

(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2017-524348
(P2017-524348A)

(43) 公表日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 5/078 (2010.01)	C 12 N 5/078	4 B 065
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	4 C 084
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	4 C 085
A 61 P 35/04 (2006.01)	A 61 P 35/04	4 C 086
A 61 K 35/15 (2015.01)	A 61 K 35/15	4 C 087
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 55 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-572566 (P2016-572566)	(71) 出願人 501249191 モナッシュ ユニバーシティ オーストラリア国 3800 ビクトリア 州, ク莱頓, ウエリントン ロー ド
(86) (22) 出願日	平成27年6月10日 (2015.6.10)	(74) 代理人 100107456 弁理士 池田 成人
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月6日 (2017.2.6)	(74) 代理人 100162352 弁理士 酒巻 順一郎
(86) 國際出願番号	PCT/AU2015/050318	(74) 代理人 100123995 弁理士 野田 雅一
(87) 國際公開番号	W02015/188228	(74) 代理人 100148596 弁理士 山口 和弘
(87) 國際公開日	平成27年12月17日 (2015.12.17)	
(31) 優先権主張番号	2014902203	
(32) 優先日	平成26年6月10日 (2014.6.10)	
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)	
(31) 優先権主張番号	2015901171	
(32) 優先日	平成27年3月31日 (2015.3.31)	
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 養子細胞移入のためのPTPN2阻害剤を用いた白血球の產生方法

(57) 【要約】

本発明は、一般に、免疫療法、特に癌免疫療法に使用される白血球、特にT細胞をex vivoで調製する方法に関する。より詳細には、本発明は、養子細胞移入に使用される、細胞障害性を示す白血球の調製の方法に関する。本発明はまた、癌治療用の細胞、及びこれらを含む組成物に関する。本発明はまた、免疫療法、特に、癌免疫療法の方法に関する。本発明は、標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生する方法に関し、この方法は、PTPN2阻害剤が白血球内のPTPN2を不活化させることができる条件下で、白血球をこのPTPN2阻害剤に接触させるステップを含み、これにより、標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生する。好ましくは、白血球は、Tヘルパー細胞の非存在下でPTPN2阻害剤に接触される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生する方法において、
P T P N 2 阻害剤が白血球内の P T P N 2 を不活化させることができることのできる条件下で、前記白
血球を前記 P T P N 2 阻害剤に接触させるステップ
を含み、これにより、標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生する、方法。

【請求項 2】

前記白血球が、Tヘルパー細胞の非存在下で、前記 P T P N 2 阻害剤に接触される、請求
項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記白血球が、癌を有する対象に由来する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記白血球が、好中球、好酸球、好塩基球、単球、又はリンパ球である、請求項 1 ~ 3
のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記リンパ球が、腫瘍浸潤リンパ球である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記白血球が、癌抗原に対する特異性を有するように調整される又はエンジニアリング
される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記エンジニアリングされた特異性が、組換えキメラ受容体、又は癌抗原に特定的に結合
する T 細胞受容体によって付与される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記白血球が、前記 P T P N 2 阻害剤に接触される前又は後で、培地で増殖される、請求
項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生する方法において、
P T P N 2 阻害剤が白血球内の P T P N 2 を不活化させることができることのできる条件下で、前記白
血球を前記 P T P N 2 阻害剤に接触させるステップ
を含み、これにより、標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生し、

前記 P T P N 2 阻害剤が、P T P N 2 タンパク質の発現又は產生を変更する、好ましくは
発現又は產生を低減して P T P N 2 を阻害する、P T P N 2 を対象とする干渉 RNA である、方法。

【請求項 10】

前記干渉 RNA が、s i RNA 又は s h RNA である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 s h RNA が、配列番号 2 ~ 1 3 からなる群から選択される配列、又は配列番号 2
~ 1 3 のいずれか 1 つと少なくとも 6 0 % の同一性を有する配列を有する、請求項 1 0 に
記載の方法。

【請求項 12】

前記 s i RNA が、配列番号 : 1 若しくは 1 4 の配列、又は配列番号 : 1 若しくは 1 4
のいずれか 1 つと少なくとも 6 0 % の同一性を有する配列を有する、請求項 1 1 に記載の
方法。

【請求項 13】

前記干渉 RNA が、レンチウイルスベクターによって供給される、請求項 9 ~ 1 2 のい
ずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記 P T P N 2 阻害剤が、前記白血球内の P T P N 2 遺伝子の全て若しくは一部を除去
又は変更する C R I S P R / C a s - 9 システムである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に
記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生する方法において、
P T P N 2 阻害剤が白血球内の P T P N 2 を不活化させることができる条件下で、前記白
血球を前記 P T P N 2 阻害剤に接触させるステップ
を含み、これにより、標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生し、
前記 P T P N 2 阻害剤が、エチル-3,4-デホスタチン (d e p h o s p a t i n) 又
は本明細書に記載の化合物 8 である、方法。

【請求項 16】

前記標的細胞が癌細胞である、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記癌細胞が、既に記載された癌細胞のいずれか 1 つである、請求項 16 に記載の方法
。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法によって產生された単離、精製、又は組換
え白血球。

【請求項 19】

癌の処置に使用される請求項 18 に記載の細胞を含む組成物。

【請求項 20】

細胞を殺すのを促進するためのサイトカインをさらに含む、請求項 19 に記載の組成物
。

10

20

【請求項 21】

癌を処置する方法において、

- ・ P T P N 2 阻害剤が白血球内の P T P N 2 を不活化させることができる条件下で、 e x
v i v o での前記 P T P N 2 阻害剤の存在下で処置されるべき癌対象又は前記処置され
るべき癌対象の組織適合ドナーからの白血球を培養し、これにより、標的癌細胞を殺す高
い能力を有する細胞の組成物を調製するステップ、
- ・ 前記細胞の組成物を前記対象に投与するステップ

を含み、これにより癌を処置する、方法。

【請求項 22】

前記癌の処置が、

30

- ・ 癌細胞の数を減少させること；
- ・ 原発腫瘍のサイズを縮小させること；
- ・ 癌細胞の末梢器官への浸潤を抑制すること；
- ・ 腫瘍の転移を抑制すること；
- ・ 腫瘍の成長を抑制すること；及び
- ・ 癌に関連した 1 つ以上の症状を軽減することからなる群から選択される、請求項 21 に
記載の方法。

【請求項 23】

前記白血球が、好中球、好酸球、好塩基球、单球、又はリンパ球である、請求項 21 又
は 22 に記載の方法。

40

【請求項 24】

リンパ球が、腫瘍浸潤リンパ球又は末梢血リンパ球である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記白血球が、処置されるべき癌に対する特異性を有するように調整される又はエンジ
ニアリングされる、請求項 21 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記エンジニアリングされた特異性が、組換えキメラ受容体、又は癌抗原に特定的に結
合する T 細胞受容体によって付与される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記白血球が、前記 P T P N 2 阻害剤の存在下で培養される前又は後で、培地で増殖さ

50

れる、請求項 21～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 PTPN2 阻害剤が、PTPN2 タンパク質の発現又は産生を変更する、好ましくは発現又は産生を低減して PTPN2 を阻害する干渉 RNA である、請求項 21～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記干渉 RNA が、siRNA 又は shRNA である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 shRNA が、配列番号 2～13 からなる群から選択される配列、又は配列番号 2～13 のいずれか 1 つと少なくとも 60% の同一性を有する配列を有する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 siRNA が、配列番号：1 若しくは 14 の配列、又は配列番号：1 若しくは 14 のいずれか 1 つと少なくとも 60% の同一性を有する配列を有する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記干渉 RNA が、レンチウイルスベクターによって供給される、請求項 28～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

前記 PTPN2 阻害剤が、エチル-3,4-デホスタチン (d e p h o s p a t i n) 又は本明細書に記載の化合物 8 である、請求項 21～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

細胞内の PTPN2 のレベルを低下させることができる干渉 RNA 分子をコードする外来性核酸を含む腫瘍抗原特異的細胞。

【請求項 35】

癌の処置用の薬剤の製造における、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の方法によって產生される白血球細胞の使用。

【請求項 36】

細胞障害性細胞の組成物であって、前記細胞の 20% 超が PTPN2 の完全又は部分的阻害を有する、組成物。

【請求項 37】

白血球及びエチル-3,4-デホスタチン (d e p h o s p a t i n) 又は本明細書に記載の化合物 8 を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[関連出願]

本出願は、参照によりそれぞれの全内容が本明細書に組み入れられるオーストラリア国仮特許出願第 2,014,902,203 号明細書及び同第 2,015,901,171 号明細書の優先権を主張するものである。

【0002】

[発明の分野]

本発明は、一般に、免疫療法、特に癌免疫療法に使用される細胞を ex vivo で調製する方法に関する。より詳細には、本発明は、養子細胞移入に使用される細胞障害性を示す白血球、特に T 細胞の調製の方法に関する。本発明はまた、癌免疫療法用の細胞及びこのような細胞を含む組成物にも関する。本発明はまた、免疫療法、特に癌免疫療法の方法に関する。

【0003】

[発明の背景]

免疫療法では、患者の免疫系の使用により、患者の免疫系を刺激して悪性腫瘍又はウイ

10

20

30

40

50

ルス感染細胞を攻撃する（かつ患者の正常細胞を残す）ことによって疾患、例えば、癌又はウイルス感染を排除する。免疫療法の1つの方式では、（例えば、癌ワクチンを投与することによる）患者の免疫化を利用して、腫瘍細胞を認識して破壊するように患者の免疫系を訓練する。別のアプローチは、治療用抗体の投与を用いて、患者の免疫系を動員して癌細胞を破壊する。細胞を用いる免疫療法は、免疫細胞、例えば、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、リンホカイン活性化キラー細胞（LAK）、細胞障害性Tリンパ球（CTL）、樹状細胞（DC）などが関与する別のアプローチである。

【0004】

様々な種類の腫瘍細胞又はウイルス感染細胞が、患者自身の免疫系によって許容されるが、これは、これらの細胞が、患者自身の細胞であり（例えば、これらの細胞が自己であり）、患者の免疫系によって有効に認識されず、腫瘍細胞又はウイルス感染細胞が、適切な調節管理なしで増殖し分裂できるためである。加えて、腫瘍特異的T細胞は、通常は寛容化されるため、これらの細胞は腫瘍活性に応答しない。従って、患者自身の免疫系は、疾患細胞を攻撃するために刺激を必要とする。

10

【0005】

養子細胞移入（ACT）は、免疫療法の有効な形式であり、抗腫瘍活性又は抗ウイルス活性を有する免疫細胞の患者への移入を行う。ACTは、典型的には、抗腫瘍活性又は抗ウイルス活性を有するリンパ球の同定、in vitroでのこれらの細胞の増幅による増大、及び疾患を有する宿主へのこれらの細胞の注入を含む処置アプローチである。

20

【0006】

養子T細胞療法は、T細胞のエフェクター機能並びに生着及びホーミング能力を温存したまま、標的抗原特異性を有する細胞を最適に選択する又は遺伝子操作してT細胞の増殖を誘導する能力に依存する。しかしながら、臨床試験は、T細胞の必須機能、例えば、抗原特異的細胞毒性を弱める最適以下の条件であると現在理解されている条件下で培養された養子移入細胞を用いて行われた。

【0007】

養子細胞療法に使用される細胞の調製に現在使用されている方法は、標的細胞、例えば、腫瘍細胞を殺す期待される能力よりも低い細胞を提供するという点で限定されている。

【0008】

本明細書におけるいずれの先行技術の参照も、この先行技術が、いずれの権限においても周知の一般知識の一部をなすことの承認又は提案ではないし、またこの先行技術が、当業者によって理解される、適切と見なされる、かつ／または他の先行技術の一部の組み合わせられることが合理的に考えられ得るとの承認又は提案でもない。

30

【0009】

[発明の概要]

本発明は、上記概説した1つ以上の問題に取り組む。

【0010】

本発明は、標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生する方法に関し、この方法は

、
・PTPN2阻害剤が白血球内のPTPN2を不活化させることができる条件下で、白血球をこの阻害剤に接触させるステップ

40

を含み、これにより、標的細胞を殺す高い能力を有する白血球を產生する。好ましくは、この白血球は、Tヘルパー細胞の非存在下でPTPN2阻害剤に接触される。

【0011】

本発明は、標的細胞を殺す高い能力を有する白血球細胞を產生する方法に関し、この方法は、

・白血球でPTPN2が不活化する条件下で十分な時間、ex vivoで白血球をPTPN2阻害剤に接触させるステップ

を含み、これにより、標的細胞を殺す高い能力を有する白血球細胞を產生する。好ましくは、白血球は、ex vivoでCD4 Tヘルパー細胞と接触されない。

50

【0012】

本発明は、P T P N 2 阻害剤の存在下でのT細胞の培養を含む、細胞障害性T細胞の少なくとも1つの特性を示すT細胞の集団をe x v i v oで調製する方法に関する。

【0013】

本発明は、細胞障害性T細胞の少なくとも1つの特性を示すT細胞の集団をe x v i v oで調製する方法に関し、この方法は：

- ・P T P N 2 阻害剤の存在下で生物学的サンプルからのT細胞集団を培養するステップ；
- ・細胞を培養で増殖させるステップ

を含み、これにより、細胞障害性を示すT細胞の集団をe x v i v oで調製する。好ましくは、生物学的サンプルは、癌患者に由来する、又は癌に対する特異性を有するように調整される若しくはエンジニアリングされる。

10

【0014】

本発明は、抗原特異的な細胞障害性T細胞を含む組成物をe x v i v oで調製する方法に関し、この方法は：

- ・T細胞を含む生物学的サンプルを用意するステップ；
- ・P T P N 2 阻害剤の存在下で、抗原性物質をT細胞集団と共に培養するステップ；及び
- ・細胞を培養で増殖させるステップ

を含み、これにより、抗原特異的な細胞障害性T細胞を含む組成物をe x v i v oで調製する。

20

【0015】

本発明は、エフェクター記憶表現型を示すT細胞のレベルを対象において上昇させる方法に関し、この方法は：

- ・P T P N 2 阻害剤の存在下で、生物学的サンプルからのT細胞集団をe x v i v oで培養するステップ；
- ・細胞を培養で増殖させるステップ；
- ・培養した細胞を対象に投与するステップ

を含み、これにより、エフェクター記憶表現型を示す対象においてT細胞のレベルを上昇させる。

20

【0016】

本発明はまた、癌の処置に適した免疫応答を対象で誘導するための方法も提供し、この方法は、

- ・対象又は組織適合ドナー対象からT細胞を得るステップ；
- ・少なくとも1つの細胞障害性T細胞の特性を示すT細胞の集団を產生するための条件下で十分な時間、e x v i v oで、P T P N 2 阻害剤の存在下でT細胞を培養し、これにより細胞障害性T細胞の集団を產生するステップ、
- ・細胞障害性T細胞の集団を対象に投与するステップを

含み、これにより、癌の処置に適した免疫応答を対象で誘導する。

30

【0017】

本発明はまた、疾患状態を有する対象におけるC D 8 + T細胞媒介免疫を高める方法にも関し、この方法は：

- ・C D 8 + T細胞を、細胞障害性T細胞の少なくとも1つの特性を示すC D 8 + T細胞の集団を產生するための条件下で十分な時間、e x v i v oでP T P N 2 阻害剤に接触させるステップ；
- ・C D 8 + T細胞の集団を対象に投与するステップ

40

を含み、これにより、対象におけるC D 8 + T細胞媒介免疫を高める。

【0018】

本発明はまた、疾患状態を有する対象におけるC D 8 + T細胞媒介免疫を高める方法にも関し、この方法は：

- ・対象のC D 8 + T細胞の集団を単離するステップ；
- ・P T P N 2 を対象とするs i R N A又はs h R N Aをコードする核酸分子を、単離され

50

た C D 8 + T 細胞に導入し、これにより C D 8 + T 細胞における P T P N 2 のレベルを低下させるステップ；及び

・ C D 8 + T 細胞を前記対象に再導入するステップ

を含み、これにより、対象における C D 8 + T 細胞媒介免疫を高める。

【 0 0 1 9 】

本発明は、対象における癌の退縮を促進する方法に関し、この方法は：

・ P T P N 2 阻害剤の存在下で、対象から得た T 細胞を培養するステップ、

・ 培養した T 細胞を対象に投与するステップ

を含み、これにより、癌の退縮が促進される。

【 0 0 2 0 】

本発明は、癌を有する対象の癌の退縮を促進する方法に関し、この方法は：

・ P T P N 2 阻害剤の存在下で、癌によって発現される腫瘍抗原に特異的な C A R T 細胞を培養するステップ、

・ 培養した C A R T 細胞を対象に投与するステップ

を含み、これにより、癌の退縮が促進される。好ましくは、癌は、H e r - 2 陽性癌であり、C A R T 細胞はH e r - 2 に特異的である。

【 0 0 2 1 】

本発明は、癌を有する患者の生存期間を延長する方法に関し、この方法は、

・ P T P N 2 阻害剤の存在下で、癌によって発現される腫瘍抗原に特異的な C A R T 細胞を培養するステップ、

・ 培養した C A R T 細胞を対象に投与するステップ

を含み、これにより、対象の生存期間が延長される。好ましくは、癌は、H e r - 2 陽性癌であり、C A R T 細胞はH e r - 2 に特異的である。

【 0 0 2 2 】

T 細胞は、腫瘍浸潤リンパ球、抗腫瘍 T 細胞受容体又はキメラ抗原受容体 (C A R) を発現するよう遺伝子操作された末梢血リンパ球、混合リンパ球腫瘍細胞培養 (M L T) で濃縮された又は自己抗原提示細胞でクローニングされた T 細胞、及び腫瘍由来ペプチドからなる群から選択することができる。リンパ球は、組織適合ドナー又は癌を有する対象から単離することができる。

【 0 0 2 3 】

本発明のいずれの方法でも、リンパ球又は T 細胞は、P T P N 2 阻害剤の存在下での培養の前に精製される又は実質的に精製される。このステップは、生物学的サンプルから他の細胞型を除去することによってリンパ球又は T 細胞を濃縮する。

【 0 0 2 4 】

一実施形態では、C A R T 細胞は、H e r - 2 特異的 C A R C D 8 + T 細胞である。この T 細胞は、本明細書に記載のいずれか 1 つ以上の型を含む 2 つ以上の T 細胞の型を含む集団であり得る。例えば、T 細胞の集団は、ナイーブの活性化及び / 又は記憶 T 細胞を含み得る。

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用される P T P N 2 阻害剤は、P T P N 2 のホスファターゼ活性を阻害するあらゆる分子であり得る。この阻害剤は、ホスファターゼ活性化部位の直接阻害剤であり得、ホスファターゼ活性をアロステリックに阻害するように作用することができる、P T P N 2 のその基質との相互作用を阻害することができる、又は P T P N 2 遺伝子の転写活性を低下させることによって、若しくは細胞中に存在する P T P N 2 m R N A 若しくはタンパク質の量を減少させることによって P T P N 2 のレベルを下げることができる。典型的には、この阻害剤は、小分子、例えば、エチル - 3 , 4 - デホスタチン (d e p h o s p a t i n) 又は本明細書に記載の化合物 8 、ペプチド、ペプチド模倣体、抑制性又は干渉 R N A 、例えば、アンチセンス R N A 、s i R N A 、m i c r o R N A 、s h R N A である。好ましくは、s i R N A は、配列番号 1 で示される配列を有する。好ましくは、s h R N A は、配列番号 2 ~ 1 2 のいずれか 1 つに示される配列、又は s h R N A が細

10

20

30

40

50

胞内での P T P N 2 のレベルを低下させる能力を維持したままの、配列番号 2 ~ 13 のいずれか 1 つと少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99% の同一性を有する配列である。

【0026】

本発明はまた、干渉 RNA、例えば、microRNA、shRNA、若しくは siRNA をコードする外来核酸、細胞内で P T P N 2 のレベルを低下させることができる分子を含む養子免疫療法に使用される腫瘍抗原特異的細胞障害性 T 細胞にも関する。

【0027】

本発明は、抗原特異的 T 細胞受容体、及び干渉 RNA、例えば、microRNA、shRNA、若しくは siRNA をコードする外来核酸、細胞内の P T P N 2 のレベルを低下させることができるものとし、細胞を含む単離細胞、精製細胞、又は組換え細胞に関する。好ましくは、T C R は、癌抗原に特異的であり、この細胞は、CD8+ T 細胞である。CD8+ T 細胞は、腫瘍浸潤リンパ球、又は癌に罹患した宿主から単離された末梢血リンパ球であり得る。

【0028】

本発明は、癌の治療に有効な単離又は精製 CD8+ T 細胞の集団を投与するステップを含む対象の癌を処置する方法に関し、この CD8+ T 細胞は、抗原特異的 T 細胞受容体、及び干渉 RNA、例えば、microRNA、shRNA、若しくは siRNA をコードする外来核酸、P T P N 2 を対象とする分子を含む。

【0029】

本発明はまた、CD8+ T 細胞を含む細胞の組成物の増殖、濃縮、又は増加の方法も提供し、この方法は、P T P N 2 阻害剤を含む培地で細胞の組成物を培養するステップを含み、この P T P N 2 阻害剤は、培養中の CD8+ T 細胞との接触を可能にするために培地に加えられる。好ましくは、増殖、濃縮、又は増加により、少なくとも 1 つの細胞障害性 T 細胞の特性を示す CD8+ T 細胞の数が 2 倍になる。より好ましくは、細胞の増加により、少なくとも 1 つの細胞障害性 T 細胞の特性を示す CD8+ T 細胞の数が 3 倍又は 4 倍になる。CD8+ T 細胞の増加は、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、又は 10 倍以上であり得る。この方法は、少なくとも 1 つの細胞障害性 T 細胞の特性を示す組成物中の CD8+ T 細胞の相対数を増加させることもできる。

