

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成31年3月14日(2019.3.14)

【公表番号】特表2018-506995(P2018-506995A)

【公表日】平成30年3月15日(2018.3.15)

【年通号数】公開・登録公報2018-010

【出願番号】特願2017-562971(P2017-562971)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	5/078	(2010.01)
C 0 7 K	16/46	(2006.01)
A 6 1 P	31/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/06	(2006.01)
A 6 1 P	37/02	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/17	(2015.01)
A 6 1 K	35/12	(2015.01)
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/078	
C 0 7 K	16/46	
A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 K	35/12	
C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 Q	1/02	
C 0 7 K	16/28	

【手続補正書】

【提出日】平成31年2月1日(2019.2.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

導入遺伝子及びD H F R F S を含むか、または発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 2】**

導入遺伝子及びTYMS<sup>SS</sup>を含むか、または発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 3】**

導入遺伝子、DHFR<sup>FS</sup>、及びTYMS<sup>SS</sup>を含むか、または発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 4】**

DHFR<sup>FS</sup>及びTYMS<sup>SS</sup>を含むか、または発現する単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 5】**

前記単離された遺伝子導入哺乳類T細胞が、ヘルパーT細胞（TH細胞）、細胞傷害性T細胞（Tc細胞またはCTL）、メモリーT細胞（TCM細胞）、エフェクターT細胞（TEM細胞）、制御性T細胞（Treg細胞；抑制性T細胞としても知られる）、ナチュラルキラーT細胞（NKT細胞）、粘膜関連インバリアントT細胞、アルファ-ベータT細胞（T細胞）、及びガンマ-デルタT細胞（T細胞）からなる群から選択される、請求項1～4のいずれかに記載の単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 6】**

哺乳類T細胞におけるATHy毒性の阻害方法であって、前記哺乳類T細胞におけるATHyR導入遺伝子の発現を含む、前記阻害方法。

**【請求項 7】**

前記ATHyR導入遺伝子が、DHFR<sup>FS</sup>である、請求項5に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記ATHyR導入遺伝子が、TYMS<sup>SS</sup>である、請求項5に記載の方法。

**【請求項 9】**

哺乳類T細胞が、ヘルパーT細胞（TH細胞）、細胞傷害性T細胞（Tc細胞またはCTL）、メモリーT細胞（TCM細胞）、エフェクターT細胞（TEM細胞）、制御性T細胞（Treg細胞；抑制性T細胞としても知られる）、ナチュラルキラーT細胞（NKT細胞）、粘膜関連インバリアントT細胞、アルファ-ベータT細胞（T細胞）、及びガンマ-デルタT細胞（T細胞）からなる群から選択される、請求項6～8のいずれかに記載の方法。

**【請求項 10】**

対象導入遺伝子を発現するT細胞の選択方法であって、

a) 前記対象導入遺伝子及びDHFR<sup>FS</sup>を発現するT細胞を含む複数のT細胞に対するチミジン合成阻害剤の適用と、

b) 前記チミジン合成阻害剤の適用から7日後以降に生存している1つまたは複数のT細胞の選択と、

を含み、前記1つまたは複数のT細胞が、前記対象導入遺伝子及びDHFR<sup>FS</sup>を含むベクターを発現する、前記選択方法。

**【請求項 11】**

前記チミジン合成阻害剤が、トトレキサート（MTX）、5-FU、ラルチトレキセド、及びペメトレキセドからなる群から選択される、請求項10に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記T細胞が、ヘルパーT細胞（TH細胞）、細胞傷害性T細胞（Tc細胞またはCTL）、メモリーT細胞（TCM細胞）、エフェクターT細胞（TEM細胞）、制御性T細胞（Treg細胞；抑制性T細胞としても知られる）、ナチュラルキラーT細胞（NKT細胞）、粘膜関連インバリアントT細胞、アルファ-ベータT細胞（T細胞）、及びガンマ-デルタT細胞（T細胞）からなる群から選択される、請求項10に記載の方法。

