

(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2021-531280  
(P2021-531280A)

(43) 公表日 令和3年11月18日(2021.11.18)

(51) Int.Cl.

**A61K 35/17 (2015.01)**  
**A61P 25/28 (2006.01)**  
**A61P 25/14 (2006.01)**  
**A61P 25/16 (2006.01)**  
**A61P 25/00 (2006.01)**

F 1

A 6 1 K 35/17  
A 6 1 P 25/28  
A 6 1 P 25/14  
A 6 1 P 25/16  
A 6 1 P 25/00

Z

テーマコード(参考)

4 B 0 5 0  
4 C 0 8 7

4 H 0 4 5

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2021-502704 (P2021-502704)

(86) (22) 出願日

平成31年3月21日 (2019.3.21)

(85) 翻訳文提出日

令和2年11月27日 (2020.11.27)

(86) 国際出願番号

PCT/US2019/023395

(87) 国際公開番号

W02019/190879

(87) 国際公開日

令和1年10月3日 (2019.10.3)

(31) 優先権主張番号

62/648,684

(32) 優先日

平成30年3月27日 (2018.3.27)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(71) 出願人 520375022

スミス セラピューティクス インコーポ  
レイテッド  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02  
467, ブルックライン, フェアウェ  
イ ロード 100

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74) 代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74) 代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】神経変性疾患を処置するためのCAR-Tregベースの治療

## (57) 【要約】

本発明は、神経変性疾患の自己免疫構成要素を抑制し、それによって、このような疾患に罹患している患者に治療効果を提供するための組成物および方法を提供する。組成物および方法は、制御性T細胞(Treg)および1種またはこれより多くのグリア細胞マーカーに特異的に結合するキメラ抗原レセプターまたはタンパク質に連結されたTregによって発現されるタンパク質のような免疫抑制部分を含む。進行性核上性麻痺(PSP)、パーキンソン病(PD)、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、慢性外傷性脳症(CTE)、およびプリオント病を含む神経変性疾患を処置するための治療上有効な用量の上記化合物が、開示される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体において神経変性疾患を処置するための方法であって、前記方法は、前記被験体に、神経組織を保護しつつ前記神経組織における炎症を低減するために治療上有効な量の、グリア細胞マーカーに特異的に結合するキメラ抗原レセプター（CAR）を各々発現する制御性T細胞（Treg）を投与し、それによって、前記神経変性疾患を処置する工程を包含し、ただし前記神経変性疾患は多発性硬化症ではない、方法。

**【請求項 2】**

前記被験体はヒトである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記グリア細胞マーカーは、希突起膠細胞糖タンパク質（MOG）、希突起膠細胞マーカー01（OM1）、希突起膠細胞マーカー04（OM4）、神経/グリアマーカー2（NG2）、A2B5、ガラクトシルセラミダーゼ（GALC）、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）、およびミエリン希突起膠細胞特異的タンパク質（MOSP）からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

10

**【請求項 4】**

前記グリア細胞マーカーは、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質（MOG）である、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記神経変性疾患は、進行性核上性麻痺（PSP）、アルツハイマー病（AD）、ハンチントン病、パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、慢性外傷性脳症（CTE）、およびブリオン病からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

前記神経変性疾患は、進行性核上性麻痺（PSP）である、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記神経変性疾患は、アルツハイマー病（AD）である、請求項5に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記神経変性疾患は、パーキンソン病（PD）である、請求項5に記載の方法。

**【請求項 9】**

多発性硬化症ではない神経変性疾患を処置するために治療上有効な量において複数の操作された制御性T細胞（Treg）を含む組成物であって、前記複数の操作されたTregの各々は、グリア細胞マーカーに特異的に結合するキメラ抗原レセプター（CAR）を発現する、組成物。

30

**【請求項 10】**

前記グリア細胞マーカーは、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質（MOG）、希突起膠細胞マーカー01（OM1）、希突起膠細胞マーカー04（OM4）、神経/グリアマーカー2（NG2）、A2B5、ガラクトシルセラミダーゼ（GALC）、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）、およびミエリン希突起膠細胞特異的タンパク質（MOSP）からなる群より選択される、請求項9に記載の組成物。

40

**【請求項 11】**

前記グリア細胞マーカーは、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質（MOG）である、請求項9に記載の組成物。

**【請求項 12】**

前記神経変性疾患は、進行性核上性麻痺（PSP）、パーキンソン病（PD）、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、慢性外傷性脳症（CTE）、およびブリオン病からなる群より選択される、請求項9に記載の組成物。

**【請求項 13】**

前記神経変性疾患は、進行性核上性麻痺（PSP）である、請求項12に記載の組成物。

50

**【請求項 14】**

前記神経変性疾患は、アルツハイマー病（A D）である、請求項 12 に記載の組成物。

**【請求項 15】**

前記神経変性疾患は、パーキンソン病（P D）である、請求項 12 に記載の組成物。

**【請求項 16】**

制御性 T 細胞（T r e g）によって発現される分子に連結されたグリア細胞特異的結合タンパク質を含む、操作されたタンパク質。

**【請求項 17】**

T r e g によって発現される前記分子は、細胞外免疫抑制酵素である、請求項 16 に記載の操作されたタンパク質。

10

**【請求項 18】**

T r e g によって発現される前記分子は、C D 7 3、C D 3 9、インドールアミン 2，3 - ジオキシゲナーゼ（I D O）、およびグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ 1（G O T 1）からなる群より選択される、請求項 17 に記載の操作されたタンパク質。

**【請求項 19】**

前記グリア細胞特異的結合タンパク質は、抗体分子のテトラマー単鎖可変フラグメント（s c F v）である、請求項 16 に記載の操作されたタンパク質。

**【請求項 20】**

前記グリア細胞特異的結合タンパク質は、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質（M O G）、希突起膠細胞マーカー 0 1（O M 1）、希突起膠細胞マーカー 0 4（O M 4）、神経 / グリアマーカー 2（N G 2）、A 2 B 5、ガラクトシルセラミダーゼ（G A L C）、ミエリン塩基性タンパク質（M B P）、グリア線維性酸性タンパク質（G F A P）、およびミエリン希突起膠細胞特異的タンパク質（M O S P）からなる群より選択されるマーカーに結合する、請求項 16 に記載の操作されたタンパク質。

20

**【請求項 21】**

前記グリア細胞特異的結合タンパク質は、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質（M O G）に結合する、請求項 20 に記載の操作されたタンパク質。

**【請求項 22】**

前記グリア細胞特異的結合タンパク質は、配列番号 4、6、および 12 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む抗体分子の単鎖可変フラグメント（s c F v）である、請求項 21 に記載の操作されたタンパク質。

30

**【請求項 23】**

制御性 T 細胞（T r e g）によって発現される分子の活性を模倣する分子に連結されたグリア細胞特異的結合タンパク質を含む、操作されたタンパク質。

**【請求項 24】**

T r e g によって発現される前記分子は、細胞外免疫抑制酵素である、請求項 23 に記載の操作されたタンパク質。

**【請求項 25】**

T r e g によって発現される前記分子は、C D 7 3、C D 3 9、インドールアミン 2，3 - ジオキシゲナーゼ（I D O）、およびグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ 1（G O T 1）からなる群より選択される、請求項 24 に記載の操作されたタンパク質。

40

**【請求項 26】**

前記グリア細胞特異的結合タンパク質は、抗体分子のテトラマー単鎖可変フラグメント（s c F v）である、請求項 23 に記載の操作されたタンパク質。

**【請求項 27】**

前記グリア細胞特異的結合タンパク質は、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質（M O G）、希突起膠細胞マーカー 0 1（O M 1）、希突起膠細胞マーカー 0 4（O M 4）、神経 / グリアマーカー 2（N G 2）、A 2 B 5、ガラクトシルセラミダーゼ（G A L C）、ミエリン塩基性タンパク質（M B P）、グリア線維性酸性タンパク質（G F A P）、およびミエリン希突起膠細胞特異的タンパク質（M O S P）からなる群より選択されるマーカー

50

に結合する、請求項 2 3 に記載の操作されたタンパク質。

【請求項 2 8】

前記グリア細胞特異的結合タンパク質は、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質（M O G）に結合する、請求項 2 7 に記載の操作されたタンパク質。

【請求項 2 9】

前記グリア細胞特異的結合タンパク質は、配列番号 4、6、および 12 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む抗体分子の単鎖可変フラグメント（s c F v）である、請求項 2 8 に記載の操作されたタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2018年3月27日出願の米国仮出願第 6 2 / 6 4 8 , 6 8 4 号（その内容は、その全体において参考として援用される）の優先権および利益を主張する。

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は、種々の神経変性疾患（例えば、進行性核上性麻痺およびパーキンソン病）に関する免疫応答および炎症を特異的に調節する C A R - T r e g 組成物およびその使用方法を提供する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

パーキンソン病（P D）、アルツハイマー病（A D）、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、および進行性核上性麻痺（P S P）のような神経変性疾患は、かなりの数の人々に影響を及ぼしており、しばしば、急激な物理的および／または精神的悪化ならびに死亡を生じる。それらの疾患の治癒、ならびに症状の管理および悪化を遅らせることに焦点を当てる処置は、既知でない。

【0 0 0 4】

1 つのこのような疾患である P S P は、パーキンソン病（P D）を模倣し、高齢者において希ではない特発性の変性疾患である。その臨床像は、核上性注視麻痺、体幹硬直（a x i a l r i g i d i t y）、認知症、および仮性球麻痺の四徴を含む。それは、動作緩徐、重篤な姿勢障害および頻繁な転倒と関連する。病状は、主に脳幹、淡蒼球、視床下核、および歯状核において、細胞喪失および T a u 神経原線維変化と関連する。P S P は、1 0 0 , 0 0 0 人あたり 5 ~ 6 人の有病率を有し、米国で 1 年に 5 0 0 0 ~ 2 5 0 0 0 人の患者が発生する。上記疾患の平均発病年齢は、63 歳であり、通常の予後は、診断から死亡まで 5 ~ 1 0 年の範囲に及ぶ。利用可能な疾患修飾処置は存在しない。

【0 0 0 5】

パーキンソン病は、既知の治癒法のないもう 1 つの神経変性疾患である。パーキンソン病は、1 , 0 0 0 人あたり約 1 ~ 2 人の有病率を有する。パーキンソン病は、黒質における星状細胞死およびその領域でのドバミン欠乏を生じるミクログリアの増大とともに、大脳基底核における細胞死によって特徴づけられる。レビー小体といわれる封入体は、細胞死の前に損傷した細胞において発生する。根底にある機構に関してパーキンソン病における脳の細胞死を駆動することが推測されるが、それらは、理解が不十分なままであり、現在、処置は疾患症状を管理することに焦点をあてている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

要旨

本発明の組成物および方法は、制御性 T リンパ球（T r e g）または T r e g 細胞によって発現される免疫抑制タンパク質を使用して、中枢神経系（C N S）におけるグリア細

10

20

30

40

50

胞を標的とする神経変性性免疫応答を調節する。T reg または免疫抑制タンパク質を、グリア細胞マーカーを特異的に認識しあつ結合するキメラ抗原レセプター (CAR) または単鎖可変フラグメント (scFv) のいずれかに連結することによって、上記免疫抑制性T reg またはタンパク質は、炎症を低減し、CNSを自己免疫による攻撃から防御するように、CNSのグリア細胞を誘導する。

