

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-519704
(P2022-519704A)

(43)公表日 令和4年3月24日(2022.3.24)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)	
C 12 N	15/13 (2006.01)	C 12 N	15/13	4 B 0 6 5
C 12 N	15/12 (2006.01)	C 12 N	15/12	Z N A 4 C 0 8 4
C 12 N	15/62 (2006.01)	C 12 N	15/62	Z 4 C 0 8 7
C 12 N	15/53 (2006.01)	C 12 N	15/53	4 H 0 4 5
C 12 N	15/54 (2006.01)	C 12 N	15/54	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全34頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-546224(P2021-546224)	(71)出願人	515045617
(86)(22)出願日	令和2年2月6日(2020.2.6)		シアトル チルドレンズ ホスピタル (
(85)翻訳文提出日	令和3年10月6日(2021.10.6)		ディービーエイ シアトル チルドレンズ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/017067		リサーチ インスティテュート)
(87)国際公開番号	WO2020/163634		アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン
(87)国際公開日	令和2年8月13日(2020.8.13)		州 シアトル ナインス アベニュー 1 9
(31)優先権主張番号	62/802,847		0 0
(32)優先日	平成31年2月8日(2019.2.8)	(74)代理人	100077012
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	弁理士 岩谷 龍
(81)指定国・地域	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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		ジェンセン,マイケル シー. アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 1 シアトル,ナインス アベニュー 1 9 0 0 シアトル チルドレンズ ホスピ タル,ディービーエイ シアトル チルド レンズ リサーチ インスティテュート内 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キメラサイトカイン受容体

(57)【要約】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、キメラサイトカイン受容体に関する。いくつかの実施形態において、キメラサイトカイン受容体は、IL-7受容体の細胞外ドメインに繫留されたIL-7と、このIL-7受容体の細胞外ドメインに連結されたIL-21受容体の細胞内ドメインとを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、キメラサイトカイン受容体を含むT細胞は、外因性サイトカインの非存在下で容易に活性化することができ、かつ/または容易に拡大増殖させることができる。

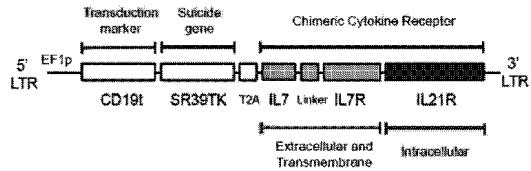


FIG.2A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

キメラサイトカイン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、該キメラサイトカイン受容体ポリペプチドが、
IL-7受容体の細胞外ドメインに繋留されたIL-7；
膜貫通ドメイン；および
IL-21受容体の細胞内ドメイン
を含み、

前記膜貫通ドメインにより、前記IL-7受容体の細胞外ドメインが前記IL-21受容体の細胞内ドメインに連結されている、ポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

前記IL-7をコードする第1の核酸；
繋留鎖をコードする第2の核酸；
前記繋留鎖を介して前記IL-7が連結される、前記IL-7受容体の細胞外ドメインをコードする第3の核酸；
前記膜貫通ドメインをコードする第4の核酸；および
前記IL-21受容体の細胞内ドメインをコードする第5の核酸
を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記繋留鎖の長さが、3アミノ酸長～30アミノ酸長である、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 4】

前記膜貫通ドメインが、IL-7受容体の膜貫通ドメインを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

第1の核酸が、配列番号2と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

第2の核酸が、配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 7】

第3の核酸が、配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

第3の核酸と第4の核酸を合わせた配列が、配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

第5の核酸が、配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

第1の核酸が、配列番号2のヌクレオチド配列を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 11】

第2の核酸が、配列番号3のヌクレオチド配列を含む、請求項1～10のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

第3の核酸が、配列番号4のヌクレオチド配列を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

第3の核酸と第4の核酸を合わせた配列が、配列番号4のヌクレオチド配列を含む、請求

50

項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 4】

第 5 の核酸が、配列番号 5 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 5】

誘導型プロモーターをさらに含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 6】

誘導型細胞傷害性遺伝子をさらに含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 1 7】

前記細胞傷害性遺伝子が、チミジンキナーゼ、チミジル酸キナーゼに融合されたチミジンキナーゼ、オキシドレダクターゼ、デオキシシチジンキナーゼ、ウラシルホスホリボシリルトランスフェラーゼ、シトシンデアミナーゼ、およびウラシルホスホリボシリルトランスフェラーゼに融合されたシトシンデアミナーゼから選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 8】

前記細胞傷害性遺伝子が、チミジンキナーゼを含む、請求項 1 6 または 1 7 に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 1 9】

前記チミジンキナーゼが、SR39TKを含む、請求項 1 8 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 0】

リボソームスキップ配列をさらに含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 1】

前記リボソームスキップ配列が、T2Aスキップ配列を含む、請求項 2 0 に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 2 2】

形質導入マーカーをコードする、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 3】

前記マーカーが、切断型 CD19 (CD19t) を含む、請求項 2 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 2 5】

ウイルスベクターを含む、請求項 2 4 に記載のベクター。

【請求項 2 6】

レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよびアデノウイルスベクターから選択される、請求項 2 4 または 2 5 に記載のベクター。

40

【請求項 2 7】

レンチウイルスベクターを含む、請求項 2 6 に記載のベクター。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を含む細胞。

【請求項 3 0】

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするポリヌクレオチド、またはCARタンパク質をさ

50

らに含む、請求項 2 9 に記載の細胞。

【請求項 3 1】

T 細胞である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の細胞。

【請求項 3 2】

CD8+T 細胞または CD4+T 細胞である、請求項 2 9 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の細胞。
。

【請求項 3 3】

CD8+T 細胞または CD4+T 細胞に由来する細胞である、請求項 2 9 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 3 4】

初代細胞である、請求項 2 9 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の細胞。

10

【請求項 3 5】

哺乳動物細胞である、請求項 2 9 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 3 6】

ヒト細胞である、請求項 2 9 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 3 7】

エクスピボの細胞である、請求項 2 9 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 3 8】

対象においてがんを治療または緩和する方法であって、

がんの治療または緩和を必要とする対象に、請求項 2 9 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の細胞を投与することを含む方法。 20

【請求項 3 9】

前記がんの治療または緩和が、前記対象にサイトカインを共投与することを含まない、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

サイトカインを前記対象に共投与することをさらに含み、このサイトカインの投与量が、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドや該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を含まず、キメラ抗原受容体 (CAR) を含む細胞を投与した対象に共投与されるサイトカインの投与量よりも少ない、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記サイトカインが、IL-7、IL-15 および IL-21 から選択される、請求項 3 8 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 4 2】

前記サイトカインが、IL-21 を含む、請求項 3 8 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記細胞が、前記対象の自己細胞である、請求項 3 8 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記がんが、大腸がん、乳がん、卵巣がん、肺がん、脾臓がん、前立腺がん、悪性黒色腫、腎臓がん、脾臓がん、脳腫瘍、膠芽腫、神経芽腫、髓芽腫、肉腫、骨がん、肝臓がんなどの固形腫瘍；または白血病、多発性骨髓腫などの非固形腫瘍を含む、請求項 3 8 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 4 5】

前記がんが脳腫瘍を含む、請求項 3 8 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記対象が哺乳動物である、請求項 3 8 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記対象がヒトである、請求項 3 8 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 8】

キメラ抗原受容体 (CAR) を含む細胞集団を調製する方法であって、

50

(a) 請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含み、キメラ受容体をコードするポリペプチドを T 細胞に形質導入する工程；

(b) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする別のポリヌクレオチドを前記 T 細胞に形質導入する工程；ならびに

(c) 前記形質導入された T 細胞の活性化および拡大増殖を刺激するのに十分な条件下で、前記 T 細胞を培養する工程

を含み、

前記培養に使用する培地が、キメラ受容体をコードするポリヌクレオチドを含んでいない T 細胞の活性化および拡大増殖を刺激するのに十分な量よりも少ない量の外因性サイトカインを含む、方法。

【請求項 4 9】

キメラ抗原受容体 (CAR) を含む細胞集団を調製する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを T 細胞に形質導入する工程；

(b) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする別のポリヌクレオチドを前記 T 細胞に形質導入する工程；ならびに

(c) 前記形質導入された T 細胞の活性化および拡大増殖を刺激する条件下において、外因性サイトカインを含んでいない培養培地中で、前記 T 細胞を培養する工程を含む方法。

【請求項 5 0】

工程 (a) の前に工程 (b) を行う、請求項 4 8 または 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

工程 (a) と工程 (b) を同時に行う、請求項 4 8 または 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記サイトカインが、IL-7、IL-15 および IL-21 から選択される、請求項 4 8 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記サイトカインが、IL-21 を含む、請求項 4 8 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記細胞が、CD8+ T 細胞または CD4+ T 細胞である、請求項 4 8 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記細胞が、CD8+ T 細胞または CD4+ T 細胞に由来する細胞である、請求項 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記細胞が初代細胞である、請求項 4 8 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 4 8 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 4 8 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記細胞がエクスピボの細胞である、請求項 4 8 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

優先権および関連出願の相互参照

本出願は、2019年2月8日に出願された米国仮出願第62/802847号の優先権の利益を主張するものであり、この出願は引用によりその全体が明示的に本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

電子形式の配列表

本願は、ASCIIテキストファイルとしての電子形式の配列表とともにEFS-Web経由で出願されたものである。この電子形式の配列表は、SCR1215WOSEQLIST.txtのファイル名で作成され、2020年2月3日に最終更新されたものであり、5,841バイトのサイズである。この電子形式の配列表に記載の情報は、引用によりその全体が本明細書に援用される。

【0003】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、キメラサイトカイン受容体に関する。いくつかの実施形態において、キメラサイトカイン受容体は、IL-7受容体の細胞外ドメインに繋留されたIL-7と、このIL-7受容体の細胞外ドメインに連結されたIL-21受容体の細胞内ドメインとを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、キメラサイトカイン受容体を含むT細胞は、外因性サイトカインの非存在下で容易に活性化することができ、かつ／または容易に拡大増殖させることができる。

10

【背景技術】

【0004】

細胞を用いた養子免疫療法では、患者から単離したT細胞を改変して合成タンパク質を発現させ、この細胞を患者に再移入して、新たな治療的機能を発揮させる。そのような合成タンパク質の例として、キメラ抗原受容体(CAR)および組換えT細胞受容体(TCR)がある。現在使用されているCARの一例は、細胞外認識ドメイン(例えば抗原結合ドメイン)、膜貫通ドメインおよび1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインからなる融合タンパク質である。CARに抗原が結合すると、免疫細胞において、CARの細胞内シグナル伝達部分が活性化関連応答(細胞溶解分子の放出など)を開始し、腫瘍細胞の死滅を誘導する。

20

【0005】

前臨床モデルでは、鎖に結合するサイトカイン(T細胞の増殖および生存を促進する可溶性因子)を補充することによってCAR T細胞療法を改善できることが示されている。しかし、患者にサイトカインを全身投与すると、毒性の副作用が起こることが臨床試験で示されたことから、サイトカインの全身投与は治療上有効な解決策ではない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、キメラサイトカイン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、該キメラサイトカイン受容体ポリペプチドが、