【0030】

本発明はまた、細胞の 20% 超が P T P N 2 の完全又は部分的な阻害を有する細胞障害性細胞の組成物に関する。好ましくは、組成物は、P T P N 2 の完全又は部分的な阻害を有する細胞を 30% 超、40% 超、50% 超、60% 超、70% 超、80% 超、85% 超、90% 超、91% 超、92% 超、93% 超、94% 超、95% 超、96% 超、97% 超、98% 超、又は 99% 超含む。一実施形態では、全ての細胞は、P T P N 2 の完全又は部分的な阻害を有する。

【0031】

本発明はまた、本明細書に記載の白血球及び P T P N 2 阻害剤を含む組成物にも関する。好ましくは、P T P N 2 阻害剤は、本明細書に記載の干渉 RNA、又はエチル-3,4-デホスタチン (d e p h o s p a t i n)、又は本明細書に記載の化合物 8 である。この組成物は、細胞を殺すのを促進するサイトカイン、例えば、IL-2 又は IFN をさらに含み得る。好ましくは、この白血球は、CAR T 細胞であり、より好ましくは CAR T 細胞は、細胞表面腫瘍抗原に特異的である。典型的には、CAR T 細胞は、Her-2 に特異的である。

【0032】

本発明のいずれの態様でも、唯一の阻害は、P T P N 2 である。言い換えれば、P T P N 2 以外の遺伝子又は遺伝子産物は阻害されない。例えば、使用される唯一の小分子阻害剤が、P T P N 2 阻害剤である、又は使用される microRNA、shRNA、若しくは siRNA のみが P T P N 2 を標的とする、又は唯一のゲノム編集が、P T P N 2 遺伝子で起

10

20

30

40

50

こる。

【0033】

特段の記載がない限り、本明細書で使用される「含む (comprise)」という語及びその変形、例えば、「含む (comprising)」、「含む (comprises)」、及び「含む (comprised)」は、さらなる添加剤、成分、整数、又はステップを排除することを意図するものではない。また、「含む (including)」という語は、「含む (comprising)」と同義的に使用され、同様に、さらなる添加剤、成分、整数、又はステップを排除することを意図するものではない。

【0034】

本発明のさらなる態様及び前の段落に記載された態様のさらなる実施形態は、例として記載される以下の説明及び添付の図面の参照により明らかになるであろう。 10

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、PTPN2欠損ナイーブOT-I CD8⁺ T細胞が、RIPmOVAマウスのI型糖尿病を促進することを示す。(a) OT-I : Ptpn2^{f1/f1}対OT-I ; Lck-Cre ; Ptpn2^{f1/f1}マウスからの精製ナイーブ(CD44¹oCD62L^{hi})CD8⁺リンパ節(LN)T細胞(8×10⁵)をRIP-mOVA宿主に養子移入して、生存及び糖尿病の発症(尿糖 55mmol/l)を監視した。血糖値を、移入から7~10日後に評価した。(b) OT-I : Ptpn2^{f1/f1}対OT-I ; Lck-Cre ; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのナイーブCD8⁺LN 20 T細胞(4×10⁵)をRIP-mOVA宿主に養子移入して、移入から15日後に血中及び尿中のブドウ糖値を監視した。尿中及び血糖値は、平均±SEMである。尿中及び血中のブドウ糖値の有意差を、2-tailed Mann-Whitney U試験(ノンパラメトリック)；**P<0.01を用いて決定した。(a)(p<0.0001)及び(b)(p=0.0012)におけるKaplan-Meier推定法での統計的分析を、自由度1のLog-rank(Mantel-Cox)試験を用いて行った。(c) PTPN2欠損ナイーブOT-I CD8⁺ T細胞のRIP-mOVAマウスへの養子移入により、I型糖尿病が発症する。OT-I : Ptpn2^{f1/f1}対OT-I ; Lck-Cre ; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのナイーブ(CD44¹oCD62L^{hi})CD8⁺リンパ節(LN)T細胞(2.5×10⁵)をRIP-mOVA宿主に養子移入して、移入から15日後に尿中及び血中のブドウ糖値を監視した。尿中及び血中のブドウ糖値の有意差を、2-tailed Mann-Whitney U試験(ノンパラメトリック)；*P<0.05、**P<0.01を用いて決定した。 30

【図2】図2は、PTPN2欠損ナイーブOT-I CD8⁺ T細胞のRIPmOVAマウスへの養子移入により、臍細胞が破壊されることを示す。OT-I : Ptpn2^{f1/f1}対OT-I ; Lck-Cre ; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのナイーブCD8⁺LN T細胞(8×10⁵)をRIP-mOVA宿主に養子移入した。(a) 移入から11日目に、臍臓をホルマリンで固定して、組織学的評価(ヘマトキシリン及びエオシン: H&E)を行った。臍島炎の重症度を組織学的に決定した。グレード0~4の臍島及び侵襲性臍島炎(グレード3及び4)の臍島の割合を、指定数のマウスに対して決定した。侵襲性臍島炎における有意差(平均±SEM)を、2-tailed Student's t試験；***P<0.001を用いて決定した。(b) 別法では、固定された臍臓に、インスリン及びグルカゴンの免疫組織学的染色を行った。 40

【図3】図3は、PTPN2ヘテロ接合ナイーブOT-I CD8⁺ T細胞が、RIP-mOVAマウスにおいて臍細胞の破壊及び糖尿病を引き起こすことを示す。OT-I : Ptpn2^{f1/+}対OT-I ; Lck-Cre ; Ptpn2^{f1/+}ヘテロ接合マウスからのナイーブCD8⁺LN T細胞(8×10⁵)をRIP-mOVA宿主に養子移入した。(a) 糖尿病の発症(尿糖 55mmol/l)を監視した。Kaplan-Meier推定法(p=0.0498)での統計的分析を、自由度1のLog-rank(Mantel-Cox)試験を用いて行った。(b) 移入から20日目に、臍臓を摘出

10

20

30

40

50

し、ホルマリンで固定し、そして組織学的評価を行った。臍島炎の重症度を組織学的に評点した。グレード0～4の臍島及び侵襲性臍島炎（グレード3及び4）の臍島の割合を、指定数のマウスに対して決定した。侵襲性臍島炎における有意差（平均±SEM）を、2-tailed Student's t試験；*P<0.05を用いて決定した。

【図4】図4は、PTPN2欠損が、RIP-mOVAにおけるナイーブOT-I CD8+ T細胞の増殖を変更しないことを示す。OT-I: Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのナイーブCD8+ LN T細胞（2×10⁶）をCFSEで染色し、RIP-mOVA宿主に養子移入した。移入から3日目に、リンパ球を、臍臓、腎臓、及び鼠径部LNから採取し、CD8及びTCR-V2について染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。2つの独立した実験の代表的なCFSEヒストグラムが示されている。定量結果は、指定数のマウスについての平均±SEMであり、2つの独立した実験の典型である。

【図5】図5は、PTPN2欠損ナイーブOT-I CD8+ T細胞が、RIP-mOVAマウスへの養子移入後に高いエフェクター機能を示すことを示す。OT-I: Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのナイーブCD8+ LN T細胞（0.8×10⁶）をRIP-mOVA宿主に養子移入した。移入から11日目に、リンパ球を（a）臍臓及び（b）鼠径部LNから採取し、CD8、TCR-V2、及びTCR-V5について染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。2つの独立した実験の代表的なドットプロット及び等高線プロットが示されている。（c）OT-I: Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのナイーブCD8+ LN T細胞（2×10⁶）をRIP-mOVA宿主に養子移入した。移入から9日目に、リンパ球を臍リンパ節から採取し、Brefeldin A/Monensinの存在下で、PMA/イオノマイシンで再刺激し、固定し、次いで透過化処理し、CD8、TCR-V2、TCR-V5、IFN-、及びグランザイムB（Grz B）に対する蛍光色素結合抗体で染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。2つの独立した実験の代表的な等高線プロットが示されている。（a）～（c）の定量結果は、指定数のマウスについての平均±SEMであり、2つの独立した実験の典型である。（a）～（c）では、有意性を、2-tailed Mann-Whitney U Test; *p<0.05、**p<0.01を用いて決定した。

【図6】図6は、PTPN2欠損が、同種ペプチドSIIINFEKLに曝露されたナイーブOT-I CD8+ T細胞の活性化を促進することを示す。（a）OT-I: Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのCD8+ナイーブLN T細胞をCFSEで染色し、0.1μg/ml SIIINFEKLと共に36時間インキュベートし、そしてフローサイトメトリーによって分析した。2つの独立した実験の代表的なCFSEヒストグラムが示されている。（b）OT-I: Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのCD8+ナイーブLN T細胞を1μg/ml SIIINFEKLと共に18時間インキュベートし、アネキシンV及びプロピジウムヨウ化物（PI）で染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。（c）OT-I: Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのCD8+ナイーブLN T細胞を0.1μg/ml SIIINFEKLと共に36時間インキュベートし、CD25、CD44、CD69、及びCD62Lについて染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。2つの独立した実験の代表的なオーバーレイヒストグラムが示されている。（b）及び（c）では、定量結果は、指定数のマウスについての平均±SEMであり、2つの独立した実験の典型である。（c）では、有意性を、2-tailed Mann-Whitney U Test; *p<0.05、**p<0.01で決定した。

【図7】図7は、PTPN2欠損が、in vitroでのTCR誘導及びIL-2誘導ナイーブCD8+ Tの分化を促進することを示す。（a）Ptpn2^{f1/f1}対Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのCD8+ナイーブLN T細胞をCF

10

20

30

40

50

SEで染色し、そしてプレート結合 - CD3 (10 µg/ml) 及び - CD28 (5 µg/ml) で48時間刺激した。3つの独立した実験の代表的なCFSEヒストグラムが示されている。(b) Ptpn2^{f1/f1}対Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのCD8⁺ナイーブLN T細胞を - CD3 (10 µg/ml) 及び - CD28 (5 µg/ml) で48時間刺激し、CD25、CD44、及びCD69について染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。2つの独立した実験の代表的なオーバーレイヒストグラムが示されている。(c) Ptpn2^{f1/f1}対Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのナイーブCD8⁺LN T細胞をプレート結合 - CD3 (10 µg/ml) 及び - CD28 (5 µg/ml) で48時間刺激した。刺激から2日目に、細胞をCD44及びCD62Lについて染色して、フローサイトメトリーにかけた。細胞を、 - CD3 / - CD28の非存在下でIL-2 (20 ng/ml) と共にさらにインキュベートした。IL-2刺激から2日目及び4日目に、細胞をCD44及びCD62Lについて染色し、そしてフローサイトメトリーにかけてCD44^{hi}CD62L^{lo}エフェクター/記憶T細胞の産生を監視した。3つの独立した実験の代表的な等高線プロットが示されている。(b) 及び(c)では、定量結果は、指定数のマウスについての平均 ± SEMであり、(b)での2つの独立した実験及び(c)での3つの独立した実験の典型である。(b) 及び(c)では、有意性を、2-tailed Mann-Whitney U Test; ** p < 0.01, *** p < 0.001を用いて決定した。

【図8】図8は、PTPN2欠損が、ex vivoでのCD8⁺CAR T細胞におけるエフェクター/記憶表現型の獲得を促進することを示す。Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}(-/-)対Ptpn2^{f1/f1}(+/+)マウスからの脾細胞を刺激し、そしてscFv抗Her-2及びCD28-CD3-(-Her-2)をレトロウイルスによって同時導入した。培養の8日後に、Her-2特異的Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}(a-Her-2-/-)対Ptpn2^{f1/f1}対照(a-Her-2+/-)CAR CD8⁺T細胞を、CD62L対CD44に対する蛍光色素結合抗体で染色し、そしてエフェクター/記憶(CD44^{hi}CD62L^{lo})の産生をフローサイトメトリーによって監視した。左側がPtpn2^{f1/f1}(+/+)であり、右側がLck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}(-/-)である。

【図9】図9は、PTPN2欠損が、ex vivoでCD8⁺CAR T細胞の活性化を促進することを示す。Her-2特異的Ptpn2^{f1/f1}(-Her-2+/-)対Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CD8⁺CAR T細胞(-Her-2-/-)又は非トランスフェクトPtpn2^{f1/f1}(+/+)対Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}(-/-)CD8⁺T細胞を、Her-2発現24JK肉腫細胞(24JK-Her-2)又はプレート結合a-CD3/CD28(T細胞を活性化させる非抗原特異的手段として)と共にインキュベートした。T細胞の活性化を、ELISAによる分泌IFNの監視によって評価した。

【図10】図10は、PTPN2欠損が、ex vivoでのCAR T細胞のCTL活性を促進することを示す。Her-2特異的Ptpn2^{f1/f1}(-Her-2+/-)対Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CAR CD8⁺T細胞(-Her-2-/-)CD8⁺T細胞を、クロム(Cr⁵¹)標識24JK-Her-2肉腫細胞又はHer-2陰性24JK肉腫細胞と共にインキュベートし、4時間後にCr⁵¹の放出を測定した。

【図11】図11は、PTPN2活性の阻害が、ex vivoでのポリクローナルCD8⁺T細胞の活性化を促進することを示す。C57BL/6マウスから単離された精製CD8⁺ナイーブ(CD62L^{hi}CD44^{lo})脾T細胞を、高度に選択的な可逆PTPN2阻害剤(化合物8)の存在下又は非存在(ビヒクル)下で、プレート結合CD3/CD28と共に48時間インキュベートした。T細胞を、CD44、CD62L、IL-2R(CD25サブユニット)及びCD69の表面のレベルを評価するために蛍光色素結合抗体で染色し、そして平均蛍光強度(MFI)をフローサイトメトリーによって監

10

20

30

40

50

視した。

【図12】図12は、PTPN2欠損が、in vivoでのナイーブT細胞のエフェクター/記憶表現型細胞への変換を促進することを示す。CD45.1⁺対CD45.2⁺ Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのナイーブ(CD62L^{hi}CD44^{1°})CD8+ LN T細胞(2×10⁶)を、replete CD45.1/2⁺宿主に同時に移入した。末梢血を、T細胞の移入後の指定された時点で収集し、CD45.2 Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}対CD45.1マウスからの養子移入されたCD8⁺ T細胞の比率を、フローサイトメトリーによって決定した。移入から16週間に後、レシピエントマウスを屠殺し、脾臓、リンパ節(LN)、肝臓、及び肺からのリンパ球をフローサイトメトリーによって分析した。養子移入された合計及びナイーブ(CD62L^{hi}CD44^{1°})中心記憶(CD62L^{hi}CD44^{hi}; CM)及びエフェクター/記憶(CD62L^{1°}CD44^{hi}; EM)CD8+ T細胞の比率を決定した。図示されている結果は、指定数のマウスの平均±SEMである。

【図13】図13は、PTPN2欠損が、in vivoでのCD8+中心/記憶T細胞のエフェクター/記憶T細胞への変換を促進することを示す。CD45.1⁺対CD45.2⁺ Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからの中心記憶(CD62L^{hi}CD44^{hi}、CM)CD8+ LN T細胞(0.5×10⁶)を、replete CD45.1/2⁺宿主に同時に移入した。末梢血を、T細胞の移入後の指定された時点で収集し、そしてCD45.2 Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}対CD45.1マウスからの養子移入されたCD8⁺ T細胞の比率を、フローサイトメトリーによって決定した。移入から16週間に後、レシピエントマウスを屠殺し、脾臓、リンパ節(LN)、肝臓、及び肺からのリンパ球をフローサイトメトリーによって分析した。養子移入された合計及びナイーブ(CD62L^{hi}CD44^{1°})中心記憶(CD62L^{hi}CD44^{hi}; CM)及びエフェクター/記憶(CD62L^{1°}CD44^{hi}; EM)CD8+ T細胞の比率を決定した。図示されている結果は、指定数のマウスの平均±SEMである。

【図14】図14は、マウスCD8+ T細胞のPTPN2の阻害により、TCR媒介T細胞活性化及びエフェクター/記憶T細胞への変換が促進されることを示す。C57BL/6マウスからのナイーブ(CD62L^{hi}CD44^{1°})CD8+ LN T細胞(1×10⁵)を、±様々な濃度のPTPN2阻害剤で、プレート結合抗CD3(5 μg/ml)及び抗CD28(5 μg/ml)で60時間刺激した。細胞を回収し、CD44、CD69、CD25、及びCD62Lに対する蛍光色素結合抗体で染色し、フローサイトメトリーによって平均蛍光強度(MFI)を分析した。図示されている結果は、指定数の複製についての平均±SDである。

【図15】図15は、PTPN2欠損が、CD8+ T細胞でのTCR媒介活性化誘導細胞死を促進しないことを示す。OT-I: Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのCD8+ナイーブLN T細胞(2×10⁵)を、1 μg/ml SIINFEKL(N4)又は1 μg/ml SIVNFEKL(Y3)と共に18時間インキュベートし、アネキシンV及びプロピジウムヨウ化物(PI)で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。図示されている結果は、指定数のマウスについての平均±SEMである。

【図16】図16は、CD8+ヒト血液リンパ球でのPTPN2の阻害により、TCR媒介T細胞活性化が促進されることを示す。新しく単離されたヒトPBMNC(2×10⁶)を、プレート結合-CD3(1.25及び2.5 μg/ml)で24時間刺激した。PBMNCを回収し、CD45RA、CD8、CD69、及びCD154に対する蛍光色素結合抗体で染色し、そしてT細胞活性化をフローサイトメトリーによって監視した。代表的なCD8対CD69及びCD154のプロット(線で画定された領域の数字は、ゲート内の相対数である)が示されている。

【図17】図17は、マウスCD8+ T細胞でのsiRNAを用いたPTPN2のノックダウンが、TCR媒介T細胞応答の促進をもたらすことを示す。C57BL/6マウス

10

20

30

40

50

からの脾細胞 (1×10^7) を、 Amaxa Mouse T cell Nucleo factor Kit を使用して 100 nM GFP siRNA、又は 30 nM、 100 nM、及び 300 nM PTPN2 siRNA、又は 30 nM BLOCK-iT (商標) Fluorescent Oligo を用いて一晩トランスフェクトした。 (A) CD8⁺ T 細胞のトランスフェクション効率を、フローサイトメトリーによって BLOCK-iT (商標) Fluorescent Oligo (Fluor. Oligo) で監視した。 (B) トランスフェクト脾細胞を、プレート結合 - CD3 (5 μ g / ml) 及び - CD28 (5 μ g / ml) で 48 時間刺激し、そして蛍光色素結合 - CD8 で染色した。 CD8⁺ T 細胞の数をフローサイトメトリーによって Calibrade Beads (商標) で定量した。図示されている結果は、指定数の複製の平均 \pm SD である。

10

【図 18】図 18 は、 PTPN2 欠損が、養子免疫療法との関連で Her-2 特異的 CAR T 細胞の腫瘍特異的活性を促進し、かつ異種移植マウスの生存期間を延長することを示す。 Her-2 特異的 Ptpn2^{f1/f1} (- Her-2 Ptpn2^{+/+} CAR T 細胞) 対 Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} CAR T 細胞 (- Her-2 Ptpn2^{-/-} CAR T 細胞) (1×10^7) を、 Her-2 発現 24 JK - Her-2 肉腫細胞に感染した C57BL/6 ヒト Her-2 トランスジェニックマウス (各群に 6 匹のマウス) に養子移入し、生存を監視した。 Her-2 特異的 CAR T 細胞での PTPN2 欠損が、6 匹のマウスのうちの 2 匹を治療した。

20

【図 19】図 19 は、 CD8⁺ ヒト血液リンパ球での PTPN2 の阻害により、 TCR 媒介 T 細胞増殖が促進されることを示す。新しく単離されたヒト PBMC (2×10^6) を、ビヒクル対照又は PTPN2 の阻害剤、化合物 8 (本明細書に記載) の存在下で、プレート結合 - CD3 で (A) 48 時間及び (B) 72 時間刺激した。 PBMC を回収し、蛍光色素結合 - CD8 で染色した。 Calibrade Beads (商標) を添加し、 T 細胞の増殖をフローサイトメトリーによって監視した。図示されている結果は、指定数の複製の平均 \pm SD である。

20

【図 20】図 20 は、 PTPN2 の阻害が、 ex vivo での Her-2 特異的 CAR T 細胞の腫瘍特異的活性化を促進することを示す。 Her-2 特異的 CAR T 細胞を、ビヒクル対照又は PTPN2 の阻害剤、化合物 8 (本明細書に記載) の存在下で、 Her-2 発現 24 JK 肉腫細胞 (24 JK - Her-2) 又は 24 JK 肉腫細胞 (24 JK) と共に、又は培地のみでインキュベートした。細胞の活性化を、供給元の仕様書に従った ELISA (Mouse IFN ELISA Set, BD OptEIA (商標)) による分泌 IFN の監視によって評価した。試験は、3 連で行った (\pm SD)。

30

【0036】

[実施形態の詳細な説明]

本明細書で開示され定義される本発明は、本文又は図面に示される又は本文又は図面から明らかとなる 2 つ以上の個々の特徴の全ての代替の組み合わせにまで及ぶことを理解されたい。全てのこれらの異なる組み合わせが、本発明の様々な代替の態様を構成する。

【0037】

ここで、本発明の特定の実施形態の詳細について述べる。本発明は、実施形態に関連して説明されるが、本発明がそれらの実施形態に限定されるものではないことを理解されたい。むしろ、本発明は、特許請求の範囲によって定められる本発明の範囲に含まれ得る全ての代替、変更、及び等価物を包含するものとする。

40

【0038】

当業者であれば、本発明の実施に使用できるであろう本明細書に記載の方法及び材料と同様又は同等の多数の方法及び材料に気付くであろう。本発明は、記載される方法及び材料に一切限定されるものではない。本明細書で開示され定義される本発明は、本文又は図面に示される又は本文又は図面から明らかとなる 2 つ以上の個々の特徴の全ての代替の組み合わせにまで及ぶことを理解されたい。全てのこれらの異なる組み合わせが、本発明の様々な代替の態様を構成する。

