(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2020-537517
(P2020-537517A)
(43)公表日　令和2年12月24日(2020.12.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/12	(2006.01)	C12N	15/12		4B065
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4C084
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C085
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C087
C12N 7/01	(2006.01)	C12N	7/01		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 27 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-519402 (P2020-519402)
(86)(22)出願日　平成30年10月4日 (2018.10.4)
(85)翻訳文提出日　令和2年6月1日 (2020.6.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/054451
(87)国際公開番号　WO2019/071032
(87)国際公開日　平成31年4月11日 (2019.4.11)
(31)優先権主張番号　62/568,786
(32)優先日　平成29年10月5日 (2017.10.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(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　９０２３２，カルバー　シティ，９９２０　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　100208580
弁理士　三好　玲奈
(74)代理人　100191086
弁理士　高橋　香元

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＴＨ１及びＴＨ２を刺激する多価抗原

(57)【要約】
個体においてＴｈ１又はＴｈ２バイアス免疫応答を誘発するための組換え核酸の組成物、方法、及び使用が提示される。いくつかの実施形態では、この核酸は、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルをコードする第１の核酸セグメントと、ポリトープペプチド及びＴｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープをコードする第２の核酸セグメントとを含む。任意選択により、Ｔｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープは、ポリトープペプチドの一部である。組換え核酸によってコードされる組換えタンパク質を個体の抗原提示細胞で発現させて、この個体においてＴｈ１又はＴｈ２バイアス免疫応答を誘発できるように、この組換え核酸を、ウイルス発現ベクター、細菌発現ベクター、又は酵母発現ベクターに挿入することができる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルをコードする第１の核酸セグメント；
ポリトープペプチド及びＴｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープをコードする第２の核酸セグメントであって、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが、任意選択により前記ポリトープペプチドの一部である、第２の核酸セグメントを含み、
前記第１及び第２の核酸セグメントが同じリーディングフレーム内に存在する、組換え核酸。
【請求項２】
ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルが、エンドソーム輸送シグナル、後期エンドソーム輸送シグナル、又はリソソーム輸送シグナルである、請求項１に記載の組換え核酸。
【請求項３】
前記リソソーム輸送シグナルが、ＬＡＭＰ１－膜貫通ドメインペプチド、ＭＨＣクラスＩＩ分子のβ鎖の細胞質尾部からなる群から選択される、請求項１又は２に記載の組換え核酸。
【請求項４】
リソソーム輸送シグナルが、モチーフＴｙｒ－Ｘ－Ｘ－疎水性残基を含むペプチドである、請求項１～３のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項５】
前記ポリトープが複数の選別されたネオエピトープペプチドを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項６】
前記選別されたネオエピトープペプチドが、個体のＭＨＣ－ＩＩ複合体に対して２００ｎＭ以下の結合親和性を有するように選別されている、請求項５に記載の組換え核酸。
【請求項７】
前記選別されたネオエピトープペプチドが、既知のヒトＳＮＰ及び体細胞変異に対して選別されている、請求項５又は６に記載の組換え核酸。
【請求項８】
共刺激分子、免疫刺激性サイトカイン、及びチェックポイント阻害を妨げる又はダウンレギュレートするタンパク質の少なくとも１つをコードする第３の核酸セグメントをさらに含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項９】
前記共刺激分子が、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ３０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＩＣＯＳ－Ｌ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＣＤ７０、ＯＸ４０Ｌ、４－１ＢＢＬ、ＧＩＴＲ－Ｌ、ＴＩＭ－３、ＴＩＭ－４、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＴＬ１Ａ、ＩＣＡＭ－１、及びＬＦＡ３からなる群から選択される、請求項８に記載の組換え核酸。
【請求項１０】
前記免疫刺激性サイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１５スーパーアゴニスト（ＡＬＴ８０３）、ＩＬ－２１、ＩＰＳ１、及びＬＭＰ１からなる群から選択される、請求項８又は９に記載の組換え核酸。
【請求項１１】
前記妨げるタンパク質が、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＴＩＭ１受容体、２Ｂ４、又はＣＤ１６０の抗体又はアンタゴニストである、請求項８～１０のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項１２】
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが前記ポリトープのＮ末端に存在する、請求項１～１１のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項１３】
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが前記ポリトー

プのＣ末端に存在する、請求項１～１２のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項１４】
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが、前記選別されたネオエピトープペプチドの少なくとも１つに存在する、請求項１～１３のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項１５】
前記選別されたネオエピトープペプチドが、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープの少なくとも１つを有するように選別されている、請求項５～１４のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項１６】
前記選別されたネオエピトープの少なくとも１つが改変されて、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープの少なくとも１つを含んでいる、請求項５～１５のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項１７】
前記選別されたネオエピトープの少なくとも１つが改変されて、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープの少なくとも１つが除去されている、請求項５～１６のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項１８】
前記ポリトープペプチドが複数のエピトープを含み、前記ポリトープペプチドにおけるエピトープの少なくとも５０％がＴｈ１特異的分極エピトープである、請求項１～１７のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項１９】
前記ポリトープペプチドが複数のエピトープを含み、前記ポリトープペプチドにおけるエピトープの少なくとも８０％がＴｈ１特異的分極エピトープである、請求項１～１８のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項２０】
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープが、患者特異的ネオエピトープ、患者及び腫瘍特異的ネオエピトープ、又は癌関連エピトープである、請求項１～１９のいずれか一項に記載の組換え核酸。
【請求項２１】
免疫療法用の組換え発現ベクターであって：
組換えタンパク質をコードする核酸配列を含み；
前記組換えタンパク質が、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル、及びＴｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープを有するポリトープペプチドを含み；
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが、任意選択により前記ポリトープペプチドの一部であり；且つ
第１及び第２の核酸セグメントが、同じリーディングフレーム内に存在する、組換え発現ベクター。
【請求項２２】
ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルが、エンドソーム輸送シグナル、後期エンドソーム輸送シグナル、又はリソソーム輸送シグナルである、請求項２１に記載の発現ベクター。
【請求項２３】
リソソーム輸送シグナル伝達要素が、ＬＡＭＰ１－膜貫通ドメインペプチド、ＭＨＣクラスＩＩ分子のβ鎖の細胞質尾部からなる群から選択される、請求項２１又は２２に記載の発現ベクター。
【請求項２４】
リソソーム輸送シグナル伝達要素が、モチーフＴｙｒ－Ｘ－Ｘ－疎水性残基を含むペプチドである、請求項２１～２３のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項２５】
前記ポリトープが、複数の選別されたネオエピトープペプチドを含む、請求項２１～２

４のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項２６】
前記選別されたネオエピトープペプチドが、ＭＨＣ－ＩＩ複合体に対して２００ｎＭ以下の結合親和性を有するように選別されている、請求項２５に記載の発現ベクター。
【請求項２７】
前記選別されたネオエピトープペプチドが、既知のヒトＳＮＰ及び体細胞変異に対して選別されている、請求項２５又は２６に記載の発現ベクター。
【請求項２８】
前記組換え核酸が、共刺激分子、免疫刺激性サイトカイン、及びチェックポイント阻害を妨げる又はダウンレギュレートするタンパク質の少なくとも１つをコードする第３の核酸セグメントをさらに含む、請求項２１～２７のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項２９】
前記共刺激分子が、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ３０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＩＣＯＳ－Ｌ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＣＤ７０、ＯＸ４０Ｌ、４－１ＢＢＬ、ＧＩＴＲ－Ｌ、ＴＩＭ－３、ＴＩＭ－４、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＴＬ１Ａ、ＩＣＡＭ－１、及びＬＦＡ３からなる群から選択される、請求項２８に記載の発現ベクター。
【請求項３０】
前記免疫刺激性サイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１５スーパーアゴニスト（ＡＬＴ８０３）、ＩＬ－２１、ＩＰＳ１、及びＬＭＰ１からなる群から選択される、請求項２８又は２９に記載の発現ベクター。
【請求項３１】
前記妨げるタンパク質が、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＴＩＭ１受容体、２Ｂ４、又はＣＤ１６０の抗体又はアンタゴニストである、請求項２８～３０のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３２】
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが前記ポリトープのＮ末端に存在する、請求項２１～３１のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３３】
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが前記ポリトープのＣ末端に存在する、請求項２１～３２のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３４】
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが、前記選別されたネオエピトープペプチドの少なくとも１つに存在する、請求項２１～３３のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３５】
前記選別されたネオエピトープペプチドが、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープの少なくとも１つを有するように選別されている、請求項２１～３４のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３６】
前記ネオエピトープの少なくとも１つが改変されて、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープの少なくとも１つを含んでいる、請求項２１～３５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３７】
前記ネオエピトープの少なくとも１つが改変されて、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープの少なくとも１つが除去されている、請求項２１～３６のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３８】
前記ポリトープペプチドが複数のエピトープを含み、前記ポリトープペプチドにおけるエピトープの少なくとも５０％がＴｈ１特異的分極エピトープである、請求項２１～３７のいずれか一項に記載の発現ベクター。

【請求項３９】
前記ポリトープペプチドが複数のエピトープを含み、前記ポリトープペプチドにおけるエピトープの少なくとも８０％がＴｈ１特異的分極エピトープである、請求項２１～３８のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項４０】
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープが、患者特異的ネオエピトープ、患者及び腫瘍特異的ネオエピトープ、又は癌関連エピトープである、請求項２１～３９のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項４１】
前記発現ベクターが、ウイルス発現ベクター、細菌発現ベクター、及び酵母発現ベクターからなる群から選択される、請求項２１～４０のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項４２】
前記ウイルス発現ベクターが、Ｅ１及びＥ２ｂ遺伝子が欠失したアデノウイルス発現ベクターである、請求項４１に記載の発現ベクター。
【請求項４３】
前記細菌発現ベクターが、ＣＤ－１４媒介性敗血症を誘発するには不十分である低いレベルで内毒素を発現する遺伝子操作された細菌において発現可能である、請求項４１又は４２に記載の発現ベクター。
【請求項４４】
前記酵母発現ベクターがＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）で発現可能である、請求項４１～４３のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項４５】
個体においてＴｈ１又はＴｈ２バイアス免疫応答を誘導する方法であって：
組換えワクチン組成物を前記個体の抗原提示細胞に送達するか又はそこで産生させるステップ含み；
前記組換えワクチン組成物が、組換え核酸配列にコードされ、且つＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル及びポリトープペプチド、及びＴｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープを含む組換えタンパク質を含み；且つ
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが、任意選択により前記ポリトープペプチドの一部である、方法。
【請求項４６】
ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルが、エンドソーム輸送シグナル、後期エンドソーム輸送シグナル、又はリソソーム輸送シグナルである、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
リソソーム輸送シグナル伝達要素が、ＬＡＭＰ１－膜貫通ドメインペプチド、ＭＨＣクラスＩＩ分子のβ鎖の細胞質尾部からなる群から選択される、請求項４５又は４６に記載の方法。
【請求項４８】
リソソーム輸送シグナル伝達要素が、モチーフＴｙｒ－Ｘ－Ｘ－疎水性残基を含むペプチドである、請求項４５～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記ポリトープが、複数の選別されたネオエピトープペプチドを含む、請求項４５～４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
前記選別されたネオエピトープペプチドが、ＭＨＣ－ＩＩ複合体に対対して２００ｎＭ以下の結合親和性を有するように選別されている、請求項４９又は５０に記載の方法。
【請求項５１】
前記選別されたネオエピトープペプチドが、既知のヒトＳＮＰ及び体細胞変異に対して選別されている、請求項４９～５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】