#### 【0007】

本発明は、大部分の神経変性疾患に対する有効な処置選択肢の欠如、ならびにいくつかのこのような疾患に対する自己免疫および/または炎症構成要素の存在を認識し、それらの疾患構成要素を特異的に抑制するように組成物を設計する。本発明の化合物および方法は、グリア細胞が、1型ヘルパー細胞 (Th1)、Tヘルパー17細胞 (Th17)、細胞傷害性T細胞 (CTL)、M1マクロファージ、および多形核好中球 (PMN) のような損傷を与える免疫細胞を調節することを可能にする。

10

#### 【0008】

本発明は、免疫抑制分子 (T reg または免疫抑制タンパク質) を希突起膠細胞 (ODC) グリア細胞へと導く。得られる化合物およびその使用法は、身体自体の免疫系を動員して、パーキンソン病 (PD)、アルツハイマー病 (AD)、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、および進行性核上性麻痺 ( PSP) のような神経変性疾患の影響に対抗する。本発明は、いくつかの神経変性疾患が神経機能を破壊するがその根底にある疾患のいかなる特定の生化学的原因にも依存していない機構 (すなわち、中枢神経系の自己免疫による攻撃) に対処する。よって、本発明の化合物および方法は、いくつもの神経変性疾患におよぶ治療効果を提供し得る。

20

#### 【0009】

本発明の局面は、被験体において神経変性疾患を処置するための方法であって、前記方法は、上記被験体に、グリア細胞マーカーに特異的に結合するキメラ抗原レセプター (CAR) を発現する治療上有効な量の制御性T細胞 (T reg) を投与する工程であって、ここで上記神経変性疾患は、多発性硬化症 (MS) ではない工程を包含する方法を包含する。次いで、上記CAR-T reg は、神経組織を保護し、神経組織における炎症を低減し、それによって、上記神経変性疾患を処置する。種々の実施形態において、上記被験体は、ヒトであり得る。

30

#### 【0010】

グリア細胞マーカーは、希突起膠細胞糖タンパク質 (MOG)、希突起膠細胞マーカー01 (OM1)、希突起膠細胞マーカー04 (OM4)、神経/グリアマーカー2 (NG2)、A2B5、ガラクトシルセラミダーゼ (GALC)、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP)、またはミエリン希突起膠細胞特異的タンパク質 (MOSP) であり得る。いくつかの実施形態において、上記グリア細胞マーカーは、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質 (MOG) であり得る。

#### 【0011】

処置され得る神経変性疾患は、進行性核上性麻痺 (PSP)、アルツハイマー病 (AD)、ハンチントン病、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、慢性外傷性脳症 (CTE)、またはプリオント病であり得る。いくつかの実施形態において、上記神経変性疾患は、進行性核上性麻痺 (PSP) である。他の実施形態において、上記神経変性疾患は、アルツハイマー病 (AD) である。さらに他の実施形態において、上記神経変性疾患は、パーキンソン病 (PD) である。

40

#### 【0012】

ある種の局面において、本発明は、多発性硬化症ではない神経変性疾患を処置するために治療上有効な量において操作された制御性T細胞 (T reg) を含む組成物を提供し、上記操作されたT reg は、グリア細胞マーカーに特異的に結合するキメラ抗原レセプター (CAR) を発現する。上記組成物におけるグリア細胞マーカーは、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質 (MOG)、希突起膠細胞マーカー01 (OM1)、希突起膠細胞マーカー04 (OM4)、神経/グリアマーカー2 (NG2)、A2B5、ガラクトシルセラ

50

ミダーゼ (GALC) 、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) 、グリア線維性酸性タンパク質 (GFP) 、またはミエリン希突起膠細胞特異的タンパク質 (MOSP) であり得る。

【0013】

上記組成物は、進行性核上性麻痺 (PSP) 、パーキンソン病 (PD) 、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 、慢性外傷性脳症 (CTE) 、またはプリオント病を処置するために治療上有効であり得る。

【0014】

本発明の種々の局面は、制御性T細胞 (Treg) によって発現される分子に連結されたグリア細胞特異的結合タンパク質を含む操作されたタンパク質を包含する。Tregによって発現される上記分子は、細胞外免疫抑制酵素であり得る。ある種の実施形態において、Tregによって発現される上記分子は、CD73、CD39、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 、またはグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ1 (GOT1) であり得る。上記グリア細胞特異的結合タンパク質は、抗体分子のテトラマー単鎖可変フラグメント (scFv) であり得る。

10

【0015】

ある種の実施形態において、上記Tregが発現する分子に結合したグリア細胞特異的結合タンパク質は、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質 (MOG) 、希突起膠細胞マーカー-01 (OM1) 、希突起膠細胞マーカー-04 (OM4) 、神経/グリアマーカー-2 (NG2) 、A2B5、ガラクトシルセラミダーゼ (GALC) 、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) 、グリア線維性酸性タンパク質 (GFP) 、またはミエリン希突起膠細胞特異的タンパク質 (MOSP) に結合し得る。

20

【0016】

いくつかの局面において、本発明は、制御性T細胞 (Treg) によって発現される分子の活性を模倣する分子に連結されたグリア細胞特異的結合タンパク質を含む操作されたタンパク質を提供する。Tregによって発現される上記模倣された分子は、CD73、CD39、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 、またはグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ1 (GOT1) のような細胞外免疫抑制酵素であり得る。上記模倣された分子に結合したグリア細胞特異的結合タンパク質は、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質 (MOG) 、希突起膠細胞マーカー-01 (OM1) 、希突起膠細胞マーカー-04 (OM4) 、神経/グリアマーカー-2 (NG2) 、A2B5、ガラクトシルセラミダーゼ (GALC) 、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) 、グリア線維性酸性タンパク質 (GFP) 、またはミエリン希突起膠細胞特異的タンパク質 (MOSP) に結合し得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、グリア細胞特異的CAR-Tregおよびその免疫抑制機能を図示する。

【図2】図2は、グリア細胞標的化免疫抑制タンパク質およびその免疫抑制機能を図示する。

40

【図3】図3は、細胞傷害性T細胞へのpMHC-テトラマーの結合および標的MOGタンパク質への本発明のGITPの結合を図示する。

【図4】図4は、CTLおよびpMHCのものと比較して、標識GITPタンパク質でのMOG標的細胞の最大染色を図示する。

【図5】図5は、CTLおよびpMHCのものと比較して、標識GITPタンパク質でのMOG標的細胞の染色の半減期を図示する。

【図6】図6は、陰性コントロールおよび陽性コントロールと比較して、Tエフェクター細胞増殖を抑制するGITP結合したMOG標的細胞の比較を図示する。

【図7】図7は、MOG-標的細胞のMOGに特異的なscFvを発現するCAR分子の相対的結合力と比較して、相当する細胞傷害性T細胞クローニングのpMHCの相対的結合力

50

を図示する。

【図8】図8は、ヒトMOG-1に対する7種の異なるscFvタンパク質に関する相対的免疫反応性を図示する。

【発明を実施するための形態】

【0018】

詳細な説明

本発明は、種々の神経変性疾患の自己免疫構成要素を調節するための組成物に関する。本明細書で提供される組成物および方法は、グリア細胞特異的マーカーを標的として、免疫抑制分子（例えば、TregまたはTregによって発現される免疫抑制タンパク質）をCNSに誘導し、進行性核上性麻痺（PSP）、アルツハイマー病（AD）、ハンチントン病、パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、慢性外傷性脳症（CTE）、またはプリオントン病のような疾患の神経変性性効果に寄与する自己免疫による攻撃を妨害する。

10

【0019】

血液脳関門は、脳またはCNSの障害の処置に対して障害物として働き得る。なぜならこの関門は、治療用化合物が、罹患した細胞にアクセスすることを遮断し得るからである。重要なことには、Tregは、血液脳関門を越えることができ、Tregが結合したグリア細胞によってCNSのニューロンに局在化することができ、それによって、本発明の化合物がCNSの神経変性障害を効果的に処置することを可能にし得る。

20

【0020】

本発明の化合物および方法は、いかなる疾患特異的な生化学的機構にも依拠せず、代わりに、多くの神経変性疾患が精神的および物理的悪化に影響を与える免疫応答を避ける。よって、同化合物および方法は、多くの神経変性疾患に対して治療効果を提供し得る。

【0021】

例えば、PSPは、tauタンパク質蓄積および神経原線維変化を伴い、身体的および精神的悪化と関連する、ニューロンおよびグリア細胞の損傷および喪失、ならびに最終的には死亡を生じる。パーキンソン病は、黒質における星状細胞死およびミクログリアの増大とともに、大脳基底核におけるニューロン喪失を伴う。レビー小体といわれる封入体は、細胞死の前に損傷した細胞において発生する。ALSは、運動ニューロンの細胞体および軸索においてタンパク質が豊富な封入体を発生させた後の、運動野における運動ニューロンの死を特徴とする。

30

【0022】

本発明は、根底にある原因および疾患機構が異なっているにも拘わらず、アルツハイマー病（AD）、ハンチントン病、慢性外傷性脳症（CTE）、およびプリオントン病を含む神経変性疾患とともに、PSP、パーキンソン病、およびALSはおそらく、炎症およびCNS劣化に寄与する免疫構成要素を含むことを認識する。Malaspina, et al, 2015, Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective, International Immunology, 27(3): 117-129; Mosley R, Gendelman H, 2017, T cells and Parkinson's disease, Lancet Neurology, 16(10): 769-71を参照（これらの各々の内容は、本明細書に参考として援用される）。よって、CNSにおける免疫応答の抑制および多くの神経変性疾患を引き起こす慢性炎症の対処に焦点を当てた本発明の化合物および方法は、多くのそれら疾患を処置するにあたって治療上有効である。

40

【0023】

本発明の化合物および方法は、グリア細胞マーカーに特異的に結合する、キメラ抗原レセプター（CAR）、抗体、または単鎖可変フラグメント（scFv）を使用する。上記グリア細胞結合分子は、Treg、Tregによって発現される免疫抑制タンパク質、ま

50

たは T reg によって発現される免疫抑制タンパク質を模倣するように構成された分子に連結される。グリア細胞は、種々の動物（ヒトを含む）の中核神経系および末梢神経系においてニューロンを支持することにおいて多くの機能を果たす非ニューロン細胞である。グリア細胞は、希突起膠細胞。星状細胞、上衣細胞、およびミクログリアを含む。CNS のニューロンを維持することにおけるそれらの機能の結果として、グリア細胞は、CNS のニューロンへと移動するので、治療用化合物をそこに局在化させるために使用され得る。例えば、希突起膠細胞（ODC）グリア細胞は、CNS へと行って（traffic）、ミエリン鞘を作ることによって、軸索の絶縁を維持する。本発明の化合物および方法は、免疫抑制分子を、ODC のようなグリア細胞へと連結し、その結果、グリア細胞が、それらの機能を発揮するにつれて、免疫抑制分子が、図 1 および 2 に示されるように、CNS のニューロンの直ぐ近くにもたらされることを包含する。上記免疫抑制分子が存在することによって、CNS に存在し得、PD、PSP などにおける神経変性疾患症状に寄与する任意の進行中の免疫応答および慢性炎症が調節される。

10

20

30

40

50

#### 【0024】

グリア細胞特異的標的としては、種々のグリア細胞によって発現されるタンパク質および他のマーカー、例えば、ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質（MOG）、希突起膠細胞マーカー 01（OM1）、希突起膠細胞マーカー 04（OM4）、神経 / グリアマーカー 2（NG2）、A2B5、ガラクトシルセラミダーゼ（GALC）、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）、またはミエリン希突起膠細胞特異的タンパク質（MOSP）が挙げられる。