30

IL-7受容体の細胞外ドメインに繋留されたIL-7；

膜貫通ドメイン；および

IL-21受容体の細胞内ドメイン

を含み、

前記膜貫通ドメインにより、前記IL-7受容体の細胞外ドメインが前記IL-21受容体の細胞内ドメインに連結されていることを特徴とするポリヌクレオチドを含む。

40

【0007】

いくつかの実施形態は、

前記IL-7をコードする第1の核酸；

繋留鎖をコードする第2の核酸；

前記繋留鎖を介して前記IL-7が連結される、前記IL-7受容体の細胞外ドメインをコードする第3の核酸；

前記膜貫通ドメインをコードする第4の核酸；および

前記IL-21受容体の細胞内ドメインをコードする第5の核酸を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、前記繋留鎖の長さは、3アミノ酸長～30アミノ酸長であ

50

る。

【0009】

いくつかの実施形態において、前記膜貫通ドメインは、IL-7受容体の膜貫通ドメインを含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は、配列番号2と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第1の核酸は、配列番号2のヌクレオチド配列を含む。

【0011】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は、配列番号3と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第2の核酸は、配列番号3のヌクレオチド配列を含む。 10

【0012】

いくつかの実施形態において、第3の核酸は、配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第3の核酸は、配列番号4のヌクレオチド配列を含む。

【0013】

いくつかの実施形態において、第3の核酸と第4の核酸を合わせた配列は、配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第3の核酸と第4の核酸を合わせた配列は、配列番号4のヌクレオチド配列を含む。 20

【0014】

いくつかの実施形態において、第5の核酸は、配列番号5と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第5の核酸は、配列番号5のヌクレオチド配列を含む。

【0015】

いくつかの実施形態は、誘導型プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態は、誘導型細胞傷害性遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記細胞傷害性遺伝子は、チミジンキナーゼ、チミジル酸キナーゼに融合されたチミジンキナーゼ、オキシドレダクターゼ、デオキシシチジンキナーゼ、ウラシルホスホリボシルトランスクフェラーゼ、シトシンデアミナーゼ、およびウラシルホスホリボシルトランスクフェラーゼに融合されたシトシンデアミナーゼから選択されるタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、前記細胞傷害性遺伝子は、チミジンキナーゼを含む。いくつかの実施形態において、前記チミジンキナーゼはSR39TKを含む。 30

【0016】

いくつかの実施形態は、リボソームスキップ配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記リボソームスキップ配列はT2Aスキップ配列を含む。

【0017】

いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、形質導入マーカーをコードする。いくつかの実施形態において、前記形質導入マーカーは、切断型CD19(CD19t)を含む。 40

【0018】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、前記ポリヌクレオチドのいずれかを含むベクターを含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、ウイルスベクターを含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよびアデノウイルスベクターから選択される。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターを含む。

【0019】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、前記ポリヌクレオチドのいずれかによりコードされるポリペプチドを含む。

【0020】

10

20

30

40

50

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、前記ポリヌクレオチドのいずれかを含む細胞、または前記ポリヌクレオチドのいずれかによりコードされるタンパク質を含む細胞を含む。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態は、キメラ抗原受容体（CAR）をコードするポリヌクレオチド、またはCARタンパク質をさらに含む。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態において、前記細胞はT細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T細胞またはCD4+T細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T細胞またはCD4+T細胞に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はエクスピボの細胞である。

10

【 0 0 2 3 】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、対象においてがんを治療または緩和する方法であって、がんの治療または緩和を必要とする対象に、前記細胞のいずれかを投与することを含む方法を含む。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態において、前記がんの治療または緩和は、前記対象にサイトカインを共投与することを含まない。

20

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態は、サイトカインを前記対象に共投与することをさらに含み、このサイトカインの投与量は、請求項1～23のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドや該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を含まず、キメラ抗原受容体（CAR）を含む細胞を投与した対象に共投与されるサイトカインの投与量よりも少ない。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態において、前記サイトカインは、IL-7、IL-15およびIL-21から選択される。いくつかの実施形態において、前記サイトカインはIL-21を含む。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態において、前記細胞は、前記対象の自己細胞である。

30

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態において、前記がんは、大腸がん、乳がん、卵巣がん、肺がん、脾臓がん、前立腺がん、悪性黒色腫、腎臓がん、脾臓がん、脳腫瘍、膠芽腫、神経芽腫、髓芽腫、肉腫、骨がん、肝臓がんなどの固形腫瘍；または白血病、多発性骨髄腫などの非固形腫瘍を含む。いくつかの実施形態において、前記がんは脳腫瘍を含む。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態において、前記対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態において、前記対象はヒトである。

【 0 0 3 0 】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、キメラ抗原受容体（CAR）を含む細胞集団を調製する方法であって、

40

(a) 前記ポリヌクレオチドのいずれかを含み、キメラ受容体をコードするポリペプチドをT細胞に形質導入する工程；

(b) キメラ抗原受容体（CAR）をコードする別のポリヌクレオチドを前記T細胞に形質導入する工程；ならびに

(c) 前記形質導入されたT細胞の活性化および拡大増殖を刺激するのに十分な条件下で、前記T細胞を培養する工程

を含み、

前記培養に使用する培地が、キメラ受容体をコードするポリヌクレオチドを含んでいないT細胞の活性化および拡大増殖を刺激するのに十分な量よりも少ない量の外因性サイトカ

50

インを含むことを特徴とする方法を含む。

【0031】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、キメラ抗原受容体(CAR)を含む細胞集団を調製する方法であって、

(a) 前記ポリヌクレオチドのいずれかをT細胞に形質導入する工程；

(b) キメラ抗原受容体(CAR)をコードする別のポリヌクレオチドを前記T細胞に形質導入する工程；ならびに

(c) 前記形質導入されたT細胞の活性化および拡大増殖を刺激する条件下において、外因性サイトカインを含んでいない培養培地中で、前記T細胞を培養する工程を含む方法を含む。

10

【0032】

いくつかの実施形態において、工程(a)の前に工程(b)を行う。

【0033】

いくつかの実施形態において、工程(a)と工程(b)を同時に行う。

【0034】

いくつかの実施形態において、前記サイトカインは、IL-7、IL-15およびIL-21から選択される。いくつかの実施形態において、前記サイトカインはIL-21を含む。

【0035】

いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T細胞またはCD4+T細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T細胞またはCD4+T細胞に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はエクスピボの細胞である。

20

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】T細胞におけるIL-21シグナル伝達用のキメラサイトカイン受容体(CCRIL21)の模式図である。図1の左図は、CCRIL21タンパク質の設計を示しており、図1の右図は、CCRIL21の代表的な機能を示している。

【0037】

【図2A】CCRIL21をコードするレンチウイルスコンストラクトの模式図である。

【0038】

【図2B】形質導入後にCD19特異的磁気ソーティングを用いて精製したCCRIL21発現CD8+T細胞のFACS分析の結果である。

【0039】

【図3】CD8+T細胞におけるリン酸化STAT3(pSTAT3)またはリン酸化STAT5(pSTAT5)の有無に関する分析結果である。

【0040】

【図4A】外因性のIL-21と接触させたT細胞またはキメラサイトカイン受容体(CCRIL21)を含むT細胞における細胞周期の進行過程における各細胞の割合(%)を示すグラフである。エラーバーは標準偏差を示す。

40

【0041】

【図4B】T細胞に外因性のIL-21を接触させた場合と、キメラサイトカイン受容体(CCRIL21)を含むT細胞を用いた場合におけるアポトーシスを起こした細胞の割合(%)を示すグラフである。

【0042】

【図5A】806CARを含むT細胞または806CARとキメラサイトカイン受容体(CCRIL21)を含むT細胞により溶解された腫瘍細胞の割合(%)を示すグラフである。

【0043】

【図5B】Lamp-1(LAMP-1)、グランザイムB(GZMB)またはパーカーフォリン(PRF

50

) の有無に関するFACS分析の結果である。

【 0 0 4 4 】

【図6】806CARを含むT細胞または806CARとキメラサイトカイン受容体（CCRIL2）を含むT細胞により殺傷されたオンターゲット腫瘍細胞の割合（%）およびオフターゲット腫瘍細胞の割合（%）を示すグラフである。

【 0 0 4 5 】

【図7】BATFまたはT-betの有無に関する分析結果である。

【 0 0 4 6 】

【図8A】806CARを含むT細胞または806CARとCCRIL21を含むT細胞を投与したマウスにおける腫瘍量（発光により測定）の経時変化を示すグラフである。

10

【 0 0 4 7 】

【図8B】806CARを含むT細胞または806CARとCCRIL21を含むT細胞を投与した担がんマウスの生存率の経時変化を示すカプランマイヤー曲線である。

【 0 0 4 8 】

【図9A】CCRIL21を発現するB7H3CAR T細胞がプライミングされ、腫瘍細胞に対するその細胞傷害性が増強されていることを示すデータのグラフである（実施例8）。

【 0 0 4 9 】

【図9B】CCRIL21を発現するCAR T細胞においてエフェクタータンパク質の発現が増加することから、該CAR T細胞がプライミングされ、その細胞傷害性が増強されることを示すデータの棒グラフである（実施例9）。

20

【 0 0 5 0 】

【図10】CCRIL21が主要な転写因子を介してエフェクター機能を調節することが示されたデータの棒グラフである（実施例10）。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 1 】

養子T細胞療法を成功させるには、投与したT細胞が堅牢な拡大増殖能と持続性を備えている必要があり、これらの挙動は、周囲環境からT細胞が受けるシグナルにより大きく左右される。前臨床モデルでは、鎖に結合するサイトカイン（T細胞の増殖および生存を促進する可溶性因子）を補充することによってキメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法を改善できることが示されている。しかし、患者にサイトカインを全身投与すると、毒性の副作用が起こることが臨床試験で示されたことから、このようなサイトカインの全身投与は治療上有効な解決策ではない（Jeught V. et al. (2014) Oncotarget 6:1359-81）。これを踏まえて、全身毒性を起こすことなく、CAR T細胞療法にサイトカイン補充を併用した際の利点を得るために、T細胞に内在する構成的なインターロイキンシグナル伝達を提供できるように、様々なキメラサイトカイン受容体を構築した。これらのキメラサイトカイン受容体により、特定の鎖サイトカインのシグナル伝達イベントが再現された。さらに、予想外にも、特定のキメラサイトカイン受容体を含むCAR T細胞の活性が高くなった。

30

【 0 0 5 2 】

キメラサイトカイン受容体を発現するCAR T細胞をインビトロで使用して、一連の腫瘍チャレンジを行い、T細胞群の生存能、増殖能および腫瘍細胞排除能を調べた。キメラサイトカイン受容体を発現するCAR T細胞が、外因性サイトカインの非存在下において向上した増殖能および生存能を示すことが見出された。さらに、特定のキメラサイトカイン受容体は、T細胞における有糸分裂の誘導およびT細胞の細胞傷害性に対して異なる効果を付与したことから、これらの効果を、特定のサイトカインによる主要な転写因子の調節を調べることにより確認した。さらに、膠芽腫同所異種移植マウスマodelを使用することにより、これらのキメラサイトカイン受容体を発現するCAR T細胞が、インビトロで顕著に向上した効力を発揮することが示された。

40

【 0 0 5 3 】

T細胞の活性化と拡大増殖の最適化には、T細胞受容体の活性化、共刺激および刺激性サ

50

イトカインという3つのシグナルが必要である。CAR T細胞では、CARにより前者2つのシグナルの提供が可能であるが、3つ目のシグナルは、周囲環境のサイトカインまたは外因性サイトカインに依存し、腫瘍微小環境では、このようなサイトカインがほとんど存在しないことがある。サイトカインの投与により、CAR T細胞療法の有効性が向上する場合があるが、全身投与によるサイトカインの補充は、臨床試験において毒性を起こすことが確認されている。全身毒性を引き起こすことなく、あるいは全身毒性を抑えて、この3つ目のシグナルをCAR T細胞に選択的に提供する方法を開発できれば、臨床的に有益である。

