

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-527044
(P2020-527044A)

(43) 公表日 令和2年9月3日(2020.9.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z 4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	4 C 0 8 7
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-501456 (P2020-501456)
 (86) (22) 出願日 平成30年7月12日 (2018.7.12)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年3月3日 (2020.3.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/068882
 (87) 国際公開番号 W02019/012024
 (87) 国際公開日 平成31年1月17日 (2019.1.17)
 (31) 優先権主張番号 17305939.5
 (32) 優先日 平成29年7月13日 (2017.7.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 507002516
 アンセルム (アンスティチュート・ナシオ
 ナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・
 ルシエルシュ・メディカル)
 フランス・75013・パリ・リュ・ドゥ
 ・トルビアク・101
 (71) 出願人 519134337
 ユニバーシテ デ ナンテス
 フランス国, 44000 ナンテス, 1
 クアイ デ トゥアヴィレ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD8+CD45RCLOW/-Treg 集団の拡大増殖および免疫抑制能力を高めるための方法

(57) 【要約】

高度に抑制性のヒト CD8⁺CD45RC^{low} / - Treg の新しい集団を特定した。この集団は Foxp3 を発現し、かつ IFN γ 、IL-10、IL-34 および TGF β を産生してそれらの抑制活性を媒介することを特徴とする。従って、そのような CD8⁺CD45RC^{low} / - Treg 集団の拡大増殖および免疫抑制能力を高めることができる方法は治療目的のために非常に望ましい。本発明者らは、ラパマイシンが CD8⁺CD45RC^{low} / - Treg 集団の拡大増殖および免疫抑制能力を高めることを証明した。従って、本発明は、ラパマイシン化合物の存在下で CD8⁺CD45RC^{low} / - Treg 集団を培養することを含む、CD8⁺CD45RC^{low} / - Treg 集団の拡大増殖および免疫抑制能力を高める方法に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラパマイシン化合物の存在下で $CD8^+CD45RC1^{low/-}Treg$ 集団を培養することを含む、 $CD8^+CD45RC1^{low/-}Treg$ 集団の拡大増殖および免疫抑制能力を高める方法。

【請求項 2】

前記 $CD8^+CD45RC1^{low/-}Treg$ 細胞集団は、目的の抗原に特異的なキメラ抗原受容体 (CAR) または自己抗原を含むキメラ自己抗体受容体 (CAAR) などの T 細胞受容体またはそのサブユニットもしくは機能的等価物をコードするように遺伝子改変されている、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記 $CD8^+CD45RC1^{low/-}Treg$ 細胞集団は遺伝子改変されており、かつ機能的 T 細胞受容体 (TCR) および / またはヒト白血球抗原 (HLA)、例えば、HLA クラス I および / または HLA クラス II の発現を欠いている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 $CD8^+CD45RC1^{low/-}Treg$ 細胞集団は治療される前記レシピエント患者の同種異系の Treg である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 $CD8^+CD45RC1^{low/-}Treg$ 細胞集団を抗原提示細胞の存在下で培養する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記ラパマイシン化合物を前記拡大増殖の 0 および 7 日目または 14 日後に培養培地に添加する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ラパマイシン化合物を前記拡大増殖の 0 および 7 日目に培養培地に添加し、メチルプレドニソロンなどの別の免疫抑制剤を培養培地に添加する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記培養培地は約 45 ng/ml の量のラパマイシンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

サイトカイン、好ましくは IL-2 および / または IL-15 を、例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 および / または 20 日目に 1 回、2 回、3 回またはそれ以上の回数で前記培養培地にさらに添加する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 10】

抗 CD3 抗体および / または抗 CD8 抗体を培養の 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 および / または 20 日目、好ましくは 0 日目および / または 11、12、13、14 および / または 15 日目に前記培養培地に添加する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記培養を、例えば 12 日間から最大 6 ~ 8 週間の間などの少なくとも 12 日間、好ましくは 14 日間行う、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 12】

それを必要とする患者における移植片拒絶反応または GVHD を予防または減少させる方法であって、ラパマイシン化合物と組み合わせた治療的有効量の $CD8^+CD45RC1^{low/-}Treg$ 集団を前記患者に投与することを含む方法。

【請求項 13】

それを必要とする患者における遺伝性疾患を治療する方法であって、前記患者にラパマイシン化合物と組み合わせた治療的有効量の $CD8^+CD45RC1^{low/-}Treg$ 集団を投与することを含み、前記遺伝性疾患は、IPEX (免疫調節異常・多腺性内分泌障

50

害・腸疾患・X連鎖症候群)およびA P E C E D (自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー)、B細胞原発性免疫不全症、マックル・ウェルズ症候群、混合型自己炎症性/自己免疫症候群、NLRP12関連遺伝性周期性発熱症候群、腫瘍壊死因子受容体1関連周期性症候群)などの自己免疫に関連する免疫系を冒す一遺伝子性遺伝性疾患、ならびにデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、嚢胞性線維症、リソソーム病および1-アンチトリプシン欠乏症などの一遺伝子性遺伝性疾患からなる群から選択される方法。

【請求項14】

シクロスポリンとメチルプレドニソロンとの組み合わせの存在下で前記CD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Treg集団を培養することを含む、CD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Treg集団の免疫抑制能力を高める方法。

10

【請求項15】

シクロスポリンとメチルプレドニソロンとの組み合わせと組み合わせたCD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Treg集団の治療的に有効な組み合わせを投与することを含む、移植片拒絶反応またはGVHDを予防または減少させる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Treg集団の拡大増殖および免疫抑制能力を高めるための方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

免疫抑制療法は、ここ数十年の間に長期間の移植片生着を著しく向上させてきたが、未だに同種移植片を慢性の移植片機能不全から予防することができず、移植を受けた患者の福祉の大きな障害のままとっている。故にここ数年間は、同種移植片生着の向上は、主に慢性移植片拒絶、二次的影響および非特異的免疫抑制が原因で停滞している¹。高い抑制能力およびドナー抗原に対する特異性により移植における免疫応答を積極的に制御する制御性細胞集団のヒトにおける同定により、Treg/エフェクターT細胞(Teff)の調節解除を伴う多くの疾患における革命的な治療戦略が生まれた。最近登場した制御性細胞による細胞治療の確立により、自己免疫ならびに骨髄および実質臓器移植における有望な将来の治療法が得られる²⁻⁴。いくつかの研究から、抗CD3-抗CD28によりポリクローナル刺激されたTregと比べて、生存、抑制機能の刺激およびそのような抗原を経験したTregの優位性のためにTCRによる抗原認識の重要性が実証されている⁵⁻⁸。GVHDおよび実質臓器移植における第I相研究は、見かけ上の毒性を有しない異なる種類の制御性細胞(異なるCD4⁺Treg、マクロファージおよびDC)を用いて開始したが、これまでに、動物モデルにおける豊富な文献にも関わらずCD8⁺Tregを用いた臨床試験は存在していない⁹⁻¹¹。ヒトにおけるCD8⁺Tregの翻訳のための1つの限界は、免疫応答を効率的に制限するためのCD4⁺Tregの機能における重要遺伝子であるFoxp3^{12,13}がCD8⁺Tregおよびその発現について他の表面マーカーまたはサイトカインに従って明確に定義されておらず、かつヒトにおけるCD8⁺Tregの機能が明らかに実証されていないという点であるかもしれない^{10,14-16}。最近では、高度に抑制性のヒトのCD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Tregの新しい集団が同定された(国際公開第2017/042170号)。この集団はFoxp3を発現し、かつIFN、IL-10、IL-34およびTGFを産生してそれらの抑制活性を媒介するものとして特徴づけられている。従って、そのようなCD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Treg集団の拡大増殖および免疫抑制能力を高めることができる方法は治療目的のために非常に望ましい。

30

40

【発明の概要】

【0003】

本発明は、CD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Treg集団の拡大増殖および免疫抑制能

50

力を高めるための方法に関する。特に本発明は特許請求の範囲によって定められている。

【発明を実施するための形態】

【0004】

本発明者らは、 $CD8^+CD45RC^{low/-}Treg$ がラパマイシンの存在下でより効率的に拡大増殖できることを証明した。さらにラパマイシンは当該集団の免疫抑制能力を高める。

【0005】

従って、本発明の第1の目的は、ラパマイシン化合物の存在下で $CD8^+CD45RC^{low/-}Treg$ 集団を培養することを含む、 $CD8^+CD45RC^{low/-}Treg$ 集団の拡大増殖および免疫抑制能力を高める方法に関する。

10

【0006】

本明細書で使用される「制御性T細胞」または「Treg」という用語は、免疫系を調節し、自己抗原への寛容性を維持し、かつ自己免疫疾患を抑止するT細胞の亜集団を指す。これらの細胞は一般にエフェクターT細胞の誘導および増殖を抑制または下方制御する。

【0007】

本明細書で使用される「集団」という用語は、細胞の総数の過半数（例えば、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは少なくとも約80%）が目的の細胞の指定された特性を有し、かつ目的のマーカーを有する（例えば、ヒト $CD8^+CD45RC^{low/-}Treg$ 細胞集団は高度な抑制機能を有し、かつ目的の特定のマーカーを発現する細胞の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは少なくとも約80%を含む）細胞集団を指す。