#### 【0025】

種々の実施形態において、CAR、scFv、または抗体は、免疫抑制分子に結合され得、グリア細胞を標的化するために使用され得る。CAR は、免疫エフェクター細胞（T 細胞）に特異性を提供し得る操作されたレセプターである。CAR は、がん免疫療法における使用のために細胞傷害性 T リンパ球に、腫瘍細胞特異性を付与するために使用されてきた。Couzin-Frankel, 2013, Cancer immunotherapy, Science, 342(6165) : 1432-33; Smith, et al., 2016, Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective, Journal of Cellular Immunotherapy, 2(2) : 59-68 (これらの各々の内容は、本明細書に参考として援用される) を参照のこと。類似の原理を使用して、本発明の化合物および方法は、ODC のようなグリア細胞上で見出されるマーカーに特異的な CAR を操作する工程を包含するが、細胞傷害性 T 細胞にグリア細胞特異的 CAR をグラフト化する代わりに、それらは、操作された免疫抑制 T reg 上にグラフト化される。

#### 【0026】

本発明の CAR - T reg は、同じかまたは 2 種もしくはこれより多くの異なるグリア細胞マーカーを標的とする多数のキメラ抗原レセプターを発現し得る。

#### 【0027】

scFv は、免疫グロブリンの重鎖の可変領域（VH）および軽鎖の可変領域（VL）を含む融合タンパク質である。scFv は、所望の標的分子（例えば、MOG）で免疫したマウスまたは他の動物の VH 遺伝子および VL 遺伝子をクローニングすることによって作製され得る。次いで、上記 VH 遺伝子および VL 遺伝子は、所望の安定性、発現レベル、およびグリア細胞またはその特異的マーカーに対する結合親和性を提供することが実験的に検証され得る種々の scFv を形成するために、多数の配向において、および種々のリンカーとともに発現され得る。上記で考察されるグリア細胞マーカーに対して特異的な scFv または抗体は、図 2 に示されかつ以下で考察される CNS 局在化免疫抑制療法を提供し得る融合タンパク質を形成するために、以下で考察される免疫抑制タンパク質に連結され得る。

## 【0028】

グリア細胞マーカーを標的とする抗体は、例えば、Pacific Immunology (San Diego, CA) または Abclonal (Woburn, MA) の特注の抗体を生成するための生姜用的に利用可能なサービスを含めた、当該分野で公知の方法によって生成され得る。

## 【0029】

CAR-Treg は、CAR-T 細胞を調製するための公知の方法によって操作され得る。Treg 細胞は、被験体から単離され得、好ましくは、処置される患者に由来する自家 Treg 細胞であり得る。次いで、上記 Treg 細胞の遺伝子は、エレクトロポレーション、ウイルスベクター、または選り抜きの操作されたキメラ抗原レセプターをコードする核酸でのトランスフェクションの他の形態のような公知の技術を通じて、改変され得る。次いで、CAR-Treg 細胞は、処置のために上記患者の系へと導入される前に、実験的に検証され得る。

10

## 【0030】

制御性 T 細胞または Treg は、免疫系を調節し、概して、エフェクター T 細胞の誘導および増殖をダウンレギュレートする。Treg は、自己免疫応答を防止し、免疫系による自己と非自己との識別を助ける。制御性 T 細胞は、トランスフォーミング増殖因子、インターロイキン 35、およびインターロイキン 10 を含む阻害性サイトカインを生成し、インターロイキン-10 を発現するように他の細胞タイプを誘導し得る。Treg はまた、グランザイム B を生成し得、それは、続いて、エフェクター細胞のアポトーシスを誘導し得る。Treg はまた、樹状細胞との直接的な相互作用および免疫抑制性のインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼの誘導を経る逆シグナル伝達を通じて機能する。Treg はまた、免疫抑制性アデノシンの生成とともに、エクトザイム CD39 および CD73 を通じて、免疫応答をダウンレギュレートし得る。Treg はまた、LAG3 によって、および TIGIT によって、樹状細胞との直接的な相互作用を通じて免疫応答を抑制する。別のコントロール機構は、IL-2 フィードバックループを介する。Treg による免疫抑制の別の機構は、CTLA-4 分子の作用によって、エフェクター T 細胞上の CD28 を通じて、共刺激の防止を経るものである。

20

## 【0031】

図 1 は、グリア細胞を標的とする CAR-Treg およびその治療機構を図示する。上記 CAR-Treg 細胞は、グリア細胞上のマーカーに特異的に結合する CAR を発現する。それによって、上記 CAR-Treg 細胞はグリア細胞に結合され、血液脳関門を越えて運ばれ、天然のグリア細胞機能を通じて CNS のニューロンへと局在化される。上記結合した Treg 細胞は、次いで、局部の、ニューロンの免疫による攻撃を抑制することによって、その天然の調節機能を果たす。

30

## 【0032】

図 2 は、ニューロンの免疫による攻撃を抑制する、本発明のグリア細胞標的化免疫抑制タンパク質 (GTP) を示す。GTP は、Treg 細胞に存在する免疫抑制タンパク質または免疫活性化代謝産物 (例えば、ATP、AMP、トリプトファン、およびグルタミン酸) をスカベンジする細胞外酵素のような酵素を含み得る。このような細胞外酵素としては、CD73、CD39、インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、およびグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ 1 (GOT1) が挙げられ得る。図 2において、MOG を発現するグリア細胞は、免疫抑制酵素 (IE) に連結された抗 MOG scFV からなる GTP によって結合される。上記グリア細胞は、そのニューロン関連機能を果たすにあたって、上記結合した IE を、種々の免疫細胞 (Th17 細胞、Th1 細胞、CTL 細胞、M1 細胞、および PMN 細胞) による免疫攻撃を受けているニューロンに局在化させ、上記免疫応答を調節するかもしくは停止させ、それによって、ニューロンを維持し、根底にある神経変性疾患の症状を低減させる。GTP は、進行性核上性麻痺 ( PSP )、アルツハイマー病 ( AD )、ハンチントン病、パーキンソン病 ( PD )、筋萎縮性側索硬化症 ( ALS )、慢性外傷性脳症 ( CTE )、多発性硬化症 ( MS )

40

50

、およびプリオントウ症候群のような神経変性疾患を処置するにあたって有用であり得る。

【0033】

本発明のG T I Pは、同じかまたは2種もしくはこれより多くの異なるグリア細胞マークターを標的とする、1種またはこれより多くのs c F Vまたは抗体に連結された1種またはこれより多くの免疫抑制タンパク質（2種またはこれより多くの異なるタンパク質を含む）を含み得る。タンパク質は、本発明のG T I Pを形成するために任意の公知の手段によって結合され得る（例えば、融合タンパク質またはビオチン-ストレプトアビジン連結を含む）。

【0034】

細胞傷害性Tリンパ球が関わるものを含む、がん免疫療法技術において使用されるとおりの養子細胞移入技術は、本発明の化合物および方法における使用のための自家C A R - T r e gを調製するために使用され得る。Rosenberg, et al., 2008, Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy, Nat Rev Cancer, 8(4):299-308を参照のこと（その内容は、本明細書に参考として援用される）。

10

【0035】

本発明のC A R - T r e gまたはグリア細胞標的化免疫抑制タンパク質は、本明細書で記載される治療用化合物のうちの1種またはこれより多くを含むキャリアシステムに組み込まれ得る。ある種の実施形態において、上記キャリアシステムは、ジスルフィド架橋したポリエチレンイミン（C L P E I）および脂質を含むナノ粒子であり得る。上記脂質は、胆汁酸（例えば、コール酸、デオキシコール酸、およびリトコール酸）であり得る。このようなキャリアシステムは、以下の実施例においてさらに記載される。他の例示的キャリアシステムは、例えば、Witttrup et al. (Nature Reviews Genetics, 16:543-552, 2015)に記載される（その内容は、その全体において本明細書に参考として援用される）に記載される。

20

【0036】

語句「非経口投与（parenteral administration）」および「非経口投与される（administered parenterally）」とは、本明細書で使用される場合、経腸投与および局所（topical）投与以外の投与様式（通常は、注射による）を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、囊内、眼窩内、心内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内および胸骨内の注射および注入が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0037】

語句「全身投与（systemic administration）」、「全身投与される（administered systematically）」、「末梢投与（peripheral administration）」および「末梢投与される（administered peripherally）」とは、本明細書で使用される場合、患者の系に入り、従って、代謝および他の類似プロセスに供されるように、中枢神経系に直接以外の、化合物、薬物または他の物質の投与（例えば、皮下投与）を意味する。

40

【0038】

本発明の化合物が医薬として、ヒトおよび動物に投与される場合、それらは、それ自体が与えられ得るか、または薬学的に受容可能なキャリアとの組み合わせにおいて、例えば、0.1～99.5%（より好ましくは、0.5～90%）の活性成分、すなわち、本発明の少なくとも1種の治療用化合物および/もしくはその誘導体を含む薬学的組成物として、与えられ得る。

【0039】

各薬剤の有効投与量は、各々、患者の年齢、体重、性別および臨床歴のような代表的な因子を鑑みて、当業者によって容易に決定され得る。一般に、本発明の化合物の適切な1日用量は、治療効果を生じるために有効な最低用量である化合物の量である。このような

50

有効用量は、一般に、上記で記載される要因に依存する。

【0040】

望ましい場合、上記活性化合物の有効1日用量は、一日を通して適切な間隔をあけて別々に投与される2、3、4、5、6またはこれより多くの部分用量として、必要に応じて単位投与形態において、投与され得る。

【0041】

本発明の薬学的組成物は、本発明の化合物のうちの1種またはこれより多く、またはその機能的誘導体の「治療上有効な量 (therapeutically effective amount)」または「予防上有効な量 (prophylactically effective amount)」を含む。「有効量 (effective amount)」とは、本明細書中、定義の節において定義されるとおりの量であり、所望の治療結果、例えば、神経障害性および/または炎症性の疼痛と関連する影響の減少または防止を達成するために必要な投与量においておよび期間にわたって有効な量を指す。本発明の化合物またはその機能的誘導体の治療上有効な量は、被験体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに上記治療用化合物が上記被験体において所望の応答を誘発する能力のような要因に従って変動し得る。治療上有効な量はまた、上記治療剤の任意の毒性または有害な効果を治療上有益な効果が上回る量である。

10

【0042】

「予防上有効な量」は、所望の予防結果を達成するために必要な投与量においておよび期間にわたって有効な量を指す。代表的には、予防的用量は、疾患の前に、または疾患のより早期のステージで被験体に使用されることから、上記予防上有効な量は、治療上有効な量より少なくてよい。予防上または治療上有効な量はまた、上記化合物の任意の毒性または有害な効果を有益な効果が上回る量である。

20

【0043】

投与レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療的または予防的な応答）を提供するために調節され得る。例えば、単一のボーラスが投与されてもよいし、いくつかの分割用量が経時的に投与されてもよいし、上記用量は、比例して低減されても、その治療の状況の逼迫によって示される場合に増大されてもよい。非経口用組成物を、投与の容易さおよび投与量の均一性のために投与単位形態で製剤化することは、特に有利である。本発明の薬学的組成物における活性成分の実際の投与量レベルは、上記患者に毒性であることなく、特定の被験体の所望の治療応答、組成物、および投与様式を達成するために有効な活性成分の量を得るために、変動され得る。

