

(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2018-520679

(P2018-520679A)

(43) 公表日 平成30年8月2日(2018.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/62 (2006.01)</b>	C12N 15/62	ZNAZ 4B065
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	4C084
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 5/10	4H045
<b>C07K 14/725 (2006.01)</b>	C07K 14/725	
<b>A61P 37/04 (2006.01)</b>	A61P 37/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-568207 (P2017-568207)	(71) 出願人	398076227 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシ ティー アメリカ合衆国、メリーランド州 212 18、ボルチモア、ノース・チャールズ・ ストリート 3400
(86) (22) 出願日	平成28年6月29日 (2016.6.29)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月20日 (2018.2.20)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/040010	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87) 国際公開番号	W02017/004150	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 国際公開日	平成29年1月5日 (2017.1.5)		
(31) 優先権主張番号	62/186,108		
(32) 優先日	平成27年6月29日 (2015.6.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫チェックポイントキメラ抗原受容体療法

## (57) 【要約】

いくつかの態様では、実施形態は、キメラ膜貫通タンパク質に関する組成物および方法に関する。キメラ膜貫通タンパク質は、阻害受容体の細胞外ドメインと、免疫応答を活性化し得る細胞内シグナリングドメインとを含み得る。本発明は、例えば、阻害受容体の細胞外ドメインと、免疫応答を活性化し得る細胞内シグナリングドメインであって、細胞内シグナリングタンパク質の一部を含む細胞内シグナリングドメインとを含む、キメラ膜貫通タンパク質を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

阻害受容体の細胞外ドメインと、免疫応答を活性化し得る細胞内シグナリングドメインであって、細胞内シグナリングタンパク質の一部を含む細胞内シグナリングドメインとを含む、キメラ膜貫通タンパク質。

**【請求項 2】**

配列番号 10 の配列を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

**【請求項 3】**

配列番号 11 の配列を含む、請求項 2 に記載のタンパク質。

**【請求項 4】**

配列番号 7 および配列番号 8 の配列を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

**【請求項 5】**

配列番号 9 の配列を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

**【請求項 6】**

前記細胞内シグナリングドメインがキナーゼ活性を含む、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 7】**

前記細胞内シグナリングドメインがリン酸化部位を含む、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 8】**

前記阻害受容体の膜貫通ドメインまたは前記細胞内シグナリングタンパク質の膜貫通ドメインを含む、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 9】**

前記阻害受容体がヒト阻害受容体またはマウス阻害受容体である、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 10】**

天然のアゴニストの結合により、前記阻害受容体が免疫活性を減少させる、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 11】**

天然のアゴニストの結合により、前記阻害受容体が、T細胞増殖、T細胞生存、サイトカイン分泌または免疫細胞溶解活性を減少させ得る、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 12】**

前記阻害受容体がリンパ球阻害受容体である、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 13】**

前記阻害受容体が、CTLA-4、PD-1、LAG-3またはTim-3である、請求項 12 に記載のタンパク質。

**【請求項 14】**

前記阻害受容体がPD-1である、請求項 13 に記載のタンパク質。

**【請求項 15】**

前記細胞内シグナリングタンパク質がヒトタンパク質またはマウスタンパク質である、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 16】**

前記細胞内シグナリングタンパク質が免疫活性を増加させる、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 17】**

前記細胞内シグナリングタンパク質が、T細胞増殖、T細胞生存、サイトカイン分泌または免疫細胞溶解活性を増強し得る、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

**【請求項 18】**

10

20

30

40

50

前記細胞内シグナリングタンパク質が膜貫通タンパク質であるか、または前記細胞内シグナリングタンパク質が天然の膜貫通タンパク質に結合し得る、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 19】

前記細胞内シグナリングタンパク質がリンパ球タンパク質である、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 20】

前記細胞内シグナリングタンパク質が CD3、4-1BB または CD28 である、請求項 19 に記載のタンパク質。

【請求項 21】

前記細胞内シグナリングタンパク質が 4-1BB である、請求項 19 に記載のタンパク質。

【請求項 22】

自殺ドメインをさらに含む、上記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 23】

前記自殺ドメインがチミジンキナーゼ活性を有するか、または前記自殺ドメインがカスパーゼである、請求項 22 に記載のタンパク質。

【請求項 24】

前記自殺ドメインが HSV チミジンキナーゼのチミジンキナーゼドメインであるか、または前記自殺ドメインがカスパーゼ 9 の一部を含む、請求項 23 に記載のタンパク質。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載のキメラ膜貫通タンパク質をコードする、核酸。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の核酸を含む、組換え細胞。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載のキメラ膜貫通タンパク質を含む、組換え細胞。

【請求項 28】

リンパ球である、請求項 26 または 27 に記載の細胞。

【請求項 29】

T 細胞である、請求項 27 に記載の細胞。

【請求項 30】

腫瘍浸潤リンパ球（「TIL」）である、請求項 27 に記載の細胞。

【請求項 31】

骨髄浸潤リンパ球（「MIL」）である、請求項 27 に記載の細胞。

【請求項 32】

前記 MIL が低酸素 MIL である、請求項 31 に記載の細胞。

【請求項 33】

組換え細胞を作製するための方法であって、細胞に請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載のキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸分子をトランスフェクトまたは感染することを含む、方法。

【請求項 34】

前記細胞が MIL である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記細胞に前記キメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸分子をトランスフェクトまたは感染する前に、低酸素条件下で前記 MIL をインキュベートすることをさらに含む、請求項 33 または 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記低酸素条件が約 0.5% ~ 約 5% の酸素ガスを含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記低酸素条件が約 1% ~ 約 2% の酸素ガスを含む、請求項 35 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 38】  
前記低酸素インキュベーションの後に、正常酸素圧条件下で前記細胞をインキュベートすることをさらに含む、請求項 35 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 39】  
前記細胞と抗 CD3 / 抗 CD28 ビーズとを接触させることをさらに含む、請求項 33 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 40】  
被験体における免疫応答を増加させるための方法であって、請求項 26 ~ 32 のいずれか一項に記載の組換え細胞を前記被験体に投与することを含む、方法。
- 【請求項 41】 10  
前記組換え細胞を作製することをさらに含み、前記組換え細胞の作製が、細胞に前記キメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトすることを含む、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 42】  
前記被験体から前記細胞を単離することをさらに含む、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 43】  
前記被験体が新生物を有する、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 44】  
前記新生物が白血病、リンパ腫または多発性骨髄腫である、請求項 43 に記載の方法。
- 【請求項 45】 20  
前記被験体がヒトである、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 46】  
被験体における新生物を処置するための方法であって、請求項 26 ~ 32 のいずれか一項に記載の組換え細胞を前記被験体に投与することを含む、方法。
- 【請求項 47】  
前記組換え細胞を作製することをさらに含み、前記組換え細胞の作製が、細胞に前記キメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトすることを含む、請求項 46 に記載の方法。
- 【請求項 48】 30  
前記被験体から前記細胞を単離することをさらに含む、請求項 46 に記載の方法。
- 【請求項 49】  
前記被験体が新生物を有する、請求項 46 に記載の方法。
- 【請求項 50】  
前記新生物が多発性骨髄腫、白血病またはリンパ腫である、請求項 49 に記載の方法。
- 【請求項 51】  
前記被験体がヒトである、請求項 46 に記載の方法。
- 【請求項 52】  
前記細胞を前記被験体に投与する前に、  
前記細胞と抗 CD3 / 抗 CD28 ビーズとを接触させること；  
低酸素条件下で前記細胞をインキュベートすること；および  
正常酸素圧条件下で前記細胞をインキュベートすること  
をさらに含む、請求項 46 に記載の方法。
- 【請求項 53】 40  
低酸素条件下で前記細胞を約 0.5 ~ 約 4 日間インキュベートする、請求項 52 に記載の方法。
- 【請求項 54】  
正常酸素圧条件下で前記細胞を約 0.5 ~ 約 4 日間インキュベートする、請求項 52 に記載の方法。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】 50

## 【 0 0 0 1 】

## 関連出願の相互参照

本願は、2015年6月29日に出願された米国仮出願第62/186,108号の優先権を主張し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

## 背景

悪性腫瘍患者の大多数は、それらの疾患で死亡する。これらの患者を処置する1つのアプローチは、キメラ抗原受容体(「CAR」)の発現を介して腫瘍細胞において発現される抗原をターゲティングするようにT細胞を遺伝子改変することである。CARは、ヒト白血球抗原非依存的に細胞表面抗原を認識するように設計された抗原受容体である。CD19ターゲティングアプローチの成功の他、CARを発現する遺伝子改変細胞を使用して他の悪性腫瘍を処置する試みは、限定的に成功している。

10

## 【 0 0 0 3 】

最近、CTLA-4(イピリムマブ)およびPD-1(ニボルマブ、ペンブロリズマブ)をターゲティングするチェックポイント阻害抗体は、転移性メラノーマ、非小細胞肺癌(NSCLC)およびホジキンリンパ腫を含む様々な悪性腫瘍の処置においてかなりの活性を示した。これらのデータは、チェックポイント遮断がどのようにして、T細胞アネルギーを克服することによる有効な免疫療法の主な障害になるかを実証している。

