

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫担当細胞を改変する方法であって、

C X A D R をコードする組換え核酸を前記免疫担当細胞に導入して改変型免疫担当細胞を作製するステップと、

前記 C X A D R を発現する条件下で第 1 の培地において前記改変型免疫担当細胞を培養するステップと、

を含み、前記免疫担当細胞が N K 細胞または樹状細胞である、方法。

【請求項 2】

前記組換え核酸が R N A である、請求項 1 の方法。

10

【請求項 3】

前記 N K 細胞が、不死化されるか、N K 9 2 細胞または遺伝子操作された N K 9 2 細胞である、請求項 2 の方法。

【請求項 4】

前記 N K 細胞が、(a) 少なくとも 1 種のキラー細胞免疫グロブリン様受容体 (K I R) の発現の低下または消失を有するように遺伝子操作される、(b) 高親和性 F c 受容体を発現するように遺伝子操作される、または (c) キメラ T 細胞受容体を発現するように遺伝子操作される、請求項 3 の方法。

【請求項 5】

前記 C X A D R をコードする組換え核酸が、恒常的に活性のあるプロモーター、N K 細胞特異的プロモーターまたは低酸素誘導性プロモーターの制御下にある、請求項 1 の方法。

20

【請求項 6】

前記改変型免疫担当細胞を組換えアデノウイルスに感染させるステップをさらに含む、請求項 1 の方法。

【請求項 7】

前記組換えアデノウイルスが、E 2 b の欠失を有し、且つ、ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうち少なくとも 1 つをコードする組換え核酸を含む、請求項 6 の方法。

【請求項 8】

前記改変型免疫担当細胞を患者に投与するステップをさらに含む、請求項 6 の方法であって、前記感染させるステップが、前記患者への前記改変型免疫担当細胞の投与の後にインピボで実施される、方法。

30

【請求項 9】

前記改変型免疫担当細胞を患者に投与するステップをさらに含む、請求項 6 の方法であって、前記感染させるステップが、前記患者への前記改変型免疫担当細胞の投与の前にインピトロで実施される、方法。

【請求項 10】

前記改変型免疫担当細胞を患者に投与するステップをさらに含む、請求項 1 の方法であって、前記改変型免疫担当細胞が、前記改変型免疫担当細胞が投与される患者に対して自家性である、方法。

40

【請求項 11】

前記第 1 の培地において前記改変型免疫担当細胞を所望の量まで増殖させる、請求項 1 の方法であって、前記改変型免疫担当細胞の投与に適した第 2 の培地で前記第 1 の培地を置き換えるステップをさらに含む、方法。

【請求項 12】

遺伝子改変型免疫担当細胞であって、前記免疫担当細胞における C X A D R の発現のための調節配列に機能可能に連結された C X A D R をコードする組換え核酸を含み、前記遺伝子改変型免疫担当細胞が N K 細胞または樹状細胞である、遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項 13】

50

前記細胞がNK細胞である、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項14】

前記細胞が、遺伝子改変されたNK細胞、NK92細胞またはNK92派生細胞である、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項15】

前記細胞が、高親和性Fc受容体を発現するように遺伝子改変されている、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項16】

前記Fc受容体が、抗体に連結されており、
前記抗体が、腫瘍関連抗原、腫瘍特異抗原または癌のネオエピトープに対する結合特異性を有する、
請求項15の遺伝子改変型免疫担当細胞。

10

【請求項17】

前記細胞が、キメラT細胞受容体を発現するように遺伝子改変されている、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項18】

前記キメラT細胞受容体が、scFv部分を含む、請求項17の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項19】

前記キメラT細胞受容体が、腫瘍関連抗原、腫瘍特異抗原または癌のネオエピトープに対する結合特異性を有するエクドメインを有する、請求項17の遺伝子改変型免疫担当細胞。

20

【請求項20】

前記組換え核酸が、前記免疫担当細胞のゲノム中に組み込まれている、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項21】

前記組換え核酸が、RNAである、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項22】

前記調節配列が、NK細胞特異的プロモーターまたは低酸素誘導性プロモーターを含む、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

30

【請求項23】

前記細胞が、前記細胞を受け入れる患者に対して自家性である、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項24】

前記免疫担当細胞が、遺伝子改変の前にCXADRを発現しない、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項25】

前記CXADRがCXADRアイソフォーム1である、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項26】

癌の免疫療法のために患者をコンディショニングする方法であって、CXADRを発現するように遺伝子改変されている免疫担当細胞を前記患者に投与するステップを含み、前記免疫担当細胞がNK細胞または樹状細胞である、方法。

40

【請求項27】

前記免疫担当細胞が、NK細胞である、請求項26の方法。

【請求項28】

ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスで前記免疫担当細胞を感染させるステップをさらに含む、請求項26の方法。

【請求項29】

50

ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスを前記患者に投与するステップをさらに含む、請求項26の方法。

【請求項30】

前記組換えアデノウイルスが、欠失しているか機能を有さないE2b遺伝子を有する、請求項28または請求項29の方法。

【請求項31】

癌と診断された患者を処置する方法であって、

CXADRをコードする組換え核酸であって、CXADRをコードする核酸が宿主免疫担当細胞における前記CXADRの発現のための調節配列に機能可能に連結されている、組換え核酸を含む遺伝子改変型免疫担当細胞を前記患者に投与するステップと、

ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスを前記患者に投与するステップと、

を含み、前記遺伝子改変型免疫担当細胞がNK細胞または樹状細胞であり、前記組換えアデノウイルスは、前記患者の中で前記遺伝子改変型免疫担当細胞において前記CXADRが発現すると投与される、方法。

【請求項32】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、NK細胞である、請求項31の方法。

【請求項33】

前記組換えアデノウイルスが、欠失しているか機能を有さないE2b遺伝子を有する、請求項31の方法。

【請求項34】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、前記患者の自家細胞である、請求項31の方法。

【請求項35】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、請求項12～25のいずれか1項に記載の遺伝子改変型免疫担当細胞である、請求項31の方法。

【請求項36】

癌と診断された患者を処置する方法であって、

組換えアデノウイルスで遺伝子改変型免疫担当細胞を感染させるステップであって、

前記遺伝子改変型免疫担当細胞は、CXADRをコードする組換え核酸であって、CXADRをコードする核酸が宿主免疫担当細胞における前記CXADRの発現のための調節配列に機能可能に連結されている、組換え核酸を含み、

前記遺伝子改変型免疫担当細胞は、NK細胞または樹状細胞であり、

前記組換えアデノウイルスは、ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つをコードする核酸を含む、ステップと、

感染させた免疫担当細胞を前記患者に投与するステップと、を含む方法。

【請求項37】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞がNK細胞である、請求項36の方法。

【請求項38】

前記組換えアデノウイルスが、欠失しているか機能を有さないE2b遺伝子を有する、請求項36の方法。

【請求項39】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、前記患者の自家細胞である、請求項36の方法。

【請求項40】

前記ネオエピトープが、癌および患者に特異的なネオエピトープである、請求項36の方法。

【請求項41】

癌の処置における遺伝子改変型免疫担当細胞の使用であって、前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、請求項12～25のいずれか1項に記載の遺伝子改変型免疫担当細胞である、使用。

【請求項42】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうち少なくとも1つをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスに感染する細胞である、請求項41の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2016年2月5日に出願された米国仮出願第62/291,999号に対する優先権を主張する。

【0002】

本発明の分野は、細胞の遺伝子改変（特に、細胞をウイルスに感染しやすくする改変）の組成物および方法である。

【背景技術】

【0003】

背景の説明は、本発明の理解において有用である可能性がある情報を含む。背景の説明は、ここで提供される情報のいずれかが先行技術であるか現在特許請求されている発明に関連するということを確認するものではないし、具体的または黙示的に参照された任意の刊行物が先行技術であるということを確認するものでもない。

【0004】

本明細書に記載される刊行物および特許出願は全て、個々の刊行物または特許出願がそれぞれ、具体的かつ個別に、参照により組み込まれると示されているのと同じ程度に、参照により組み込まれる。組み込まれた参考文献における用語の定義または使用が、本明細書で提供される当該用語の定義と矛盾しているか本明細書で提供される当該用語の定義に反している場合、本明細書で提供される当該用語の定義が適用され、その参考文献における当該用語の定義は適用されない。