30

【0044】

用語「投与単位 (dose unit)」とは、本明細書で使用される場合、処置される哺乳動物被験体のための単位投与量として適した物理的に不連続の単位を指し；各単位は、必要とされる薬学的キャリアを伴って、所望の治療効果を生じるように計算された活性化合物の所定の量を含む。本発明の投与単位形態の仕様は、(a)上記化合物の特有の特性、および(b)個体における感受性の処置のためにこのような活性化合物を調合する分野において固有の制限、によって要求されるかまたはこれらに直接依存する。

40

【0045】

いくつかの実施形態において、治療上有効な量は、細胞培養アッセイ、または動物モデル、通常は、マウス、ウサギ、イヌ、もしくはブタのいずれかにおいて、最初に予測され得る。上記動物モデルはまた、望ましい濃度範囲および投与経路を達成するために使用される。このような情報は、次いで、他の被験体における有用な用量および投与経路を決定するために使用され得る。一般に、上記治療上有効な量は、被験体において神経障害性および/または炎症性の疼痛を低減または阻害するために十分である。いくつかの実施形態において、上記治療上有効な量は、被験体において神経障害性および/または炎症性の疼痛を排除するために十分である。特定の患者のための投与量は、従来の考慮事項を使用して（例えば、適切な従来の薬理学的プロトコールによって）、当業者によって決定され得る。医師は、例えば、最初に比較的低用量で、その後、適切な応答が得られるまで、上記

50

用量を増大させて、処方し得る。患者に投与される用量は、患者において有益な治療応答を経時的にもたらす、または例えば、適用に応じて、症状、もしくは他の適切な活性を低減するために十分である。上記用量は、特定の製剤の有効性、および本発明の化合物またはその機能的誘導体の活性、安定性または血清半減期、ならびに患者の状態、ならびに処置される患者の体重もしくは体表面積によって決定される。上記用量のサイズはまた、特定の被験体における特定のベクター、製剤などの投与に付随する任意の有害な副作用の存在、性質および程度によって決定される。1種またはこれより多くの本発明の化合物またはその機能的誘導体を含む治療用組成物は、必要に応じて、当該分野で周知の方法に従つて、有効性、組織代謝を確認し、投与量を見積もるために、1またはこれより多くの適切な、インビトロモデルおよび/またはインビボでの疾患動物モデル（例えば、神経障害性および/または炎症性の疼痛のモデル）において試験される。特に、投与量は、関連アッセイにおいて、活性、安定性または非処置に対する他の適切な処置の尺度（例えば、処置した細胞または動物モデル 対 処置していない細胞または動物モデルの比較）によって最初に決定され得る。製剤は、例えば、患者の重さおよび全体的な健康状態に適用される場合、関連製剤のLD50および/または本発明の化合物もしくはその機能的誘導体の、種々の濃度での任意の副作用の観察によって決定された速度で投与される。投与は、単一用量または分割用量を介して達成され得る。

#### 【0046】

投与は、代表的には、薬学的に受容可能な投与形態を投与することを含み、上記投与形態は、本明細書で記載される化合物の投与形態を意味し、例えば、錠剤、糖衣錠、散剤、エリキシル剤、シロップ剤、液体調製物（懸濁物を含む）、スプレー、吸入用錠剤（inhalants tablet）、ロゼンジ、エマルジョン、液剤、顆粒剤、カプセル剤、および坐剤、ならびに注射用の液体調製物（リポソーム調製物を含む）が挙げられる。技術および製剤化は、一般に、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 最新版（これは、その全体において参考として援用される）に見出され得る。投与は、経口的に、皮内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に、皮下に、または鼻内に行われ得る。化合物は、単独で、または適切な薬学的キャリアとともに投与されてもよく、固体または液体の形態（例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁物、またはエマルジョン）にあり得る。

#### 【0047】

活性成分を含む薬学的組成物は、経口用途に適した形態、例えば、錠剤、トローチ、ロゼンジ、水性もしくは油性の懸濁物、分散性の散剤もしくは顆粒剤、エマルジョン、硬質もしくは軟質のカプセル剤、またはシロップ剤もしくはエリキシル剤であり得る。経口用途が意図される組成物は、薬学的組成物の製造について当該分野で公知の任意の方法に従つて調製され得、このような組成物は、薬学的に的を射たかつ口当たりの良い調製物を提供するために、甘味剤、矯味矯臭剤、着色剤および保存剤から選択される、1種またはこれより多くの薬剤を含み得る。錠剤は、錠剤の製造において適切な、非毒性の薬学的に受容可能な賦形剤と混合して、活性成分を含む。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム）、造粒剤および崩壊剤、例えば、コーンスターク、またはアルギン酸；結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシアガム）、ならびに滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）であり得る。上記錠剤はコーティングされていなくてもよいし、消化管での崩壊および吸収を遅らせ、それによって、より長期間にわたって持続した作用を提供するための公知の技術によってコーティングされてもよい。例えば、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートのような時間遅延物質（time delay material）が使用されてもよい。それらは、制御放出のために治療用浸透圧錠剤を形成するために、米国特許第4,256,108号、同第4,166,452号および同第4,265,874号（これらの各々の内容は、その全体において本明細書に参考として援用される）に記載される技術によってコー

10

20

30

40

50

ティングされ得る。

【0048】

経口用途のための製剤はまた、活性成分が不活性固体希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリン）と混合される硬質ゼラチンカプセル剤、または活性成分が水または油媒体（例えば、ラッカセイ油、流動パラフィンまたはオリーブ油）と混合される軟質ゼラチンカプセル剤として提示され得る。

【0049】

製剤はまた、親（非イオン化）化合物と - シクロデキストリンの誘導体、特に、ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリンとの複合体を含み得る。

【0050】

代替の経口製剤は、上記化合物が腸溶性コーティングの中に被包される放出制御製剤を使用して達成され得る。

【0051】

水性懸濁物は、水性懸濁物の製造に適した賦形剤と混合した状態にある活性物質を含む。このような賦形剤は、懸濁化剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル - ピロリドン、トラガカントガムおよびアカシアガム）；分散剤または湿潤剤（例えば、天然に存在するホスファチド、例えば、レシチン）またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンステアレート）、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールに由来する部分エステル（例えば、ポリオキシエチレンと脂肪酸およびヘキシトール無水物に由来する部分エステル）との縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートである。上記水性懸濁物はまた、1種またはこれより多くの保存剤（例えば、p - ヒドロキシ安息香酸エチル、またはp - ヒドロキシ安息香酸n - プロピル）、1種またはこれより多くの着色剤、1種またはこれより多くの香味・香料、および1種またはこれより多くの甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）を含み得る。

【0052】

油性懸濁物は、活性成分を、植物性油（例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油またはココナッツ油）中、またはミネラルオイル（例えば、流動パラフィン）中に懸濁することによって製剤化され得る。上記油性懸濁物は、濃化剤（例えば、蜜蝋、固体パラフィンまたはセチルアルコール）を含み得る。甘味剤（例えば、上記のもの）および香味・香料は、口に合う経口調製物を提供するために添加され得る。これらの組成物は、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）の添加によって保存され得る。

【0053】

水の添加による水性懸濁物の調製に適した分散性の散剤および顆粒剤は、活性成分を、分散剤または湿潤剤、懸濁化剤および1種またはこれより多くの保存剤と混合した状態で提供する。適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤が例示され、例えば、甘味剤、香味・香料および着色剤もまた存在し得る。

【0054】

本発明の薬学的組成物はまた、水中油型エマルジョンの形態にあり得る。その油相は、植物性油（例えば、オリーブ油またはラッカセイ油）、またはミネラルオイル（例えば、流動性パラフィン）またはこれらの混合物であり得る。適切な乳化剤は、天然に存在するガム（例えば、アカシアガムまたはトラガカントガム）、天然に存在するホスファチド（例えば、大豆レシチン）、ならびに脂肪酸およびヘキシトール無水物に由来するエステルもしくは部分エステル（例えば、ソルビタンモノオレエート）、ならびに上記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）であり得る。上記エマルジョンはまた、甘味剤および香味・香料を含み得る。

【0055】

シロップ剤およびエリキシル剤は、甘味剤（例えば、グリセロール、プロピレングリコ

10

20

30

40

50

ール、ソルビトールまたはスクロース)を用いて製剤化され得る。このような製剤はまた、粘滑剤 (d e m u l c e n t)、保存剤、ならびに矯味矯臭剤および着色剤を含み得る。上記薬学的組成物は、無菌で注射用の水性または油性の懸濁物の形態にあり得る。この懸濁物は、上記で言及されているそれら適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を使用して、公知の技術に従って製剤化され得る。上記無菌で注射用の調製物はまた、非毒性の非経口的に受容可能な希釈剤または溶媒中の無菌で注射用の液剤または懸濁物にあり得、例えば 1, 3 - ブタンジオール中の液剤として存在し得る。使用され得る上記受容可能なビヒクルおよび溶媒の中には、水、リングル液および等張性塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌の不揮発性油は、溶媒または懸濁媒体として従来どおり使用される。この目的のために、任意の刺激のない不揮発性油が使用され得る(合成モノグリセリドまたはジグリセリドが挙げられる)。さらに、オレイン酸のような脂肪酸は、注射物の調製における使用が見出される。

10

## 【0056】

各活性薬剤はまた、薬物の直腸投与のための坐剤の形態で投与され得る。これらの組成物は、上記薬物と適切な非刺激性賦形剤とを混合することによって調製され得る。この非刺激性賦形剤は、通常の温度では固体であるが、直腸温では液体であり、従って、直腸では融解して、上記薬物を放出する。このような物質は、カカオ脂およびポリエチレングリコールである。

## 【0057】

局所的使用のために、クリーム剤、軟膏、ゼリー、液剤または懸濁物が適切である。局所適用は、マウスウォッシュおよび含嗽剤の使用を含む。

20

## 【0058】

用語「薬学的組成物 (p h a r m a c e u t i c a l c o m p o s i t i o n)」は、投与様式および投与形態の性質に依存して、本明細書で記載されるとおりの化合物、ならびに薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクル(例えば、保存剤、充填剤、崩壊剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁化剤、甘味剤、矯味矯臭剤、香料 (p e r f u m i n g a g e n t)、抗細菌剤、抗真菌剤、滑沢剤および分散剤を含む少なくとも 1 種の成分を含む組成物を意味する。用語「薬学的に受容可能なキャリア (p h a r m a c e u t i c a l l y a c c e p t a b l e c a r r i e r)」とは、本明細書で記載されるように、任意のキャリア、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを意味するために使用される。懸濁化剤の例としては、エトキシリ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天およびトラガカントガム、またはこれらの物質の混合物が挙げられる。微生物活動の防止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって保証され得る。等張化剤 (i s o t o n i c a g e n t)、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを含むこともまた、望ましいことであり得る。上記注射用の薬学的形態の長期の吸收は、吸收を遅延させる薬剤(例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン)を使用することによってもたらされ得る。適切なキャリア、希釈剤、溶媒、またはビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール、これらの適切な混合物、植物性油(例えば、オリーブ油)、および注射用有機エステル(例えば、オレイン酸エチル)が挙げられる。賦形剤の例としては、ラクトース、乳糖 (m i l k s u g a r)、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、およびリン酸二カルシウムが挙げられる。崩壊剤の例としては、デンプン、アルギン酸、およびある種の複合シリケートが挙げられる。滑沢剤の例としては、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、タルク、および高分子量ポリエチレングリコールが挙げられる。

