

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-511903
(P2019-511903A)

(43) 公表日 令和1年5月9日(2019.5.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G045
C12Q 1/70 (2006.01)	C12Q 1/70	4B063
G01N 33/50 (2006.01)	G01N 33/50 Z	4B065
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 Y	
C12N 15/12 (2006.01)	C12N 15/12	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-538100 (P2018-538100)
 (86) (22) 出願日 平成29年2月16日 (2017.2.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月11日 (2018.9.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/018214
 (87) 国際公開番号 WO2017/143092
 (87) 国際公開日 平成29年8月24日 (2017.8.24)
 (31) 優先権主張番号 62/297,751
 (32) 優先日 平成28年2月19日 (2016.2.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513276204
 ナント ホールディングス アイピー エルエルシー
 Nant Holdings IP, LLC
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90232 カルバーシティ ジェファーソン
 ブールバード 9920
 9920 Jefferson Blvd
 Culver City California 90232 U. S. A.

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫原性調節の方法

(57) 【要約】

腫瘍生検の増加した腫瘍免疫原性の Ex vivo 決定は、患者における腫瘍の免疫療法を同定するためのガイドとして用いられる。最も好ましくは、ex vivo 試験は、その後、増加した活性化または活性について免疫コンピテント細胞を用いてアッセイされる、事前に処理した腫瘍細胞を生み出すストレス状態への生検試料の曝露を含むであろう。試験状態は、生検試料の免疫刺激組成物、ネオエピトープに対する抗体および/または変更された細胞への曝露を含み、免疫原性の増加は、好ましくはT細胞および/またはNK細胞への曝露により決定される。

【選択図】 図 1

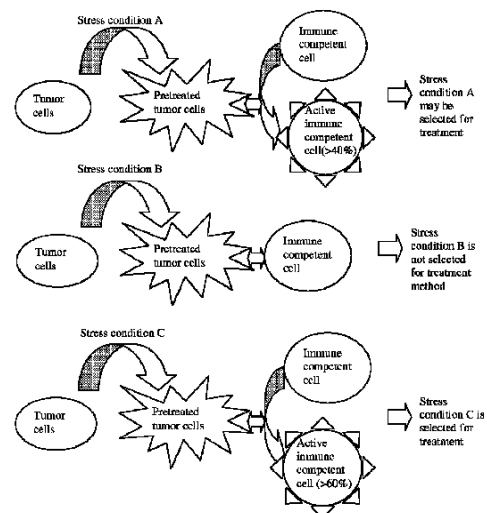


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者の腫瘍からの複数の生検試料をそれぞれのかつ異なる複数のストレス状態に *in vivo* で曝露してそれぞれの事前に処理した腫瘍細胞を生み出すこと；
事前に処理した腫瘍細胞を複数の免疫コンピテント細胞と接触させること、および事前に処理した腫瘍細胞に対する免疫コンピテント細胞の応答を定量すること；および
応答が事前に決定された閾値を満たす又は超える場合に治療の選択肢として、ストレス状態を選択すること
を含む、患者のための治療の選択肢を同定する方法。

【請求項 2】

ストレス状態は、低用量化学療法、低線量照射への曝露、熱ショック治療、低酸素症、酸素過剰症、慢性炎症状態への曝露、活性酸素種への曝露、ネイティブな又は変更された免疫 T 又は NK 細胞への曝露、抗体への曝露および環境ストレス状態からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

低用量化学療法は、メトロノーム低用量化学療法を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

環境ストレス状態は、DNA 損傷剤、HSP90 阻害剤、GSK3 阻害剤、およびウイルス感染からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

事前に処理した腫瘍細胞は、ストレス状態への曝露をしていない同じ細胞と比較して、NKGD2Dリガンドを過剰発現する、先行する請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

複数の生検試料を免疫刺激剤に曝露する工程をさらに含む、先行する請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

免疫刺激剤は、サイトカインである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

サイトカインは、IL-15、IL-15 スーパーアゴニスト、IL-2、IL-7 および IL-21 からなる群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

免疫刺激剤は、TLRリガンドである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

免疫刺激剤は、チェックポイント阻害剤である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

生検試料について、複数のネオエピトープを決定する工程をさらに含む、先行する請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

複数のネオエピトープの少なくとも 1 つに対する抗体を生み出す工程をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

複数のネオエピトープの少なくとも 1 つをコードする組換え核酸を含むウイルスベクターを生み出す工程をさらに含み、任意選択でウイルスベクターを有する免疫コンピテント細胞を接触させる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

事前に処理した腫瘍細胞を複数の免疫コンピテント細胞と接触させる工程の後、事前に処理した腫瘍細胞について、第二の複数のネオエピトープを決定する工程をさらに含む、先行する請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

免疫コンピテント細胞は、NK細胞である、先行する請求項のいずれか 1 項に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 16】

NK細胞は、NK92細胞、またはaNK細胞、h aNK細胞およびt aNK細胞からなる群より選択される遺伝学的に操作されたNK細胞である、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

免疫コンピテント細胞の応答を定量する工程は、顕微鏡アッセイ、発光アッセイ、蛍光アッセイまたは放射線学的アッセイを含む、先行する請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

事前に決定された閾値は、事前に処理した腫瘍細胞の溶解またはアポトーシスの、事前に決定された割合である、先行する請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 19】

(削除)

【請求項 20】

(削除)

【請求項 21】

(削除)

【請求項 22】

複数の生検試料を免疫刺激剤に曝露する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 23】

免疫刺激剤はサイトカインである、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

サイトカインは、IL-15、IL-15スーパーアゴニスト、IL-2、IL-7およびIL-21からなる群より選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

免疫刺激剤は、TLRリガンドである、請求項22に記載の方法。

【請求項 26】

免疫刺激剤は、チェックポイント阻害剤である、請求項22に記載の方法。

【請求項 27】

生検試料について、複数のネオエピトープを決定する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 28】

複数のネオエピトープの少なくとも1つに対する抗体を生み出す工程をさらに含む、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

複数のネオエピトープの少なくとも1つをコードする組換え核酸を含むウイルスベクターを生み出す工程をさらに含む、免疫コンピテント細胞をウイルスベクターと接触させる、請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

事前に処理した腫瘍細胞を複数の免疫コンピテント細胞と接触させる工程の後、事前に処理した腫瘍細胞について、第二の複数のネオエピトープを決定する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 31】

免疫コンピテント細胞は、NK細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項 32】

NK細胞は、NK92細胞、またはaNK細胞、h aNK細胞およびt aNK細胞からなる群より選択される遺伝学的に操作されたNK細胞である、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

免疫コンピテント細胞の応答を定量する工程は、顕微鏡アッセイ、発光アッセイ、蛍光アッセイまたは放射線学的アッセイを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項34】

事前に決定された閾値は、事前に処理した腫瘍細胞の溶解またはアポトーシスの、事前に決定された割合である、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2016年2月19日に提出されたUS仮出願シリアル番号62/297,751に対する優先権を主張する。

10

【0002】

本発明の分野

本発明の分野は、*in vivo*でがんの免疫原性を増加する患者治療の選択肢を同定するための、がんの*ex vivo*治療のための組成物および方法である。

【背景技術】

【0003】

背景記載は、本発明の理解において有用であり得る情報を含む。本明細書中に提供される情報のいずれも、先行技術であるまたは本出願の請求項に記載された発明に関連することを認めるものではなく、また具体的にもしくは黙示的に言及されたいかなる出版物が先行技術であることを認めるものではない。

20

【0004】

本明細書中、全ての出版物は、各個別の出版物または特許出願が具体的にかつ個別に参照により組み込まれることを示すのと同程度に参照により組み込まれる。組み込まれた参照における用語の定義または使用が本明細書中に提供される用語の定義と矛盾する或いは反する場合、本明細書中に提供される用語の定義が適用され、参照中の用語の定義は適用されない。