20

【0008】

本明細書で使用される当該技術分野で周知の「CD8」（分化抗原群8）という用語は、T細胞受容体（TCR）の共受容体として機能する膜貫通糖タンパク質を指す。機能するために、CD8は一对のCD8鎖からなる二量体を形成する。T細胞におけるCD8の最も一般的な形態は $CD8\alpha\beta$ および $CD8\alpha\zeta$ 鎖からなり、 $CD8^+CD45RC^{low/-}Treg$ 細胞は両方の鎖を発現する。天然に生じるヒト $CD8\alpha\beta$ タンパク質は、受入番号P01732でUniProtデータベースにおいて提供されているアミノ酸配列を有する。天然に生じるヒト $CD8\alpha\zeta$ タンパク質は、受入番号P10966でUniProtデータベースにおいて提供されているアミノ酸配列を有する。

30

【0009】

本明細書で使用される「CD45」（LCAまたはPTPRCとしても知られている）という用語は、「Streuliら, 1996」において以前に記載された異なるアイソフォームで存在する膜貫通糖タンパク質を指す。CD45のこれらの異なるアイソフォームは、CD45細胞外領域の一部をコードする3つの可変エクソンの選択的スプライシングにより生じるそれらの細胞外ドメイン構造において異なる。CD45の各種アイソフォームは異なる細胞外ドメインを有するが、およそ300個のアミノ酸残基の2つの相同な高度に保存されたホスファターゼドメインを有する同じ膜貫通および細胞質セグメントを有する。天然に生じるヒトCD45タンパク質は受入番号P08575でUniProtデータベースにおいて提供されているアミノ酸配列を有する。本明細書で使用される「CD45RC」という用語はチロシンホスファターゼCD45のエクソン6スプライスバリエント（エクソンC）を指す。CD45RCアイソフォームはB細胞上ならびに $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞のサブセット上で発現される。本明細書で使用される「low/-」という用語は、表面マーカーの発現レベルを定量化するための細胞数測定における当業者の一般的な用語であり、表面マーカーが中レベルで発現されていること、または存在しないことを示す。

40

【0010】

いくつかの実施形態では、 $CD8^+CD45RC^{low/-}Treg$ 細胞集団は、以下

50

でさらに説明されているように、所望の発現産物をコードするように遺伝子改変されている。

【0011】

「遺伝子改変されている」という用語は、細胞が $CD8^+ CD45RC^{1.0w} / - Treg$ 細胞の非組み換え集団に天然に存在しない核酸分子、または前記 $CD8^+ CD45RC^{1.0w} / - Treg$ 細胞集団に非天然状態で存在する核酸分子（例えば増幅されている）を含むことを示す。当該核酸分子は前記細胞またはその祖先の中に導入されていてもよい。

【0012】

ウイルス媒介遺伝子送達、非ウイルス媒介遺伝子送達、裸のDNA、物理的処理などの多くの手法を使用して、細胞集団を遺伝子改変することができる。この目的のために、核酸は通常、組み換えウイルス、プラスミド、ファージ、エピソーム、人工染色体などのベクターに組み込まれる。遺伝子を運ぶ核酸を細胞に導入することができる手段の例としては、限定されるものではないが、マイクロインジェクション、電気穿孔法、形質導入、またはDEAE-デキストラン、リポフェクション、リン酸カルシウムを用いる形質移入あるいは当業者に公知の他の手順が挙げられる。

【0013】

いくつかの実施形態では、 $CD8^+ CD45RC^{1.0w} / - Treg$ 細胞集団は、ウイルスベクター（もしくは組み換えウイルス）またはウイルス様粒子（VLP）などのベクター粒子を用いて遺伝子改変されている。本実施形態では、異種核酸を例えば組み換えウイルスの中に導入し、次いでこれを使用して $CD8^+ CD45RC^{1.0w} / - Treg$ 細胞集団を感染させる。異なる種類の組み換えウイルス、特に組み換えレトロウイルスを使用することができる。レトロウイルス感染により細胞のゲノムの中への安定な組み込みが生じるので、レトロウイルスは好ましいベクターである。これは、リンパ球の拡大増殖が対象への注射後にインビトロまたはインビボのいずれかにおいて各細胞分裂での情報伝達のために導入遺伝子が分離中に安定に維持されることを必要とするため、重要な性質である。使用することができるレトロウイルスの種類は、腫瘍ウイルス、レンチウイルスまたはスプーマウイルスファミリーのレトロウイルスである。腫瘍ウイルスファミリーの特定の例は、MoMLV、ALV、BLVまたはMMTVなどの遅発性腫瘍ウイルス、すなわち非癌遺伝子担体、およびRSVなどの早発性腫瘍ウイルスである。レンチウイルスファミリーの例は、HIV、SIV、FIVまたはCAEVである。欠損性組み換えレトロウイルスを構築するための技術は、文献（国際公開第89/07150号、国際公開第90/02806号および国際公開第94/19478号）に広く記載されている。これらの技術は通常、導入遺伝子を含むレトロウイルスベクターの適当なパッケージング細胞株への導入、およびその後の産生されたウイルスの回収を含み、前記ウイルスはそれらのゲノムに当該導入遺伝子を含む。 $CD8^+ CD45RC^{1.0w} / - Treg$ 細胞集団は、ウイルス上澄みまたは精製したウイルスとのインキュベーションによって、あるいは当該ウイルスのパッケージング細胞と共に前記Treg細胞を共培養することによって、あるいはTranswell技術などによって、各種プロトコルを用いて組み換えウイルスで感染させることができる。本明細書で使用される「ウイルス様粒子」（VLP）という用語は、ウイルス粒子に似た構造を指す。本発明に係るウイルス様粒子は、ウイルスゲノムの全てまたは一部を欠いており、典型的に、かつ好ましくはウイルスゲノムの複製および感染成分の全てまたは一部を欠いているため非複製的である。本明細書で使用される「非複製的」という用語は、VLPの中に含まれているか含まれていないゲノムを複製することができないことを指す。VLPは当該技術分野で知られている技術に従って、例えば国際公開第02/34893号として公表されている国際特許出願に記載されているように調製することができる。

【0014】

$CD8^+ CD45RC^{1.0w} / - Treg$ 細胞集団を遺伝子改変するために使用される核酸は、ポリペプチド（例えば、タンパク質、ペプチドなど）やRNAなどの各種生物学

10

20

30

40

50

的に活性な産物をコードしてもよい。特定の実施形態では、当該核酸は免疫抑制活性を有するポリペプチドをコードする。別の実施形態では、当該核酸は細胞に有害であるか条件付きで有害であるポリペプチドをコードする。好ましい例としては、HSV-1 TKなどのチミジンキナーゼやシトシンデアミナーゼなど（ヌクレオシド類似体の存在下で毒性を付与する）が挙げられる。

【0015】

別の好ましいカテゴリの核酸は、目的の抗原に特異的なキメラ抗原受容体（CAR）または自己抗原を含むキメラ自己抗体受容体（CAAR）などのT細胞受容体またはそのサブユニットもしくは機能的等価物をコードするものである。例えば、抗原に特異的な組み合わせTCRまたはCARの発現により、それを必要とする患者における免疫応答を阻害するためのエフェクターT細胞に対してより特異的かつ効率的に作用することができるヒトCD8⁺CD45RC^{low}/Treg細胞が生成される。キメラ抗原受容体（CAR）設計の基本原則は広範囲に記載されている（例えば「Sadelainら、2013」）。CARは、一般にスペーサ/ヒンジおよび膜貫通ドメインを介して細胞内シグナル伝達ドメインに連結された細胞外抗原認識部分を含む。「第1世代」CARの細胞内シグナル伝達ドメインはT細胞活性化部分のみを含む。「第2世代」CARの細胞内ドメインは、活性化部分、例えばCD3と直列の共刺激部分を含む。共刺激ドメインの例としては、限定されるものではないが、ICOS、OX40（CD134）、CD28、4-1BB（CD137）、CD27およびDAP10が挙げられる。「第3世代」CARの細胞内ドメインは、CD28、腫瘍壊死因子受容体（TNF α ）（OX40もしくは4-1BBなど）とCD3との組み合わせなどの、活性化部分と直列の2つの共刺激ドメインを含む。CARは一般に、細胞外抗原結合ドメインを、生存および増殖シグナルをサポートするための共刺激内部ドメインと直列のT細胞受容体のCD3-鎖に由来する細胞内シグナル伝達ドメインと融合させることによって得られる。CARで修飾されたT細胞は患者のMHCとは独立して機能し、かつ臨床用途のために容易に産生させることができるので、CARをベースとする手法を用いて以下に記載するように病原性抗原を標的にすることは有用である。CAARは、細胞内シグナル伝達ドメインに融合された自己免疫疾患に関連する自己抗原などの細胞外自己抗原を含む。CAARの細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、限定されるものではないが、CD137CD3シグナル伝達ドメインなどのTもしくはNK受容体シグナル伝達ドメインが挙げられる。

10

20

30

【0016】

いくつかの実施形態では、本発明のCD8⁺CD45RC^{low}/Treg細胞は遺伝子改変されており、細胞内シグナル伝達分子に連結された少なくとも1種のCAR、1種のCAARおよび/または1種の天然受容体を発現する。CARの例としては、限定されるものではないが、第1世代CAR、第2世代CAR、第3世代CAR、4つ以上のシグナル伝達ドメイン（共刺激ドメインおよび活性化ドメイン）を含むCAR、および阻害性CAR（iCAR）が挙げられる。