30

## 【0059】

用語「薬学的に受容可能な (p h a r m a c e u t i c a l l y a c c e p t a b l e)」とは、それが過度の毒性、刺激、アレルギー応答などがなく、妥当な医学的判断の範囲内でヒトおよび下等動物の細胞と接触した状態における使用に適切であり、妥当な利

40

50

益 / リスク比と釣り合っていることを意味する。

【 0 0 6 0 】

参照による援用

特許、特許出願、特許公報、学術雑誌、書籍、論文、ウェブコンテンツのような他の文書への言及および引用は、本開示全体を通じて行われている。全てのこのような文書は、全ての目的のためにそれらの全体において本明細書に参考として援用される。

【 0 0 6 1 】

均等物

本発明の種々の改変およびその多くのさらなる実施形態は、本明細書で示されかつ記載されるものに加えて、本明細書で引用される科学文献および特許文献への言及を含め、本文書の全内容から当業者に明らかになる。本明細書における主題は、本発明の実施に適合され得る重要な情報、例示およびガイダンスを、その種々の実施形態およびその均等物において含む。

10

【 実施例 】

【 0 0 6 2 】

実施例 1

試験デザイン

進行性核上性麻痺 ( P S P ) を有する参加者は、エキソビボで拡大増殖された自家 C D 4 + C D 1 2 7 1 o / - C D 2 5 + C A R - 制御性 T 細胞 ( T r e g ) の 1 回の注入を受ける。 C A R - T r e g を、中枢神経系 ( C N S ) において特異的に発現される糖タンパク質であるミエリン - 希突起膠細胞タンパク質 ( M O G ) を特異的に認識し、脳における免疫寛容および抗炎症効果を誘導するようにデザインする。

20

【 0 0 6 3 】

主な目的は、 P S P を有する少なくとも 5 名の患者において、エキソビボで選択され、拡大増殖されかつ形質導入される自家 C N S 特異的 C A R - T r e g の静脈内注入の安全性および実現性を評価することである。

【 0 0 6 4 】

一時的な転帰尺度は、以下である：

1 . 有害事象

30

2 . 検査の異常

3 . 注入反応

4 . 感染に関連する合併症

5 . P S P の経過に対する潜在的な負の影響

【 0 0 6 5 】

二次的な目的は、 P S P に対する C N S 特異的 C A R - T r e g の効果を評価することおよび他の神経変性疾患における潜在的適用に関する兆候を得ることである。

【 0 0 6 6 】

エンドポイントは、以下である：

1 . P S P 患者における臨床パラメーター、神経心理学的パラメーター、放射線医学的パラメーターおよび生化学的パラメーターに対する C N S 特異的 C A R - T r e g の効果を評価する

40

2 . アルツハイマー病 ( A D ) を含む他の神経変性疾患における C N S 特異的 C A R - T r e g の潜在的な治療上の使用法に関する兆候を得る

3 . 神経変性障害に関する C A R - T r e g の潜在的有効性への価値ある洞察を提供し得るプラシーボを対照とした潜在的なフェーズ I I 無作為化二重盲検において兆候を得る。

【 0 0 6 7 】

患者評価

臨床評価および神経心理学的評価： 包含基準および排除基準の詳細な説明、ならびに臨床評価 ( 運動および神経心理学的 ) および神経画像診断評価を、以前 ( Giordan o et al . , J . Transl . Med . 2014 ; Canesi e

50

tal., J. Transl. Med. 2016 (本明細書に参考として援用される) ) に報告されたように行う。患者は、神経学的検査を受けて、以下のスケールを使用して運動機能が評価される: 統一パーキンソン病評価スケール (UPDRS パート I II、運動スコア) 、ホーエン・ヤール重症度分類 (Hoehn and Yahr staging) (H & Y) 、PSP 評価スケール (PSP-RS) (Goetz et al., Mov. Disord. 2004; Golbe et al., Brain 2007 (これらの各々の内容は、本明細書に参考として援用される) ) 。ミニメンタルステート評価 (MMSE) をまた、以前 (Folstein et al., J. Psychiatr. Res. 1975 (本明細書に参考として援用される) ) に記載されたように行う。全てのこれらの検査を、ベースライン時および各追跡点 (細胞投与の 1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、および 12 ヶ月後) において評価する。UPDRS および PSP-RS スコアが、ベースラインと比較して 30 % より大きく減少しなかった場合、および H & Y 重症度分類が規定された時点で変化しなかった場合、「安定」として臨床状態を分類する (Canesi et al., J. Transl. Med. 2016 (本明細書に参考として援用される) ) 。

10

20

30

40

50

## 【0068】

神経画像診断: 全ての患者は、脳の核磁気共鳴画像化法 (MRI) を使用して、長軸方向の神経画像診断評価 (ベースライン時、細胞投与の 24 時間後、および 1 年後) 、線条体ドパミントランスポーター単一光子放射型コンピューター断層撮影法 (SPECT) および陽電子放出断層撮影法 (PET) (ともに、ベースライン時および 12 ヶ月後) を受ける。ヨウ素 - 123 (FP-CIT) および 18F - フルオロ - 2 - デオキシグルコース (Beta-CIT) で標識したトロパントレーサー (tropanic tracer) をそれぞれ、SPECT 画像化および PET/TC 画像化のために使用する。

## 【0069】

SPECT に関しては、110 ~ 140 MBq の [123I]FP-CIT (Datscan, GE-Health, Amersham, UK) の静脈内投与を、全ての患者において、甲状腺プロックの 30 ~ 40 分後に行う (10 ~ 15 mg のルゴール溶液経口)。分析を以前 (Isaias et al., NeuroReport 2007 (本明細書に参考として援用される) ) に記載されたように行う。灰白質解剖学的分布の容積測定テンプレートを、巨視的な解剖法 (自動化解剖学的ラベリング) を適用することによって、Montreal Neurological Institute MRI 単一参加者脳アトラスから生成し、2.64 cm 厚の参照断面を得るために、再配向および再フォーマットする。8 つの不規則な目的の領域 (ROI) のテンプレートを、この断面上に手で線を引いて、それぞれ、[123I]FP-CIT の特異的取り込みおよび非特異的取り込みを有する線条体および後頭葉構造の解剖学的な程度を評価する。上記 ROI テンプレートをまた、参照 SPECT 断面上に配置し、線条体および後頭皮質の両方に対して調節する。線条体 ROI をまた、それらの前方 (尾状核) 部分および後方 (被殼) 部分へと分割する。

## 【0070】

[123I]FP-CIT の特異的線条体ドパミン取り込みトランスポーター (DAT) 結合を、式: [(特定の ROI における平均数) - (後頭 ROI における平均数)] / (後頭 ROI における平均数) を使用して、線条体全体、被殼および尾状核において計算する。各被験体の被殼 / 尾状核比も計算する。

## 【0071】

全ての患者はまた、170 MBq の静脈注射後、安静時に F - フルオロ - 2 - デオキシグルコース陽電子放出断層撮影スキャニング (FDG PET) を受ける。各獲得は、頭部のコンピューター断層撮影法 (CT) トランスマッショナスキャナ (16 秒持続して 50 mA) 、続いて、Biograph Truepoint 64 PET/CT スキャナー (Siemens) を使用する 15 分間の三次元 (3D) 静的放出を含む。PET 断面を、反復アルゴリズム (OS-EM) を使用して再構築し、同じスキャナーで得られた頭

部の低線量 CT スキャンから得られる密度係数を使用して、散乱および減衰に関して補正する。画像を、反復アルゴリズム順序化サブセット期待値最大化法 (OSEM) を使用して、128 - 2 mm の 128 ピクセルの長軸横断画像の形態において再構築する。PET システムの解像度は、4 ~ 5 mm FWHM である。

#### 【0072】

生体力学的評価：生体力学的評価を、ベースライン時、ならびに CAR-Treg 細胞投与の 6 ヶ月後および 12 ヶ月後に評価する。パラメーターの 2 つの特定のセット（一方は、立位のもの、および一方は歩行開始のもの）を、アドホックアルゴリズム (Carpinella et al., IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng. 2007 (本明細書に参考として援用される)) によって自動的に抽出する。立位に関しては、圧力中心 (CoP) 平均速度および空間変位を測定する (Canesi et al., J. Transl. Med. 2016 (本明細書に参考として援用される))。歩行開始を検査するために、予想姿勢調節を分析し (Canesi et al., J. Transl. Med. 2016 (本明細書に参考として援用される)) (すなわち、不安定および非荷重相)、以下のパラメーターを測定する：(1) 両方の相の継続時間、(2) CoP の前後 (AP) および内外 (ML) のシフトおよび速度、(3) CoP 平均長および速度、(4) 第 1 歩の長さおよび (5) 速度もまた、測定する。空間パラメーターを、身長 (body height) (%BH) に基づいて正規化する。

#### 【0073】

##### CAR-Treg 細胞の調製および投与

Treg 単離および拡大増殖 (expansion)：ポリ Treg を選択し、3 種の細胞表面マーカー (CD4、CD25、および CD127) に基づいて、PSP を有する 5 名の個体から拡大増殖して、以前 (Putnam et al., Diabetes 2009; Bluestone et al., Sci. Transl. Med., 2015 (本明細書に参考として援用される)) に記載されたように末梢血に存在する FOXP3+ Treg を精製する。

#### 【0074】

400 ml の新鮮な末梢血を、クエン酸リシン酸デキストロースを含む血液パックユニットに集め、Ficoll 密度勾配を介して PBMC の単離のために、24 時間以内に処理する。Treg を、以下の GMP グレード凍結乾燥抗体を用いて高速セルソーターで単離する：CD4 - PerCP (ペリジニンクロロフィルタンパク質) (L200 クローン)、CD127 - PE (フィコエリトリン) (40131 クローン)、および CD25 - APC (アロフィコシアニン) (2A3 クローン)。ソートした CD4+CD127lo/-CD25+ 細胞を、10% ヒト熱非働化プール AB 血清 (Vallley Biomedical) を含む 3 ml の X-VIVO 15 培地 (Lonza, カタログ番号 04-418Q) 中に集める。Treg を、ソート後に純度に関して分析する。CD4+CD127lo/-CD25+ 細胞の予測される純度は、96% より多い (Bluestone et al., Sci. Transl. Med., 2015 (本明細書に参考として援用される))。

#### 【0075】

精製 Treg を、以前 (Bluestone et al., Sci. Transl. Med., 2015 (本明細書に参考として援用される)) に記載されたように、抗 CD3 および抗 CD28+ 組換え IL-2 でコーティングした臨床グレードの Dynabeads とともに培養する。血液ユニットは、4.2 × 106 ~ 11.8 × 106 精製 CD4+CD127lo/-CD25+ Treg の間を得ると予測される (Bluestone et al., Sci. Transl. Med., 2015 (本明細書に参考として援用される))。拡大増殖した Treg 調製物は、およそ 90% FOXP3+ であると予測される。Treg 調製物を、生存率、CD4+ パーセンテージ、および CD8+ 細胞混入に関してチェックする (Bluestone et al.,

10

20

30

40

50

Sci. Transl. Med., 2015 (本明細書に参考として援用される)。10

【0076】

拡大増殖したポリTregの表現型およびTCR分析: Tregを単離するために使用される重要な細胞表面マーカーであるCD4およびCD127を、拡大増殖後にチェックする。