【0005】

疾患組織からのゲノミクスまたはプロテオミクスの洞察に基づくパーソナライズド医薬は、がん療法において次第に前途有望なツールになってきた。しかしながら比較的少ない量の疾患組織から得られ得る情報の著しい量にもかかわらず、治療は、典型的には、よく特性評価された標的を有する、比較的少ない数の実験的または承認された薬に限定される。例えば、HER2の変異体を標的とする抗体(トラスツズマブ)を用いた乳がんの治療は、腫瘍がHER2タンパク質を過剰発現する場合、結果を改善することができる。同じように、がん増殖は、キナーゼを含む経路により推進される場合、治療は、かかるキナーゼ(例えば、アファチニブ、エルロチニブなどを用いたEGFRの阻害、またはボスチニブ、イマチニブなどを用いたBcr-Ablの阻害)を標的とするキナーゼ阻害剤を用い効果的であり得る。しかしながら、がんは、多くの場合において、特定の薬物に対する抵抗を発達させるであろうし、増殖はしばしば再開する。

30

【0006】

その代わりに或いはさらに、がん治療は、1つまたは複数の免疫システムの構成要素を用いた、異常な細胞の根絶を補助する免疫療法を含み得る。例えば、免疫療法は、免疫応答を刺激するサイトカインおよび/または免疫チェックポイント阻害剤を包含し得るが、他の例においては、細胞または変更された細胞が治療剤として採用される。さらに他の例において、がんワクチンは、特定の疾患において少なくとも部分的に効果的であることが報告されている。多くの場合、患者の免疫システムに提示されるおよび/または利用可能な特定のエピトープ並びに患者の免疫システムの健康(それは、しばしば、事前の化学療法治療によりすでに損なわれている)にその有効性が依存するため、残念なことに、免疫ベースのがん療法は、しばしば全く予測不可能である。さらに多くの腫瘍は、強い免疫回避を示し、免疫療法は、かかるメカニズムの主要因であるはずであるが、それは一般によく理解されていない。

40

50

【0007】

ある者は患者 - 特異的ネオエピトープを同定し、免疫療法にそれらを用いることにより当該問題を解決しようと試みた。例えば、WO2016/172722は、がんネオエピトープおよびネオエピトープを用いて免疫療法のための合成抗体を生み出す方法を開示する。別の例において、US2016/0326597は、いくつかのネオエピトープが、特定のMHC複合体に対し他より強い結合親和性を有する場合の、患者のがん試料におけるネオエピトープの使用を開示する。より強い結合親和性を有するネオエピトープを同定することにより、それらのネオエピトープが、免疫チェックポイントモジュレーターを投与することによる治療に应答しやすい個人を同定するために使用され得る。別の者は、抗原を発現する細胞に向けられたT細胞を刺激する、予備刺激するおよび/または増殖させるための、個人の腫瘍抗原の発現パターンを標的とする(例えば、WO2014/082729を参照のこと)患者特異的腫瘍治療を開発することを試みた。

10

【0008】

さらに他の者は、がん治療、特に免疫療法に対する、個別の患者の感受性を決定することにより、矛盾する免疫应答の課題を解決することを試みた。例えば、WO2011/131246は、ストレス应答マーカ-またはマクロオートファジー应答マーカ-の発現を評価することにより、がん治療に対する腫瘍の感受性を決定するための*ex vivo*方法を開示する。

【0009】

しかしながら、それらのいずれも、ネオエピトープおよび他のマーカ-のがん細胞上の発現が、がん細胞に与えられたストレス状態に依って変化するかもしれず、そのようにしてそれらの患者間でのばらつきを認識できないとは考えなかった。従って、たとえ当該分野で知られている、がんに対する治療の多くの選択肢があっても、それらの全てまたはほぼ全ては、不利益に悩まされていた。その結果としてがん療法のシステムおよび方法の改善のニーズが残されている。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の主題は、特定の治療を介し腫瘍の免疫原性を増加させる、およびかかる治療を単独でまたは免疫刺激と組み合わせて使用して腫瘍を根絶し、腫瘍に対する免疫記憶を形成する、さまざまなシステム、組成物および方法を対象とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の主題の一態様において、本発明者らは、患者のための治療の選択肢を同定する方法を考える。*ex vivo*で患者の複数の腫瘍生検試料を、それぞれのかつ異なる複数のストレス状態に曝露して、それぞれの事前に処理した腫瘍細胞を生み出す工程を含む。別の工程において、事前に処理した腫瘍細胞は、その後、複数の免疫コンピテント細胞と接触し、事前に処理した腫瘍細胞に対する免疫コンピテント細胞の应答が定量される。また別の工程において、应答が、事前に決定された閾値を満たす又は超える場合に、該ストレス状態は、治療の選択肢として選択される。

40

【0012】

他の可能性の中で、適したストレス状態は、低用量化学療法(例えば、メトロノームのような低用量)、低線量照射への曝露、熱ショック治療、低酸素症、酸素過剰症、慢性炎症状態への曝露、活性酸素種への曝露、ネイティブなまたは変更された免疫T細胞またはNK細胞への曝露、抗体への曝露および/または環境ストレス状態(例えば、DNA損傷剤、HSP90阻害剤、GSK3阻害剤、ウイルス感染)を含む。

【0013】

ストレス状態は、NKGD2リガンドの(ストレス状態への曝露をしていない同じ細胞と比較した)過剰発現、チェックポイント阻害剤リガンドの発現、ネオエピトープの発現を含む、ストレスをかけられた細胞上で発現されるさまざまなマーカ-をもたらすかもし

50

れず、または、シグナル経路（例えば、アポトーシス経路、細胞分裂経路）などの活性化または不活性化をもたらすかもしれない。

【0014】

さらに、複数の生検試料は、免疫刺激剤に曝露されてもよいと考えられ、特に、免疫刺激剤はサイトカイン（例えば、IL-15、IL-15スーパーアゴニスト、IL-2、IL-7、IL-21）、TLRリガンド（例えば、PAMPs DAMPs）および/またはチェックポイント阻害剤を含むと考えられる。

【0015】

望まれる場合、適した方法は、それに対し抗体または他の結合分子が生み出されてもよい、生検試料上の1つまたは複数のネオエピトープを決定する工程を含んでもよいことも考慮される。さらに、1つまたは複数のネオエピトープをコードする組換え核酸を含むウイルスベクターまたは組換えウイルスが、生み出されてもよく、免疫コンピテント細胞は、ウイルスベクターまたは組換えウイルスでトランスフォームされるであろうことが特に好ましい。さらに事前に処理した腫瘍細胞を免疫コンピテント細胞に接触させた後の、事前に処理した腫瘍細胞について、1つまたは複数のさらなるネオエピトープが、決定されてもよい。最も典型的には、免疫コンピテント細胞は、T細胞および/またはNK細胞（および特にNK92細胞、またはaNK細胞、haNK細胞もしくはtaNK細胞などの遺伝学的に操作されたNK細胞）である。

10

【0016】

免疫コンピテント細胞の応答を定量する工程に関し、顕微鏡アッセイ、発光アッセイ、蛍光アッセイ、および放射線学的アッセイの1つまたは複数が、特に考えられる。従って、事前に決定された閾値は、事前に処理した腫瘍細胞の、事前に決定された溶解またはアポトーシスの割合であるかもしれないが、しかし、また比色分析または蛍光分析シグナルであるかもしれない。

20

【0017】

本発明の主題のさまざまな目的、特徴、態様および利点は、以下の好ましい実施形態の詳細な説明と、それにおいて同じ数字は同じ構成要素を表す添付図面を併せてより明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、例となる、さまざまなストレス状態を用いて、がん細胞の免疫原性を詮索することにより、患者のための治療を同定する方法を説明する。

30

【発明を実施するための形態】

【0019】

詳細な説明

本発明の主題は、特に特定の治療を介して腫瘍の免疫原性を増加させる状態の同定により、患者のための治療の選択肢を同定するシステムおよび方法、ならびにかかる治療を単独でまたは免疫刺激と合わせて用いるシステムおよび方法を提供する。