【0017】

本発明によれば、目的の抗原を認識するCARの細胞外ドメインは、抗体またはその抗原結合断片などの前記抗原に結合する受容体または受容体の断片を含んでもよい。本発明によれば、CARの細胞外ドメインは、ヒト抗体またはあらゆる他の生物種に由来する抗体を含んでもよい。本明細書で使用される「抗体断片」という用語は、抗原のエピトープと特異的に相互作用する能力を保持する抗体の少なくとも1つの部分を指す。抗体断片の例としては、限定されるものではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィドによって連結されたFv(sdFv)、VHおよびCHIドメインからなるFd断片、直鎖状抗体(linear antibody)、sdAb(VLもしくはVHのいずれか)などの単ドメイン抗体、ラクダ科VHHドメイン、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片からなる二価の断片などの抗体断片から形成された多特異的抗体、および抗体の単離されたCDRまたは他のエピトープ結合断片が挙げられる。

40

50

【0018】

いくつかの実施形態では、本発明のCD8⁺CD45RC^{low}/Treg細胞は遺伝子改変されており、機能的T細胞受容体(TCR)および/またはヒト白血球抗原(HLA)、例えば、HLAクラスIおよび/またはHLAクラスIIの発現を欠いている。いくつかの実施形態では、機能的TCRおよび/またはHLAを欠いている本発明の遺伝子改変されたCD8⁺CD45RC^{low}/Treg細胞は同種異系のTregである。

【0019】

本明細書で使用される「ラパマイシン化合物」という用語は、米国特許出願公開第2003/0008923号(これは参照により本明細書に組み込まれる)に定められているラパマイシンコア構造を有する化合物を含み、これは化学的または生物学的に修飾されていてもよいがmTOR阻害特性をまだ保持している。いくつかの実施形態では、ラパマイシン化合物はラパマイシンである。その誘導体としては、ラパマイシンのエステル、エーテル、オキシム、ヒドラゾンおよびヒドロキシルアミン、ならびにラパマイシンコア構造上の官能基が例えば還元または酸化によって修飾されている化合物が挙げられる。そのような化合物の薬学的に許容される塩もラパマイシン誘導体であるとみなされる。ラパマイシンのエステルおよびエーテルの具体例は、ラパマイシン核の42および/または31位にあるヒドロキシル基のエステルおよびエーテル、ならびに(27位のケトンの化学的還元後に)27位にあるヒドロキシル基のエステルおよびエーテルである。オキシム、ヒドラゾンおよびヒドロキシルアミンの具体例は(42位のヒドロキシル基の酸化後に)42位にあるケトンおよびラパマイシン核の27位のケトンのオキシム、ヒドラゾンおよびヒドロキシルアミンである。ラパマイシンの42位および/または31位のエステルおよびエーテルの例は、以下の特許：アルキルエステル(米国特許第4,316,885号)、アミノアルキルエステル(米国特許第4,650,803号)、フッ素化エステル(米国特許第5,100,883号)、アミドエステル(米国特許第5,118,677号)、カルバミン酸エステル(米国特許第5,118,678号)、シリルエーテル(米国特許第5,120,842号)、アミノエステル(米国特許第5,130,307号)、アセタール(米国特許第551,413号)、アミノジエステル(米国特許第5,162,333号)、スルホン酸および硫酸エステル(米国特許第5,177,203号)、エステル(米国特許第5,221,670号)、アルコキシエステル(米国特許第5,233,036号)、O-アリール、O-アルキル、O-アルケニルおよびO-アルキニルエーテル(米国特許第5,258,389号)、炭酸エステル(米国特許第5,260,300号)、アリールカルボニルおよびアルコキシカルボニルカルバメート(米国特許第5,262,423号)、カルバメート(米国特許第5,302,584号)、ヒドロキシエステル(米国特許第5,362,718号)、ヒンダードエステル(米国特許第5,385,908号)、複素環式エステル(米国特許第5,385,909号)、ジェム二置換エステル(米国特許第5,385,910号)、アミノアルカン酸エステル(米国特許第5,389,639号)、ホスホリルカルバミン酸エステル(米国特許第5,391,730号)、カルバミン酸エステル(米国特許第5,411,967号)、カルバミン酸エステル(米国特許第5,434,260号)、アミジノカルバミン酸エステル(米国特許第5,463,048号)、カルバミン酸エステル(米国特許第5,480,988号)、カルバミン酸エステル(米国特許第5,480,989号)、カルバミン酸エステル(米国特許第5,489,680号)、ヒンダードN-オキシドエステル(米国特許第5,491,231号)、ピオチンエステル(米国特許第5,504,091号)、O-アルキルエーテル(米国特許第5,665,772号)、およびラパマイシンのPEGエステル(米国特許第5,780,462号)に開示されており、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。ラパマイシンの27-エステルおよびエーテルの例は米国特許第5,256,790号に開示されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。ラパマイシンのオキシム、ヒドラゾンおよびヒドロキシルアミンの例は米国特許第5,373,014号、第5,378,836号、第5,023,264号および第5,563,

10

20

30

40

50

145号に開示されており、それらは参照により本明細書に組み込まれる。これらのオキシム、ヒドラゾンおよびヒドロキシルアミンの調製は上に列挙されている特許に開示されている。42 - オキサラマイシンの調製は米国特許第5,023,263号に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。「ラパマイシン類似体またはその誘導体」の範囲内の他の化合物としては、例えば国際公開第98/02441号および本明細書において引用されている参考文献において「ラパログ (rapalog)」と称されている化合物および化合物クラス、ならびに例えば国際公開第01/14387号および本明細書において引用されている参考文献において「エピラパログ (epirapalog)」と称されている化合物および化合物クラスが挙げられる。「ラパマイシン誘導体」の範囲内の別の化合物は、ストレプトミセス・ヒグロスコピクス (Novartis社) によって製造されているマクロライド抗生物質に由来するエベロリムスすなわち4-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンである。エベロリムスはサーティカン (Certican)、RAD-001およびSDZ-RADとしても知られている。

【0020】

いくつかの実施形態では、CD8⁺CD45RC^{low} / - Treg細胞集団を抗原提示細胞 (APC) の存在下で培養する。本明細書で使用される「抗原提示細胞」または「APC」という用語は、好ましくはクラスI MHC分子と会合した1つ以上の抗原の提示を誘導することができるインタクトな細胞全体および他の分子 (同種異系由来の全て) と、同種異系の免疫応答を誘導することができる全ての種類の単核細胞との両方を含む。好ましくは生存細胞全体をAPCとして使用する。好適なAPCの例は以下に詳細に考察されており、限定されるものではないが、単球、マクロファージ、樹状細胞、単球由来樹状細胞、マクロファージ由来樹状細胞、B細胞および骨髓性白血病細胞、例えばTHP-1、U937、HL-60またはCEM-CM3細胞株などの細胞全体が挙げられる。

【0021】

典型的には、CD8⁺CD45RC^{low} / - Treg細胞集団は適当な培養培地で培養する。本明細書で使用される「培地」という用語は、細胞生存度を維持し、かつ増殖を支持する栄養分を含む細胞集団を維持するための培地または細胞集団を培養するための培地 (例えば「培養培地」) を指す。当該培地は、塩、緩衝液、アミノ酸、グルコースまたは他の糖 (類)、抗生物質、血清もしくは血清代替物、および増殖因子やサイトカインなどの他の成分のいずれかを適当な組み合わせで含有していてもよい。特定の細胞型のために通常使用される培地は当業者に公知である。本発明の培地は、Invitrogen社製のRPMI 1640などの市販されている培地をベースにしている。

【0022】

いくつかの実施形態では、ラパマイシン化合物を拡大増殖の0および7日目または14日後に培養培地に添加する。いくつかの実施形態では、ラパマイシン化合物を拡大増殖の0および7日目に培養培地に添加し、かつメチルプレドニソロンなどの別の免疫抑制剤を培養培地に添加する。

【0023】

いくつかの実施形態では、当該培養培地は約45 ng/mlの量のラパマイシンを含む。本明細書で使用される「約」という用語は、パラメータ、量および持続時間などの測定可能な値を指す場合、そのような変動が開示されている発明において実施するのに適当である限り、指定された値からの±20%以下、好ましくは±15%以下、より好ましくは±10%以下、さらにより好ましくは±5%以下の変動を包含することが意図されている。当然のことながら、修飾語句「約」が指している値それ自体も具体的かつ好ましくは開示されている。いくつかの実施形態では、当該培養培地は、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54または55 ng/mlの量のラパマイシンを含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、サイトカイン、好ましくはIL-2および/またはIL-15を培養の0日目に当該培養培地に添加する。いくつかの実施形態では、サイトカイン、

好ましくはIL - 2および/またはIL - 15を例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19および/または20日目に1回、2回、3回またはそれ以上の回数で当該培養培地にさらに添加する。いくつかの実施形態では、サイトカイン、好ましくはIL - 2および/またはIL - 15を培養の0日目および5、6、7または8日目に当該培養培地に添加する。いくつかの実施形態では、サイトカイン、好ましくはIL - 2および/またはIL - 15を0日目および培養の終了まで2、3または4日ごとに当該培養培地に添加する。