**【請求項 13】**

MTX及び5-FUに対する耐性を有する末梢血単核細胞（PBMC）の選択的増殖方

法であって、

- a ) A T h y R 遺伝子を含むベクターを用いた P B M C への遺伝子導入と、
  - b ) チミジン合成阻害剤を用いた前記遺伝子導入 P B M C の処理と、
  - c ) 前記 A T h y R 遺伝子を発現する P B M C の選択と、
- を含む、前記選択的増殖方法。

【請求項 14】

前記遺伝子導入 P B M C に由来する T 細胞集団の増殖をさらに含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記チミジン合成阻害剤が、 M T X である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記チミジン合成阻害剤が、メトトレキサート ( M T X ) 、 5 - F U 、 ラルチトレキセド、及びペメトレキセドからなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 A T h y R 遺伝子が、 T Y M S <sup>S S</sup> である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 A T h y R 遺伝子が、 D H F R <sup>F S</sup> である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 19】

対象導入遺伝子と、 D H F R <sup>F S</sup> をコードするヌクレオチド配列と、を含む核酸配列を含む、単離された遺伝子導入哺乳類 T 細胞。

【請求項 20】

対象導入遺伝子と、 T Y M S <sup>S S</sup> をコードするヌクレオチド配列と、を含む核酸配列を含む、単離された遺伝子導入哺乳類 T 細胞。

【請求項 21】

対象導入遺伝子と、 D H F R <sup>F S</sup> をコードするヌクレオチド配列と、を含む核酸を含む、単離された遺伝子導入哺乳類 T 細胞であって、前記対象導入遺伝子と、 D H F R <sup>F S</sup> をコードする前記ヌクレオチド配列と、が機能可能なように連結される、前記単離された遺伝子導入哺乳類 T 細胞。

【請求項 22】

前記対象導入遺伝子と、 D H F R <sup>F S</sup> をコードする前記ヌクレオチド配列とが、発現に際して、同一の m R N A にコードされる、請求項 21 に記載の遺伝子導入哺乳類 T 細胞。

【請求項 23】

前記対象導入遺伝子をコードする前記配列と、 D H F R <sup>F S</sup> をコードする前記ヌクレオチド配列とが、内部リボソーム進入部位 ( I R E S ) またはリボソームスリップ配列によって分離される、請求項 21 に記載の遺伝子導入哺乳類 T 細胞。

【請求項 24】

前記対象導入遺伝子が、 D H F R <sup>F S</sup> をコードする前記ヌクレオチド配列に対して、 3 ' 側に位置する、請求項 21 に記載の遺伝子導入哺乳類 T 細胞。

【請求項 25】

対象導入遺伝子と、 T Y M S <sup>S S</sup> をコードするヌクレオチド配列と、を含む核酸を含む、単離された遺伝子導入哺乳類 T 細胞であって、前記対象導入遺伝子と、 T Y M S <sup>S S</sup> をコードする前記ヌクレオチド配列と、が機能可能なように連結される、前記単離された遺伝子導入哺乳類 T 細胞。

【請求項 26】

前記対象導入遺伝子と、 T Y M S <sup>S S</sup> をコードする前記ヌクレオチド配列とが、発現に際して、同一の m R N A にコードされる、請求項 25 に記載の遺伝子導入哺乳類 T 細胞。

【請求項 27】

前記対象導入遺伝子をコードする前記配列と、 T Y M S <sup>S S</sup> をコードするヌクレオチド配列とが、内部リボソーム進入部位 ( I R E S ) またはリボソームスリップ配列によって分離される、請求項 25 に記載の遺伝子導入哺乳類 T 細胞。

**【請求項 28】**

前記対象導入遺伝子が、 $TYMS^{S\ S}$ をコードする前記ヌクレオチド配列に対して、3'側に位置する、請求項25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 29】**

$DHFR^{F\ S}$ をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 30】**

前記対象導入遺伝子が、キメラ抗原受容体(CAR)構築物、ポリペプチドホルモン、自殺遺伝子、またはT細胞受容体(TCR)をコードする、請求項25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 31】**

前記対象導入遺伝子が、増殖因子またはサイトカインをコードする、請求項25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 32】**

前記サイトカインが、IL-12である、請求項31に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 33】**

前記サイトカインが、IL-15である、請求項31に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 34】**