【0020】

本発明の主題は、さまざまな変更および代替的实施形態が可能であるが、それらの特定の説明された実施形態は、図面において示され、以下に詳細に説明されるであろう。しかしながら、本発明を特定の開示された形態に限定する意図はないことが理解されるべきであり、しかし、それどころか、本発明は、特許請求の範囲に含まれる、すべての変更、代替的实施形態および均等物を対象とするものである。以下の議論は、本発明の主題の多くの例を提供する。それぞれの実施形態は、発明の要素の単一の組み合わせを表すが、本発明の主題は、開示された要素のすべての可能な組み合わせを含むことが考慮される。従って、一実施形態が、要素A、BおよびCを含み、第二の実施形態が要素BおよびDを含む場合、そのとき、明示的に開示されていない場合であっても、本発明の主題は、A、B、CまたはDの他の残りの組み合わせを含むことが考慮される。

40

【0021】

50

本発明者は、一連の腫瘍生検を用いた *ex vivo* 治療において、患者における腫瘍が、事前に同定された介入を用いて、腫瘍をより免疫原性であると表すことにより、より効果的に治療され得ることを発見した。本明細書で使用する場合、用語「免疫原性」は、免疫応答を生み出すもしくは容易にする、または、*in vitro*、*ex vivo*、または *in vivo* で「免疫原性」細胞と接触する免疫細胞の活性化を導く、細胞の特性を意味する。従って、本発明の主題の一態様において、本発明者は、腫瘍またはがん細胞を誘導してより免疫原性にする事により、患者のための治療の選択肢を同定する方法を考える。図1は、一例となる考えられる方法の説明を示す。ここで、一工程は、患者の腫瘍からの複数の生検試料を、それぞれのかつ異なる複数のストレス状態に *ex vivo* で曝露することを含む。

10

【0022】

好ましい実施形態において、患者の腫瘍生検からの生組織は、それぞれの試料が異なるタイプ/状態のストレス状態に曝露され得るように、複数の試料に分けられる。例えば、腫瘍生検は、小細胞肺癌と診断された患者から採取され、生検は、複数の試料（例えば、少なくとも2、少なくとも4、少なくとも10、少なくとも20または少なくとも50など）に分けられる。当然ながら、生検は固形腫瘍に限定される必要がなく、しかし循環腫瘍細胞および血液感染性がん（例えば、さまざまなCML、AML、ALLなどのリンパ腫）も、本明細書において使用に適していると明示的に扱われることが理解されるべきである。

20

【0023】

本明細書で使用する場合、異なるストレス状態は、腫瘍細胞において独立にかつ分離して（例えば、異なる時点に行われる処理により、異なる化学物質を用いた処理によりなど）誘導され得るストレス状態である。例えば、いくつかの実施形態において、ストレス状態は、ストレスの単一の原因により（例えば、熱のみ、単一の化学物質のみなど）誘導され得る。他の実施形態において、ストレス状態は、ストレスの複数の原因により誘導され得る。例えば、ストレス状態は、Aの原因となる一のストレスおよびBの原因となる別のストレスの同時の処理により誘導され得る。別の例として、ストレス状態は、Aの原因となる一のストレスおよびBの原因となる別のストレスの連続した処理により誘導され得る。また、Aの原因となる一のストレスの複数回の処理（例えば、1分の時間間隔を伴う3回の1分間の熱ショック）、およびAの原因となる一のストレスの単回の処理（例えば、1分または3分間の単回の熱ショック）は、二つの異なる区別可能なストレス状態であるとも考えられる。

30

【0024】

さらなる考えられる例において、ストレス状態は、メトロノームのような低用量化学療法を含み得る。最も典型的には、低用量治療は、LD₅₀またはIC₅₀が70%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下または5%以下での化学治療剤についての曝露であるだろう。さらに、有利な場合、かかる低用量レジメンは、例えば、US 7758891、US 7771751、US 7780984、US 7981445およびUS 8034375において記載される、メトロノームのような方法で行われてもよい。かかる低用量レジメンにおいて使用される特定の薬物に関し、すべての化学治療剤が適しているとみなされると考えられる。他の適した薬物の中で、キナーゼ阻害剤、受容体アゴニストおよびアンタゴニスト、代謝拮抗、細胞増殖抑制および細胞傷害性薬物はすべて本明細書中で考慮される。しかしながら、特に好ましい剤は、腫瘍の増殖または発達を推進する経路の構成要素を干渉または阻害すると同定されるものが挙げられる。かかる薬物は、例えばWO 2011/139345およびWO 2013/062505に記載されるオミックスデータについての経路分析を用いて同定され得る。

40

【0025】

いくつかの実施形態において、ストレス状態は、1つまたは複数の環境ストレス状態を含んでもよいと考えられる。例えば、生検試料からのがん細胞の一部は、放射線、好ましくは低用量放射線に曝露され得る。この例において、がん細胞は、さまざまな線量の放

50

射線を受けることができ、典型的な線量は0.01 - 0.1 Gy、0.1 - 1 Gy、1 - 10 Gy、10 - 100 Gyの範囲であるだろうし、いくつかの場合においてより高くさえあるであろう。放射線は、さまざまな線源からもたらされてよく、ガンマ放射線、アルファ粒子曝露および/またはベータ放射体が採用されてもよい。しかしながら、ガンマ放射線またはX線曝露が典型的には好ましい。最も典型的には、かつ放射線がストレス状態として採用された場合、さらなる化学治療剤は二本鎖DNA修復および相同鎖交換修復を干渉する薬物を含むであろう。

【0026】

別の例として、環境ストレス状態は、さまざまな時間幅（例えば、10秒、1分、5分、10分間など）で、がん細胞の熱（例えば、典型的には少なくとも40、少なくとも42、少なくとも45または少なくとも47）への曝露を含んでもよく、望ましい場合、環境ストレス状態（例えば、単回の曝露、1分間隔での複数回の曝露、さまざまな時間間隔での複数回の曝露など）へのそれぞれの曝露の間にさまざまな休止を伴ってもよい。

10

【0027】

さらに別の例としては、環境ストレス状態は、腫瘍低酸素症を模倣するため、酸素の欠乏を含んでもよい。ここで、少なくともがん細胞の一部は、低酸素症（例えば、15%未満、10%未満、5%未満、3%未満、1%未満 O_2 ）で、事前に決定された時間（例えば、少なくとも1時間、少なくとも24時間、少なくとも3日、少なくとも1週間、少なくとも3週間など）の間、維持され得る。同じように、酸素過剰状態は、含まれ得ると考えられる。例えば、少なくともがん細胞の一部は、酸素過剰状態（例えば、22%より多い、25%より多い、30%より多い、35%より多い O_2 ）で、一定時間（例えば、少なくとも1時間、少なくとも24時間、少なくとも3日、少なくとも1週間、少なくとも3週間など）の間、維持され得る。

20

【0028】

いくつかの実施形態において、環境ストレス状態は、生理的な量の炎症関連試薬を投与することによる模倣慢性炎症を含んでもよい。これらの実施形態において、炎症関連試薬は、腫瘍壊死因子（TNF-）、インターロイキン6（IL-6）、インターロイキン10（IL-10）、形質転換成長因子（TGF-）を含む、腫瘍発達と関連するサイトカインを含んでもよい。加えてまたはその代わりに、環境ストレス状態は、がん細胞の慢性酸化ストレスへの曝露および/またはラジカルへの曝露を含んでもよい。例えば、生検試料は、活性酸素種（ROS）源として外来の過酸化水素（ H_2O_2 ）に、低投与量で（例えば、10 μM - 20 μM 、20 μM から30 μM 、30 μM から40 μM の間など）、急性期について（例えば、12時間、24時間、48時間、7日など）、または高投与量で（例えば、100 μM - 200 μM 、200 μM から300 μM 、300 μM から400 μM の間など）慢性期について（例えば、1か月、3か月、6か月など）曝露され得る。