前記組換え核酸が、共刺激分子、免疫刺激性サイトカイン、及びチェックポイント阻害を妨げる又はダウンレギュレートするタンパク質の少なくとも１つをコードする第３の核酸セグメントをさらに含む、請求項４５～５１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５３】

前記共刺激分子が、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ３０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＩＣＯＳ－Ｌ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＣＤ７０、ＯＸ４０Ｌ、４－１ＢＢＬ、ＧＩＴＲ－Ｌ、ＴＩＭ－３、ＴＩＭ－４、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＴＬ１Ａ、ＩＣＡＭ－１、及びＬＦＡ３からなる群から選択される、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

前記免疫刺激性サイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１５スーパーアゴニスト（ＡＬＴ８０３）、ＩＬ－２１、ＩＰＳｌ、及びＬＭＰ１からなる群から選択される、請求項５２又は５３に記載の方法。

【請求項５５】

前記妨げるタンパク質が、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＴＩＭ１受容体、２Ｂ４、又はＣＤ１６０の抗体又はアンタゴニストである、請求項５２～５４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５６】

前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが前記ポリトープのＮ末端に存在する、請求項４５～５５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５７】

前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが前記ポリトープのＣ末端に存在する、請求項４５～５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５８】

前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープが、前記選別されたネオエピトープペプチドの少なくとも１つに存在する、請求項４５～５７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５９】

前記選別されたネオエピトープペプチドが、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極エピトープの少なくとも１つを有するように選別されている、請求項４９～５８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６０】

前記選別されたネオエピトープペプチドの少なくとも１つが改変されて、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２分極エピトープの少なくとも１つを含んでいる、請求項４９～５９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６１】

前記選別されたネオエピトープペプチドの少なくとも１つが改変されて、前記Ｔｈ１特異的分極エピトープ又は前記Ｔｈ２特異的分極シグナル伝達要素の少なくとも１つが除去されている、請求項４９～６０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６２】

発現ベクターが、ウイルス発現ベクター、細菌発現ベクター、及び酵母発現ベクターからなる群から選択される、請求項４５～６１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６３】

前記ウイルス発現ベクターが、Ｅ１及びＥ２ｂ遺伝子が欠失したアデノウイルス発現ベクターである、請求項６２に記載の方法。

【請求項６４】

前記細菌発現ベクターが、ＣＤ－１４媒介性敗血症を誘発するには不十分である低いレベルで内毒素を発現する遺伝子操作された細菌において発現可能である、請求項６２又は６３に記載の方法。

【請求項６５】

前記酵母発現ベクターがＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）で発現可能であ

る、請求項６２～６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６６】
前記個体が腫瘍を有する場合、前記核酸配列がＴｈ１特異的分極エピトープを含む、請求項４５～６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７】
前記個体が自己免疫疾患又は臓器移植拒絶に関連する症状を有する場合、前記核酸配列がＴｈ２特異的分極エピトープを含む、請求項４５～６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８】
前記ポリトープペプチドが複数のエピトープを含み、前記ポリトープペプチドにおけるエピトープの少なくとも８０％がＴｈ１特異的分極エピトープである、請求項４５～６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９】
前記Ｔｈ１特異的分極エピトープが、患者特異的ネオエピトープ、患者及び腫瘍特異的ネオエピトープ、又は癌関連エピトープである、請求項４５～６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０】
個体においてＴｈ１又はＴｈ２バイアス免疫応答を誘導するための、請求項１～２０のいずれか一項に記載の組換え核酸の使用。
【請求項７１】
個体においてＴｈ１又はＴｈ２バイアス免疫応答を誘導するための、請求項２１～４４のいずれか一項に記載の組換え発現ベクターの使用。
【請求項７２】
請求項１～２０のいずれか一項に記載の組換え核酸を含む抗原提示細胞。
【請求項７３】
請求項２１～４４のいずれか一項に記載の組換えタンパク質を含む抗原提示細胞。
【請求項７４】
請求項１～２０のいずれか一項に記載の組換え核酸を含む組換えウイルス、細菌細胞、又は酵母。
【請求項７５】
請求項７４に記載の組換えウイルス、細菌細胞、又は酵母を含む医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１７年１０月５日に出願された同時係属中の米国仮特許出願第６２／５６８，７８６号明細書の優先権を主張する。
【０００２】
本発明の分野は、特にＴｈ－１又はＴｈ－２バイアス免疫応答を誘発することに関する免疫療法である。
【背景技術】
【０００３】
背景の説明は、本発明を理解するのに有用であり得る情報を含む。本明細書に提供される任意の情報が、先行技術である又は現在請求される発明に関連していることも、特に又は暗黙的に参照される任意の刊行物が先行技術であることも認めるものではない。
【０００４】
本明細書におけるすべての刊行物及び特許出願は、あたかも各個別の刊行物又は特許出願が参照により具体的且つ個別に組み込まれることが示されたかのように、同程度に参照により組み込まれる。組み込まれた参照文献における用語の定義又は使用は、本明細書で提供されるその用語の定義に矛盾するか、又は反する場合、本明細書で提供されるその用語の定義が適用され、参照文献におけるその用語の定義は適用されない。
【０００５】

ヘルパーＴ（Ｔｈ）細胞は、抗原提示細胞上に発現されたＭＨＣ－ＩＩ－抗原複合体に結合すると、抗原特異的エフェクターＴヘルパーＩ型（Ｔｈ－１）細胞、２型（Ｔｈ－２）細胞、制御性Ｔ（Ｔ$_{reg}$）細胞、又は１７型（Ｔｈ－１７）細胞に分極する。これらの異なる種類のＴｈ細胞の中で、Ｔｈ－１細胞は、典型的には標的抗原を提示する細胞に対して細胞毒性を発揮することによって、マクロファージ及び／又はＣＤ８＋Ｔ細胞と共に細胞性免疫応答を誘発する。Ｔｈ－２細胞は、Ｂ細胞を刺激して増殖させ、そしてＢ細胞を誘導して標的抗原特異的抗体の産生を増加させることにより、Ｂ細胞及び／又はマスト細胞を体液性免疫応答に適合させる。Ｔｒｅｇ細胞は、例えばエフェクターＴ細胞の誘導及び増殖を抑制又はダウンレギュレートすることにより、免疫系を調節し、自己抗原に対する耐性を維持し、且つ自己免疫疾患を予防する。ナイーブＴｈ細胞の様々な種類のＴｈ細胞のいずれかへの分極は、ＭＨＣ－ＩＩ抗原複合体への結合時の細胞シグナルカスケード、様々なサイトカインのバランス、ＭＨＣ－ＩＩ分子に負荷された抗原の種類、及び／又は複数の共刺激分子の存在を含め、複数の因子によって引き起こされ得る。ほとんどの場合、これらの因子は、ある種類のＴｈ細胞の分極を誘発することが多く、同時に他の種類のＴｈ細胞を抑制する。

【０００６】

最近になって、Ｔｈ－１及びＴｈ－２分極を特異的に誘発するタンパク質のペプチド／エピトープ配列が発見された（ＯｎｃｏＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　３：９，ｅ９５４９７１；Ｏｃｔｏｂｅｒ　１，２０１４を参照）。ここでは、インスリン様成長因子結合タンパク質（ＩＧＦＢＰ－２）の１つのエピトープは、主にＴｈ１分極を誘発することが確認されたが、同じタンパク質の別のエピトープはＴｈ－２分極を誘発した。その場合、これらのエピトープの１つをタンパク質から除去すると、Ｔｈ細胞の分極のバランスがシフトし得ることが示された。しかしながら、その研究は、単一の標的分子に限定されていた。

【０００７】

従って、Ｔｈ細胞分極のバランスのシフトのいくつかの例が知られているにもかかわらず、異なる疾患状態におけるＴｈ細胞分極の調節、及び患者特異的且つ状態特異的な調節は、大部分が未発見のままであった。従って、個体においてＴｈ１又はＴｈ２バイアス免疫応答を誘発するＴｈ－１又はＴｈ－２特異的エピトープの改善された組成物、方法、及び使用が依然として必要である。

【発明の概要】

【０００８】

本発明の主題は、細胞上のＭＨＣ－ＩＩ表面発現を介してＴｈ－１バイアス免疫応答又はＴｈ－２バイアス免疫応答のいずれかを選択的に誘発することができる組換えタンパク質の様々な組成物、方法、及び使用に関する。従って、主題の一態様は、複数の核酸セグメントを有する組換え核酸を含む。典型的には、組換え核酸は、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルをコードする第１の核酸セグメントと、ポリトープペプチド及びＴｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープをコードする第２の核酸セグメントとを含む。いくつかの実施形態では、Ｔｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープは、ポリトープペプチドの一部である。他の実施形態では、Ｔｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープは、ポリトープペプチドのＮ末端、Ｃ末端に位置し得る。好ましくは、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル及びポリトープペプチドは、同じリーディングフレーム内にある。

【０００９】

本発明の主題の別の態様では、本発明者らは、免疫療法用の組換え発現ベクターを企図する。組換え発現ベクターは、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル及びＴｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープを有するポリトープペプチドを含む組換えタンパク質をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｔｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープは、ポリトープペプチドの一部である。他の実施形態では、Ｔｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープは、ポリトープペプチドのＮ末端、Ｃ末端に位置し得る。好ましくは、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル及びポリトープ