導入遺伝子及び $DHFR^{F\ S}$ を発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞であって、前記T細胞が、(1)前記導入遺伝子をコードする配列を含むポリヌクレオチドと、(2)前記 $DHFR^{F\ S}$ をコードする配列を含むポリヌクレオチドと、を含む、前記単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 35】**

導入遺伝子及び $TYMS^{S\ S}$ を発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞であって、前記T細胞が、(1)前記導入遺伝子をコードする配列を含むポリヌクレオチドと、(2)前記 $TYMS^{S\ S}$ をコードする配列を含むポリヌクレオチドと、を含む、前記単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 36】**

前記T細胞が、ヘルパーT細胞(TH細胞)、細胞傷害性T細胞(Tc細胞またはCTL)、メモリーT細胞(TCM細胞)、エフェクターT細胞(TEM細胞)、制御性T細胞(Treg細胞；抑制性T細胞としても知られる)、ナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)、粘膜関連インバリアントT細胞、アルファ-ベータT細胞(T細胞)、及びガンマ-デルタT細胞(T細胞)からなる群から選択される、請求項19～35のいずれかに記載の単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 37】**

癌を有する患者を治療するための組成物であって、請求項1～4及び請求項16～21のいずれかに記載の単離された遺伝子導入哺乳類T細胞の、治療上有効な量を含む、前記組成物。

**【請求項 38】**

前記図のいずれかにおいて示されるか、または前記説明に記載の対象導入遺伝子を発現するT細胞の、選択方法。

**【請求項 39】**

前記図のいずれかにおいて示されるか、または前記説明に記載の、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

**【請求項 40】**

前記図のいずれかにおいて示されるか、または前記説明に記載の、MTX、5-FU、ラルチトレキセド、及びペメトレキセドのうちの1つまたは複数に対する耐性を有するヒトT細胞の、選択的増殖方法。

**【請求項 4 1】**

前記 T 細胞が、ヘルパー T 細胞 (T H 細胞)、細胞傷害性 T 細胞 (T c 細胞または C T L)、メモリー T 細胞 (T C M 細胞)、エフェクター T 細胞 (T E M 細胞)、制御性 T 細胞 (T r e g 細胞；抑制性 T 細胞としても知られる)、ナチュラルキラー T 細胞 (N K T 細胞)、粘膜関連インバリアント T 細胞、アルファ - ベータ T 細胞 (T  $\alpha\beta$  細胞)、及びガンマ - デルタ T 細胞 (T  $\gamma\delta$  細胞) からなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

**【請求項 4 2】**

哺乳類から単離された T 細胞集団における制御性 T 細胞の濃縮方法であって、前記 T 細胞集団と、MTX、5-FU、ラルチトレキセド、及びペメトレキセド、またはそれらの組み合わせからなる群から選択されるチミジン合成阻害剤と、の接触によって、前記集団におけるエフェクター T 細胞を選択的に枯渇させる、前記濃縮方法。

**【請求項 4 3】**

哺乳類から単離された前記 T 細胞集団が、MTX 及び 5-FU の両方と接触する、請求項 4 2 に記載の方法。

**【請求項 4 4】**

哺乳類から単離された T 細胞集団における制御性 T 細胞の枯渇方法であって、1つまたは複数のアミノグリコシドの存在下で前記 T 細胞集団を培養して、前記培養において前記制御性 T 細胞を選択的に枯渇させることによる前記枯渇方法としてさらに定義される、請求項 4 0 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 4 5】**

前記 T 細胞が、DHFR<sup>F</sup><sup>S</sup> 及び TYMS<sup>S</sup><sup>S</sup> のうちの 1 つまたは複数を発現する、請求項 4 0 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 4 6】**

哺乳類から単離された制御性 T 細胞の選択方法であって、  
a) チミジン合成阻害剤を用いた、DHFR<sup>F</sup><sup>S</sup> 及び TYMS<sup>S</sup><sup>S</sup> のうちの 1 つまたは複数を発現する複数の T 細胞の処理と、  
b) 制御性 T 細胞のマーカーを発現する制御性 T 細胞の選択と、  
を含む、前記選択方法。