【0077】

以前のデータは、天然のCD45RA+ Tregがこれらの培養物中で優先的に拡大増殖し、CD45RA+RO-細胞が、拡大増殖期を通じてCD45RAをダウンレギュレートし、CD45ROをアップレギュレートすることを示した (Bluestone et al., Sci. Transl. Med., 2015 (本明細書に参考として援用される))。CCR7 (Tregトラフィッキングレセプター)、CD38 (増強されたTreg機能と関連する多機能性細胞外酵素) およびCD45ROを、拡大増殖の前および後に決定する。拡大増殖したTregのTCRレパートリーも分析し、新鮮に単離された集団と比較して、拡大増殖したTregのポリクローニ性を決定する。拡大増殖した細胞は、拡大増殖前培養物とは識別不可能なポリクローニ性を示すこと、およびTregが、拡大増殖後に非常に多様な集団のままであることが予測される (Bluestone et al., Sci. Transl. Med., 2015 (本明細書に参考として援用される))。20

【0078】

拡大増殖したポリTregの機能分析: Treg拡大増殖後に以下のアッセイ (Bluestone et al., Sci. Transl. Med., 2015 (本明細書に参考として援用される))を行う:

- 拡大増殖したTregの全体の純度および安定性を評価するためのFOXP3座のエンハンサー領域のDNAメチル化状態。
- リンパ球表現型を評価するためのサイトカイン生成 (IFN、IL-4、IL-5 およびIL-17)。
- 拡大増殖した細胞の機能的潜在能力を決定するためのインビトロ抑制活性。

【0079】

CAR-Treg細胞の生成および機能分析: CAR RNAを、ヒトTregのエレクトロポレーション後のTreg上の、および公開されたプロトコール (Zhao, Y et al., 2010 Cancer Res and Beatty, GL et al., 2014 Cancer Immunol Res; Singh, N et al., 2014 Oncoimmunol (これらの各々の内容は、本明細書に参考として援用される)に従ったPSPマウスモデルへの養子移入後のマウスTreg上での抗MOG CAR発現に関して最適化する。第二世代レンチウイルスベクターおよび標準的プロトコール (Levine, B. L. et al., 2017 Mol Ther Methods & Clin Dev (本明細書に参考として援用される))を使用する抗MOG CARの送達もまた、最適化する。ヒトTregを、RNAのエレクトロポレーションを使用するGMP条件 (約1mg / 3 × 10<sup>6</sup> Treg) 下で、またはレンチウイルス形質導入 (1 × 10<sup>6</sup> pfu / 3 × 10<sup>6</sup> Treg) のいずれかで形質導入する。抗MOG CARの臨床グレードのRNAを生成する。2.6 × 10<sup>9</sup> Treg細胞に対して約0.9mg RNA / 患者; 5名の患者につき4.5mgが、必要とされる。臨床グレードのレンチウイルスを生成する。2.6 × 10<sup>9</sup> Treg細胞に対して約8.7 × 10<sup>9</sup> pfu / 患者; 5名の患者につき4.3 × 10<sup>10</sup> pfuが、必要とされる。MOG特異的CAR-Tregの機能分析を、3.3において上記で記載されるように行う。40

【0080】

細胞投与

MOG特異的CAR-Tregの1回の投与を、各患者に対して行う (2.6 × 10<sup>9</sup>)

50

C A R - T r e g / 患者）。細胞を、少なくとも 5 名の P S P 患者に投与する。患者は、アセトアミノフェンおよびジフェンヒドラミンでの前投薬を受ける。C A R - T r e g を、末梢静脈ラインを介して 10 ~ 30 分かけて注入する。注入の前および後に、次いで、少なくとも 1 時間にわたって 15 分ごとに、次いで、最初の 4 時間にについて 1 時間ごとに、および 20 時間にについて 4 時間ごとに、バイタルサインを測定する。種々の血球数を伴う化学的性質および全血球カウントを、臨床研究ユニットから退院する前に翌日に反復する。患者を、注入後 4 日目に、次いで、4 週間にわたって 1 週間に 1 回、次いで、1 年間にわたって 13 週間に 1 回、および 2 年間にわたって 26 週間に 1 回、追跡評価のために診察する。有害事象に関する電話モニタリングを、5 年間にわたって 6 ヶ月毎に継続し、その後、最後のクリニック訪問を行う。

10

#### 【 0 0 8 1 】

##### C A R - T r e g 細胞注入後の患者評価

P S P 患者における臨床パラメーター、神経心理学的パラメーター、放射線医学的パラメーターおよび生化学的パラメーターに対する C N S 特異的 C A R - T r e g の効果を、上記のように評価する。試験は全て、各追跡点で行う：細胞投与後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、および 12 ヶ月。

#### 【 0 0 8 2 】

##### 実施例 2

疾患を引き起こす、損傷を与える免疫応答を止める免疫抑制制御性 T リンパ球 ( T r e g ) の構成要素を利用する多発性硬化症 ( M S ) の薬物を、開発および試験する。全世界の M S 市場は、約 215 億ドルであるが、 M S の最も一般的な形態に関して承認された薬物は、顕著な副作用を伴うが若干の疾患修飾を与えるに過ぎない。 M S のより重篤な形態に関しては、処置選択肢は、わずか 1 種の最近承認された薬物に限られている。

20

#### 【 0 0 8 3 】

M S の再発寛解型 ( R R M S - 診断される M S のうちの 85 % ) については、11 種の F D A 承認薬が存在する。現在承認されているかまたは R R M S に関して臨床評価中の、いくつかの経口利用可能なおよび抗体ベースの薬物が存在する。2017 年 3 月に、 F D A は、一次進行型 M S ( P P M S - 診断される M S のうちの約 10 % ) については、オクレリズマブ ( 抗 C D 20 抗体, Roche ) の使用を承認した。オクレリズマブは、症状の 25 % 低減をもたらし、現在、 U S A では P P M S の唯一の免疫調節剤である。二次進行型 M S ( S P M S ) は、 R R M S を有する患者において常に発症し、それに関しても、制限された疾患修飾選択肢が存在する。

30

#### 【 0 0 8 4 】

##### 生物製剤の生成

抗 M O G ハイブリドーマを、 C R O を通じて、組換えヒト M O G でマウスを免疫することによって生成する。 V H 遺伝子および V L 遺伝子をクローニングし、抗 s c F v 分子。 V H および V L の配向、ならびにリンカー ( s c F v 間のまたは各 s c F v 内部の ) は、 G T I P の安定性、発現レベルおよび結合能力に大きく影響を及ぼし得る。場合によっては、これらの形態のうちの 1 つのみが、機能的分子を生成する。従って、 V H - V L のいくつかの配向を、小規模に発現させ、スケールアップ生成の前に試験する。接続するリンカー、中心リンカー、次いで、 T r e g 関連酵素または模倣物へと接続するとともに 4 種の抗 M O G s c F v をコードする発現構築物を、生成する。

40

#### 【 0 0 8 5 】

##### マウス M S モデルにおける G T I P タンパク質生成物の検証

G T I P を、マウスの M S の急性および慢性の E A E モデルにおいて試験する。ミエリン塩基性タンパク質 ( M B P ) 、骨髄炎症性細胞 ( マクロファージおよび好中球 ) および抗 M B P 抗体に対して特異的な T h 1 、 T h 17 、 C T L ( 血液および C N S ) のレベルを測定する。免疫学的応答は、疾患進行と相關する。投与を、後期ステージ M S における潜在的用途への洞察を得るために変化させる。生成物を通常のマウスにおいて投与して、任意の潜在的オフターゲット効果への洞察を得る。

50

## 【0086】

## 臨床評価

臨床試験を行って、MSにおける疾患修飾薬剤としてのGTPの有効性を試験する。その生成物を、第1使用薬(first use drug)に応答しないRRMS患者において最初に試験する。安全性および耐容性を、抗体治療に関するものに類似の投与レジメンを使用して測定する(例えば、最初に2週間ごとに3回のi.v.用量、次いで、20週間にわたって4週間ごと)。フェーズ2試験において、一次尺度は、減少した疾患再発頻度および脳病変である。二次尺度は、血中において減少した炎症性サイトカイン、Th1/Th17細胞および他の白血球レベルである。副作用は、感染しやすさの増大を含み得る。これらの試験は、再発頻度において49%までの低減を示す他の第2使用薬に對して、上記化合物の有効性を本発明者らが基準にする(benchmark)ことを可能にする。上記生成物が受容可能な有効性レベルを示す場合、それらは、PPMS患者におけるより長期間のフェーズ2臨床試験に入る。一次尺度は、運動機能の低下の遅延および低減した脳病変であり、二次尺度は、血中において減少した炎症性サイトカイン、Th1/Th17細胞および他の白血球のレベルである。

10

## 【0087】

## 実施例3

テトラマー結合アッセイを使用して、図3に示されるように、標的細胞へのGTP結合の結合力を、T細胞に対する既知のテトラマー(Ober, B et al, 2000 Int Immunol(本明細書に参考として援用される))のものと、比較する。B6.2.16 CTL上のTCRに対するH-Yペプチド/MHC H-2Db(pMHC)テトラマーの相対的結合力を、細胞染色およびフローサイトメトリー(FCM)を使用する2つのパラメーターを決定することによって測定する。これらは、テトラマー染色(細胞洗浄後)の最大染色を与えるために必要とされる濃度および半減期( $t_{1/2}$ )である。MOG標的細胞を、非接着性標的細胞(例えば、RMAまたはJurkat細胞)の遺伝子トランスフェクションによって生成する。抗体染色およびフローサイトメトリー(FCM)は、MOGの表面発現を確認する。抗体染色およびFCMは、CTL上にB6.2.16 TCRと同じMOGレベルを有するトランスフェクト体を同定する。標識GTPタンパク質でのMOG標的細胞の染色の最大染色および半減期を測定し、図4および5に示されるように、CTLおよびpMHCテトラマーのものと比較する。その目的は、CTLおよびpMHCテトラマーのものに匹敵するかまたはこれより良好な細胞相互作用の結合力を有するGTPを生成することである。GTP分子におけるテトラマー抗MOG scFvが、このバーを下回る場合、scFvのバランス(valance)結合価は増大され得る。さらにより高い結合価が必要とされる場合、ナノ粒子足場が、標的細胞結合のための必要な結合力を達成するために使用され得る。

20

30

## 【0088】

## 実施例4

MOG標的細胞に結合したGTPがTエフェクター(Teff)細胞の増殖を抑制する能力を試験する。所定のスカベンジャーIE(以下の表1を参照のこと)のテトラマーから構成されるGTPは、MOG標的細胞に結合され、洗浄され、次いで、増殖しつつあるヒトTeff(例えば、抗CD3/CD28およびIL-2刺激の3日後に標準的手順を使用して生成される)とともにインキュベートされる(図6の中央の列)。

40

## 【表1】

表1

代謝産物 (M)	免疫抑制スカベンジング酵素 (IE)
AMP	CD73
ATP	CD39
TRP	IDO
GLU	GOT

10

## 【0089】

細胞を、G T I PにおけるI Eの基質である関連する有糸分裂促進性代謝産物 (M) (上記の表を参照のこと)を添加した培地で培養する。経時的に、Mの濃度およびT e f fの数を、図6に示されるように測定する。G T I P修飾されたM O G - 標的細胞の数は、抑制活性の指数を与えるために、一定の時間後にT e f fの数に対して量が決定される (titrate)。陰性コントロール実験 (図6の左列)では、M O G - 標的細胞に結合したテトラマー-s c F vは、より長いM半減期、一定時間後より多量のT e f fおよびT e f f細胞蓄積に対する抑制活性なしを生じる。陽性コントロール (図6の右列)として、ヒトT r e g (標準条件下で、例えば、C D 3 / C D 2 8およびT G F - 刺激の9日後に、生成される)を、T e f f細胞と共に培養し、抑制活性を、G T I P修飾されたM O G標的細胞のものと比較する。ヒトT r e g細胞のものと匹敵する、G T I P修飾したM O G標的細胞の細胞間ベースでの有効性は、特定のI EでのG T I P分子の陽性検証として働く。上記アッセイは、最も有効なI E分子から構成されるG T I Pを同定する。有効性は、G T I P分子におけるI E分子の1より多くのタイプを添加すること、および/またはI E分子の結合値を増大させることによって、増大され得る。