50

【0039】

本明細書で言及される全ての特許及び刊行物は、参照によりその全内容が本明細書に組み入れられる。

【0040】

本明細書を理解する上で、単数形で使用される語は、複数形も含み、逆も同様であるとする。

【0041】

本発明者らは、特に癌免疫療法で養子細胞移入に使用される細胞の効率的な調製の方法を開発した。本発明者らは、驚くべきことに、T細胞でのPTPN2の活性の阻害が、標的細胞を殺す能力を高めることを見出した。さらに、本発明の利点は、寛容化されるが、寛容化されない場合、例えば、腫瘍浸潤リンパ球の場合に腫瘍抗原に特異的であるため、養子細胞移入に有用であり得るT細胞を、再活性化させて寛容性を低下できることである。本発明の方法の更なる利点は、T細胞が、CD4+ T細胞ヘルプの存在を必要とすることなく、ex vivoで細胞障害性CD8+ T細胞系譜で分化できることである。

10

【0042】

いかなる理論又は作用機序にも拘束されるものではないが、PTPN2活性の阻害により、T細胞受容体(TCR)シグナル伝達に変化が起き、これにより、寛容性が逆転又は回避され、代わりにT細胞の細胞障害性T細胞系譜での分化が促進される。例えば、PTPN2活性を低下させるために処置された単離CD8+ T細胞は、以下の機能のいずれか1つ以上を有することになる：増強された免疫応答が望ましいであろう抗原を有する細胞に対する細胞障害活性、維持の促進、及び／若しくは抗原の提示に対する抗原リコール応答を生じさせること、又はエフェクターT細胞の機能的及び／若しくは表現型特性を有すること。

20

【0043】

ex vivoで培養されたCD8+ T細胞の癌免疫療法は、驚くべき有効性を示すことが実証されたが、このような療法は、腫瘍細胞を標的とし、一旦認識するとその腫瘍細胞を殺す能力を有する有効数のCD8+ T細胞を得ることが困難であるため、全ての患者に有効であるわけではない。本発明は、標的細胞、例えば、腫瘍細胞を殺す高い能力を有する細胞を產生する手段を提供する。

30

【0044】

樹状細胞による抗原交差提示は、侵入病原体及び腫瘍抗原に対する細胞障害性CD8+ T細胞のプライミング、並びに自己抗原に対する末梢寛容の仲介に極めて重要である。タンパク質チロシンホスファターゼN2は、in vivoでT細胞受容体のシグナル伝達を減衰させて、CD8+ T細胞応答を調整する。本発明者らは、脾臓-細胞抗原の交差提示後の末梢寛容の維持におけるPTPN2の役割を調べた。OVA特異的OTI CD8+ T細胞(C57BL/6)の、脾臓-細胞でOVAを発現するRIP-mOVAレシピエントへの導入では、OVA特異的CD4+ T細胞が同時に導入された場合は、脾島の破壊のみが起こる。本発明者らは、RIP-mOVAレシピエントに導入されたPTPN2欠損OT-I CD8+ T細胞は、CTL活性を獲得し、これにより細胞が破壊され、CD4+ヘルプの非存在下で糖尿病が発症することを示している。これらの研究により、PTPN2は、自己抗原の交差提示後にCD8+ T細胞応答を制限する末梢T細胞寛容に極めて重要なメディエーターとして同定されている。研究結果により、PTPN2の欠損が、寛容原性CD8+ T細胞応答を、脾臓細胞の破壊を引き起すことができるCD8+ T細胞応答に変換し得る機序が明らかにされている。さらに、研究結果は、T細胞媒介免疫及び／又はT細胞養子腫瘍免疫療法を強化するための潜在的なアプローチについての洞察を提供する。

40

【0045】

自己反応性能力を有するT細胞の除去又は不活化は、胸腺及び抹消寛容機序の両方によって相乗的に媒介される極めて重要な作業である。自己反応性T細胞の大部分は、陰性選択；胸腺髓質細胞の末梢組織抗原を異所性に発現する能力によって促進されるプロセスに

50

より胸腺で除去される。それでもなお、この選択をすり抜け得る少数の高い自己反応性T細胞が、後に末梢寛容機序によって除去される。

【0046】

一連の実験により、未成熟樹状細胞(DC)が、この文脈で必須の役割を果たすことが立証された。未成熟DCは、非炎症性組織から自己抗原を獲得し、これらをリンパ節に輸送し、制限されたT細胞の増殖を誘導して最終的に組織由来抗原に対して強く反応するT細胞が消失するように、これらの自己抗原を提示する。侵入病原体に対する細胞障害性Tリンパ球免疫応答の誘導は、感染部位の排出を行うLNで始まり、成熟抗原提示細胞(APC)による外来抗原のプロセシング及び提示を必要とする。注目すべきことに、CTL応答の開始及び自己応答性T細胞の寛容化の両方は、DCが外来抗原を得て、これらの抗原に由来するペプチドをそれら自体のMHC-1分子に導く(交差提示と呼ばれるプロセス)能力に依存する場合が多い。

10

【0047】

CD4⁺T細胞は、DCの成熟を誘導する(T細胞ライセンスとして知られるプロセス)ことができるため、DCの交差提示及びT細胞刺激能力に影響を与えることが分かれている。DCのT細胞刺激能力は、強い炎症性刺激の非存在下で、特に重要であると考えられる。さらに、CD4⁺T細胞は、自己抗原提示DCを成熟させ、これにより、これらの寛容潜在性を自己免疫促進細胞に変換することが示されている。

20

【0048】

対象からの白血球、好ましくはT細胞の解剖学的供給源は、末梢血、腫瘍、悪性滲出液、及び排出リンパ節を含む。養子移入に使用されるリンパ球は、切除された腫瘍の間質(腫瘍浸潤リンパ節)又は血液から得ることができ、かつ；抗腫瘍T細胞受容体又はキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子操作され、混合リンパ球腫瘍細胞培養(MLT)で濃縮される、又は自己抗原提示細胞及び腫瘍由来ペプチドを用いてクローニングされる。注入に使用されるリンパ球は、好ましくはHLA適合の同種異系ドナー、又は癌を有する対象から単離することができる。一実施形態では、患者からのリンパ球、好ましくはT細胞は、骨髄から得られるものでも、骨髄に由来するものでもない。

20

【0049】

本発明のいずれの方法でも、PTPN2阻害剤の存在下で培養された白血球、好ましくはT細胞を、細胞を得た同じ哺乳動物に導入することができる。言い換えれば、本発明の方法に使用される細胞は、自己細胞とすることができます、即ち、病状が処置又は予防される哺乳動物から得ることができる。別法では、細胞は、同種異系的に別の対象に導入することができる。好ましくは、対象の病状を処置又は予防する方法では、細胞は、対象の自己細胞である。

30

【0050】

癌免疫療法を目的とするT細胞の1つの供給源は、例えば、モノクローナル抗体の抗原結合ドメインに由来する人工キメラ受容体を使用することであり得る。適切な細胞内シグナル伝達ドメインに結合されると、これらのキメラ抗原受容体(CAR)を発現するT細胞は、腫瘍細胞標的を殺すことができる。CAR-T細胞は、無制限にMHCに作用するという利点を有し、これにより、CAR-T細胞が、抗原プロセシング又は提示経路が遮断される腫瘍細胞を標的とすることができる。さらに、CAR-T細胞は、細胞表面のナノペプチド抗原に導かれることができ、悪性細胞で認識され得る標的構造の範囲を広げることができる。従って、CAR発現T細胞は、MHC制限細胞障害性T細胞を補完して、この細胞免疫療法の全有効性を高めることができる。

40

【0051】

ナイーブCD8⁺及びCD4⁺T細胞が、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子によって提示されたペプチド抗原に結合すると、T細胞受容体のシグナル強度により、T細胞が、G1細胞周期チェックポイントを通過して細胞分化に進んだか否か、インターロイキン-2(IL-2)を産生してクローン増殖(expansion)/増殖(proliferation)されたか否か、及び分化して様々なエフェクター機能を獲得した

50

か否かが決定される。T C R シグナル伝達は、S r c ファミリータンパク質チロシンキナーゼ、L c k 及びF y n、並びにS y k ファミリー P T K Z A P - 7 0 によって媒介されるチロシンリン酸化に依存する。T C R の結合により、L c k が、T C R の免疫受容体チロシン活性化モチーフをリン酸化することができ、これによりZ A P - 7 0 が動員され、養子タンパク質、例えば、L A T の活性化及びリン酸化が起こる。これにより、シグナル伝達複合体の核形成、並びに複数のエフェクター経路のリン酸化及び活性化が可能となる。T C R が結合すると、L c k の活性化及び/又は機能が、L c k 及びその基質の局在化、並びに免疫学的シナプス内の調節分子の存在度、活性化、及び分離によって調節される。このような調節分子は、L c k Y 5 0 5 阻害部位及びL c k Y 3 9 4 活性化部位のリン酸化を調節するタンパク質チロシンホスファターゼ (P T P) を含む。

10

【0052】

P T P N 2 (T 細胞 P T P、P T N 2、P T P T、T C - P T P、T C E L L P T P、及びT C P T P としても知られる) は、T 細胞を含む造血細胞で豊富に発現される遍在ホスファターゼ (ubiquitous phosphatase) である。同一のN末端及び触媒ドメインを有するが、C末端が異なるT C P T P の2つのスプライス変異体：疎水性C末端によって小胞体 (E R) を標的とする48-kDa型 (T C 4 8) 及び核局在化配列によって核を標的とする45-kDa変異体 (T C 4 5) が発現される。静止細胞における明らかに排他的な核局在化にもかかわらず、T C 4 5 は、両方の区画における基質にアクセスするために核と細胞質との間を往復することができる。ゲノムワイド関連解析により、P T P N 2 - 塩基多型 (S N P) が、1型糖尿病、関節リウマチ、クローン病、及びセリック病を含むいくつかのヒト自己免疫疾患の発症に関連付けられた。特に、イントロンP T P N 2 変異体、r s 1 8 9 3 2 1 7 (C) は、1型糖尿病の発症に関連付けられた。このS N P は、C D 4 + T 細胞におけるP T P N 2 m R N A の約40%の減少に関連している。P T P N 2 は、ナイーブC D 4 + 及びC D 8 + T 細胞におけるT C R シグナル伝達の重要な制御因子であり、かつL c k 及びF y n を脱リン酸化及び不活性化するよう機能する。P T P N 2 はまた、J a n u s 活性化キナーゼ (J A K) - 1 / 3 並びに転写のシグナル伝達物質及び活性化因子 (S T A T) - 1 / 3 / 5 / 6 を脱リン酸化して、サイトカインシグナル伝達を減衰させる。

20

【0053】

P T P N 2 阻害剤の存在がP T P N 2 を阻害したか否かを決定するために、次のような実験を行うことができる：既に記載された基質としてp - N P P (パラニトロフェニルリン酸) 及びp - t y r - R C M L (p - t y r 還元型カルボキシアミドメチル化及びマレイル化リゾチーム) を用いてP T P N 2 免疫沈降物中のP T P N 2 活性を測定する (B u k c z y n s k a P e t a l . B i o c h e m J . 2 0 0 4 J u n 1 5 ; 3 8 0 (P t 3) : 9 3 9 - 4 9 ; T i g a n i s T e t a l . J C h e m . 1 9 9 7 A u g 2 2 ; 2 7 2 (3 4) : 2 1 5 4 8 - 5 7)。別法では、フローサイトメトリー及び免疫プロット法によるチロシンリン酸化について、P T P N 2 の既知の基質、例えば、S r c ファミリーキナーゼメンバーL c k 及びF y n 並びに転写因子S T A T 1、S T A T 3、及びS T A T 5 の分析を行うことができる。

30

【0054】

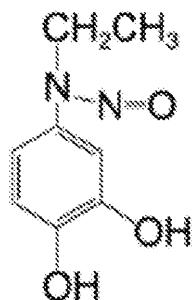
本発明に有用なP T P N 2 阻害剤は、本明細書に記載の1つ以上のP T P N 2 の機能を完全に又は部分的に低下させる阻害剤である。好ましくは、P T P N 2 阻害剤は、P T P N 2 のホスファターゼ活性を低下させる (例えば、小分子、ペプチド又はペプチド模倣体) 、P T P N 2 遺伝子の転写活性を低下させる、又は細胞内に存在するP T P N 2 m R N A 若しくはタンパク質の量を減少させる。P T P N 2 を阻害し、かつ本発明に有用な例示的な小分子は、エチル - 3 , 4 - デホスタチン (d e p h o s p a t i n) 又は化合物8である (Z h a n g e t a l . (2 0 0 9) , J A C S , 1 3 1 , 1 3 0 7 2 - 1 3 0 7 9)。本発明に有用であり得る他の阻害剤は、国際公開第03/073987 A 2号パンフレット；同第03/097621 A 1号パンフレット；米国特許出願公開第2012/0088720 A 1号明細書；米国特許第7,393,869号明細書；及

40

50

び米国特許出願公開第2006/0235061 A1号明細書に記載のPTPN2阻害活性を有する分子を含む。

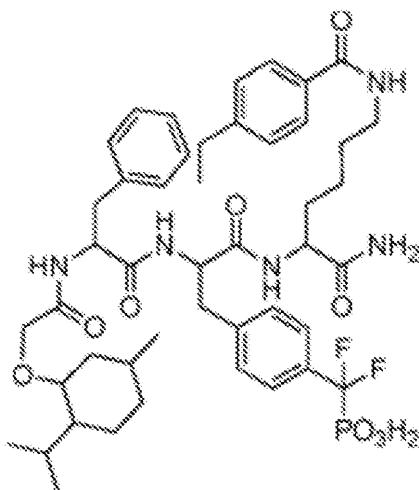
〔化 1 〕



10

エチル-3,4-デホスタチン (d e p h o s p a t i n) の化学構造

【化2】



20

30

化合物 8 の化学構造

〔 0 0 5 5 〕

PTPN2の発現は、PTPN2の転写レベルを低下させるあらゆる手段によって減少させることができる。例えば、miRNA、shRNA、又はsiRNAアプローチを使用することができる。例示的なsiRNA及びshRNAは、以下のいずれか1つ以上の配列、又はPTPN2若しくは3'UTRのコード配列を標的にすることによってPTPN2の発現を減少させるのに十分な相同性を有する配列を含む。

〔 0 0 5 6 〕

例示的な siRNA は：

40

(5' = A A G A U U G A C A G A C A C C U A A U A U U 3' =) 配列番号 1 ; 及び
 (5' = A A G C C C A U A U G A U C A C A G U C G 3' =) 配列番号 14 ; を含み、
 かつ例示的な s h RNA は :

N M _ 0 0 1 2 0 7 0 1 3 . 1 の P T P N 2 配列の 5 8 2 位で始まる G A T G A C C A A G A G A T G C T G T T T の標的配列、及び

5' - C C G G - G A T G A C C A A G A G A T G C T G T T - C T C G A G - A A A
C A G C A T C T C T T G G T C A T C - T T T T T - 3' ; S E Q I D N O : 2
; 配列番号 2 のヘアピン配列を含む T R C N 0 0 0 0 0 0 2 7 8 1 ;

N M _ 0 0 1 2 0 7 0 1 3 . 1 の P T P N 2 配列の 1 2 7 3 位で始まる T G C A A G A T A C A A T G G A G G A G A の標的配列、及び

50

5' - C C G G - T G C A A G A T A C A A T G G A G G A G A - C T C G A G - T C T
 C C T C C A T T G T A T C T T G C A - T T T T T - 3' ; S E Q I D N O : 3
 ; 配列番号：3のヘアピン配列を含むT R C N 0 0 0 0 0 0 2 7 8 2 ;

N M _ 0 0 1 2 0 7 0 1 3 . 1 の P T P N 2 配列の 6 3 6 位で始まる G A A G A T G T
 G A A G T C G T A T T A T の標的配列、及び

5' - C C G G - G A A G A T G T G A A G T C G T A T T A T - C T C G A G - A T A
 A T A C G A C T T C A C A T C T T C - T T T T T - 3' ; S E Q I D N O : 4
 ; 配列番号 4 のヘアピン配列を含むT R C N 0 0 0 0 0 0 2 7 8 3 ;

N M _ 0 0 2 8 2 8 . 3 の P T P N 2 配列の 1 5 4 2 位で始まる G T G C A G T A G A
 A T A G A C A T C A A の標的配列、及び

5' - C C G G - G T G C A G T A G A A T A G A C A T C A A - C T C G A G - T T G
 A T G T C T A T T C T A C T G C A C - T T T T T - 3' ; S E Q I D N O : 5
 ; 配列番号 5 のヘアピン配列を含むT R C N 0 0 0 0 0 0 2 7 8 4 ;

N M _ 0 0 1 2 0 7 0 1 3 . 1 の P T P N 2 配列の 7 8 1 位で始まる C T C A C T T T
 C A T T A T A C T A C C T の標的配列、及び

5' - C C G G - C T C A C T T T C A T T A T A C T A C C T - C T C G A G - A G G
 T A G T A T A A T G A A G T G A G - T T T T T - 3' ; S E Q I D N O : 6
 ; 配列番号 6 のヘアピン配列を含むT R C N 0 0 0 0 0 0 2 7 8 5 ;

N M _ 0 0 1 2 0 7 0 1 3 . 1 の P T P N 2 配列の 1 0 6 1 位で始まる A T T C T C A
 T A C A T G G C T A T A A T の標的配列、及び

5' - C C G G - A T T C T C A T A C A T G G C T A T A A T - C T C G A G - A T T
 A T A G C C A T G T A T G A G A A T - T T T T T G - 3' ; S E Q I D N O : 7
 ; 配列番号 7 のヘアピン配列を含むT R C N 0 0 0 0 3 1 4 6 9 2 ;

N M _ 0 0 1 2 0 7 0 1 3 . 1 の P T P N 2 配列の 6 3 5 位で始まる A G A A G A T G
 T G A A G T C G T A T T A の標的配列、及び

5' - C C G G - A G A A G A T G T G A A G T C G T A T T A - C T C G A G - T A A
 T A C G A C T T C A C A T C T T C T - T T T T T G - 3' ; S E Q I D N O : 8
 ; 配列番号 8 のヘアピン配列を含むT R C N 0 0 0 0 3 1 4 6 0 9 ;

N M _ 0 0 1 1 2 7 1 7 7 . 1 の P T P N 2 配列の 2 7 0 位で始まる A T A T G A T C
 A C A G T C G T G T T A A の標的配列、及び

5' - C C G G - A T A T G A T C A C A G T C G T G T T A A - C T C G A G - T T A
 A C A C G A C T G T G A T C A T A T - T T T T T G - 3' ; S E Q I D N O : 9
 ; 配列番号 9 のヘアピン配列を含むT R C N 0 0 0 0 2 7 9 3 2 9 ;

N M _ 0 0 1 2 0 7 0 1 3 . 1 の P T P N 2 配列の 5 4 0 位で始まる G T G G A G A A
 A G A A T C G G T T A A A の標的配列、及び

5' - C C G G - G T G G A G A A A G A A T C G G T T A A A - C T C G A G - T T T
 A A C C G A T T C T T C T C C A C - T T T T T G - 3' ; S E Q I D N O : 1 0
 ; 配列番号 10 のヘアピン配列を含むT R C N 0 0 0 0 3 1 4 6 1 2

N M _ 0 0 1 2 0 7 0 1 3 . 1 の P T P N 2 配列の 3 5 4 位で始まる T A T G A T C A
 C A G T C G T G T T A A A の標的配列、及び

5' - C C G G - T A T G A T C A C A G T C G T G T T A A A - C T C G A G - T T T
 A A C A C G A C T G T G A T C A T A - T T T T T G - 3' ; S E Q I D N O : 1 1
 ; 配列番号 11 のヘアピン配列を含むT R C N 0 0 0 0 3 1 4 6 9 3

N M _ 0 0 1 1 2 7 1 7 7 . 1 の P T P N 2 配列の 8 0 3 1 位で始まる G C C A A G A
 T T G A C A G A C A C C T A の標的配列、及び

10

20

30

40

50

5' - C C G G - G C C A A G A T T G A C A G A C A C C T A - C T C G A G - T A G
G T G T C T G T C A A T C T T G G C - T T T T T - 3' ; S E Q I D N O : 1
2

; 配列番号 12 のヘアピン配列を含む T R C N 0 0 0 0 0 2 9 8 9 1
N M _ 0 0 2 8 2 8 . 3 の P T P N 2 配列の 1 5 4 2 位で始まる G T G C A G T A G A
A T A G A C A T C A A の標的配列、及び

5' - C C G G - G T G C A G T A G A A T A G A C A T C A A - C T C G A G - T T G
A T G T C T A T T C T A C T G C A C - T T T T G - 3' : S E Q I D N O :
1 3

; 配列番号 13 のヘアピン配列を含む T R C N 0 0 0 0 3 1 4 5 5 1 を含む。

10

【 0 0 5 7 】

さらに、 P T P N 2 の阻害は、 P T P N 2 をコードする配列の全て若しくは一部を除去又は改変するゲノム編集も含み得る。例示的なゲノム編集技術は C R I S P R / C a s 9 システムである (J i n e k , M . , e t a l . (2 0 1 2) S c i e n c e , 3 3 7 , 8 1 6 - 8 2 1 ; C o n g L . , e t a l . (2 0 1 3) S c i e n c e , 3 3 9 , 8 1 9 - 8 2 3 ; a n d Q i , L . S . , e t a l . (2 0 1 3) C e l l , 1 5 2 , 1 1 7 3 - 1 1 8 3) 。

【 0 0 5 8 】

m i R N A 、 s i R N A 、 又は s h R N A を、 ウイルスベクターを用いて関連する T 細胞に送達することができる。ヒト遺伝子療法の適用で同定されたウイルスベクターを含め、本発明での使用に適した非常に多数の利用可能なウイルスベクターが存在する。適切なウイルスベクターは、 R N A ウィルスをベースとするベクター、 例えば、 レトロウイルス由来ベクター、 例えば、 モロニーマウス白血病ウイルス (M L V) 由来ベクターを含み、 そしてさらに複雑なレトロウイルス由来ベクター、 例えば、 レンチウイルス由来ベクターを含む。ヒト免疫不全ウイルス (H I N - 1) 由来ベクターは、 この分類に属する。他の例としては、 H I N - 2 に由来するレンチウイルスベクター、 ネコ免疫不全ウイルス (F I N) 、 ウマ感染性貧血ウイルス、 サル免疫不全ウイルス (S I V) 、 及びマエディビスナウイルスが挙げられる。