**【請求項 4 7】**

前記複数の T 細胞が、DHFR<sup>F</sup><sup>S</sup> を発現する、請求項 4 6 に記載の方法。

**【請求項 4 8】**

前記選択段階が、抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD39 抗体、抗 CD45 抗体、抗 CD152 抗体、及び抗 LAMP 抗体のうちの 1 つまたは複数を使用する、磁気ビーズによる選別を用いた細胞の単離を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

**【請求項 4 9】**

前記選択段階が、抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD25 抗体、抗 CD39 抗体、抗 CD45 抗体、抗 CD152 抗体、抗 KI-67 抗体、及び抗 FOXP3 抗体のうちの 1 つまたは複数を使用する、磁気ビーズによる選別を用いた細胞の単離を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記チミジン合成阻害剤が、メトトレキサート (MTX) である、請求項 4 6 に記載の方法。

**【請求項 5 1】**

前記チミジン合成阻害剤が、5-FU である、請求項 4 6 に記載の方法。

**【請求項 5 2】**

前記チミジン合成阻害剤が、ラルチトレキセドまたはペメトレキセドである、請求項 4 6 に記載の方法。

**【請求項 5 3】**

c) 葉酸 (f o l a t e) を用いた、前記制御性 T 細胞の処理、  
をさらに含む、請求項 4\_6 に記載の方法。

【請求項 5 4】

c) 制御性 T 細胞における葉酸 (f o l a t e) 合成の回復、  
をさらに含む、請求項 4\_6 に記載の方法。

【請求項 5 5】

c) ロイコボリン及び F U のうちの 1 つまたは複数を用いた、前記制御性 T 細胞の処理  
、  
をさらに含む、請求項 4\_6 に記載の方法。

【請求項 5 6】

c) ロイコボリン及び M T X のうちの 1 つまたは複数を用いた、前記制御性 T 細胞の処理、  
をさらに含む、請求項 4\_6 に記載の方法。

【請求項 5 7】

哺乳類から単離された第 1 の複数の T 細胞と、チミジン合成阻害剤と、を含む組成物であって、哺乳類から単離され、チミジン合成阻害剤を含まない第 2 の複数の T 細胞と比較して、前記第 1 の複数の T 細胞の制御性 T 細胞が濃縮される、前記組成物。

【請求項 5 8】

第 1 の導入遺伝子の発現制御の提供方法であって、T Y M S <sup>S S</sup> をコードするヌクレオチド配列に機能可能なように連結された前記第 1 の導入遺伝子を含む核酸を含む遺伝子導入哺乳類細胞の提供を含み、前記細胞が、D H F R <sup>F S</sup> をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、前記提供方法。

【請求項 5 9】

前記第 1 の導入遺伝子と、T Y M S <sup>S S</sup> をコードするヌクレオチド配列とが、発現に際して、同一の m R N A にコードされる、請求項 5\_8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記第 1 の導入遺伝子をコードする前記配列と、T Y M S <sup>S S</sup> をコードする前記ヌクレオチド配列とが、内部リボソーム進入部位 (I R E S) またはリボソームスリップ配列によって分離される、請求項 5\_8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記第 1 の対象導入遺伝子が、キメラ抗原受容体 (C A R) 構築物である、請求項 5\_8 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記第 1 の対象導入遺伝子が、ポリペプチドホルモン、ケモカイン、またはサイトカインである、請求項 5\_8 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記サイトカインが、I L - 1 2 である、請求項 6\_2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記サイトカインが、I L - 1 5 である、請求項 6\_2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

D H F R <sup>F S</sup> をコードする前記ヌクレオチド配列が、機能可能なように第 2 の導入遺伝子に連結される、請求項 5\_8 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記第 2 の導入遺伝子と、D H F R <sup>F S</sup> をコードする前記ヌクレオチド配列とが、発現に際して、同一の m R N A にコードされる、請求項 6\_5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記第 2 の対象導入遺伝子をコードする前記配列と、D H F R <sup>F S</sup> をコードするヌクレオチド配列とが、内部リボソーム進入部位 (I R E S) またはリボソームスリップ配列によって分離される、請求項 6\_6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記第2の導入遺伝子が、自殺遺伝子、CAR、TCR、ポリペプチドホルモン、サイトカイン、ケモカイン、または転写因子である、請求項6\_6に記載の方法。