【0054】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかにおいて、インターロイキン21(CCRIL21)のキメラ受容体を含むCAR T細胞を構築する。CCRIL21は、CAR T細胞に刺激性のサイトカインシグナルを提供することにより、CAR T細胞療法の有効性を向上させる。図1は、T細胞上のCCRIL21を示す。左図は、タンパク質の設計を示しており、IL-7受容体の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインとIL-21受容体の細胞内ドメインとが、繋留されたIL-7サイトカイン分子に可動性リンカーを介して連結されたキメラ受容体タンパク質を示している。図1の右図は、CCRIL21の代表的な機能を示しており、繋留されたIL-7が、内因性鎖受容体と複合体を形成し、このように受容体が二量体化することによって、IL-21受容体の細胞内ドメインを介して細胞内シグナル伝達が活性化される。

【0055】

インビトロでの初代ヒトT細胞のデータから、CCRIL21を発現するCD8+T細胞が、IL-21のシグナル伝達の下流のシグナル伝達を誘導し、サイトカインを必要とせずに増殖および生存を促進し、増強された細胞傷害性およびエフェクター機能を付与することが示された。また、膠芽腫同所移植マウスのインビオデータから、CCRIL21を発現するCAR T細胞は、CCRIL21を発現していないCAR T細胞と比べて、腫瘍排除能が有意に向上升しており、全生存期間を延長させることができた。

【0056】

用語の定義

本開示において使用される用語は、本明細書を参照すれば、一般的な通常の意味を有する。当業者であれば、本明細書全体を参照することにより、使用されている各用語を理解できるであろう。

【0057】

本明細書において、「a」または「an」は、1つまたは1つ以上を意味してもよい。

【0058】

本明細書において、「約」は、特定の数値が、この数値を決定するために用いられた方法に本質的に付随する誤差の変動または実験間での変動を含むことを示す。

【0059】

本明細書において、「キメラ受容体」は、疾患または障害に関連する分子と結合する抗体配列やその他のタンパク質配列のリガンド結合ドメインを含む合成設計された受容体であって、該リガンド結合ドメインが、好ましくはスペーサードメインを介して、T細胞受容体またはその他の受容体に由来する1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば共刺激ドメイン)に連結された受容体を含んでいてもよい。キメラ受容体は、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、キメラ免疫受容体、あるいはキメラ抗原受容体(CAR)とも呼ぶことができる。

【0060】

本明細書において、「キメラサイトカイン受容体」は、サイトカイン受容体ポリペプチドの細胞外ドメインに繋留されたサイトカインと、膜貫通ドメインと、該膜貫通ドメインを介して前記サイトカイン受容体ポリペプチドの細胞外ドメインに連結されたサイトカイン受容体の細胞内ドメインとを含む合成設計された受容体を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記サイトカインは、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、

10

20

30

40

50

IL-21などの、I型サイトカイン受容体に結合するサイトカインから選択することができる。いくつかの実施形態において、前記サイトカイン受容体ポリペプチドの細胞外ドメインは、IL-2受容体、IL-4受容体、IL-7受容体、IL-9受容体、IL-13受容体、IL-15受容体、IL-21受容体などのI型サイトカイン受容体に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態において、前記膜貫通ドメインは、IL-2受容体、IL-4受容体、IL-7受容体、IL-9受容体、IL-13受容体、IL-15受容体、IL-21受容体などのI型サイトカイン受容体に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態において、前記サイトカイン受容体ポリペプチドの細胞内ドメインは、IL-2受容体、IL-4受容体、IL-7受容体、IL-9受容体、IL-13受容体、IL-15受容体、IL-21受容体などのI型サイトカイン受容体に由来するものであってもよい。

10

【0061】

本明細書において、「キメラ抗原受容体（CAR）」は、キメラT細胞受容体としても知られており、遺伝子組換え受容体である人工T細胞受容体を指してもよく、エフェクターアイム細胞に任意の特異性を移植することができる。キメラ抗原受容体を使用して、例えば、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に移植することができ、例えば、レトロウイルスベクターやその他の適切な遺伝子送達システムを使用することにより、モノクローナル抗体のコード配列を容易に移入することができる。CARの構造は、モノクローナル抗体由来の一本鎖可変領域断片（scFv）を含んでいてもよく、このscFvが、CD3の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインに融合されている。これらの分子は、scFvがその標的によって認識されると、これに応答してシグナル伝達を誘導する。いくつかの実施形態では、自己不活性型トランスポゼースシステムを有する遺伝子送達ベクターを利用する。いくつかの実施形態において、前記遺伝子送達ベクターは、少なくとも1つのタンパク質をコードする配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記タンパク質はキメラ抗原受容体である。キメラ受容体は、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、キメラ免疫受容体、および／またはキメラ抗原受容体（CAR）と呼ぶこともできる。CARは、免疫受容体を発現する細胞に任意の特異性を移植することができる遺伝子組換え受容体である。CARは、抗体もしくは抗体断片、スペーサー、シグナル伝達ドメインおよび／または膜貫通領域を含んでいてもよい。しかしながら、CARは、様々な構成要素すなわちドメイン（例えば、エピトープ結合領域（例えば、抗体断片、scFvまたはそれらの一部）、スペーサー、膜貫通ドメインおよび／またはシグナル伝達ドメインなど）が改変されており、これよって驚くべき効果が得られたことから、本明細書の文脈の一部では、CARの構成要素は、独立した個々の構成要素としての特徴を含むものとして記載されている。CARに含まれる様々な構成要素は様々なバリエーションを有することから、例えば、特定のエピトープに対する結合親和性が増強されている。

20

【0062】

人工T細胞受容体すなわちCARは、養子細胞移入と呼ばれる技術を使用して、がんまたはウイルス感染症の治療法として使用できる。T細胞を対象から採取し、がん細胞、ウイルスまたはウイルス感染細胞に提示される分子に特異的な受容体を発現するように該T細胞を改変する。この遺伝子組換えT細胞は、がん細胞もしくはウイルス感染細胞を認識してこれらを殺傷することができるか、またはウイルスの排除を促すことができ、このように作製された遺伝子組換えT細胞を前記対象に再導入する。いくつかの実施形態において、前記遺伝子送達ベクターは、キメラ抗原受容体をコードする配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、養子T細胞免疫療法用の組換えマルチプレックスT細胞を作製する方法が提供される。最も広い意味において、前記方法は、本明細書に記載の実施形態のいずれかによる遺伝子送達ベクターを提供する工程、前記遺伝子送達ベクターをT細胞に導入する工程、および前記遺伝子送達ベクターを含む前記細胞を選択する工程を含んでいてもよく、前記選択工程は、選択圧下において特定の表現型を発現する前記T細胞を単離することを含む。

30

【0063】

効果的な免疫応答を惹起するには、T細胞を共刺激することが望ましく、このような免疫

40

50

応答はリンパ球が活性化されたときに起こる。共刺激シグナルは抗原非特異的であり、抗原を有する細胞の細胞膜に発現された共刺激分子とT細胞とが相互作用することによって発生する。共刺激分子としては、CD28、CD80およびCD86が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、養子T細胞免疫療法用の組換えマルチプレックスT細胞を作製する方法が提供される。いくつかの実施形態において、前記T細胞は、キメラ抗原受容体を有するT細胞である。いくつかの実施形態において、キメラ抗原受容体を有する前記T細胞は、共刺激リガンドを発現するように遺伝子組換えされている。いくつかの実施形態において、対象においてがんまたはウイルス感染症を治療、抑制または緩和する方法が提供される。最も広い意味では、前記方法は、本明細書に記載の実施形態のいずれかによるT細胞を前記対象に投与することを含んでいてもよい。このような実施形態のいくつかにおいて、前記対象は、家畜や愛玩動物などの動物であり、別の実施形態において、前記対象はヒトである。このような実施形態のいくつかにおいて、キメラ抗原を有する前記T細胞は、共刺激分子を発現するように遺伝子組換えされている。いくつかの実施形態において、前記遺伝子送達ベクターは、少なくとも1つの共刺激分子をコードする配列を含む。いくつかの実施形態において、前記遺伝子送達ベクターは、少なくとも1kb～20kbである。

10

【0064】

本明細書において、「遺伝子組換えする」および「遺伝子組換え」は、遺伝子工学技術を利用して改変した遺伝物質（核酸など）を使用して、細菌、T細胞、細菌細胞、真核細胞、昆虫、植物、哺乳動物などの生物や細胞を組み換える方法を含んでいてもよい。例えば、まず、分子クローニング法を用いて目的の遺伝物質を単離し、複製することによってDNA配列を作製するか、あるいはDNAを合成し、次いで得られたこのようなコンストラクトを宿主生物に挿入することによって、DNAなどの核酸を宿主ゲノムに挿入することができる。スクレアーゼを使用して、遺伝子を欠失させることができ、「ノックアウト」することもできる。遺伝子ターゲティングは、相同組換えにより内因性遺伝子を改変する別の技術であり、遺伝子欠失、エキソンの除去、遺伝子の付加または点突然変異導入に使用することができる。

20

【0065】

本明細書では、形質導入による遺伝子組換えについて述べる。「形質導入」とは、ベクターを使用して、例えば、DNAやRNAなどの遺伝物質を細胞に移入する方法を指す。一般的な技術では、ウイルスベクター、エレクトロポレーション、または細胞透過性を向上させる化学試薬が使用される。DNAは、ウイルスまたはウイルスベクターにより移入することができる。本明細書では、免疫細胞であるCD4+T細胞および/またはCD8+T細胞を組み換える方法について述べる。治療用遺伝子を高発現させるため、かつ/または細胞表面上のキメラ抗原受容体の発現量を増加させるために、例えば、特定のタンパク質またはキメラ抗原受容体をコードする遺伝物質をT細胞に形質導入する。T細胞は、例えば、ウイルスを使用して遺伝子組換えすることができる。遺伝子療法に一般に使用されるウイルスは、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レトロウイルスまたはレンチウイルスである。

30

【0066】

キメラ抗原受容体をコードする核酸を送達するための組換え感染性ウイルス粒子を利用した様々な形質導入技術が開発されてきた。このような形質導入技術は、現時点において、Tリンパ球を形質導入するためのアプローチとして好ましい。本明細書で述べるように、形質導入に使用するウイルスベクターとして、シミアンウイルス40、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスに由来するウイルスベクターを挙げることができる。このように、遺伝子移入方法および遺伝子発現方法としては様々なものが存在するが、このような方法は、哺乳動物細胞に遺伝物質を導入して発現させることを本質的な機能とする。前述した形質導入技術のいくつかは、造血細胞またはリンパ球に形質導入することを目的として使用することができ、このような形質導入技術としては、リン酸カルシウムトランスフェクション；プロトプラスト融合

40

50

; エレクトロポレーション; または組換えアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターもしくはレトロウイルスベクターによる感染が挙げられる。初代Tリンパ球への形質導入は、エレクトロポレーションまたはレトロウイルスもしくはレンチウイルスの感染によって成功を収めている。このように、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを使用することによって、真核細胞(例えばT細胞)に非常に効率的に遺伝子を移入することができる。さらに、レトロウイルスまたはレンチウイルスの組み込みは制御下で行うことができ、細胞1個あたり1コピーまたは数コピーの新しい遺伝情報を安定して組み込むことができる。また、本明細書で述べるように、インサイチューで細胞に形質導入することができる。