【0025】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、抗CD3抗体および/または抗CD28抗体を培養の0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19および/または20日目、好ましくは0日目および/または11、12、13、14および/または15日目に当該培養培地に添加する。いくつかの実施形態では、0.1~10 μ g/ml、好ましくは0.25~4 μ g/ml、より好ましくは1 μ g/mlの抗CD3抗体および/または0.1~10 μ g/ml、好ましくは0.25~4 μ g/ml、より好ましくは1 μ g/mlの抗CD28抗体を当該培養培地に添加する。

10

【0026】

典型的には、培養は例えば12日間から最大6~8週間の間などの少なくとも12日間、好ましくは14日間行う。

【0027】

本発明の方法は、移植片拒絶反応またはGVHDを予防または減少させるための養子T細胞移入に特に有用である。

20

【0028】

本明細書で使用される「移植片拒絶反応を予防または減少させる」という用語は、免疫移植片拒絶反応の予防または阻害、ならびに免疫移植片拒絶反応の発生または進行を遅らせることを包含することが意図されている。この用語は、患者における移植片の生着を引き延ばすこと、または患者における移植片の不全を回復させることも包含することが意図されている。さらにこの用語は、例えば間質性線維症、慢性移植片動脈硬化症または脈管炎などの免疫拒絶に付随する免疫学的合併症を例えば寛解させるなどの、免疫移植片拒絶反応の症状を寛解させることを包含することが意図されている。本明細書で使用される「移植片拒絶反応」という用語は、急性および慢性移植片拒絶反応の両方を包含する。「急性拒絶反応」は、移植された組織が免疫学的に異質である場合の組織移植レシピエントの免疫系による拒絶反応である。急性拒絶反応は、それらのエフェクター機能を行い、かつ移植片組織を破壊するレシピエントの免疫細胞による移植片組織の浸潤を特徴とする。急性拒絶反応の発生は急であり、かつ一般に移植手術後数週間以内にヒトにおいて生じる。一般に、急性拒絶反応はラパマイシンおよびシクロスポリンなどの免疫抑制剤で阻害または抑制することができる。「慢性拒絶反応」は一般に、急性拒絶反応の免疫抑制が上手く行っている場合であっても生着後数ヶ月から数年以内にヒトにおいて生じる。線維症は全ての種類の臓器移植の慢性拒絶反応における共通因子である。「移植」という用語およびその変形は、移植が同系であるか(ドナーおよびレシピエントが遺伝的に同一である)、同種異系であるか(ドナーおよびレシピエントが異なる遺伝的起源を有するが同じ生物種である)、または異種である(ドナーおよびレシピエントが異なる生物種からのものである)かに関わらず、レシピエントへの移植片(グラフトともいう)の挿入を指す。従って典型的なシナリオでは、宿主はヒトであり、かつ移植片は、同じもしくは異なる遺伝的起源のヒト由来の同系移植片である。別のシナリオでは、移植片は、系統的に遠く離れている生物種の動物などのそれが移植される生物種とは異なる生物種に由来し、例えば、ヒト心臓がヒト宿主に移植される。いくつかの実施形態では、移植片のドナーはヒトである。移植片のドナーは生きていたドナーまたは死亡したドナー、すなわち死体ドナーであってもよい。いくつかの実施形態では、移植片は臓器、組織または細胞である。本明細書で使用される「臓器」という用語は、生物の体内で特定の機能または機能群を行う血管付き

30

40

50

実質臓器を指す。臓器という用語は、限定されるものではないが、心臓、肺、腎臓、肝臓、膵臓、皮膚、子宮、骨、軟骨、小腸もしくは大腸、膀胱、脳、乳房、血管、食道、卵管、胆嚢、卵巣、膵臓、前立腺、胎盤、脊髄、上肢および下肢を含む肢、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿管、尿道、子宮を含む。本明細書で使用される「組織」という用語は、ヒトまたは動物における任意の種類組織を指し、限定されるものではないが、血管組織、皮膚組織、肝臓組織、膵臓組織、神経組織、泌尿生殖器組織、胃腸組織、骨および軟骨を含む骨格組織、脂肪組織、腱および靭帯を含む結合組織、羊膜組織、絨毛膜組織、硬膜、心膜、筋肉組織、腺組織、顔組織、眼組織を含む。本発明の特定の実施形態では、移植片は心臓同種移植片である。本明細書で使用される「細胞」という用語は、目的の細胞を多くに含む組成物、好ましくは前記細胞の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも65%を含む組成物を指す。いくつかの実施形態では、細胞は、骨髄、末梢血または臍帯血に由来する多分化能性造血幹細胞、あるいは心筋細胞、膵臓細胞、肝細胞、神経細胞などの異なる細胞株の多能性（すなわち、胚性幹細胞（ES）または人工多能性幹細胞（iPS））または多分化能性幹細胞由来分化細胞からなる群から選択される。

10

【0029】

いくつかの実施形態では、細胞組成物は、同種異系の造血幹細胞移植（HSCT）のために使用され、従って、通常は骨髄、末梢血または臍帯血に由来する多分化能性造血幹細胞を含む。HSCTは白血病およびリンパ腫を有する患者には治療的であり得る。但し、同種異系のHSCTの重要な限界は、この治療法を受けたヒトの約30~50%において深刻な形態で生じる移植片対宿主病（GVHD）の発生である。従って本発明の方法によって調製されるTreg細胞集団は、特に移植片対宿主疾患（GVHD）を予防または減少させるのに適している。従っていくつかの実施形態では、それを必要とする患者は、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、骨髄異形成症候群（MDS）/骨髄増殖性症候群、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫などのリンパ腫、慢性リンパ性白血病（CLL）および多発性骨髄腫からなる群から選択される疾患に罹患している。

20

【0030】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞組成物は、免疫系の活性化が関与し、かつ免疫応答の阻害が有益である遺伝性疾患の治療に特に適している。前記疾患の例としては、限定されるものではないが、IPEX（免疫調節異常・多腺性内分泌障害・腸疾患・X連鎖症候群）およびAPECED（自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー）、B細胞原発性免疫不全症、マックル・ウェルズ症候群、混合型自己炎症性/自己免疫症候群、NLRP12関連遺伝性周期性発熱症候群、腫瘍壊死因子受容体1関連周期性症候群）などの自己免疫に関連する免疫系を冒す一遺伝子性遺伝性疾患、ならびにデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）、嚢胞性線維症、リソソーム病および1-アンチトリプシン欠乏症などの一遺伝子性遺伝性疾患が挙げられる。

30

【0031】

本発明のさらなる目的は、ラパマイシン化合物と組み合わせた $CD8^+CD45RC^{10}W^-$ Treg集団の治療的に有効な組み合わせを投与することを含む、移植片拒絶反応またはGVHDを予防または減少させる方法に関する。

40

【0032】

本発明のさらなる目的は、それを必要とする患者における遺伝性疾患（上に記載されている）を治療する方法であって、ラパマイシン化合物と組み合わせた $CD8^+CD45RC^{10}W^-$ Treg集団の治療的に有効な組み合わせを投与することを含む方法に関する。

【0033】

本明細書で使用される「治療的に有効な組み合わせ」という用語は、移植片拒絶反応またはGVHDを予防または減少させるのに十分なラパマイシン化合物の量と一緒にしたTreg集団の量を指す。「治療的有効量」は、「向上した治療結果」が生じるような当業

50

者によって日常的に用いられる手順を用いて決定される。但し当然のことながら、本発明の化合物および組成物の総1日使用量は正しい医学的判断の範囲内で担当医によって決定される。任意の特定の対象のための具体的な治療の有効用量レベルは、治療されている疾患および当該疾患の重症度、用いられる具体的な化合物の活性、用いられる具体的な組成物、対象の年齢、体重、健康状態、性別および食事、用いられる具体的なタンパク質の投与時間、投与経路および排泄率、治療の持続期間、用いられる具体的なポリペプチドと組み合わせ使用されるか同時に使用される薬物、および医療分野で周知の同様の因子などの様々な因子によって決まる。例えば、所望の治療効果を達成するのに必要なレベルよりも少ないレベルで本化合物の投与を開始して所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増加させることは十分に当業者の範囲内である。但し、当該製品の1日投与量は成人1日

10

【0034】

本発明によれば、 $CD8^+CD45RC^{low}$ / $Treg$ 集団およびラパマイシン化合物は医薬組成物の形態で対象に投与する。典型的には、 $Treg$ 集団およびラパマイシン化合物を薬学的に許容される賦形剤、および任意に生分解性ポリマーなどの持続放出性マトリックスと組み合わせて治療用組成物を形成してもよい。「薬学的に」または「薬学的に許容される」とは、適当であれば哺乳類、特にヒトに投与した場合に副作用、アレルギー反応または他の有害反応を生じない分子実体および組成物を指す。薬学的に許容される担体または賦形剤は、あらゆる種類の非毒性固体、半固体もしくは液体充填剤、希釈液、封入材料または製剤補助剤 (*formulation auxiliary*) を指す。経口、舌下、皮下、筋肉内、静脈内、経皮、局所もしくは直腸内投与のための本発明の医薬組成物において、単独または別の有効成分と組み合わせた有効成分は、従来の医薬支持体 (*pharmaceutical support*) との混合物として単位投与形態で動物および人間に投与することができる。好適な単位投与形態は、錠剤、ゲルカプセル、