【請求項6\_9】

前記自殺遺伝子が、誘導性自殺遺伝子である、請求項6\_8に記載の方法。

【請求項7\_0】

前記自殺遺伝子が、誘導性カスパーゼ9である、請求項6\_9に記載の方法。

【請求項7\_1】

前記哺乳類細胞が、T細胞である、請求項5\_8に記載の方法。

【請求項7\_2】

TYMS<sup>SS</sup>と、第1の導入遺伝子をコードする配列と、をコードする、組換えRNA。

【請求項7\_3】

5'から3'に向かって、TYMS<sup>SS</sup>をコードする配列と、IL-12をコードする配列と、を含む組換え核酸分子であって、発現に際して、TYMS<sup>SS</sup>をコードする前記配列と、IL-12をコードする配列と、が同一RNAにコードされる、前記組換え核酸分子。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0174

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0174】

本出願において引用及び参照される特許及び刊行物はすべて、それらの全体が参照によって本明細書に援用される。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

導入遺伝子及びDHF<sup>FS</sup>を含むか、または発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目2)

導入遺伝子及びTYMS<sup>SS</sup>を含むか、または発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目3)

導入遺伝子、DHF<sup>FS</sup>、及びTYMS<sup>SS</sup>を含むか、または発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目4)

DHF<sup>FS</sup>及びTYMS<sup>SS</sup>を含むか、または発現する単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目5)

前記単離された遺伝子導入哺乳類T細胞が、ヘルパーT細胞(TH細胞)、細胞傷害性T細胞(Tc細胞またはCTL)、メモリーT細胞(TCM細胞)、エフェクターT細胞(TEM細胞)、制御性T細胞(Treg細胞；抑制性T細胞としても知られる)、ナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)、粘膜関連インバリアントT細胞、アルファ-ベータT細胞(T細胞)、及びガンマ-デルタT細胞(T細胞)からなる群から選択される、項目1～4のいずれかに記載の単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目6)

哺乳類T細胞におけるAthy毒性の阻害方法であって、前記哺乳類T細胞におけるAthyR導入遺伝子の発現を含む、前記阻害方法。

(項目7)

前記AthyR導入遺伝子が、DHF<sup>FS</sup>である、項目5に記載の方法。

(項目8)

前記A Th y R導入遺伝子が、T Y M S S Sである、項目5に記載の方法。

(項目9)

哺乳類T細胞が、ヘルパーT細胞(T H細胞)、細胞傷害性T細胞(T c細胞またはC T L)、メモリーT細胞(T C M細胞)、エフェクターT細胞(T E M細胞)、制御性T細胞(T r e g細胞；抑制性T細胞としても知られる)、ナチュラルキラーT細胞(N K T細胞)、粘膜関連インバリアントT細胞、アルファ-ベータT細胞(T 細胞)、及びガンマ-デルタT細胞(T 細胞)からなる群から選択される、項目6～8のいずれかに記載の方法。

(項目10)

対象導入遺伝子を発現するT細胞の選択方法であって、

a) 前記対象導入遺伝子及びD H F R F Sを発現するT細胞を含む複数のT細胞に対するチミジン合成阻害剤の適用と、

b) 前記チミジン合成阻害剤の適用から7日後以降に生存している1つまたは複数のT細胞の選択と、

を含み、前記1つまたは複数のT細胞が、前記対象導入遺伝子及びD H F R F Sを含むベクターを発現する、前記選択方法。

(項目11)

前記チミジン合成阻害剤が、トトレキサート(M T X)、5-F U、ラルチトレキセド、及びペメトレキセドからなる群から選択される、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記T細胞が、ヘルパーT細胞(T H細胞)、細胞傷害性T細胞(T c細胞またはC T L)、メモリーT細胞(T C M細胞)、エフェクターT細胞(T E M細胞)、制御性T細胞(T r e g細胞；抑制性T細胞としても知られる)、ナチュラルキラーT細胞(N K T細胞)、粘膜関連インバリアントT細胞、アルファ-ベータT細胞(T 細胞)、及びガンマ-デルタT細胞(T 細胞)からなる群から選択される、項目10に記載の方法。