20

【 0 0 5 9 】

好ましくは改変レトロウイルス、 より一層好ましくは改変レンチウイルスが、 特定の m i R N A 、 s i R N A 、 又は s h R N A を送達するために使用される。このウイルスは、 殺されるべき特定の細胞を標的とするためにキメラ抗原 T 細胞受容体をコードする配列も含み得る。従って、 ポリヌクレオチド及びあらゆる関連遺伝子要素が、 プロウイルスとして宿主細胞のゲノムに組み込まれる。改変レトロウイルスは、 ウィルスの作製に必要な配列並びに m i R N A 、 s i R N A 、 又は s h R N A 及び / 又は C A R を含むウイルスベクターから、 好ましくはパッケージング細胞で作製される。ウイルスベクターは、 m i R N A 、 s i R N A 、 又は s h R N A の発現を促進する遺伝要素、 例えば、 プロモーター及びエンハンサー配列も含み得る。標的細胞での複製を防止するために、 複製に必要な内在性ウイルス遺伝子を除去することができる。

30

【 0 0 6 0 】

C D 8 + T 細胞及び P T P N 2 阻害剤を含む組成物は、 癌特異的抗原及び / 又は細胞を殺すのを強める 1 つ以上のサイトカイン (例えば、 I L - 2 又は I F N) をさらに含み得る。単離、 濃縮、 又は精製 C D 8 + T 細胞を含む組成物中に抗原が存在する場合は、 この抗原は、 独立した存在物として、 又は C D 8 + T 細胞に存在する T 細胞受容体又は C A R とこの抗原が相互作用できるあらゆる関連で存在し得る。抗原が、 C D 8 + T 細胞の T C R と相互作用できる場合は、 この C D 8 + T 細胞を活性化させることができる。抗原が C D 8 + T C R によって認識され得るように抗原を組成物中に含めることができる様々な実施形態の例は、 限定されるものではないが、 抗原提示細胞、 例えば、 樹状細胞、 マクロファージ、 又は特定の活性化された上皮細胞の表面に M H C - 1 に結合されて存在する抗原 (又は動物モデルでの同等の提示) を含む。別法では、 抗原は、 C D 8 +

40

50

T細胞上のT C Rによる抗原の認識を容易にし得るその他の天然若しくは合成分子又は他の化合物、複合体、存在物、基質などと物理的に結合することができる。例えば、抗原は、MHC-1又は他の適切な分子と複合体を形成してこの抗原をCD8+ T C Rに提示することができ、このMHC-1又は他の適切な分子は、基質、例えば、ラテックスビード、任意のプレートのプラスチック表面、又はその他の適切な基質に物理的に結合して、抗原のCD8+ T細胞 T C Rへの適切なアクセスを容易にすることができ、これにより、抗原がCD8+ T細胞によって認識される。

【0061】

CD8+ T細胞は、T細胞表面マーカーに基づいてT細胞を区別して分離するルーチンの細胞選別技術を用いて得ることができ、この細胞選別技術は、本発明の組成物及び方法に使用されるCD8+ T細胞の単離された集団を得るために使用することができる。例えば、血液及び/又は末梢血リンパ球を含む生物学的サンプルは、市販の装置及び試薬を用いてこのサンプルから単離された個々のCD8+ T細胞から得ることができ、これにより、CD8+ T細胞の単離された集団が得られる。マウスCD8+ T細胞は、さらなる細胞表面マーカー、例えば、CD44、L-セレクチン(CD62L)、CD25、CD49d、CD122、CD27、CD43、CD69、KLRG-1、CXCR3、CCR7、IL-7R、及びKLRG-1の使用によって表現型を基準にさらに特徴付け、かつ/又は単離することができる。CD8+ T細胞は、CD4+細胞、NK1.1+細胞、B220+細胞、CD11b+細胞、TER119+細胞、Gr-1+細胞、CD11c+細胞、及びCD19+細胞の陰性選択によって最初に濃縮することができる。ナイーブCD8+ T細胞は、CD44 low、CD62L high、CCR7 high、CD25 low、CD43 low、CD49d low、CD69 low、IL-7R high、及びCD122 lowとして特徴付けられ、抗原曝露記憶T細胞は、CD44 high、CD49d high、CD122 high、CD27 high、CD43 high、及びCXCR3 highである。記憶CD8+ CD44 high T細胞は、リンパ組織常在型中心記憶T細胞(CD62L high、CCR7 high)及び非リンパ組織常在型エフェクター記憶T細胞(CD62L low、CCR7 low)にさらに細分することができる(Klonowski et al. Immunity 2004, 20: 551-562)。CD8+ T細胞の単離された集団は、任意の適切な容器、装置、細胞培地、システムなどでPTPN2及び/又は抗原と混合することができ、様々な所望の細胞障害性T細胞の特徴のいずれかを有するようにT細胞を増殖させ、かつ/又は成熟させ、かつ/又は分化させるために、in vitroで培養し、かつ/又は1つ以上の抗原及びその他の試薬又は細胞培地に曝露することができる。

【0062】

ヒトCD8+ T細胞型及び/又は集団は、表現型細胞表面マーカーCD62L、CCR7、CD27、CD28、及びCD45RA又はCD45ROを用いて同定することができる(Sallusto F et al. Nature 1999, 401: 708-712)。本明細書で使用されるCD8+ T細胞型及び/又は集団は、細胞表面マーカーの発現の以下の特徴又はパターンを有する:ナイーブT細胞は、CD45RA+、CD27+、CD28+、CD62L+、及びCCR7+として特徴付けられ;CD45RO+中心記憶T細胞は、CD45RA-、CD27+、CD28+、CD62L+、及びCCR7+として特徴付けられ;CD45RO+エフェクター記憶T細胞は、これら5つのマーカー(CD45RA-、CD27-、CD28-、CD62L-、及びCCR7-)の発現の欠損によって定義され;そして最終分化したエフェクター記憶CD45RA+ T細胞は、CD45RO+、CCR7-、CD27-、CD28-、CD62L-として特徴付けられる。最終分化したエフェクター記憶細胞は、マーカー、例えば、CD57、KLRG1、CX3CR1をさらに上方制御し、かつ、高レベルのグランザイムA及びB、パーフォリン、並びにIFN- γ を産生するそれらの能力によって特徴付けられる強い細胞障害性を示す。従って、T細胞の様々な集団を、それらの発現又はこれらのマーカー

10

20

30

40

50

の発現の欠損に基づいて他の細胞から、及び／又は互いに分離することができる。この方式では、本発明は、CD8+ T細胞の異なる集団を分離する方法、及びCD8+ T細胞の分離又は単離された集団も提供する。本明細書に記載のCD8+ T細胞型は、当分野で公知のその他の適切な方法で単離することもでき；例えば、特定の1又は複数の抗原が、抗原特異的CD8+ T細胞を産生するために使用される場合は、これらの細胞は、この1又は複数の抗原を用いる親和性精製によって他の細胞から分離又は単離することができ；適切なプロトコルは当分野で公知である。

【0063】

異なるCD8+ T細胞型はまた、例えば：IFNの分泌；IL-2の分泌；グランザイムBの産生；FasLの発現；及びCD107の発現を含む、特定の機能も示し得る。しかしながら、細胞表面マーカーの発現パターンは、本明細書に記載のそれぞれの特定のCD8+ T細胞型及び／又は集団の特徴と見なされ、それぞれの細胞型及び／又は集団の機能的属性は、細胞が受ける刺激の程度によって異なり得る。

10

【0064】

T細胞のエフェクター機能又は特性は、これらのT細胞受容体の抗原：標的細胞上のMHC複合体との特定の結合、又はCAR T細胞の場合は、キメラ抗原受容体、例えば、scFvの標的細胞上に発現される抗原との相互作用に応答してこれらが放出するエフェクター分子によって決定することができる。細胞障害性CD8+ T細胞によって放出され得る細胞障害性エフェクター分子は、パーフォリン、グランザイムA及びB、グラニュライシン、並びにFasリガンドを含む。一般に、脱顆粒時に、パーフォリンは、それ自身が標的細胞の原形質膜の中に進入して孔を形成し、グランザイムは、アポトーシス（細胞死の形）を引き起こし得るセリンプロテアーゼであり、グラニュライシンは、標的細胞にアポトーシスを誘導し、かつFasリガンドも、アポトーシスを誘導し得る。典型的には、これらの細胞障害性エフェクター分子は、放出まで細胞内の溶解性顆粒中に保存される。細胞障害性T細胞によって放出され得る他のエフェクター分子は、IFN、TNF-、及びTNF-を含む。IFN-は、ウイルスの複製を阻害し、マクロファージを活性化させ得る一方、TNF-及びTNF-は、マクロファージの活性化及び標的細胞の殺傷に寄与し得る。本発明のいずれの方法でも、PTPN2阻害剤に接触された細胞の投与又は再導入の前に、これらの細胞は、グランザイムA及びB、パーフォリン、及びIFNを含む細胞障害性エフェクターT細胞を特定する表面及び細胞内マーカーに対する蛍光色素結合抗体を用いるフローサイトメトリーによって、それらの細胞障害活性について評価される。

20

【0065】

活性化T細胞は、既にG0期ではない細胞であり、1つ以上の細胞毒、サイトカイン、及び／又は本明細書に記載の細胞型（例えば、CD8+）に特徴的な他の膜関連マーカーを産生し始め、かつ特定のペプチド：その表面のMHC複合体又は抗原のみを提示し、そのエフェクター分子を放出するあらゆる標的細胞を認識して結合することができる。

30

【0066】

T細胞の細胞障害性T細胞の集団への分化を促進する本発明の方法は、細胞障害性T細胞の集団の統計的に有意な増加をもたらす。集団は、適切な対照、例えば、本発明の方法での処置前の集団のサイズなどに対して、細胞が少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%多い量で存在する場合は増加している。細胞障害性CD8+ T細胞のエフェクター機能は、適切な対照、例えば、特定の事象又は条件の非存在下での特定のアッセイにおける細胞のサンプルの能力などに対して、細胞が少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%以上の機能を有する場合は増加している。必要に応じて、in vivoでの細胞集団のin vivo機能又は存在を、in vitroアッセイで対象から単離された細胞を用いて測定することができる。

40

【0067】

細胞の「濃縮された」又は「精製された」集団は、例えば、対象の体内に見られる細胞

50

と比較した、又は P T P N 2 阻害剤への曝露前の比率と比較した、特定の細胞の他の細胞に対する比率の増加である。一部の実施形態では、細胞の濃縮された又は精製された集団において、特定の細胞は、全細胞集団の少なくとも 20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、又は 99% を含む。細胞の集団は、1 つ以上の細胞の表面マーカー及び/又は特性によって定義することができる。

【0068】

本明細書に記載の細胞障害性 T 細胞の少なくとも 1 つの特性を示す P T P N 2 阻害剤に曝露又は接触された C D 8 + T 細胞は、対象に投与されると、腫瘍細胞に対して細胞障害性 T 細胞応答を引き起こす。好ましくは、腫瘍細胞に対するこの C T L 応答は、標的抗原を有する腫瘍細胞の細胞死、例えば、溶解の誘発に有効である。P T P N 2 阻害剤に曝露又は接触された C D 8 + T 細胞を、例えば、注射、注入、塗布、植え込み、経口摂取、又は局所投与、又はこれらの任意の組み合わせを含む任意の方法によって対象に与えることができる。注射は、例えば、静脈内、筋肉内、皮内、皮下、又は腹腔内であり得る。過度の実験なしで当業者が決定することができる、癌、その重症度、及び対象の全体的な健康状態によって決まる所与の期間に亘って、単回又は複数回の投与を行うことができる。注射は、複数の部位で行うことができる。C D 8 + T 細胞の投与は、単独としても良いし、又は他の治療薬と組み合わせても良い。各用量は、約 10×10^3 の C D 8 + T 細胞、 20×10^3 の細胞、 50×10^3 の細胞、 100×10^3 の細胞、 200×10^3 の細胞、 500×10^3 の細胞、 1×10^6 の細胞、 2×10^6 の細胞、 20×10^6 の細胞、 50×10^6 の細胞、 100×10^6 の細胞、 200×10^6 、 500×10^6 、 1×10^9 の細胞、 2×10^9 の細胞、 5×10^9 の細胞、及び 10×10^9 の細胞などを含み得る。投与頻度は、例えば、1 週間に 1 回、1 週間に 2 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回、4 週間に 1 回、1 か月に 1 回、2 か月に 1 回、3 か月に 1 回、4 か月に 1 回、5 か月に 1 回、及び 6 か月に 1 回などであり得る。投与が行われる合計日数は、1 日、2 日、又は 3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、16 日、17 日、18 日、19 日、又は 20 日などであり得る。所与の投与は、同じ日に 2 回以上の注射を伴うこともあることを理解されたい。投与のために、投与される C D 8 + T 細胞の少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 99% が、細胞障害性 T 細胞の少なくとも 1 つの特性を示す。

【0069】

本明細書は、特にヒトでの適用について述べるが、本発明は、動物用にも有用であることを明確に理解されよう。従って、全ての態様において、本発明は、家畜、例えば、ウシ、ヒツジ、ウマ、及び家禽；ペット、例えば、ネコ及びイヌ；並びに動物園の動物に有用である。従って、「対象」又は「処置されるべき/処置される対象」という一般的な語は、増強された免疫応答を必要とする全ての動物（例えば、ヒト、類人猿、イヌ、ネコ、ウマ、及びウシ）、例えば、癌を有する対象を含むことを理解されよう。

【0070】

本明細書で使用される「e x v i v o」又は「e x v i v o 療法」という語は、細胞が、患者又は適切な代替の供給源、例えば、適切な同種異系ドナーから得られ、そして改変され、これにより、改変された細胞を使用して疾患を処置することができ、この疾患が、改変された細胞によってもたらされる治療効果によって改善される療法を指す。処置は、改変された細胞の患者への投与又は再導入を含む。e x v i v o 療法の恩恵は、処置による不所望の副作用に患者が曝されずに患者に処置の恩恵を与える能力である。

【0071】

「投与された」という語は、それぞれの細胞を含む、治療有効量の上述の組成物の個人への投与を意味する。「治療有効量」とは、投与されると効果をもたらす用量のことである。正確な用量は、処置の目的により、公知の技術を用いて当業者が確認することができる。当分野で公知であり、上記記載のように、全身送達か局所送達かの調整、年齢、体重

10

20

30

40

50

、全体的な健康状態、性別、食事、投与時間、薬物相互作用、及び状態の重症度が必要であり得、これらは、当業者によるルーチンの実験によって確認することができる。

【0072】

処置を必要とする対象は、良性の前癌状態の又は非転移性の腫瘍、並びに癌の発生又は再発が防止される腫瘍を既に有する対象を含む。対象は、腹水及び／又はリンパ節に存在する転移性細胞を含む転移性細胞を有し得る。

【0073】

処置の目的又は結果は、癌細胞の数を減少させること；原発腫瘍のサイズを縮小させること；癌細胞の末梢器官への浸潤を抑制する（即ち、ある程度まで遅くする、好ましくは停止する）こと；腫瘍の転移を抑制し（即ち、ある程度まで遅くする、好ましくは停止し）、腫瘍の成長をある程度まで抑制すること；及び／又は障害に関連した1つ以上の症状をある程度まで軽減することであり得る。

10

【0074】

処置の効果は、生存期間、疾患の進行までの時間、奏功率（RR）、応答期間、及び／又は生活の質を評価することによって測定することができる。

【0075】

本方法は、疾患の進行までの時間を延ばすのに特に有用である。

【0076】

本方法は、全生存期間及び無進行生存期間を含むヒトの生存期間を延ばすのに特に有用である。

20

【0077】

本方法は、癌の全ての兆候が処置に応答して消失する、治療に対する完全な応答を提供するのに特に有用である。これは、必ずしも癌が治癒したことを意味するものではない。

【0078】

本方法は、処置に応答して1つ以上の腫瘍若しくは病変のサイズ又は体内の癌の範囲が縮小する、治療に対する部分的な応答を提供するのに特に有用である。

【0079】

処置の目的又は結果は、以下のいずれか1つ以上であり得る：

- ・癌細胞の数を減少させること；
- ・原発腫瘍のサイズを縮小させること；
- ・癌細胞の末梢器官への浸潤を抑制する（即ち、ある程度まで遅くし、好ましくは停止する）こと；
- ・腫瘍の転移を抑制する（即ち、ある程度まで遅くし、好ましくは停止する）こと；
- ・腫瘍の成長をある程度まで抑制すること；
- ・障害に関連した1つ以上の症状をある程度まで軽減すること。

30

【0080】

一実施形態では、処置を必要とする動物は、良性の前癌状態の非転移性腫瘍を有する動物を含む。

【0081】

一実施形態では、癌は、前癌状態又は前新生物である。

40

【0082】

一実施形態では、癌は、二次癌又は転移癌である。二次癌は、あらゆる器官又は組織、特に、比較的高い血行力学的压力を有する器官又は組織、例えば、肺、肝臓、腎臓、脾臓、腸、及び脳に存在し得る。二次癌は、腹水及び／又はリンパ節で検出され得る。

【0083】

一実施形態では、癌は、実質的に検出不可能であり得る。

【0084】

「前癌状態」又は「前新生物状態（pre-neoplasia）」は、一般に、典型的には癌に進行する又は癌を発症する状態又は成長を指す。「前癌状態」の成長は、細胞周期のマーカーによって決定することができる異常な細胞周期の調節、増殖、又は分化に

50

よって特徴付けられる細胞を含み得る。

【0085】

一実施形態では、癌は、前癌状態又は前新生物である。

【0086】

一実施形態では、癌は、二次癌又は転移癌である。二次癌は、あらゆる器官又は組織、特に、比較的高い血圧を有する器官又は組織、例えば、肺、肝臓、腎臓、脾臓、腸、及び脳に存在し得る。

【0087】

一実施形態では、癌は、細胞表面腫瘍抗原 Her - 2 を発現する。細胞表面腫瘍抗原 Her - 2 を発現する癌の一例として肉腫が挙げられる。

10

【0088】

癌の他の例として、芽細胞腫（髄芽腫及び網膜芽腫を含む）、肉腫（脂肪肉腫及び滑膜細胞肉腫を含む）、神経内分泌腫瘍（カルチノイド腫瘍、ガストリノーマ及び膵島細胞癌を含む）、中皮腫、神経鞘腫（聴神経腫を含む）、髄膜腫、腺癌、メラノーマ、白血病又はリンパ性悪性疾患、小細胞肺癌（SCLC）を含む肺癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌、肺表皮癌（epidermoid lung cancer）、腹膜癌、肝細胞癌、消化管癌を含む胃癌（gastric or stomach cancer）、膵臓癌、グリア芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌（転移性乳癌を含む）、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（kidney or renal cancer）、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆道の腫瘍、並びに頭頸部癌が挙げられる。

20

【0089】

前新生物、新生物、及び転移性疾患は、本発明の方法を適用することができる特定の例である。広い例として、乳房腫瘍、大腸腫瘍、腺癌、中皮腫、膀胱腫瘍、前立腺腫瘍、胚細胞腫瘍、肝癌 / コロンジオ（cholangio）、癌腫、神経内分泌腫瘍、下垂体腫瘍、小円形細胞腫瘍、扁平上皮癌、黒色腫、非定型的線維黄色腫、精上皮腫、非精上皮腫、間質ライディッヒ細胞腫、セルトリ細胞腫、皮膚腫瘍、腎腫瘍、精巣腫瘍、脳腫瘍、卵巣腫瘍、胃腫瘍、口腔腫瘍、膀胱腫瘍、骨腫瘍、頸部腫瘍、食道腫瘍、喉頭腫瘍、肝臓腫瘍、肺腫瘍、腫瘍、及びウィルムス腫瘍が挙げられる。

30

【0090】

特定の癌の他の例として、限定されるものではないが、腺癌、腺腫、腺線維腫、腺リンパ腫、アドントーマ（adontoma）、AIDS関連癌、聴神経腫、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、腺癌腫、副腎皮質癌、原発性骨髄線維症、脱毛症、胞状軟部肉腫、エナメル上皮腫、角化血管腫、好酸球性血管リンパ球増殖症、硬化性血管腫、血管腫症、アプローマ、肛門癌、血管肉腫、再生不良性貧血、星状細胞腫、毛細血管拡張性運動失調、基底細胞癌（皮膚）、膀胱癌、骨癌、腸癌、脳幹神経膠腫、脳及びCNS腫瘍、乳癌、鰓腫、CNS腫瘍、カルチノイド腫瘍、子宮頸癌、小児期脳腫瘍、小児期癌、小児期白血病、小児期軟部組織肉腫、軟骨肉腫、絨毛癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸直腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、癌腫（例えばウォーカー癌、基底細胞癌、基底扁平上皮細胞癌、ブラウン・ペアス癌、腺管癌、エーリッヒ腫瘍、クレブス2癌、メルケル細胞癌、ムチン様癌、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭様癌、硬性癌、細気管支癌、気管支原性癌、扁平上皮細胞癌、及び移行性細胞癌）、癌肉腫、子宮頸部異形成、葉状囊肉腫、セメント腫、脊索腫、分離腫、軟骨肉腫、軟骨芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、胆管細胞腫、コレステリン腫、円柱腫、囊胞腺癌、囊腺腫、隆起性皮膚纖維肉腫、纖維形成性小円形細胞腫、腺管癌、未分化胚細胞腫、内分泌癌、子宮内膜癌、上衣細胞腫、食道癌、ユーリング肉腫、肝外胆管癌、眼癌、眼：黑色腫、網膜芽細胞腫、卵管癌、ファンコーニ貧血、纖維腫、纖維肉腫、胆囊癌、胃癌、消化管癌、消化管カルチノイド腫瘍、尿生殖器癌、胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛疾患、神経膠腫、婦人科癌、巨細胞腫、神経節神経腫、神経膠腫、グロムス血管腫、顆粒層細胞腫、半陰陽性卵巣腫瘍、血液学的悪性疾患、毛様細胞性白血