ペプチドは、同じリーディングフレーム内にある。核酸配列は、ウイルス発現ベクター、細菌発現ベクター、及び酵母発現ベクターに組み込むことができる。

【００１０】

本発明の主題のさらに別の態様では、個体においてＴｈ１又はＴｈ２バイアス免疫応答を誘発する方法に関する。この方法では、組換えワクチン組成物は、個体の抗原提示細胞に送達されるか、又は該抗原提示細胞で産生される。例えば、組換えワクチン組成物は、組換え核酸配列にコードされ、且つ組換えタンパク質を含み、該組換えタンパク質は、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル及びポリトープペプチド、及びＴｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープを含む。いくつかの実施形態では、Ｔｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープは、ポリトープペプチドの一部である。他の実施形態では、Ｔｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープは、ポリトープペプチドのＮ末端、Ｃ末端に位置し得る。好ましくは、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル及びポリトープペプチドは、同じリーディングフレーム内にある。

【００１１】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、個体においてＴｈ１又はＴｈ２バイアス免疫応答を誘導するための上記の組換え核酸及び／又は組換え発現ベクターの使用を企図する。さらに、本発明者らは、個体においてＴｈ１又はＴｈ２バイアス免疫応答を誘導するための上記の組換え核酸及び／又は組換えタンパク質を含む抗原提示細胞を企図する。

【００１２】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らはまた、上記の組換え核酸を含む組換えウイルス、細菌細胞、又は酵母を企図し、さらに組換えウイルス、細菌細胞、又は酵母を含む医薬組成物も企図する。

【００１３】

本発明の主題の様々な目的、特徴、態様、及び利点は、好ましい実施形態の以下の詳細な説明からより明らかになるであろう。

【発明を実施するための形態】

【００１４】

本発明者らは、現在、免疫療法、及び特にネオエピトープベースの免疫療法を、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞バイアス免疫応答を選択的に誘発することによりさらに改善できることを見出した。そのようなＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞バイアス免疫応答は、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル及びＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極エピトープに結合した（好ましくはポリトープ）ペプチドが発現するように、抗原提示細胞を接触させるか、又個体における抗原提示細胞を遺伝子改変することにより、個体（例えば、患者）に選択的且つ特異的に誘発することができる。本発明の主題のいくつかの態様では、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋の細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極エピトープは、患者及び／又は腫瘍特異的エピトープであり得、分極エピトープはまた、Ｔｈ１又はＴｈ２特異的分極を誘発することが知られている（且つ、典型的には癌細胞におけるネオエピトープとしては見出されていない）エピトープであり得る。

【００１５】

実際、ペプチドの発現をＭＨＣクラスＩＩ提示に向けることにより、ペプチドが分極エピトープ（分極エピトープは、特定のＴ細胞免疫応答型を生じさせることが知られている）であるか又はこれを含む場合に所望のＴ細胞免疫応答型を誘発できることを理解されたい。従って、癌免疫療法では、ＭＨＣクラスＩＩ提示に向けられ、さらにＴｈ１分極エピトープ（これは、癌特異的ネオエピトープ、又はＴｈ１分極を誘発することが知られているエピトープであってもよい）を含む組換えタンパク質を構築することができる（例えば、インビトロで組換え発現させるか、又はインビボで抗原提示細胞で発現させる）。同様に、自己免疫疾患の処置では、ＭＨＣクラスＩＩ提示に向けられ、さらにＴｈ２分極エピ

トープ（疾患特異的なネオエピトープ、又はＴｈ２分極を誘発することが知られているエピトープであってもよい）を含む組換えタンパク質を構築することができる（例えば、インビトロで組換え発現させるか、又はインビボで抗原提示細胞で発現させる）。

【００１６】

そのために、本発明者らは、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極エピトープ及びＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルを有する（ポリトープ）ペプチドを過剰発現する抗原提示細胞がナイーブＴｈ細胞と相互作用し、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞にＴｈ細胞が特異的に分極するように、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞など）を改変するように組換え核酸組成物又はワクチン組成物を作製できることを企図する。次に、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞の増殖により、Ｔ細胞媒介免疫応答のバランスをＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞バイアス免疫応答にシフトさせることができる。従って、組換えキメラタンパク質は、タンパク質の細胞内発現がＭＨＣクラスＩＩ提示をもたらし、提示時に、応答バイアスを誘発することが知られている組換えタンパク質の一部によって少なくとも部分的に指示されるバイアスをもたらすように設計できることを認識されたい。

【００１７】

本明細書で使用される「腫瘍」という用語は、人体の１つ又は複数の解剖学的部位に位置するか、又は該部位で確認することができる、１つ又は複数の癌細胞、癌組織、悪性腫瘍細胞、又は悪性腫瘍組織を指し、それらと互換的に使用される。

【００１８】

本明細書で使用される「結合する」という用語は、K_Dが10^{-6}Ｍ以下又は10^{-7}Ｍ以下である高親和性を有する２つの分子間の相互作用を「認識する」及び／又は「検出する」という用語を指し、それらと互換的に使用することができる。

【００１９】

本発明の主題の例示的且つ特に好ましい一態様では、本発明者らは、組換えタンパク質をコードする組換え核酸組成物を導入することにより、ナイーブＴｈ細胞によって認識されるべき細胞表面の抗原として組換えタンパク質を提示するように、患者の抗原提示細胞を遺伝子改変できることを企図する。一般に、組換えタンパク質は、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル、ポリトープペプチド、及びＴｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープを含む。

【００２０】

従って、組換えタンパク質が単一の組換え核酸によってコードされる好ましい実施形態では、この組換え核酸は、少なくとも２つの核酸セグメント：ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルをコードする第１の核酸セグメント（配列要素）；ポリトープペプチド及びＴｈ１特異的分極エピトープ又はＴｈ２特異的分極エピトープ（又はＴｈ１７特異的分極エピトープ、Ｔｒｅｇ特異的分極エピトープ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞分極エピトープ）をコードする第２の核酸セグメントを含む。最も好ましくは、２つの核酸セグメントは、この２つの核酸セグメントが２つのペプチドセグメントを有する単一のタンパク質に翻訳され得るように、同じリーディングフレーム内にある。

【００２１】

本明細書で使用されるポリトープは、単一のポリペプチドとして発現される２つ以上の抗原のタンデムアレイを指す。好ましくは、２つ以上のヒト疾患関連抗原は、リンカー又はスペーサーペプチドによって分離されている。リンカー又はスペーサーのペプチド配列の任意の適切な長さ及び順序を使用することができる。しかしながら、リンカーペプチドの長さは、３～３０アミノ酸、好ましくは５～２０アミノ酸、より好ましくは５～１５アミノ酸であることが好ましい。また、発明者らは、グリシンリッチ配列（例えば、ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｓｅｒ－ｇｌｙ－ｇｌｙなど）が、２つの抗原間のポリトープの柔軟性を提供するために好ましいことを企図する。

【００２２】

エンドソーム、後期エンドソーム、又はリソソームへの組換えタンパク質の細胞内輸送を誘導することができ、それにより、組換えタンパク質をＭＨＣ－ＩＩ複合体と結合させることができる任意の適切なＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルが企図される。従って、いくつかの実施形態では、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルは、１つ又は複数のソーティングエンドソーム輸送シグナル、例えば、分化クラスター１ｂ（ＣＤ１ｂ）リーダーペプチド、リソソーム関連膜タンパク質（ＬＡＭＰ）の膜貫通ドメイン、ＣＤ１ｃテールペプチド（又はＣＤ１ｃのＣ末端ドメイン）を含み得る。他の実施形態では、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルは、１つ又は複数の後期エンドソーム（リサイクリングエンドソーム）輸送シグナル、例えば、ＣＤ１ｂリーダーペプチド、ＬＡＭＰの膜貫通ドメイン、ＣＤ１ａテールペプチド（又はＣＤ１ａのＣ末端ドメイン）を含み得る。さらに他の実施形態では、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルは、１つ又は複数のリソソーム輸送シグナル、例えば、ＣＤ１ｂリーダーペプチド、ＬＡＭＰの膜貫通ドメイン、ＬＡＭＰの細胞質テール（又はＬＡＭＰのＣ末端ドメイン）、又はモチーフＴｙｒ－Ｘ－Ｘ－疎水性残基をコードするヌクレオチド配列を含み得る。

【００２３】

配列の構成及びいくつかのＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルは、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルの種類、ポリトープペプチドをコードする核酸セグメントの長さ、及び／又はポリトープペプチドの配列によって異なり得る。例えば、組換え核酸は、ポリトープをコードする核酸セグメントの５’末端、３’末端、又はその中に１つのＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル（例えば、ＣＤ１ｂリーダーペプチドをコードする核酸配列など）を含み得る。別の例では、組換え核酸は、少なくとも２つのＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナルを含み得、１つはポリトープをコードする核酸セグメントの５’末端にあり、もう１つはポリトープをコードする核酸セグメントの３’末端にある（例えば、５’末端のＣＤ１ｂリーダーペプチドをコードする核酸配列、及びポリトープをコードする核酸セグメントの３’末端のＬＡＭＰの膜貫通ドメインなど）。より例示的なＭＨＣ－ＩＩシグナル及びポリトープとのそれらの配置は、参照により本明細書に組み入れられる国際公開第２０１７／２２２６１９号パンフレット（及びその米国国内段階の対応物）で確認することができる。

【００２４】

ポリトープペプチドをコードする第２の核酸セグメントに関して、本発明者らは、ポリトープペプチドが少なくとも１つ又は複数の抗原ペプチド又はペプチド断片を含むことを企図する。例えば、抗原ペプチド又はペプチド断片は、１つ又は複数の炎症関連ペプチド抗原、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、セリアック病、１型糖尿病、グレーブス病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチなど）関連ペプチド抗原、臓器移植拒絶に関連するペプチド抗原、腫瘍関連ペプチド抗原、及び癌ネオエピトープであり得る。いくつかの実施形態では、抗原ペプチド又はペプチド断片は、状態又は疾患に一般的に共通する既知のペプチドである（例えば、癌関連又は癌特異的抗原、寄生虫抗原など）。好ましくは、抗原ペプチド又はペプチド断片は、患者特異的及び／又は組織特異的である。

【００２５】

もちろん、個体の免疫反応が自己免疫反応である場合、企図される組成物及び方法は、最も典型的にはＴｈ２及び／又はＴｒｅｇ分極を使用して免疫応答を寛容原性応答に分極する様々な構築物を利用することになることを理解されたい。他方、個体の免疫反応が、（例えば、免疫抑制、耐性、又はアネルギーが原因で）腫瘍に対する不十分な免疫反応である場合、本組成物及び方法は、好ましくは、最も典型的にはＴｈ１及び／又はＴｈ１７分極を使用して免疫応答を免疫原性応答に分極する様々な構築物を利用することになる。