。

(項目13)

M T X及び5-F Uに対する耐性を有する末梢血単核細胞(P B M C)の選択的増殖方法であって、

a) A Th y R遺伝子を含むベクターを用いたP B M Cへの遺伝子導入と、

b) チミジン合成阻害剤を用いた前記遺伝子導入P B M Cの処理と、

c) 前記A Th y R遺伝子を発現するP B M Cの選択と、

を含む、前記選択的増殖方法。

(項目14)

前記遺伝子導入P B M Cに由来するT細胞集団の増殖をさらに含む、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記チミジン合成阻害剤が、M T Xである、項目13に記載の方法。

(項目16)

前記チミジン合成阻害剤が、メトトレキサート(M T X)、5-F U、ラルチトレキセド、及びペメトレキセドからなる群から選択される、項目13に記載の方法。

(項目17)

前記A Th y R遺伝子が、T Y M S S Sである、項目13に記載の方法。

(項目18)

前記A Th y R遺伝子が、D H F R F Sである、項目13に記載の方法。

(項目19)

対象導入遺伝子と、D H F R F Sをコードするヌクレオチド配列と、を含む核酸配列を含む、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目20)

対象導入遺伝子と、T Y M S S<sub>5</sub>をコードするヌクレオチド配列と、を含む核酸配列を含む、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目21)

対象導入遺伝子と、D H F R F S<sub>5</sub>をコードするヌクレオチド配列と、を含む核酸を含む、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞であって、前記対象導入遺伝子と、D H F R F S<sub>5</sub>をコードする前記ヌクレオチド配列と、が機能可能なように連結される、前記単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目22)

前記対象導入遺伝子と、D H F R F S<sub>5</sub>をコードする前記ヌクレオチド配列とが、発現に際して、同一のmRNAにコードされる、項目21に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目23)

前記対象導入遺伝子をコードする前記配列と、D H F R F S<sub>5</sub>をコードする前記ヌクレオチド配列とが、内部リボソーム進入部位(IRES)またはリボソームスリップ配列によって分離される、項目21に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目24)

前記対象導入遺伝子が、D H F R F S<sub>5</sub>をコードする前記ヌクレオチド配列に対して、3'側に位置する、項目21に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目25)

対象導入遺伝子と、T Y M S S<sub>5</sub>をコードするヌクレオチド配列と、を含む核酸を含む、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞であって、前記対象導入遺伝子と、T Y M S S<sub>5</sub>をコードする前記ヌクレオチド配列と、が機能可能なように連結される、前記単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目26)

前記対象導入遺伝子と、T Y M S S<sub>5</sub>をコードする前記ヌクレオチド配列とが、発現に際して、同一のmRNAにコードされる、項目25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目27)

前記対象導入遺伝子をコードする前記配列と、T Y M S S<sub>5</sub>をコードするヌクレオチド配列とが、内部リボソーム進入部位(IRES)またはリボソームスリップ配列によって分離される、項目25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目28)

前記対象導入遺伝子が、T Y M S S<sub>5</sub>をコードする前記ヌクレオチド配列に対して、3'側に位置する、項目25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目29)

D H F R F S<sub>5</sub>をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、項目25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目30)

前記対象導入遺伝子が、キメラ抗原受容体(CAR)構築物、ポリペプチドホルモン、自殺遺伝子、またはT細胞受容体(TCR)をコードする、項目25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目31)

前記対象導入遺伝子が、増殖因子またはサイトカインをコードする、項目25に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目32)

前記サイトカインが、IL-12である、項目31に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目33)

前記サイトカインが、IL-15である、項目31に記載の遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目34)

導入遺伝子及びD H F R F S<sub>5</sub>を発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞であって、前記T細胞が、(1)前記導入遺伝子をコードする配列を含むポリヌクレオチドと、(2)前記D H F R F S<sub>5</sub>をコードする配列を含むポリヌクレオチドと、を含む、前記単離さ

れた遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目35)