30

【0029】

さらに別の例において、環境ストレス状態は、がん細胞の、さまざまなDNA損傷剤（例えば、DNA挿入剤、メチル化剤、鎖切断剤、ダイマー（dimer）を誘導するためのUV照射など）、細胞の小胞体（ER）ストレス誘導性アポトーシスを誘導し得るペプチドまたは試薬（例えば、熱ショックタンパク質（HSP）90阻害剤、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3（GSK3）阻害剤、タンパク質N-グリコシル化阻害剤（例えば、ツニカマイシンなど）、タンパク質輸送遮断薬（例えば、プレフェルジンAなど）、ERへのカルシウム取り込み阻害剤（例えば、タブシガルギンなど）を含む、1つまたは複数の化学物質または状態への曝露を含んでもよい。

40

【0030】

いくつかの実施形態において、環境ストレス状態は、さまざまなタイプのがんに関連する、1つまたは複数のタイプのウイルスへの、がん細胞の曝露を含んでもよい。例えば、かかるウイルスは、ヒトパピローマウイルス（HPV）、エプスタインバーウイルス（

50

EBV)、肝炎Bウイルス(HBV)および/または肝炎Cウイルス(HCV)、ヒト免疫欠損ウイルス(HIV)、ヒトヘルペスウイルス8(HHV-8)、ヒトTリンパ球向性ウイルス-1(HTLV-1)、メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)および/またはシミアンウイルス40(SV40)を含む。容易に理解されるように、感染投与量および曝露時間は、ウイルス休止および活動、がん細胞のタイプおよび他の個別の患者の状態に依って異なり得る。

【0031】

上記に議論されたストレス状態の状態(例えば、期間、頻度、時間、用量、濃度など)は、腫瘍細胞を直接的にまたは間接的に誘導して事前に処理した腫瘍細胞を生み出すのに効果的であることが考慮される。本明細書で使用する場合、事前に処理した腫瘍細胞は、
10
ストレス状態での処理前の腫瘍細胞と異なる少なくとも1つの特徴を発現する腫瘍細胞である。例えば、いくつかの実施形態において、ストレス状態は、タンパク質発現、細胞周期および/またはアポトーシスに対する感受性に影響を与えるのに効果的である。例えば、事前に処理した腫瘍細胞は、1つまたは複数の細胞タンパク質(例えば、細胞表面受容体タンパク質、核受容体タンパク質、並びに損傷関連分子パターンと関連するタンパク質(DAMPs)、インターフェロンおよびサイトカインを含む分泌タンパク質など)、および/またはヌクレオチド(例えば、mRNA、microRNAなど)の、発現レベルが変化し得る。別の例として、事前に処理した腫瘍細胞は、その形態または環境との相互作用(例えば、細胞の形状、他の細胞または細胞外マトリクスとの接着のレベルなど)が
20
変化し得る。別の例として、事前に処理した腫瘍細胞は、細胞のタンパク質および特にシグナリングおよび細胞周期と関連するタンパク質(例えば、キナーゼ、ホスファターゼ、熱ショックタンパク質、グリコシラーゼなど)の活性が変化し得る。

【0032】

特定の理論または仮説に縛られることを望まないが、本発明者は、また、ストレス状態に曝露された生検試料由来の事前に処理した腫瘍細胞の少なくとも一部分(例えば、少なくとも20%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも60%)は、NK細胞および/またはT細胞(CD4+および/またはCD8+)活性化のトリガーをひくのに十分な量で、1つまたは複数の抗原性エピトープまたは他のシグナルを曝露するか提示するであろうことも考慮する。好ましい一実施形態において、生検試料由来の事前に
30
処理したがん細胞の少なくとも一部分(例えば、少なくとも20%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも60%)は、同じストレス状態へ曝露していない同じ生検試料由来の腫瘍細胞と比較して、特にNKGD2Dリガンド(例えば、MICA、MICB、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAET1L/ULBP6、RAET1N/ULBP3など)といったストレスマーカーの、より高い発現レベル(例えば、少なくとも20%より高い、少なくとも30%より高い、少なくとも50%より高いなど)またはより高い細胞表面発現レベルを示す。同じように、生検試料由来の事前に処理したがん細胞の少なくとも一部分は、ストレス状態に応答して1つまたは複数のネオエピトープも発現し得るか
40
および/またはその表面上に存在し得る。

【0033】

ストレス状態の特定のタイプに関わらず、一般に、ストレス状態およびがん細胞へのストレス状態を提供する状態は、即時の細胞死を避けるように選択されると考えられる。好ましい実施形態において、ストレス状態を提供する、最適なまたは望ましい状態は、事前に決定された閾値に基づいて決定され得る。例えば、事前に決定された閾値は、事前に処理した腫瘍細胞の、事前に決定された溶解またはアポトーシスの割合であってもよい。従って、状態は、組織におけるすべての細胞の典型的には50%未満、より典型的には30%未満、さらにより典型的には10%未満および最も典型的には5%未満の殺細胞効果を有するように調節される。従って、事前に処理した腫瘍細胞は、治療後に生存可能であろうし(しかし低下した増殖率を有するかもしれない)、もっとも好ましくは、実質的に変化した遺伝子発現プロファイル(それは続くオミックス分析において確立されてもよく、
50

特にトランスクリプトミクスおよび/またはプロテオミクス分析を介してもよい)を示す。ストレス状態および重症度の特定のタイプに応じて、数秒から数日を超える事前処理が行われてもよい。適切である場合、免疫コンピテント細胞と接触させる前に、事前に処理した細胞を数時間から数日間回復させることができる。

【0034】

特に好ましい実施形態において、事前に処理したがん細胞は、その後、免疫コンピテント細胞に曝露または接触させる。本明細書で使用する場合、用語「免疫コンピテント細胞」は、免疫応答の生成、増殖または維持と関連する任意の細胞を含み、そのため特に自然免疫および/または適応免疫に寄与する細胞を含む。従って、特に免疫コンピテント細胞は、特に樹状細胞、T細胞、NK細胞などといった抗原提示細胞を含むことが考慮される。特に好ましい態様において、免疫コンピテント細胞は、NK92細胞、構成的に活性であるかもしくはネオエピトープに対する特異性を有するよう変更されたアロジェニックNK92細胞、または遺伝学的に操作されたNK細胞(例えば、aNK細胞、h aNK細胞またはt aNK細胞)を含む。或いは、免疫コンピテント細胞は、患者に対しナイーブであり得るか、アロジェニックであり得るCD4+および/またはCD8+T細胞(任意選択で構成的に活性であるかもしくは、キメラT細胞/抗原受容体を介するなどのネオエピトープに対する特異性を有するように変更された)もまた含む。さらなる実施形態において、免疫コンピテント細胞は、特に当該生検が得られた患者からの免疫コンピテント細胞といった、細胞の混合物であってもよい。例えば、かかる混合物は、未精製であってもよく、(例えば、全血)、部分的に精製されていてもよく(例えば、軟膜)または単離された細胞タイプ(例えば、樹状細胞またはマクロファージまたはT細胞)であってもよい。

【0035】

典型的には、用いられる免疫コンピテント細胞がNK細胞である場合、処理された腫瘍細胞のNK細胞に対する割合は、10,000:1から1:10,000の間であり、より典型的には1,000:1から1:1,000の間であり、最も典型的には10:1から1:10の間である。本明細書中での使用に適した多くのNK細胞が存在するが、特に、NK細胞はNantkwest, Inc. (9920 Jefferson Blvd., Culver City, CA 90232; <http://nantkwest.com/platform/>を参照のこと)により記載されるような、aNK細胞、h aNK細胞およびt aNK細胞を含むことが考慮される。細胞がエピトープに対する親和性を有するよう遺伝学的に変更された場合、かかるエピトープは強い免疫応答を引き出しやすいネオエピトープ(すなわち、HLAマッチした患者および腫瘍特異的なネオエピトープ)であることが特に好ましい。