【0067】

10

本明細書において、「ベクター」または「コンストラクト」は、細胞に異種核酸を導入するために使用される核酸であって、様々な調節エレメントを含むことができることから、細胞において異種核酸を発現させることができる核酸を含んでいてもよい。ベクターとしては、プラスミド、ミニサークル、酵母、およびウイルスゲノムが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、プラスミド、ミニサークル、ウイルスベクター、DNAまたはmRNAである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターである。本明細書において、「Vpx」は、HIV-2型およびいくつかのサル免疫不全ウイルス株にコードされているビリオン関連タンパク質を含んでいてもよい。Vpxは、ヒトにおいてHIV-2の複製を増強することができる。Vpxタンパク質とともにパッケージングされたレンチウイルスベクターをトランスフェクションに使用すると、骨髄系細胞の感染率を上昇させることができる。いくつかの実施形態において、前記レンチウイルスベクターはVpxタンパク質とともにパッケージングされている。本明細書において、「Vpr」タンパク質はViral Protein Rを指してもよい。Vprは14kDaのタンパク質であり、HIV-1の組込み前複合体の核移行の制御において重要な役割を果たしており、非分裂細胞におけるウイルス複製に必要とされる。非分裂細胞としては、例えば、マクロファージが挙げられる。いくつかの実施形態において、前記レンチウイルスベクターは、Vprタンパク質またはその一部とともにパッケージングすることができる。いくつかの実施形態において、前記レンチウイルスベクターは、ウイルスのアクセサリータンパク質とともにパッケージングされる。いくつかの実施形態において、前記ウイルスアクセサリータンパク質は、Vif、Vpx、Vpu、NefおよびVprからなる群から選択される。このようなvif、Vpx、vpu、nefなどのアクセサリータンパク質は、細胞内リガンドと相互作用してアダプター分子として機能し、宿主因子の正常な機能をウイルス自身の目的のために利用することを可能にする。HIVアクセサリータンパク質はStrelbelらによって報告されている(HIV Accessory Proteins versus Host Restriction Factors, Curr Opin Virol. 2013 Dec; 3(6): 10.1016/j.coviro.2013.08.004; この文献は引用によりその全体が明示的に本明細書に援用される)。

20

30

30

【0068】

40

本明細書において、「プロモーター」は、構造遺伝子の転写を誘導するヌクレオチド配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、プロモーターは遺伝子の5'末端の非コード領域に存在し、構造遺伝子の転写開始点の近傍に位置する。転写を開始させるプロモーター配列のエレメントは、コンセンサスヌクレオチド配列によって特徴付けられることが多い。プロモーター配列のエレメントとしては、RNAポリメラーゼ結合部位、TATA配列、CAAT配列、分化特異的エレメント(DSE; McGhee et al., Mol. Endocrinol. 7:551 (1993); 引用によりその全体が明示的に本明細書に援用される)、環状AMP応答エレメント(CRE)、血清応答エレメント(SRE; Treisman et al., Seminars in Cancer Biol. 1:47 (1990); 引用によりその全体が明示的に本明細書に援用される)、グルココルチコイド応答エレメント(GRE)、およびその他の転写因子結合部位が挙げられ、例えば、CRE/ATF(O'Reilly et al., J. Biol. Chem. 267:19938

50

(1992) ; 引用によりその全体が明示的に本明細書に援用される)、AP2 (Ye et al., J. Biol. Chem. 269:25728 (1994) ; 引用によりその全体が明示的に本明細書に援用される)、SP1、cAMP応答エレメント結合タンパク質 (CREB ; Loeken et al., Gene Expr. 3:253 (1993) ; 引用によりその全体が明示的に本明細書に援用される)、および8量体因子 (概要は、Watson et al., eds., Molecular Biology of the Gene, 4th ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987 ; 引用によりその全体が明示的に本明細書に援用される) および Lemaigre and Rousseau, Biochem. J. 303:1 (1994) (引用によりその全体が明示的に本明細書に援用される) を参照されたい) を挙げることができるが、これらに限定されない。本明細書において、プロモーターは、構成的に活性なプロモーター、抑制可能なプロモーター、誘導型プロモーターのいずれであってもよい。プロモーターが誘導型プロモーターである場合、転写率は誘導剤に応答して上昇する。これに対して、プロモーターが構成的プロモーターである場合、転写率は誘導剤による調節を受けない。抑制可能なプロモーターも公知である。

10

【0069】

本明細書において、「治療する」、「治療すること」、「治療された」または「治療」は、文脈に応じて、治療処置と予防処置の両方を指してもよい。

20

【0070】

本明細書において、障害に関して使用される「緩和する」、「緩和すること」、「緩和」または「緩和された」という用語は、障害の症状の軽減、疾患の安定化、または障害の進行の阻止を指してもよい。がんなどの障害の場合、これらの用語は、腫瘍の大きさの縮小、がん細胞の成長もしくは増殖の抑制もしくはがん細胞数の減少、腫瘍の完全な排除もしくは部分的な排除 (例えば、完全奏効もしくは部分奏効)、疾患の安定化、がんの進行の阻止 (例えば、無増悪生存)、または医師によって治療効果であると見なされるがんに対する他の効果を含んでいてもよい。

20

【0071】

本明細書において、「投与する」、「投与すること」または「投与された」は、化合物もしくは薬学的に許容されるその塩、または組換え細胞組成物を患者または対象に導入するための方法を指してもよく、これには、経口投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与または経皮投与が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0072】

本明細書において、「対象」または「患者」は、例えば、実験、診断、予防および / または治療を目的として、本明細書に記載の実施形態を使用または投与してもよいあらゆる生物を指してもよい。対象または患者として、例えば、動物が挙げられる。いくつかの実施形態において、対象は、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト靈長類またはヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、靈長類またはヒトである。

30

【0073】

本明細書において、「共投与」は、別の治療剤と組み合わせて2つ以上の治療剤を投与することを指してもよい。各治療剤は、生物の血流中に同時に存在することができるよう、連続してまたは同時に投与することができる。

40

【0074】

特定のポリヌクレオチド

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、キメラサイトカイン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、前記キメラサイトカイン受容体ポリペプチドは、I型サイトカイン受容体の細胞外ドメインと膜貫通ドメイン (IL-7受容体の細胞外ドメインと膜貫通ドメインなど) からなる部分に繋留されたサイトカイン (IL-7など) と、I型サイトカイン受容体の細胞内ドメイン (IL-21受容体の細胞内ドメインなど) とを含んでいてもよい。そのような実施形態のいくつかにおいて、前記膜貫通ドメインにより、I型サイトカイン受容体の細胞外ドメインがI型サイトカイン受容体の細胞内ドメインに連結されている。いくつかの実施形態に

50

おいて、前記キメラサイトカイン受容体ポリペプチドは、IL-7受容体の細胞外ドメインに繫留されたIL-7；膜貫通ドメイン；およびIL-21受容体の細胞内ドメインを含んでいてもよく、前記膜貫通ドメインにより、前記IL-7受容体の細胞外ドメインが前記IL-21受容体の細胞内ドメインに連結されている。このようなキメラサイトカイン受容体の代表的な実施形態を図2Aに示す。いくつかの実施形態において、前記IL-7受容体の各ドメインは、IL-7受容体鎖の各ドメインに由来するものである。

【0075】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、IL-7をコードする第1の核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、繫留鎖をコードする第2の核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、前記繫留鎖を介して前記IL-7が連結される、IL-7受容体の細胞外ドメインをコードする第3の核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、IL-7受容体の膜貫通ドメインをコードする第4の核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、IL-21受容体の細胞内ドメインをコードする第5の核酸を含んでいてもよい。

10

【0076】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、IL-7をコードする第1の核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、IL-7は、哺乳動物（例えばヒトなど）に由来するものである。いくつかの実施形態において、第1の核酸は、配列番号2のヌクレオチド配列と同一性を有するヌクレオチド配列を含む。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%を超えるか、100%であるか、または前記割合のいずれか2つを上下限とする範囲内にある。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は約95%を超える。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は95%を超える。

20

【0077】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、繫留鎖をコードする第2の核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記繫留鎖の長さは、2アミノ酸長～50アミノ酸長、5アミノ酸長～40アミノ酸長、10アミノ酸長～35アミノ酸長、10アミノ酸長～30アミノ酸長、または15アミノ酸長～25アミノ酸長であってもよい。いくつかの実施形態において、第2の核酸は、配列番号3のヌクレオチド配列と同一性を有するヌクレオチド配列を含む。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%を超えるか、100%であるか、または前記割合のいずれか2つを上下限とする範囲内にある。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は約95%を超える。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は95%を超える。

30

【0078】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、前記繫留鎖を介して前記IL-7が連結される、IL-7受容体の細胞外ドメインをコードする第3の核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記IL-7受容体の細胞外ドメインは、哺乳動物（ヒトなど）に由来するものである。いくつかの実施形態において、第3の核酸は、配列番号4のヌクレオチド配列と同一性を有するヌクレオチド配列を含む。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%を超えるか、100%であるか、または前記割合のいずれか2つを上下限とする範囲内にある。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は約95%を超える。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は95%を超える。

40

【0079】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、膜貫通ドメインをコードする第4の核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記膜貫通ドメインは、IL-7受容体の膜貫通ドメイン、またはIL-21受容体の膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施

50

形態において、前記膜貫通ドメインは、IL-7受容体の膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態において、前記IL-7受容体の膜貫通ドメインは、哺乳動物（ヒトなど）に由来するものである。いくつかの実施形態において、第3の核酸と第4の核酸を合わせた配列は、IL-7受容体の細胞外ドメインとIL-7受容体の膜貫通ドメインをコードし、配列番号4のヌクレオチド配列と同一性を有するヌクレオチド配列を含む。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%を超えるか、100%であるか、または前記割合のいずれか2つを上下限とする範囲内にある。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は約95%を超える。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は95%を超える。

10

【0080】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、IL-21受容体の細胞内ドメインをコードする第5の核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記IL-21受容体の細胞内ドメインは、哺乳動物（ヒトなど）に由来するものである。いくつかの実施形態において、第5の核酸は、配列番号5のヌクレオチド配列と同一性を有するヌクレオチド配列を含む。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%を超えるか、100%であるか、または前記割合のいずれか2つを上下限とする範囲内にある。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は約95%を超える。そのような実施形態のいくつかにおいて、この同一性は95%を超える。

20

【0081】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、誘導型プロモーターをさらに含んでいてもよい。そのような実施形態のいくつかにおいて、キメラサイトカイン受容体の転写は、前記誘導型プロモーターと相互作用する特定の薬剤の存在下で誘導することができる。

【0082】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、さらに誘導型細胞傷害性遺伝子をコードすることができる。そのような実施形態のいくつかにおいて、前記細胞傷害性遺伝子の転写を誘導することにより、前記ポリヌクレオチドを含む細胞の殺傷を誘導することができる。細胞傷害性遺伝子の例として、チミジンキナーゼ、チミジル酸キナーゼに融合されたチミジンキナーゼ、オキシドレダクター、デオキシシチジンキナーゼ、ウラシルホスホリボシルトランスクフェラーゼ、シトシンデアミナーゼ、およびウラシルホスホリボシルトランスクフェラーゼに融合されたシトシンデアミナーゼなどのタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。いくつかの実施形態において、チミジンキナーゼが好ましい。そのような実施形態のいくつかにおいて、前記チミジンキナーゼはSR39TKを含む。SR39TKを含むヌクレオチド配列の一例として、配列番号7のヌクレオチド配列が挙げられる。