導入遺伝子及びTYMS<sup>SS</sup>を発現する、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞であって、前記T細胞が、(1)前記導入遺伝子をコードする配列を含むポリヌクレオチドと、(2)前記TYMS<sup>SS</sup>をコードする配列を含むポリヌクレオチドと、を含む、前記単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目36)

前記T細胞が、ヘルパーT細胞(TH細胞)、細胞傷害性T細胞(Tc細胞またはCTL)、メモリーT細胞(TCM細胞)、エフェクターT細胞(TEM細胞)、制御性T細胞(Treg細胞；抑制性T細胞としても知られる)、ナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)、粘膜関連インバリアントT細胞、アルファ-ベータT細胞(T細胞)、及びガンマ-デルタT細胞(T細胞)からなる群から選択される、項目19～35のいずれかに記載の単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目37)

癌を有する患者の治療方法であって、項目1～4及び項目16～21のいずれかに記載の単離された遺伝子導入哺乳類T細胞の、治療上有効な量での患者に対する投与を含む、前記治療方法。

(項目38)

前記図のいずれかにおいて示されるか、または前記説明に記載の対象導入遺伝子を発現するT細胞の、選択方法。

(項目39)

前記図のいずれかにおいて示されるか、または前記説明に記載の、単離された遺伝子導入哺乳類T細胞。

(項目40)

前記図のいずれかにおいて示されるか、または前記説明に記載の、MTX、5-FU、ラルチトレキセド、及びペメトレキセドのうちの1つまたは複数に対する耐性を有するヒトT細胞の、選択的増殖方法。

(項目41)

前記T細胞が、ヘルパーT細胞(TH細胞)、細胞傷害性T細胞(Tc細胞またはCTL)、メモリーT細胞(TCM細胞)、エフェクターT細胞(TEM細胞)、制御性T細胞(Treg細胞；抑制性T細胞としても知られる)、ナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)、粘膜関連インバリアントT細胞、アルファ-ベータT細胞(T細胞)、及びガンマ-デルタT細胞(T細胞)からなる群から選択される、項目40に記載の方法。

(項目42)

哺乳類から単離されたT細胞集団における制御性T細胞の濃縮方法であって、前記T細胞集団と、MTX、5-FU、ラルチトレキセド、及びペメトレキセド、またはそれらの組み合わせからなる群から選択されるチミジン合成阻害剤との接触によって、前記集団におけるエフェクターT細胞を選択的に枯渇させる、前記濃縮方法。

(項目43)

哺乳類から単離された前記T細胞集団が、MTX及び5-FUの両方と接触する、項目42に記載の方法。

(項目45)

哺乳類から単離されたT細胞集団における制御性T細胞の枯渇方法であって、1つまたは複数のアミノグリコシドの存在下で前記T細胞集団を培養して、前記培養において前記制御性T細胞を選択的に枯渇させることによる前記枯渇方法としてさらに定義される、項目40～43のいずれか1項に記載の方法。

(項目46)

前記T細胞が、DHFR<sup>FS</sup>及びTYMS<sup>SS</sup>のうちの1つまたは複数を発現する、項目40～45のいずれか1項に記載の方法。

(項目47)

哺乳類から単離された制御性T細胞の選択方法であって、

a) チミジン合成阻害剤を用いた、DHFR<sup>FS</sup>及びTYMS<sup>SS</sup>のうちの1つまたは複数を発現する複数のT細胞の処理と、

b) 制御性T細胞のマーカーを発現する制御性T細胞の選択と、  
を含む、前記選択方法。

(項目48)

前記複数のT細胞が、DHFR<sup>FS</sup>を発現する、項目47に記載の方法。

(項目49)

前記選択段階が、抗CD4抗体、抗CD25抗体、抗CD3抗体、抗CD8抗体、抗CD39抗体、抗CD45抗体、抗CD152抗体、及び抗LAP抗体のうちの1つまたは複数を使用する、磁気ビーズによる選別を用いた細胞の単離を含む、項目47に記載の方法。

(項目50)

前記選択段階が、抗CD4抗体、抗CD25抗体、抗CD3抗体、抗CD8抗体、抗CD25抗体、抗CD39抗体、抗CD45抗体、抗CD152抗体、抗K1-67抗体、及び抗FoxP3抗体のうちの1つまたは複数を使用する、磁気ビーズによる選別を用いた細胞の単離を含む、項目47に記載の方法。