20

30

40

50

例えば塩酸またはリン酸などの無機酸、あるいは酢酸、シュウ酸、酒石酸およびマンデル酸などの有機酸と共に形成されているものが挙げられる。また遊離カルボキシル基と共に形成されている塩は、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来していてもよい。また当該担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒体であってもよい。適切な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合には必要とされる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の予防は、各種抗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、ソルビン酸およびチメロサルなどによって行うことができる。多くの場合に、等張剤、例えば糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射可能な組成物の長期吸収は、吸収を遅らせる薬剤、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本組成物中に使用することによって生じさせることができる。無菌注射溶液は、活性化化合物を必要とされる量で上に列挙されている他の成分のいくつかと共に適当な溶媒の中に組み込み、必要に応じてその後ろに濾過滅菌して調製する。一般に分散液は、様々な滅菌された有効成分を塩基性分散媒体および上に列挙されているもののうち必要とされる他の成分を含有する無菌媒体の中に組み込んで調製する。無菌注射溶液の調製のための無菌粉末の場合、典型的な調製方法は、有効成分の粉末 + 先に無菌濾過したその溶液からのあらゆるさらなる所望の成分が得られる真空乾燥および凍結乾燥技術である。直接注射のためのより多くまたは高度に濃縮された溶液の調製も企図されており、ここでは極めて迅速な浸透を生じさせて高濃度の活性薬剤を小さい腫瘍領域に送達するために溶媒としてのDMSOの使用が意図されている。製剤化したら、溶液はその剤形に適合可能な方法および治療的に有効な量で投与する。当該製剤は、上に記載した種類の注射溶液などの様々な剤形で容易に投与するが、薬物放出カプセルなども用いることができる。水溶液との形態での非経口投与のために、例えば当該溶液を必要であれば適切に緩衝すべきであり、液体希釈液を最初に十分な生理食塩水またはグルコースにより等張性にすべきである。これらの特定の水溶液は静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、用いることができる無菌水性媒体は本開示を踏まえれば当業者には公知であろう。治療されている対象の状態に応じて投与量における若干の変動は必ず生じる。投与に対して責任を有する者は、いずれの場合も、個々の対象のために適当な用量を決定する。

【0035】

本発明者らは、シクロスポリンとメチルプレドニソロンとの組み合わせがCD8⁺CD45RC^{low} / - Treg 集団の免疫抑制能力を高めることも証明した。

【0036】

従って、本発明のさらなる目的は、シクロスポリンとメチルプレドニソロンとの組み合わせの存在下でCD8⁺CD45RC^{low} / - Treg 集団を培養することを含む、CD8⁺CD45RC^{low} / - Treg 集団の免疫抑制能力を高める方法に関する。ラパマイシンの存在下での前記集団の培養のために記載されている全ての実施形態は、シクロスポリンとメチルプレドニソロンとの組み合わせに対して必要な変更を加える。

【0037】

本発明のさらなる目的は、CD8⁺CD45RC^{low} / - Treg 集団、シクロスポリンおよびメチルプレドニソロンの治療的に有効な組み合わせを投与することを含む、移植片拒絶反応またはGVHDを予防または減少させる方法にも関する。ラパマイシンと共に記載されている移植片拒絶反応またはGVHDを予防または減少させる方法のための全ての実施形態はシクロスポリンとメチルプレドニソロンとの組み合わせに対して必要な変更を加える。

【0038】

本明細書で使用される「シクロスポリン」という用語は、当該技術分野におけるその一

10

20

30

40

50

般的な意味を有し、かつシクロスポリンA、シクロスポリンAの誘導体、シクロスポリンAの塩などおよびそれらの混合物を指す。

【0039】

本明細書で使用される「メチルプレドニソロン」という用語は、当該技術分野におけるその一般的な意味を有し、かつ(6, 11) - 11, 17, 21 - トリヒドロキシ - 6 - メチル - プレグナ - 1, 4 - ジエン - 3, 20 - ジオンを指す。

【0040】

本発明を以下の図および実施例によってさらに例示する。但し、これらの実施例および図は決して本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

10

【0041】

【図1】細胞療法のためのCD8⁺CD45RC^{low} - Tregの拡大増殖。CD8⁺CD45RC^{low} - TregをHVの新鮮な血液から選別し、抗CD3および抗CD28 MA bにより14日間拡大増殖させ、次いでIL-2およびIL-15および免疫抑制剤が添加されたか添加されていない培地において同種異系のAPCの存在下で7日間培養し、かつ生存について評価した。1を超える値は細胞の増殖を意味する。n = 7。

【図2】Tregの拡大増殖収率、表現型および抑制活性に対する培養培地へのラパマイシンの添加の効果。図2A：結果は、ラパマイシンが添加されたか添加されていない培地における培養後の0日目に播種された細胞数に対して正規化された7、14および20日目に回収された細胞数として表されている。図2B~図2D：ラパマイシンの存在または非存在下で7日間(B)、14日間(C)または20日間(D)培養されたTregをTreg関連マーカーの発現について解析した。図2E(左)：結果は、ラパマイシンの非存在下での培養後のTregによって媒介された抑制率(%)に対して正規化されたラパマイシンの存在下での培養後のTregによって媒介された抑制率(%)として表されている。図2E(右)：ラパマイシンの非存在下で培養されたTreg(「w/o NTで拡大増殖されたTreg」と命名)またはラパマイシンの存在下で培養されたTreg(「w/ rapaで拡大増殖されたTreg」と命名)の非存在下(「w/o Treg」)または存在下で同種異系のAPCに応答したレスポナーT細胞の増殖の代表的なヒストグラム。

20

【図3】Tregの拡大増殖収率および抑制活性に対する培養培地へのCsA、MPA、MPrまたはタクロリムスの添加の効果。図3A：結果は、1種のIS薬物が添加されたか添加されていない培地における培養後の0日目に播種された細胞数に対して正規化された7日目に回収された細胞数として表されている。図3B~図3D：Tregを1種のIS薬物の存在または非存在下で7日間培養し、次いで同じ薬物または異なる薬物と共に培養し、かつ拡大増殖収率(図3B)および同種異系のAPCで刺激されたCD4⁺CD25 - エフェクターT細胞に対する抑制活性(図3C~図3D)を解析した。図3B：結果は、0日目に播種された細胞数に対して正規化された14日目に回収された細胞数として表されている。図3C：結果は、どんなIS薬物も使用しない培養後のTregによって媒介された抑制率(%)に対して正規化されたIS薬物と共に培養した後のTregによって媒介された抑制率(%)として表されている。図3D：結果は、各IS薬物の組み合わせについての拡大増殖スコアの平均の関数としての抑制スコアの平均として表されている。1:1は、どんなIS薬物も使用せずに拡大増殖したTregにより得られた抑制および拡大増殖スコアを意味する。

30

40

【図4】Tregの同種異系活性化および表現型に対するラパマイシン、CsA、MPA、MPrまたはタクロリムスの効果。図4A：結果は、IS薬物が添加されたか添加されていない培地における培養後の0日目に播種された細胞数に対して正規化された21日目に回収された細胞数として表されている。図4B：Tregを21日目にTreg関連マーカーの発現について解析した(14日間の薬物を使用しない拡大増殖および7日間のISが添加された培地での培養)。

【0042】

50

実施例 1

材料および方法

新鮮もしくは解凍したPBM CからのCD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Tregを、10% AB血清、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(0.1mg/ml)、ピルビン酸ナトリウム(1mM)、グルタミン(2mM)、Hepes緩衝液(1mM)、非必須アミノ酸(1x)、IL-2(1000U/ml)およびIL-15(10ng/ml)が添加されたRPMI 1640培地に3x10⁵/mlで播種し、コーティングした抗CD3 mAb(1μg/ml)、可溶性抗CD28 mAb(1μg/ml)および/または1:4のTreg:APC比の同種異系のAPCで刺激した。7日目に、拡大増殖した細胞を1.5x10⁵/mlで希釈し、コーティングした抗CD3および可溶性抗CD28 MAb(それぞれ1μg/ml)で再度刺激した。IL-2およびIL-15サイトカインを0、7、10および12日目に新たに添加した。シクロスポリンA(45ng/ml)、ラパマイシン(45ng/ml)、メチルプレドニソロン(500pg/ml)、タクロリムス(2ng/ml)またはミコフェノール酸モフェチル(1μg/ml)などの免疫抑制剤を拡大増殖の0および7日目または14日間の薬物を使用しない拡大増殖後に培養培地に添加して、CD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Tregに対するそれらの毒性および抑制への効果を評価した。14日目に、拡大増殖したTregを使用前にPBSで洗浄した。7日目に10倍超まで拡大増殖したCD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Tregに対して抑制活性を試験した。長期間の拡大増殖のために、14および21日目にCD8⁺CD45RC^{1.0w/-}TregおよびCD4⁺CD25^{high}CD127^{1.0w/-}Tregをコーティングした抗CD3(1μg/ml)および可溶性抗CD28 MAb(1μg/ml)で再度刺激し、IL-2およびIL-15サイトカインを7~28日目の間に2日ごとに新たに添加した。必要な場合には培養培地1xサイトカイン(IL-2(1000U/ml)およびIL-15(10ng/ml))を添加した。