【0005】

アデノウイルスは、よく特徴付けられた二本鎖DNAウイルスであり、人間において呼吸器感染症を引き起こすその能力で知られている。より最近では、アデノウイルスのゲノムが、多くの目的の細胞型への送達のための様々な導入遺伝子を含むアデノウイルス粒子の生産を可能にする組成物を生成するように改変された。アデノウイルス5型は、この点で最もよく研究されたプラットフォームのうちの一つであり、数多くのキットが、使用者が決定したウイルスを生産するために商業市場で利用可能となっている（例えば、Vector BioLabs, USA, Malvern, PA 19355；またはThermo Fisher Scientific, USA, Waltham, MA 02451）。このように生産されたアデノウイルス5型は、細胞培養、動物、さらには臨床試験において用いられており、さらに、この系への科学者および臨床医の精通を支えている。細胞内へのウイルスの侵入は、コクサッキー・アデノウイルス受容体（CXADR）を介して媒介されると考えられている。

【0006】

CXADRを産生できないかウイルスの侵入には不十分な量のCXADRしか産生しない細胞または組織では、そのような細胞におけるアデノウイルス5型の技術の使用が制限され、そのため、多くの臨床的に関連する細胞および組織（幹細胞および免疫細胞が包含される）の形質導入が妨げられる。CXADR（Swiss-Prot Accession Number: P78310）は、I型膜受容体であり、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである（Science（1997）275；1320-1323）。CXADRは、典型的には200アミノ酸よりも大きなサイズである細胞外ドメインを有し、タイトジャンクションの完全性に必須である上皮アピカルジャンクション複合

10

20

30

40

50

体 (epithelial apical junction complex) の構成要素であると考えられている (J Biol Chem (1999) 274; 10219-10226)。CXADRは、細胞内のPDZドメイン含有タンパク質LNX (Ligand-of-Numb Protein-X) を細胞間の接触部位にリクルートする (J Biological Sci (2003) 278; 7439-7444)。CXADRはまた、ホモフィリックな細胞接着分子として機能する可能性もあり (Molecular Brain Research (2000) 77; 19-28)、PMNの形質膜に位置するJAMLとの接着相互作用を介したPMNの経上皮遊走において観察されている (Mol Biol Cell (2005) 16; 2694-703)。CXADRノックアウトマウスは、心臓の欠陥に関連する胚性致死の表現型を示した (Genesis (2005) 42; 77-85)。これらの複数の機能と関与に基づけば、CXADRの主要な生理学的役割がウイルスの侵入の受容体である可能性は低い。

10

【0007】

骨肉腫および悪性甲状腺腫瘍においてCXADRの過剰発現が観察されており (Cancer Sci (2003) 94; 70-75; Thyroid (2005) 15; 977-87)、CXADRはまた、US2014/0193419に記載されるように、乳癌、腎臓癌および肺癌の細胞株において、ならびに結腸の腫瘍組織において、過剰発現していた。注目すべきことに、CXADRアンチセンスプラスミドベクターは、高発現している肺癌細胞によって媒介される異種移植片を抑止し、軟寒天コロニー形成を阻害した (Cancer Res (2004) 64; 6377-80)。CXADRの発現は、シンジェニックマウス腫瘍モデルにおける前腫瘍性前駆病変から腫瘍性乳癌増殖への移行後に亢進される (Clin Cancer Res (2005) 11; 4316-20)。乳癌細胞の3D組織培養モデルでは、悪性転換において見られるような極性と完全性の崩壊が、CXADRのアプレギュレーションをもたらし得る (Proc Natl Acad Sci (2003) 100, 1943-1948)。卵巣癌および子宮頸癌の細胞株におけるCXADRの過剰発現は、アポトーシスからの保護によって細胞生存を高めた (Clin Cancer Res (2005) 11; 4316-20)。胃腸癌におけるCXADRの発現は、腫瘍の分化と相関していた (Cancer Gene Ther (2006) Epub)。CXADRの発現の減少は、進行した膀胱癌と関連した (Urology (2005) 66; 441-6)。卵巣癌細胞株におけるCXADRの過剰発現は、細胞遊走を阻害した (Exp Cell Res (2004) 298; 624-31)。CXADRの発現は、原発性前立腺癌において減少したが、転移すると高発現する (Cancer Res (2002) 62; 3812-8)。

20

30

【0008】

CXADRの公知の使用では、US2015/0140018で開示されるように、ヒトCXADRの位置181~230に存在するエピトープに結合することが可能な抗体は、前立腺癌細胞、膵臓癌細胞および結腸直腸癌細胞に対する抗癌活性を有することが報告された。さらに、この'018出願は、その抗体がADCおよびCDCの活性を有することを開示した。さらに、US2008/0124360に記載されるように、アデノウイルスベクターは、樹状細胞を標的化するのに適した改変型または異種性の繊維タンパク質を生じさせてプロセッシングおよびT細胞への提示のために樹状細胞に抗原をより特異的に送達するように構築されている。この目的のために、ウイルス粒子は、特定のネイティブの受容体 (例えば、Ad5とAd2の場合にはコクサッキー・アデノウイルス受容体) への結合から脱標的化され、樹状細胞上に発現される受容体に再標的化された。そのような再標的化は、感染の再指向化 (redirection) に関しては少なくとも概念的に有益であるが、新たな困難が生じる。とりわけ、確立されたアデノウイルスの宿主細胞におけるウイルスの増殖は、宿主細胞の感染に必要であるCXADR受容体への結合の喪失のせいで、もはや選択肢ではない。

40

【0009】

しかし、注目すべきことに、治療用細胞におけるCXADRの発現または過剰発現は、

50

癌治療において、さらには癌と診断された患者の処置の補助的役割において、用いられていないようである。従って、そのような状況においてC X A D Rを用いる組成物および方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0010】

本発明の主題は、免疫担当細胞におけるC X A D Rの組換え発現を用いてウイルスのトランスフェクション（特に組換えアデノウイルスでのトランスフェクション）に対する細胞の感受性を増加させる、癌の処置の組成物および方法を対象とする。改変された細胞は、直接的な様式（例えば、患者および腫瘍に特異的なネオエピトープをコードする組換えアデノウイルスに感染した樹状細胞またはNK細胞）または間接的な様式（例えば、共刺激分子またはチェックポイント阻害剤をコードする組換えアデノウイルスに感染したNK細胞）で治療的機能を提供することが企図される。

10

【0011】

本発明の主題の一態様では、発明者等は、C X A D Rをコードする組換え核酸を免疫担当細胞に導入して改変型免疫担当細胞を作製するステップを含む、免疫担当細胞を改変する方法を企図する。さらなるステップでは、改変型免疫担当細胞が、C X A D Rを発現する条件下で第1の培地において培養される。

【0012】

最も典型的には、免疫担当細胞は、NK細胞（例えば、不死化NK細胞またはNK92細胞あるいは遺伝子操作されたNK92細胞）、T細胞（例えば、CD8⁺）、B細胞、マクロファージまたは樹状細胞である。例えば、NK細胞は、少なくとも1種のキラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）の発現の低下または消失を有するように遺伝子操作されてもよいが、高親和性Fc受容体を発現するように遺伝子操作されてもよいが、キメラT細胞受容体を発現するように遺伝子操作されてもよい。好適な調節エレメントに関して、C X A D R遺伝子は、恒常的に活性のあるプロモーター、NK細胞特異的プロモーターまたは低酸素誘導性プロモーターの制御下にあってもよいということが企図される。好適なNK細胞は特定のアデノウイルスに対して天然に許容性であってもよいということ、または1種以上の特定のアデノウイルスに対する許容性を増加させるか示すようにNK細胞が改変または選択されるということがさらに企図される。

20

【0013】

さらに理解されるように、企図される方法は、（典型的には患者および腫瘍に特異的な）ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよび/またはチェックポイント阻害剤をコードする組換え核酸を含むであろう組換えアデノウイルス（好ましくはE2bの欠失を有する）で改変型免疫担当細胞を感染させるステップをさらに含んでもよい。好適なアデノウイルスに関して、好ましいアデノウイルスは、免疫担当細胞に感染することが容易に可能である、および/または感染細胞に導入された1種以上の遺伝子の発現を可能にするということが留意されるべきである。企図される方法は、患者に改変型免疫担当細胞を投与するステップをさらに含んでもよいということ、および感染させるステップは、患者への改変型免疫担当細胞の投与の後にインピボで行われるということがさらに留意される。あるいは、企図される方法はまた、患者に改変型免疫担当細胞を投与するステップを含んでもよく、ここで、感染させるステップは、患者への改変型免疫担当細胞の投与の前にインピボで行われる。