20

## 【0090】

## 実施例5

M O Gに特異的なs c F vを発現するC A R分子が、T r e g細胞をM O G発現標的細胞に、生理学的に意味のあるT細胞:標的細胞相互作用に近い相対的結合力で結合させる能力を測定するために、アッセイが使用される。比較のために使用される生理学的に意味のあるT細胞:標的細胞相互作用は、C T L:ペプチド/M H C (p M H C) / 標的細胞相互作用である。これは、細胞-細胞結合体のためのフローサイトメトリー (F C M) ベースのアッセイ (O p f e r m a n , J T et al . , 2 0 0 1 I n t I m m u n o l . (本明細書に参考として援用される))を使用して行われる。

30

## 【0091】

関連するC T Lクローン (B 6 . 2 . 1 6)に対するp M H C標的の相対的結合力を決定する (図7の左列)。標的を、生体染色色素 (v i t a l d y e) P K H 2 6 (赤色)で標識し、C T LをC F S E (緑色)で標識し、4時間にわたって共インキュベートし、次いで、標準的剪断力に供して、F C Mによって検査する。結合体は、二重染色ダブルトとして検出され、H-Yペプチド抗原の存在に依存する。p M H C標的: B 6 . 2 . 1 6 C T L相互作用の相対的結合力は、2つのパラメーター (結合体形成の最大レベル (全投入細胞のうちの約80%)および結合体の解離の半減期)によって測定される。M O G標的細胞を、標準的条件 (例えば、抗C D 3 / C D 2 8 I L - 2刺激T細胞のレンチウイルス形質導入)下で生成したC A R - 抗M O G s c F v発現ヒトT細胞とともにインキュベートする。標識した細胞間の結合体の半減期を、F C Mによって測定する (図7の右列)。C T L: p M H C / 標的細胞のものと匹敵する結合体半減期は、M O G陽性標的細胞に関するT細胞に対する抗M O G s c F v / C A Rの生理学的結合力を示す。

40

## 【0092】

50

### 実施例 6

ヒトファージディスプレイ s c F v ライブライバーの親和性パニングによって、ヒト M O G に対して特異的な s c F v 抗体を生成した。 Q C S D S - P A G E を、ライブライバー スクリーニングの前に行って、標的の純度を評価した。非特異的結合因子を低減するために、プレカウンター選択 ( p r e - c o u n t e r s e l e c t i o n ) を、ポリスチレン平底プレートおよびプロッキング緩衝液を使用して、先ず標的化スクリーニングの前に上記ファージライブライバーに対して行った。

#### 【 0 0 9 3 】

3 回のバイオパニングの後に、陽性富化を観察した。20 個のクローンを、3 回目から無作為に拾い上げ、Q C モノクローナルファージ E L I S A を行った。18 個のクローンは、コントロールと比較して、標的に結合することが見出された。18 個全ての陽性クローンを配列決定した。

10

#### 【 0 0 9 4 】

別の 20 のクローンを、3 回目から拾い上げ、Q C モノクローナルファージ E L I S A に供した。第 2 のクローンセットの 20 個の全てが、コントロールと比較して、標的に結合することが見出された。それらの全てを配列決定した。

20

#### 【 0 0 9 5 】

38 の陽性クローンの分析後に、特有の配列を有する 7 個の陽性クローン (クローン 1 、 3 、 6 、 10 、 13 、 17 、 21 ) が同定された。7 種の s c F v タンパク質の配列およびこれらをコードする D N A 配列を、以下に列挙する：

#### 【 0 0 9 6 】

【化1】

クローン1 DNA(配列番号1):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAG  
 ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCG  
 CCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAAGTATTCTGATTATGGAATAC  
 TACAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGCCGGTCAACCATCTCAGAGACAATTCAA  
 GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATT  
 10 ACTGTGCGAAAAATGCTAATTATTTGACTACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCG  
 TCTCGAGCGGTGGAGGCAGGTTCAAGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTCGACG  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTGCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGGAAAGCCCCTAACGCTCCTGATCTGATGCATCCAGTTGCAAAGTGG  
 GGTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAG  
 CAGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAACAGACTTCTACTTATCCT  
 GGTACGTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

20

クローン1 タンパク質(配列番号2):

EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISDYGNNT  
 AYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNANYFDYWGQQGLTVVS  
 SGGGGSGGGSGGGSTDIQMTQSPSSLSAVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK  
 APKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQTSTYPGTFGQGTT  
 VEIK

30

クローン3 DNA(配列番号3):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAG  
 ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCG  
 CCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCATCTATTCTTATGGTTCTTAT  
 ACAGGTTACGCAGACTCCGTGAAGGCCGGTCAACCATCTCAGAGACAATTCAA  
 GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATT  
 ACTGTGCGAAAAATGGTTATGCTTTGACTACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCG  
 40 TCTCGAGCGGTGGAGGCAGGTTCAAGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTCGACG

40

【化2】

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCGCTTGCAAAGTGGG  
 GTCCCATCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGC  
 AGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAACAGAACATGATGCTCTCCT  
 AATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

10

クローン3 タンパク質(配列番号4):

EVQLLESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSYGSYTG  
 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNGYAFDYWGQGTLVTVSS  
 GGGGSGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA  
 PKLLIYGASALQSGVPSRFSGSGLDFTLTISLQPEDFATYYCQQNDASPNTFGQGTK  
 VEIK

20

クローン6 DNA(配列番号5):

GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAG  
 ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCG  
 CCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAACTATTCTACTTATGGTATTA  
 TACAACCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTCACCATCTCCAGAGACAATTCAA  
 GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATT  
 ACTGTGCGAAAGGTAGTTACTTGTACTGGGCCAGGAACCCCTGGTCACCG  
 TCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTCGACG  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTGCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCTATTGCAAAGTGGG  
 GTCCCATCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGC  
 AGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAACAGTCTAATGCTACTCCT  
 CTACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

30

40

クローン6 配列番号(配列番号6):

## 【化3】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISTYGYTT  
 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSYTFDYWGQGTLTVSSG  
 GGGSGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP  
 KLLIYSASYLQSGVPSRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSNATPSTFGQGKVEI  
 KVEIK

10

クローン10 DNA(配列番号7):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAG  
 ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCG  
 CCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGGTATTACTAATTATGGTTATAC  
 TACATATTACGCAACTCCGTGAAGGCCGGTCAACATCTCCAGAGACAATTCAA  
 GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATT  
 ACTGTGCGAAATCTTCTTATTCTTGTACTACTGGGCCAGGAACCTGGTCACCG  
 TCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTCGACG  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTGCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCGCTTGCAAAGTGGG  
 GTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGC  
 AGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAACAGTCTGCTTATTATCCTG  
 ATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

20

クローン10 タンパク質(配列番号8):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITNYGYTT  
 YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSYSFDYWGQGTLTVSS  
 GGGSGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA  
 PKLLIYAASALQSGVPSRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSAYYPDTFGQGK  
 VEIK

30

クローン13 DNA(配列番号9):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAG  
 ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCG

40

【化4】

CCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCATCTATTAAATTCTGCTGGTGGTTC  
 TACATATTACGAGACTCCGTGAAGGGCCGGTCAACATCTCCAGAGACAATTCAA  
 GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTATATT  
 ACTGTGCAGAAAATTCTGTTATTGACTACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCG  
 TCTCGAGCGGTGGAGGCAGGTCAAGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTGCACG  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTGCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCAATTGCAAAGTGG  
 GGTCCCATCAAGGTTCAAGGGTGGAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTACCACATCAG  
 CAGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAACAGACTGATACTTATCC  
 TACTACGTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

10

クローン13 タンパク質(配列番号10):

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINSAGGSTY  
 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNSAYFDYWQGQTLTVSS  
 GGGGSGGGSGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA  
 PKLLIYDASNLQSGVPSRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQTDYPTTFQGQTKV  
 EIK

20

クローン17 DNA(配列番号11):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAG  
 ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCG  
 CCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAAGTATTCTACTCTGGTAGTTA  
 TACAGCTTACGAGACTCCGTGAAGGGCCGGTCAACATCTCCAGAGACAATTCAA  
 GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTATATT  
 ACTGTGCAGAAAAGGTGGTTACTTTGACTACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCG  
 TCTCGAGCGGTGGAGGCAGGTCAAGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTGCACG  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTGCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTGCACTTGCAGAAAGTGGG  
 GTCCCATCAAGGTTCAAGGGTGGAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTACCACATCAGC

30

40

## 【化5】

AGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTGTGGTAATCCT  
ACTACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

クローン17 タンパク質(配列番号12):

EVQLLESGGLVQPGGLRLSCAASGFTESSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISTSGSYTA  
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGYTFDYWGQGTLTVSS  
GGGGSGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA  
PKLLIYSASTLQSGVPSRFSGSQTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSDGNPTTFGQGKVE  
EIK

10

クローン21 DNA(配列番号13):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCCTCTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGCAGCCTCTGGATTCCACCTTAGCAGCTATGCCATGACCGGGTC  
CCCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGCTCAGGTATTCGAATGGGGTAA  
GTAGACAATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTCACCATCTCCAGAGACAATT  
CAAGAACACGCTGTATCCTGAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGCCGTA  
TATTACTGTGCGAAACATAATGCGCATTGACTACTGGGCCAGGGAACCTGGTC  
ACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCAGGTCAGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTC  
GACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
AGTCACCATCACTGCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCA  
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACGCTCCTGATCTAAAGGCATCCAGGTGCAAA  
GTGGGGTCCCCTAACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCA  
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTGCATGG  
TGCCTCCGACGTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

20

30

クローン21 タンパク質(配列番号14):

EVQLLESGGLVQPGGLRLSCAASGFTESSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISYSGAYTA  
YADSVNGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGTDFDYWGQGTLTVSSG  
GGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP  
KLLIYGASNLLQSGVPSRFSGSQTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNYDPSTFGQGKVE  
IK

40

50

## 【0097】

発現ベクターを、上記7種のs c F v タンパク質の各々に関して構築した。その後、上記細胞溶解物を、ELISAのためにコーティングした。次いで、可溶性ELISAを、30および37の両方からの細胞溶解物を使用して行った。コントロールと比較したところ、全7個のクローンにおいて差異が容易に観察された。上記7個の陽性クローンの中で、クローン1、6および13は、他のものより遙かに強かった。