40

50

病、頭頸部癌、肝細胞癌、遺伝性乳癌、組織球増殖症、ホジキン病、ヒトパピローマウイルス、胞状奇胎、高カルシウム血症、下咽頭癌、過誤腫、血管内皮腫、血管腫、血管周囲細胞腫、血管肉腫、血管肉腫、組織球障害、組織球増殖性悪性疾患、組織球腫、肝細胞腫、汗腺腫、ホンドロ肉腫(hondrosarcoma)、免疫増殖性小(immunoproliferative small)、オポーマ(opoma)、オントラオーキュラー黒色腫(contralateral melanoma)、島細胞癌、カポジ肉腫、腎臓癌、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、喉頭癌、平滑筋肉腫、白血病、リ・フラウメニ症候群、口唇癌、脂肪肉腫、肝臓癌、肺癌、リンパ水腫、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、レイゴミオ肉腫(legiomyosarcoma)、白血病(例えばB細胞、混合細胞、ヌル細胞、T細胞、T細胞慢性、HTLV-II関連、リンパ管肉腫、リンパ球性急性、リンパ球性慢性、肥満細胞、及び骨髄性)、白血肉腫、ライディッヒ細胞腫、脂肪肉腫、平滑筋腫、平滑筋肉腫、リンパ管腫、リンパ管細胞腫、リンパ管腫、リンパ管筋腫、リンパ管肉腫、男性乳癌、悪性腎横紋筋肉腫様腫瘍、髄芽細胞腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、転移性癌、口腔癌、多発性内分泌腺腫症、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄腫、骨髄増殖性障害、悪性カルチノイド症候群カルチノイド心疾患、髄芽細胞腫、髄膜腫、黒色腫、間葉細胞腫、中腎腫、中皮腫、筋芽細胞腫、筋腫、筋肉腫、粘液腫、粘液肉腫、鼻腔癌、鼻咽頭癌、腎芽細胞腫、神経芽細胞腫、神経纖維腫症、ナイマー・ヘン染色体不安定症候群、非黒色腫皮膚癌、非小細胞肺癌(nsclc)、神経鞘腫、神経芽細胞腫、神経上皮腫、神経線維腫症、神経纖維腫、神経腫、新生物(例えば、骨、乳房、消化系、結腸直腸、肝臓)、眼癌、食道癌、口腔癌、中咽頭癌、骨肉腫、造瘻術卵巣癌、腋臓癌、副鼻腔癌、副甲状腺癌、耳下腺癌、陰茎癌、末梢性神経外胚葉性腫瘍、下垂体癌、真性赤血球增加症、前立腺癌、骨腫、骨肉腫、卵巣癌、乳頭腫、傍神経節腫、非クロム親和性傍神経節腫、松果体腫、形質細胞腫、癌原遺伝子、稀な癌及び関連疾患、腎細胞癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、ロートムント・トムソン症候群、細網内皮症、横紋筋腫、唾液腺癌、肉腫、神経鞘腫、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌(sclic)、小腸癌、軟部組織肉腫、脊髄腫瘍、扁平上皮癌(皮膚)、胃癌、滑膜肉腫、肉腫(例えば、ユーイング実験的肉腫、カポジ肉腫、及び肥満細胞肉腫)、セルトリ細胞腫、滑膜腫、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、移行上皮癌(膀胱)、移行上皮癌(腎孟/尿管)、栄養膜癌、奇形腫、卵胞膜細胞腫、胸腺腫、栄養膜腫瘍、尿道癌、尿路系癌、ウロプラキン(uroplakin)、子宮肉腫、子宮癌、腫瘍、外陰部癌、ワルデンストレームマクログロブリン血症、及びウィルムス腫瘍が挙げられる。

【0091】

本明細書で開示され定義される本発明は、上述又は本文若しくは図面から明らかとなる2つ以上の個々の特徴の全ての代替の組み合わせにまで及ぶことを理解されたい。全てのこれらの異なる組み合わせが、本発明の様々な代替の態様を構成する。

【0092】

[実施例1]

[マウス]

$Pt\text{pn}^{2\text{ f 1}}/\text{f 1}$ (C57BL6)、Lck-Cre; $Pt\text{pn}^{2\text{ f 1}}/\text{f 1}$ (C57BL6)、及びRIP-mOVA (C57BL6)を、餌及び水を自由に摂取できる状態の温度が制御されたハイバリア設備内で12時間の明暗サイクルで維持した。6~10週齢の雌レシピエントマウス及び3~6週齢の雄又は雌ドナーマウスを養子移入に使用した。ex vivo実験では、雄又は雌マウスのいずれかを使用した; $Pt\text{pn}^{2\text{ f 1}}/\text{f 1}$ 及びLck-Cre; $Pt\text{pn}^{2\text{ f 1}}/\text{f 1}$ 又は対応するOT-1マウスは性別を合わせた。 $Pt\text{pn}^{2\text{ f 1}}/\text{f 1}$ 及びLck-Cre; $Pt\text{pn}^{2\text{ f 1}}/\text{f 1}$ マウス及び対応するOT-1 TCRトランスジェニックマウスは既に説明した(Weide FW (2013) Nature Commun In press.)。RIP-mOVAトランスジェニックマウス(Kurts C, et al. (1996) Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. The Jour

10

20

30

40

50

nal of Experimental Medicine 184 (3) : 923 - 930.) は、 Bill Heath (University of Melbourne, Australia) から提供された。

【0093】

[材料]

組換えマウス IL-2 を Peprotech から購入した。 SIIINFEKL ペプチドを JPT Peptide Technologies から購入した。 ハムスター - マウス CD3 (145 - 2C11) 、 - マウス CD28 (37.51) 、 及び FITC - Annexin V Apoptosis Detection Kit I を BD Biosciences から購入した。 FoxP3 Staining Buffer Set 及び Cell Stimulation Cocktail (及びタンパク質輸送阻害剤) を eBiosciences から購入した。 ウシ胎仔血清 (HyClone) を Thermo Scientific から購入し、 ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D - PBS) 及び 1640 RPMI を Invitrogen から購入した。

【0094】

[フローサイトメトリー]

切除されたばかりの LN の単一細胞懸濁液を、 既に記載されたフローサイトメトリーにかけた (Weide FW (2013) Nature Commun In press.) 。 表面染色では、 細胞 ($1 \times 10^6 / 10 \mu l$) を D - PBS / 2% FBS に懸濁し、 96 ウエルマイクロタイタープレート (Falcon, BD Biosciences) で、 氷上で 20 分間染色した。 選別では、 細胞を、 15 ml ファルコンチューブ (BD Biosciences) で、 氷上で 30 分間染色した。 細胞を洗浄し、 D - PBS / 2% FBS で再懸濁し、 LSRII (BD Biosciences) を用いて分析する、 又は Influx sorter (BD Biosciences) を用いて精製した。 精製された CD8 + CD62Lhi CD44^{1°} T 細胞を、 純度 (99% 超) についてルーチン的に試験した。 データを FlowJo7 (Tree Star Inc.) ソフトウェアを用いて分析した。

【0095】

[抗体]

BD Pharmingen (San Jose, CA) からの次の抗体を染色に使用した : フルオレセイン - イソチオシアネート (FITC) 結合又は BD Horizon (商標) V450 結合 - CD44 (IM7) 、 フィコエリトリン (PE) 結合又は アロフィコシアニン (APC) 結合 - CD62L (MEL-14) 、 パシフィック・ブルー結合又は Alexa Fluor 647 結合 - CD8 (53-6.7) 、 PE 結合 - CD25 (PC61) 、 PE 結合 TCR - V2 (B20.1) 、 PE 結合 TCR - V5.1 / 5.2 (MR9-4) 、 及び PE シアニン染料 7 (Cy7) - CD69 (H1.2F3) 。 PE 結合 - IFN (XMG1.2) 及び FITC 結合 グランザイム B (GB11) は Biologend から購入した。

【0096】

[CTL 活性の評価]

3 ~ 4 週齢の OT - 1 マウスのナイーブ CD8⁺ (CD62Lhi CD44^{1°}) LN T 細胞 (20×10^5) を FACS によって精製し、 これを、 RIP - mOVA マウスの尾静脈に静脈注射した。 移入から 9 日後に、 脾臓 LN を回収してホモジナイズした。 細胞を 1640 RPMI complete で再懸濁し、 Cell Stimulation Cocktail [ホルボール 12 - ミリスチン酸 13 - アセテート (PMA) 、 イオノマイシン (Ionomycin) 、 ブレフェルジン、 及びモネンシンを含む] で、 37 度 5 時間刺激した。 細胞を固定し、 製造者の取扱説明書に従って FoxP3 Staining Buffer Set で透過処理した。 細胞を、 CD8 、 TCR - V2 、 TCR - V5 、 IFN 、 及び グランザイム B に対する蛍光色素結合抗体で染色し、 フローサイトメトリーによって分析した。

【0097】

[疾患の評価及び組織学]

RIP-mOVAマウスにおける糖尿を、Diastix (Bayer) を用いて監視し、Accu-Check glucometer (Roche) を用いて血糖値を測定した。2日違いの2つの陽性測定値(尿糖 55 mmol/l)後にマウスを糖尿病として評点した。臍臓を摘出して、ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。臍臓切片を、既に記載されたインスリン又はグルカゴンについて染色した (Merry TL, et al. (2013) 高脂肪食を与えた肥満Gpx-1欠損マウスは、不完全なインスリン分泌を示すが、肝脂肪変性及び肝臓の損傷から保護されている (High fat fed obese Gpx1-deficient mice exhibit defective insulin secretion but protection from hepatic steatosis and liver damage) Antioxidants & redox signaling)。ヘマトキシリン及びエオシン染色 (H&E) 臍臓切片の盲目組織学的分析を行ってインスリンの程度を決定した(グレード0~4)。グレード0は、非浸潤を表し、グレード1は、単核細胞の臍管集積を表し、グレード2は、単核細胞の周囲集積を表し、グレード3は、臍島内浸潤を表し、そしてグレード4は、重度の構造的障害及び細胞の完全な消失を表す。全ての臍島は、100 μm離れた3つの切片から評点した。グレード0~4の臍島の割合はそれぞれ、評点された臍島の総数のパーセンテージとして決定され示された。

【0098】

[RIP-mOVAマウスへの養子移入]

RIP-mOVAマウスにおけるI型糖尿病の導入のために、3~4週齢のOT-1マウスからの 2.5×10^5 、 8×10^5 、又は 20×10^5 のCD8⁺CD62L^{hi}CD44¹°ナイーブLN T細胞をFACSで精製し、これをRIP-mOVAマウスの尾静脈に静脈注射した。CD8⁺OT-1 T細胞ドナー細胞を、CD8⁺及びTCR-V²⁺TCR-V⁵⁺細胞のゲーティングによって同定した。OT-1マウスからのCD8⁺CD62L^{hi}CD44¹°ナイーブLN T細胞のin vivo増殖反応を評価するために、3~4週齢のマウスからの 2×10^6 のCFSE染色細胞を、RIP-mOVAマウスの尾静脈に静脈内導入した。増殖性ドナーCD8⁺OT-1 T細胞を、CD8⁺及びTCR-V²⁺CFSE⁺細胞のゲーティングによって同定した。

【0099】

[in vitro刺激]

TCRトランスジェニックOT-1又は非トランスジェニックマウスからのCFSE染色又は非染色CD8⁺CD62L^{hi}CD44¹°ナイーブLN T細胞(1×10^5 /ウェル)を、96ウェル丸底プレートにおいて $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ SIIINFEKLで36時間、又はプレート結合-CD3($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)及び-CD28($5 \mu\text{g}/\text{ml}$)で48時間刺激した。活性化状態を決定するために、細胞を回収し、-CD25、-CD44、及び-CD69に対する蛍光色素結合抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0100】

[in vitroアポトーシス]

TCRトランスジェニックOT-1マウスからのCD8⁺CD62L^{hi}CD44¹°ナイーブLN T細胞(2×10^5 /ウェル)を、96ウェル丸底プレートにおいて $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ SIIINFEKLで18時間刺激した。細胞を回収し、FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kitで染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。定量のために、Calibrite Beads (BD Biosciences)をウェルに添加してから細胞を回収した。細胞を、プロピジウムヨウ化物(PI)⁻、アネキシンV⁻(生)、プロピジウムヨウ化物(PI)⁻アネキシンV⁺(アポトーシス)、及びプロピジウムヨウ化物(PI)⁺アネキシンV⁺(壞死)として分類した。

10

20

30

40

50

【0101】

[エフェクター/記憶T細胞のin vitro産生]

CD8⁺CD62L^{hi}CD44¹°ナイーブLN T細胞(1×10^5 / ウエル)を、96ウェル丸底プレートにおいて、既に記載されたプレート結合 - CD3 (10 µg / ml) 及び - CD28 (5 µg / ml) で刺激した (Weide FW (2013) *Nature Commun In press*.)。刺激の48時間後に、細胞を回収し、洗浄し、細胞数をカウントし、 0.5×10^5 の細胞 / ウエルを、 - CD3 / - CD28 の存在下で、平底96ウェルプレートでマウスIL-2 (20 ng / ml)と共にインキュベートした。IL-2の投与から2日後及び4日後に、細胞をCD44及びCD62Lに対する蛍光色素結合抗体で染色し、エフェクター/記憶T細胞の産生を、フローサイトメトリーによって Calibrите Beads (BD Biosciences) で定量した。

10

【0102】

[CFSE染色]

CFSE (Invitrogen - Molecular Probes) 希釈によるT細胞の増殖の評価のために、リンパ球(1×10^7 / ml)を、0.1% (v/v) BSAが添加されたD-PBSで再懸濁した。CFSEを5 µMの最終濃度で添加し、細胞を、室温で5分間インキュベートした。次いで、細胞を、養子移入又はin vitro刺激の前に、10% (v/v) FBSが添加されたD-PBSで3回洗浄した。

20

【0103】

[統計分析]

統計分析を、2-tailed Mann-Whitney U Testを用いるノンパラメトリックを使用するGraphpad Prismソフトウェアで行った。Kaplan-Meier推定法での統計分析を、自由度が1のLog-rank (Mantel-Cox) 試験を用いて行った。両方の試験では、p < 0.05 は有意とみなした。

【0104】

[動物倫理]

全ての実験は、NHMRC Australian Code of Practice for the Care and Use of Animalsに従って行った。全てのプロトコルは、Monash University School of Biomedical Sciences Animal Ethics Committeeによって承認された (Ethics number: MARP/2012/124)。

30

【0105】

[実施例2]

[PTPN2欠損OT-I CD8⁺ T細胞が、CD4+helpの非存在下でRIP-mOVAマウスの1型糖尿病を促進する]

CD8⁺ T細胞の交差プライミング (cross-priming) におけるPTPN2欠損の結果及び自己免疫性糖尿病の発症を調べるために、本発明者らは、RIP-mOVAマウスを利用した (Kurts C, et al. (1996) *The Journal of Experimental Medicine* 184 (3): 923-930.)。RIP-mOVAマウスは、脾臓の細胞及び腎臓の腎近位尿細管細胞で膜結合型のオボアルブミン (OVA) を発現する (Kurts C, et al. (1996) *The Journal of Experimental Medicine* 184 (3): 923-930.)。しかしながら、RIP-mOVAマウスでの「自己」としてのOVAの胸腺発現は許容される。OT-Iマウスは、CD8⁺ 単一陽性共線細胞を選択するOVAペプチド²⁵⁷SIINFEKL²⁶⁴ (K^b クラスI MHCとの関連で提示される) に特異的なV2/V5 TCRを発現する (Hogquist KA, et al. (1994) *Cell* 76 (1): 17-27.)。ナイーブOT-I CD8⁺ T細胞のみのRIP-mPVAマウスへの養子移入により、「自己反応性」

40

50

OT - I CD 8 + T 細胞の交差提示及び除去が起こる。この交差寛容のプロセスは、OVA 特異的 CD 4 + T 細胞の共移入によって阻害され、交差プライミングが起こり、細胞が破壊され、そして 1 型糖尿病が発症する。以前の研究により、寛容及び 1 型糖尿病の消失は、Rag 1 - / - 背景の多数の OT - I ドナー T 細胞の移入によっても引き起こされ得るが、C57BL/6 背景の OT - I T 細胞を利用する後の研究により、それ自体のナイーブ OT - I CD 8 + T 細胞が、[たとえ、 10×10^6 の OT - I CD 8 + T 細胞の移入後でも] 1 型糖尿病を引き起こさないことが分かった。CD 8 + T 細胞の交差プライミング及び 1 型糖尿病の発症に対する PTPN2 欠損の影響を評価するため、Ptpn2^{f1/f1} 及び Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} マウスを、OT - I TCR トランスジェニック背景で交配した。ナイーブ (CD44¹⁰ CD62L^{hi}) OT - 1; Ptpn2^{f1/f1} 及び OT - I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} CD 8 + T 細胞を、RIP-mOVA レシピエントに移入して、糖尿病 (尿糖 > 50 mM) の発症及び生存を監視した。予想通り、 $2.5 \sim 8 \times 10^5$ の OT - 1; Ptpn2^{f1/f1} 対照 CD 8 + T 細胞を受け取ったマウスは、70 日が経過しても糖尿病 / 病的状態の一切の兆候を示さず (図 1)、末梢寛容の誘導に一致していた。対照的に、 8×10^5 の OT - I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} CD 8 + T 細胞を受け取ったマウスは、早くも移入から 7 日後に尿糖値の上昇及び糖尿病を示し、マウスの 100% が、養子移入から 14 日以内に重度の脱水症になった (図 1 a)。

【0106】

同様に、 4×10^5 の OT - I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} CD 8 + T 細胞を受け取った 7 匹のマウスのうちの 4 匹は、移入から 15 日後までに高血糖及び糖尿 / 糖尿病を示し (図 1 b)、 2.5×10^5 の OT - I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} CD 8 + T 細胞を受け取った 6 匹のマウスのうちの 4 匹は糖尿を示した (図 1 c)。移入から 11 日後の組織学的分析 [ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) 染色] により、 8×10^5 の OT - I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} CD 8 + T 細胞を受け取ったマウスの糖尿病の発症が、破壊的な膵島炎を伴い、多数の濃縮した核の存在が、残存膵島の閉塞性病変の近傍の細胞アポトーシス及び著しい免疫細胞の浸潤に一致していることが明らかになった (図 2 a)。免疫組織化学的分析により、細胞及び膵島の破壊に一致して、膵島残存におけるグルカゴン染色の減少と共にインスリン染色が著しく減少したことが明らかになった (図 2 b)。対照的に、OT - 1; Ptpn2^{f1/f1} 対照 CD 8 + T 細胞を受け取ったマウスは、膵島の 20% のみが破壊的な膵島炎を示し、残りの膵島は、膵島周囲炎又は非浸潤のいずれかを示した (図 2)。PTPN2 SNP と 1 型糖尿病との関連から、本発明者らは、CD 8 + T 細胞の交差プライミング及び 1 型糖尿病の発症に対する Ptpn2 ヘテロ接合性の影響も評価した。 8×10^5 の OT - 1; Ptpn2^{f1/+} 又は OT - I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/+} CD 8 + T 細胞を、RIP-mOVA レシピエントに移入し、糖尿病の発症を監視した。OT - I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/+} CD 8 + T 細胞を受け取った 12 匹のマウスのうちの 4 匹が、移入から 20 日後までに著しい糖尿 / 糖尿病を示した [p < 0.05; Long Rank (Mantel-Cox) 試験] (図 3)。OT - I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/+} CD 8 + T 細胞を受け取って糖尿病を発症したマウスの移入から 20 日後の組織学的評価により、これが、OT - I; Ptpn2^{f1/+} CD 8 + T 細胞を受け取ったマウスの 20% と比較して、調べた膵島の 50% 超で破壊的な膵島炎に関連していることが明らかになった (図 3)。従って、CD 8 + T 細胞におけるホモ接合性又はヘテロ接合性 PTPN2 欠損は、CD4+he1p の非存在下で、寛容の低下をもたらし、細胞が破壊され、そして自己免疫性糖尿病が発症する。

【0107】

[RIP-mOVA マウスにおける OT - I CD 8 + T 細胞の初期増殖は、PTPN2 欠損によって影響されない]

OT - I CD 8 + T 細胞が、RIP-mOVA マウスの膵臓及び腎臓の排出リンパ

10

20

30

40

50

節で交差提示されると、これらは、初期増殖され、次いで寛容化されて除去される。本発明者らは、PTPN2欠損CD8+T細胞の養子移入に関連した自己免疫性糖尿病の促進が、増殖反応の増強に関係し得るか否かを最初に決定した。CFSE標識ナイーブ(CD44^{1°}CD62L^{hi})OT-1; Ptpn2^{f1/f1}及びOT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CD8+T細胞(2×10⁶)をRIP-mOVAレシピエントに移入し、3日後にCFSE希釈により細胞増殖を評価した(図4)。細胞増殖を、脾臓、腎臓、及び鼠径部LNに存在するT細胞で評価した。細胞増殖において有意差がないことが、脾臓及び腎臓を排出するLNにおけるOT-1; Ptpn2^{f1/f1}及びOT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CD8+T細胞; 3日後に同様の数に分裂したOT-1; Ptpn2^{f1/f1}及びOT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CD8+T細胞から明らかになった(図4)。OVAの発現を脾臓及び腎臓に制限し続けることにより、本発明者らは、鼠径部LNにおける明確なOT-I CD8+T細胞の増殖を一切検出しなかった(図4)。従って、PTPN2欠損に関連した寛容性の低下及び自己免疫性糖尿病の発症は、増殖反応の増強が原因ではあり得ない。

【0108】

[PTPN2欠損は、RIP-mOVAマウスのOT-I CD8+T細胞を分化させる]

