

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7250519号

(P7250519)

(45)発行日 令和5年4月3日(2023.4.3)

(24)登録日 令和5年3月24日(2023.3.24)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

C 1 2 N 15/85 (2006.01)

C 1 2 N 15/85

Z

C 1 2 N 15/867(2006.01)

C 1 2 N 15/867

Z

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 14/725(2006.01)

C 0 7 K 14/725

請求項の数 21 (全33頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-549452(P2018-549452)

(86)(22)出願日 平成29年3月23日(2017.3.23)

(65)公表番号 特表2019-512251(P2019-512251
A)

(43)公表日 令和1年5月16日(2019.5.16)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/056931

(87)国際公開番号 WO2017/162797

(87)国際公開日 平成29年9月28日(2017.9.28)

審査請求日 令和1年8月7日(2019.8.7)

(31)優先権主張番号 LU93006

(32)優先日 平成28年3月23日(2016.3.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関
ルクセンブルク(LU)

(73)特許権者 501357201

ヘルムホルツ ツェントゥルム ミュンヘン
ドイチェス フォルシュングスツェン
トゥルム フューア ゲズントハイト ウ
ント ウムヴェルト (ゲーエムペーハー)
ドイツ連邦共和国 8 5 7 6 4 ノイヘル
ベルク, インゴルシュテーター・ラント
シュトラッセ 1

(74)代理人 110001508

弁理士法人 津国

(72)発明者 ノエスナー, エルフリーデ

ドイツ国, 8 1 5 4 5 ミュンヘン, ハ
ルトハウザーシュトラッセ 1 1 9

(72)発明者 シュレンカー, ラモナ

ドイツ国, 8 0 6 3 7 ミュンヘン, フ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 PD - 1 及び 4 - 1 B B の融合タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列と比較して 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 アミノ酸の置換、欠失、及び / 又は挿入を含むアミノ酸配列を N 末端に含む PD-1 細胞外ドメインであって、PD-L1 / 2 結合親和性を示す PD-1 細胞外ドメインと；

(b) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む PD-1 膜貫通ドメインと；

(c) 配列番号 4 のアミノ酸配列と比較して 0、1、2、3、又は 4 アミノ酸の置換、欠失、及び / 又は挿入を含むアミノ酸配列を C 末端に含む 4-1BB 細胞内ドメインであって、CD8+ T 細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、又は、前記 CD8+ T 細胞を PD-L1 / L2+ 標的細胞で刺激した際に前記 CD8+ T 細胞の増殖速度を増大させる 4-1BB 細胞内ドメインと；

を含む融合タンパク質。

【請求項 2】

CD3 ドメインを更に含む、請求項 1 記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

前記細胞外ドメインが、リンカー又はヒンジドメインを含まない、請求項 1 又は 2 記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

前記 PD-1 細胞外及び / 又は膜貫通ドメインが、ヒト PD-1 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記4-1BB細胞内ドメインが、ヒト4-1BBである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記PD-1細胞外ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、前記融合タンパク質が、PD-L1/2結合親和性を示す、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

前記4-1BB細胞内ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、前記融合タンパク質が、CD8+ T細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、前記CD8+ T細胞をPD-L1/L2+標的細胞で刺激した際に前記CD8+ T細胞の増殖速度を増大させることができる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

10

【請求項 8】

前記PD-1膜貫通ドメインが、配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、前記融合タンパク質が、CD8+ T細胞にレトロウイルスによって形質導入、形質転換又はそうでなければ導入されたとき、前記CD8+ T細胞をPD-L1/L2+標的細胞で刺激した際にIFN 及び/又はIL-2の分泌を増大させることができる、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項記載の融合タンパク質をコードしている核酸分子。

【請求項 10】

請求項 9 記載の核酸分子を含むベクター。

20

【請求項 11】

請求項 9 記載の核酸分子又は請求項 10 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 9 記載の核酸分子又は請求項 10 記載のベクターが形質導入された請求項 11 記載の宿主細胞。

【請求項 13】

前記核酸分子又は前記ベクターが、前記宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれている、請求項 11 又は 12 記載の宿主細胞。

【請求項 14】

レトロウイルス形質導入を介して形質導入されている、請求項 12 又は 13 記載の宿主細胞。

30

【請求項 15】

請求項 9 記載の核酸分子によってコードされている融合タンパク質を安定的に発現している、請求項 11 ～ 14 のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項 16】