30

40

【0014】

望まれる場合、改変型免疫担当細胞は、その改変型免疫担当細胞が投与される患者に対して自家性である、および/または、後で改変型免疫担当細胞の投与に適した第2の培地と置き換えられる第1の培地において所望の量まで増殖されてもよい。

【0015】

従って、本発明はまた、宿主免疫担当細胞におけるC X A D Rの発現のための調節配列に機能可能に連結されたC X A D R（例えば、アイソフォーム1）をコードする組換え核酸を含む遺伝子改変型免疫担当細胞も企図する。上記のように、好適な免疫担当細胞には

50

、NK細胞、T細胞、B細胞、マクロファージおよび樹状細胞が包含される。しかし、さらに企図される態様では、代替となる細胞は必ずしも免疫担当細胞である必要はなく、他の好適な細胞には、CHO細胞、HEK-293細胞、マウス骨髄腫リンパ芽球様細胞、BHK細胞、Sf9細胞等が明示的に包含される。

【0016】

遺伝子改変型免疫担当細胞がNK細胞である場合、そのようなNK細胞は、遺伝子改変されたNK細胞、NK92細胞またはNK92派生細胞であってもよい。例えば、細胞は、高親和性Fc受容体（腫瘍関連抗原、腫瘍特異抗原または癌のネオエピトープに対する結合特異性を有する抗体に連結されてもよい）を発現するように遺伝子改変されてもよいが、キメラT細胞受容体（例えば、scFv部分を含むもの）を発現するように遺伝子改変されてもよい。好ましいキメラT細胞受容体は、典型的には、腫瘍関連抗原、腫瘍特異抗原または癌のネオエピトープに対する結合特異性を有するエクドメインを有するであろう。

10

【0017】

遺伝子改変型免疫担当細胞中の組換え核酸は、宿主細胞のゲノム中に組み込まれてもよいが、染色体外DNAまたはRNAとして存在してもよい。最も典型的には、但し必ずしもそうではないが、調節配列は、NK細胞特異的プロモーターまたは低酸素誘導性プロモーターを含んでもよい。

【0018】

別の観点から見れば、発明者等はまた、癌の免疫療法のために患者をコンディショニングする方法も企図する。好ましい方法は、CXADRを発現するように遺伝子改変されている免疫担当細胞（例えば、NK細胞、T細胞、B細胞、マクロファージまたは樹状細胞）を患者に投与するステップを含む。

20

【0019】

さらに、そのような方法は、ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうち少なくとも1つをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスで免疫担当細胞を感染させるステップをさらに含んでもよいが、ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうち少なくとも1つをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスを患者に投与するステップをさらに含んでもよい。好ましくは、組換えアデノウイルスは、欠失しているか機能を有さないE2b遺伝子を有するであろう。

30

【0020】

本発明の主題のさらに別の態様では、CXADRをコードする組換え核酸であって、CXADRをコードする核酸が宿主免疫担当細胞におけるCXADRの発現のための調節配列に機能可能に連結されている、組換え核酸を含む遺伝子改変型免疫担当細胞を患者に投与するステップを含む、癌と診断された患者を処置する方法が企図される。別のステップでは、ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよび/またはチェックポイント阻害剤をコードする核酸を含む組換えアデノウイルスが患者に投与される。最も典型的には、組換えアデノウイルスは、患者の中で遺伝子改変型免疫担当細胞においてCXADRが発現すると投与される。

40

【0021】

好ましい免疫担当細胞には、NK細胞、T細胞、B細胞、マクロファージおよび樹状細胞が包含され、組換えアデノウイルスが、欠失しているか機能を有さないE2b遺伝子を有すること、および/または遺伝子改変型免疫担当細胞が患者の自家細胞であることが一般に好ましい。

【0022】

さらに企図される態様では、癌と診断された患者を処置する方法が企図される。そのような方法は、典型的には、組換えアデノウイルスで遺伝子改変型免疫担当細胞を感染させるステップを含み、ここで、遺伝子改変型免疫担当細胞は、CXADRをコードする組換え核酸であって、CXADRをコードする核酸が宿主免疫担当細胞におけるCXADRの

50

発現のための調節配列に機能可能に連結されている、組換え核酸を含み、組換えアデノウイルスは、ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つをコードする核酸を含む。別のステップでは、感染済みの免疫担当細胞が患者に投与される。

【0023】

従って、癌の処置における遺伝子改変型免疫担当細胞の使用も企図され、ここで、遺伝子改変型免疫担当細胞は、本明細書で提示されるような遺伝子改変型免疫担当細胞である。遺伝子改変型免疫担当細胞は、ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスに感染する細胞であってもよいということがさらに留意される。

10

【0024】

本発明の主題の様々な目的、特徴、態様および利点は、以下の好ましい実施形態の詳細な説明ならびに同様の数字が同様の構成要素を表す添付の図面から、より明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、本明細書中の教示と組み合わせて使用するのに適したCXADR配列カセットの例示的な模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

組換えアデノウイルス(A d V)5型は、許容性の細胞型における、よく特徴付けされた、および一般に使用される、ウイルス性の遺伝子送達プラットフォームを提供する。しかし、A d V 5型についての所与の細胞型の形質転換能は、CXADRの発現またはその十分な量に主に依存する。残念なことに、この受容体の発現は、多くの癌型、幹細胞または養子免疫伝達される免疫細胞(細胞傷害性T細胞またはNK細胞など)には存在しないことで有名である。

20

【0027】

今回、発明者等は、核酸コンストラクトで細胞をトランスフェクトして、目的の細胞に対してCXADR遺伝子の発現を促進し、インビトロおよびインビボにおいてA d V 5型のトランスフェクションに対する感受性を付与できるということを発見した。最も好ましくは、CXADRの組換え発現に適した細胞には、NK細胞、T細胞(CD8⁺、CD4⁺等)、B細胞、マクロファージおよび特定の樹状細胞集団などの免疫担当細胞が包含される。CXADRの発現によって、これらの遺伝子操作された細胞は、そのように感染した細胞に組換え核酸を送達する遺伝子改変型アデノウイルスに感染しやすくなるということが企図される。最も好ましくは、送達は、免疫原性が低下しているか消失しているアデノウイルスコンストラクトを用いて行われ、特に企図されるアデノウイルスには、E2b遺伝子が機能しないか欠失しているものが包含される(例えば、Journal Of Virology, Feb. 1998, p. 926 - 933を参照のこと)。

30

【0028】

これに関連して、CXADR遺伝子での宿主細胞(例えば、NK細胞などの免疫担当細胞またはタンパク質産生細胞)のトランスフェクションは必ずしも、広範な種類のウイルスによる感染が可能である普遍的に許容性である細胞をもたらす必要はないということが理解されるべきである。実際、トランスフェクトされた細胞の感染は、(例えば、使用されるCXADRのアイソタイプに応じて)特定のウイルスのサブセット、さらにはアデノウイルスのサブセットに限定されてもよいということが理解されるべきである。例えば、いくつかのトランスフェクトされた免疫担当細胞(例えば、NK92細胞)は、霊長類(例えば、ゴリラ)由来のアデノウイルスに容易に感染しやすい可能性がある一方で、それらは、ヒトアデノウイルスまたは改変型アデノウイルスによるトランスフェクションを受けにくい可能性がある。一方で、いくつかの改変型アデノウイルス(例えば、NK92派生物)は、それらの改変のおかげで、免疫担当細胞に容易に感染する可能性がある(例え

40

50

ば、本来の免疫原性を除去するために特定の初期遺伝子が除去された場合)。

【0029】

さらに、および特にトランスフェクトされた細胞のウイルス感染に対する許容性が低い状況では、細胞を、許容性に関して適合させてもよい/選択してもよいということが企図される。そのような選択は、細胞が不死化されるクローン増殖であってもよいが、または、細胞が、まず不死化されてから、トランスフェクトされ、許容性に関して選択されてもよい。あるいは、トランスフェクトされた許容細胞はまた、許容性を確立する1種以上の形質について分析されてもよく、その後、これらの形質が、許容性の改善のために、さらなる細胞に付与されてもよい。