【0036】

さらに考えられる態様において、ストレス状態を受けている生検試料からの少なくともいくつかのがん細胞は、免疫コンピテント細胞の応答を効果的に活性化または増加させ得ることは留意されるべきであろう。いくつかの実施形態において、免疫コンピテント細胞および/またはストレスを受けた細胞の応答を免疫毒性試験により評価することができる。例えば、免疫コンピテント細胞がNK細胞である場合、NK細胞の殺効果は、顕微鏡アッセイ(例えば、形状の欠失の変形を検出するために)、発光アッセイ(例えば、発光剤の漏れを検出するために)、蛍光アッセイ(例えば、溶解剤の輸送または配達を検出するために)、または放射線学的アッセイ(例えば、アイソトープの漏れを検出するために)を用いて評価してもよい。異なる視点から見ると、NKまたは他の免疫コンピテント細胞による殺効果は、そのように事前に処理した腫瘍細胞の免疫原性の尺度であり得る。同じように、予想される増加した免疫原性は、腫瘍細胞の物理的パラメータ(例えば、サイズ、密度における増加または減少、形状もしくは基質への接着の変化)の変化によっても証明され得る。免疫コンピテント細胞の殺効果を検出する、任意の適した方法は、考慮される。例えば、そのように処理された細胞の免疫原性を、(51)Cr放出アッセイによる標的腫瘍細胞に対する細胞溶解活性を決定することにより決定してもよく、あるいは、フローサイトメトリー(例えば、Methods Mol Biol. 2010; 598:

10

20

30

40

50

207-19; Scand J Immunol. 2012 Apr; 75(4): 455-62; または Acea Biosciences Inc による xCELLigence システムを参照のこと) を用いてパーフォリン、グランザイムおよびグラニュライシンの細胞内のレベルを決定することにより決定してもよい。

【0037】

他の実施形態において、免疫コンピテント細胞の応答は、細胞表面受容体タンパク質の相対的発現レベルを含む。例えば、NK細胞活性化は、阻害性(例えば、キラー細胞イムノグロブリン様受容体(KIR)、LIR(白血球阻害性受容体)、Ly49の阻害性アイソフォーム)ならびに活性化受容体(NCR(天然細胞傷害性受容体)、CD94: NKG2ヘテロダイマー、CD16(Fc IIA)、Ly49の活性化アイソフォームなど)刺激のバランスにより決定される。従って、これらの実施形態において、タンパク質の差分および相対的発現は、たとえばFACSアッセイ、顕微鏡アッセイ、発光アッセイ、蛍光アッセイ、放射線学的アッセイ、ウエスタンブロットなどといった、タンパク質発現および/または局在を検出する、任意の適した方法により定量され得る。

10

【0038】

免疫コンピテント細胞のより強い応答(例えば、より高いサイトカインおよび/またはケモカインの放出、いくつかの細胞表面受容体タンパク質より高い発現レベル、より強い細胞溶解活性など)は、事前に処理したがん細胞のより高い免疫原性を反映しやすいと考えられる。いくつかの実施形態において、免疫コンピテント細胞応答の定量は、統計学的に評価され、他のストレス状態と比較して、どのストレス状態がより効果的に応答を誘導するかを決定することができる。より効果的なストレス状態が免疫細胞応答を引き出すのに使用される場合、かかる免疫コンピテント細胞が、患者が当該免疫コンピテント細胞で治療された場合に、*in vivo*でがん細胞に対する免疫応答をより効率よくかつより効果的に引き出しやすい。従って、それらのアッセイにおける、免疫細胞(例えば、NK細胞など)応答は、おそらく治療成功の予測指標として、使用され得ると理解されるべきである。

20

【0039】

がん細胞に対して提供される全てのストレス状態が、おそらくがん細胞を接触させる免疫コンピテント細胞に対して、同じ免疫応答を引き出すわけではないこともまた考慮される。言い換えれば、がん細胞の免疫原性は、ストレス状態に依って異なるかもしれない。いくつかのストレス状態の有効性は、がんのタイプに依って異なるかもしれない。例えば、ストレス状態Aは、非小細胞肺がんのがん細胞の免疫原性を誘導するのに効果的であり得るが、大細胞神経内分泌腫瘍のがん細胞の免疫原性を誘導するには効果的ではないかもしれない。いくつかのストレス状態の有効性は、同じタイプのがんに罹患する患者間でさえ異なるかもしれない。他の例としては、ストレス状態Aは、患者Xの乳がんのがん細胞の免疫原性を誘導するのに効果的であり得るが、ストレス状態Bは、患者Yの乳がんのがん細胞の免疫原性を誘導するのに効果的でないかもしれない。従って、効果的な治療方法を同定するのに使用され得るこの方法は、患者特異的腫瘍に対する患者の特定の免疫システムの応答を最大にするであろうパーソナライズド免疫療法についてのプラットフォームを提供することが理解されるべきである。

30

40

【0040】

ストレス状態を提供することは、ストレス状態に曝露されたがん細胞の免疫原性を引き出すのに効果的であるかもしれないが、ストレス状態と同時の免疫刺激剤の同時治療または同時投与は、さらになん細胞の免疫原性を増強し得ると考えられる。がん細胞の免疫原性を増加または調節し得る、任意の適したタイプの免疫刺激剤が考慮される。例えば、免疫刺激剤は、刺激性サイトカイン(例えば、インターロイキン(IL)-15、IL-15スーパーアゴニスト、IL-2、IL-7、IL-21など)および1つまたは複数のToll様受容体(TLR)リガンド(例えば、フィブリノゲン、ヘパラン硫酸断片、ヒアルロン酸断片、HSP70など)を含んでもよい。いくつかの実施形態において、免疫刺激剤は、がん細胞への免疫システム攻撃を促進する1つまたは複数のチェックポイント

50

阻害剤（例えば、イピリムマブ（Yervoy（登録商標））、ペンブロリズマブ（Keytruda（登録商標））、およびニボルマブ（Opdivo（登録商標）））もまた含んでもよい。

【0041】

いくつかの実施形態において、2又は複数の異なる免疫刺激剤は、ストレス状態を伴い提供され得る。これらの実施形態において、2又は複数の異なる免疫刺激剤間の割合は、がんのタイプおよびステージならびに患者の特性（例えば、年齢、性別、健康状態など）、ストレス状態のタイプ、および免疫刺激剤の同時治療のタイミングに依って異なり得る。例えば、免疫刺激剤は、ストレス状態と同時に、ストレス状態の処理の後、（例えば、ストレス状態の完了1分後、1時間後、1日後など）に処理され得る。またさらなる実施形態において、免疫刺激剤は、生検がストレス状態を受ける前（例えば、ストレス状態の開始1分前、1時間前、1日前など）に投与され得る。

10

【0042】

がん細胞の免疫原性は、がん細胞における少なくともいくつかのネオエピトープの発現と強く関連しあうかもしれないことが考慮される。従って、ネオエピトープは、その後処理された生検細胞を標的とするのに使用される抗体を生み出すのに使用され得るし、および/またはそれは複数のネオエピトープの少なくとも1つをコードする組換え核酸を含むウイルスベクターを生み出すのに使用してもよい（生検試料または事前に処理した細胞は、その後ウイルスベクターに曝露されてもよい）。