30

【0083】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、タンパク質をコードする配列を2つ以上含んでいてもよい。そのような実施形態のいくつかにおいて、前記ポリヌクレオチドは、リボソームスキップ配列を含んでいてもよい。リボソームスキップ配列の一例として、T2Aスキップ配列が挙げられる。T2Aスキップ配列を含むヌクレオチド配列の一例として、配列番号6のヌクレオチド配列が挙げられる。

40

【0084】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、形質導入マーカーをコードする核酸を含んでいてもよい。そのようなマーカーは、ポリヌクレオチドの形質導入に成功し、このポリヌクレオチドにコードされたマーカーの発現に成功した細胞の特定および取得に有用である。形質導入マーカーの一例として、切断型CD19(CD19^t)分子が挙げられる。

【0085】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、本明細書で提供されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを含む。

50

【 0 0 8 6 】ベクター

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターに関する。いくつかの実施形態において、このベクターは、細胞への形質導入に適したものであるか、細胞への形質導入が行えるように構成されている。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、ウイルスベクターを含む。ウイルスベクターの例として、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよびアデノウイルスベクターが挙げられる。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターを含む。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態において、ベクターは、本明細書で提供される、キメラサイトカイン受容体をコードするポリヌクレオチドと、CARをコードするポリヌクレオチドとを含んでいてもよい。

【 0 0 8 8 】細胞

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、本明細書で提供されるポリヌクレオチドを含む細胞、または本明細書で提供されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CARをコードするポリヌクレオチドまたはCARタンパク質をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記細胞はT細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T細胞またはCD4+T細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T細胞またはCD4+T細胞に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞である。

【 0 0 8 9 】治療方法

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、対象においてがんを治療または緩和する方法に関する。そのような方法のいくつかは、がんの治療または緩和を必要とする対象に、本明細書で提供される細胞を投与することを含む。いくつかの実施形態において、前記細胞は、キメラサイトカイン受容体または該キメラサイトカイン受容体をコードするポリヌクレオチドと、CARまたは該CARをコードするポリヌクレオチドとを含む。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態において、前記がんとして、大腸がん、乳がん、卵巣がん、肺がん、膵臓がん、前立腺がん、悪性黒色腫、腎臓がん、膵臓がん、脳腫瘍、膠芽腫、神経芽腫、髓芽腫、肉腫、骨がん、肝臓がんなどの固形腫瘍；または白血病、多発性骨髄腫などの非固形腫瘍を挙げることができる。いくつかの実施形態において、前記がんは脳腫瘍を含む。

【 0 0 9 1 】

本明細書で提供されるいくつかのキメラサイトカイン受容体を利用することによって、サイトカインの共投与により対象への治療法を補う必要性が抑えられるか、その必要性がなくなる。例えば、キメラサイトカイン受容体を含んでいないCAR T細胞を対象に投与する場合、外因性サイトカインを共投与して、対象に投与されたCAR T細胞をさらに刺激したり、活性化することができる。本明細書で述べるように、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含むT細胞は、外因性サイトカインの非存在下において十分に刺激および／もしくは活性化された状態で提供することができ、または本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含んでいないT細胞を投与した場合よりも大幅に少ない投与量の外因性サイトカインの存在下において、十分に刺激および／もしくは活性化された状態で提供することができる。いくつかの実施形態において、前記がんの治療または緩和は、前記対象にサイトカインを共投与することを含まない。いくつかの実施形態は、サイ

10

20

30

40

50

トカインを前記対象に共投与することをさらに含み、このサイトカインの投与量は、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含まず、キメラ抗原受容体（CAR）を含む細胞を投与した対象に共投与されるサイトカインの投与量よりも少ない。そのような実施形態のいくつかにおいて、CARとキメラサイトカイン受容体を含む細胞を投与した対象に共投与されるサイトカインの投与量は、キメラサイトカイン受容体を含まず、CARを含む細胞を投与した対象に共投与されるサイトカインの投与量よりも少なくすることができ、その投与量の差は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%もしくは100%を超えてよく、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%もしくは約100%を超えてよく、または前記割合のいずれか2つを上下限とする範囲内の割合であってもよい。

10

【0092】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含むCAR T細胞を投与することによって、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含んでいないCAR T細胞を投与した対象と比べて、対象からの腫瘍の排除が改善される。

【0093】

そのような実施形態のいくつかにおいて、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含むCAR T細胞を投与することによって、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含んでいないCAR T細胞を投与した対象における腫瘍体積と比べて、対象における腫瘍体積が減少する。そのような実施形態のいくつかにおいて、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含むCAR T細胞を投与した対象における腫瘍体積は、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含んでいないCAR T細胞を投与した対象における腫瘍体積と比べて減少させることができ、その腫瘍体積の差は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%もしくは100%を超えてよく、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%もしくは約100%を超えてよく、または前記割合のいずれか2つを上下限とする範囲内にある割合であってもよい。

20

【0094】

そのような実施形態のいくつかにおいて、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含むCAR T細胞を投与することによって、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含んでいないCAR T細胞を投与した対象における腫瘍体積の減少速度よりも速い速度で対象における腫瘍体積が減少する。

30

【0095】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含むCAR T細胞を投与することによって、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含んでいないCAR T細胞を投与した対象の全生存期間と比べて、対象の全生存期間が延長する。

40

【0096】

前記実施形態のいくつかにおいて、前記サイトカインは、IL-7、IL-15およびIL-21から選択される。いくつかの実施形態において、前記サイトカインはIL-21を含む。いくつかの実施形態において、前記細胞は、前記対象の自己細胞である。いくつかの実施形態において、前記対象は、ヒトなどの哺乳動物である。

【0097】

細胞集団の調製方法

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、CARを含む細胞集団を調製する方法に関する。そのような方法のいくつかは、

(a) 本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体をコードするポリヌクレオチドをT細胞に形質導入する工程；

(b) キメラ抗原受容体（CAR）をコードする別のポリヌクレオチドを前記T細胞に形質導入する工程；ならびに

(c) 前記形質導入されたT細胞の活性化および拡大増殖を刺激するのに十分な条件下で

50

、前記 T 細胞を培養する工程
を含み、

前記培養に使用する培地が、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含んでいない T 細胞の活性化および拡大増殖を刺激するのに十分な量よりも少ない量の外因性サイトカインを含むことを特徴とする。

いくつかの実施形態において、工程 (a) の前に工程 (b) を行う。いくつかの実施形態において、工程 (a) と工程 (b) を同時に行う。

【 0 0 9 8 】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体と CAR を含む T 細胞の活性化および拡大増殖を刺激するのに十分な外因性サイトカインの量は、本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体を含まず、CAR を含む T 細胞の活性化および拡大増殖を刺激するのに十分な外因性サイトカインの量よりも少なく、その量の差は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% もしくは 100% を超えるか、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90% もしくは約 100% を超えるか、または前記割合のいずれか 2 つを上下限とする範囲内の割合である。いくつかの実施形態において、前記サイトカインは、IL-7、IL-15 および IL-21 から選択される。いくつかの実施形態において、前記サイトカインは IL-21 を含む。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T 細胞または CD4+T 細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T 細胞または CD4+T 細胞に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、ヒト細胞などの哺乳動物細胞である。

10

20

30

40

【 0 0 9 9 】

いくつかの実施形態は、キメラ抗原受容体 (CAR) を含む細胞集団を調製する方法であって、

(a) 本明細書で提供されるキメラサイトカイン受容体をコードするポリヌクレオチドを T 細胞に形質導入する工程；

(b) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする別のポリヌクレオチドを前記 T 細胞に形質導入する工程；ならびに

(c) 前記形質導入された T 細胞の活性化および拡大増殖を刺激する条件下において前記 T 細胞を培養する工程

を含む方法を含む。

いくつかの実施形態において、T 細胞の培養は、外因性サイトカインを含んでいない培養培地を使用して行われる。いくつかの実施形態において、工程 (a) の前に工程 (b) を行う。いくつかの実施形態において、工程 (a) と工程 (b) を同時に行う。いくつかの実施形態において、前記サイトカインは、IL-7、IL-15 および IL-21 から選択される。

いくつかの実施形態において、前記サイトカインは IL-21 を含む。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T 細胞または CD4+T 細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD8+T 細胞または CD4+T 細胞に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、ヒト細胞などの哺乳動物細胞である。

【 0 1 0 0 】

キットおよびシステム

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、T 細胞集団の調製用のキットに関する。いくつかの実施形態において、キットは、本明細書で提供されるポリヌクレオチドまたはベクターを含んでいてもよい。

【 0 1 0 1 】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、T 細胞集団の調製用のシステムを含む。いくつかの実施形態において、システムは、本明細書で提供されるポリヌクレオチドまたはベクターを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、システムは、本明細書で提供される細胞をさらに含んでいてもよい。

50

【実施例】**【0102】**実施例1 - 方法

IL21シグナル伝達用キメラサイトカイン受容体（CCRIL21）コンストラクトの設計
 CCRIL21コンストラクトは、CD19マーカータンパク質、T2Aリボソームスキップ配列およびCCRIL21タンパク質がこの順序でコードされた1つのリーディングフレームを含む（図2A）。発現はヒト伸長因子1（EF1）プロモーターで駆動される。このCCRIL21タンパク質は、内因性IL7Rの細胞外ドメインと膜貫通ドメインを含む細胞外ドメインを含み、この細胞外ドメインに、可動性リンカー配列を介してサイトカインIL7が繋留されている。IL7Rの膜貫通ドメインの細胞内側の末端には、内因性IL21Rの細胞内ドメインが存在する。表1に、IL21シグナル伝達用キメラサイトカイン受容体（CCRIL21）の構成要素の核酸配列を示す。表1の各配列を記載順に連結したものが、CCRIL21の全配列となる。表2に、本明細書で提供される特定の実施形態で有用なさらなる構成要素の核酸配列を示す。

10

【0103】T細胞の作製および培養

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）から磁気活性化セルソーティングによりCD8+T細胞を単離し、Dynabeads（ライフテクノロジーズ社）を用いてCD3/CD28ビーズで刺激した。2日後、レンチウイルスを用いてこの細胞にCCRIL21および/またはCARの導入遺伝子を形質導入した。刺激後10日目～24日目に、CARを形質導入したT細胞の培養物にメトトレキサート（MTX）を加え、CARを発現する集団を選択した。また、刺激後24日目に、CD19発現の有無で選別する磁気ソーティングにより、CCRIL21を発現する細胞を濃縮した（図2B）。選別した集団を急速拡大培養法（REP法）に供した。これについては、例えば、Wang, X. et al. J. Immunother. 35, 689-701 (2012)を参照されたい。REP法の5日目～14日目にMTXを補充した。REP法の開始から14日目に、フローサイトメトリーにより、CCRIL21コンストラクトおよび/またはCARコンストラクトを発現するT細胞集団が精製されていることを確認し、後に実施するアッセイのためにT細胞を凍結保存した。T細胞を解凍後、直ちに2回目のREP法に供し、14日後にアッセイを開始した。

20

【0104】アポトーシス状態アッセイ

アネキシンVと7-AAD（BioLegend社）で細胞を染色し、生存率とアポトーシスの状態を調べた。培養物から細胞を分離して、96ウェルの丸底プレートに加え、BioLegend社のアネキシンV染色バッファーで2回洗浄した。細胞をアネキシンVと7-AADで染色した後、さらにアネキシンVバッファーで2回洗浄し、12時間以内にフローサイトメトリーで分析した。