【0030】

本発明の主題の例示的な一態様では、CXADRをコードするcDNAをHEK-293Tの全cDNA調製物から増幅した後、図1に例示的に示すようにpeak8-puromycinプラスミドにクローニングした。遺伝子発現は、EF-1 (ヒト伸長因子1)プロモーターから駆動させた。このように調製した組換え配列をDNAシーケンシングにより確認し、参照用データセット中のヒトCXADRアイソフォーム1の既知の配列(NP_001329.1)と完全に整列させた。次いで、この発現プラスミドを、当技術分野において周知である標準的なトランスフェクションプロトコルを用いてNK92細胞にトランスフェクトした。細胞ストックの調製のために、トランスフェクトされた細胞の選択を、ピューロマイシンを用いて実施した。ヒトNK細胞株は、アデノウイルス(特にAdV5型)で形質導入するのが困難であることが一般的に知られているため、そのような形質転換細胞は特に有利である。

【0031】

もちろん、本発明の主題は上記の特定の発現ベクターに限定されないということ、および、実際、細胞における組換え核酸からの発現の全ての様式が本発明での使用に適しているとみなされるということが理解されるべきである。一般に、好適なCXADRをコードする核酸配列を、いくつかのタイプのベクターにクローニングできる。例えば、CXADRの核酸を、プラスミド、ファージミド、ファージ派生物、動物ウイルスおよびコスミドなどの環状ベクターにクローニングできる。特に興味深いベクターには、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクターおよびシーケンシングベクターが含まれる。さらに、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に与えられてもよい。ウイルスベクターの技術は、当技術分野において周知であり、例えば、Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1~4巻(Cold Spring Harbor Press, NY)において、ならびに他のウイルス学および分子生物学のマニュアルにおいて、説明されている。ベクターとして有用であるウイルスには、様々なレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスおよびレンチウイルスが含まれる。一般に、好適なベクターは、少なくとも1種の生物において機能する複製開始点、プロモーター配列、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位および1種以上の選択マーカーを含むであろう(例えば、WO01/96584; WO01/29058; および米国特許第6,326,193号)。

【0032】

哺乳動物細胞への遺伝子導入のために、いくつかの周知のウイルスを利用した系が開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための便利なプラットフォームを与える。選択された遺伝子を、当技術分野で公知の技術を用いて、ベクターに挿入し、レトロウイルス粒子の中にパッケージングすることができる。次いで、この組換えウイルスを単離し、インビボまたはエクスピボのいずれかで対象の細胞に送達することができる。一部の実施形態では、アデノウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターが使用される。もちろん、本発明の主題は特定のベクターに限定されないということ、および、実際、細胞における組換え核酸からの発現の全ての様式(ベクター以外のコンストラクトからの発現を含む)が本発明での使用に適しているとみなされるということが理解されるべ

10

20

30

40

50

きである。例えば、一過性発現が望まれる場合、組換え核酸は、RNAとして、または真核生物の複製配列を有さない染色体外DNAとして、送達されてもよい。一方、永久的な発現が望まれる場合、細胞のゲノム中への組込みのために核酸が送達されてもよいが、または、細胞を（例えば、CRISPR/Cas9技術を用いた）ゲノム編集に供してゲノム中に発現カセットを導入してもよい。

【0033】

同様に、転写および翻訳の制御が大きく異なってもよく、発現が、恒常的に活性のあるプロモーターから、対応する誘導物質を用いて誘導性プロモーターから、または選択された組織または培養条件の下で活性化されるプロモーターから、駆動されてもよいということが理解されるべきである。当技術分野で知られているように、様々なプロモーターエレメント（例えば、開始因子結合部位、ポリメラーゼ結合部位、エンハンサー等）が、転写の開始の頻度を調節する。典型的には、これらは、開始部位の30~110bp上流の領域に位置するが、但し、いくつかのプロモーターは、開始部位の下流にも機能的エレメントを含むことが示されている。プロモーターエレメント間の間隔はフレキシブルであることが多く、その結果、プロモーターエレメント同士を逆にしても、または互いに移動させても、プロモーターの機能は保たれる。例えば、チミジンキナーゼ（tk）プロモーターでは、プロモーターエレメント間の間隔は、50bp離れるまで増加させることができ、それを超えると活性は低下し始める。

10

【0034】

プロモーターによっては、個々のエレメントが協調的に、あるいは独立的に、機能して転写を活性化し得るということも理解されるべきである。例示的なプロモーターには、CMV IE遺伝子、EF-1a、ユビキチンCまたはホスホグリセロキナーゼ（PGK）のプロモーターが包含される。さらに企図される態様では、プロモーターは、PGKプロモーター、または哺乳動物のT細胞においてCXADR導入遺伝子を発現させることが可能であるプロモーター（EF-1aプロモーターなど）である。ネイティブのEF-1aプロモーターは、リボソームへのアミノアシルtRNAの酵素的送達を担う、伸長因子1複合体のアルファサブユニットの発現を駆動する。EF-1aプロモーターは、哺乳動物用発現プラスミドで広く使用されており、様々なウイルスベクターにクローニングされた導入遺伝子からの発現を駆動するのに有効であることが示されている（例えば、Mol. Ther. (2009), 17(8): 1453-1464を参照のこと）。

20

30

【0035】

好適なプロモーターのさらなる例としては、前初期サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターが挙げられる。このプロモーター配列は、それに機能可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することが可能である強力な恒常的プロモーター配列である。しかし、他の恒常的プロモーター配列が使用されてもよく、これらには、サルウイルス40（SV40）初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）long terminal repeat（LTR）プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターならびにヒトの遺伝子のプロモーター（アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーターおよびクレアチンキナーゼプロモーターなど）が包含される。さらに、本発明の主題は、恒常的プロモーターに限定されないということ、さらには誘導性プロモーターも本明細書において明示的に企図されるということが理解されるべきである。誘導性プロモーターの使用は、有利なことに、（誘導性プロモーターに機能可能に連結されている）ポリヌクレオチド配列の発現を、そのような発現が望まれる時にオンにすること、および発現が望まれない時に発現をオフにすることが可能である分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例としては、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーターおよびテトラサイクリンプロモーターが挙げられる。

40

【0036】

50

組換えCXADRの発現がNK細胞特異的発現に限定されることが望まれる場合、NK細胞において優先的に(The Human Protein Atlas (URL: www.proteinatlas.org))において列挙されているような10未満または6未満だが3以上の組織における発現)、あるいは独占的に(The Human Protein Atlasにおいて列挙されているような3未満だが1以上の組織における発現)、発現される遺伝子に特有のプロモーターを含む発現コンストラクトが企図される。同様に、他の免疫担当細胞または抗原提示細胞(例えば、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、マクロファージ、樹状細胞)のための組織特異的発現または細胞特異的発現を伴うプロモーターも、本発明での使用に適していると明示的にみなされる。

【0037】

例えば、CXADRの発現が、NK細胞特異的発現であることが好ましい場合、またはNK細胞特異的発現に限定される場合、哺乳動物NK細胞受容体プロモーターが、CXADRの配列に機能可能に連結されてもよい。好適なプロモーターは、NKp30プロモーター(例えば、J Exp Med (1999), 190:1505-1516を参照のこと)、NKp44プロモーター(例えば、J Exp Med (1999), 189:787-796を参照のこと)およびNKp46プロモーター(例えば、J. Exp. Med (1997), 186:1129-1136; J Exp Med (1998), 188(5):953-60; またはNature (2001), 409:1055-1060を参照のこと)に由来してもよい(から派生してもよい)。ヒトの配列が好ましいが、別の起源(特に哺乳動物起源)も本発明において適しているとみなされる。そのような遺伝子の他の生物におけるホモログに関する情報を含め、配列、遺伝子情報とモチーフ情報、相同性、および他の関連情報は、容易に入手可能である(例えば、ヒトのNKp30 Gene ID:259197; NKp44 Gene ID:9436; NKp46 Gene ID:9437を参照のこと)。さらに、追加のエレメント(例えば、遺伝子のコード配列の下流に位置するエンハンサー)を、本明細書で提示される教示と併せて用いることができる。

