可能な溶媒和物と組み合わせて投与するための医薬の調製のための、キメラ抗原受容体又は組換えT細胞受容体を発現するように改変された免疫細胞の使用。