20

【0043】

従って、最も効果的な療法を同定する腫瘍生検の *ex vivo* 治療はまた、腫瘍細胞に存在するネオエピトープの同定を増補してもよい。ネオエピトープは、独自の腫瘍特異的抗原を生成するランダム変異を腫瘍細胞において発現するとして特徴付けられ得る。従って、異なる観点からみると、ネオエピトープは、変異のタイプ（例えば、欠失、挿入、トランスページョン、トランジション、トランスロケーション）および変異の影響（例えば、ナンセンス、ミスセンス、フレームシフトなど）を考慮することにより同定してもよく、それは、それ自体を介してサイレントであり、他の無関係な（例えば、発現されない）変異が除去されている第一のコンテンツフィルターとして機能するかもしれない。ネオエピトープ配列は、比較的短い長さ（例えば、7 - 11マー）を有する配列ストレッチであって、かかるストレッチはアミノ酸配列における変化を含むであろうとして定義され得ることはさらに理解されるべきである。最も典型的には、変化したアミノ酸は、中央のアミノ酸位置でまたはその近くにあるだろう。例えば、典型的なネオエピトープは、 $A_4 - N - A_4$ または $A_3 - N - A_5$ または $A_2 - N - A_7$ または $A_5 - N - A_3$ または $A_7 - N - A_2$ の構造であって、Aは、タンパク質原性アミノ酸であり、Nは変化したアミノ酸（野生型と比較してまたはマッチした健常人と比較して）であるものを有してもよい。例えば、本明細書中で考慮されるネオエピトープ配列は、比較的短い長さ（例えば、5 - 30マー、より典型的には7 - 11マー、または12 - 25マー）を有する配列ストレッチであって、かかるストレッチはアミノ酸配列における変化を含むものを含む。

30

【0044】

従って、変化したアミノ酸の位置に依り、変化されたアミノ酸を含む多くのネオエピトープ配列において、単一のアミノ酸変化が存在し得ることは理解されるべきである。有利には、かかる配列のばらつきは、ネオエピトープの複数回の選択を可能とし、潜在的に有用な標的を増加させる。その後、1つまたは複数の望ましい特性（例えば、患者HLA型への最も高い親和性、最も高い構造的安定性など）に基づいて選択され得る。最も典型的には、ネオエピトープは、変化したアミノ酸を、好ましくは中央に位置、あるいは主要組織適合遺伝子複合体（MHC）へのその結合を改善するような位置に有する、2 - 50アミノ酸の間の長さ、より典型的には5 - 30アミノ酸の間、最も典型的には9 - 15アミノ酸の間の長さを有するように計算されるであろう。例えば、エピトープがMHC - I複合体により提示されるものである場合、典型的なネオエピトープ長は、約8 - 11アミノ酸であろうし、MHC - II複合体を介した提示のための典型的なネオエピトープ長は、約

40

50

13 - 17 アミノ酸の長さを有するであろう。容易に理解されるように、ネオエピトープにおける変化したアミノ酸の位置は、中央以外であってもよいため、ネオエピトープの実際のペプチド配列およびその実際のトポロジーは、かなり異なる可能性がある。

【0045】

好ましくは、ネオエピトープは、がん細胞が1つまたは複数のストレス状態に曝露された時に、*de novo* 発現または増強された発現を示す。従って、発現するまたは増強された発現を示すネオエピトープの同定は、核酸シーケンシング、特にDNA上を操作するNGS方法（例えば、Illuminaシーケンシング、ion torrentシーケンシング、ピロシーケンシング、ナノポアシーケンシングなど）、RNAシーケンシング（例えば、RNAseq、逆転写ベースのシーケンシングなど）ならびにタンパク質シーケンシングまたは質量分析ベースのシーケンシング（例えば、SRM、MRM、CRMなど）を含む、さまざまなオミクス分析により同定され得る。DNAシーケンシング、RNAシーケンシング、タンパク質シーケンシングおよびそれらのシーケンシング結果のコンピューター分析のさらに詳細な方法は、国際特許出願番号PCT/US16/65412において詳細に記載され、それは、その全体において本明細書中に組み込まれる。

10

【0046】

効果的ストレス状態への曝露後に、増強された免疫原性を示す多くのがん細胞は、ネオエピトープの異なる発現を示してもよいことが考慮される。例えば、がん細胞は、効果的なストレス状態への曝露後に、異なるタイプのネオエピトープを発現してもよい。他の例としては、がん細胞は、複数のネオエピトープを異なる割合で発現してもよい。さらに別の例としては、がん細胞は、複数のネオエピトープを発現してもよく、かかる複数のネオエピトープは、異なる半減期または細胞表面安定性（例えば、細胞表面の輸送のため、エンドサイトーシスのためなど）を示してもよい。従って、またさらに適した方法は、ストレス状態および/または免疫刺激剤への曝露前の生検試料についてネオエピトープのタイプおよび/または発現を決定する工程、ならびに事前に処理した腫瘍細胞を複数の免疫コンピテント細胞と接触させる工程後の事前に処理した腫瘍細胞についてネオエピトープのタイプおよび/または発現を決定する工程をさらに含むであろうことが考慮される。

20

【0047】

さらに、またいくつかのネオエピトープは、患者のがん細胞および非がん細胞間で共通するとも考えられる。この状況において、それらのエピトープを標的とする治療方法は、望ましくないであろう自己免疫症状を誘導し得る。従って、方法は、好ましくはがん細胞における生検試料についてネオエピトープのタイプ/発現を決定する工程および同じ患者の非がん細胞についてネオエピトープのタイプ/発現を決定する工程、（または同じ生検試料からの）ならびに、それらのエピトープ発現を比較する工程を含む。例えば、患者の腫瘍生検の一部およびマッチした正常試料（同じ患者の非腫瘍試料、例えば、末梢血単核細胞（PBMC）試料）もまた、オミックス分析に付す。特に好ましい態様において、オミックス分析は、全ゲノムシーケンシング、エクソームシーケンシング、RNAシーケンシング（好ましくは転写レベル決定を伴う定量的）および/またはプロテオミクス分析（核酸からの予測、より好ましくは組織切片またはホルマリン固定したパラフィン包埋（FFPE）試料からの分析的）を含む。

30

40

【0048】

そのように得られたオミックス分析は、その後、腫瘍ネオエピトープを同定するのに用いられ、それらは、さらに転写レベル（すなわち、転写されるかどうか、およびどの程度されるか）および患者のHLAタイプとのHLAマッチについて分析される。同定およびネオエピトープの使用のための適した方法は、2016年10月12日に提出された同時係属中の我々のUS出願番号15/292021および2016年10月12日に提出された15/292021において開示されており、オミックスデータに基づくHLA予測は、2016年8月25日に提出された、同時係属中の我々の国際特許出願PCT/US16/48768において記載されている。ネオエピトープは、その後、2016年12

50

月7日に提出された同時係属の国際特許出願PCT/US16/65412において記載されるように、治療のためのがんワクチンにおいて用いることができる。これらすべての参照は、本明細書においてその全体が組み込まれる。

【0049】

1つまたは複数のネオエピトープが一度がん細胞の免疫原性に寄与しやすいまたは原因となりやすいと同定されると、それらのネオエピトープは、当該がん細胞において過剰発現され、がん細胞の免疫原性がさらに増補され得ることもまた考慮される。例えば、ネオエピトープAが、1つまたは複数のストレス状態を提供する際に、がん細胞において、特異的にかつ高く上方制御され/発現される。この状況において、ネオエピトープAの全体または断片は、ウイルスベクターまたは哺乳動物のトランスフェクションのためのベクター（例えば、蛍光または抗生物質抵抗などのマーカーを有する）にクローニングされ得るし、免疫応答を生み出すのを補助するために、免疫コンピテント細胞、および特に樹状細胞へ配達され得る。さらに、またはその代わりに、経路分析が1つまたは複数の代替のネオエピトープAの過剰発現を導くであろう非ストレス状態を同定するために行われ得る。他の適した経路分析ツールの中で、PARADIGMは、特に好ましい（例えば、WO2011/139345またはWO2013/062505を参照のこと）。

10

【0050】

さらに、同定されるネオエピトープの少なくともいくつかは、それらのネオエピトープに対する1つまたは複数の抗体（例えば、モノクローナル、ポリクローナル）を生み出すのにも使用され得る。その後、処理された細胞は、さらに、それらのネオエピトープに対する抗体に曝露されてもよい。他の利点の中で、かかる抗体の添加は、組織生検（および患者）においてADCCを増加するのに効果的であるであろうことが考慮される。