30

【0105】細胞周期アッセイ

Millipore社のMuse Cell Cycle Analysisキットを使用して、T細胞の有糸分裂活性の定量評価を行った。このキットを用いて、フローサイトメトリーにより個々の細胞の細胞周期段階を判定した。ヨウ化プロピジウム染色により求められるDNA含有量に基づいて細胞をゲーティングし、細胞周期段階ごとに分類した。

40

【0106】細胞傷害性アッセイ

標的細胞をクロム51で標識し、T細胞群と様々な比率で4時間共培養した。上清中に放出されたクロム51を測定することにより標的細胞の溶解率を定量評価した（Cooper, L.J.N. et al. Blood 101, 1637-1644 (2003)）。

【0107】細胞内サイトカインの染色

T細胞とEGFRvIIIを発現するK562細胞（K562-vIII）を、エフェクター細胞と標的細

50

胞の比率が2：1になるようにして6時間共培養した。共培養の開始から2時間後に、T細胞からの分泌タンパク質の放出を阻止するため、輸送阻害剤カクテルを加えた。共培養の終了後、細胞の表面マーカーを染色し、CytoFix/CytoPermキット（BD）を用いて固定し、透過処理を行った後、細胞内の分泌タンパク質を染色した。

【0108】

リン酸化フローサイトメトリー

シグナル伝達タンパク質のリン酸化状態は、Krutzik, P.O. et al., Cytometry 55A, 61-70 (2003)に記載の方法と同様にして、フローサイトメトリーにより評価した。濃PFAを細胞培養ウェルに直接加えた後、70%エタノールで細胞の透過処理を行った。抗リン酸化STAT抗体（BioLegend社）を用いて染色を行った。

10

【0109】

標的細胞の混合物を用いたフローサイトメトリーによる細胞傷害性アッセイ

CAR T細胞を、CD19^t（オフターゲット）を発現するK562細胞とEGFRvIII（オンターゲット）を発現するK562細胞の混合物と共に培養した。共培養後、フローサイトメトリーで集団を選別し、死細胞を選択的に標識する色素を用いて、各標的細胞集団の殺傷率を評価した。

【0110】

マウスを用いた実験

キメラサイトカイン受容体（CCR）を発現するCAR T細胞のインビボでの抗腫瘍効果は、動物実験委員会（IACUC）が承認したプロトコルに従い、膠芽腫同所移植モデルを用いて評価した。GFPとホタルルシフェラーゼを発現する200,000個のヒトU87細胞を、10～12週齢の雄性NSGマウスに頭蓋内注入した。腫瘍の生着は、D-ルシフェリンをマウスに皮下注射し、ホタルルシフェラーゼの発光を検出する生物発光イメージングにより確認した。その後、1群あたり4～5匹からなる複数の実験群にマウスを振り分けた。7日後に、 1×10^6 個のT細胞を頭蓋内の腫瘍注入部位に直接注入した。その後、90日目まで生物発光イメージングにより腫瘍の発達をモニターした。

20

【0111】

実施例2 - CCRIL21によるIL-21シグナル伝達の再現

CD8+T細胞において、外因性のIL-21は、共通鎖と複合体を形成したIL-21受容体に結合し、このヘテロ二量体からなる受容体複合体により、STAT3とSTAT5のリン酸化を含むIL-21関連シグナル伝達イベントが誘導される。

30

【0112】

初代CD8+ヒトT細胞を、サイトカインの非存在下またはIL-21（10ng/mL）の存在下で14時間培養した後、フローサイトメトリーにより、リン酸化STAT3およびリン酸化STAT5の有無に関する分析を行った。図3に示すように、IL-21の非存在下で培養したCCRIL21含有細胞は、IL-21の存在下で培養したCCRIL21非含有対照細胞と実質的に同程度のリン酸化STAT3レベルおよびリン酸化STAT5レベルを示した。このように、CCRIL21は、初代CD8+ヒトT細胞においてIL-21のシグナル伝達イベントを再現することが可能であった。

40

【0113】

実施例3 - CCRIL21を介した、サイトカイン非依存性の細胞周期の進行および細胞の生存

T細胞の増殖と生存に対するCCRIL21の効果をインビトロで評価するため、CCRIL21を発現するT細胞またはMock T細胞を外因性サイトカインの非存在下で培養した。2日後に細胞周期の進行を調べ（図4A）、6日後に細胞のアポトーシスの状態を調べた（図4B）。コントロールとして、Mock T細胞を10ng/mLのIL-21の存在下でも培養した。

【0114】

図4Aに示すように、IL-21の非存在下で培養したCCRIL21含有細胞におけるS期の細胞とG2/M期の細胞の比率は、IL-21の存在下で培養したCCRIL21非含有対照細胞におけるS期の細胞とG2/M期の細胞の比率と実質的に同程度であった。さらに、IL-21の非存

50

在下で培養したCCRIL21含有細胞におけるS期の細胞とG2/M期の細胞を合わせた割合は、IL-21の非存在下で培養した対照細胞におけるS期の細胞とG2/M期の細胞を合わせた割合よりも有意に高かった。

【0115】

図4Bに示すように、アポトーシスを起こした細胞と死細胞を合わせた割合は、IL-21の非存在下で培養したCCRIL21含有細胞と、IL-21の存在下で培養したCCRIL21非含有対照細胞とで実質的に同程度であった。

【0116】

実施例4 - CCRIL21を発現するCAR T細胞のプライミングによるその細胞傷害性の増強

EGFRvIIIを標的とするCAR (806CAR) を含むT細胞または806CARとCCRIL21を含むT細胞の活性を細胞傷害性アッセイにより測定した。4時間のクロム放出アッセイにより、ヒト膠芽腫U87細胞株に対するCCRIL21発現CAR T細胞の細胞傷害性が増強されていることが示された(図5A)。

10

【0117】

また、Lamp-1、グランザイムB、パーフォリンなどの、細胞傷害性に関するタンパク質の量の測定も行った。各T細胞とK562-EGFRvIII細胞を6時間にわたり共培養した後、フローサイトメトリーにより、細胞表面のLamp-1の有無と、細胞傷害性タンパク質であるグランザイムBとパーフォリンのベースライン発現量を調べた(図5B)。CCRIL21を発現する細胞では、脱顆粒タンパク質であるLamp-1(LAMP-1)の発現量と、細胞傷害性タンパク質であるグランザイムB(GZMB)およびパーフォリン(PRF)の発現量が、806CARのみを含むT細胞よりも高かった。

20

【0118】

実施例5 - CCRIL21によりプライミングされた細胞傷害性のCAR標的細胞に対する限定的作用

806CARを含むT細胞または806CARとCCRIL21を含むT細胞の細胞傷害活性を、標的(EGFRvIII)を発現する標的細胞、または標的ではない対照としてのCD19tを発現する細胞を用いて測定した。CD19t(オフターゲット)を発現するK562細胞とEGFRvIII(オンターゲット)を発現するK562細胞の混合物と各T細胞を共培養した。共培養後、フローサイトメトリーにより細胞集団を選別し、各標的集団の殺傷率を評価した。

30

【0119】

図6に示すように、オフターゲット腫瘍細胞に対する傷害性はCCRIL21により増強されていないことから、CCRIL21による細胞傷害性の増強は、CARが標的とする細胞に限定されていることが示された。

【0120】

実施例6 - 806CAR T細胞における、主要な転写因子を介したCCRIL21によるエフェクター機能の調節

806CARを含むT細胞または806CARとCCRIL21を含むT細胞を、EGFRvIIIを発現するK562細胞と1:1の比率になるようにして24時間培養した。806CARのみを含むT細胞を含む培養物にIL-21を接触させた。

40

【0121】

転写因子であるBATFとT-betの量を測定した(図7)。BATFとT-betは、細胞傷害性機能の獲得と維持に関与している。CCRIL21は、BATFやT-betなどの転写因子をアップレギュレートすることにより、CAR T細胞に対するIL-21の効果を再現した。この結果から、CCRIL21を発現するCAR T細胞がプライミングされ、その細胞傷害性が増強されたことが示された。

【0122】

実施例7 - CCRIL21の発現による、インビボでのCAR T細胞の腫瘍排除能の増強

マウスの頭蓋内にヒト膠芽腫の腫瘍を移植した。7日後、腫瘍特異的なCAR (806CAR) を発現するT細胞をマウスの頭蓋内に投与した。生物発光イメージングにより腫瘍量を測定したところ、CCRIL21を発現する806CAR T細胞を投与したマウスでは、806CA

50

Rのみを発現するT細胞を投与したマウスよりも腫瘍除去率が高かった(図8A)。さらに、CCRIL21を発現する806CAR T細胞を投与したマウスは、806CARのみを発現するT細胞を投与したマウスよりも有意に長い生存期間を示した(図8B)。

【表1】

特徴 [配列番号]	配列
GMCSF の シグナル配列	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCAACCC CAGCATTCCCTGATCCCA
[配列番号 1]	
ヒト IL7 サイトカイン配列 (開始コドン除去) [配列番号 2]	GATTGTGATATTGAAGGTAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTCT AATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTA GCAATTGCCTGAATAATGAATTAACTTTTAAAAGACATATCTGTGA TGCTAATAAGGAAGGTATGTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGA GGCAATTCTTAAATGAATAGCACTGGTGTGATTTGATCTCCACTTAT TAAAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACGGCCA GGTTAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCCAACCAAC AAAGAGTTTGGAGAGAAAATAATCTTAAAGGAACAGAAAAACTGA ATGACTTGTGTTCTAAAGAGACTATTACAAAGAGATAAAACTTGTT GGAATAAAATTGATGGGCACTAAAGAACAC
可動性リンカー配列 (グリシン ₄ セリン ₁) ₂ [配列番号 3]	GGAGGCGGTGGGAGCGGAGGCGGTGGGAGC
ヒト IL7R の 細胞外ドメインおよび 膜貫通ドメイン [配列番号 4]	ATGACAATTCTAGGTACAACCTTTGGCATGGTTTTCTTACTTCAA GTCGTTCTGGAGAAAGTGGCTATGCTAAAATGGAGACTTGGAAAG ATGCAGAACTGGATGACTACTCATTCTCATGCTATGCCAGTTGGAA GTGAATGGATCGCAGCACTCACTGACCTGTGCTTTGAGGACCCAG ATGTCACACATACCAATCTGAAATTGAAATATGTGGGCCCTCGTG GAGGTAAGTGCCTGAATTTCAGGAAACTACAAGAGATATATTCAT CGAGACAAAGAAATTCTACTGATTGGAAAGAGCAATATATGTGTGA AGGTTGGAGAAAAGAGTCTAACCTGCAAAAAAATAGACCTAACCACT ATAGTTAACCTGAGGCTCCTTGACCTGAGTGTCTATCGGGA AGGAGCCAATGACTTGTGGTGACATTAAACATCACACTTGCAAA AGAAGTATGTAAGTTAATGCACGATGTAGCTACCGCCAGGAA AAGGATGAAAACAAATGGACGCATGTGAATTATCCAGCACAAAGCT GACACTCCTGCAGAGAAAGCTCCAACCGGCAGCAATGTATGAGATT AAAGTTCGATCCATCCCTGATCACTATTAAAGGCTCTGGAGTGA ATGGAGTCCAAGTTATTACTTCAGAACTCCAGAGATCAATAAGCT CAGGGGAGATGGATCCTATCTTACTAACCATCAGCATTGAGTTT TTCTCTGTCGCTCTGTTGGTCATCTGGCCTGTGTGTTATGG