次に、本発明者らは、OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CD8+T細胞のRIP-mOVAマウスへの移入後に明らかになる自己免疫性糖尿病が、in vivoでのCD8+T細胞の産生の促進に関連し得るか否かを決定した。ナイーブ(CD44^{1°}CD62L^{hi})OT-1; Ptpn2^{f1/f1}及びOT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CD8+T細胞(8×10⁵)をRIP-mOVAに移入し、そしてCD44^{hi}CD62L^{1°}エフェクター/記憶T細胞の産生を、脾臓及び鼠径部LNで評価した。11日後に、本発明者らは、PTPN2欠損が、脾臓LNにおけるOT-I CD8+T細胞の総数及びCD44^{hi}CD62L^{1°}OT-I CD8+エフェクター/記憶T細胞の総数の両方を増加させたが、鼠径部LNでは増加させなかつことを見出した(図5 a~b)。興味深いことに、鼠径部LNでは、恐らく、OT-I CD8+T細胞の脾臓への移動の結果として、PTPN2欠損OT-I CD8+T細胞の総数が減少した。これらの結果は、脾臓LNでの交差プライミング後に、PTPN2欠損が、OT-I CD8+エフェクター/記憶T細胞の産生を促進することに一致している。OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CD44^{hi}CD62L^{1°}CD8+T細胞がCTL活性を示したか否かを決定するために、本発明者らは、CD8+T細胞を殺すのに重要な2つのタンパク質であるインターフェロン(IFN)及びグランザイムBのレベルを測定した。OT-I CD44^{hi}CD62L^{1°}CD8+T細胞を、ナイーブOT-I; Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CD8+T細胞を受け取ったRIP-mOVAマウスの脾臓LNから単離し、そしてIFN及びグランザイムBのレベルを、PMA/イオノマイシンでの短い再刺激後に細胞内染色によって評価した(図5 c)。PTPN2欠損は、CD8+CTLを産生させた(図5 c)。IFNのレベルは、OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Ptpn2^{f1/f1}T細胞で2倍に上昇した(図5 c)。さらに、グランザイムBは、OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}CD8+T細胞では明確であったが、OT-I; Ptpn2^{f1/f1}対照T細胞では明確ではなく(図5 c)、OT-I; Ptpn2^{f1/f1}対照T細胞が寛容化されることに一致している。総合すると、これらの結果は、自己抗原の交差提示後に、PTPN2欠損が、CD8+T細胞の分化を促進し、CTLを産生させることに一致している。

【0109】

[PTPN2欠損は、in vitroでの抗原誘導OT-I CD8+T細胞の活性化及びIL-2媒介分化を促進する]

PTPN2欠損は、TCR誘導増殖の閾値を下げ、これにより、ナイーブCD8+O

T - I T 細胞が、低濃度の同種ペプチド抗原 S I I N F E K L、又は T C R 親和性が最適以下である変更されたペプチドリガンドに曝露されると増殖が促進される。しかしながら、P T P N 2 欠損は、高濃度 S I I N F E K L に応答した O T - I C D 8 + T 細胞の増殖は促進しない。P T P N 2 欠損が、増殖と無関係に O T - I C D 8 + T 細胞の活性化を促進し得るか否かについて決定するために、本発明者らは、O T - I ; P t p n 2 f 1 / f 1 及び O T - I ; L c k - C r e ; P t p n 2 f 1 / f 1 ナイーブ (C D 4 4 1 °) C D 8 + O T - I T 細胞を、飽和濃度の S I I N F E K L (0.1 μg / m l) で 36 時間刺激した (図 6)。固着されたクラス I M H C によって提示されるペプチドによって誘導される C D 8 + T 細胞応答は、T 細胞によって自己提示される溶出ペプチドが主な原因であり得るため、本発明者らは、ペプチドを培養上清に直接添加した。P T P N 2 欠損は、高濃度の S I I N F E K L に曝露された O T - I C D 8 + T 細胞の増殖を変更しなかった (36 時間後の C F S E 希釈によって評価される) (図 6 a)。さらに、P T P N 2 欠損は、O T - I C D 8 + T 細胞の生存期間を変更しなかった (アネキシン V 染色によって評価される) (図 6 b)。他方、C D 6 9 及び I L - 2 受容体 (C D 2 5) サブユニットの細胞表面の発現の監視、並びにフローサイトメトリーによる芽球化 (細胞のサイズ) によって評価される O T - I C D 8 + T 細胞の活性化は、P T P N 2 欠損によって著しく促進された (図 6 c)。さらに、細胞表面 C D 4 4 の発現レベルは、分化した C D 8 + T 細胞に一致して増加した (図 6 c)。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 0 】

P T P N 2 欠損が、T C R 誘導 C D 2 5 の発現の促進し、以前の研究が、P T P N 2 の I L - 2 - 誘導 S T A T 5 シグナル伝達を減衰させる能力を明らかにしていることから、本発明者らは、C D 8 + エフェクター T 細胞の I L - 2 誘導分化に対する P T P N 2 欠損の影響を評価した。ナイーブ C D 8 + T 細胞を、C D 2 8 の同時刺激と共に強い刺激で培養し、次いでこの刺激を除去して I L - 2 と共にインキュベートすると、これらの T 細胞は、C D 4 4 h i C D 6 2 L 1 ° T 細胞に分化し、グランザイム B 及び I F N の発現によって特徴付けられる C T L 活性を獲得する。P t p n 2 f 1 / f 1 及び L c k - C r e ; P t p n 2 f 1 / f 1 マウスからのナイーブ (C D 4 4 1 ° C D 6 2 L h i) C D 8 + T 細胞を、飽和濃度のプレート結合 - C D 3 (10 μg / m l) 及び - C D 2 8 (5 μg / m l) で 48 時間刺激し、次いで刺激を除去して 20 n g / m l I L - 2 の存在下で 2 ~ 4 日間培養し、そして C D 4 4 及び C D 6 2 L の細胞表面の発現を決定した (図 7)。これらの飽和濃度の - C D 3 / - C D 2 8 では、P T P N 2 欠損は、増殖 (C F S E 希釈によって評価される) にも細胞表面の C D 4 4 の増加にも影響を与えないが (図 7 a ~ B)、少量ではあるが、T C R 媒介活性化の促進に一致して C D 2 5 及び C D 6 9 が増加した (図 7 b)。しかしながら、P T P N 2 欠損は、I L - 2 刺激の後に C D 4 4 h i C D 6 2 L 1 ° である細胞の数を著しく増加させた (図 7 c)。総合すると、これらの結果は、C D 8 + エフェクター T 細胞の T C R 及び I L - 2 媒介分化を誘導する P T P N 2 欠損に一致している。

【 0 1 1 1 】

R I P - m O V A モデル及び「高親和性」T C R トランスジェニック T 細胞を用いた以前の研究により、組織特異的抗原を、対応する排出 L N に存在する D C によってナイーブ C D 8 + T 細胞に対して構成的かつ選択的に提示し、T 細胞の活性化を制限して寛容を促進することができる立証された。続く研究により、これが、低親和性から中程度の親和性の T C R を発現するポリクローナル T 細胞にも当てはまることが立証された。しかしながら、C D 4 + T 細胞からのヘルプの非存在下で、交差提示される C D 8 + T 細胞がクローニングを受けて、寛容を維持する。このような交差寛容は、T C R のシグナル伝達を調整して、T 細胞の応答をそれ自体に制限する T 細胞固有の機序によって少なくとも部分的に誘導することができる。この研究では、本発明者らは、R I P - m O V A モデル及び O T - I T 細胞を使用して、ホスファターゼ P T P N 2 が、交差提示される内在性抗原である C D 8 + T 細胞の寛容に役立つことを立証した。

【 0 1 1 2 】

P T P N 2 のレベルは、 T C R 親和性 (C D 5 のレベルによって監視される) に直接相関して P T P N 2 で増加する、胸腺を離れるナイーブ T 細胞で上昇し、これにより、リンパ球減少に関連した自己抗原に対してより強く応答する親和性の高い T 細胞が P T P N 2 を増加させた。 P T P N 2 の非存在下で、リンパ球減少環境で急速に T C R 媒介増殖されたナイーブ C D 8 + T 細胞が、抗原曝露エフェクター細胞の特徴を獲得して、自己免疫の発達を促進する。この研究では、本発明者らは、 P T P N 2 欠損が、細胞自己抗原による C D 8 + T 細胞の交差プライミングを可能にして寛容を回避して C T L 活性を獲得し、従って細胞の破壊及び 1 型糖尿病の発症を促進することを見出した。 P T P N 2 の非存在下では、 O T - I C D 8 + T 細胞のみが、 R I P - m O V A マウスにおける糖尿病を促進することができ ; これは、たとえ極少数の O T - I C D 8 + T 細胞 (2 . 5 × 1 0 5) が移入された場合でも起きた。重要なことに、これは、排出臍臓 L N での O T - I C D 8 + T 細胞の増殖の増大に関連しておらず、むしろ、ナイーブ T 細胞の C D 4 4 h i C D 6 2 L 1 ° C T L への分化の増加に関連していた。本発明者らの e x v i v o 研究は、 C D 4 4 h i C D 6 2 L 1 ° C T L の産生の促進が、 T C R 誘導及び I L - 2 誘導応答の増強が原因であろうことを示唆している。感染との関連では、 C D 8 + T 細胞における I L - 2 シグナル伝達は、最終分化した C T L の発達に必須である。ここで、本発明者らは、飽和条件下で、 T C R 誘導増殖における差異が明らかではないが、 T C R 誘導 C D 2 5 のレベルが上昇した場合、 P T P N 2 が、 C D 4 4 h i C D 6 2 L 1 ° C D 8 + T 細胞の I L - 2 誘導産生を悪化させることを示した。 T C R 誘導 T 細胞活性化の促進以外では、 P T P N 2 は、 C D 8 + T 細胞において I L - 2 、 I L - 6 、及び I F N 誘導シグナル伝達をそれぞれ媒介する S T A T 5 、 S T A T 3 、及び S T A T 1 を含む S T A T ファミリーメンバーを脱リン酸化する能力も有する。このようなサイトカインは、 C D 8 + T 細胞の増殖、分化、及び生存期間の調節に極めて重要な役割を果たす。例えば、過剰な I F N は、近年、自己免疫疾患を発症しやすい R o q u i n 機能獲得型マウス (R o q u i n g a i n - o f - f u n c t i o n m i c e) における短命エフェクター C D 8 + T 細胞の蓄積を増加させることを示した。従って、 P T P N 2 欠損は、 I L - 2 シグナル伝達を含むサイトカインシグナル伝達を直接促進することによって自己免疫関連 C T L の発達に少なくとも部分的に寄与し得る。

【 0 1 1 3 】

本発明者らによる結果は、交差提示 C D 8 + T 細胞の寛容を阻害して自己免疫の発達に寄与する、負の調節因子、例えば、 P T P N 2 の変更の結果としての T C R 調整における変更の可能性を明らかにしている。 1 型糖尿病関連 P T P N 2 S N P [(r s 1 8 9 3 2 1 7 (C)] は、 T 細胞における P T P N 2 メッセージの約 4 0 % の減少に関連している。本発明者らの研究は、 O T - I C D 8 + T 細胞における P T P N 2 ヘテロ接合性が、 R I P - m O V A マウスの交差提示によって誘導される末梢寛容を抑制するのに十分であることを示唆している。従って、本発明者らの研究は、 P T P N 2 S N P が自己免疫の発達に寄与し得る機序を明らかにしている。

【 0 1 1 4 】

末梢寛容への寄与以外では、抗原交差提示は、腫瘍における病原体及び抗原に対する C D 8 + 細胞障害性 T 細胞応答のプライミングに極めて重要である。多数の第 I 相及び第 I I 相試験が、抗ウイルス又は抗腫瘍処置として D C ワクチン接種又は養子 T 細胞療法を用いて行われてきた。重要なことに、ヒト腫瘍から単離された T 細胞は、疲弊又は寛容化 T 細胞の多数の特徴を示し ; 腫瘍から単離された C D 8 + T 細胞は、抑制性受容体、例えば、 P D - 1 を発現し、かつサイトカインの産生不良を示す。

【 0 1 1 5 】

【 実施例 3 】

以下は、レトロウイルス感染を用いる C A R - T 細胞を产生するための例示的な方法である (C h e a d l e E J et al . J Immunol 2010 ; 184 : 1 8 8 5 - 1 8 9 6) 。特異的な C A R を発現させるこのアプローチはまた、 C A R - T 細胞又は本明細書に記載のその他の T 細胞型において s h R N A 及び s i R N A を発現させ

10

20

30

40

50

てPTPN2の発現を低減するのにも適している。この方法は、マウスの設定で適用するように設計されているが、例えば、The m eli, et al. (2013), Nature Biotechnology, 31(1), pp 928-933(関連するオンラインの方法を含む)及びTran et al. (2014), Science, 344, pp 641-645に記載の方法に基づいてヒトでの適用のために変更することができる。

【0116】

[0日目 - T細胞の単離]

1. 脾細胞を単離するために、脾臓をB1/6マウスから摘出する
2. EtOHをマウス及び器具(ハサミ/鉗子)に噴霧する。 10
3. マウスの背中に切開部を形成して、指で皮膚を後方に引っ張る。脾臓は、左側にあり、明るい赤紫色である。
4. 脾臓を腹部に付着させている脂肪を切り取って、脾臓をペトリ皿(非被覆)に入れる
5. 5mlのダルベッコPBS又は培地を脾臓に添加する。
6. シリンジを開けて、プランジャー端部を滅菌状態に維持する。この端部を使用して脾臓をすり潰して、単一細胞懸濁液 - 約 1×10^8 の細胞/脾臓にする。
7. ナイロン70μM篩を50mlファルコンチューブに入れ、この混合物をこの篩にかける。脂肪組織が、篩に残る。
8. 別の5mlのPBS又は培地をペトリ皿に加えて残りの細胞を収集し、合計10mlを超える脾細胞 - RBC及びWBCを篩にかける。 20
9. 1250rpmで5分間回転させてペレットを得る。
10. 吸引により上清を廃棄する。
11. ペレットを3mlのACK溶解緩衝液で懸濁する(一番上の棚 - 室温)。この緩衝液からRBCを除去する。
12. 反転させて手で4分間前後に揺する。
13. 15mlのRPMI(10%+Lotto)培地を加える。
14. 回転中の細胞数のカウントのためにこの混合物を10μlのアリコートにして、フィルターチップ内に維持する。
15. 1250rpmで5分間回転させる。
16. 吸入装置を用いて上清を廃棄すると、ペレットはもはや赤色でないはずである。 30
17. XmlのRPMI培地をペレットに加えて、 2.5×10^7 の細胞/ウェルで再懸濁する。
18. サイトカインを加える - フィルターチップを使用して滅菌を維持する: (細胞数カウント用顕微鏡の下のフリーザー内の新鮮なアリコート、冷蔵庫内の作業ストック溶液を4で最大1か月間保存することができる)
19. 混合する。
20. 5ml/ウェル(通常は6ウェルプレート)(2.5×10^7 の細胞/ml)のアリコートにする。
21. プレートに細胞(C57脾細胞)、培地、名称、日付、 5×10^6 の細胞/mlを表示する 40
22. インキュベーター(5% CO₂)に一晩入れておく。

【0117】

[細胞数のカウント]

1. ステップ15で収集した10μlの細胞を、顕微鏡に近い96ウェルプレートに入れる。
2. 10μlのトリパンブルー(trypsin blue)をウェルに入れる(2倍の希釈)。
3. 正方形のカバーガラスを細胞数カウント用スライドガラスの上部に乗せる(最初にこのスライドガラスに息を吹きかけてカバーガラスがスライドガラスの上を良くスライドするようにする)。

10

20

30

40

50

4. 細胞をスライドガラスにアリコートし、顕微鏡下で観察する。
5. 死んだ細胞はトリパンブルー (tryptan blue) を取り込むが、生きている細胞は取り込まない。
6. 細胞数をカウントする - 細胞が十分に間隔が空いているようであれば、底部の 5 つの正方形をカウントし、全グリッドをカバーするようにこの値に 5 を乗じる。

【0118】

[レトロネクチンプレート]

1. レトロネクチン (10 µg / ml)

100 µl のアリコート / チューブ - 1 チューブ / プレート - 100 µl / 10 ml PBS

10

2. 6 ウェルプレート

3. 1. 5 ml / ウェル (レトロネクチン / PBS を再使用することができる) にピペットする。

4. 4 で一晩 (又は 4 に設定するのを忘れた場合は 37 で 2 時間) 維持する。

【0119】

[ウイルスパッケージングライン (viral packaging line)]

1. ウイルスパッケージングラインを回収して、 6×10^6 の細胞 / 培地で、25 ml の培地を含むフラスコに播種する。

【0120】

[1日目]

20

[ウイルスパッケージングライン]

1. ウイルスパッケージングラインを含むフラスコをインキュベーター (10% CO₂) から取り出す。

2. ウイルス粒子を含む上清を 60 ml シリンジに注入し、表示された 50 ml ファルコンチューブに濾過して入れる - 各パッケージングラインが約 25 ml の総量となるようとするべきである。

3. フラスコの培地を新鮮な RPMI (10% + L o t) 培地 (25 ml) に取り替えて、フラスコをインキュベーター (5% CO₂) に戻す。

【0121】

[レトロネクチンプレート]

30

1. プレートを傾けて、吸入によりレトロネクチンを除去する。

2. 2. 5 ml のウイルスパッケージングラインの上清 (pLXSN 及び Erb) をウェルに加える。

3. プレートをポリエチレンラップでしっかりと包装して、縁がしっかりと密封されるようにする。余分なポリエチレンラップは、プレートの上部に乗せることができる。

4. 遠心分離機に入れて、プレートが正確に平衡を保てるようにし、1200 × g で 30 分間、室温で回転させる (プログラム 4)。

【0122】

[T 細胞を回収する]

1. T 細胞を含む 6 ウェルプレート (5 ml の培地 / ウェル) をインキュベーター (5% CO₂) から取り出して、顕微鏡下で観察する。

2. プラスチックピペットを使用して細胞を各ウェルの底部から除去して T 細胞を回収する。ピペットを (3 ~ 4 回) 上下させて、「全て T 細胞」と表示された新しい 50 ml ファルコンチューブに移す。総量 = 30 ml

3. 各 50 ml ファルコンチューブの溶液が 30 ml を超えないようにする。

4. 10 ml Ficoll - Plaque (室温の棚) をピペットの最も遅い速度で、「全て T 細胞」を含むファルコンチューブの底部にピペットする。この段階では勾配が存在するはずであり、ゲルがチューブの底部に沈んでいる。

5. 1800 rpm、加速 / 減速 6 で 10 分間遠心分離する。

6. 新しい 50 ml ファルコンチューブに「生きている T 細胞」と表示する。

50

7. *Ficoll-plate*により生細胞を死細胞から分離する。*Ficoll-plate*により死細胞がゲルの底部に残り、生細胞が、上清の下のゲルのすぐに上にくる。T細胞に近づきすぎないように注意して、できる限り多くの培地上清を吸引する。1mlピペットを使用して、生T細胞を取り出して、「生T細胞」ファルコンチューブに入れる。

8. 生T細胞を10mlの新鮮なRPMI(10%+Lotto)培地で再懸濁する。

9. 10μlの細胞をフィルターチップにアリコートし、細胞数のカウントのために(顕微鏡に近い)96ウェルプレートに移す。

10. 例えば、2×5mlのLXSN+Er bであるパッケージングラインの数によって、10mlの容量の再懸濁T細胞をファルコンチューブに分ける。

11. 50mlファルコンチューブを1250rpmで5分間回転させる(プログラム1)。

12. 回転の後、T細胞のペレットを廃棄しないように注意して、上清を吸引により廃棄する。

13. Xmlのウイルス上清を正確に表示されたペレットに加え、再懸濁する。

14. (レトロネクチンプレートを考慮して)サイトカインを加える

15. 2.5ml/ウェル(3ウェル/sup e型)をピペットする。

16. プレートを前述同様にポリエチレンラップで包装して、1200×gで1.5時間回転させる(プログラム4、時間を変更)。

17. 回転が完了したら、注意深くポリエチレンラップを除去して、プレートをインキュベーター(5%CO₂)に入れる。

【0123】

[2日目]

1. ウイルスパッケージングラインを含むフラスコをチェックする(5%CO₂インキュベーター)。

2. ウイルス粒子を含む上清を60mlシリンジに注入し、表示された50mlファルコンチューブに濾過して入れる - 各パッケージングラインが約25mlの総量となるようするべきである。

3. 回転中に細胞を大きいフラスコに分けてラインの成長を維持する。

【0124】

[レトロネクチンプレートからのT細胞の回収]

4. レトロネクチンプレート-T細胞+PLXSN/Er b/sup e(3ウェル/サンプル-2つのプレート)(5%CO₂インキュベーター)をチェックする。

5. プラスチックピペットを使用して細胞を各ウェルの底部から除去してT細胞を回収する。ピペットを(3~4回)上下させて、新しい50mlファルコンチューブに移す。総量=15mlの各サンプル。

6. 全ての細胞が除去されていない場合は、PBS洗浄を行うこともできる。

7. ペレットにする準備ができるまでこれらのファルコンチューブを5%CO₂インキュベーターで維持する。*

8. (ステップ3~4からの)レトロネクチンプレートを「空にする」ために、2.5mlの(ステップ2からの)ウイルス上清を加え - 上清の正確に表示されたプレートへのアリコートをチェックする。

9. 1日目にしたようにポリエチレンラップに包装し、1200×gで30分間回転させる(プログラム4)。

【0125】

[細胞を分ける]

10. ウイルス細胞がコンフルエント(分ける必要性よりも重要である)であったため、パッケージングライン[PLXSN及びEr b]を含むフラスコに細胞を分ける。

11. 0.5mlのtryptase(4で保存)(trypsin)をフラスコに加え、緩やかに振り動かして細胞がtryptaseで被覆されるようにする。

10

20

30

40

50

12. 吸入により *tryptase* を廃棄する。

13. フラスコを室温で 5 ~ 10 分間放置する、又はインキュベーター (5% CO₂) に入れて、フラスコに付着した細胞を除去するプロセスを速める。

14. 30 ml の培地 (RPMI) を新しい大きいフラスコに入れる。

15. 細胞が分離されたら、10 ml の RPMI 培地を加え、ピペットを上下させて細胞をフラスコの底部に移動させる。

16. これを 1 ml 取って、1 : 10 を超える希釈で新しい大きいフラスコにピペットする (表示をチェックする) - 細胞は 3 ~ 4 日でコンフルエントになる。チェックして、80% コンフルエントを超えたたら分ける。