【００２６】

少なくともいくつかの種類の自己免疫疾患、臓器移植拒絶（例えば、急性又は慢性拒絶）、及び癌の予後は、それぞれ自己免疫疾患、臓器移植の拒絶症状、又は腫瘍を有する患者における異なる抗原の発現によって予測又は示すことができる。例えば、自己免疫疾患（例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）を有する患者では、１つ又は複

数の自己抗原の全身又は局所発現は、患者自身の組織を攻撃する自己抗体の生成を引き起こし得る。臓器移植拒絶に苦しむ患者では、移植臓器から生じる外来抗原が、移植臓器を攻撃するように患者の免疫系を誘導する。腫瘍を有する患者では、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的ネオエピトープは、免疫応答の代表的な標的であり得る。

【００２７】

容易に理解されるように、ポリトープペプチドにおける企図される抗原及び／又はネオエピトープは、オミクッス解析及び患者の疾患細胞及び対応する健康な細胞、又は移植組織（若しくは細胞）及び対応する患者の組織（若しくは細胞）の比較によって選択することができる。オミックスデータには、限定されるものではないが、ゲノミクス、リピドミクス、プロテオミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクス、栄養ゲノミクス、及び細胞のその他の特性と生物学的機能に関する情報が含まれる。疾患細胞（例えば、癌細胞、自己免疫攻撃細胞）、移植細胞、又は正常細胞（若しくは組織）には、単一又は複数の異なる組織又は解剖学的領域からの細胞、単一又は複数の異なる宿主からの細胞、及び組み合わせの任意の順列が含まれ得る。

【００２８】

癌及び／又は正常細胞のオミックスデータは、好ましくは、ゲノム配列情報を含むゲノムデータセットを含む。最も典型的には、ゲノム配列情報は、患者から（例えば、腫瘍生検を介して）、最も好ましくは癌組織（疾患組織）及び患者又は健康な個人の対応する健康な組織から得られるＤＮＡ配列情報を含む。例えば、ＤＮＡ配列情報は、患者の膵臓（及び／又は転移した細胞の近傍の領域）の膵臓癌細胞、及び患者の正常な膵臓細胞（非癌性細胞）又は患者以外の健康な個人からの正常な膵臓細胞から得ることができる。

【００２９】

本発明の主題の特に好ましい一態様では、ＤＮＡ分析は、疾患（又は移植）細胞及び正常細胞の両方の（典型的には、少なくとも１０倍、より典型的には少なくとも２０倍のカバレッジ深度での）全ゲノム配列決定及び／又はエキソーム配列決定によって行われる。或いは、以前の配列決定からの既に確立された配列記録（例えば、ＳＡＭ、ＢＡＭ、ＦＡＳＴＡ、ＦＡＳＴＱ、又はＶＣＦファイル）からＤＮＡデータを提供することもできる。従って、データセットは、未処理又は処理済みデータセットを含み得、例示的なデータセットは、ＢＡＭ形式、ＳＡＭ形式、ＦＡＳＴＱ形式、又はＦＡＳＴＡ形式のデータセットを含む。しかしながら、データセットは、ＢＡＭフォーマットで、又はＢＡＭＢＡＭ ｄｉｆｆオブジェクトとして提供されることが特に好ましい（例えば、米国特許出願公開第２０１２／００５９６７０Ａ１号明細書及び同第２０１２／００６６００１Ａ１号明細書を参照）。さらに、データセットは、同じ患者の腫瘍及び対応する正常な試料を反映しているため、患者及び腫瘍の具体的情報が得られることに留意されたい。従って、罹患細胞を生じさせない遺伝的生殖系の変化（例えば、サイレント突然変異、ＳＮＰなど）を排除することができる。もちろん、罹患細胞試料が、初期腫瘍、処置開始時の腫瘍、再発腫瘍、又は転移部位などに由来し得ることを認識されたい。また、移植細胞試料を、移植の１時間後、６時間後、２４時間後、３日後、７日後、１ヶ月後、６ヶ月後、１年後に入手できることも認識されたい。ほとんどの場合、患者の対応する正常試料は、血液、又は同じ組織型の非罹患組織、又は組織移植の前に患者から採取された組織であり得る。

【００３０】

同様に、配列データのコンピュータ分析は、多数の方法で行うことができる。しかしながら、最も好ましい方法では、分析は、例えば、米国特許出願公開第２０１２／００５９６７０Ａ１号明細書及び同第２０１２／００６６００１Ａ１号明細書に開示されているように、ＢＡＭファイル及びＢＡＭサーバーを使用して、腫瘍及び正常試料の位置誘導型同期アラインメントによりインシリコで行われる。そのような分析は、偽陽性の抗原又はネオエピトープを有利に減少させ、メモリ及び計算リソースの要求を大幅に削減する。

【００３１】

患者の罹患（又は移植）組織及び対応する正常組織の分析に関して、そのような方法が、腫瘍と対応する正常な配列との間の位置による差異の示差配列オブジェクト（ｄｉｆｆ

ｅｒｅｎｔｉａｌ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｏｂｊｅｃｔ）又は他の識別を作成できる限り、多数の方法が本明細書での使用に適していると考えられる。しかしながら、示差配列オブジェクトは、罹患試料及び対応する正常試料のゲノム配列情報を表すＢＡＭファイルの増分同期アラインメント（ｉｎｃｒｅｍｅｎｔａｌ　ｓｙｎｃｈｒｏｎｏｕｓ　ａｌｉｇｎｍｅｎｔ）によって作成されることが特に好ましい。例えば、特に好ましい方法には、米国特許出願公開第２０１２／００５９６７０号明細書及び同第２０１２／００６６００１号明細書に記載されているＢＡＭＢＡＭベースの方法が含まれる。

【００３２】

さらに、罹患（又は移植）細胞及び／又は正常細胞のオミックスデータは、患者から、最も好ましくは患者又は健康な個体の罹患組織（又は移植組織）及び対応する健康組織（又は患者自身の組織）から得られたＲＮＡ（好ましくは細胞内ｍＲＮＡ）の配列情報及び発現レベル（発現プロファイリング又はスプライスバリアント解析を含む）を含むトランスクリプトームデータセットを含む。当技術分野で公知のトランスクリプトーム分析の多数の方法が存在し、既知の方法はすべて、本明細書での使用に適していると考えられる（例えば、ＲＮＡｓｅｑ、ＲＮＡハイブリダイゼーションアレイ、ｑＰＣＲなど）。その結果、好ましい材料には、ｍＲＮＡ及び一次転写産物（ｈｎＲＮＡ）が含まれ、ＲＮＡ配列情報は、同じ患者の腫瘍試料及び対応する正常（健康な）試料から順に得られる逆転写ｐｏｌｙＡ$^{+}$－ＲＮＡから得ることができる。同様に、ｐｏｌｙＡ$^{+}$－ＲＮＡは、典型的には、トランスクリプトームの代表として好ましいが、他の形態のＲＮＡ（ｈｎ－ＲＮＡ、非ポリアデニル化ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡなど）も本明細書での使用に適していると考えられることに留意されたい。好ましい方法には、特にＲＮＡｓｅｑを含む定量ＲＮＡ（ｈｎＲＮＡ又はｍＲＮＡ）分析及び／又は定量プロテオミクス分析が含まれる。他の態様では、ＲＮＡの定量及び配列決定は、ＲＮＡ－ｓｅｑ、ｑＰＣＲ、及び／又はｒｔＰＣＲベースの方法を使用して行われるが、様々な代替方法（例えば、固相ハイブリダイゼーションベースの方法）も適切であると考えられる。別の観点から見ると、トランスクリプトーム分析は、（単独で、又はゲノム分析と組み合わせて）疾患（例えば、癌、自己免疫疾患、又は移植）及び患者固有の変異を有する遺伝子を同定及び定量化するのに適し得る。

【００３３】

細胞ｍＲＮＡの配列情報及び発現レベルに関するトランスクリプトームデータに加えて、本発明者らはまた、循環腫瘍ＲＮＡ（ｃｔＲＮＡ）及び／又は循環遊離ＲＮＡ（ｃｆＲＮＡ）を利用して、自己免疫疾患関連、移植関連、又は癌関連の抗原／ネオエピトープの存在及び／又は発現レベルを確認できることも企図する。最も典型的な態様では、ｃｔＲＮＡは、細胞の完全性を維持し、且つｃｔＲＮＡ／ｃｆＲＮＡ及び／又はｃｔＤＮＡ／ｃｆＤＮＡを安定させる条件下で処理される全血から分離される。非核酸成分から分離されると、循環核酸が、好ましくはリアルタイム定量的ＰＣＲを使用して定量される。本発明の主題に関連して、循環核酸のすべてが罹患組織、移植された組織、又は腫瘍組織に特異的である必要はないことを認識されたい。従って、病変細胞由来ＲＮＡ及びＤＮＡはそれぞれ、ｃｔＲＮＡ及びｃｔＤＮＡと表わされる。罹患細胞に由来しない循環核酸は、ｃｆＲＮＡ（循環遊離ＲＮＡ）及びｃｆＤＮＡ（循環遊離ＤＮＡ）と表わされる。本明細書で使用される「患者」という用語は、状態（例えば、癌）と診断された個人、並びに状態を検出又は識別する目的で検査及び／又は試験を受けている個人の両方を含むことに留意されたい。

【００３４】

従って、１つ又は複数の所望の核酸を、特定の疾患、病期、特定の突然変異について、又は発現した抗原及び／若しくはネオエピトープの個人突然変異プロファイル又は存在に基づいてさえ選択できることを理解されたい。或いは、特定の遺伝子の新しい変異又は発現の変化の発見又はスキャニングが望まれる場合、患者のトランスクリプトームの少なくとも一部をカバーするようにリアルタイム定量的ＰＣＲをＲＮＡｓｅｑで置き換えてもよい。さらに、病変組織の生検を必要とせずに動画を得るために、分析を静的又は経時的に