(項目51)

前記チミジン合成阻害剤が、メトトレキサート(MTX)である、項目47に記載の方法。

(項目52)

前記チミジン合成阻害剤が、5-FUである、項目47に記載の方法。

(項目53)

前記チミジン合成阻害剤が、ラルチトレキセドまたはペメトレキセドである、項目47に記載の方法。

(項目54)

c) 葉酸(folate)を用いた、前記制御性T細胞の処理、  
をさらに含む、項目47に記載の方法。

(項目55)

c) 制御性T細胞における葉酸(folate)合成の回復、  
をさらに含む、項目47に記載の方法。

(項目56)

c) ロイコボリン及びFUのうちの1つまたは複数を用いた、前記制御性T細胞の処理、  
をさらに含む、項目47に記載の方法。

(項目57)

c) ロイコボリン及びMTXのうちの1つまたは複数を用いた、前記制御性T細胞の処理、  
をさらに含む、項目47に記載の方法。

(項目58)

哺乳類から単離された第1の複数のT細胞と、チミジン合成阻害剤と、を含む組成物であって、哺乳類から単離され、チミジン合成阻害剤を含まない第2の複数のT細胞と比較して、前記第1の複数のT細胞の制御性T細胞が濃縮される、前記組成物。

(項目59)

第1の導入遺伝子の発現制御の提供方法であって、TYMS<sup>SS</sup>をコードするスクレオチド配列に機能可能なように連結された前記第1の導入遺伝子を含む核酸を含む遺伝子導入哺乳類細胞の提供を含み、前記細胞が、DHFR<sup>FS</sup>をコードするスクレオチド配列をさらに含む、前記提供方法。

(項目60)

前記第1の導入遺伝子と、T Y M S S S をコードするヌクレオチド配列とが、発現に際して、同一のm R N A にコードされる、項目59に記載の方法。

(項目61)

前記第1の導入遺伝子をコードする前記配列と、T Y M S S S をコードする前記ヌクレオチド配列とが、内部リボソーム進入部位(I R E S)またはリボソームスリップ配列によって分離される、項目59に記載の方法。

(項目62)

前記第1の対象導入遺伝子が、キメラ抗原受容体(C A R)構築物である、項目59に記載の方法。

(項目63)

前記第1の対象導入遺伝子が、ポリペプチドホルモン、ケモカイン、またはサイトカインである、項目59に記載の方法。

(項目64)

前記サイトカインが、I L - 12である、項目63に記載の方法。

(項目65)

前記サイトカインが、I L - 15である、項目63に記載の方法。

(項目66)

D H F R F S をコードする前記ヌクレオチド配列が、機能可能なように第2の導入遺伝子に連結される、項目59に記載の方法。

(項目67)

前記第2の導入遺伝子と、D H F R F S をコードする前記ヌクレオチド配列とが、発現に際して、同一のm R N A にコードされる、項目66に記載の方法。

(項目68)

前記第2の対象導入遺伝子をコードする前記配列と、D H F R F S をコードするヌクレオチド配列とが、内部リボソーム進入部位(I R E S)またはリボソームスリップ配列によって分離される、項目67に記載の方法。

(項目69)

前記第2の導入遺伝子が、自殺遺伝子、C A R、T C R、ポリペプチドホルモン、サイトカイン、ケモカイン、または転写因子である、項目67に記載の方法。

(項目70)

前記自殺遺伝子が、誘導性自殺遺伝子である、項目69に記載の方法。

(項目71)

前記自殺遺伝子が、誘導性カスパーゼ9である、項目70に記載の方法。

(項目72)

前記哺乳類細胞が、T細胞である、項目59に記載の方法。

(項目73)

T Y M S S S と、第1の導入遺伝子をコードする配列と、をコードする、組換えR N A 。

(項目74)

5'から3'に向かって、T Y M S S S をコードする配列と、I L - 12をコードする配列と、を含む組換え核酸分子であって、発現に際して、T Y M S S S をコードする前記配列と、I L - 12をコードする配列と、が同一R N A にコードされる、前記組換え核酸分子。