【0038】

さらに企図される別の態様では、企図されるプロモーターはまた、CXADR遺伝子の転写を駆動する1以上の環境条件に敏感であってもよい。例えば、発現は、温度感受性プロモーター(例えば、BMC Biotechnol. 2011; 12; 11:51を参照のこと)の制御下で、または低酸素および金属感受性プロモーター(例えば、Gene Ther. 2006; 13(10):857-68を参照のこと)の制御下で、駆動されてもよい。そのような制御は、多くの腫瘍が低酸素微小環境を提示するため、細胞が癌治療において使用される場合に特に有利である可能性がある。

【0039】

プロモーターの特定のタイプと性質に関係なく、プロモーターは、CXADRの配列に機能可能に連結されて宿主細胞(すなわち、ベクターまたは他の発現コンストラクトで形質転換された細胞)における発現を駆動するであろうということが企図される。容易に理解されるように、組換え核酸コンストラクトは、様々な追加のエレメント(転写終結エレメント、イントロン配列、および/またはポリアデニル化シグナルが包含される)を含んでもよい。発現コンストラクトの構築は、任意の好適な遺伝子工学の技術(とりわけ、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製、およびDNAシーケンシングが包含される)を用いて達成できる。そのような技術は、当技術分野で周知であり、他の所で説明されている(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., (1989)を参照のこと)。

【0040】

本発明の主題のさらに企図される別の態様では、CXADRの発現は、上で例示されるようなアイソフォーム1に限定されないということが理解されるべきである。実際、好適

10

20

30

40

50

なCXADRタンパク質には、コクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体として働き、その結果、細胞へのコクサッキーウイルスおよび/またはアデノウイルス(特に、アデノウイルス5型)の侵入を媒介する、全てのタンパク質が包含される。例えば、1つの好適なヒトCXADRアイソフォーム1タンパク質の配列が、(対応する核酸配列NM_001338によってコードされる)NP_001329に記載されている。

【0041】

しかし、ヒトCXADRタンパク質の数多くの別のアイソフォームと前駆体も適切であるとみなされ、これらには、アイソフォーム4前駆体(例えば、NP_001193994.1)、アイソフォーム2前駆体(例えば、NP_001193992.1)、アイソフォーム3前駆体(例えば、NP_001193993.1)、アイソフォームX1(例えば、XP_011527778.1)、アイソフォームX2(例えば、XP_011527779.1)、アイソフォームX3(例えば、XP_011527780.1)、アイソフォームX4(例えば、XP_011527781.1)、アイソフォームCRA_b(例えば、EAX10031.1)、アイソフォームCRA_d(例えば、EAX10033.1)等が包含される。同様に、CXADRは、ヒトのタンパク質に限定される必要はなく、さらには、マウスCXADRタンパク質(例えば、NP_001020363.1)、ラットCXADRタンパク質(例えば、NP_446022.1)またはウシCAXDRタンパク質(例えば、NP_776723.1)であってもよい。もちろん、CXADRタンパク質をコードする核酸に関しては、全ての対応する核酸配列が適切であるとみなされる。最も好ましくは、核酸配列は、ヒトのコドン使用頻度および/または発現の増加のために、最適化されるであろう。

10

20

【0042】

さらに、本明細書で企図される全てのタンパク質配列および対応する核酸配列は、上で説明されるような任意の配列からある程度変動してもよく、変動は、合理性に基づく塩基の変更(例えば、制限部位を導入するためのもの、コドンを最適化するためのもの、後の改変のために官能基を付加するためのもの等)に起因するもの、または偶発的な変異に起因するものであってもよいということも理解されるべきである。従って、発現されるCXADRタンパク質は、上で説明されるような配列と少なくとも約30%、35%、40%、45%または50%、好ましくは少なくとも約55%、60%、65%または70%、より好ましくは少なくとも約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%または94%、最も好ましくは少なくとも約95%、97%、98%、99%または99%超、相同であろう。

30

【0043】

本明細書で説明される発現ベクターは、組換え型の非哺乳動物NK細胞およびヒトNK細胞の作製のいずれにも有用であり、これらの細胞は、新たに単離されてもよいか、前駆細胞または幹細胞から培養されてもよいか、既存の培養物(遺伝子改変されていてもよい)に由来してもよいということが理解されるであろう。当技術分野で公知の細胞に遺伝子を導入して発現させる方法が数多く存在する。発現ベクターの場合、ベクターは、当技術分野において公知である任意の方法によってNK細胞または他の宿主細胞(特に、MHC複合体を介して抗原を提示することが可能である免疫担当細胞)に容易に導入できる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的または生物学的な手段によって宿主細胞に導入できる。

40

【0044】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等が包含される。ベクターおよび/または外因性核酸を含む細胞を作製するための方法は、当技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1~4巻(Cold Spring Harbor Press, NY)を参照のこと。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入のための好適な方法は、リン酸カルシウムトランス

50

フェクションまたはリポフェクションである。

【0045】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNAベクターおよびRNAベクターの使用が包含される。ウイルスベクター（特にレトロウイルスベクター）は、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）に遺伝子を挿入するための最も広く使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ボックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス等に由来し得る（例えば、米国特許第5,350,674号および同第5,585,362号を参照のこと）。

【0046】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段には、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、および脂質を利用した系（水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームが包含される）など、コロイド分散系が包含される。インビトロおよびインビボでの送達ビヒクルとしての使用のための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工の膜小胞）である。標的化されたナノ粒子または他の好適なサブミクロンサイズの送達系でのポリヌクレオチドの送達など、核酸の最先端の標的化送達の他の方法が利用可能である。ウイルス以外の送達系が利用される場合、例示的な送達ビヒクルはリポソームである。（インビトロ、エクスピボまたはインビボでの）宿主細胞への核酸の導入のために、脂質製剤の使用が企図される。別の態様では、核酸は、脂質と結び付けられてもよい。脂質と結び付けられた核酸は、リポソームの水性の内部に封入されていてもよいが、リポソームの脂質二重層内に散在していてもよいが、リポソームおよびオリゴヌクレオチドの両方に結合する連結分子を介してリポソームに付着させられていてもよいが、リポソームに閉じ込められていてもよいが、リポソームと複合体化されていてもよいが、脂質を含む溶液中に分散されていてもよいが、脂質と混合されていてもよいが、脂質と組み合わされていてもよいが、脂質中の懸濁液として含まれていてもよいが、ミセルと共に含まれているか複合体化されていてもよいが、他の方法で脂質と結び付けられていてもよい。脂質、脂質/DNAまたは脂質/発現ベクターに関連する組成物は、溶液中において、いかなる特定の構造にも限定されない。例えば、それらは、二層構造で、ミセルとして、または「崩壊した」構造を伴って、存在してもよい。それらはまた、溶液中に単純に散在していてもよく、サイズまたは形状が一様でない凝集物を形成する可能性がある。脂質は、天然または合成の脂質であってよい脂肪性物質である。例えば、脂質には、細胞質に天然に存在する脂肪滴、ならびに長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体（脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドなど）を含む化合物のクラスが包含される。

【0047】

また、リポフェクタミン-核酸複合体も企図される。外因性核酸を宿主細胞に導入するために、あるいは本発明の阻害剤に細胞を曝露させるために、用いられる方法に関係なく、宿主細胞における組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイが実施されてよい。そのようなアッセイには、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ（サザンブロッティングとノーザンブロッティング、RT-PCRおよびPCRなど）、

「生化学的」アッセイ（例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウェスタンブロット）による、または本発明の範囲内に含まれる作用物質を同定するための本明細書で説明されるアッセイによる、特定のペプチドの存在または非存在の検出など）が包含される。

【0048】

トランスフェクションのための細胞に関しては、全ての細胞（特に、内因性のCXADRの発現が全くないか比較的低い細胞）が本発明での使用に適しているとみなされるといことが企図される。例えば、好適な細胞には、NK細胞、T細胞（CD8⁺、CD4⁺等）、B細胞、マクロファージおよび樹状細胞などの免疫担当細胞だけでなく、腎臓、胎盤、胸腺および脾臓に由来する細胞、ならびにCXADRの発現が低レベルである特定の腫瘍細胞（進行した膀胱癌、原発性前立腺癌等）も包含される。一般に、および別の観点