20

【0051】

腫瘍細胞の増強された免疫原性は、免疫細胞応答を増強するのに有益であり得るが、免疫原性は、非腫瘍細胞に著しい影響を与えるべきではない。従って、免疫原性を最適にする腫瘍細胞の最も良い適した処理に関して、対照を超える、かつより典型的には対照を少なくとも20%または少なくとも40%または少なくとも60%を超える、任意の治療が適していることが考慮される。最も好ましくは、かかる処理はまた、組織において非腫瘍細胞に対するより低い細胞傷害性であり、当業者は、免疫原性を最大にし、細胞傷害性を最小にする、最適な治療を容易に決定することができるであろう。例えば、免疫原性に適した結果は、事前に処理した腫瘍細胞の溶解またはアポトーシスを含み、非腫瘍細胞の溶解またはアポトーシスを欠く。

30

【0052】

一度適した処理が同定されると、患者は、急性（かつ好ましくは耐久性のある）免疫応答を生み出す可能性を増加させるような剤およびプロトコルを用いて治療され得る。さらに患者の治療は、上記議論されたネオエピトープ（および任意選択で共刺激分子およびチェックポイント阻害剤を含む他の分子）をコードする遺伝子を含む組換え核酸を配達するであろう免疫療法的ウイルス組成物を用いてさらに増補してもよいことは理解されるべきである。免疫応答をさらに増加させるために、治療戦略を調節又は変更して免疫原性を増加させるために、本明細書中に記載される基本原則に従い、次の腫瘍生検を採取してもよい。この文脈において、さらなるオミックス情報は、治療上効果的な免疫応答を引き出すのに重要である（ネオ）エピトープへの洞察を提供するかもしれないことは理解されるべきである。実際に、本発明者は、複数回のかかる処理の同定および処理は、腫瘍エピトープおよびネオエピトープに対する有利に「より広いネットを投じる」かもしれないエピトープブレッドまたは抗原カスケードを導くであろうことを考慮する。最後に、チェックポイント阻害剤が用いられる場合に、かかる阻害剤は、制御できない（自己）免疫応答についての可能性のある問題を減少させるために、局所的に腫瘍に投与されるかもしれないことが考慮される。

40

【0053】

いくつかの実施形態において、本発明の特定の実施形態を記載するおよび請求するため

50

に使用される量または範囲を表す数字は、いくつかの場合においては「約」という用語によって修飾されるものとして理解されるべきである。従って、いくつかの実施形態において、明細書および添付の特許請求の範囲において記載された数値パラメータは、特定の実施形態により得られることが求められる所望の特性に応じて異なり得る近似値である。いくつかの実施形態において、数値パラメータは、報告された有効数字の数に照らしかつ通常の丸め技法を適用することにより解釈されるべきである。本発明のいくつかの実施形態の広い範囲を示す数値範囲およびパラメータは近似値であるにもかかわらず、特定の例において表された数値は、実施可能な限り正確に報告される。本発明のいくつかの実施形態において提示される数値は、それぞれの試験測定値に見られる標準偏差から必然的に生じる特定の誤差を含んでもよい。文脈が反対に指示しない限り、本明細書に記載された全ての範囲は、それらの端点を含むものとして解釈されるべきであり、オープンエンド範囲は、商業的に実用的な値のみを含むと解釈されるべきである。同様に、文脈が反対に指示しない限り、値のすべてのリストは中間値を含むものとして考慮されるべきである。

10

【0054】

本明細書の記載および以下の特許請求の範囲を通して使用される場合、「a」、「an」および「the」の意味は、文脈が他に明確に示さない限り、複数の言及を含む。また、本明細書の記載において使用される場合、「in」の意味は、文脈が他に明確に示さない限り、「in」および「on」を含む。

【0055】

本明細書中に記載される全ての方法は、本明細書中で他に示されない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施され得る。本明細書中の特定の実施形態に関して提供される任意のおよびすべての実施例、または例示的な用語（例えば、「など」）の使用は、単に本発明をより良く説明することを意図しており、他に主張しない限り、本発明の範囲の限定をもたらさない。本明細書中のいかなる用語も、本発明を実施するのに必須である、任意の請求されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。

20

【0056】

本明細書中で開示された本発明の代替的要素または実施形態のグループ分けは、限定として解釈されるべきではない。各グループメンバーは、個別に、または本明細書中に見出されるグループの他のメンバーもしくは他の要素との任意の組み合わせで参照および要求することができる。利便性および/または特許性の理由から、1つまたは複数のグループのメンバーをグループに含めることができ、またはグループから削除することができる。かかる包含または削除が生じる場合、明細書は、本明細書中、変更されたグループを含むとみなされ、従って、添付の特許請求の範囲で使用されるすべてのマーカッシュグループの記述を満たす。

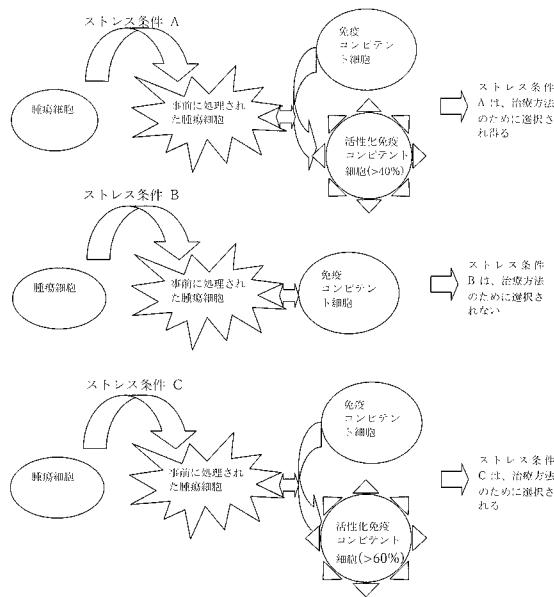
30

【0057】

本明細書中の発明概念から逸脱することなく、既に説明した以外の多くの変更が可能であることは、当業者には明らかである。従って、本発明の主題は、添付の特許請求の範囲を除いて限定されるものではない。さらに、明細書および特許請求の範囲の両方を解釈するにあたり、すべての用語は、文脈と一致する最も広い可能な方法で解釈されるべきである。特に、用語「含む (comprises)」および「含む (comprising)」は、要素、構成要素または工程を非排他的な方法で参照するものと解釈され、言及された要素、構成要素または工程は、存在してもよく、利用されてもよく、または明示的に言及されていない他の要素、構成要素または工程に組み合わせてもよい。

40

【 図 1 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成30年10月11日 (2018.10.11)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

患者の腫瘍からの複数の生検試料をそれぞれのかつ異なる複数のストレス状態に *in vivo* で曝露してそれぞれの事前に処理した腫瘍細胞を生み出すこと；

事前に処理した腫瘍細胞を複数の免疫コンピテント細胞と接触させること、および事前に処理した腫瘍細胞に対する免疫コンピテント細胞の応答を定量すること；および

応答が事前に決定された閾値を満たす又は超える場合に治療の選択肢として、ストレス状態を選択すること

を含む、患者のための治療の選択肢を同定する方法。

【 請求項 2 】

ストレス状態は、低用量化学療法、低線量照射への曝露、熱ショック治療、低酸素症、酸素過剰症、慢性炎症状態への曝露、活性酸素種への曝露、ネイティブな又は変更された免疫 T 又は NK 細胞への曝露、抗体への曝露および環境ストレス状態からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【 請求項 3 】

低用量化学療法は、メトロノーム低用量化学療法を含む、請求項 2 に記載の方法。

【 請求項 4 】

環境ストレス状態は、DNA 損傷剤、HSP 90 阻害剤、GSK 3 阻害剤、およびウ

イルス感染からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

事前に処理した腫瘍細胞は、ストレス状態への曝露をしていない同じ細胞と比較して、NKGD2リガンドを過剰発現する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

複数の生検試料を免疫刺激剤に曝露する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

免疫刺激剤は、サイトカインである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

サイトカインは、IL - 15、IL - 15 スーパーアゴニスト、IL - 2、IL - 7 および IL - 21 からなる群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