【0043】

結果

本発明者らは、14日間の拡大増殖後7日目のCD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Tregの生存(図1)または14日間の拡大増殖時のCD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Tregの拡大増殖収率および抑制機能スコア(図3D)に対する免疫抑制剤(病院で使用される濃度)の効果を試験した。インビトロでの拡大増殖に対する免疫抑制剤の効果を試験するために、それらを14日間の間またはその後に単独で添加したか(すなわち、0~7日目のシクロスポリンA(CsA)、次いで7~14日目のメチルプレドニソロン(MPr)は図3Dの左上の角においてCsA-MPrとラベルが付されている)、あるいはどんな免疫抑制剤も使用せずに(NT)添加した。本発明者らは、ラパマイシン(Rapa)のみの存在下での14日間の拡大増殖は、拡大増殖倍数および抑制能力の両方を高めるために最も効率的であること、および最初にラパマイシンおよびその後メチルプレドニソロンも効率的な組み合わせであるが、ミコフェノール酸モフェチル(MPA)の存在はラパマイシンによる拡大増殖を阻害し、かつ抑制を減少させ(図3D)、従って、ラパマイシンがインビトロだけでなくインビボでもCD8⁺CD45RC^{1.0w/-}Tregの拡大増殖および機能を高めるのに有利であり得ることを観察した。

【0044】

実施例 2

方法:新鮮な血液を一人の健康な志願者から採取し、PBM CをFicoll遠心分離によって単離し、PBSで洗浄し、PBS-FCS-EDTA中2x10⁸のPBM C/mlで調整し、抗CD3-PerCPy7、抗CD4-PerCPy5.5および抗CD45RC FITCと共に4で30分間インキュベートした。細胞をPBS-FCS-EDTAで洗浄し、60μmのティッシュで濾過し、Dapiで標識し、かつFACS Ariaによりリンパ球の形態、凝集細胞の除外およびDAPI-CD3⁺CD4⁻CD45RC^{1.0w/-}の発現に基づいて選別した。選別後に細胞を培地で洗浄し、10% AB

血清、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (0.1 mg/ml)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、グルタミン (2 mM)、Hepes 緩衝液 (1 mM)、非必須アミノ酸 (1x)、IL-2 (1000 U/ml) および IL-15 (10 ng/ml)、抗 CD28 MA b (クローン CD28.2、可溶性、1 µg/ml) が添加され、かつ 50 nM のラパマイシンが添加されたか添加されていない RPMI 1640 培地を含む、先に抗 CD3 (OKT3 クローン、PBS 中 1 µg/ml、1 ml/ウェル、37 で 1 時間、次いで PBS で 3 回洗浄) でコーティングした p6 プレートに 10^6 の Treg / ウェル / 3 ml で播種した。7 および 14 日目に、Treg を回収、計数および洗浄し、かつ 10% AB 血清、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (0.1 mg/ml)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、グルタミン (2 mM)、Hepes 緩衝液 (1 mM)、非必須アミノ酸 (1x)、IL-2 (1000 U/ml) および IL-15 (10 ng/ml)、抗 CD28 MA b (クローン CD28.2、可溶性、1 µg/ml) が添加され、かつ 50 nM のラパマイシンが添加されたか添加されていない RPMI 1640 培地を含む、先に抗 CD3 (OKT3 クローン、PBS 中 1 µg/ml、1 ml/ウェル、37 で 1 時間、次いで PBS で 3 回洗浄) でコーティングした p6 プレートに 5×10^5 の Treg / ウェル / 3 ml で播種した。7 ~ 20 日目から、サイトカインを 2 日ごとに新たに添加し、新鮮な培地 (10% AB 血清、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (0.1 mg/ml)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、グルタミン (2 mM)、Hepes 緩衝液 (1 mM)、非必須アミノ酸 (1x)、IL-2 (1000 U/ml) および IL-15 (10 ng/ml) が添加された RPMI 1640 培地) を増殖率に応じて必要な場合に添加した。抑制活性の評価のために拡大増殖した Treg を 14 日目に回収した。同じ HVD ナーからの PBMC を解凍し、PBS で洗浄し、PBS-FCS-EDTA 中 2×10^8 の PBMC / ml で調整し、抗 CD3-PerCPy7、抗 CD4-PerCPy5.5 および抗 CD25-APC-Cy7 と共に 4 で 30 分間インキュベートした。細胞を PBS-FCS-EDTA で洗浄し、60 µm のティッシュで濾過し、Dapi で標識し、かつ FACS Aria によりリンパ球の形態、凝集細胞の除外および DAPI-CD3⁺CD4⁺CD25⁻ の発現に基づいて選別し、かつ CFSE で標識した。CD3⁺ 細胞枯渇および 35 Gy の照射によって APC を得た。拡大増殖した Treg を、10% AB 血清、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (0.1 mg/ml)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、グルタミン (2 mM)、Hepes 緩衝液 (1 mM) および非必須アミノ酸 (1x) が添加された RPMI 1640 培地に 1:1:1 の Treg:Teff:APC 比で播種した。5 日間の培養後に、Teff 増殖を DAPI-CD4⁺CD3⁺T 細胞における CFSE 解析によって解析した。

【0045】

結果：Treg 培養のための培養培地へのラパマイシンの添加により、細胞表現型に影響を与えることなく拡大増殖収率および抑制機能が向上した (図 2)。

【0046】

実施例 3

方法：新鮮な血液を一人の健康な志願者から採取し、PBMC を Ficoll 遠心分離によって単離し、PBS で洗浄し、PBS-FCS-EDTA 中 2×10^8 の PBMC / ml で調整し、抗 CD3-PerCPy7、抗 CD4-PerCPy5.5 および抗 CD45RC FITC と共に 4 で 30 分間インキュベートした。細胞を PBS-FCS-EDTA で洗浄し、60 µm のティッシュで濾過し、Dapi で標識し、かつ FACS Aria によりリンパ球の形態、凝集細胞の除外および DAPI-CD3⁺CD4⁻CD45RC^{low} の発現に基づいて選別した。選別後に細胞を培地で洗浄し、10% AB 血清、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (0.1 mg/ml)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、グルタミン (2 mM)、Hepes 緩衝液 (1 mM)、非必須アミノ酸 (1x)、IL-2 (1000 U/ml) および IL-15 (10 ng/ml)、抗 CD28 MA b (クローン CD28.2、可溶性、1 µg/ml) が添加され

、かつ免疫抑制剤（シクロスポリンA（45 ng/ml）、ラパマイシン（45 ng/ml）、メチルプレドニソロン（500 pg/ml）、タクロリムス（2 ng/ml）またはミコフェノール酸モフェチル（1 μg/ml））が添加されたか添加されていないRPMI 1640培地を含む、先に抗CD3（OKT3クローン、PBS中1 μg/ml、1 ml/ウェル、37 °Cで1時間、次いでPBSで3回洗浄）でコーティングしたp6プレートに10⁶のTreg/ウェル/3 mlで播種した。7日目に、Tregを回収、計数および洗浄し、かつ10% AB血清、ペニシリン（100 U/ml）、ストレプトマイシン（0.1 mg/ml）、ピルビン酸ナトリウム（1 mM）、グルタミン（2 mM）、Hepes緩衝液（1 mM）、非必須アミノ酸（1×）、IL-2（1000 U/ml）およびIL-15（10 ng/ml）、抗CD28 MA b（クローンCD28.2、可溶性、1 μg/ml）が添加され、かつ免疫抑制剤（シクロスポリンA（45 ng/ml）、ラパマイシン（45 ng/ml）、メチルプレドニソロン（500 pg/ml）、タクロリムス（2 ng/ml）またはミコフェノール酸モフェチル（1 μg/ml））（0~7日目と同じまたは異なる薬物）が添加されたか添加されていないRPMI 1640培地を含む、先に抗CD3（OKT3クローン、PBS中1 μg/ml、1 ml/ウェル、37 °Cで1時間、次いでPBSで3回洗浄）でコーティングしたp6プレートに5×10⁵のTreg/ウェル/3 mlで播種した。10および12日目に、サイトカインを新たに添加した。抑制活性の評価のために拡大増殖したTregを14日目に回収した。同じHVDナーからのPBMCを解凍し、PBSで洗浄し、PBS-FCS-EDTA中2×10⁸のPBMC/mlで調整し、抗CD3-PCy7、抗CD4-PerCP-Cy5.5および抗CD25-APC-Cy7と共に4 °Cで30分間インキュベートした。細胞をPBS-FCS-EDTAで洗浄し、60 μmのティッシュで濾過し、Dapiで標識し、かつFACS Ariaによりリンパ球の形態、凝集細胞の除外およびDAPI-CD3⁺CD4⁺CD25⁻の発現に基づいて選別し、かつCFSEで標識した。CD3⁺細胞枯渇および35 Gyの照射によってAPCを得た。拡大増殖したTregを10% AB血清、ペニシリン（100 U/ml）、ストレプトマイシン（0.1 mg/ml）、ピルビン酸ナトリウム（1 mM）、グルタミン（2 mM）、Hepes緩衝液（1 mM）および非必須アミノ酸（1×）が添加されたRPMI 1640培地に1:1:1のTreg:Teff:APC比で播種した。5日間の培養後に、Teff増殖をDAPI-CD4⁺CD3⁺T細胞においてCFSE解析によって解析した。