10

20

30

40

50

から見ても、後で（すなわち、組換えCXADRを発現させた後に）アデノウイルスベクターによりトランスフェクトされることが望まれる全ての細胞がトランスフェクションに適しているということが企図される。しかし、免疫担当細胞（特に、NK細胞および改変型NK細胞）が特に好ましく、これは、そのような細胞におけるCXADRの発現が、1種以上の抗原（特に、新抗原、腫瘍関連抗原、またはそのような抗原を含むキメラ分子）を宿主の免疫系に送達できる、（アデノウイルス送達を介した）組換え核酸によるインピボでのトランスフェクションを可能にするためである。

【0049】

NK細胞は、特定の表面抗原（ヒトのNK細胞の場合、CD56および/またはCD16が包含される）の発現、細胞表面上に / または / のTCR複合体が存在しないこと、特定の細胞溶解機構の活性化によって「自己」MHC/HLA抗原を発現できない細胞に結合して殺す能力、NK活性化受容体のリガンドを発現する腫瘍細胞または他の疾患細胞を殺す能力および免疫応答を刺激または阻害するサイトカインと呼称されるタンパク質分子を放出する能力など、特定の特徴および生物学的特性のおかげで容易に特定できる。これらの特徴および活性のいずれかを使用して、当技術分野で周知の方法を用いてNK細胞を特定できる。もちろん、好適な宿主細胞（特にNK細胞）は、腫瘍と診断された患者から取得されるか、あるいは以下でさらに詳述されるような既に確立された細胞株から取得されるということが留意されるべきである。

10

【0050】

例えば、本発明の主題の特に好ましい一態様では、NK細胞は、NK-92派生細胞であり、好ましくは、（阻害の欠如または減少を介して）そのような細胞を恒常的に活性化された状態にすることになる少なくとも1種のキラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）の発現の低下または消失を有するように遺伝子改変される。従って、好適な改変型細胞は、例えばMHCクラスI分子との相互作用を減少または消失させるように、変異している1種以上の改変型キラー細胞免疫グロブリン様受容体を有してもよい。もちろん、1種以上のKIRはまた、欠失していてもよいが、または（例えば、miRNA、siRNA等を介して）発現が抑制されてもよいということが留意されるべきである。最も典型的には、2種以上のKIRが、変異しているか、欠失しているか、またはサイレンスされるであろうし、特に企図されるKIRには、2つまたは3つのドメインを有するもの、短いか長い細胞質側末端を有するものが包含される。別の観点から見ると、改変、サイレンスまたは欠失されるKIRには、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1、KIR3DL2、KIR3DL3およびKIR3DS1が包含されるであろう。そのような改変型細胞は、当技術分野で周知のプロトコルを用いて調製してもよい。あるいは、そのような細胞はまた、aNK細胞（「活性化型ナチュラルキラー細胞（activated natural killer cells）」）としてNantkwest（URL：www.nantkwest.comを参照のこと）から商業的に入手してもよい。

20

30

【0051】

別の例では、遺伝子操作されたNK細胞はまた、高親和性Fc受容体（CD16）を発現するように改変されているNK-92派生細胞であってもよい。Fc受容体の高親和性パリアントの配列は当技術分野で周知であり、作製および発現の全ての様式は、本発明での使用に適しているとみなされる。そのような受容体の発現は、患者の腫瘍細胞（例えば、ネオエピトープ）、特定の腫瘍型（例えば、her2neu、PSA、PSMA等）または癌に関連するもの（例えば、CEA-CAM）に特異的な抗体を用いた腫瘍細胞の特異的標的化を可能にすると考えられている。有利なことに、そのような抗体は、市販されており、（例えば、Fc受容体に結合された）細胞と組み合わせて使用できる。あるいは、そのような細胞はまた、haNK細胞（「高親和性ナチュラルキラー細胞（high-affinity natural killer cells）」）としてNantkwestから商業的に入手してもよい。次いで、そのような細胞は、やはり以下でさらに説明されるように、CXCL1

40

50

2 またはその一部を発現するように、あるいはC X C R 4 の発現の低下または消失を有するように、さらに改変されてもよい。

【0052】

本発明の主題のさらに別の態様では、遺伝子操作されたNK細胞はまた、キメラT細胞受容体を発現するように遺伝子操作されていてもよい。特に好ましい態様では、キメラT細胞受容体は、腫瘍関連抗原、腫瘍特異抗原および癌のネオエピトープに対する結合特異性を有するs c F v部分または他のエクドメインを有するであろう。前述のように、そのようなキメラT細胞受容体を発現するようにNK細胞を遺伝子操作する数多くの様式が存在し、全ての様式が、本発明での使用に適しているとみなされる。あるいは、そのような細胞はまた、t a N K細胞(「標的活性化型ナチュラルキラー細胞(target-activated natural killer cells)」)としてN a n t K w e s tから商業的に入手してもよい。次いで、そのような細胞は、以下で説明されるように、C X C L 1 2 またはその一部を発現するように、あるいはC X C R 4 の発現の低下または消失を有するように、さらに改変されてもよい。

10

【0053】

細胞が、癌関連抗原、または癌関連抗原に対する特異性を有する抗体、に対して親和性を有するように操作される場合、全ての既知の癌関連抗原が使用に適切であるとみなされるということが企図される。例えば、癌関連抗原には、C E A、M U C - 1、C Y P B 1 等が包含される。同様に、細胞が、癌特異抗原、または癌特異抗原に対する特異性を有する抗体、に対して親和性を有するように操作される場合、全ての既知の癌特異抗原が使用に適切であるとみなされるということが企図される。例えば、癌特異抗原には、P S A、H e r - 2、P S A、ブラキュリ(brachyury)等が包含される。

20

【0054】

さらに、NK細胞または他の宿主細胞(例えば、免疫担当細胞)は、トランスフェクトされた細胞を支える、活性化する、またはトランスフェクトされた細胞に所望の機能を与える、1種以上のタンパク質を発現するように遺伝子操作されてもよいということが企図される。そのような追加的な遺伝子改変は、別個に、すなわちC X A D Rをコードする核酸でのトランスフェクションの前に、あるいは同時に、すなわちC X A D Rをコードする核酸でのトランスフェクションと一緒に(例えば、同じ組換え核酸から、または第2の組換え核酸から)、行われてもよい。

30

【0055】

例えば、NK細胞または他の宿主細胞は、必要に応じて、NK細胞の活性化のための追加の手段を提供するため及びより頑強な免疫応答を亢進するためにI L 2 R BおよびI L 2 R Gのうちの一つ以上と一緒に、I L 2 R Aの少なくとも一部を発現してもよい。遺伝子操作されたNK細胞は、最も好ましくは、活性化型NK細胞、高親和性NK細胞または標的活性化型NK細胞であろう。好ましいI L 2 R Aには、I L 2 R Aの完全長または高親和性のバリエーションが包含される。さらに、遺伝子操作されたNK細胞はまた、1種以上のサイトカイン(特にI L - 1 2)を発現してもよいということが企図される。従って、そのように調製されたNK細胞は、I L 2に関して宿主のT細胞を打ち負かし得るということが理解されるべきである。さらに、企図されるNK細胞または他の宿主細胞はまた、活性化の増大をもたらすためにI L - 1 5またはI L - 1 5スーパーアゴニスト(例えば、A L T - 8 0 3)を発現してもよい。最後に、望まれる場合、NK細胞または他の宿主細胞は、宿主の免疫応答をさらに亢進または刺激するために1種以上の免疫チェックポイント阻害剤を発現してもよい。

40

【0056】

さらに別の例では、発明者等は、1種以上の共刺激分子を発現させて免疫応答を亢進するための、遺伝子操作されたNK細胞または他の宿主細胞のトランスフェクションを企図する。もう一度繰り返すが、遺伝子操作されたNK細胞は、最も好ましくは、活性化型NK細胞、高親和性NK細胞または標的活性化型NK細胞であろう。好ましい共刺激分子は、B 7 . 1 (C D 8 0)、I C A M - 1 (C D 5 4)、I C O S - Lおよび/またはL F

50

A - 3 (CD58) であってよい。別の例では、好ましい共刺激分子は、必要に応じて B7.1 (CD80)、ICAM-1 (CD54)、ICOS-L および / または LFA-3 (CD58) のうちのいずれか 1 つと組み合わせた、4-1BBL、CD30L、CD40、CD40L、CD48、CD70、CD112、CD155、GITRL、OX40L および / または TL1A であってよい。