繰り返しサンプリングして行うことができることを理解されたい。

【００３５】

最も典型的には、適切な組織源は、好ましくは血漿又は血清として提供される全血を含む。或いは、様々な他の体液も、ｃｔＲＮＡがそのような体液中に存在する限り適切であると考えられることに留意されたい。適切な体液としては、唾液、腹水、髄液、尿などが挙げられ、これらは、新鮮であってもよいし、又は保存／冷凍であってもよい。例えば、本明細書で示される分析では、検体は、ＲＮＡ安定剤を含む無細胞ＲＮＡ　ＢＣＴ（登録商標）チューブ又はＤＮＡ安定剤を含む無細胞ＤＮＡ　ＢＣＴ（登録商標）チューブに吸い込まれた１０ｍｌの全血として採用した。有利には、ｃｔＲＮＡは、無細胞ＲＮＡ　ＢＣＴチューブ内の全血中で７日間安定であり、ｃｔＤＮＡは無細胞ＤＮＡ　ＢＣＴチューブ内の全血中で１４日間安定であり、ｃｔＲＮＡもｃｔＤＮＡも分解されることなく、患者の試料を世界中の場所から発送する時間が確保される。さらに、ｃｔＲＮＡは、血液細胞を溶解しないか又は実質的に溶解しない（例えば、１％以下、又は０．１％以下、又は０．０１％以下、又は０．００１％以下である）ＲＮＡ安定化剤を使用して単離することが一般的に好ましい。別の観点から見ると、ＲＮＡ安定化試薬は、試薬を血液と混合した後の血清又は血漿中のＲＮＡ量の実質的な増加（例えば、総ＲＮＡの１０％以下、又は５％以下、又は２％以下、又は１％以下の増加）をもたらさない。同様に、これらの試薬はまた、血中の細胞の物理的完全性を維持し、血球に存在する細胞ＲＮＡの放出を低減する、又はなくしさえする。そのような維持は、分離されていてもされていなくてもよい収集された血液の形態であり得る。あまり好ましくない態様では、企図される試薬は、血液以外の収集された組織中のｃｔＤＮＡ及び／又はｃｔＲＮＡを２日間、より好ましくは少なくとも５日間、最も好ましくは少なくとも７日間安定化させる。もちろん、多数の他の収集方法も適切であると考えられ、ｃｔＲＮＡ及び／又はｃｔＤＮＡを、さらに処理する前に少なくとも部分的に精製するか、又は固相に吸着させて安定性を高めることができることを認識されたい。適切な組成物及び方法は、２０１７年３月１７日に出願された同時係属中の米国仮特許出願第６２／４７３２７３号明細書、２０１７年６月２０日に出願された同第６２／５５２５０９号明細書、及び２０１７年５月２６日に出願された同第６２／５１１８４９号明細書に開示されている。

【００３６】

さらに、罹患（腫瘍、自己免疫攻撃、又は移植）細胞及び／又は正常細胞のオミックスデータは、タンパク質発現レベル（タンパク質分子の定量）、翻訳後修飾、タンパク質間相互作用、タンパク質－ヌクレオチド相互作用、及びタンパク質－脂質相互作用などを含むプロテオミクスデータセットを含む。従って、本明細書に提示されるプロテオミクス分析は、選択されたタンパク質の活性の決定も含み得ることも理解されたい。そのようなプロテオミクス分析は、新たに切除された組織から、凍結又は他の方法で保存された組織から、さらにはＦＦＰＥ組織試料から行うことができる。最も好ましくは、プロテオミクス分析は、定量的（すなわち、発現されたポリペプチドの定量的情報を提供する）及び定性的（すなわち、ポリペプチドの数値的又は定性的な特定の活性を提供する）である。あらゆる適切なタイプの分析が企図される。しかしながら、特に好ましいプロテオミクス法には、抗体ベースの方法及び光学分析法が含まれる。さらに、プロテオミクス分析は、タンパク質自体に関する定性的又は定量的情報を提供し得るだけではなく、タンパク質が触媒的又は他の機能的活性を有するタンパク質活性データも含み得ることに留意されたい。プロテオームアッセイを行うための１つの例示的な技術が、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７４７３５３２号明細書に記載されている。タンパク質発現の同定及びさらには定量のさらに適切な方法には、様々な光学分析（例えば、選択的反応モニタリング（ＳＲＭ）、多重反応モニタリング（ＭＲＭ）、及び連続反応モニタリング（ＣＲＭ））が含まれる。その結果、上記の方法は、患者及び病変組織特異的ネオエピトープを提供し、これらのネオエピトープは、抗原／ネオエピトープを含むタンパク質の細胞内位置（例えば、膜位置）、発現強度（例えば、同じ患者の対応する正常発現と比較した過剰発現）などによってさらに選別することができることを理解されたい。

【００３７】
オミックス分析により同定された抗原／ネオエピトープが、１つ又は複数のパラメータでさらに選別されることが特に好ましい。例えば、同定された抗原／ネオエピトープは、既知のヒトＳＮＰ及び体細胞変異に対して選別することができる。この例では、同定された抗原／ネオエピトープは、ヒト同一配列の使用を回避するために、（例えば、患者又は患者の集合の）既知のヒト配列を含むデータベースと比較することができる。さらに、選別はまた、患者のＳＮＰに起因する同定された抗原／ネオエピトープ配列の除去を含み得、このＳＮＰは、罹患した配列及び対応する正常配列の両方に存在する。例えば、ｄｂＳＮＰ（一塩基多型データベース）は、米国立ヒトゲノム研究所（ＮＨＧＲＩ）と共同で全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）によって開発され、保有されている異なる種内及び種間の遺伝的変異の無料の公開アーカイブである。データベースの名称は、１つのクラスの多型のみ（単一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ））のコレクションを意味するが、実際には比較的広い範囲の分子変異を含む：（１）ＳＮＰ、（２）短い欠失及び挿入多型（インデル／ＤＩＰ）、（３）マイクロサテライトマーカー又は縦列型反復配列（ＳＴＲ）、（４）多塩基多型（ＭＮＰ）、（５）ヘテロ接合配列、（６）指定変異体（ｎａｍｅｄ　ｖａｒｉａｎｔ）。ｄｂＳＮＰは、明らかに中立的な多型、既知の表現型に対応する多型、及び変異のない領域を採用する。上記のようなデータベース及び他の選別オプションを使用して、患者及び罹患細胞特異的抗原／ネオエピトープを選別して、それらの既知の配列を除去し、偽陽性が大幅に低減された複数の抗原／ネオエピトープ配列を含む配列セットを得ることができる。

【００３８】
ネオエピトープはまた、より広い環境（例えば、ポリトープ内）に存在する場合は処理され、患者のＭＨＣ複合体上に提示される必要があるため、免疫系にはすべてのネオエピトープが見えるわけではないことを認識されたい。その意味では、すべてのネオエピトープのほんの一部しか、提示に対して十分な親和性を有していないことを理解されたい。別の観点から見ると、処置の成功は、ＭＨＣ複合体を介して提示できるネオエピトープの数が増加すると増え、このようなネオエピトープは、患者のＨＬＡ型に対して最小限の親和性を有する。従って、効果的な結合及び提示は、ネオエピトープの配列と患者の特定のＨＬＡ型の複合機能であることを理解されたい。従って、患者の組織のＨＬＡ型の決定が通常は必要である。最も典型的には、ＨＬＡ型の決定には、少なくとも３つのＭＨＣ－Ｉサブタイプ（例えば、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ）及び少なくとも３つのＭＨＣ－ＩＩサブタイプ（例えば、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＱ、ＨＬＡ－ＤＲ）が含まれ、好ましくは各サブタイプが少なくとも２桁又は少なくとも４桁の深度まで決定される。しかしながら、より一層の深度（例えば、６桁、８桁）も企図される。

【００３９】
（既知の化学又はインシリコ決定を使用して）患者のＨＬＡ型が確認されると、ＨＬＡ型の構造解が計算され、且つ／又はデータベースから取得され、次いで、この構造解が、（典型的には選別された）ネオエピトープのＨＬＡ構造解に対する結合親和性を決定するために、インシリコドッキングモデルで使用される。結合親和性の決定に適したシステムには、ＮｅｔＭＨＣプラットフォームが含まれる（例えば、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２００８　Ｊｕｌ　１；３６（Ｗｅｂ　Ｓｅｒｖｅｒ　ｉｓｓｕｅ）：Ｗ５０９－Ｗ５１２を参照）。次に、以前に決定されたＨＬＡ型、特にＭＨＣ－ＩＩ結合に対して高い親和性（例えば、２００ｎＭ未満、１００ｎＭ未満、７５ｎＭ未満、５０ｎＭ未満）を有するネオエピトープが、患者のＭＨＣＩ－／ＩＩサブタイプの知識と共に治療の作成のために選択される。

【００４０】
ＨＬＡの決定は、当技術分野で周知の湿式化学における様々な方法を使用して行うことができ、これらの方法のすべては、本明細書での使用に適切であると考えられる。しかしながら、特に好ましい方法では、ＨＬＡ型は、既知及び／又は一般的なＨＬＡ型のほとんど又はすべてを含む参照配列を使用して、インシリコのオミックスデータから予測するこ

ともできる。例えば、本発明の主題による好ましい一方法では、染色体６ｐ２１．３（又はＨＬＡ対立遺伝子が見られる任意の他の位置／その近傍）にマッピングする比較的多数の患者配列リードが、データベース又は配列決定装置によって提供される。最も典型的には、配列リードは、約１００～３００塩基の長さを有し、且つリードの質、アラインメント情報、向き、位置などを含むメタデータを含む。例えば、適切な形式には、ＳＡＭ、ＢＡＭ、ＦＡＳＴＡ、ＧＡＲなどが含まれる。本発明の主題に限定されるものではないが、患者配列リードは、少なくとも５倍、より典型的には少なくとも１０倍、さらにより典型的には少なくとも２０倍、最も典型的には少なくとも３０倍のカバレッジ深度を提供することが一般に好ましい。

【００４１】

異なる観点から見ると、望ましい高い親和性でＭＨＣ－ＩＩに結合する腫瘍及び患者特異的ネオエピトープ配列を（例えば、様々なオミックスデータ、並びに特に全ゲノム配列決定及びＲＮＡｓｅｑデータから）容易に同定できることを理解されたい。次に、そのようなネオエピトープ配列は、本明細書に提示されるように組成物及び使用方法での使用に適している。好ましくは、２つ以上のネオエピトープ配列が、上記のように輸送配列に融合されるポリトープを生成するために、典型的には単一ポリペプチド鎖（任意選択の柔軟なＧ／Ｓ又は他のペプチドスペーサー要素を有する）で使用される。また上記のように、そのように同定された１つ又は複数のポリトープを、望ましい応答バイアス（例えば、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、応答バイアス）を示すものを選択するためにさらに選別してもよいし、且つ／又は特定の応答バイアスを生成することが知られている１つ又は複数のペプチド配列に結合させてもよい。