17. フラスコを 5% CO₂ インキュベーターに入れる。

10

【0126】

[* T 細胞を回収する (続き)]

18. T 細胞を含む 50 ml ファルコンチューブを 1250 rpm で 5 分間回転させる (プログラム 1)。

19. 回転の次に、T 細胞のペレットを廃棄しないように注意して、上清を吸引により廃棄する。

20. * 7. 5 ml の (3 つのウェルの) ウィルス上清を正確に表示されたペレットに加えて、軽く再懸濁する。余分な上清を廃棄することができる。

21. (レトロネクチンプレートを考慮して) サイトカインを加える :

IL 2 を 15 μl

20

IL 7 を 30 μl

22. 2. 5 ml (T 細胞 - ウィルス複合体) / ウェルをレトロネクチンプレート (3 つのウェル / プレート > > 5 × 10⁶ の細胞 / ウェル) にピペットする。

23. プレートを前述同様にポリエチレンラップで包装して、1200 × g で 1.5 時間回転させる (プログラム 4 、時間を変更)。

24. 回転が完了したら、注意深くポリエチレンラップを除去して、プレートをインキュベーター (5% CO₂) に 4.5 時間入れる。

25. プラスチックピペットを使用して細胞を各ウェルの底部から除去して T 細胞を回収する。ピペットを (3 ~ 4 回) 上下させて、新しい 50 ml ファルコンチューブに移す。

総量 = 各サンプルの 15 ml。

30

26. *in vitro* アッセイを行っている場合は PBS 洗浄して、最大量の細胞を収集するのが良い。

27. 50 ml ファルコンチューブを 1250 rpm で 5 分間回転させる (プログラム 1)。

28. 回転の次に、T 細胞のペレットを廃棄しないように注意して、上清を吸引により廃棄する。

29. 15 ml の RPMI 培地をファルコンチューブ + サイトカイン (15 μl の IL 2 及び 30 μl の IL 7) に加える。素早く回転させる。

30. 5 ml / ウェル (3 つのウェル / サンプル) を新しい表示された通常の 6 ウェルプレートにアリコートする。

31. 2 日後により多くのサイトカインを加える、又は分割 / 増加する状態になるまで 5% CO₂ インキュベーターでインキュベートする。

【0127】

[4 日目 / 5 日目]

形質導入 T 細胞をチェックし、分割する準備ができていない場合は、別の 5 ml の新鮮な RPMI を、サイトカインと共に各ウェル (ウェル内に既にある培地の上に) に加える。

6 つのウェル全て (3 つの L X S N + 3 つの E r b) = 30 ml が必要

+ 30 μl の IL 2 及び 60 μl の IL 7

7 ~ 8 日目に回収する準備ができるまで 5% CO₂ の 37 のインキュベーターでイン

40

50

キュベートする。

【0128】

[7~8日目]

in vitro / in vivo アッセイのために形質導入 T 細胞を回収する。

【0129】

[実施例4]

Lck - Cre ; Ptpn2^{f1/f1} (-/-) 対 Ptpn2^{f1/f1} (+/+) マウスからの脾細胞を刺激して、scFv - 抗Her - 2 及び CD28 - CD3 - (-Her - 2) を用いてレトロウイルスにより同時形質導入する。培養が8日経過したら、Her - 2 特異的 Lck - Cre ; Ptpn2^{f1/f1} (-Her - 2 -/-) 対 Ptpn2^{f1/f1} 対照 (a - Her - 2 +/+) CAR CD8+ T 細胞を、CD62L 対 CD44 に対する蛍光色素結合抗体で染色し、エフェクター / 記憶 (CD44^{hi} CD62L^{lo}) の産生をフローサイトメトリーによって監視した。図8の結果は、PTPN2 欠損が、ex vivo での CD8+ CAR T 細胞のエフェクター / 記憶表現型の獲得を促進することを示している。

【0130】

[実施例5]

Her - 2 特異的 Ptpn2^{f1/f1} (-Her - 2 +/+) 対 Lck - Cre ; Ptpn2^{f1/f1} CD8+ CAR T 細胞 (-Her - 2 -/-) 又は非トランスフェクト Ptpn2^{f1/f1} (+/+) 対 Lck - Cre ; Ptpn2^{f1/f1} (-/-) CD8+ T 細胞を、Her - 2 発現 24JK 肉腫細胞 (24JK - Her - 2) 又はプレート結合 a - CD3 / CD28 (T 細胞を活性化させる非抗原特異的手段として) と共にインキュベートした。T 細胞の活性化を、ELISA による分泌 IFN の監視によって評価した。図9の結果は、PTPN2 欠損が、ex vivo での CD8+ CAR T 細胞の活性化を促進することを示している。

【0131】

[実施例6]

Her - 2 特異的 Ptpn2^{f1/f1} (-Her - 2 +/+) 対 Lck - Cre ; Ptpn2^{f1/f1} CAR CD8+ T 細胞 (-Her - 2 -/-) CD8+ T 細胞を、クロム (Cr⁵¹) 標識 24JK - Her - 2 肉腫細胞又は Her - 2 隆性 24JK 肉腫細胞と共にインキュベートし、4時間後に Cr⁵¹ の放出を測定した。図10の結果は、PTPN2 欠損が、ex vivo での CAR T 細胞 CTL の活性を促進することを示している。

【0132】

[実施例7]

C57BL/6 から単離された精製 CD8+ ナイーブ (CD62L^{hi} CD44^{lo}) 脾 T 細胞を、高度に選択的な可逆 PTPN2 阻害剤 (本明細書に化合物 8 として記載) の存在下又は非存在下 (ビヒクリル) で、プレート結合 CD3 / CD28 と共に 48 時間インキュベートした。T 細胞を、蛍光色素結合抗体で染色して、CD44、CD62L、IL - 2R (CD25 サブユニット)、及び CD69 の表面のレベルを評価し、そして平均蛍光強度 (MFI) をフローサイトメトリーによって監視した。図11の結果は、PTPN2 の阻害の非遺伝学的方法が T 細胞の活性を促進し得ることを示している。ここに記載される研究は、小分子による PTPN2 活性の阻害が、ex vivo でのポリクローナル CD8+ T 細胞の活性化を促進することを示している。

【0133】

本明細書に記載の結果は、CAR T 細胞の活性を PTPN2 の阻害によって促進できることを示している。さらに、CD8+ T 細胞の細胞培養中の PTPN2 の化合物による阻害は、ex vivo でのポリクローナル CD8+ T 細胞の活性化を促進する。これらの結果は、PTPN2 の阻害が、自己 T 細胞 / CAR T 細胞の養子細胞療法において特定の適用を見出すことができる、T ヘルパー非依存性の細胞毒性の獲得を可能にする

10

20

30

40

50

ことを示している。

【0134】

[実施例8]

[マウス]

Ptpn2^{f1/f1} (C57BL6) 及び Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} (C57BL6) 若しくは対応する OT-1マウス又は CD45.1 及び CD45.1 / 2 コンジェニックマウスを、餌及び水を自由に摂取できる状態の温度が制御されたハイバリア設備内で 12 時間の明暗サイクルで維持した。週齢及び性別が合わせられた 6 ~ 8 週齢の雌レシピエントマウス及び 6 週齢の雌ドナーマウスを養子移入実験に使用した。 ex vivo 実験では、雄マウス又は雌マウスの何れかを使用した。 Ptpn2^{f1/f1} 及び Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} 及び 対応する OT-I TCR トランスジェニックマウスの作製では、 Ptpn2^{f1/f1} 及び Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} マウス又は OT-1; Ptpn2^{f1/f1} マウスと OT-1; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1} マウスとを交配させた。 CD45.1 / 2 マウスの作製では、 C57BL / 6 マウスと CD45.1 マウスとを交配させた。 C57BL / 6 J 背景の Lck-Cre (James D. Marth's laboratory, UCSD, La Jolla, California, USA が起源である) 及び TCR (OT-I 及び OT-II) トランスジェニックマウスは、 W. Alexander (Walter and Eliza Hall Institute) 及び W. Heath (Walter and Eliza Hall Institute) から提供された。 CD45.1 マウスは、 WEHI Animal Facility (Kew, Australia) から購入した。 C57BL / 6ヒトHer-2 トランスジェニックマウスは、 Peter MacCallum で育種され、これを 6 ~ 16 週間で実験法に使用した。 10 20 20

【0135】

[材料]

SIIINFEL 及び SIYNFEL ペプチドを JPT Peptide Technologies から購入した。 ハムスター - マウス CD3 (145-2C11) 、 - マウス CD28 (37.51) 、及び FITC - Annexin V Apoptosis Detection Kit I を BD Biosciences から購入した。 ウシ胎仔血清 (HyClone) を Thermo Scientific から購入し、 ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) 及び 1640 RPMI を Invitrogen から購入した。 30

【0136】

[フローサイトメトリー]

切除された脾臓及びリンパセルからの単一細胞懸濁液を、すりスライドガラス間で軽く圧縮することによって得て、これを、 2 % (v/v) ウシ胎仔血清 (FBS:CSL) が添加された冷却 PBS で洗浄した。 細胞懸濁液は、遠心分離 (300 × g 、 4 で 5 分間) によって回収し、 Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter) を用いて細胞数を決定した。 肝臓及び肺リンパ節を、灌流した肝臓及び肺から分離し、これを小片にカットして 200 μm の篩で濾し、次に室温で 33 % Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences) 勾配にかけた。 赤血球細胞を、赤血球細胞溶解緩衝液 (Sigma-Aldrich) を用いて除去した。 40

【0137】

表面染色のために、細胞 (1 × 10⁶ / 10 μl) を D-PBS / 2 % FBS で再懸濁し、氷上で 20 分間、 96 ウエルマイクロタイタープレート (Falcon, BD Biosciences) で染色した。 選別のために、細胞を氷上で 30 分間、 15 ml ファルコンチューブ (BD Biosciences) で染色した。 細胞を洗浄し、 D-PBS / 2 % FBS で再懸濁し、 LSRII (BD Biosciences) 若しくは Cyan ADP (Beckmann-Coulter) を用いて分析する、又は Influx sorter (BD Biosciences) を用いて精製した。 精製 CD8 50

⁺ C D 6 2 L ^{h i} C D 4 4 ^{1 °} T 細胞を、純度（99%超）についてルーチン的に試験した。データを FlowJo 7 (Tree Star Inc.) ソフトウェアを用いて分析した。

【0138】

[抗体]

BD Pharmingen (San Jose, CA) からの次の抗体を染色に使用した：フルオレセイン-イソチオシアネート (FITC) 結合又は BD Horizon (商標) V 4 5 0 結合 - C D 4 4 (IM7)、フィコエリトリン (PE) 結合又はアロフィコシアニン (APC) 結合 - C D 6 2 L (MEL-14)、パシフィック・ブルー結合又は Alexa Fluor 647 結合 - C D 8 (53-6.7)、PE 結合 - C D 2 5 (PC61)、及び PE シアニン染料 7 (Cy7) - C D 6 9 (H1.2F3)、APC 結合ヒト - C D 6 9 (FN50)、及び APC - Cy7 結合ヒト - C D 1 5 4 (TRAP-1)。Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach, Germany) からの次の抗体を染色に使用した：Viobright FITC 結合ヒト - C D 8 (BW135/80) 及び Vioblue 結合ヒト - C D 8 (T6D11)。

【0139】

[一次マウスT細胞におけるRNA干渉]

Ptpn2 を、Ptpn2 (AAGCCCAUAUGAUCAAGUCG、配列番号 14) ; Dharmacron Thermo Scientific, Waltham, MA) を用いて一次マウスT細胞で一過性にノックダウンし；緑色蛍光タンパク質 (GFP ; CAAGCUGACCCUGAAGUUCdTdT ; Dharmacron Thermo Scientific, Waltham, MA) siRNA を対照として使用した。一次マウスT細胞に、製造者の取扱説明書に従って Amaxa Mouse T cell Nucleofactor Kit (Lonza, Basel, Switzerland) を用いて、30nM、100nM、及び 300nM siRNA をトランスフェクトした。トランスフェクションの効率をフローサイトメトリーによって監視するために、脾細胞にも、30nM BLOCK-iT (商標) Fluorescent Oligo (Life Technologies, Carlsbad, CA) をトランスフェクトした。一晩のインキュベーション後に、Amaxa トランスフェクション培地を、1640 RPMI 完全培地に取り替えて、T細胞を、96 ウェル丸底プレート内でプレート結合 - C D 3 (5 μg / ml) 及び - C D 2 8 (5 μg / ml) を用いて 48 時間刺激した。T細胞の数を、フローサイトメトリーによって監視した。定量のために、細胞を回収する前に Calibrite Beads (BD Biosciences) をウェルに添加した。

【0140】

[in vitro 刺激]

C D 8 ⁺ C D 6 2 L ^{h i} C D 4 4 ^{1 °} ナイーブ L N T 細胞 (1×10^5 / ウェル) を、96 ウェル丸底プレート内でプレート結合 - C D 3 (5 μg / ml) 及び - C D 2 8 (5 μg / ml) を用いて 60 時間刺激した。PTPN2 阻害剤を、1 日 2 回培養物に添加した。活性化の状態を決定するために、細胞を回収し、- C D 2 5、- C D 4 4、- C D 6 2 L、及び - C D 6 9 に対する蛍光色素結合抗体で染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。

【0141】

[in vitro アポトーシス]

TCR トランスジェニック OT-1 からの C D 8 ⁺ C D 6 2 L ^{h i} C D 4 4 ^{1 °} ナイーブ L N T 細胞 (2×10^5 / ウェル) を、96 ウェル丸底プレート内で 1 μg / ml の S I I N F E K L 又は 1 μg / ml の S I Y N F E K L を用いて 18 時間刺激した。細胞を回収し、FITC - Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences) で染色し、そしてプロピジウムヨウ化物 (PI

) - Annexin V+ (アポトーシス) 細胞をフローサイトメトリーによって分析した。定量のために、細胞を回収する前に Calibrile Beads (商標) (BD Biosciences) をウェルに添加した。

【0142】

[養子細胞療法の実験]

C57BL/6ヒトHer-2トランスジェニックマウスに、 1×10^6 の 24JK-Her-2細胞 (Dr. Patrick Hwu; NIH, Bethesda, MD によって提供された) に皮下注射して第4乳腺脂肪体に注入する。次いで、マウスを、scFv-抗Her-2形質導入T細胞 (1×10^7) の移入の前に、腫瘍注入の7日後にg線照射 (5Gy) の亜致死量で前処置した。対照群は未処置のままにした。マウスに、T細胞移入後に投与される9用量の50,000 IU/200mlを含む、1日2回の組換えヒトIL-2 (Biological Resource Branch, National Cancer Institute, Frederick, MD) の腹腔内注射をした。

10

【0143】

[ヒトPBMCの単離及び刺激]

ヒト血液を、Ficoll (登録商標) 勾配 (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) を含む15mlガラス管に収集した。末梢血単球 (PBMC) を、遠心分離 (2200 × rpm、室温で20分間) によって回収した。PBMCを、無血清 RPMI 1640 中でPTPN2阻害剤と共に、37度で2時間インキュベートし、プレート結合ヒト-CD3 (5 µg/ml : クローンOKT-3) で24時間刺激した。細胞を回収し、-CD8、-CD45RA、-CD154、及び-CD69に対する蛍光色素結合抗体で染色し、そしてこれらの活性状態を決定するためにフローサイトメトリーによって分析した。T細胞の増殖を監視するために、細胞が回収される前にCalibrile Beads (商標) をウェルに添加した。

20

【0144】

[結果]

図12は、replete CD45.1/2⁺宿主に同時移入された、CD45.1⁺対CD45.2⁺ Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのナイーブ (CD62L^{hi}CD44^{lo}) CD8+ LN T細胞 (2×10^6) の結果を示している。末梢血を、T細胞移入後の指定の時点で収集し、そしてCD45.2 Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}対CD45.1マウスからの養子移入CD8⁺ T細胞の比率を、フローサイトメトリーによって決定した。移入から16週間後に、レシピエントマウスを屠殺して、脾臓、リンパ節 (LN)、肝臓、及び肺からのリンパ球をフローサイトメトリーによって分析した。養子移入された合計及びナイーブ (CD62L^{hi}CD44^{lo}) 中心記憶 (CD62L^{hi}CD44^{hi}; CM) 及びエフェクター/記憶 (CD62L^{lo}CD44^{hi}; EM) CD8⁺ T細胞の比率を決定した。図示されている図12の結果は、指定数のマウスについての平均±SEMである。これらの結果は、野生型と比較してPTPN2ノックアウト細胞では、in vivoでのナイーブ CD8⁺ T細胞のエフェクター記憶型T細胞への変換の促進を示している。PTPN2の非存在が、エフェクター記憶表現型T細胞の生存期間の延長もたらすと考えられる。

30

【0145】

図13は、replete CD45.1/2⁺宿主に同時移入されたCD45.1⁺対CD45.2⁺ Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからの中心記憶 (CD62L^{hi}CD44^{hi}, CM) CD8+ LN T細胞 (0.5×10^6) の結果を示している。末梢血を、T細胞移入後の指定の時点で収集し、そしてCD45.2 Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}対CD45.1マウスからの養子移入されたCD8⁺ T細胞の比率をフローサイトメトリーによって決定した。移入から16週間後に、レシピエントマウスを屠殺して、脾臓、リンパ節 (LN)、肝臓、及び肺からのリンパ球をフローサイトメトリーによって分析した。養子移入された合計及びナイーブ (CD62L^{hi}

40

50

CD44^{1°}) 中心記憶(CD62L^{hi}CD44^{hi}; CM)及びエフェクター/記憶(CD62L^{1°}CD44^{hi}; EM)CD8+T細胞の比率を決定した。図示されている結果は、指定数のマウスについての平均±SEMである。PTPN2欠損は、in vivoでの中心記憶T細胞のエフェクター記憶表現型への変換を促進する。

【0146】

総合すると、図12及び図13の結果は、細胞の出発集団が、ナイーブCD8+T細胞、中心記憶表現型細胞、又はこれらの両方の混合物であってもなくても、宿主細胞への移入が、エフェクター記憶表現型への変換を可能にすること、及びこの変換がPTPN2の非存在下で促進されることを示している。エフェクター記憶表現型細胞は、特に腫瘍の処置での養子移入に有用な細胞の集団である。

10

【0147】

図14では、プレート結合抗CD3(5 μg/ml)及び抗CD28(5 μg/ml)で60時間、±様々な濃度のPTPN2阻害剤(化合物8)で刺激された、C57BL/6マウスからのナイーブ(CD62L^{hi}CD44^{1°})CD8+LN T細胞(1×10⁵)の結果が示されている。細胞を回収し、CD44、CD69、CD25、及びCD62Lに対する蛍光色素結合抗体で染色し、平均蛍光強度(MFI)をフローサイトメトリーによって分析した。図示されている結果は、指定数の複製についての平均±SDである。図14の結果は、PTPN2阻害剤がナイーブCD8+T細胞を刺激して活性化表現型にすることを示している。

20

【0148】

OT-I: Ptpn2^{f1/f1}対OT-I; Lck-Cre; Ptpn2^{f1/f1}マウスからのCD8+ナイーブLN T細胞(2×10⁵)を、1 μg/ml SIIINFEKL(N4;高親和性ペプチド)又は1 μg/ml SIYNFEKL(Y3;低親和性ペプチド)と共に18時間インキュベートし、アネキシンV及びプロピジウムヨウ化物(PI)で染色し、フローサイトメトリーによって分析した(図15)。図示されている結果は、指定数のマウスについての平均±SEMである。図15の結果は、PTPN2欠損が活性化誘導細胞死をもたらさないことを示している。本明細書の他の部分、特に図12~図14で示されている結果と合わせて、PTPN2欠損又は阻害は、活性化誘導細胞死(AICD)による細胞死を増加させることなく、in vivoでのナイーブ又は中心記憶型T細胞のエフェクター記憶表現型への変換を促進する。AICDは、それらのT細胞受容体(TCR)の繰り返しの刺激により生じ、かつ末梢免疫寛容を維持するのに役立つ活性化Tリンパ球の負の調節因子である。本明細書に示される実験は、PTPN2欠損又は阻害T細胞は、強くて、野生型細胞よりもAICDが起こりにくくなっていることを実証している。

30

【0149】

図16の結果は、CD8+ヒト血液リンパ球における小分子阻害剤、化合物8によるPTPN2の阻害により、TCR媒介T細胞活性化が促進されることを示している。新しく単離されたヒトPBMC(2×10⁶)を、プレート結合-CD3(1.25及び2.5 μg/ml)で24時間刺激した。PBMCを回収し、CD45RA、CD8、CD69、及びCD154に対する蛍光色素結合抗体で染色し、そしてT細胞の活性化をフローサイトメトリーによって監視した。代表的なCD8対CD69及びCD154プロット(線で画定された領域の数字は、ゲート内の相対数である)が示されている(図16)。これらのデータは、末梢血から単離された細胞を含むヒトCD8+T細胞でのPTPN2の阻害が、T細胞受容体媒介T細胞活性化の促進を示すことを裏付けている。

40

【0150】

マウスCD8+T細胞でのsiRNAを用いたPTPN2のノックダウンは、細胞数の用量反応性の増加によって示される、TCR媒介T細胞応答の促進をもたらす(図17)。C57BL/6マウスからの脾細胞(1×10⁷)を、Amaxa Mouse T cell Nucleofactor Kitを用いて100nM GFP siRNA又は30nM、100nM、及び300nM PTPN2 siRNAで一晩トランス

50

フェクトした。トランスフェクト脾細胞を、プレート結合 - C D 3 (5 μ g / m l) 及び - C D 2 8 (5 μ g / m l) で 4 8 時間刺激し、そして蛍光色素結合 - C D 8 で染色した。 C D 8 + T 細胞数をフローサイトメトリーによって定量した。図示されている結果は、指定数の複製の平均 \pm S D である。