10

20

30

40

50

特徴 [配列番号]	配列
ヒト IL21R の 細胞内ドメイン [配列番号 5]	AGCCTGAAAACACACCCCTCTGTGGCGGCTGTGGAAGAAAATCTGG GCCGTGCCATCTCCTGAGCGGTTCTTCATGCCTCTGTACAAGGGCT GCAGCGGCGACTTCAAGAAATGGGTCGGAGCCCCCTTTACCGGCA GCTCTCTGGAACCTGGACCTTGGAGCCCTGAGGTGCCAGCACAC TGGAAAGTGTACAGCTGTCAACCCTCCTAGAAGGCCGCCAAGAGAC TGCAGCTGACAGAGCTGCAAGAGCCTGCCAGCTGGTGGAATCTG ATGGCGTGCCAACGCCTAGCTTCTGGCCCACAGCTCAGAATAGCG GCGGCTCTGCCTACAGCGAGGAAAGAGATAGACCCCTACGGCCTGG TGTCCATCGACACCGTGACAGTGCTGGATGCCGAGGGACCTTGTA CCTGGCCTTGTAGCTGCGAGGACGATGGCTACCCCTGCTCTGGATC TGGACGCTGGCCTTGAGCCTCTCCAGGACTGGAAGATCCTCTGC TGGACGCCGAAACAACCGTGCTGTCTTGCGCTGTGTCTGCCG GATCTCCTGGACTTGGAGGCCCTCTGGGAAGCCTGCTGGATAGAC TGAAACCTCCTCTGGCCGACGGCGAAGATTGGCTGGTGGACTTC CTTGGGGCGGAAGATCTCCAGGCGGAGTGTCTGAGTCTGAAGCCG GTTCTCCACTGGCCGGCCTGGACATGGATACCTCGATTCTGGCTT CGTGGGCAGCGACTGTAGCAGCCCTGTGGAATGCGACTTCACAAG CCCTGGCGACGAGGGCCCACCTAGAAGCTATCTGAGACAGTGGGT CGTGATCCCTCCACCTCTGTCTAGTCCTGGACCTCAGGCTTCT

10

20

30

40

50

【表2】

特徴 [配列番号]	配列
T2A [配列番号 6]	GGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGT GGAGGAGAATCCCGGCCCT
SR39TK 遺伝子 [配列番号 7]	ATGCCACGCTACTGCAGGTTATAGACGGTCCCCACGGGATG GGGAAAACCACCAACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTCGCG CGACGATATCGTCTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGT GCTGGGGCTTCCGAGACAATCGGAACATCTACACCACACAACA CCGCCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGACGCCGGTG GTAATGACAAGCGCCCAGATAACAATGGCATGCCATTGCCGTG ACCGACGCCGTTCTGGCTCCTCATATCGGGGGGGAGGCTGGGAG CTCACATGCCCGCCCCCGGCCCTACCATCTTCCTCGACCGCC ATCCCATGCCATTGCTGTGCTACCCGGCCGCGCGTACCTTA TGGGCAGCATGACCCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCGTGGCCCTC ATCCCGCCGACCTTGCCCGCACCAACATCGTGTGCTGGGCCCT TCCGGAGGACAGACACATCGACCGCCTGGCAAACGCCAGCGCC CCGGCGAGCGGCTGGACCTGGCTATGCTGGCTGCGATTGCCCGC GTTTACGGGCTACTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGTGCAGG GGGTCGTGGCGGGAGGACTGGGGACAGCTTCGGGGACGGCCG TGCCGCCCGAGGGTGCCGAGCCCCAGAGCAACGCCGGGCCACG ACCCCATATCGGGGACACGTTATTACCCCTGTTGGGCCCG GTTGCTGGCCCCAACGGCGACCTGTATAACGTGTTGCCCTGG CCTTGGACGTCTGGCCAAACGCCCTCCGTTCCATGCACGTCTTA TCCTGGATTACGACCAATCGCCCGCCGGCTGCCGGACGCCCTG CTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACCCACGTCACCACCC CGGCTCCATACCGACGATATGCGACCTGGCGCGCACGTTGCC GGGAGATGGGGAGGCTAAC

10

20

30

【0123】

実施例8 - CCRIL21を発現するB7H3CAR T細胞のプライミングによる、腫瘍細胞に対するその細胞傷害性の増強

CCRIL21を発現するCAR T細胞がプライミングされることにより、腫瘍細胞に対するその細胞傷害性が増強されるのかどうかを評価するために、CD8+ B7H3CAR T細胞とK562腫瘍細胞を、T細胞1個に対してK562腫瘍細胞が2個となる比率で共培養した。Incucyte S3生細胞蛍光イメージング装置を用いて、腫瘍細胞の増殖を1週間にわたってモニターした。

【0124】

図9Aのデータに示すように、B7H3CAR T細胞では最終的に腫瘍細胞の数が上回ったが、CCRIL21を発現するCAR T細胞は、試験期間中にわたって腫瘍の増殖を抑制することができた。

【0125】

これらのデータから、CCRIL21を発現するCAR T細胞が持続的な細胞傷害能を有することが示された。さらに、これらの結果から、806CAR T細胞と同様に、B7H3CAR T細胞においてもCCRIL21が細胞傷害性を増強させることができた。

【0126】

実施例9 - エフェクタータンパク質の発現増加によりCCRIL21発現B7H3CAR T細胞がプライミングされたことによる細胞傷害性の増強

40

50

CCRIL21を発現するCAR T細胞において細胞傷害能が増強されることにより、該CAR T細胞がプライミングされ、その細胞傷害性が増強されるかどうかを評価するために、CD8+ B7H3CAR T細胞とK562腫瘍細胞を共培養した後、エフェクタータンパク質の発現を細胞内フローサイトメトリーにより分析した。

【0127】

図9Bのグラフは、生物学的反復を3回とした場合の蛍光強度の中央値(MFI)の平均値を示している。エラーバーは標準偏差を示す。一元配置分散分析による統計解析を行った(n.s.=有意差なし、*p 0.05、***p 0.005)。

【0128】

このデータが示すように、CCRIL21を発現するCAR T細胞では、細胞傷害性タンパク質であるグランザイムB、インターフェロン、およびパーフォリンの発現量がB7H3CAR T細胞よりも高かった。10

【0129】

この結果から、806CAR T細胞と同様に、B7H3CAR T細胞においてもCCRIL21がエフェクタータンパク質の高発現を促すことにより、細胞傷害能を増強させることができた。

【0130】

実施例10 - B7H3CAR T細胞における、主要な転写因子を介したCCRIL21によるエフェクター機能の調節

CCRIL21が主要な転写因子を介してエフェクター機能を調節するのかどうかを明らかにするために、転写因子であるTbetとBATFの発現を細胞内フローサイトメトリーにより評価した。20

【0131】

図10のグラフは、生物学的反復を3回とした場合の蛍光強度の中央値(MFI)の平均値を示している。エラーバーは標準偏差を示す。一元配置分散分析による統計解析を行った(**p 0.01、****p 0.001)。CCRIL21を発現するCAR T細胞では、統計学的に高いレベルのTbetとBATFが確認された。

【0132】

これらのデータから、806CAR T細胞と同様に、B7H3CAR T細胞においてもCCRIL21が主要な転写因子の発現を調節することにより、遺伝子発現を全体的に変化させていることが示された。30

【0133】

本明細書で使用されている「含む(comprising)」という用語は、「含む(including)」、「含む(containing)」または「特徴とする(characterized by)」という用語と同義であるとともに、オープンエンドで包括的な意味であり、本明細書には記載されていないさらなる要素や工程を除外するものではない。

【0134】

前述の説明は、本発明のいくつかの方法および材料を開示するものである。本発明の方法および材料は、変更することができ、製造方法および器具も変更することができる。このような変更は、本開示または本明細書に開示された本発明の実施を考慮に入れて、当業者であれば容易に理解することができる。したがって、本発明は、本明細書に開示された特定の実施形態に限定されず、本発明の真の範囲および要旨において可能なあらゆる変更およびその他の態様を包含する。40

【0135】

本明細書において引用された公開特許出願、非公開特許出願、特許および学術文献を含む(ただしこれらに限定されない)すべての参考文献は、引用によりその全体が本明細書に援用され、本明細書の一部を構成する。引用により援用された文献、特許または特許出願が本明細書の開示内容と矛盾する場合、このような矛盾事項よりも本明細書の記載が採用および/または優先される。

10

20

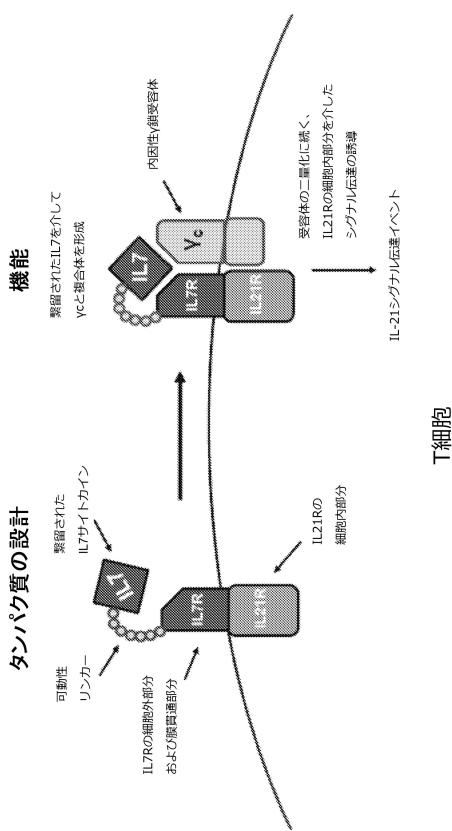
30

40

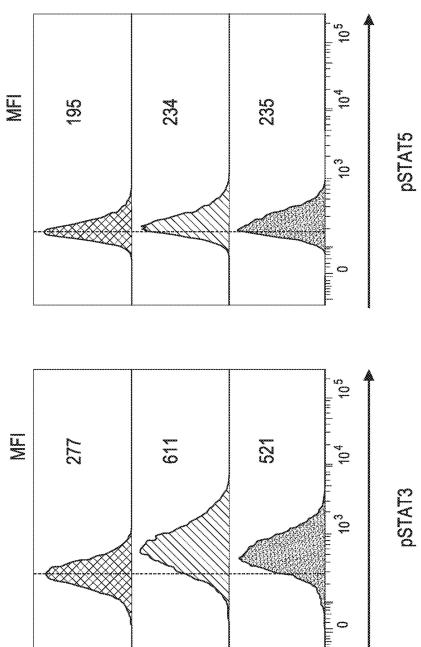
50

〔四面〕

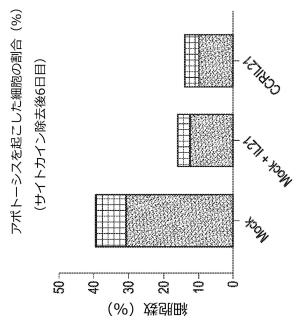
【 図 1 】



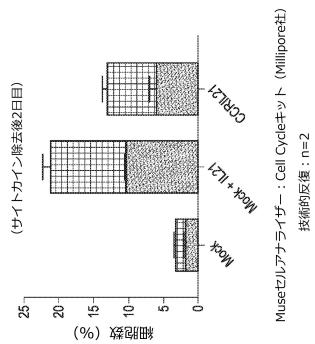
【図3】



【図4A-4B】



細胞周期の進行過程における各細胞の割合(%)
(サイトカイン除去後2日目)