20

## 【 発明の概要 】

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 4 】

## 概要

いくつかの態様では、実施形態は、阻害受容体の細胞外ドメインと、免疫応答を活性化し得る細胞内シグナリングドメインとを含むキメラ膜貫通タンパク質に関する。細胞外ドメインは、例えば、CTLA-4、PD-1、LAG-3またはTim-3由来の細胞外ドメインであり得る。細胞内シグナリングドメインは、例えば、CD3、4-1BBまたはCD28の細胞内シグナリングドメインであり得る。いくつかの態様では、実施形態は、本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸に関する。

30

## 【 0 0 0 5 】

いくつかの態様では、実施形態は、本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸を含む細胞に関する。いくつかの態様では、実施形態は、本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質を含む細胞に関する。

## 【 0 0 0 6 】

いくつかの態様では、実施形態は、組換え細胞を作製するための方法であって、細胞に本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトすることを含む方法に関する。

## 【 0 0 0 7 】

いくつかの態様では、実施形態は、被験体における免疫応答を増加させるための方法であって、本明細書に記載される組換え細胞を前記被験体に投与することを含む方法に関する。いくつかの態様では、実施形態は、被験体における新生物を処置するための方法であって、本明細書に記載される組換え細胞を前記被験体に投与することを含む方法に関する。

40

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 0 8 】

【 図1-1 】 図1は、CD8由来のリーダーペプチド(「CD8a LP」)と、マウスPD-1の細胞外ドメイン(「PD-1 ECD」)と、マウス4-1BBの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン(それぞれ「4-1BB TM」および「4-1BB ICD」)とを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードするヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。ヌクレオチド配列の逆相補体(配列番号2)も示されている。マウスリンパ球にお

50

る発現のために、コドン最適化した。

【図1-2】図1は、CD8由来のリーダーペプチド(「CD8a LP」と、マウスPD-1の細胞外ドメイン(「PD-1 ECD」と、マウス4-1BBの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン(それぞれ「4-1BB TM」と「4-1BB ICD」とを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードするヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。ヌクレオチド配列の逆相補体(配列番号2)も示されている。マウスリンパ球における発現のために、コドン最適化した。

【図1-3】図1は、CD8由来のリーダーペプチド(「CD8a LP」と、マウスPD-1の細胞外ドメイン(「PD-1 ECD」と、マウス4-1BBの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン(それぞれ「4-1BB TM」と「4-1BB ICD」とを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードするヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。ヌクレオチド配列の逆相補体(配列番号2)も示されている。マウスリンパ球における発現のために、コドン最適化した。

10

【図1-4】図1は、CD8由来のリーダーペプチド(「CD8a LP」と、マウスPD-1の細胞外ドメイン(「PD-1 ECD」と、マウス4-1BBの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン(それぞれ「4-1BB TM」と「4-1BB ICD」とを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードするヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。ヌクレオチド配列の逆相補体(配列番号2)も示されている。マウスリンパ球における発現のために、コドン最適化した。

【0009】

20

【図2-1】図2は、CD8由来のリーダーペプチド(「CD8a LP」と、ヒトPD-1の細胞外ドメイン(「PD-1 ECD」と、ヒト4-1BBの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン(それぞれ「4-1BB TM」と「4-1BB ICD」とを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードするヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。ヌクレオチド配列の逆相補体(配列番号4)も示されている。ヒトリンパ球における発現のために、コドン最適化した。

【図2-2】図2は、CD8由来のリーダーペプチド(「CD8a LP」と、ヒトPD-1の細胞外ドメイン(「PD-1 ECD」と、ヒト4-1BBの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン(それぞれ「4-1BB TM」と「4-1BB ICD」とを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードするヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。ヌクレオチド配列の逆相補体(配列番号4)も示されている。ヒトリンパ球における発現のために、コドン最適化した。

30

【図2-3】図2は、CD8由来のリーダーペプチド(「CD8a LP」と、ヒトPD-1の細胞外ドメイン(「PD-1 ECD」と、ヒト4-1BBの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン(それぞれ「4-1BB TM」と「4-1BB ICD」とを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードするヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。ヌクレオチド配列の逆相補体(配列番号4)も示されている。ヒトリンパ球における発現のために、コドン最適化した。

【図2-4】図2は、CD8由来のリーダーペプチド(「CD8a LP」と、ヒトPD-1の細胞外ドメイン(「PD-1 ECD」と、ヒト4-1BBの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン(それぞれ「4-1BB TM」と「4-1BB ICD」とを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードするヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。ヌクレオチド配列の逆相補体(配列番号4)も示されている。ヒトリンパ球における発現のために、コドン最適化した。

40

【0010】

【図3】図3は、以下の実施例2に記載されているトランスフェクションプロトコールを使用してmCherry遺伝子と、PD-1の細胞外ドメインを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸(配列番号1)とをトランスフェクトしたLenti-X 293T細胞に関するフローサイトメトリーの結果を示す。図3は、核酸が293T細胞において発現されることを示す。

50

## 【0011】

【図4】図4は、以下の実施例1に記載されている形質導入プロトコールを使用してmCherry遺伝子と、PD-1の細胞外ドメインおよび4-1BBの細胞内ドメインを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸（配列番号1）とを形質導入したLenti-X 293T細胞に関するフローサイトメトリーの結果を示す。6ウェルプレートの1ウェル中で、1.9mLのウイルスを細胞に形質導入した。図4は、核酸が293T細胞において発現されることを示す。

## 【0012】

【図5】図5は、以下の実施例1に記載されている形質導入プロトコールを使用してmCherry遺伝子と、PD-1の細胞外ドメインおよび4-1BBの細胞内ドメインを含むキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸（配列番号1）とを形質導入したLenti-X 293T細胞に関するフローサイトメトリーの結果を示す。6ウェルプレートの1ウェル中で、0.38mLのウイルスを細胞に形質導入した。図5は、核酸が293T細胞において発現されることを示す。

10

## 【0013】

【図6】パネルAおよびパネルBは、PD-1細胞外ドメインと、4-1BB膜貫通ドメインと、4-1BB細胞内ドメインとを有するキメラ受容体を含むMILが腫瘍特異性に悪影響を与えないことを示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0014】

20

詳細な説明

CAR療法は、これまでに大きな展望を示している。慢性リンパ球性白血病（CLL）およびより最近では急性リンパ芽球性白血病（ALL）をターゲティングするCD19 CARは、顕著な成功を収めている。興味深いことに、他の抗原をターゲティングするCARは、同様の臨床応答を提供しなかった。このような抗原標的アプローチの1つの限界は、特定の表面受容体を発現する疾患のみに限定されるというそれらの治療適用性であり、単一の腫瘍抗原をターゲティングするという限界は、抗原喪失変異体では再発をもたらしている。

## 【0015】

腫瘍免疫学における主な障害は、多くの細胞ベースのアプローチの固有の抗腫瘍効果を制限する腫瘍特異的寛容の誘導である。最近の研究では、チェックポイント阻害因子をターゲティングして、転移性メラノーマに対する抗CTLA-4および抗PD-1の承認をもたらすことによる有意な臨床効果が示されている。いくつかの態様では、実施形態は、チェックポイント阻害因子を発現し、細胞内ドメインを活性化する細胞外ドメインを含むキメラ受容体に関する。これは、寛容原性機構をハイジャックして活性化シグナルにするという利点を有する。このアプローチは、T細胞アネルギーが疾患の病因の主な側面であるすべての臨床状況であって、抗原特異性が内因性T細胞レパートリーによって提供されるすべての臨床状況において使用され得る。

30

## 【0016】

いくつかの態様では、実施形態は、阻害受容体の細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内シグナリングドメインとを含むキメラ膜貫通タンパク質に関する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナリングドメインは、免疫応答を活性化し得る。細胞内シグナリングドメインは、細胞内シグナリングタンパク質の一部を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、T細胞などの細胞の活性化を維持するために使用され得る。

40

## 【0017】

いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、シグナルを細胞内シグナリングドメインに伝達し得る。例えば、細胞外ドメインは、天然の阻害受容体のアゴニストの結合により、シグナルを細胞内シグナリングドメインに伝達し得る。

## 【0018】

シグナル伝達は、タンパク質のオリゴマー化を含み得る。オリゴマー化は、ホモオリゴ

50

マー化またはヘテロオリゴマー化を含み得る。オリゴマー化は、タンパク質のダイマー化（すなわち、第2のキメラ膜貫通タンパク質とのホモダイマー化または異なるタンパク質とのヘテロダイマー化）を含み得る。

【0019】

シグナル伝達は、リン酸化を含み得る。例えば、細胞内シグナリングドメインは、キナーゼ活性および/またはリン酸化部位を含み得る。シグナル伝達は、自己リン酸化、例えば細胞内シグナリングドメインの自己リン酸化を含み得る。

【0020】

いくつかの実施形態では、タンパク質は、膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、完全な膜タンパク質である。例えば、タンパク質は、1型膜タンパク質、2型膜タンパク質または複数回膜貫通タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、阻害受容体の膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、細胞内シグナリングタンパク質の膜貫通ドメインを含む。キメラ膜貫通タンパク質は、例えば、細胞膜を通過して細胞外ドメインを移行させるシグナルペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、

10

【化1】

IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV ( 配列番号 5)

の配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通タンパク質は、CD8由来のシグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、CD8リーダーペプチドを含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、

20

【化2】

MALPVTALLLPLALLLHAARP ( 配列番号 6)