【００４２】

従って、同定された抗原／ネオエピトープは、ナイーブＴ細胞への結合時にＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞媒介免疫応答を誘発するそれらの選好に基づいて選別又は分類されることも好ましい。当技術分野で周知のあらゆる湿式化学法又はインシリコ法を含む、抗原特異的Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞媒介性免疫応答を決定するための任意の適切な方法が企図される。例えば、ドナー（典型的には該当する患者）のＰＭＢＣを合成ネオエピトープ配列に曝露し、抗原提示細胞のサイトカイン分泌を、当技術分野で公知のＥＬＩＳＰＯＴアッセイを使用して監視することができる（例えば、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ；７４（１０）Ｍａｙ　１５，２０１４；ｐ２７１０－２７１８を参照）。容易に理解されるように、ネオエピトープに応答する特定のサイトカイン分泌パターンにより、応答バイアスのタイプが明らかになる（例えば、Ｔｈ１バイアスではＩＦＮ－γ、Ｔｈ２バイアスではＩＬ－１０、Ｔｈ１７バイアスではＩＬ－１７、ＴｒｅｇバイアスではＴＧＦ－βなど）。

【００４３】

或いは、抗原／ネオエピトープの全体又は断片を、（典型的には、ネオ抗原が得られた同じ患者の）抗原提示細胞で発現させることができ、且つ表面に抗原／ネオエピトープを発現する抗原提示細胞を、最も典型的には本明細書に提示される組成物を摂取することになる個体の細胞を使用して、インビトロでナイーブＴ細胞と接触させることができる。ここでもまた、接触後の分極Ｔ細胞から分泌されたサイトカインの種類及び／又は量に基づいて、抗原／ネオエピトープを、Ｔｈ１特異的、Ｔｈ２特異的、Ｔｈ１７特異的、Ｔｒｅｇ特異的、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的若しくは非特異的の１つに保存することができる（例えば、Ｔｈ１分極、Ｔｈ２分極の両方などを誘発することができる）。さらに別の例では、同定された抗原／ネオエピトープは、既知のＴｈ１バイアス、Ｔｈ２バイアス、又は非特異的抗原との配列比較により、Ｔｈ１バイアス、Ｔｈ２バイアス、又は非特異的として決定することができる。そのような例では、Ｔｈ１バイアス、Ｔｈ２バイアス、又は非特異的の可能性は、既知のＴｈ１バイアス、Ｔｈ２バイアス、又は非特異的抗原、特に既知のＴｈ１バイアス、Ｔｈ２バイアス分極エピトープ（モチーフ、ドメイン）との類似性（例えば、配列類似性、コンセンサス配列の保有、構造類似性、ドメイン位置類似性など）に基づいて決定することができる。

【００４４】
本明細書で使用される、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極エピトープは、ナイーブＴｈ細胞（又はナイーブＣＤ４＋細胞）からのＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞の分極のバランスを、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、又は少なくとも９０％の確率で単一方向にシフトさせる（例えば、より多くのナイーブＴｈ細胞がＴｈ１細胞に分極され、ナイーブＴｈ細胞がＴｈ１細胞に分極される確率が高いなど）と予測される又は実証されている任意のエピトープである。例えば、エピトープが抗原提示細胞によって提示され、且つ抗原／ネオエピトープを提示する抗原提示細胞に結合しているナイーブＴｈ細胞の少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、又は少なくとも９０％がＴｈ１細胞に分極している場合、エピトープはＴｈ１分極エピトープとして決定することができる。上記のように、エピトープ又は抗原配列のバイアス効果は、ＥＬＩＳＰＯＴアッセイなどの当技術分野で公知のプロトコルを使用してインビボで容易に決定することができる（例えば、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ；７４（１０）Ｍａｙ　１５，２０１４，ｐ２７１０－２７１８を参照）。

【００４５】
本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、ポリトープが、ナイーブＴｈ細胞のＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極を誘発する特異性に関してより均質な抗原／ネオエピトープ又はその断片を含む場合、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的免疫応答をより効果的に誘発できることを企図する。従って、Ｔｈ１特異的免疫応答を誘発するためのポリトープは、少なくとも５０％、好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％のＴｈ１特異的抗原／ネオエピトープを含むことが好ましい。もちろん、同じ判断が、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇバイアスエピトープにも当てはまる。

【００４６】
いくつかの実施形態では、本発明者らはまた、抗原／ネオエピトープ又はそれらの断片が、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的であるように改変され得ることを企図する。例えば、Ｔｈ１バイアスでもｔｈ２バイアスでもない（例えば、Ｔｈ１又はＴｈ２特異的モチーフが抗原／ネオエピトープ中に存在しない）抗原又はネオエピトープを、そのＮ末端若しくはＣ末端における、又は抗原／ネオエピトープペプチドにおける既知のＴｈ１特異的又はＴｈ２特異的分極エピトープ（ペプチドモチーフ、ＩＧＦＢＰ－２のＮ末端ドメイン、ＩＧＦＢＰ－２のＣ末端ドメインなど）と結合させる又は同時発現させることができる。別の例では、抗原／ネオエピトープが、そのペプチドにＴｈ１又はＴｈ２特異的分極エピトープの両方を含む場合、該抗原／ネオエピトープを改変して、Ｔｈ１又はＴｈ２特異的ドメインの１つを除去してこの特異的ドメインの１つだけがエピトープに含まれるようにすることができる。これらの実施形態では、抗原／ネオエピトープの抗原性が、有意に影響を受けないこと、ナイーブ抗原／ネオエピトープから好ましくは３０％未満、より好ましくは２０％未満、最も好ましくは１０％未満しか低下しないことが特に好ましい。

【００４７】
或いは、ポリトープは、１つ又は複数の既知のＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極エピトープ（モチーフ、ドメイン）と結合することができる。既知のＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極エピトープは、ポリトープの抗原／ネオエピトープが特異的である疾患／状態に関連することもあるし、又は関連しないこともある。既知のＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極エピトープは、ポリトープペプチドの任意の適切な位置に配置できることが企図される。例えば、１つ又は複数のＴｈ１特異的分極エピトープは、ポリトープのＮ末端又はＣ末端に配置することができる（例えば、ポリトープのＮ末端に１つのＴｈ１特異的分極エピトープ、ポリトープのＣ末端に１つのＴｈ１特異的分極エピトープ、ポリトープのＮ末端及びＣ末端のそれぞれに１つの

Ｔｈｌ特異的分極エピトープ、ポリトープのＮ末端に複数のＴｈ１特異的分極エピトープ、ポリトープのＣ末端に複数のＴｈｌ特異的分極エピトープなど）。他の例では、ポリペプチドの抗原／ネオエピトープ間に１つ又は複数のＴｈ１特異的分極エピトープ（例えば、ポリトープの第１の抗原と第２の抗原との間、ポリトープの第２の抗原と第３の抗原との間に１つのＴｈ１特異的分極エピトープ、ポリトープの第１の抗原と第２の抗原との間及び第２の抗原と第３の抗原との間にそれぞれに１つのＴｈ１特異的分極エピトープなど）。

【００４８】

従って、企図されるポリペプチドは、２つ又は３つ（又はそれ以上）の成分：免疫応答（例えば、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｒｅｇ、Ｔｈ１７）バイアス成分に任意選択的に結合され得る、抗原（例えば、ネオエピトープ又はポリトープ）成分に結合される輸送成分を有するキメラポリペプチドを含むことを認識されたい。前述のように、抗原成分の１つ又は複数のペプチド配列は、免疫応答（例えば、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｒｅｇ、Ｔｈ１７）バイアス成分としても機能し得る。

【００４９】

本発明者らは、そのようなキメラポリペプチドをコードする核酸配列（例えば、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル、抗原／ポリトープ、及び／又はＴｈ１特異的分極エピトープ若しくはＴｈ２特異的分極エピトープを含む）を、組換えタンパク質のインビボ又はインビトロでの発現に適した任意の発現ベクターに導入できることをさらに企図する。次に、組換え核酸を患者の抗原提示細胞（例えば、樹状細胞など）に、又は細菌若しくは酵母細胞に送達して、核酸配列によってコードされる組換えタンパク質がそのような細胞で発現され、その後、細菌細胞又は酵母細胞全体を含むワクチンとして、又はその断片として個体に送達され得るように、該組換え核酸がベクターに挿入される。タンパク質を発現するために使用できる任意の適切な発現ベクターが企図される。特に好ましい発現ベクターには、少なくとも１０００、好ましくは２０００、より好ましくは５０００のカセットサイズの塩基対を運搬できるものが含まれ得る。或いは、組換え核酸はまた、抗原提示細胞に直接トランスフェクトされ得るｍＲＮＡであってもよい。

【００５０】

従って、一実施形態では、好ましい発現ベクターには、ウイルスベクター（例えば、任意選択によりＥ１及び／又はＥ２ｂ遺伝子が欠失されたか、又は非機能性である、非複製組換えアデノウイルスゲノム）が含まれる。発現ベクターがウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、特にＥ１及びＥ２ｂが欠失したＡｄＶ）である場合は、組換え核酸を含む組換えウイルスは、個別に使用してもよいし、又は医薬組成物中の治療ワクチンとして組み合わせて使用してもよいことが企図され、該医薬組成物は、典型的には投与単位当たり10^{6}～10^{13}のウイルス粒子、及びより典型的には10^{9}～10^{12}のウイルス粒子のウイルス力価を有する無菌の注射用組成物として製剤される。或いは、ウイルスを利用してエクスビボで患者（又は他のＨＬＡ適合）細胞を感染させることができ、次に、そのように感染した細胞が患者に輸血される。さらなる例では、ウイルスによる患者の処置は、裸の形態の同種移植又は自家移植ナチュラルキラー細胞若しくはＴ細胞、又はネオエピトープを標的とする抗体を発現するキメラ抗原受容体、ネオエピトープ、腫瘍関連抗原、若しくはウイルスと同じペイロードを有する同種移植又は自家移植ナチュラルキラー細胞若しくはＴ細胞を伴い得る。患者由来のＮＫ－９２細胞株を含むナチュラルキラー細胞はまた、ＣＤ１６を発現することができ、抗体と結合し得る。

【００５１】

なおさらなる実施形態では、発現ベクターは、遺伝子操作された細菌で発現され得る細菌ベクターであり得、この遺伝子操作された細菌は、ヒト細胞において内毒素反応を引き起こさないほど十分に低く、且つ／又は人体に導入されたときにＣＤ－１４媒介性敗血症を誘発するのに不十分であるレベルでエンドトキシンを発現する。修飾されたリポ多糖を含む１つの例示的な細菌株には、ＣｌｅａｒＣｏｌｉ（登録商標）ＢＬ２１（ＤＥ３）エレクトロコンピテント細胞が含まれる。この細菌株は、遺伝子型Ｆ－ｏｍｐＴ　ｈｓｄＳ