【 0 1 5 1 】

P T P N 2 欠損は、養子免疫療法との関連で H e r - 2 特異的 C A R T 細胞の腫瘍特異的活性を促進し、かつ異種移植マウスの生存期間を延長する(図 18)。 H e r - 2 特異的 P t p n 2 ^f 1 / ^f 1 (- H e r - 2 + / +) 対 L c k - C r e ; P t p n 2 ^f 1 / ^f 1 C A R T 細胞(- H e r - 2 - / -) (1 \times 1 0 ⁷) を、 H e r - 2 発現 2 4 J K - H e r - 2 肉腫細胞に感染した C 5 7 B L / 6 ヒト H e r - 2 トランスジェニックマウス(各群に 6 匹のマウス)に養子移入して生存を監視した。 1 0 0 日後に、 L c k - C r e ; P t p n 2 ^f 1 / ^f 1 C A R T 細胞(- H e r - 2 - / -) が養子移入された 6 匹のマウスのうちの 2 匹がまだ生存していた。
10

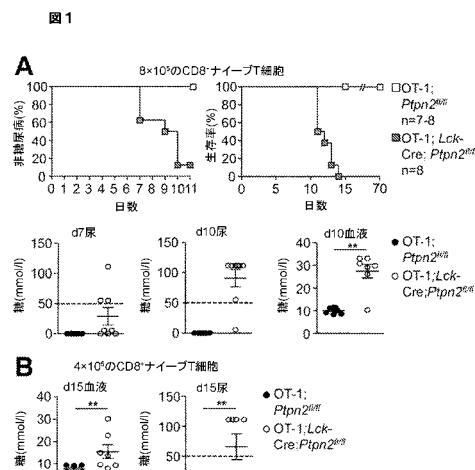
【 0 1 5 2 】

C D 8 + ヒト血液リンパ球での P T P N 2 の阻害により、 T C R 媒介 T 細胞増殖が促進された(図 19)。新しく単離されたヒト P B M C (2 \times 1 0 ⁶) を、ビヒクル対照又は P T P N 2 の阻害剤、化合物 8 (本明細書に記載) の存在下で、プレート結合 - C D 3 で(A) 4 8 時間及び(B) 7 2 時間刺激した。 P B M C を回収して、蛍光色素結合 - C D 8 で染色した。 C a l i b r i t e B e a d s (商標) を添加して、 T 細胞の増殖をフローサイトメトリーによって監視した。図示されている結果は、指定数の複製の平均 \pm S D である。
20

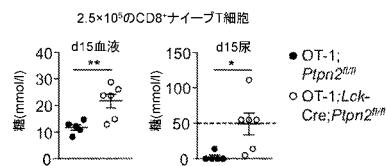
【 0 1 5 3 】

P T P N 2 の阻害は、 e x v i v o での H e r - 2 特異的 C A R T 細胞の腫瘍特異的活性化を促進する(図 20)。 H e r - 2 特異的 C A R T 細胞を、ビヒクル対照又は P T P N 2 の阻害剤、化合物 8 (本明細書に記載) の存在下で、 H e r - 2 発現 2 4 J K 肉腫細胞(2 4 J K - H e r - 2) 又は 2 4 J K 肉腫細胞(2 4 J K) と共に、又は培地のみでインキュベートした。 T 細胞の活性化を、供給元の仕様書に従って E L I S A (M o u s e I F N E L I S A S e t , B D O p t E I A (商標)) による分泌された I F N の監視によって評価した。試験は、 3 連で行った(\pm S D)。

【図1】



C



【図2】

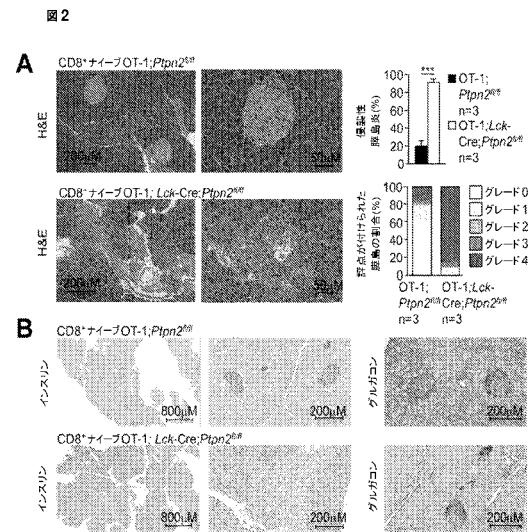
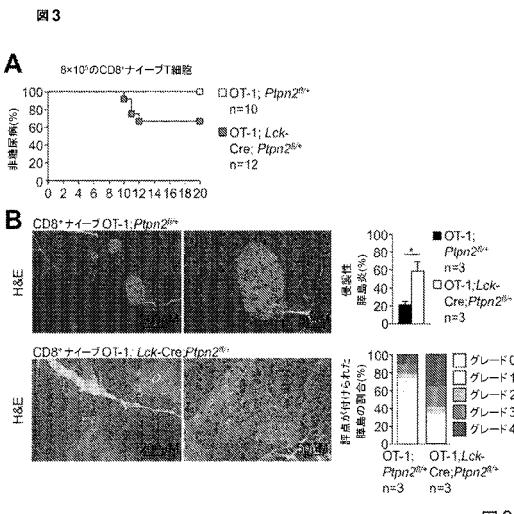
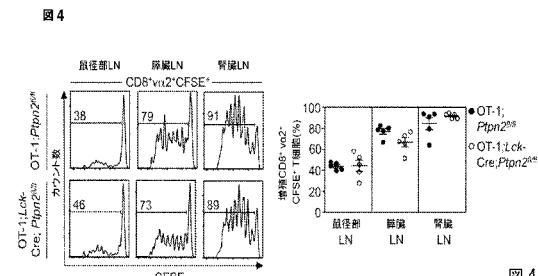


図2

【図3】



【図4】



【図5】

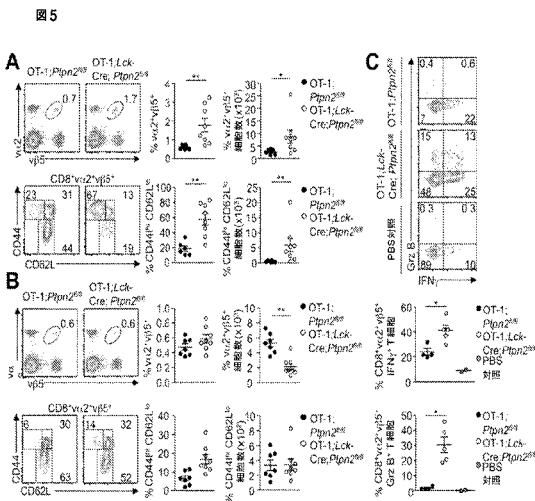


図5

【図6】

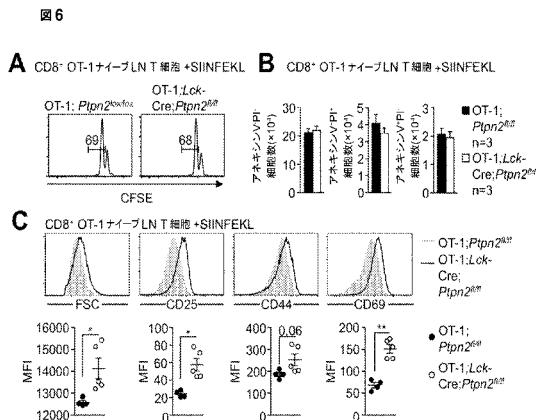


図6

【図7】

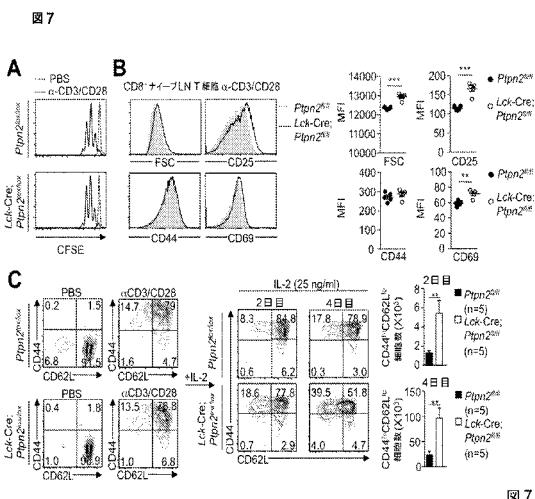
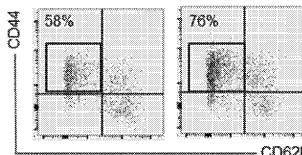


図7

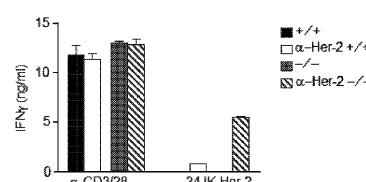
【図8】

Figure 8



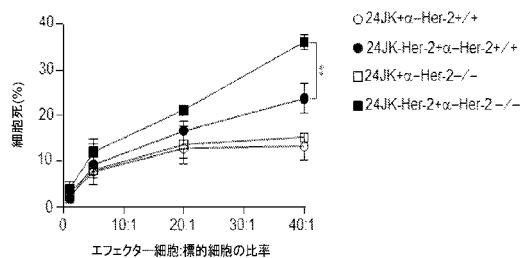
【図9】

Figure 9



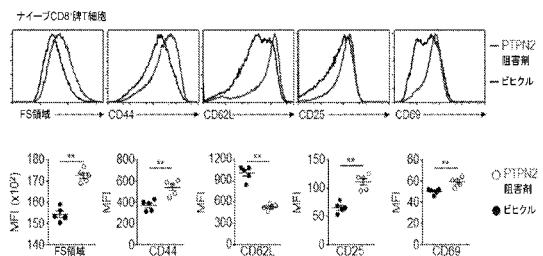
【図10】

図10



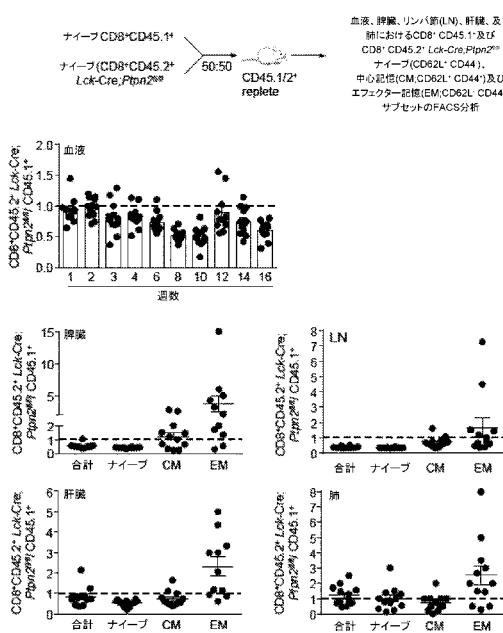
【図11】

図11



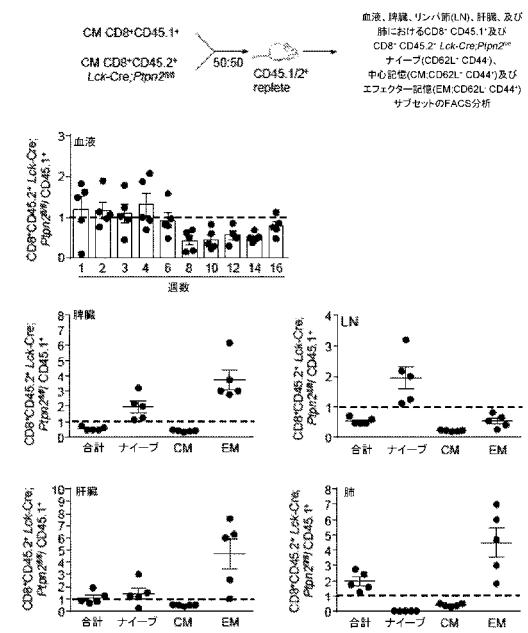
【図12】

図12

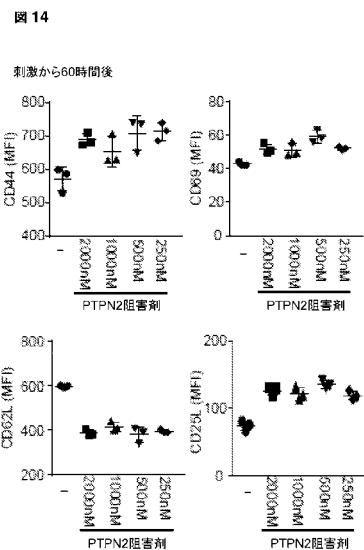


【図13】

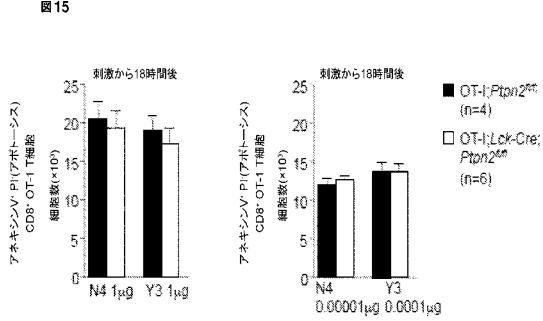
図13



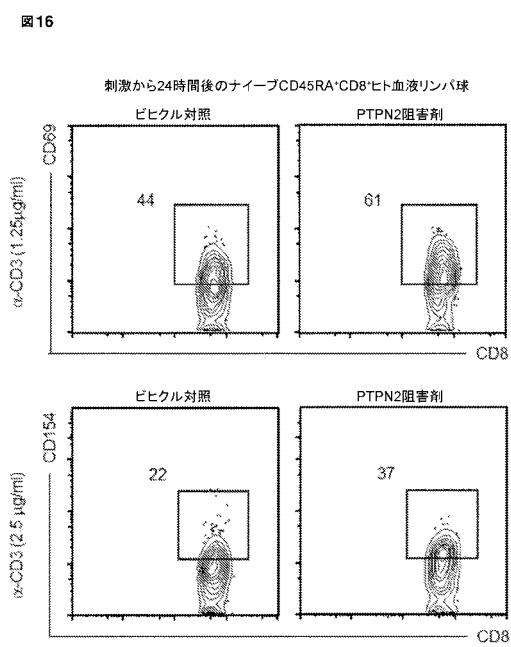
【図 14】



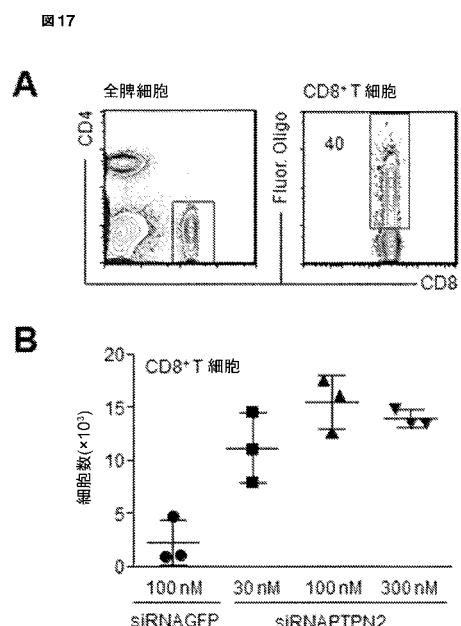
【図 15】



【図 16】

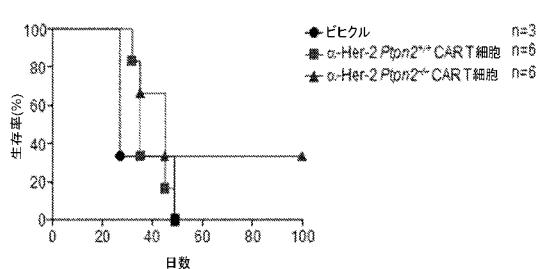


【図 17】



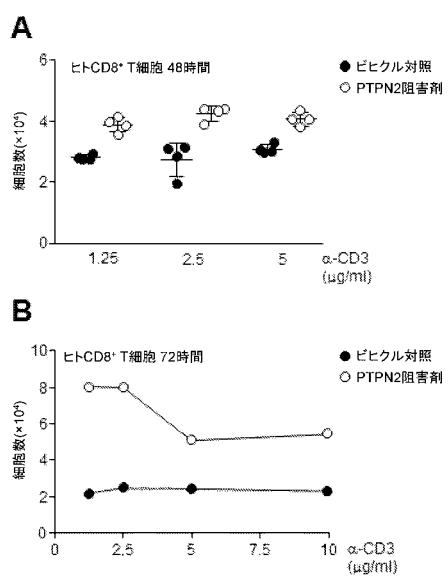
【図 18】

図18



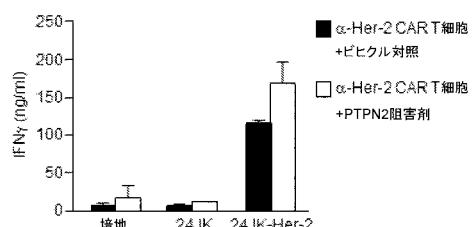
【図 19】

図19



【図 20】

図20



【配列表】

2017524348000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/050318
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>A61K 35/17 (2015.01) C12N 15/113 (2010.01) C12N 5/0783 (2010.01)</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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) DATABASES: TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEF, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPES, TXPUS01A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPWOEA, WPIAP, EPODOC, MEDLINE, BIOSIS, HCAPLUS, EMBASE with KEYWORDS: cancer, PTPN2, T-PTP, cytotoxic, leukocyte, killing, inhibitor, adoptive transfer, dephostatin, siRNA, shRNA & like terms. DATABASE: HCAPLUS with KEYWORD: 237756-11-5/RN, 1187396-28-6/RN. DATABASE: GENOMEQUEST with SEQ ID NOS: 1-14 and KEYWORDS: cancer, shRNA, siRNA & like terms. DATABASES: PAMS (NOSE), INTESS, AusPat, The Lens, Google with APPLICANT / INVENTOR names.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<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		
Date of the actual completion of the international search 10 August 2015	Date of mailing of the international search report 10 August 2015	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	Authorised officer Catriona Bruce AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 7940	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/050318
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:		
a. (means)		
<input type="checkbox"/> on paper		
<input checked="" type="checkbox"/> in electronic form		
b. (time)		
<input type="checkbox"/> in the international application as filed		
<input checked="" type="checkbox"/> together with the international application in electronic form		
<input type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purposes of search		
2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.		
3. Additional comments: SEQ ID NOs: 1-14 were used for search purposes.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2015/050318

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. Claims Nos.: 17 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:
See Supplemental Box
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/AU2015/050318
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WIEDE, F., et al., 'PTPN2 attenuates T-cell lymphopenia-induced proliferation', <i>Nature Communications</i> , 21 Jan 2014, vol. 5: 3073, pages 1-15 Abstract; Results	18-20, 36-37
X	WO 2008/043181 A1 (MCGILL UNIVERSITY) 17 April 2008 Abstract; claims 8, 17; para [0074]	18-20, 36-37
X	STANFORD, S. M., et al., 'High-throughput screen using a single-cell tyrosine phosphatase assay reveals biologically active inhibitors of tyrosine phosphatase CD45', <i>Proceedings of the National Academy of Sciences, USA</i> , 2012, vol. 109, pages 13972-13977 page 13974, right hand column, second paragraph; Figure 3C; Abstract	18-20, 36-37
X	WO 2014/201021 A2 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC. et al.) 18 December 2014 Abstract; Claims 1, 2, 30, 32-33, 35; page 106, second paragraph; page 124, first paragraph; page 127, first paragraph; SEQ ID NO: 662	12, 14, 31
P,X	WIEDE, F., et al., 'PTPN2 restrains CD8 ⁺ T cell responses after antigen cross-presentation for the maintenance of peripheral tolerance in mice', <i>Journal of Autoimmunity</i> , epub 2 July 2014, vol. 53, pages 105-114 Abstract; 2.1 'Mice'	18-20, 36-37
A	SEO, H., et al., 'Ethyl-3,4-dephostatin inhibits PTPN2 and induces ERK activation', <i>Bulletin of the Korean Chemical Society</i> , 2011, vol. 32, pages 2476-2478 Entire document	
P,X	WO 2014/201021 A2 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC. et al.) 18 December 2014 Abstract; Claims 1, 2, 30, 32-33, 35; page 106, second paragraph; page 124, first paragraph; page 127, first paragraph; SEQ ID NO: 662	1-11, 13, 15-30, 32-37
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2015/050318
Supplemental Box	
Continuation of Box II The claim does not comply with Rule 6.2(a) because it relies on references to the description.	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2015/050318	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2008/043181 A1	17 April 2008	WO 2008043181 A1	17 Apr 2008
		CA 2579184 A1	12 Apr 2008
WO 2014/201021 A2	18 December 2014	WO 2014201021 A2	18 Dec 2014
WO 2014/201021 A2	18 December 2014	WO 2014201021 A2	18 Dec 2014

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

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 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	A 6 1 K	38/19
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/00
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	C 1 2 N	15/00
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	38/06	(2006.01)	A 6 1 K	31/713
A 6 1 K	31/15	(2006.01)	A 6 1 K	38/06
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	31/15
			A 6 1 K	39/395
			A 6 1 K	39/395

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, 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, R O, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ティガニス, トニー

オーストラリア, ヴィクトリア州 3800, クレイトン, ウエリントン ロード, ケア
オブ モナッシュ ユニバーシティ

(72)発明者 ウィーデ, フロリアン

オーストラリア, ヴィクトリア州 3800, クレイトン, ウエリントン ロード, ケア
オブ モナッシュ ユニバーシティ

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AA95Y AB01 AC20 BA02 BD21 BD39 CA44

4C084 AA02 BA01 BA15 BA23 BA44 DA01 MA02 NA05 ZB211 ZB261

ZC751

4C085 AA13 AA14 AA16 CC23

4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZB21 ZB26 ZC75

4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 BC83 CA04 CA12 MA02 NA14

ZB21 ZB26 ZC75

4C206 AA01 AA02 HA03 KA01 NA14 ZB21 ZB26 ZC75