CD8+ T細胞である、請求項 11 ～ 15 のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項 17】

(1) 請求項 9 記載の核酸分子又は請求項 10 記載のベクターを宿主細胞に形質導入することと；

(2) 工程(1)の形質導入された宿主細胞を好適な培地中で培養して、前記細胞を成長させ、そして、前記核酸分子又は前記ベクターによってコードされている融合タンパク質を発現させることと；

40

(3) 前記宿主細胞を前記培地から回収することとを含む、請求項 11 ～ 16 のいずれか一項記載の宿主細胞を調製する方法。

【請求項 18】

請求項 17 記載の方法によって得ることができる宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項記載の融合タンパク質、請求項 9 記載の核酸分子、請求項 10 記載のベクター、及び/又は請求項 11 ～ 16 若しくは 18 のいずれか一項記載の宿主細胞を含む医薬組成物。

50

【請求項 20】

請求項 1～8 のいずれか一項記載の融合タンパク質、請求項 9 記載の核酸分子、請求項 10 記載のベクター、請求項 11～16 若しくは 18 のいずれか一項記載の宿主細胞を含む、癌及び慢性ウイルス感染症の処置において使用するための医薬組成物。

【請求項 21】

請求項 1～8 のいずれか一項記載の融合タンパク質、請求項 9 記載の核酸分子、請求項 10 記載のベクター、及び/又は請求項 11～16 若しくは 18 のいずれか一項記載の宿主細胞を含むキット又はキットインパーツ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、(a) N末端にPD-1又はCD40Lに由来するポリペプチドを含む細胞外ドメインと；(b) 膜貫通ドメインと；(c) C末端に4-1BB又はCD28に由来するポリペプチドを含む細胞内ドメインとを含む融合タンパク質に関する。また、N末端にCD28、そして、C末端にCD40Lを含む融合タンパク質も想定される。また、本発明は、このような融合タンパク質をコードしている核酸分子、このような核酸分子を含有するベクター、及びこのようなベクターを含有する宿主細胞に関する。本発明は、更に、このような宿主細胞を生成する方法に関する。最後に、本発明は、特に、癌及び慢性ウイルス感染症等のPD-1/PD-L2若しくはCD40の結合及び/又はPD-1/PD-L2若しくはCD40の発現に関連する疾患又は障害を処置するための、このような融合タンパク質、核酸分子、ベクター、及び/又は宿主細胞を含む医薬組成物に関する。

20

【0002】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の養子移入は、腫瘍に対する有望な治療法の選択肢である(Rosenberg et al., Science (2015), 348: 62-68)。残念なことに、TILの単離及びその増殖は、全ての腫瘍実体において可能な訳ではない。したがって、トランスジーンT細胞受容体(TCR)によるT細胞の遺伝子操作の概念が開発された(Hurwitz et al., Cancer Microenviron (2014), 7: 1-9)。未だ今日まで、このようなT細胞は短い生存時間を示し、そして、患者においてその機能が失われる(Janicki et al., Cancer Res (2008), 68: 2993-3000; Bai et al., PNAS USA (2008), 105: 13003-13008; Bendle et al., Cancer Res (2004), 64: 8052-8056; Anderson et al., J Immunol (2007), 178: 1268-1276)。CD28等の共刺激受容体によるTCRシグナル伝達カスケードの共刺激は、T細胞の増殖、生存、及び細胞毒性を増強することができる(Chen et al., Nat Rev Immunol (2013), 13: 227-242)。しかし、上皮腫瘍は共刺激受容体CD28のリガンド(CD80/86)を発現せず、そして、ヒトエフェクタT細胞はそれ自体このような受容体に対して陰性であるので、保守的な方法では共刺激は起こり得ない。この古典的な方法には依存しないT細胞に対する共刺激を提供するために、キメラ共刺激受容体が作製された。該キメラ共刺激受容体は、共抑制受容体PD-1(CD279としても知られている)の細胞外ドメインと、CD28のシグナル伝達ドメインとからなる(Ankri et al., J Immunol (2013), 4121-4129; Prosser et al., Mol Immunol (2012), 263-272; 国際公開公報第2013/019615号)。