【0047】

結果：Treg培養のための培養培地へのラパマイシン、CsAまたはタクロリムスの添加により、Tregの拡大増殖収率および抑制活性が向上し、MPAの添加は、活性および拡大増殖に有害であり、かつメチルプレドニソロンの添加により機能が向上した（図3）。

【0048】

実施例4

方法：新鮮な血液を一人の健康な志願者から採取し、PBMCをFicoll遠心分離によって単離し、PBSで洗浄し、PBS-FCS-EDTA中2×10⁸のPBMC/mlで調整し、抗CD3-PCy7、抗CD4-PerCP-Cy5.5および抗CD45RC-FITCと共に4 °Cで30分間インキュベートした。細胞をPBS-FCS-EDTAで洗浄し、60 μmのティッシュで濾過し、Dapiで標識し、かつFACS Ariaによりリンパ球の形態、凝集細胞の除外およびDAPI-CD3⁺CD4⁻CD45RC^{low}の発現に基づいて選別した。選別後に細胞を培地で洗浄し、10% AB血清、ペニシリン（100 U/ml）、ストレプトマイシン（0.1 mg/ml）、ピルビン酸ナトリウム（1 mM）、グルタミン（2 mM）、Hepes緩衝液（1 mM）、非必須アミノ酸（1×）、IL-2（1000 U/ml）およびIL-15（10 ng/ml）、抗CD28 MA b（クローンCD28.2、可溶性、1 μg/ml）が添加されたRPMI 1640培地を含む、先に抗CD3（OKT3クローン、PBS中1 μg/ml、1 ml/ウェル、37 °Cで1時間、次いでPBSで3回洗浄）でコーティングした

p6プレートに 10^6 のTreg/ウェル/3mlで播種した。7日目に、Tregを回収、計数および洗浄し、かつ10%AB血清、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(0.1mg/ml)、ピルビン酸ナトリウム(1mM)、グルタミン(2mM)、Hepes緩衝液(1mM)、非必須アミノ酸(1x)、IL-2(1000U/ml)およびIL-15(10ng/ml)、抗CD28MAb(クローンCD28.2、可溶性、1 μ g/ml)が添加されたRPMI 1640培地を含む、先に抗CD3(OKT3クローン、PBS中1 μ g/ml、1ml/ウェル、37で1時間、次いでPBSで3回洗浄)でコーティングしたp6プレートに 5×10^5 のTreg/ウェル/3mlで播種した。10および12日目に、サイトカインを新たに添加した。14日目に、拡大増殖したTregを回収し、10%AB血清、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(0.1mg/ml)、ピルビン酸ナトリウム(1mM)、グルタミン(2mM)、Hepes緩衝液(1mM)、非必須アミノ酸(1x)が添加され、免疫抑制剤(シクロスポリンA(45ng/ml)、ラパマイシン(45ng/ml)、メチルプレドニソロン(500pg/ml)、タクロリムス(2ng/ml)またはミコフェノール酸モフェチル(1 μ g/ml))が添加されたか添加されておらず、かつサイトカインが添加されたか添加されていない(IL-2(1000U/ml)およびIL-15(10ng/ml)が14、16、18および20日目に添加された)、RPMI 1640培地を含むp96プレートに同種異系のAPC(Treg:APC1:4)と共に 5×10^5 Treg/ウェル/200 μ lで播種した。Tregを21日目に生存/拡大増殖収率および表現型について解析した。

10

20

【0049】

結果：Treg培養のための培養培地の添加は、Tregの生存および同種異系のAPCに应答したTreg増殖にも影響を与えなかった(図5)。タクロリムスおよびメチルプレドニソロンはそれぞれ、薬物非含有培地と比較してTregによってIFNgおよびCD154発現を有意に減少させた(図4)。

【0050】

参考文献

本出願全体を通して、各種参考文献は本発明が属する最先端技術について記載している。これらの参考文献の開示は参照によって本開示に組み込まれる。

1. Nankivell, B. J. ら, 慢性同種移植腎症の自然史(The natural history of chronic allograft nephropathy). N Engl J Med 349, 2326-2333(2003).

30

2. Moreau, A., Alliot-Licht, B., Cuturi, M. C. & Blancho, G. 臓器移植における寛容原性樹状細胞療法(Tolerogenic dendritic cell therapy in organ transplantation). Transpl Int(2016).

3. Clement, M. ら, CD8(+)制御性T細胞による濾胞性ヘルパーT-胚中心B細胞軸の制御はアテローム性動脈硬化症および三次リンパ器官の発生を制限する(Control of the T follicular helper-germinal center B-cell axis by CD8(+) regulatory T cells limits atherosclerosis and tertiary lymphoid organ development). Circulation 131, 560-570(2015).

40

4. Singer, B. D., King, L. S. & D'Alessio, F. R. 免疫療法としての制御性T細胞(Regulatory T cells as immunotherapy). Frontiers in Immunology 5, 46(2014).

5. Tsang, J. Y. ら, 同種特異的Treg細胞の効力はT細胞受容体の機能結合活性と相関しているように思われる(The potency of allo-specific Tregs cells appears to correlate w

50

ith T cell receptor functional avidity).
Am J Transplant 11, 1610 - 1620 (2011).

6. Tsang, J. Y. ら, TCR 遺伝子導入によって CD4⁺CD25⁺Treg に間接的な同種抗原特異性を付与することはマウスにおける移植寛容に有利である (Conferring indirect allospecificity on CD4⁺CD25⁺Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice). J Clin Invest 118, 3619 - 3628 (2008).

7. Sago, P. ら, 同種抗原特異性を有するヒトの制御性T細胞はポリクローナルの制御性T細胞よりも同種免疫による皮膚移植片損傷の強力な阻害剤である (Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells). Sci Transl Med 3, 83ra42 (2011).

8. Picarda, E., Anegon, I. & Guillon, C. 同種移植における CD8⁽⁺⁾Treg の T 細胞受容体特異性 (T-cell receptor specificity of CD8⁽⁺⁾Tregs in allotransplantation). Immunotherapy 3, 35 - 37 (2011).

9. Guillon, C. ら, CD40Ig 治療により CD8CD45RC T 細胞、IFN- γ およびインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼによって媒介される同種移植片受容が生じる (CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase). J Clin Invest 117, 1096 - 1106 (2007).

10. Vuddamalai, Y. & van Meerwijk, J. P. CD28⁻ および CD28^{low}CD8⁺ 制御性 T 細胞: マウスおよび人間について (CD28⁻ and CD28^{low}CD8⁺ Regulatory T Cells: Of Mice and Men). Frontiers in Immunology 8, 31 (2017).

11. Wang, Y. M. & Alexander, S. I. CD8 制御性 T 細胞: 古いものは今では新しい (CD8 regulatory T cells: what's old is now). Immunology and Cell Biology 87, 192 - 193 (2009).

12. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. 転写因子 Foxp3 による制御性 T 細胞発生の制御 (Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3). Science 299, 1057 - 1061 (2003).

13. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 は CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞の発生および機能をプログラムする (Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells). Nat Immunol 4, 330 - 336 (2003).

14. Guillon, C., Picarda, E. & Anegon, I. 実質臓器移植における CD8⁺ 制御性 T 細胞 (CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation). Curr Opin Organ Transplant 15, 751 - 756 (2010).

10

20

30

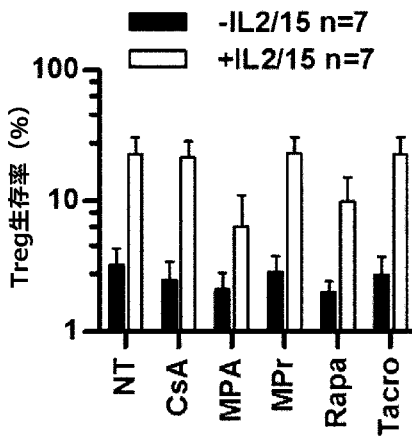
40

50

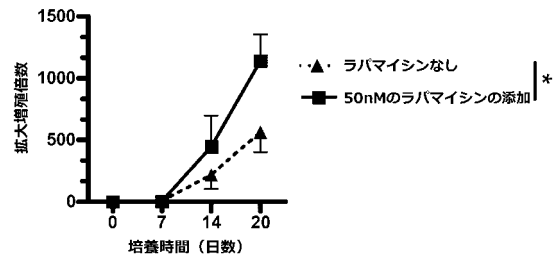
15. Niederkorn, J. Y. CD8⁽⁺⁾ T制御性細胞における新しい概念 (Emerging concepts in CD8⁽⁺⁾ T regulatory cells). *Curr Opin Immunol* 20, 327-331 (2008).

16. Liu, J., Chen, D., Nie, G. D. & Dai, Z. CD8⁽⁺⁾ CD122⁽⁺⁾ T細胞：中心記憶細胞の表現型を有する新しく現れた調節因子 (CD8⁽⁺⁾ CD122⁽⁺⁾ T-Cells: A Newly Emerging Regulator with Central Memory Cell Phenotypes). *Frontiers in Immunology* 6, 494 (2015).