Ｂ（ｒＢ－ｍＢ－）ｇａｌ ｄｃｍ ｌｏｎ λ（ＤＥ３［ｌａｃＩ ｌａｃＵＶ５－Ｔ７ ｇｅｎｅ １ ｉｎｄ１ ｓａｍ７ ｎｉｎ５］）ｍｓｂＡ１４８ ΔｇｕｔＱΔｋｄｓＤ ΔｌｐｘＬΔｌｐｘＭΔｐａｇＰΔｌｐｘＰΔｅｐｔＡを有するＢＬ２１である。これに関連して、いくつかの特定の欠失変異（ΔｇｕｔＱ ΔｋｄｓＤ ΔｌｐｘＬ ΔｌｐｘＭΔｐａｇＰΔｌｐｘＰΔｅｐｔＡ）がＬＰＳの脂質$ＩＶ_{Ａ}$への改変をコードする一方、１つの追加の補償変異（ｃｏｍｐｅｎｓａｔｉｎｇ ｍｕｔａｔｉｏｎ）（ｍｓｂＡ１４８）が、ＬＰＳ前駆体脂質ＩＶＡの存在下で細胞の生存の維持を可能にすることを理解されたい。これらの変異により、オリゴ糖鎖がＬＰＳから欠失する。より具体的には、６つのアシル鎖のうち２つが欠失している。ＬＰＳの６つのアシル鎖は、骨髄分化因子２（ＭＤ－２）と複合体を形成したＴｏｌｌ様受容体４（ＴＬＲ４）によって認識され、ＮＦ－κＢの活性化及び炎症性サイトカインの産生を引き起こすトリガーである。４つのアシル鎖のみを含む脂質$ＩＶ_{Ａ}$は、ＴＬＲ４によって認識されないため、内毒素反応を引き起こさない。エレクトロコンピテントＢＬ２１細菌が例として提供されるが、本発明者らは、遺伝子改変細菌もまた化学的コンピテント細菌であり得ることを企図する。或いは、又はさらに、発現ベクターはまた、酵母、好ましくはサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）（例えば、ＧＩ－４００シリーズ組換え免疫療法用酵母株など）で発現され得る酵母ベクターであり得る。

【００５２】

もちろん、本明細書で企図される組換え核酸が、ウイルス、酵母、又は細菌発現ベクターに限定されることなく、当技術分野で周知のプロトコルに従っていずれも適切な細胞にトランスフェクトすることができるＤＮＡワクチンベクター、線状化ＤＮＡ、及びｍＲＮＡも含み得ることを理解されたい。

【００５３】

さらに、本発明者らは、ＭＨＣ－ＩＩ輸送シグナル及び／又はＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極エピトープと結合したポリトープペプチドが、好ましくは１つ又は複数の共刺激分子、免疫刺激性サイトカイン、及び／又はチェックポイント阻害を妨げる又はダウンレギュレートするタンパク質で共発現することを企図する。従って、一実施形態では、第３の核酸セグメントが、共刺激分子、免疫刺激性サイトカイン、及び／又はチェックポイント阻害を妨げる又はダウンレギュレートするタンパク質の少なくとも１つをコードする。第３の核酸セグメントは、共刺激分子、免疫刺激性サイトカイン、及び／又はチェックポイント阻害を妨げる又はダウンレギュレートするタンパク質が、ポリトープペプチドとは別の異なるペプチドとして発現されるように異なるリーディングフレームに存在し得る。しかしながら、第３の核酸セグメントは、内部プロテアーゼ切断部位をコードする核酸配列によって（例えば、ヒトメタロプロテアーゼなどによって）分離された、第１及び第２の核酸セグメントと同じリーディングフレームに存在し得ることも企図される。さらに別の実施形態では、第３の核酸セグメントは、それらの発現が（同じタイプ又は異なるタイプの）２つの別々のプロモーターによって別々に異なって調節され得るように、第１及び第２の核酸セグメントとは別の発現ベクター内の位置に存在する。

【００５４】

適切な共刺激分子には、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ３０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＩＣＯＳ－Ｌ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＣＤ７０、ＯＸ４０Ｌ、４－１ＢＢＬが含まれるが、作用機序があまり明確ではない（又は理解されていない）他の刺激分子には、ＧＩＴＲ－Ｌ、ＴＩＭ－３、ＴＩＭ－４、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＴＬ１Ａ、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ３、及びＳＬＡＭファミリーのメンバーが含まれる。しかしながら、癌関連配列との協調発現に特に好ましい分子には、ＣＤ８０（Ｂ７－１）、ＣＤ８６（Ｂ７－２）、ＣＤ５４（ＩＣＡＭ－１）、及びＣＤ１１（ＬＦＡ－１）が含まれる。

【００５５】

さらに、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｔｒｅｇ、又はＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞特異的分極及びバイアス免疫応答を増強するための任意の適切な種類のサイトカイン、特に好ま

しいサイトカイン及びサイトカイン類似体には、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１５スーパーアゴニスト（ＡＬＴ－８０３）が含まれることが企図される。さらに、共刺激分子及び／又はサイトカインの発現が、ネオエピトープ又はポリトープが１つ又は複数の共刺激分子及び／又はサイトカインと同時に発現されるように調整されることが好ましいことを理解されたい。従って、典型的には、共刺激分子及び／又はサイトカインが、例えば、内部リボソーム侵入部位又は２Ａ配列を使用して、単一の転写物（ポリトープをコードする配列部分を含んでも含まなくてもよい）から、又は複数の転写産物から生成されることが企図される。

【００５６】

さらに、或いは、ポリトープペプチドと共発現される免疫刺激性サイトカインは、所望の免疫応答又はＣＤ４＋Ｔ細胞／ナイーブＴｈ細胞分極の方向に基づいて選択することができる。例えば、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞からのＴｒｅｇ細胞の分極が望ましい実施形態では、免疫刺激性サイトカインは、ＩＬ－２及びＴＧＦ－βを含むように選択することができる。ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞からのＴｈ１７細胞の分極が望ましい別の実施形態では、免疫刺激性サイトカインは、ＩＬ－６及びＴＧＦ－βを含むように選択することができる。同様に、Ｔｈ１細胞分極のための免疫刺激性サイトカインにはＩＬ－１２及びＩＦＮ－γが含まれ得、且つＴｈ２細胞分極のための免疫刺激性サイトカインにはＩＬ－４が含まれ得る。さらに、Ｔｆｈ細胞（濾胞ヘルパーＴ細胞）分極のための免疫刺激性サイトカインにはＩＬ－６及びＩＬ－１２が含まれ得、ＣＤ４＋細胞傷害性Ｔ細胞分極のための免疫刺激性サイトカインにはＩＬ－２が含まれ得る。

【００５７】

チェックポイント阻害を妨げる又はダウンレギュレートするタンパク質に関して、チェックポイント受容体に結合する任意の適切なペプチドリガンドが企図される。最も典型的には、結合は、受容体を介したシグナル伝達を阻害する、又は少なくとも低減し、特に企図される受容体には、ＣＴＬＡ－４（特にＣＤ８$^{+}$細胞）、ＰＤ－１（特にＣＤ４$^{+}$細胞）、ＴＩＭ１受容体、２Ｂ４、及びＣＤ１６０が含まれる。例えば、適切なペプチド結合剤には、受容体に特異的に結合する抗体断片、特にｓｃＦｖだけではなく、小分子ペプチドリガンド（例えば、ＲＮＡディスプレイ又はファージパニングを介して単離される）も含まれ得る。ここでもまた、ペプチド分子の発現は、ネオエピトープ又はポリトープが１つ又は複数のペプチドリガンドと同時に発現されるように調整されることが好ましいことを理解されたい。従って、典型的には、ペプチドリガンドは、例えば、内部リボソーム侵入部位又は２Ａ配列を使用して、単一の転写産物（ポリトープをコードする配列部分を含んでも含まなくてもよい）から、又は複数の転写産物から生成されることが企図される。

【００５８】

本発明者らは、上記の組換え核酸を有する組換えウイルス、細菌、又は酵母を任意の薬学的に許容される（例えば、好ましくは無菌注射用組成物として製剤化された）担体で製剤化して医薬組成物を形成できることをさらに企図する。医薬組成物が組換えウイルスを含む場合、組成物のウイルス力価は、投与単位当たり10^{4}～10^{12}のウイルス粒子であることが好ましい。しかしながら、代替製剤もまた、本明細書での使用に適していると見なされ、すべての既知の投与経路及び投与方法が本明細書で企図される。医薬組成物が組換え細菌を含む場合、組成物の細菌力価は、投与単位当たり10^{2}～10^{3}、10^{3}～10^{4}、10^{4}～10^{5}の細菌細胞であることが好ましい。医薬組成物が組換え酵母を含む場合、組成物の細菌力価は、投与単位当たり10^{2}～10^{3}、10^{3}～10^{4}、10^{4}～10^{5}の酵母細胞であることが好ましい。

【００５９】

本明細書で使用される、ウイルス製剤、細菌製剤、又は酵母製剤の「投与」という用語は、ウイルス製剤、細菌製剤、又は酵母製剤の直接投与及び間接投与の両方を指し、製剤の直接投与は、典型的には医療従事者（例えば、医師、看護師など）によって行われ、間接投与は、（例えば、注射、注入、経口投与、局所投与などによる）直接投与のために医療従事者に製剤を提供する又は利用可能にするステップを含む。