を含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、阻害受容体の細胞外ドメインである。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、リガンド結合ドメイン、例えば阻害受容体のアゴニスト結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、リガンド結合に応じて膜を通過してシグナルを伝達するために十分な構造を含む。いかなる特定の理論にも縛られるものではないが、多価リガンドによって媒介されるオリゴマー化によってシグナルを伝達する阻害受容体の場合、単に存在するリガンド結合ドメインは、リガンド結合に応じて膜を通過してシグナルを伝達するために十分な構造であり得る。いかなる特定の理論にも縛られるものではないが、細胞膜に対する膜貫通ドメインの方向を変化させることによってシグナルを伝達する阻害受容体の場合、細胞外ドメインは、リガンド結合に応じて膜を通過してシグナルを伝達するために、リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインとの間の天然の構造を必要とし得る。例えば、細胞外ドメインは、そのリガンド結合ドメインからその膜貫通ドメインまでの阻害受容体の天然の配列を含み得る。

30

【0022】

天然の阻害受容体は、ヒト阻害受容体またはマウス阻害受容体であり得る。したがって、細胞外ドメインは、ヒトアミノ酸配列またはマウスアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、天然の阻害受容体の起源は、例えば、キメラ膜貫通タンパク質に対する免疫応答を回避するために、処置される被験体の種に一致するように選択される。それにもかかわらず、天然の阻害受容体は、例えば便宜上異なる種から選択され得る。したがって、キメラタンパク質は、タンパク質が発現される細胞の種またはタンパク質が投与される被験体のいずれかにとって異種由来のものでもよいし、または異種由来のものでもよい。

40

【0023】

いくつかの実施形態では、天然の阻害受容体は、天然のアゴニストの結合により免疫活性を減少させるタンパク質から選択される。例えば、天然の阻害受容体は、天然のアゴニ

50

ストの結合により、T細胞増殖、T細胞生存、サイトカイン分泌または免疫細胞溶解活性を減少させ得る。天然の阻害受容体は、リンパ球阻害受容体であり得る（すなわち、阻害受容体は、T細胞などのリンパ球において発現され得る）。例えば、天然の阻害受容体はT細胞において発現され得、天然の阻害受容体に対するアゴニストの結合は、T細胞増殖、T細胞生存、サイトカイン分泌または免疫細胞溶解活性に不利な細胞シグナリングを引き起こし得る。

【0024】

いくつかの実施形態では、天然の阻害受容体は、CTLA-4（細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質；CD152）、PD-1（プログラム細胞死タンパク質1；CD279）、LAG-3（リンパ球活性化遺伝子3；CD223）またはTim-3（T細胞免疫グロブリンムチン-3）であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、CTLA-4、PD-1、LAG-3またはTim-3由来の細胞外ドメインであり得る。阻害受容体は、PD-1であり得る。いくつかの実施形態では、膜貫通タンパク質は、PD-1の細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインの配列は、

【化3】

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT  
DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPK  
AQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV. ( 配列番号 7)

を含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、細胞内シグナリングドメインは、細胞内シグナリングタンパク質のシグナリングドメインである。いくつかの実施形態では、細胞内シグナリングドメインは、キナーゼ活性またはリン酸化部位を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞内シグナリングドメインは、例えば細胞膜を通過するシグナル伝達後に、キナーゼまたはホスホリラーゼなどのシグナリング分子を活性化し得る。細胞内シグナリングドメインは、下流のキナーゼまたはホスホリラーゼを介してシグナリングし得る。

【0026】

細胞内シグナリングタンパク質は、ヒトタンパク質またはマウスタンパク質であり得る。したがって、細胞内シグナリングドメインは、ヒトアミノ酸配列またはマウスアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞内シグナリングタンパク質は、例えば、シグナリングドメインが細胞の細胞質機構を利用して下流のシグナリング分子を活性化し得るように、処置に使用される被験体および細胞の種に一致するように選択される。それにもかかわらず、細胞内シグナリングタンパク質は、例えば、上記のように便宜上異なる種から選択され得る。

【0027】

いくつかの実施形態では、細胞内シグナリングタンパク質は、免疫活性を増加させる。したがって、キメラ膜貫通タンパク質を介したシグナル伝達は、細胞内シグナリングドメインが細胞内シグナリングカスケードを媒介する免疫活性を増加させるシグナルカスケードをもたらし得る。いくつかの実施形態では、細胞内シグナリングタンパク質は、T細胞増殖、T細胞生存、サイトカイン分泌または免疫細胞溶解活性を増強し得る。いくつかの実施形態では、細胞内シグナリングタンパク質は膜貫通タンパク質であるか、または細胞内シグナリングタンパク質は天然の膜貫通タンパク質に結合し得る。細胞内シグナリングタンパク質は、リンパ球タンパク質であり得る（すなわち、細胞内シグナリングタンパク質は、T細胞などのリンパ球において発現され得る）。

【0028】

いくつかの実施形態では、細胞内シグナリングタンパク質は、CD3（T細胞表面糖タンパク質CD3鎖；CD247）、4-1BB（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミ

10

20

30

40

50

リーメンバー 9 ; C D 1 3 7 ) または C D 2 8 ( T 細胞特異的 表面糖タンパク質 C D 2 8 ; T p 4 4 ) である。したがって、細胞内シグナリングタンパク質は、C D 3 、 4 - 1 B B、または C D 2 8 のシグナリングドメインを含み得る。細胞内シグナリングタンパク質は、4 - 1 B B であり得る。したがって、細胞内シグナリングタンパク質は、4 - 1 B B 由来のシグナリングドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、

【化 4】

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL ( 配列番号 8)

を含む。

10

【0029】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通タンパク質は、自殺ドメインを含む(すなわち、前記タンパク質を含む組換え細胞を殺傷する)。自殺ドメインは、チミジンキナーゼ活性またはカスパーゼ活性を含み得る。例えば、自殺ドメインは、チミジンキナーゼまたはカスパーゼであり得る。いくつかの実施形態では、自殺ドメインは、H S V チミジンキナーゼのチミジンキナーゼドメイン(「H S V - T K」)であるか、または自殺ドメインは、カスパーゼ 9 の一部を含む。

【0030】

いくつかの態様では、実施形態は、本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸分子に関する。核酸分子は、例えば、組換え細胞におけるキメラ膜貫通タンパク質の発現のために、キメラ膜貫通タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含み得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、細胞特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。

20

【0031】

核酸分子は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 4 に記載されている配列を含み得る。核酸分子は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 4 に記載されている配列における連続する少なくとも約 100、200、300、400、500、600 または 700 ヌクレオチドを含み得る。核酸分子は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 4 に記載されているヌクレオチド配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列相同性を有するヌクレオチド配列を含み得る。核酸分子は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 4 に記載されているヌクレオチド配列における連続する少なくとも約 100、200、300、400、500、600 または 700 ヌクレオチドと少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列相同性を有するヌクレオチド配列を含み得る。例えば、核酸分子は、配列番号 3 に記載されているヌクレオチド配列における連続する少なくとも 100 ヌクレオチドと少なくとも 95% の配列相同性を有するヌクレオチド配列を含み得る。

30

【0032】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、本明細書および/または図面に記載されているアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 または配列番号 11 に記載されているアミノ酸配列の 1 つまたはそれより多くを含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、核酸分子は、本明細書および/または図面に記載されているヌクレオチド配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列相同性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み得る。タンパク質の文脈では、相同性は、同一性または類似性であり得る。核酸分子の文脈では、配列相同性は、配列同一性を指し得る。相同性は、デフォルト設定を使用したルーチンツール、例えば E x p a s y、B L A S T p、C l u s t a l など

40

50

用いることによって使用され得る。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通タンパク質は、以下の表に記載されている1つまたはそれを超えるアミノ酸配列を含む：

【表 1】

配列	配列番号
IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV	5
MALPVTALLLPLALLLHAARP	6
PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLPGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV	7
KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	8
IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	9
PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLPGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	10
MALPVTALLLPLALLLHAARPPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLPGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	11

10

20

30

40

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通タンパク質は、本明細書に記載されるアミノ酸配列の1つと少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列相同性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 5 】

本明細書に記載されるアミノ酸配列の変異体は、様々な実施形態に含められ得る。「変異体」という用語は、タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列と比較して1つまたはそれを超える（例えば、1つ、2つ、3つ、4つなどの）アミノ酸置換、欠失および/または挿入が存在するタンパク質またはポリペプチドを指し、この用語は、タンパク質またはポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子変異体および選択的スプライス変異体を含む。「変異体」という用語は、アミノ酸配列における1つまたはそれを超えるアミノ酸を

50

類似もしくは相同アミノ酸または非類似アミノ酸で置き換えることを含む。いくつかの変異体は、アミノ酸配列における1つまたはそれを超えるアミノ酸位置におけるアラニン置換を含む。他の置換としては、タンパク質の総正味電荷、極性または疎水性にほとんどまたは全く影響を及ぼさない保存的置換が挙げられる。保存的置換は、キメラ膜貫通タンパク質の機能にわずかな影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、リンパ球、例えば実施例3に記載されている骨髄浸潤リンパ球(MIL)において発現される場合、機能は、タンパク質の特異性であり得る。当業者は、実施例3と同一または類似のプロトコールを使用して、本明細書で提供される配列と比較することによって、置換がキメラ膜貫通タンパク質の機能に影響を与えるかを決定し得る。非限定的で例示的な保存的置換は、以下の表に記載されている。いくつかの実施形態によれば、キメラ膜貫通タンパク質は、本明細書に記載されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【表 2】