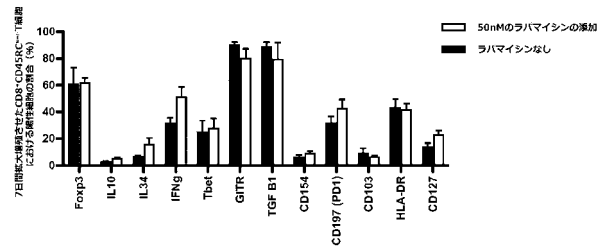
【図1】



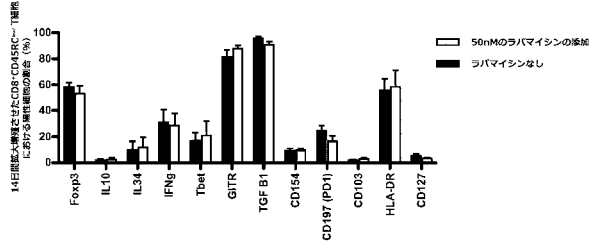
【図2A】



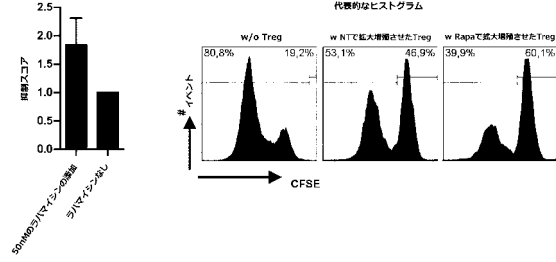
【図2B】



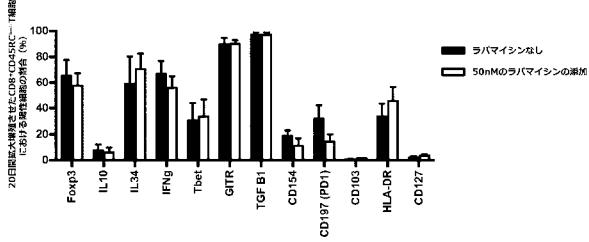
【 図 2 C 】



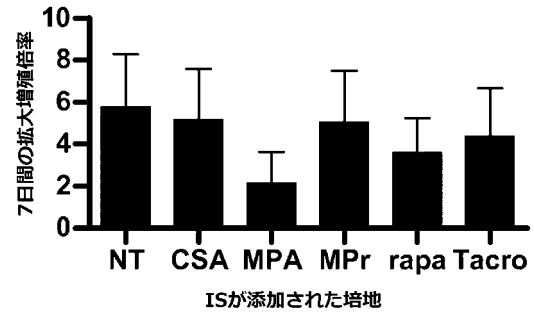
【 図 2 E 】



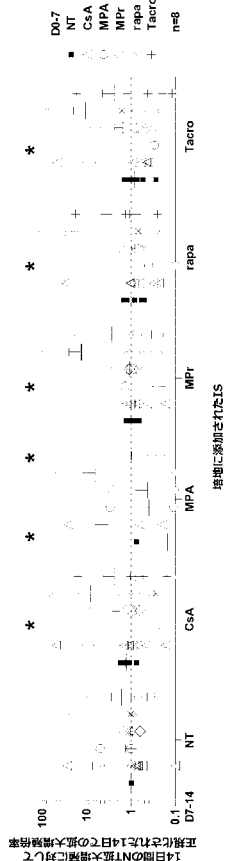
【 図 2 D 】



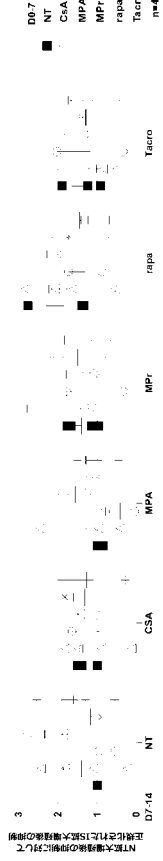
【 図 3 A 】



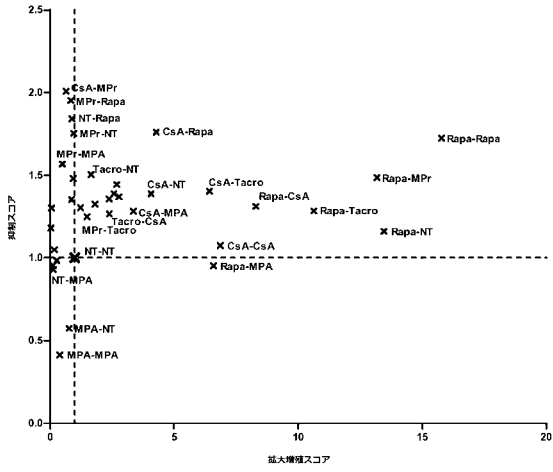
【 図 3 B 】



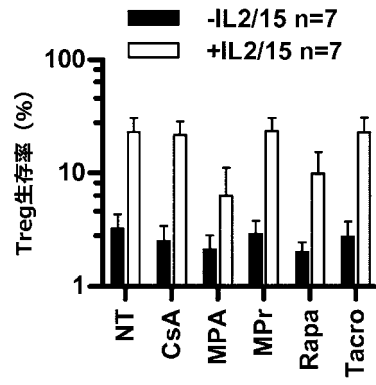
【 図 3 C 】



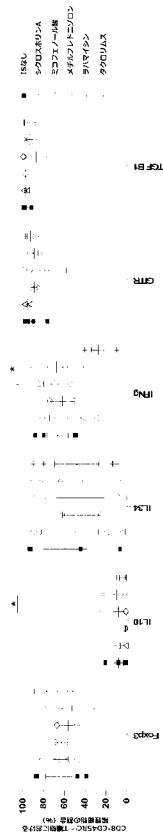
【 図 3 D 】



【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/068882

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/0783 ADD.		
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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/042170 A1 (INSERM [FR]; UNIVERSITÉ DE NANTES [FR]; CENTRE HOSPITALIER UNIV DE NA) 16 March 2017 (2017-03-16) cited in the application page 11; claims 1-18 page 54; figure 9	1-6,9, 11-15
A	WO 2016/009041 A1 (INSERM INST NAT DE LA SANTÉ ET DE LA RECH MÉDICALE [FR]; UNIVERSITÉ DE) 21 January 2016 (2016-01-21) cited in the application page 50 - page 51; figure 5 ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 September 2018		08/10/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Paresce, Donata

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/068882

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SÉVERINE BÉZIE ET AL: "IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 125, no. 10, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 3952-3964, XP055249807, US ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JC181227 page 3956 - page 3957; figure 4 -----	1-15
A	GUILLOMNEAU, C. ET AL.: "CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase", J CLIN INVEST, vol. 117, 2007, pages 1096-1106, XP055250192, cited in the application the whole document -----	1-11
A	WO 2012/012797 A2 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; JOHNSON RAYMOND M [US]) 26 January 2012 (2012-01-26) claims 1-3 -----	1-11
A	US 2011/052547 A1 (FOWLER DANIEL H [US] ET AL) 3 March 2011 (2011-03-03) page 3 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/068882

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017042170 A1	16-03-2017	AU 2016318762 A1	22-03-2018
		CA 2997646 A1	16-03-2017
		CN 108291203 A	17-07-2018
		EP 3347452 A1	18-07-2018
		KR 20180054663 A	24-05-2018
		US 2018251731 A1	06-09-2018
		WO 2017042170 A1	16-03-2017
WO 2016009041 A1	21-01-2016	EP 3169350 A1	24-05-2017
		JP 2017523963 A	24-08-2017
		US 2017202921 A1	20-07-2017
		WO 2016009041 A1	21-01-2016
WO 2012012797 A2	26-01-2012	CA 2842294 A1	26-01-2012
		EP 2596355 A2	29-05-2013
		US 2013189282 A1	25-07-2013
		WO 2012012797 A2	26-01-2012
US 2011052547 A1	03-03-2011	US 2006159667 A1	20-07-2006
		US 2011052547 A1	03-03-2011

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 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K 38/13 (2006.01)	A 6 1 K 38/13	
A 6 1 K 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/436	
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

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

(71) 出願人 519134326
 セントレ ホスピタリエール ユニバーシタイル デ ナンテス
 フランス国, 4 4 0 9 3 ナンテス セデックス, 5 アレー デ イーレ グロリエット

(74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一

(74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直

(74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代

(74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

(72) 発明者 ギロンノー, キャロル
 フランス国, 4 4 0 9 3 ナント, 3 0 ブールバード ジャン モネ, ユー 1 0 6 4 / インセルム
 ユニバーシテ デ ナント

(72) 発明者 アネゴン, イグナシオ
 フランス国, 4 4 0 9 3 ナント, 3 0 ブールバード ジャン モネ, インセルム ユーエムア
 ール 1 0 6 4

(72) 発明者 ベジエ, セヴェリーヌ
 フランス国, 4 4 0 9 3 ナント, 3 0 ブールバード ジャン モネ, インセルム ユーエムア
 ール 1 0 6 4

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA02 BA01 BA09 BA18 BA24 BA44 DA11 MA02 NA05 ZA661
 ZA662 ZA941 ZA942 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZB371 ZB372 ZC752
 4C086 AA01 AA02 DA10 MA03 MA04 NA05 ZA66 ZA94 ZB07 ZB08
 ZB37 ZC75
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 NA05 ZA66 ZA94 ZB07 ZB08
 ZB37