【００６０】
いくつかの実施形態では、ウイルス製剤、細菌製剤、又は酵母製剤は、皮下注射、真皮下注射、又は静脈内注射を含む全身注射によって投与される。全身注射が効率的でない可能性がある（例えば、脳腫瘍など）の他の実施形態では、製剤が腫瘍内注射によって投与されることが企図される。
【００６１】
製剤投与の用量及びスケジュールに関しては、用量及び／又はスケジュールは、ウイルス、細菌、又は酵母の種類、疾患の種類及び予後（例えば、腫瘍の種類、大きさ、位置）、患者の健康状態（例えば、年齢、性別などを含む）によって変動し得ることが企図される。用量及びスケジュールは変動し得るが、この用量及びスケジュールは、製剤が宿主の正常細胞に有意な毒性作用をもたらさないが、Ｔｈ１バイアス又はＴｈ２バイアス免疫応答のいずれかを誘発するのに十分であるように選択及び調節することができる。従って、好ましい一実施形態では、製剤を投与する最適又は所望の条件は、所定の閾値に基づいて決定することができる。例えば、所定の閾値は、特定の種類のサイトカイン（例えば、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－β、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１０など）の所定の局所濃度又は全身濃度であり得る。従って、投与条件は、典型的には、Ｔｈ－１免疫応答特異的サイトカイン（又はＴｈ－２免疫応答特異的サイトカイン）が、少なくとも局所的又は全身的に、Ｔｈ－２免疫応答特異的サイトカイン（又はＴｈ－１免疫応答特異的サイトカイン）よりも少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％多く発現されるように調整される。
【００６２】
例えば、医薬組成物が組換えウイルスを含む場合、腫瘍溶解性ウイルス製剤の企図される用量は、少なくとも10^{6}のウイルス粒子／日、又は少なくとも10^{8}のウイルス粒子／日、又は少なくとも10^{10}のウイルス粒子／日、又は少なくとも10^{11}のウイルス粒子／日である。いくつかの実施形態では、ウイルス製剤の単回用量を、少なくとも１日間、少なくとも３日間、少なくとも１週間、少なくとも２週間、少なくとも１か月間、又はその他の所望のスケジュールにわたって少なくとも１日１回又は１日２回（投与当たり半用量）投与することができる。他の実施形態では、ウイルス製剤の用量は、スケジュールの間に徐々に増加させる、又はスケジュールの間に徐々に減少させることができる。さらに他の実施形態では、ウイルス製剤のいくつかの一連の投与は、間隔を空けることができる（例えば、３日間連続してそれぞれ１回の投与、そして７日間の間隔を空けてから３日間連続してそれぞれ１回の投与など）。
【００６３】
いくつかの実施形態では、医薬製剤の投与は、２つ以上の異なる段階：プライミング投与及びブースト投与であり得る。プライミング投与の用量は、その後のブースト投与よりも（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％）多いと企図される。しかしながら、プライミング投与の用量は、その後のブースト投与よりも少ないことも企図される。さらに、複数のブースト投与が行われる場合、各ブースト投与は異なる用量（例えば、増加する用量、減少する用量など）を有する。
【００６４】
いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、本発明者らは、本明細書で企図される医薬組成物の（例えば、組換えワクチン組成物、ウイルス、細菌、又は酵母としての）患者への投与が、上記の組換え核酸又はこの組換え核酸によってコードされる組換えタンパク質の患者の抗原提示細胞への送達をもたらすことを企図する。例えば、遺伝子改変された細菌又は酵母によって生成されるＭＨＣ－ＩＩシグナルに関連するポリトープペプチドは、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）で処理され、抗原提示細胞表面上のＭＨＣ－ＩＩ複合体と結合した抗原として提示され得る。別の例では、ＭＨＣ－ＩＩシグナルに関連したポリトープペプチドをコードする核酸配列は、遺伝子改変ウイルスの感染によって抗原提示細胞に送達することができ、抗原提示細胞においてコードされる。次に、ＭＨＣ－ＩＩシグナルに関連した生成されたポリトープペプチドは、抗原提示細胞表

面上のＭＨＣ－ＩＩ複合体と結合した抗原として提示され得る。ポリトープがＴｈ１特異的分極エピトープに結合されている場合、又はポリトープの抗原／ネオエピトープがＴｈ１特異的分極を誘発するように選択されている場合、ＭＨＣ－ＩＩ－ポリトープ複合体に結合したナイーブＴｈ細胞はＴ細胞成熟をＴｈ１細胞に分極する可能性が高いと予想される。さらに、Ｔｈ１細胞から分泌されるサイトカインは、他のナイーブＴｈ細胞をＴｈ１細胞にさらに向かわせて、Ｔｈ１優位免疫応答の優位環境を生成し得る。そのような特異的Ｔｈ１（又はＴｈ２）優位免疫応答は、少なくとも局所的に疾患特異的免疫療法を提供し得ることを理解されたい。例えば、自己免疫疾患又は臓器移植拒絶を有する患者の場合、Ｔｈ２特異的免疫応答をブーストすることにより、患者自身の組織及び／又は移植臓器に対するＴｈ１特異的細胞傷害性免疫応答を抑制することができる。別の例では、癌を有する患者の場合、Ｔｈ１特異的免疫応答をブーストすることにより、癌及び患者特異的抗原又はネオエピトープを発現する腫瘍細胞に対する細胞毒性媒介免疫応答を増強し得る。さらに別の例では、自己免疫疾患を有する患者の場合、Ｔｒｅｇ発現（又は分極）をブーストすることにより、自己組織に対する過剰反応性免疫応答を抑制することができる。しかしながら、免疫応答のＴｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７８、Ｔｒｅｇなどに対する分極は、一般的な分極ではなく、発現された抗原の特定の状況における分極であることを認識されたい。従って、免疫応答は、抗原特異的な方法で特定のＣＤ４サブタイプに向けて非常に効果的に調節することができることを理解されたい。

【００６５】

本明細書における発明の概念から逸脱することなく、既に説明された変更に加えて、さらに多くの変更が可能であることは当業者には明らかであろう。従って、本発明の主題は、添付の特許請求の範囲を除いて制限されるべきではない。さらに、明細書と特許請求の範囲の両方を解釈する際、すべての用語は、文脈と一致する可能な限り広い意味で解釈されるべきである。特に、「～を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」及び「～を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語は、非排他的な要領で要素、構成要素、又はステップを言及するものと解釈するべきであり、言及される要素、構成要素、又はステップは、存在してもよいし、又は利用してもよいし、又は明確に言及されていない他の要素、構成要素、又はステップと組み合わせてもよいことを示している。本明細書の説明及び以下の特許請求の範囲全体で使用される「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その（ｔｈｅ）」の意味は、文脈に特段の記載がない限り、複数の指示対象を含む。また、本明細書の説明で使用される「～における（ｉｎ）」の意味は、文脈に特段の記載がない限り、「～における（ｉｎ）」及び「～における（ｏｎ）」を含む。本明細書の特許請求の範囲に、Ａ、Ｂ、Ｃ．．．．、及びＮからなる群から選択されるいずれか少なくとも１つと記載される場合、その文章は、ＡとＮでもＢとＮなどでもなく、群の唯１つの要素を必要とすると解釈するべきである。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/054451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12N 15/74(2006.01)i, C12N 15/81(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i

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)
C07K 14/47; A61K 31/7088; A61K 39/00; A61K 39/39; A61K 39/395; A61K 9/14; C12N 15/63; C12N 15/62; C12N 15/74; C12N 15/81; C12N 15/85; A61K 48/00

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: multivalent antigens, stimulation, th1, th2, MHC-II trafficking signal, polytope peptide, polarizing epitope, vector, immunity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KREITER, S. et al., `Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals', The Journal of Immunology, 2008, Vol.180, pp.309-318 See abstract; and page 310.	1-3,21-23
A	MEMARNEJADIAN, A. et al., `Fusion of HBsAg and prime/boosting augment Th1 and CTL responses to HCV polytope DNA vaccine', Cellular Immunology, 2010, Vol.261, pp.93-98 See the whole document.	1-3,21-23
A	SABBAGHIAN, E. et al., `In silico design of a multimeric polytope as a highly immunogenic DNA vaccine against human cytomegalovirus', Journal of Applied Biotechnology Reports, 2014, Vol.1, Issue 4, pp.143-153 See the whole document.	1-3,21-23
A	WO 2011-059478 A1 (UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE NAVY) 19 May 2011 See the whole document.	1-3,21-23
A	US 2011-0071214 A1 (ALLEN, G. J.) 24 March 2011 See the whole document.	1-3,21-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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	Date of mailing of the international search report
21 May 2019 (21.05.2019)	**21 May 2019 (21.05.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea	KWON, YONGKYONG
Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No. +82-42-481-3371

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/054451

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003-0103966 A1 (GROOTEN, J. et al.) 5 June 2003 See the whole document.	1-3,21-23
A	US 2016-0166663 A1 (QANTU THERAPEUTICS, INC.) 16 June 2016 See the whole document.	1-3,21-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/054451

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. ☒ Claims Nos.: 45-69
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 45-69 are directed to a treatment method of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv), to search.

2. ☒ Claims Nos.: 6,9,26,29,42,53,63,75
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:
Claims 6, 9, 26, 29, 42, 53, 63, 75 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 4-5,7-8,10-20,24-25,27-28,30-41,43-44,48-52,54-62,64-74
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. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.

3. ☐ 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. ☐ 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

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ 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.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2018/054451

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011-059478 A1	19/05/2011	EP 2488197 A1	22/08/2012
		US 2012-0195893 A1	02/08/2012
		US 9795661 B2	24/10/2017
US 2011-0071214 A1	24/03/2011	CA 2760041 A1	19/11/2009
		WO 2009-137872 A1	19/11/2009
US 2003-0103966 A1	05/06/2003	AU 6604701 A	17/12/2001
		CA 2408688 A1	13/12/2001
		EP 1289555 A2	12/03/2003
		WO 01-94419 A2	13/12/2001
		WO 01-94419 A3	21/03/2002
US 2016-0166663 A1	16/06/2016	EP 3027205 A1	08/06/2016
		US 10195257 B2	05/02/2019
		WO 2015-017280 A1	05/02/2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	C12N	5/10		
C12N	***15/861***	***(2006.01)***	C12N	15/861	Z	
A61K	***48/00***	***(2006.01)***	A61K	48/00		
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	A61P	43/00	121	
A61K	***35/761***	***(2015.01)***	A61K	35/761		
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	A61P	35/00		
A61P	***37/02***	***(2006.01)***	A61P	37/02		
A61P	***37/06***	***(2006.01)***	A61P	37/06		
A61K	***35/74***	***(2015.01)***	A61K	35/74	A	
A61K	***36/06***	***(2006.01)***	A61K	36/06		
A61K	*38/20*	*(2006.01)*	A61K	38/20		
A61K	*38/17*	*(2006.01)*	A61K	38/17		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
			A61K	39/395	N	
			A61K	38/17	100	

(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,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,JO,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

(72)発明者　スーン－シオン，パトリック
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９０２３２，カルバー　シティ，９９２０　ジェファーソン　ブールバード
(72)発明者　ニアジ，ケイヴァン
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９０２３２，カルバー　シティ，９９２０　ジェファーソン　ブールバード

Ｆターム(参考)　4B065 AA01X AA72X AA94X AA95X AB01 BA02 CA24 CA45
4C084 AA13 MA02 NA05 NA14 ZB07 ZB08 ZB26 ZC75
4C085 AA13 BB31 CC22 EE03
4C087 AA01 AA02 BC11 BC30 BC83 CA12 MA02 NA05 NA14 ZB07
ZB08 ZB26 ZC75