## 保存的アミノ酸置換

塩基性：	アルギニン リジン ヒスチジン
酸性：	グルタミン酸 アスパラギン酸
非荷電極性：	グルタミン アスパラギン セリン トレオニン チロシン
非極性：	フェニルアラニン トリプトファン システイン グリシン アラニン バリン プロリン メチオニン ロイシン イソロイシン

10

20

30

40

## 【 0 0 3 6 】

以下の表は、保存的アミノ酸置換の別のスキームを示す。

【表 3】

元の残基	保存的置換
Ala	Gly; Ser; Thr
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His; Ser
Asp	Glu; Asn
Cys	Ser
Gln	Asn; Ser; Asp; Glu
Glu	Asp; Gln; Lys
Gly	Ala; Pro; Asn
His	Asn; Gln; Tyr
Ile	Leu; Val; Met; Val; Phe
Leu	Ile; Val; Met; Phe
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Tyr; Ile; Val; Phe
Pro	Ser; Thr; Ala; Gly
Phe	Met; Leu; Tyr; Trp
Ser	Thr; Gly; Asn; Asp
Thr	Ser; Asn
Trp	Tyr; Phe
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu; Met; Phe

10

20

30

## 【0037】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基の1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個は、保存的置換で改変される。いくつかの実施形態では、1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸残基のみが、保存的置換で置換される。

## 【0038】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通タンパク質は、配列番号10もしくは配列番号11の配列またはその変異体を含む。配列番号10は、配列番号5、7および8の組み合わせである。配列番号11は、配列番号5、6、7および8の組み合わせである。いくつかの実施形態では、配列番号6の配列は、細胞外膜へのキメラ膜貫通タンパク質の輸送を支援し得る別のシグナルペプチドまたはリーダー配列で置き換えられる。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメイン、例えば配列番号5は、異なる膜貫通タンパク質で置き換えられる。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、PD-1の膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、4-1BBの膜貫通ドメインである。

40

## 【0039】

いくつかの態様では、実施形態は、本明細書に開示される核酸を含む組換え細胞に関する。いくつかの実施形態では、実施形態は、本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質を含む組換え細胞に関する。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号5、6、7、

50

8、9、10もしくは11のタンパク質またはその変異体を含むキメラタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、リンパ球である。細胞は、T細胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（「TIL」）または骨髄浸潤リンパ球（「MIL」）であり得る。

【0040】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質を含む細胞は、被験体に投与された場合、キメラ膜貫通タンパク質を含まない細胞と比較して、被験体において長く存続し、および/または活性状態を長く保持する。

【0041】

いくつかの態様では、実施形態は、組換え細胞を作製するための方法であって、細胞に本明細書に記載される核酸分子をトランスフェクトすることを含む方法に関する。いくつかの態様では、実施形態は、組換え細胞を作製するための方法であって、細胞に本明細書に記載されるアミノ酸配列をコードする核酸分子をトランスフェクトすることを含む方法に関する。核酸分子は、プラスミドであり得る。細胞は、1つまたはそれを超える本明細書に記載されるヌクレオチド配列を含むプラスミドによってトランスフェクトされ得る。細胞はまた、核酸分子を含むウイルスまたはウイルス様粒子で感染され得る。いくつかの実施形態では、細胞は、TILまたはMILである。いくつかの実施形態では、MILは、活性化MILである。MILは、例えば低酸素条件下で、例えばそれらを抗CD3/抗CD28ビーズおよび適切なサイトカインと共にインキュベートすることによって活性化され得る。低酸素条件下におけるMILの成長の例は、例えば、国際公開第2016037054号（これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に見られ得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、本明細書に記載される低酸素環境下で細胞をインキュベートした後に、細胞にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、低酸素環境下で細胞を約1日間、2日間、3日間、4日間または5日間インキュベートした後に、細胞にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、次いで、細胞は、正常酸素圧（normoxic）条件下で約1日間、2日間、3日間、4日間または5日間インキュベートされる。

【0042】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通タンパク質を含むMILは、国際公開第2016037054号（これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法にしたがって調製される。いくつかの実施形態では、前記方法は、被験体由来の骨髄、リンパ球および/または骨髄浸潤リンパ球（「MIL」）中の細胞を抽出すること；低酸素環境下で前記細胞をインキュベートし、それにより、活性化MILを生産すること；ならびに前記活性化MILを被験体に投与することを含み得る。細胞はまた、本明細書に記載される抗CD3/抗CD28抗体およびサイトカインの存在下で活性化され得る。キメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸分子（例えば、本明細書に記載されるものの1つ）は、低酸素環境下でMILをインキュベートする前または後に、細胞にトランスフェクトまたは感染され得る。

【0043】

低酸素環境は、約21%未満の酸素、例えば約20%未満、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%または約3%未満の酸素を含み得る。例えば、低酸素環境は、約0%の酸素～約20%の酸素、例えば約0%の酸素～約19%の酸素、約0%の酸素～約18%の酸素、約0%の酸素～約17%の酸素、約0%の酸素～約16%の酸素、約0%の酸素～約15%の酸素、約0%の酸素～約14%の酸素、約0%の酸素～約13%の酸素、約0%の酸素～約12%の酸素、約0%の酸素～約11%の酸素、約0%の酸素～約10%の酸素、約0%の酸素～約9%の酸素、約0%の酸素～約8%の酸素、約0%の酸素～約7%の酸素、約0%の酸素～約6%の酸素、約0%の酸素～約5%の酸素、約0%の酸素～約4%の酸素または約0%の酸素～約3%の酸素を含み得る。いくつかの実施形態では、低酸素環境は、約1%～約7%の酸素を含む。いくつかの実施形態では、低酸素環境は、約1

10

20

30

40

50

% ~ 約 2 % の酸素である。いくつかの実施形態では、低酸素環境は、約 0 . 5 % ~ 約 1 . 5 % の酸素である。いくつかの実施形態では、低酸素環境は、約 0 . 5 % ~ 約 2 % の酸素である。低酸素環境は、約 2 0 %、1 9 %、1 8 %、1 7 %、1 6 %、1 5 %、1 4 %、1 3 %、1 2 %、1 1 %、1 0 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 % または約 0 % の酸素を含み得る。いくつかの実施形態では、低酸素環境は、約 7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 % または 1 % の酸素を含む。

【 0 0 4 4 】

低酸素環境下における M I L のインキュベートは、例えば、組織培養培地中で M I L を少なくとも約 1 時間、例えば少なくとも約 1 2 時間、1 8 時間、2 4 時間、3 0 時間、3 6 時間、4 2 時間、4 8 時間、6 0 時間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、1 0 日間、1 1 日間、1 2 日間、1 3 日間またはさらに少なくとも約 1 4 日間インキュベートすることを含み得る。インキュベートは、M I L を約 1 時間 ~ 約 3 0 日間、例えば約 1 日間 ~ 約 2 0 日間、約 1 日間 ~ 約 1 4 日間または約 1 日間 ~ 約 1 2 日間インキュベートすることを含み得る。いくつかの実施形態では、低酸素環境下における M I L のインキュベートは、低酸素環境下で M I L を約 2 日間 ~ 約 5 日間インキュベートすることを含む。前記方法は、低酸素環境下で M I L を約 1 日間、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、1 0 日間、1 1 日間、1 2 日間、1 3 日間または 1 4 日間インキュベートすることを含み得る。いくつかの実施形態では、前記方法は、低酸素環境下で M I L を約 3 日間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、低酸素環境下で M I L を約 2 日間 ~ 約 4 日間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、低酸素環境下で M I L を約 3 日 ~ 約 4 日間インキュベートすることを含む。

10

20

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態では、前記方法は、例えば、低酸素環境下で M I L をインキュベートした後に、正常酸素圧環境下で M I L をインキュベートすることをさらに含む。

【 0 0 4 6 】

正常酸素圧環境は、少なくとも約 2 1 % の酸素を含み得る。正常酸素圧環境は、約 5 % の酸素 ~ 約 3 0 % の酸素、例えば約 1 0 % の酸素 ~ 約 3 0 % の酸素、約 1 5 % の酸素 ~ 約 2 5 % の酸素、約 1 8 % の酸素 ~ 約 2 4 % の酸素、約 1 9 % の酸素 ~ 約 2 3 % の酸素または約 2 0 % の酸素 ~ 約 2 2 % の酸素を含み得る。いくつかの実施形態では、正常酸素圧環境は、約 2 1 % の酸素を含む。

30

【 0 0 4 7 】

正常酸素圧環境下における M I L のインキュベートは、例えば、組織培養培地中で M I L を少なくとも約 1 時間、例えば少なくとも約 1 2 時間、1 8 時間、2 4 時間、3 0 時間、3 6 時間、4 2 時間、4 8 時間、6 0 時間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、1 0 日間、1 1 日間、1 2 日間、1 3 日間またはさらに少なくとも約 1 4 日間インキュベートすることを含み得る。インキュベートは、M I L を約 1 時間 ~ 約 3 0 日間、例えば約 1 日間 ~ 約 2 0 日間、約 1 日間 ~ 約 1 4 日間、約 1 日間 ~ 約 1 2 日間または約 2 日間 ~ 約 1 2 日間インキュベートすることを含み得る。