免疫刺激剤は、TLRリガンドである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

免疫刺激剤は、チェックポイント阻害剤である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

生検試料について、複数のネオエピトープを決定する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

複数のネオエピトープの少なくとも 1 つに対する抗体を生み出す工程をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

複数のネオエピトープの少なくとも 1 つをコードする組換え核酸を含むウイルスベクターを生み出す工程をさらに含み、任意選択でウイルスベクターを有する免疫コンピテント細胞を接触させる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

事前に処理した腫瘍細胞を複数の免疫コンピテント細胞と接触させる工程の後、事前に処理した腫瘍細胞について、第二の複数のネオエピトープを決定する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

免疫コンピテント細胞は、NK細胞である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

NK細胞は、NK92細胞、またはaNK細胞、h aNK細胞およびt aNK細胞からなる群より選択される遺伝学的に操作されたNK細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

免疫コンピテント細胞の応答を定量する工程は、顕微鏡アッセイ、発光アッセイ、蛍光アッセイまたは放射線学的アッセイを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

事前に決定された閾値は、事前に処理した腫瘍細胞の溶解またはアポトーシスの、事前に決定された割合である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

複数の生検試料を免疫刺激剤に曝露する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

免疫刺激剤はサイトカインである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

サイトカインは、IL - 15、IL - 15 スーパーアゴニスト、IL - 2、IL - 7

および I L - 2 1 からなる群より選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

免疫刺激剤は、T L R リガンドである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

免疫刺激剤は、チェックポイント阻害剤である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 4】

生検試料について、複数のネオエピトープを決定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

複数のネオエピトープの少なくとも 1 つに対する抗体を生み出す工程をさらに含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

複数のネオエピトープの少なくとも 1 つをコードする組換え核酸を含むウイルスベクターを生み出す工程をさらに含み、免疫コンピテント細胞をウイルスベクターと接触させる、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

事前に処理した腫瘍細胞を複数の免疫コンピテント細胞と接触させる工程の後、事前に処理した腫瘍細胞について、第二の複数のネオエピトープを決定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

免疫コンピテント細胞は、N K 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

N K 細胞は、N K 9 2 細胞、または a N K 細胞、h a N K 細胞および t a N K 細胞からなる群より選択される遺伝学的に操作された N K 細胞である、請求項 2 8 に記載の方法。



【請求項 3 0】

免疫コンピテント細胞の応答を定量する工程は、顕微鏡アッセイ、発光アッセイ、蛍光アッセイまたは放射線学的アッセイを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

事前に決定された閾値は、事前に処理した腫瘍細胞の溶解またはアポトーシスの、事前に決定された割合である、請求項 1 に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/018214
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)j		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/50; A61K 35/12; C12P 021/02; C12N 005/06; A61K 38/20; G01N 33/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: stress, immune competent cell, NK cell, NKG2D		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010-0034772 A1 (DRESSEL, RALF et al.) 11 February 2010 See abstract; paragraphs [0006], [0029], [0037], [0051]-[0052], [0074], [0078], [0100]-[0106]; figs. 6A-6B, 8A-8C.	1-5, 19-26, 31-34
Y		27-30
Y	KAHRAMAN, ALISAN et al., 'Major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MIC A/B): A novel role in nonalcoholic steatohepatitis', Hepatology, 2010, Vol.51, No.1, pages 92-102 See page 94, right column, lines 19-24; fig. 3.	27-30
A	CAMPOLI, MICHAEL et al., 'HLA antigen and NK cell activating ligand expression in malignant cells: a story of loss or acquisition', Seminars in Immunopathology, 2011, Vol.33, No.4, pages 321-334 See the whole document.	1-5, 19-34
A	MAHONEY, KATHLEEN M. et al., 'Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets', Nature Reviews Drug Discovery, 2015, Vol.14, No.8, pages 561-584 See the whole document.	1-5, 19-34
A	US 2004-0038339 A1 (PETER KUFER et al.) 26 February 2004 See the whole document.	1-5, 19-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 30 May 2017 (30.05.2017)		Date of mailing of the international search report 30 May 2017 (30.05.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea  Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung  Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2017/018214

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 7-10,12,13,16 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: Each of the claims 7-10, 12, 13 and 16 refers to a claim which is not drafted in accordance with the third sentence of PCT Rule 6.4(a).
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 6,11,14,15,17,18 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2017/018214

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0034772 A1	11/02/2010	CA 2702370 A1	22/05/2008
		EP 2079833 A1	22/07/2009
		JP 2010-509257 A	25/03/2010
		WO 2008-058728 A1	22/05/2008
US 2004-0038339 A1	26/02/2004	AU 2001-260153 B2	17/08/2006
		AU 6015301 A	03/10/2001
		CA 2406993 A1	27/09/2001
		CN 1423700 A	11/06/2003
		EP 1266014 A2	18/12/2002
		JP 2004-500108 A	08/01/2004
		WO 01-71005 A2	27/09/2001
		WO 01-71005 A3	03/01/2002

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(71) 出願人 518203696
 ナントセル, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
 ブールバード

(74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一

(74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直

(74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代

(74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

(72) 発明者 スン - シオン, パトリック
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
 ブールバード

(72) 発明者 ニアジ, カイバン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
 ブールバード

(72) 発明者 ラビザド, シャールーズ
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
 ブールバード

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BA11 BB20 BB60 CA30 CB02 FA16 FB03 FB08
 FB12 FB13
 4B063 QA05 QA19 QA20 QQ02 QQ08 QQ10 QQ13 QQ43 QQ79 QR32
 QR48 QR72 QR77 QR79 QR80 QS38
 4B065 AA93Y AA94X AB01 AC12 AC14 AC20 BA02 CA24 CA46

专利名称(译)	免疫原性调节の方法		
公开(公告)号	JP2019511903A	公开(公告)日	2019-05-09
申请号	JP2018538100	申请日	2017-02-16
申请(专利权)人(译)	南特控股有限责任公司IPD		
[标]发明人	スンシオンパトリック ニアジカイバン ラビザドシャルルーズ		
发明人	スン-シオン,パトリック ニアジ,カイバン ラビザド,シャルルーズ		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/12 C12N15/86 C12N5/10 C12N5/0783		
CPC分类号	G01N33/5011 G01N33/505 G01N33/5044 G01N33/6878 G01N2333/7155		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/50.Z G01N33/53.Y C12N15/12 C12N15/86.Z C12N5/10 C12N5/0783		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB20 2G045/BB60 2G045/CA30 2G045/CB02 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ13 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS38 4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/AC12 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	62/297751 2016-02-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

肿瘤活检的增加的肿瘤免疫原性的离体测定被用作鉴定患者中的肿瘤免疫疗法的指南。最优选地，离体测试包括将活检样品暴露于产生预处理的肿瘤细胞的应激条件下，然后用免疫感受态细胞测定其活化或活性增加。来吧 测试条件包括活检样品暴露于免疫刺激组合物，新表位和/或改变的细胞的抗体，并且免疫原性增加优选地是由于暴露于T细胞和/或NK细胞。决定了。[选型图]图1

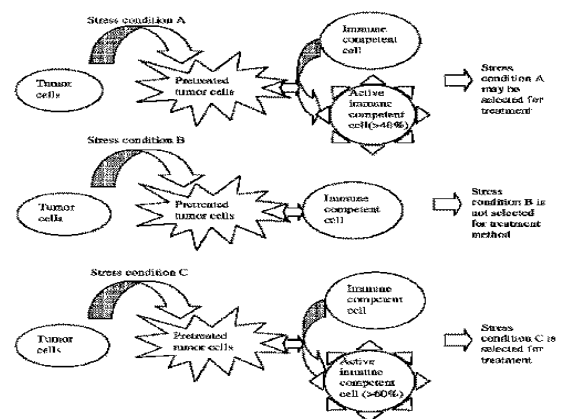


Figure 1