【0057】

望まれる場合、改変型 NK 細胞はまた、CXCL12 の少なくとも一部 (より好ましくは完全長の CXCL12) を提示してもよい、および / または NK 細胞は、CXCR4 の発現を低下させるか、あるいは完全にサイレンスするように、遺伝子改変される。NK 細胞の表面上における CXCL12 の少なくとも一部の提示および / または CXCR4 の排除によって、そのように改変された細胞は、NK 細胞特異的経路を介した殺滅活性を依然として維持しつつも、宿主による認識および同種移植片拒絶を受けにくくなるとともに凝集傾向が低下すると考えられる。

10

【0058】

さらに、CXADR の発現には免疫担当細胞が一般的に好ましいが、数多くの非免疫担当細胞も適しているとみなされ、特に、これらには、組換えタンパク質生産に適している確立された細胞株が包含されるということが認識されるべきである。従って、CHO 細胞、HEK-293 細胞、マウス骨髄腫リンパ芽球様細胞、BHK 細胞、Sf9、CV-1、COS-1 細胞等を含め、様々な哺乳動物細胞株および昆虫細胞株が特に企図される。

20

【0059】

本明細書中の説明において、および添付の特許請求の範囲の全体にわたって、使用される場合、「a」、「an」および「the」の意味には、そうではないことが文脈上明確に指示されていない限り、複数への言及が包含される。また、本明細書中の説明において使用される場合、「in」の意味には、そうではないことが文脈上明確に指示されていない限り、「in」および「on」が包含される。本明細書で使用される場合、そうではないことが文脈上指示されていない限り、「~に連結された」なる用語は、(互いに連結されている 2 つの要素が互いに接触する) 直接的な連結および (少なくとも 1 つの追加的要素が 2 つの要素の間に位置する) 間接的な連結の両方を包含することが意図される。従って、用語「~に連結された」および「~と連結された」は、同義的に使用される。

30

【0060】

本明細書中に記載される方法は全て、そうではないことが本明細書中で指示されない限り、あるいは文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施できる。本明細書中の特定の実施形態に関して提供される任意および全ての例または例示的な言葉 (例えば、「など」) の使用は、単に本発明をより明らかにすることを意図したものに過ぎず、他の形で特許請求される本発明の範囲を限定するものではない。本明細書中のいかなる言葉も、本発明の実施に不可欠である、特許請求の範囲に記載されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。

【0061】

本明細書で開示される本発明の代替的な要素または実施形態のグループ分けは、限定として解釈されるべきではない。グループのメンバーはそれぞれ、個々に、またはそのグループの他のメンバーもしくは本明細書中に見出される他の要素と任意に組み合わせて、参照および特許請求できる。利便性および / または特許性の理由から、グループの 1 つ以上のメンバーを、グループに含める、あるいはグループから削除することができる。そのような包含または削除が生じる場合、本明細書は、改変された通りのグループを含むとみなされ、従って、添付の特許請求の範囲で使用される全てのマーカッシュグループについての記載を満たす。

40

【0062】

本明細書中の発明の概念から逸脱することなく、既に説明したものの以外にも数多くの改変が可能であるということが当業者には明らかであるはずである。従って、本発明の主題は、添付の特許請求の範囲における場合を除き、制限されるべきではない。さらに、明細

50

書および特許請求の範囲の両方を解釈する際に、全ての用語は、文脈と一致する最も広い可能な様式で解釈されるべきである。特に、用語「含む (comprises)」および「含む (comprising)」は、要素、構成要素またはステップを非排他的な様式で指すものとして解釈されるべきであり、言及された要素、構成要素またはステップが存在してもよいか、利用されてもよいか、明示的に言及されていない他の要素、構成要素またはステップと組み合わせられてもよいということを意味する。明細書と特許請求の範囲が、A、B、C・・・およびNからなる群より選択されるもののうちの少なくとも1つに言及する場合、その文章は、AとNやBとN等ではなく、グループの1つの要素のみを必要とするものとして解釈されるべきである。

【0063】

配列表

【表 1】

<110>	NantCell						
<120>	Compositions And Methods For Recombinant CXADR Expression						
<130>	102538.0008PCT						
<150>	US 62/291,999						
<151>	2016-02-05						
<160>	1		10				
<170>	PatentIn version 3.5						
<210>	1						
<211>	1112						
<212>	DNA						
<213>	Homo sapiens		20				
<220>							
<221>	gene						
<222>	(7)..(1110)						
<223>	CXADR isoform 1						
<400>	1						
aagcttatgg	cgctcctgct	gtgcttcgtg	ctcctgtgcg	gagtagtgga	tttcgccaga	60	30
agtttgagta	tcaactactcc	tgaagagatg	attgaaaaag	ccaaagggga	aactgcctat	120	
ctgccatgca	aatttacgct	tagtcccgaa	gaccagggac	cgctggacat	cgagtggctg	180	
atatcaccag	ctgataatca	gaaggtggat	caagtgatta	ttttatattc	tggagacaaa	240	
atztatgatg	actactatcc	agatctgaaa	ggccgagtac	attttacgag	taatgatctc	300	
aaatctggtg	atgcatcaat	aatgtaacg	aatttacaac	tgtcagatat	tggcacatat	360	
cagtgcaaag	tgaaaaaagc	tcttgggtgt	gcaaataaga	agattcatct	ggtagttcct	420	40
gttaagcctt	caggtgctgag	atgttacgtt	gatggatctg	aagaaattgg	aagtgacttt	480	
aagataaaat	gtgaacccaaa	agaaggttca	cttccattac	agtatgagtg	gcaaaaattg	540	
tctgactcac	agaaaatgcc	cacttcatgg	ttagcagaaa	tgacttcatc	tgttatatct	600	
gtaaaaaatg	cctcttctga	gtactctggg	acatacagct	gtacagtcag	aaacagagtg	660	

【配列表】

2019504631000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成30年5月24日(2018.5.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫担当細胞を改変する方法であって、

C X A D R をコードする組換え核酸を前記免疫担当細胞に導入して改変型免疫担当細胞を作製するステップと、

前記 C X A D R を発現する条件下で第 1 の培地において前記改変型免疫担当細胞を培養するステップと、

前記改変型免疫担当細胞を組換えアデノウイルスに感染させるステップと、

を含み、

前記免疫担当細胞が N K 細胞または樹状細胞であり、

前記組換えアデノウイルスが、E 2 b の欠失を有し、且つ、ネオエピトープと共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうち少なくとも 1 つとをコードする組換え核酸を含む、

方法。

【請求項2】

前記組換え核酸が R N A である、請求項 1 の方法。

【請求項3】

前記 N K 細胞が、不死化されるか、N K 9 2 細胞または遺伝子操作された N K 9 2 細胞である、請求項 2 の方法。

【請求項4】

前記 N K 細胞が、(a) 少なくとも 1 種のキラー細胞免疫グロブリン様受容体 (K I R) の発現の低下または消失を有するように遺伝子操作される、(b) 高親和性 F c 受容体を発現するように遺伝子操作される、または (c) キメラ T 細胞受容体を発現するように遺伝子操作される、請求項 3 の方法。

【請求項5】

前記 C X A D R をコードする組換え核酸が、恒常的に活性のあるプロモーター、N K 細胞特異的プロモーターまたは低酸素誘導性プロモーターの制御下にある、請求項 1 の方法。

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

(削除)

【請求項8】

前記改変型免疫担当細胞を患者に投与するステップをさらに含む、請求項 6 の方法であって、前記感染させるステップが、前記患者への前記改変型免疫担当細胞の投与の後にインピボで実施される、方法。

【請求項9】

前記改変型免疫担当細胞を患者に投与するステップをさらに含む、請求項 6 の方法であって、前記感染させるステップが、前記患者への前記改変型免疫担当細胞の投与の前にインピトロで実施される、方法。

【請求項10】

前記改変型免疫担当細胞を患者に投与するステップをさらに含む、請求項1の方法であって、前記改変型免疫担当細胞が、前記改変型免疫担当細胞が投与される患者に対して自家性である、方法。

【請求項11】

前記第1の培地において前記改変型免疫担当細胞を所望の量まで増殖させる、請求項1の方法であって、前記改変型免疫担当細胞の投与に適した第2の培地で前記第1の培地を置き換えるステップをさらに含む、方法。