40

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、細胞は、正常酸素圧環境下に置かれた後に、または正常酸素圧環境に置かれる前に、本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸分子をトランスフェクトまたは感染される。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、M I L は、被験体から骨髓サンプルを抽出し、本明細書に記載されるように細胞を培養 / インキュベートすることによって得られる。いくつかの実施形態では、骨髓サンプルは、赤血球を除去するために遠心分離される。いくつかの実施形態では、骨髓サンプルは、アフエレーシスに供されない。いくつかの実施形態では、骨髓サンプルは、末梢血リンパ球 (「 P B L 」) を含まないか、または骨髓サンプルは、P B L を実質的に含まない。これらの方法は、T I L として公知のものと同じものではない細

50

胞を選択する。したがって、M I LはT I Lではない。T I Lは、当業者に公知の方法によって選択され得、T I Lが本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質を発現し得るように、本明細書に記載される核酸分子をトランスフェクトまたは感染され得る。

**【0050】**

いくつかの実施形態では、細胞はまた、C D 3およびC D 2 8に対する抗体と共に培養することによって活性化される。これは、例えば、市販されているかまたは当業者によって作製され得る抗C D 3 / 抗C D 2 8ビーズと共に細胞をインキュベートすることによって実施され得る。次いで、細胞は、プレート、フラスコまたはバッグにプレーティングされ得る。低酸素条件は、9 5 %窒素および5 % C O<sub>2</sub> ガス混合物で低酸素チャンパーまたは細胞培養バッグのいずれかを3分間フラッシュすることによって達成され得る。これは、例えば、容器内のO<sub>2</sub> ガスを1 ~ 2 %またはそれ未満にし得る。次いで、細胞は、本明細書または国際公開第2 0 1 6 0 3 7 0 5 4号（これは、参照により本明細書に組み込まれる）の例に記載されているように培養され得る。

10

**【0051】**

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質を含む低酸素M I Lが提供される。いくつかの実施形態では、低酸素M I Lは、約0 . 5 % ~ 約5 %の酸素ガスの環境下にある。いくつかの実施形態では、低酸素M I Lは、約1 % ~ 約2 %の酸素ガスの環境下にある。いくつかの実施形態では、低酸素M I Lは、約1 % ~ 約3 %の酸素ガスの環境下にある。いくつかの実施形態では、低酸素M I Lは、約1 % ~ 約4 %の酸素ガスの環境下にある。低酸素M I Lは、低酸素環境（例えば、本明細書に記載される環境）下で一定期間（例えば、本明細書に記載される期間）インキュベートされたM I Lである。いかなる特定の理論にも縛られるものではないが、低酸素M I Lは、M I Lの抗腫瘍能力に影響を与えるタンパク質および / または遺伝子発現の変化を受ける。本明細書に記載されるように、低酸素M I Lはまた、抗C D 3 / 抗C D 2 8ビーズまたは他の類似の活性化試薬の存在下で活性化され得る。したがって、低酸素M I Lはまた、活性化低酸素M I Lであり得る。

20

**【0052】**

いくつかの態様では、実施形態は、被験体における免疫応答を増加させるための方法であって、本明細書に記載される組換え細胞を前記被験体に投与することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、実施形態は、被験体における新生物を処置するための方法であって、本明細書に記載される組換え細胞を前記被験体に投与することを含む方法に関する。新生物は、良性新生物、悪性新生物または二次新生物であり得る。新生物は、癌であり得る。新生物は、リンパ腫または白血病、例えば慢性リンパ球性白血病（「C L L」）または急性リンパ芽球性白血病（「A L L」）であり得る。新生物は、多発性骨髄腫および任意の固形腫瘍（例えば、乳癌、前立腺癌、肺癌、食道癌、脳癌、腎臓癌、膀胱癌、膵臓癌、骨肉腫など）であり得る。

30

**【0053】**

前記方法は、複数の本明細書に記載される組換え細胞を被験体に投与することを含み得る。前記方法は、有効量の本明細書に記載される組換え細胞を被験体に投与することを含み得る。

40

**【0054】**

いくつかの実施形態では、細胞は、被験体から得られる。トランスフェクトまたは感染される細胞は、被験体から得られ得る。細胞は、本明細書に記載されるように得られ得る。例えば、投与される細胞は、被験体にとって自己であり得る。いくつかの実施形態では、投与される細胞は、被験体にとって同種である。細胞は、被験体から得られ、本明細書に記載されるキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトまたは感染され得る。細胞は、娘細胞の親が被験体から得られた娘細胞であり得る。組換え細胞は、核酸をトランスフェクトもしくは感染されたものであり得るか、または組換え細胞の親は、核酸をトランスフェクトもしくは感染されたものであり得る。いくつかの実施形態では、トランスフェクトまたは感染された後の細胞は、本明細書に記載されるアミノ配列の1つ

50

またはそれよりも多くを含むタンパク質を発現する。

【0055】

前記方法は、組換え細胞を作製することをさらに含み得、組換え細胞の作製は、細胞に本明細書に記載されるものなどのキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトまたは感染することを含む。いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通タンパク質は、配列番号5、6、7、8、9、10もしくは11のいずれか1つに記載されているアミノ酸配列またはその変異体を含む。同様に、前記方法は、複数の組換え細胞を作製することをさらに含み得、複数の組換え細胞の作製は、複数の細胞に本明細書に記載されるものなどのキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトまたは感染することを含む。前記方法は、親細胞をエクспанションすることをさらに含み得る（例えば、組換え細胞は、親細胞の娘細胞であり得る）。前記方法は、細胞の集団をエクспанションすることを含み得る（例えば、前記方法は、複数の本明細書に記載される組換え細胞を被験体に投与することを含み得、複数の組換え細胞の各細胞は、親細胞の娘細胞であり得る）。

10

【0056】

前記方法は、被験体から細胞または親細胞を単離することをさらに含み得る。

【0057】

前記方法は、例えば、蛍光活性化細胞選別（「FACS」）または磁気活性化細胞選別（「MACS」）によって、細胞を選別することをさらに含み得る。

【0058】

細胞は、例えば、薬学的に許容され得る組成物で、任意の適切な経路によって被験体に投与され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、パイロジェンフリーである。例えば、細胞の投与は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して行われ得る。例えば、投与は、非経口、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、眼窩内、眼、脳室内、嚢内、髄腔内、嚢内、腹腔内、脳室内または髄腔内であり得る。非経口投与の場合、細胞は、静脈内注射、皮下注射または筋肉内注射のいずれかによって、薬学的に許容され得るビヒクルまたは担体を含む組成物で投与され得る。細胞は、注射、例えばポラス注射または連続注入による非経口投与のために製剤化され得る。組成物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクルの懸濁液、溶液またはエマルジョンなどの形態をとり得、製剤化剤、例えば懸濁剤、安定剤および/または分散剤を含有し得る。

20

30

【0059】

注射による投与の場合、緩衝剤または保存剤などの他の溶質と、溶液を等張性にするための十分な量の薬学的に許容され得る塩またはグルコースとをさらに含有し得る滅菌水性ビヒクルの細胞溶液を使用することが望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容され得る担体と共に製剤化され得、注射投与用の滅菌溶液または懸濁液を提供する。特に、注射剤は、液体溶液もしくは懸濁液として、またはエマルジョンとして従来の形態で調製され得る。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、マンニトール、ラクトース、レシチン、アルブミン、グルタミン酸ナトリウム、システイン塩酸塩などである。加えて、所望により、注射用医薬組成物は、微量の非毒性補助物質、例えば湿潤剤、pH緩衝剤などを含有し得る。適切な医薬担体は、“Remington's pharmaceutical Sciences” by E. W. Martinに記載されている。

40

【0060】

被験体は、免疫細胞を含む任意の生物であり得る。例えば、被験体は、齧歯類、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマおよび霊長類から選択され得る。被験体は、マウスまたはヒトであり得る。

【0061】

被験体は、新生物を有し得る。新生物は、良性新生物、悪性新生物または二次新生物であり得る。新生物は、癌であり得る。新生物は、リンパ腫または白血病、例えば慢性リンパ球性白血病（「CLL」）または急性リンパ芽球性白血病（「ALL」）であり得る。

50

被験体は、神経膠芽細胞腫、髄芽細胞腫、乳癌、頭頸部癌、腎臓癌、卵巣癌、カボジ肉腫、急性骨髄性白血病およびB系統悪性腫瘍を有し得る。被験体は、多発性骨髄腫を有し得る。

【0062】

いくつかの実施形態では、被験体は、「それを必要とする」被験体である。本明細書で使用される場合、「それを必要とする」という語句は、被験体が、特定の方法または処置の必要性を有すると特定されているかまたは疑われていることを意味する。いくつかの実施形態では、特定は、任意の診断手段によって行われ得る。本明細書に記載される方法および処置ではいずれも、被験体は、それを必要とするものであり得る。

【0063】

本明細書で使用される場合、「a」、「an」および「the」などの用語は、文脈上特に明確な要求がない限り、単数形および複数形の指示対象を含む。

【0064】

本明細書で使用される場合、「含む (comprise)」、「有する (have)」、「有する (has)」および「含む (include)」という用語およびそれらの活用形は、本明細書で使用される場合、「限定されないが、・・・を含む」を意味する。様々な構成要素または工程を「含む」(「限定されないが、・・・を含む」の意味として解釈される)という意味において、様々な組成物および方法が記載されるが、組成物、方法およびデバイスはまた、様々な構成要素および工程「から本質的になり」得るか、または様々な構成要素および工程「からなり」得、このような専門用語は、本質的に限定された要素群を定義するものとして解釈されるべきである。