アボトーシスの状態
 ADD- / アキシシンV+ (アボトーシスの発生)
 ADD+ / アキシシンV+ (元滅)
 各群につき試験した細胞数 : 10,000個

AB
※

44

10

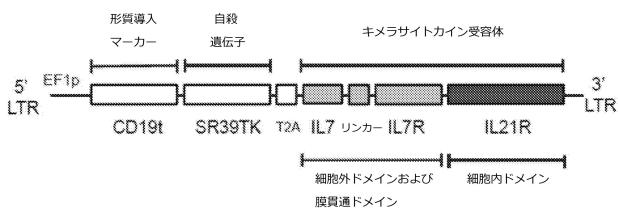
20

30

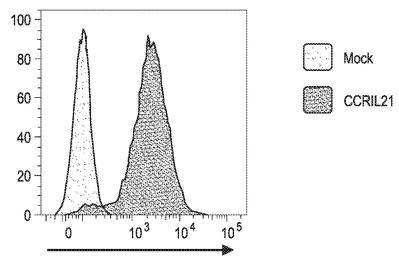
40

50

【 図 2 A - 2 B 】



四 2A



义 2B

10

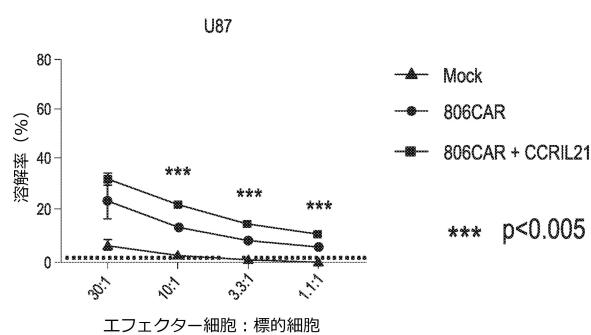
20

30

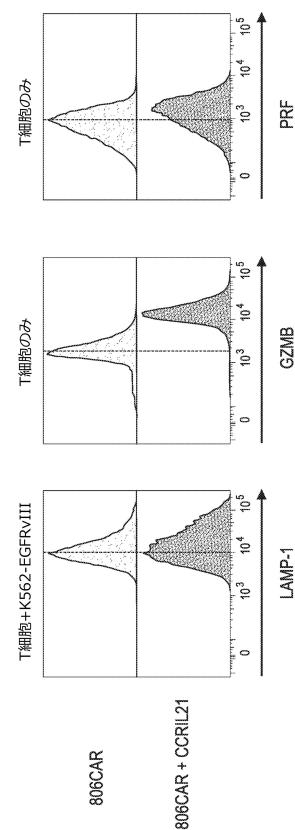
40

50

【図5A】



【図5B】



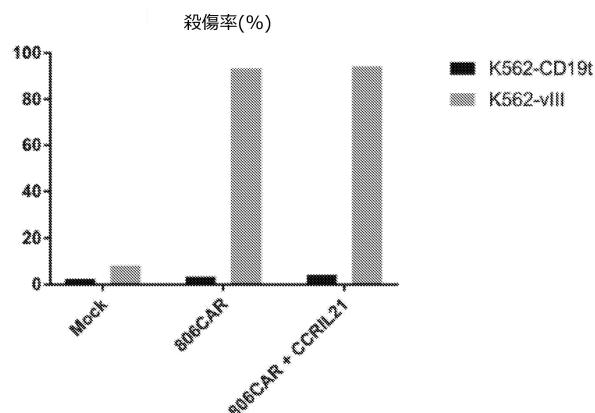
10

20

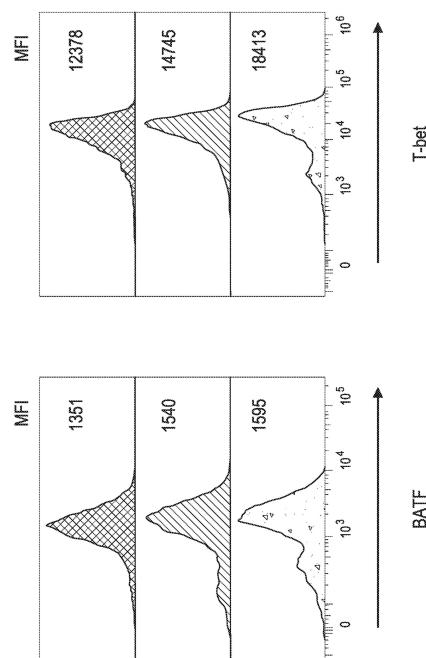
30

40

【図6】



【図7】



50

【図 8 A - 8 B】

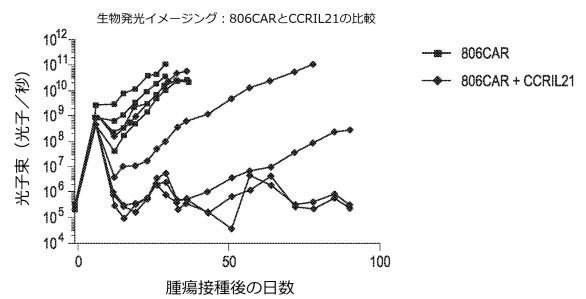


図8A

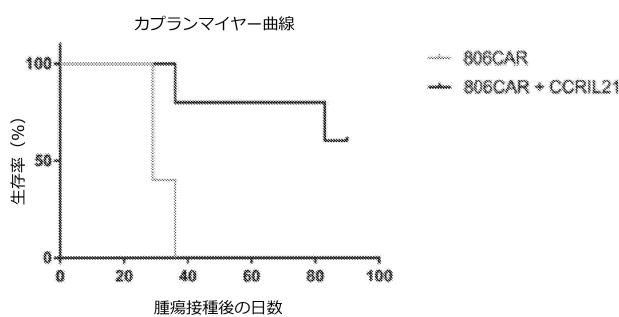
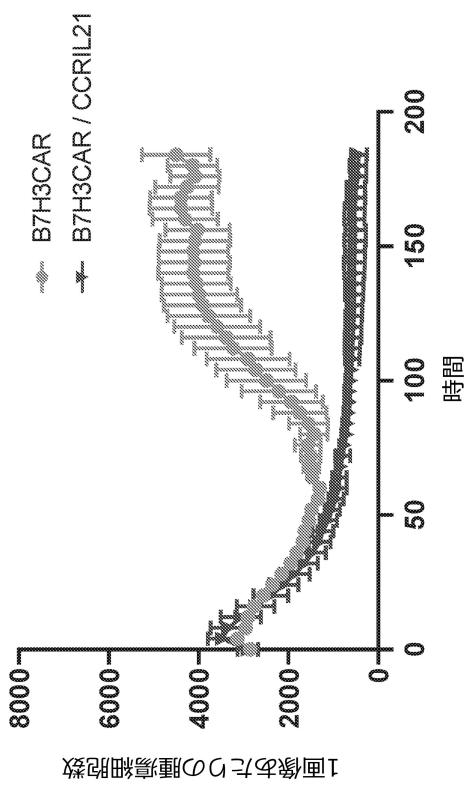


図8B

【図 9 A】



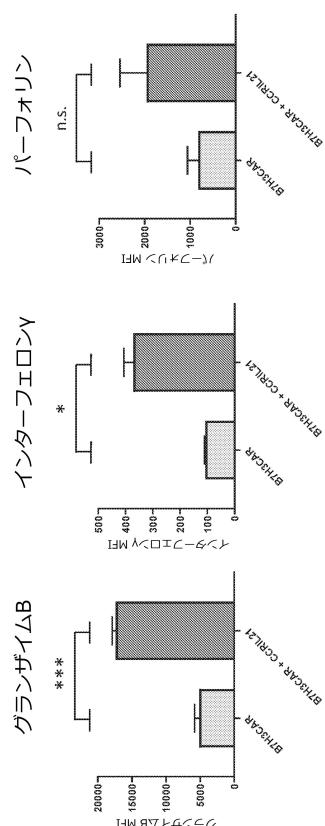
10

20

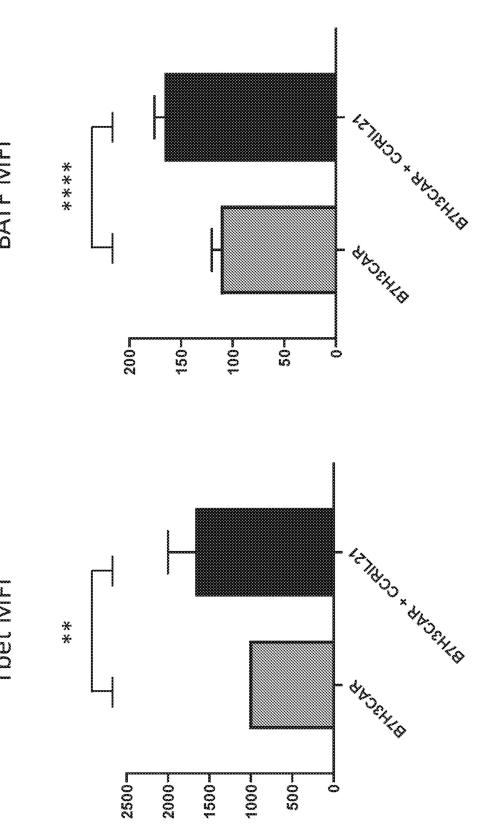
30

40

【図 9 B】



【図 10】



50

【配列表】

2022519704000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
		PCT/US 20/17067
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - A61K 38/00, A61K 48/00, C07K 14/46 (2020.01)		
CPC - A61K 35/17, A61K 39/0011, A61P 35/00, C07K 14/46, C07K 14/7155, C07K 16/3069, C12N 5/0636, A61K 2039/5158, A61K 2039/55522, C07K 2317/56, C07K 2317/569, C07K 2317/622, C07K 2319/00, C07K 2319/70		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/161064 A1 (F1 ONCOLOGY, INC.) 07 September 2018 (07.09.2018) claims 35-38; para [0271], [0681], [0953], [1084]; Fig 19A	1-3
Y	MITTAL, et al. Improved Treatment of Breast Cancer with Anti-HER2 Therapy Requires Interleukin-21 Signaling in CD8+ T Cells. Cancer Res, 15 January 2016, Vol 76, No 2, pp 1-11; Abstract	1-3
Y	NARA, et al. WSB-1, a novel IL-21 receptor binding molecule, enhances the maturation of IL-21 receptor. Cell Immunol. 2011, Vol 269, No 1, pp 54-59; pg 55, pg 56, col 1	2, 3/2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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		
Date of the actual completion of the international search 06 April 2020		Date of mailing of the international search report 01 MAY 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 20/17067	
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:	10	
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: 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:		
3.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-59 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.	30	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of 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.	40

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード(参考)

C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55	
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861	Z
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 0 7 K	16/24 (2006.01)	C 0 7 K	16/24	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	

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,N
E,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,JO,JP,KE,K
G,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,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 サクスピー , クリストファー ピー .

アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 1 シアトル , ナインス アベニュー 1 9 0 0 シアトル
チルドレンズ ホスピタル , ディービーエイ シアトル チルドレンズ リサーチ インスティテュート内

F ターム(参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C084 AA02 DA01 DA12 NA14 ZB26 ZB27 ZC75

4C087 AA01 AA02 BB44 BB65 NA14 ZB26 ZB27 ZC75

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA22 EA28 FA74