【請求項12】

遺伝子改変型免疫担当細胞であって、前記免疫担当細胞におけるCXADRの発現のための調節配列に機能可能に連結されたCXADRをコードする組換え核酸を含み、前記遺伝子改変型免疫担当細胞がNK細胞または樹状細胞であり、ネオエピトープと共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つとをコードする組換えアデノウイルス核酸をさらに含む、遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項13】

前記細胞がNK細胞である、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項14】

前記細胞が、遺伝子改変されたNK細胞、NK92細胞またはNK92派生細胞である、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項15】

前記細胞が、高親和性Fc受容体を発現するように遺伝子改変されている、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項16】

前記Fc受容体が、抗体に連結されており、前記抗体が、腫瘍関連抗原、腫瘍特異抗原または癌のネオエピトープに対する結合特異性を有する、請求項15の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項17】

前記細胞が、キメラT細胞受容体を発現するように遺伝子改変されている、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項18】

前記キメラT細胞受容体が、scFv部分を含む、請求項17の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項19】

前記キメラT細胞受容体が、腫瘍関連抗原、腫瘍特異抗原または癌のネオエピトープに対する結合特異性を有するエクドメインを有する、請求項17の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項20】

前記組換え核酸が、前記免疫担当細胞のゲノム中に組み込まれている、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項21】

前記組換え核酸が、RNAである、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項22】

前記調節配列が、NK細胞特異的プロモーターまたは低酸素誘導性プロモーターを含む、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項23】

前記細胞が、前記細胞を受け入れる患者に対して自家性である、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項24】

前記免疫担当細胞が、遺伝子改変の前にCXADRを発現しない、請求項12の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項 25】

前記 C X A D R が C X A D R アイソフォーム 1 である、請求項 12 の遺伝子改変型免疫担当細胞。

【請求項 26】

癌の免疫療法のために患者をコンディショニングする方法であって、C X A D R を発現するように遺伝子改変されている免疫担当細胞を前記患者に投与するステップを含み、前記免疫担当細胞が N K 細胞または樹状細胞であり、ネオエピトープと共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つとをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスで前記免疫担当細胞を感染させるステップをさらに含む、方法。

【請求項 27】

前記免疫担当細胞が、N K 細胞である、請求項 26 の方法。

【請求項 28】

(削除)

【請求項 29】

ネオエピトープ、共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスを前記患者に投与するステップをさらに含む、請求項 26 の方法。

【請求項 30】

前記組換えアデノウイルスが、欠失しているか機能を有さない E 2 b 遺伝子を有する、請求項 28 または請求項 29 の方法。

【請求項 31】

癌と診断された患者を処置する方法であって、

C X A D R をコードする組換え核酸であって、C X A D R をコードする核酸が宿主免疫担当細胞における前記 C X A D R の発現のための調節配列に機能可能に連結されている、組換え核酸を含む遺伝子改変型免疫担当細胞を前記患者に投与するステップと、

ネオエピトープと共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つとをコードする核酸を含む組換えアデノウイルスを前記患者に投与するステップと、

を含み、前記遺伝子改変型免疫担当細胞が N K 細胞または樹状細胞であり、前記組換えアデノウイルスは、前記患者の中で前記遺伝子改変型免疫担当細胞において前記 C X A D R が発現すると投与される、方法。

【請求項 32】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、N K 細胞である、請求項 31 の方法。

【請求項 33】

前記組換えアデノウイルスが、欠失しているか機能を有さない E 2 b 遺伝子を有する、請求項 31 の方法。

【請求項 34】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、前記患者の自家細胞である、請求項 31 の方法。

【請求項 35】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、請求項 12 ~ 25 のいずれか1項に記載の遺伝子改変型免疫担当細胞である、請求項 31 の方法。

【請求項 36】

癌と診断された患者を処置する方法であって、

組換えアデノウイルスで遺伝子改変型免疫担当細胞を感染させるステップであって、

前記遺伝子改変型免疫担当細胞は、C X A D R をコードする組換え核酸であって、C X A D R をコードする核酸が宿主免疫担当細胞における前記 C X A D R の発現のための調節配列に機能可能に連結されている、組換え核酸を含み、

前記遺伝子改変型免疫担当細胞は、N K 細胞または樹状細胞であり、

前記組換えアデノウイルスは、ネオエピトープと共刺激分子、サイトカインおよびチェックポイント阻害剤のうちの少なくとも1つとをコードする核酸を含む、

ステップと、

感染させた免疫担当細胞を前記患者に投与するステップと、
を含む方法。

【請求項 37】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞がNK細胞である、請求項36の方法。

【請求項 38】

前記組換えアデノウイルスが、欠失しているか機能を有さないE2b遺伝子を有する、
請求項36の方法。

【請求項 39】

前記遺伝子改変型免疫担当細胞が、前記患者の自家細胞である、請求項36の方法。

【請求項 40】

前記ネオエピトープが、癌および患者に特異的なネオエピトープである、請求項36の
方法。

【請求項 41】

癌の処置における遺伝子改変型免疫担当細胞の使用であって、前記遺伝子改変型免疫担
当細胞が、請求項12～25のいずれか1項に記載の遺伝子改変型免疫担当細胞である、
使用。

【請求項 42】

(削除)

【手続補正書】

【提出日】平成30年12月12日(2018.12.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2019504631000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/016543
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0783(2010.01)i, C12N 7/00(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i, C07K 14/725(2006.01)i, A61K 35/17(2014.01)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) C12N 5/0783; C12N 5/06; C12N 5/10; C07K 16/32; A01K 67/027; C12N 7/01; C12N 7/00; C07K 14/705; C07K 14/725; A61K 35/17		
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: CXADR, CAR, immune competent cell, NK cell, adenovirus		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002-0016974 A1 (WOODLAND, ROBERT T. et al.) 07 February 2002 See claim 1: paragraphs [0040]-[0041],[0074] and [0095].	1-6, 11-25, 41-42
Y		7
Y	US 6063622 A (CHAMBERLAIN, JEFFREY S. et al.) 16 May 2000 See claim 1.	7
A	WO 2015-193411 A1 (CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNGSINSTITUT GEORG-SPEYER-HAUS et al.) 23 December 2015 See claims 1 and 4.	1-7, 11-25, 41-42
A	KOTHA, POORNIMA L. N. et al., 'Adenovirus Entry From the Apical Surface of Polarized Epithelia Is Facilitated by the Host Innate Immune Response', PLOS pathogens, [E-pub] 13 March 2015, Vol. 11, No. 3, pp. e1004696 (internal pages 1-22) See abstract	1-7, 11-25, 41-42
A	HOURI, NADIA et al., 'The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) undergoes ectodomain shedding and regulated intramembrane proteolysis (RIP)', PLoS One. 28 August 2013, Vol. 8, No. 8, pp. e73296 (internal pages 1-16) See abstract.	1-7, 11-25, 41-42
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"I" 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 19 May 2017 (19.05.2017)		Date of mailing of the international search report 19 May 2017 (19.05.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung  Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/016543

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.: 8-10,26-40
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 8-10 and 26-40 pertain to a method for treatment 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 PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. 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. Claims Nos.:
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 additional 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/US2017/016543

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002-0016974 A1	07/02/2002	AU 3704201 A WO 01-60980 A1	27/08/2001 23/08/2001
US 6063622 A	16/05/2000	EP 0935648 A1 EP 0935648 B1 US 5994132 A US 6057158 A US 6083750 A US 6451596 B1 WO 98-17783 A1	17/11/2004 05/05/2010 30/11/1999 02/05/2000 04/07/2000 17/09/2002 30/04/1998
WO 2015-193411 A1	23/12/2015	AU 2015-276136 A1 CA 2951355 A1 KR 10-2017-0018450 A	22/12/2016 23/12/2015 17/02/2017

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	15/09	Z N A
C 1 2 N 5/0784 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
	C 1 2 N	5/0784	

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

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 スン - シオン, パトリック

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
ブルバード

(72)発明者 ラビザド, シャールーズ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
ブルバード

(72)発明者 ニアジ, カイバン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
ブルバード

F ターム(参考) 4B065 AA94X AA94Y AB01 BA02 CA44

4C084 AA13 MA02 NA14 ZB26

4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 BC83 CA12 MA02 NA14 ZB26