【0065】

本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置された」または「処置すること」という用語は、対象が望ましくない生理学的症状、障害もしくは疾患を減速させる(低減する)か、または有益なもしくは所望の臨床結果を得る両方の治療処置を意味する。本明細書に記載される実施形態の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果としては、限定されないが、症候の緩和；症状、障害もしくは疾患の程度の縮小；症状、障害もしくは疾患の状態の安定化(すなわち、非悪化)；症状、障害もしくは疾患の発症の遅延もしくはその進行の減速；検出可能または検出不可能にかかわらず、症状、障害もしくは疾患の状態の向上もしくはその(部分的または完全にかかわらず)寛解；患者によって必ずしも認識されない少なくとも1つの測定可能な物理的パラメータの向上；または症状、障害もしくは疾患の増強もしくは改善が挙げられる。したがって、「癌の処置」または「癌を処置すること」は、癌または本明細書に記載される他の症状に関連する一次現象または二次症候のいずれかを緩和または向上する行為を意味する。いくつかの実施形態では、処置される癌は、本明細書に列挙される癌の1つである。

【実施例】

【0066】

以下の実施例は、本明細書に記載される方法および組成物の例示であり、限定するものではない。治療において通常直面する様々な条件およびパラメータに関する他の適切な改変および適合であって、当業者に明らかな改変および適合は、実施形態の思想および範囲内である。

【0067】

実施例1：CAR形質導入プロトコール

形質導入の16～24時間前に、T細胞を適切な培地にプレイングし、CD3、CD28およびIL-2で刺激した。次いで、細胞をインキュベーター(37 / 5% CO<sub>2</sub>)に一晩入れた。16～24時間後、細胞を損なわずに、可能な限り多くの培地を除去した。次いで、CARウイルスを細胞に追加し、インキュベーターに4～12時間戻した。4～12時間後、IL-2を含有する適切な体積の培地を細胞に戻し、次いで、インキュベーターに戻した。細胞をインキュベーター内で放置し、必要な場合には培地を分割および交換して、3～12日間成長させた。限定されないが、フローサイトメトリー、ウエ

10

20

30

40

50

スタンプロッキング、または蛍光レポーター遺伝子を使用した場合には蛍光顕微鏡法を含む様々な方法によって、CAR形質導入をチェックし得る。

【0068】

実施例2：CARトランスフェクションプロトコール

D MEM + 10% FBS 中、80% コンフルエントを決して超えない細胞密度で、293T細胞を2日毎に少なくとも3継代にわたって継代した。トランスフェクションの1日前に、24時間後(トランスフェクションの日)に約80%コンフルエントになる密度で、293T細胞を播種した。トランスフェクションの日に培地を除去し、十分な新鮮培地を追加して細胞をカバーした。別のチューブにおいて、VSV-G、Gag、Pol & Rev プラスミド、トランスフェクション試薬およびCARプラスミドを混ぜ合わせ、室温で10~20分間インキュベートした。次いで、この混合物を293T細胞に滴下し、一晚インキュベートした。トランスフェクションの12~24時間後、培地を完全に交換し、またはさらなる新鮮培地を追加した。トランスフェクションの48時間後および72時間後の両方に、細胞由来のウイルス含有培地を収集し、新鮮培地を細胞に補充した。収集した培地中の細胞を、遠心分離またはろ過によって除去した。次いで、収集した培地を超遠心分離でスピンして、ウイルスをペレット化した。過剰な培地を除去し、ウイルスをD MEM または HBSS に再懸濁し、滅菌チューブに等分し、使用まで -80 で保存した。

10

【0069】

実施例3：MILの機能および成長は、キメラ受容体タンパク質の存在によって悪影響を受けない。

20

被験体から得たMILを、本明細書に記載されるように活性化およびエクспанションした。簡潔に言えば、被験体から骨髄サンプルを得た後、国際公開第2016037054号(これは、参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように、低酸素条件下、抗CD3/抗CD28ビーズおよびサイトカインの存在下で、細胞をインキュベートした。次いで、配列番号11を含むキメラ膜貫通タンパク質をコードする核酸分子を含むウイルスをMILに感染させた。次いで、正常酸素圧条件下で細胞を成長させ、エクспанションした。対照MILおよび感染MILを異なる細胞型と接触させた。MILのエクспанションおよびMILの抗原認識能力は、キメラ膜貫通タンパク質の存在によって悪影響を受けなかった。これらの結果は、MILへのキメラ膜貫通タンパク質の添加が、その機能および成長に有害ではないことを実証している。結果は、2人の異なる患者からの図6パネルAおよびBに示されている。

30

【0070】

要約すると、本明細書で提供される実施形態および実施例は、キメラ膜貫通タンパク質を発現する細胞を有効に使用して癌を処置し、および/または免疫応答を調節し得ることを示している。

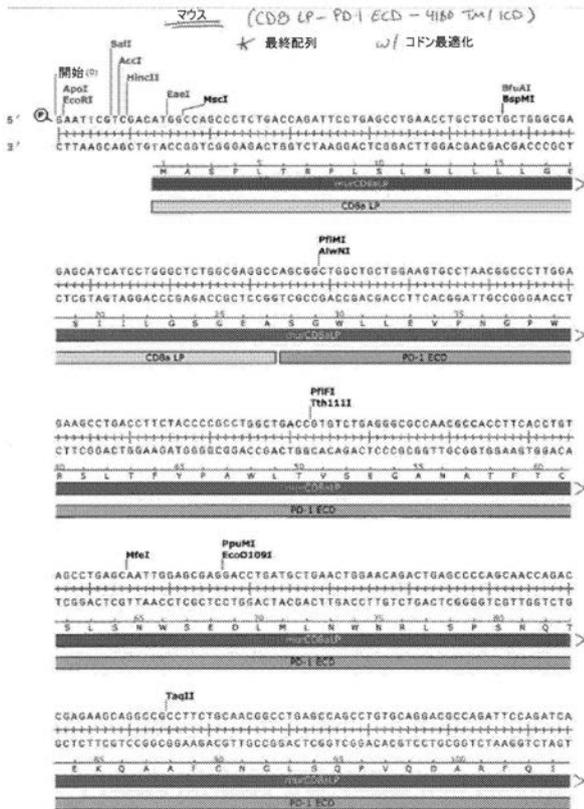
【0071】

本明細書で言及され、および/または出願書類に列挙されている米国特許、米国特許出願公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許文献(CAS番号を含む)はいずれも、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

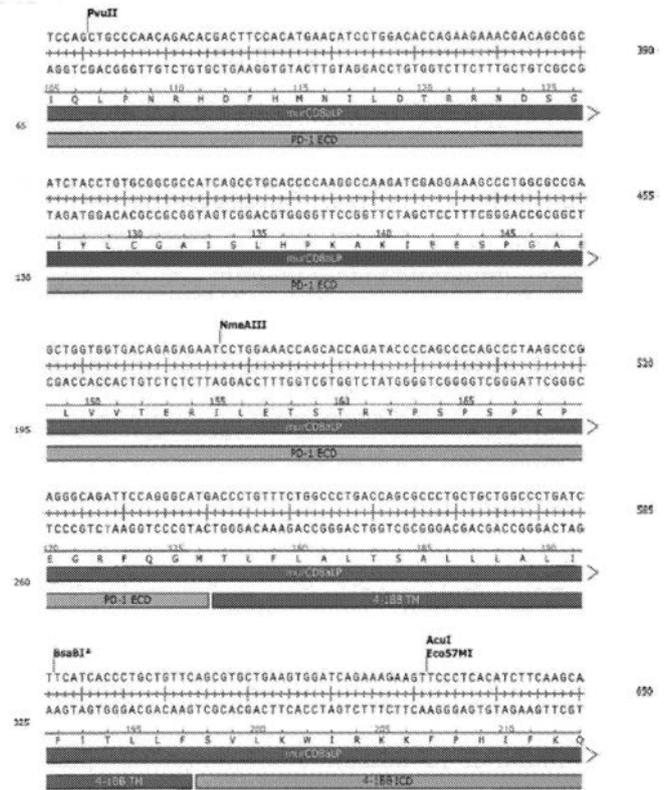
【図 1 - 1】

Figure 1



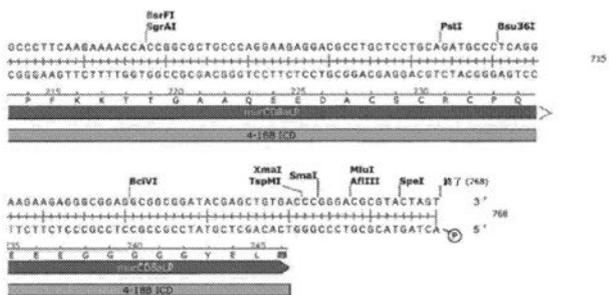
【図 1 - 2】

Figure 1 ( 続き )



【図 1 - 3】

Figure 1 ( 続き )