## 【0098】

量の決定を伴うE L I S Aを、上記7個の陽性クローニングから生成した可溶性s c F vに對して行って、それらがM O Gに結合する能力をランク付けした。上記7種のs c F vをp E T - 2 6 bにサブクローニングして、s c F v - m y c - 6 × H i s フォーマットとして構築した。16において誘導した上記7種のs c F vの純度は、> 85%であったのに対して、37で誘導した場合の純度は、より低かった。よって、16を、生成のためのより適切な条件であると決定した。Q C E L I S Aを行って、上記7種のs c F vの各々に關して標的M O Gへの結合能力を分析した。コントロールと比較したところ、上記7個の陽性クローニング（クローニング1、3、6、10、13、17、21）の各々において差異が容易に見出された。上記7個の陽性クローニングの中で、3個のクローニング（クローニング3、6および17）は、標的に対してより強い結合能力を示した。

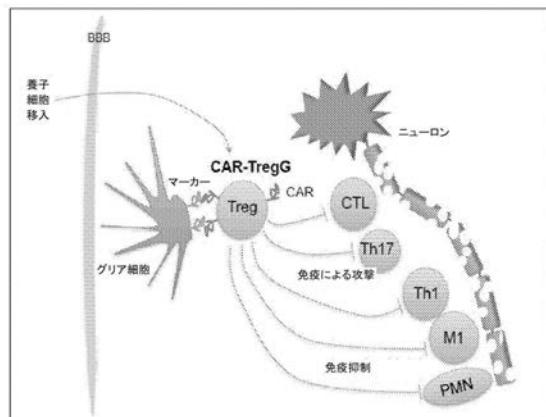
## 【0099】

16で誘導した上記7個のクローニングの各々に關するQ C E L I S Aによる量の決定を、行った。上記7個のクローニングの7種の異なる濃度を、E L I S Aによる量の決定のために使用した。結果は、7個全てのクローニングが、標的M O Gに特異的に結合し得ることを示した。上記7個のクローニングの中で、クローニング3、6および17は、上記標的に対してより強い結合親和性をなお示した。結果を、図8に示す。図8は、クローニング17の抗h M O G 1 s c F vが最強の結合を示し、続いて、クローニング6の結合、次いで、クローニング3の結合であったことを図示する。その残りの4個のクローニングは、クローニング17、6および3のものより有意に弱い結合を示した。

10

20

## 【図1】



## 【図2】

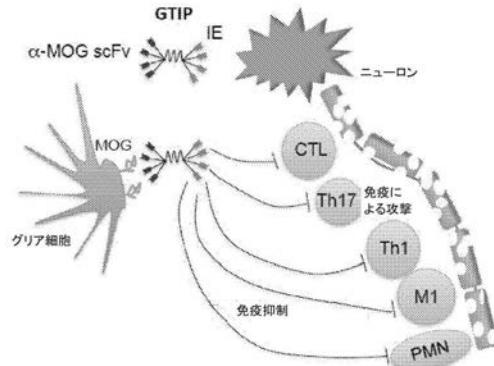


FIG. 2

FIG. 1

【図3】



【図5】

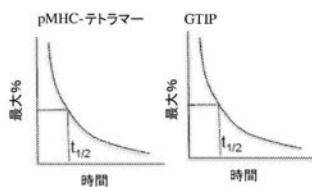


FIG. 5

FIG. 3

【図4】

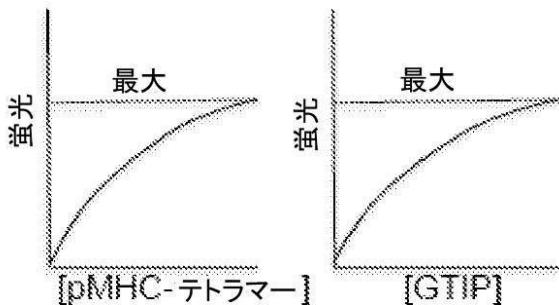
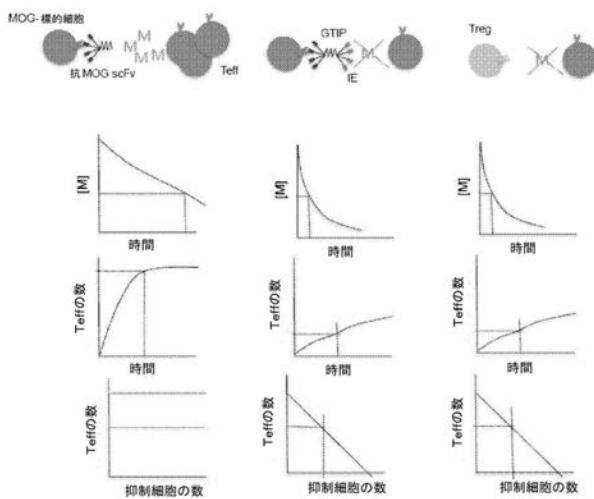


FIG. 4

【図6】



【図7】

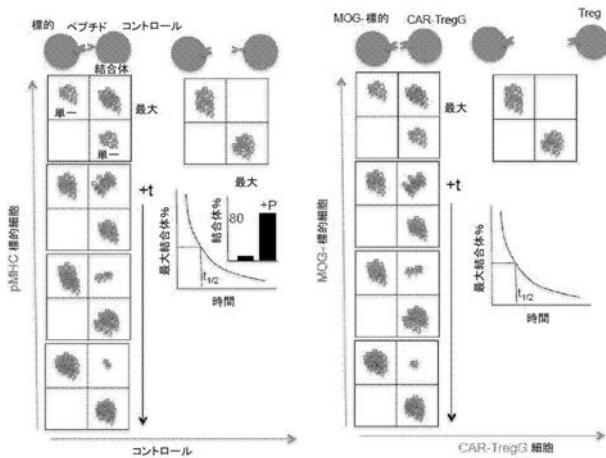


FIG. 6

FIG. 7

【図 8】

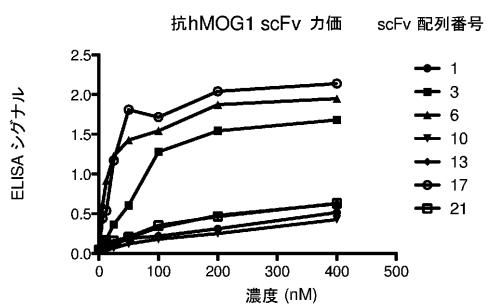


FIG. 8

## 【手続補正書】

【提出日】令和3年5月13日(2021.5.13)

## 【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】追加

【補正の内容】

【配列表】

2021531280000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 19/23395												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 35/17, A61K 38/17, A61K 39/395, A61K 9/00, A61P 1/16 (2019.01) CPC - C07K 2319/00, A61K 2039/505, A61P 37/06, A61K 38/177														
<b>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</b>														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> 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														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">WO 2017/100428 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 15 June 2017 (15.06.2017) para [0047]; para [0069]; para [0186]; para [0197]; para [0201]- [0202]</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">WO 2007/140971 A2 (F. HOFFMANN LA ROCHE AG) 13 December 2007 (13.12.2007) Abstract; page 3, in 24-34</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 2008/0027001 A1 (WOOD et al.) 31 January 2008 (31.01.2008) Abstract; para [0089]</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">6, 8</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	WO 2017/100428 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 15 June 2017 (15.06.2017) para [0047]; para [0069]; para [0186]; para [0197]; para [0201]- [0202]	1-8	Y	WO 2007/140971 A2 (F. HOFFMANN LA ROCHE AG) 13 December 2007 (13.12.2007) Abstract; page 3, in 24-34	1-8	Y	US 2008/0027001 A1 (WOOD et al.) 31 January 2008 (31.01.2008) Abstract; para [0089]	6, 8
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	WO 2017/100428 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 15 June 2017 (15.06.2017) para [0047]; para [0069]; para [0186]; para [0197]; para [0201]- [0202]	1-8												
Y	WO 2007/140971 A2 (F. HOFFMANN LA ROCHE AG) 13 December 2007 (13.12.2007) Abstract; page 3, in 24-34	1-8												
Y	US 2008/0027001 A1 (WOOD et al.) 31 January 2008 (31.01.2008) Abstract; para [0089]	6, 8												
<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 "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 17 July 2019		Date of mailing of the international search report <b>19 AUG 2019</b>												
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: <b>Lee W. Young</b> <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 19/23395
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>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:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.</p> <p>Group I, claims 1-8, directed to a method for treating a neurodegenerative disease in a subject.</p> <p>Group II, claims 9-15, directed to a composition comprising a plurality of engineered regulatory T cells (Tregs).</p> <p>Group III, claims 16-29, directed to an engineered protein comprising a glial cell-specific binding protein coupled to a molecule expressed by a Treg.</p>		
-----continued on supplemental sheet-----		
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>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.</p> <p>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.:</p> <p>4. <input checked="" 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. 1-8</p>		
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/23395

## Continuation of Box III: Observations where unity of invention is lacking:

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

## Special technical features:

Group I has the special technical feature of a treatment method comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of Tregs, that is not required by Group II or III.

Group II has the special technical feature of a composition comprising a plurality of engineered Tregs, that is not required by Group I or III.

Group III has the special technical feature of an engineered protein comprising a glial cell-specific binding protein coupled to a molecule expressed by a Treg, that is not required by Group I or II.

## Common technical features:

Groups I-III share the common technical feature of an engineered Tregs in a therapeutically effective amount to treat a neurodegenerative disease that is not multiple sclerosis, each of the plurality of engineered Tregs expressing a CAR that specifically binds to a glial cell marker. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is taught by WO 2017/100428 A1 to Memorial Sloan Kettering Cancer Center (hereinafter 'Sloan'), in view of WO 2007/140971 A2 to F. Hoffmann-La Roche Ag (hereinafter 'Roche').

Sloan discloses a method for treating a neurodegenerative disease in a subject (para [0069]- "methods for treating immune- mediated disorders. Such disorders include... Alzheimer's disease"; para [0047]), the method comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of regulatory T cells (Tregs), each expressing a chimeric antigen receptor (CAR) that specifically binds to a glial cell marker (para [0186]-[0187]- "expanding the isolated regulatory T cells in cell culture. In another particular embodiment, the immunoinhibitory cells express a CAR that binds to an autoimmune antigen of the autoimmune disorder. In yet another particular embodiment, the antigen which the immunoinhibitory cell recognizes and is sensitized to, or to which the CAR binds to, is selected from the group consisting of myelin, myelin basic protein, myelin oligodendrocyte glycoprotein"), thereby treating the neurodegenerative disease (para [0069]- "methods for treating immune- mediated disorders"; [0186] "method of treating an immune-mediated disorder"), but does not specifically teach that the neurodegenerative disease is not multiple sclerosis.

Roche discloses that subjects with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's have glial cells with increased expression of glial cell markers such as MOG and that these markers can be used as a biomarker for disease severity (Abstract- "assessing Alzheimer's Disease in vitro comprising measuring in a body fluid sample the level of one or more proteins of the group consisting of Myelin- associated glycoprotein precursor (MAG)... (MOG)"; page 3, In 24-34- "a relative increase of the MOG and/or Contactin-1 precursor level, or a variant thereof indicates that the disease becomes worse"). Since Roche teaches that glial cell markers are associated with neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art, to have combined the teachings of Sloan and Roche and used the method disclosed by Sloan for treating neurodegenerative diseases associated with increased glial cell markers including Alzheimer's.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-III inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical features.

## 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 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 9/06 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/06	Z
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
	C 0 7 K 16/18	

(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,R0,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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 アシュトン・リッカルト, フィリップ ジー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02467, チェスナット ヒル, フェアウェイ ロード 100

F ターム(参考) 4B050 CC07 CC10 DD11 LL01  
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 CA12 NA14 ZA02 ZA15 ZA16  
 ZB21 ZC41  
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74