【図 1 - 4】

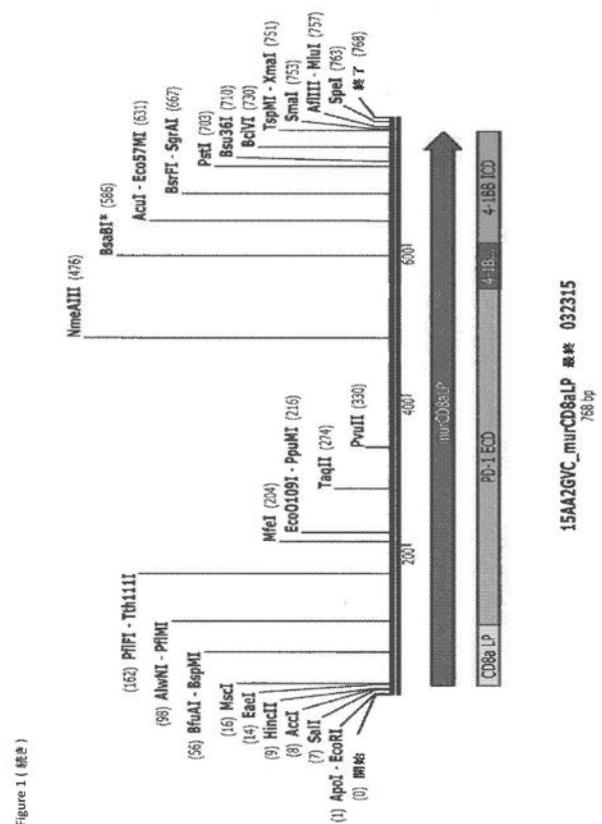
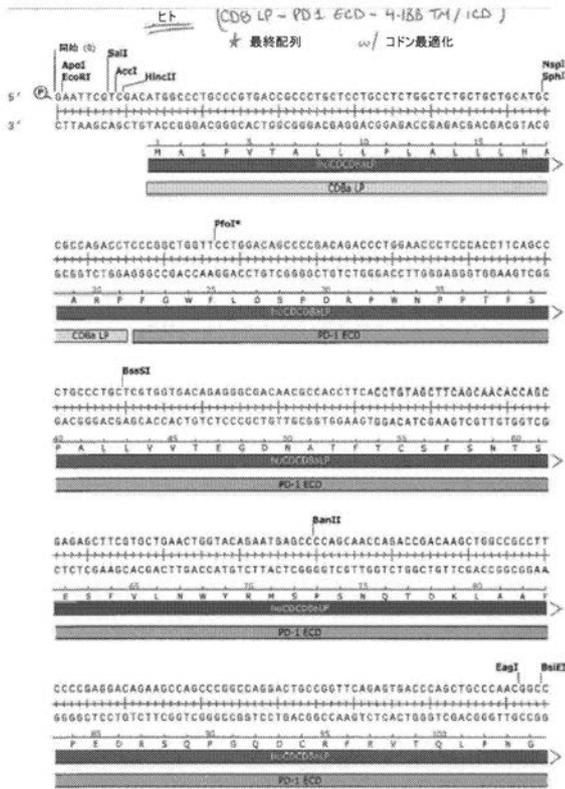


Figure 1 ( 続き )

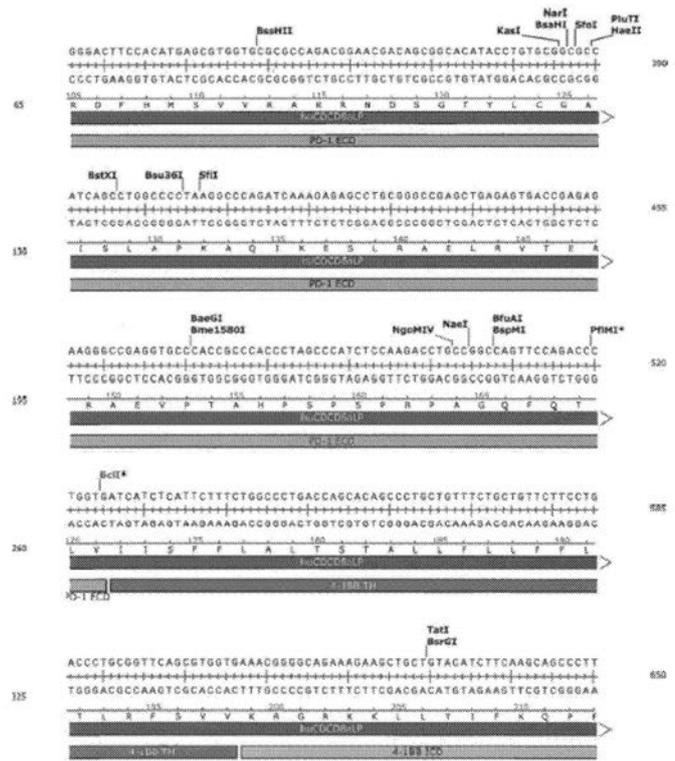
【図 2 - 1】

Figure 2



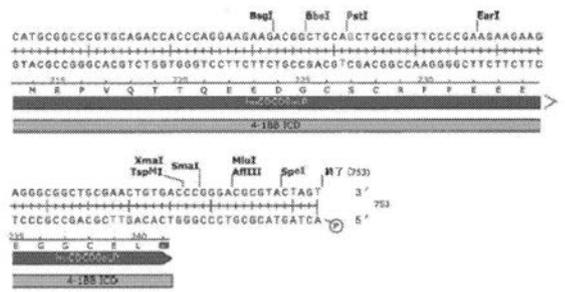
【図 2 - 2】

Figure 2 ( 続き )



【図 2 - 3】

Figure 2 ( 続き )



【図 2 - 4】

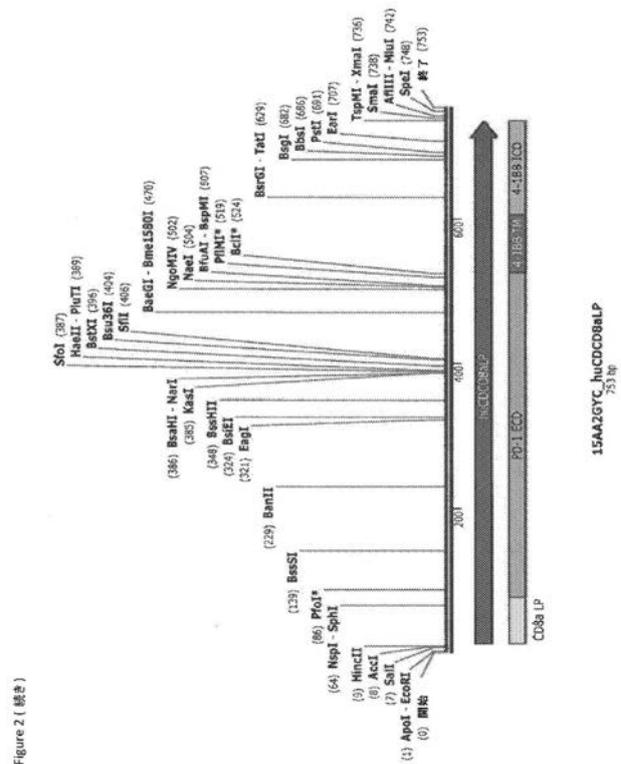


Figure 2 ( 続き )

【 3 】

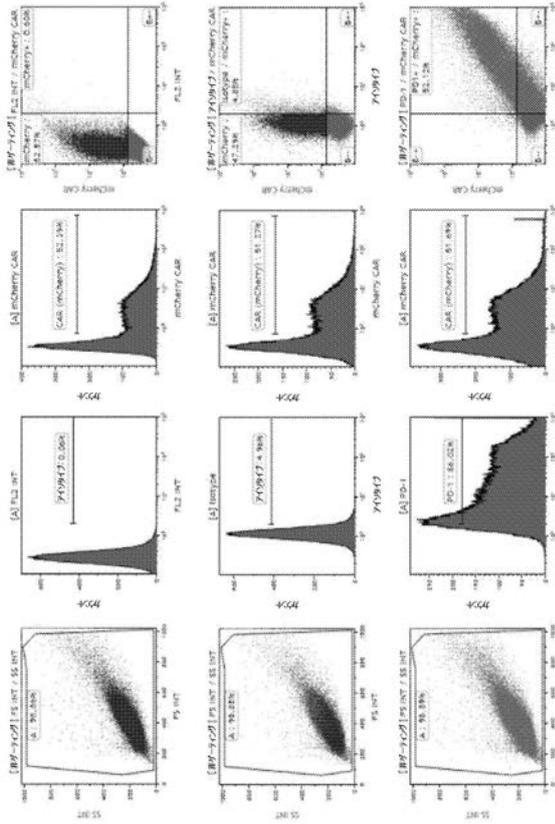


Figure 3

【 4 】

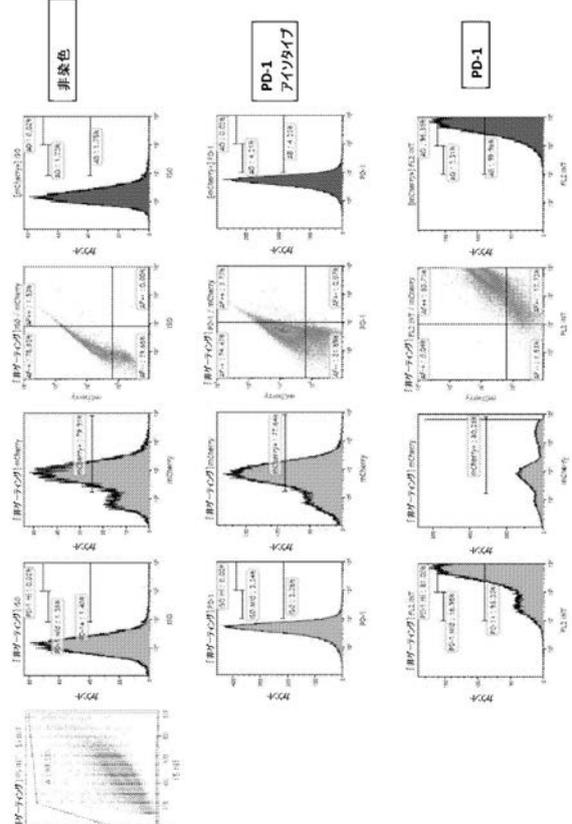


Figure 4

【 5 】

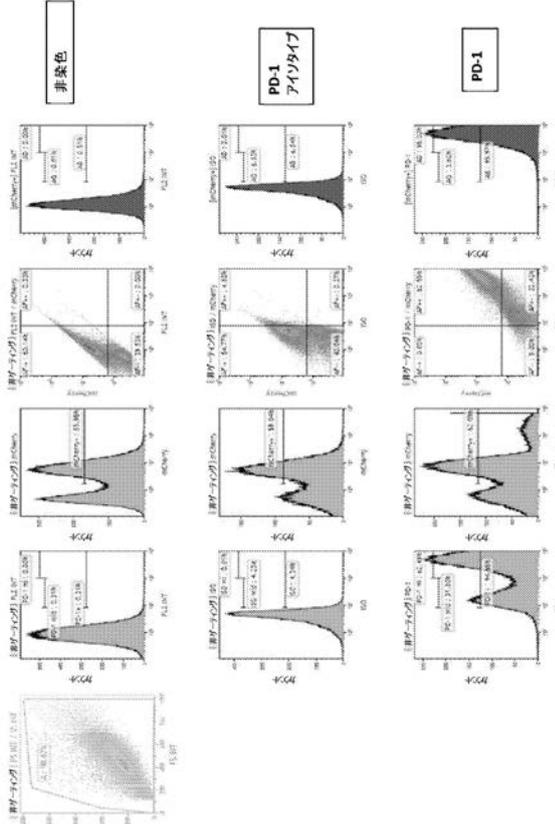
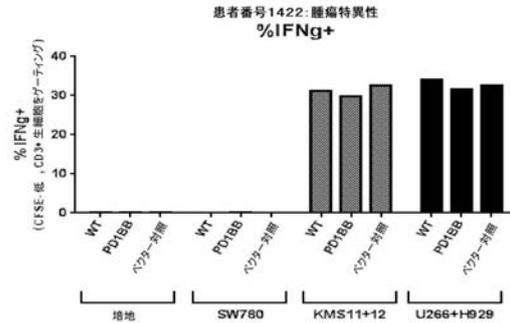


Figure 5

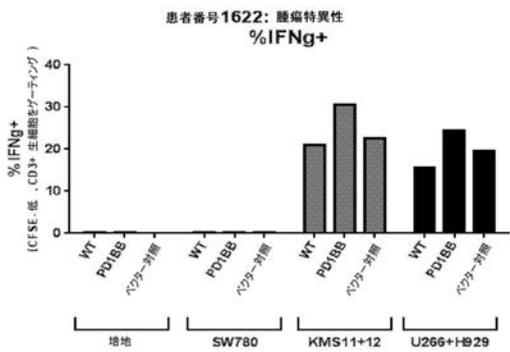
【 6 】

Figure 6

A.



B.



【手続補正書】

【提出日】平成30年4月2日(2018.4.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2018520679000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/040010
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC (2016.01) C07K 19/00, C12N 15/62, C07K 14/705, C07K 14/725, A61K 38/17, A61P 35/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC (2016.01) C07K, C12N, A61K 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) See extra sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013019615 A2 UNIV PENNSYLVANIA]; JUNE CARL H; ZHAO YANGBING 07 Feb 2013 (2013/02/07) the whole document	1-29,33,34,40-51
Y		30-32,35-39,52-54
X	US 2014242049 A1 NAT CANCER CT 28 Aug 2014 (2014/08/28) the whole document	1-29,33,34,40-51
Y		30-32,35-39,52-54
X	SHIN, Jae Hun, et al. Positive conversion of negative signaling of CTLA4 potentiates antitumor efficacy of adoptive T-cell therapy in murine tumor models. Blood, 2012, 119,24: 5678-5687. doi:10.1182/blood-2011-09-380519 Retrieved from the internet: <http://www.bloodjournal.org/content/119/24/5678.full>  14 Jun 2012 (2012/06/14) the whole document	1-29,33,34,40-51
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 Sep 2016		Date of mailing of the international search report 22 Sep 2016
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Facsimile No. 972-2-5651616		Authorized officer HOROWITZ Anat  Telephone No. 972-2-5651689

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/040010

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y		30-32,35-39,52-54
Y	WO 2014100385 A1 ANTHROGENESIS CORP?[US] 26 Jun 2014 (2014/06/26) [06][0138]	30
Y	NOONAN, Kimberly A., et al. Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma. <i>Science translational medicine</i> , 2015, 7.288: 288ra78-288ra78 Retrieved from the internet: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4634889/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4634889/</a> > DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa7014 20 May 2015 (2015/05/20) the whole document	31,32
P,Y	WO 2016037054 A1 UNIV JOHNS HOPKINS 10 Mar 2016 (2016/03/10) the wole document	35-39,52-54

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2016/040010

**B. FIELDS SEARCHED:**

\* Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases consulted: THOMSON INNOVATION, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, Google Scholar

Search terms used: Chimeric antigen receptor fusion, PD-1, programmed cell death protein 1, CD279, CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte associated protein 4, CD152, LAG-3, Lymphocyte-activation gene 3, CD223, Tim-3, T cell immunoglobulin mucin-3

AND CD3 zeta or T cell surface glycoprotein CD3 zeta or CD247 or 4-1BB or tumor necrosis factor receptor superfamily

member 9 or CD137 or CD28 or Tp44

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/US2016/040010

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
WO 2013019615 A2	07 Feb 2013	WO 2013019615 A2	07 Feb 2013
		WO 2013019615 A3	08 May 2014
		AU 2012290342 A1	30 Jan 2014
		CA 2842368 A1	07 Feb 2013
		CL 2014000195 A1	08 Aug 2014
		CN 104114233 A	22 Oct 2014
		CO 6862107 A2	10 Feb 2014
		EA 201490364 A1	29 Aug 2014
		EC SP14013186 A	31 Mar 2014
		EP 2736540 A2	04 Jun 2014
		EP 2736540 A4	29 Apr 2015
		GT 201400015 A	16 Dec 2014
		IL 230496 D0	31 Mar 2014
		JP 2014524234 A	22 Sep 2014
		KR 20140045533 A	16 Apr 2014
		MA 35360 B1	01 Aug 2014
		MX 2014001222 A	15 Sep 2014
		PE 15202014 A1	17 Nov 2014
		US 2014219975 A1	07 Aug 2014
US 2014242049 A1	28 Aug 2014	US 2014242049 A1	28 Aug 2014
		JP 2014532642 A	08 Dec 2014
		KR 20130045824 A	06 May 2013
		KR 101471647 B1	11 Dec 2014
		WO 2013062365 A2	02 May 2013
		WO 2013062365 A3	20 Jun 2013
WO 2016037054 A1	10 Mar 2016	WO 2016037054 A1	10 Mar 2016
WO 2014100385 A1	26 Jun 2014	WO 2014100385 A1	26 Jun 2014
		AU 2013204922 A1	10 Jul 2014

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/US2016/040010

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		AU 2013204922 B2	14 May 2015
		CA 2895840 A1	26 Jun 2014
		CN 105246912 A	13 Jan 2016
		EP 2935321 A1	28 Oct 2015
		EP 2935321 A4	06 Jul 2016
		HK 1215267 A1	19 Aug 2016
		IL 239500 D0	31 Aug 2015
		JP 2016507499 A	10 Mar 2016
		KR 20150099576 A	31 Aug 2015
		SG 11201504855W A	30 Jul 2015
		US 2015307623 A1	29 Oct 2015

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K 38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 ボレロ, イヴァン エム.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 3 1, ボルティモア, キングストン ロード 9 1 2

(72) 発明者 リー, スーザン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 2 4, ボルティモア, エス ハイランド アベニュー  
8 2 8

(72) 発明者 ヌーナン, キンバリー エー.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0 9, ボルティモア, ボニー リッジ ドライブ 6  
6 0 7, アpartment 1 0 2

(72) 発明者 パードール, ドリュー エム.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 3 3 - 2 2 4 1, ブルックビル, ジェイムズ クリー  
ク コート 1 9 4 0 0

F ターム(参考) 4B065 AA92Y AA94X AA94Y AB01 AC20 BA01 BC06 CA24 CA44

4C084 AA01 AA02 AA07 BA08 BA22 BA23 MA17 MA23 MA66 NA14

ZB082 ZB092 ZB262 ZB272 ZC192

4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 EA22 EA28 FA74