30

40

【0003】

通常、腫瘍特異的T細胞は、表面上でPD-1を発現し、次いで、PD-1は腫瘍細胞上で発現しているそのリガンドであるPD-L1に結合する。この結合の結果、TCRシグナル伝達及びT細胞の活性化がブロックされ、それによって、腫瘍特異的T細胞が阻害される。TCRシグナル伝達を共刺激する(ひいては、T細胞の活性化を増強する)ために、CD28の刺激が必要である。上記を参照。

【0004】

PD-1及びCD28のドメインを含むキメラ共刺激受容体は、両方の関連する機能、一方ではPD-1の細胞外受容体機能、他方ではCD28の細胞内シグナル伝達機能を示すであろう。これまで提示されたこのようなキメラコンストラクトでは(Ankri, 引用文中; Prosser,

50

引用文中；国際公開公報第2013/019615号）、膜貫通ドメインはそれぞれのシグナル伝達分子からとられた。

【0005】

しかし、このようなコンストラクトはPD-L1が媒介するT細胞阻害を低減し、そして、T細胞の活性化を増強すると記載されているが、このようなコンストラクトには更なる改善の余地がまだ残されている。

【0006】

この問題は、本明細書に記載され、そして、特許請求の範囲に規定される本発明によって対処された。

【0007】

本発明は、

(a) N末端にPD-1又はCD40Lに由来するポリペプチドを含む細胞外ドメイン(ECD)と；

(b) 膜貫通ドメイン(TMD)と；

(c) C末端に4-1BB又はCD28に由来するポリペプチドを含む細胞内ドメイン(ICD)と

を含む融合タンパク質に関する。

【0008】

好ましくは、本発明によれば、細胞外ドメイン(ECD)がPD-1に由来するポリペプチドをそのN末端に含む場合、細胞内ドメイン(ICD)は、4-1BBに由来するポリペプチドをそのC末端に含有し、そして、逆もまた同様である。同様に、細胞外ドメインがCD40Lに由来するポリペプチドをそのN末端に含む場合、細胞内ドメインは、CD28に由来するポリペプチドをそのC末端に含有し、そして、逆もまた同様である。CD40Lに由来するECD及びCD28に由来するICDを有する融合タンパク質では、ICDがTMDのN末端に位置し、一方、TMDが融合タンパク質の最もC末端に位置することも可能である。例示として(そして、非限定的に)図8に示される融合タンパク質を参照。

【0009】

本発明の一実施態様では、細胞外ドメインは、(a) PD-1に由来するポリペプチドをそのN末端に、そして、4-1BBに由来するポリペプチドをそのC末端に含む。

【0010】

CD28と比べて、4-1BB(CD137)は、TCRシグナル伝達を促進することができるT細胞のサブセット上に存在する共刺激受容体である。4-1BBは、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)サブファミリーのメンバーであり、そして、ナイーブT細胞には存在しないが、T細胞刺激及びエフェクタ細胞への分化後に誘導される(Cheuk et al., Cancer Gene Ther (2004), 11: 215-226)。4-1BBの細胞内ドメインはQEEモチーフを含有し、これは、APC上で発現している4-1BBLとライゲーションすると、TNFR関連因子2(TRAF2)を動員する(Arch et al., Mol Cell Biol (1998), 18: 558-565; Nam et al., J Immunol (2005), 174: 1898-1905)。TRAF2は、ERKを含むMAPK経路を活性化し、そして、NF- κ Bの核移行を活性化する(Watts, Annu Rev Immunol (2005), 23: 23-68)。それによって、サイトカインの産生及びT細胞の生存を増強する。したがって、本発明は、PD-1の細胞外ドメイン(ECD)及び4-1BBの細胞内シグナル伝達ドメイン(ICD)を含むか又はからなる融合(本明細書では「キメラ」とも呼ばれる)タンパク質を提供する。

【0011】

本発明の更なる態様では、そのN末端におけるCD28に由来するICD、CD40Lに由来するICDの断片、CD40LのTMD、及びそのC末端におけるCD40L由来のECDを含む融合タンパク質が想定される(図8)。本発明の一実施態様では、融合タンパク質は、配列番号29に示されるアミノ酸配列を含むか又はからなる。

【0012】

更に、本発明は、CD40Lの細胞外ドメイン(ECD)及びCD28の細胞内シグナル伝達ドメイン(ICD)を含む融合(キメラ)タンパク質を提供する。T細胞で発現すると、この

10

20

30

40

50

キメラタンパク質は、その受容体であるCD40を発現している細胞と相互作用したときに二重の機能を発揮することが本発明に関連して驚くべきことに見出された。T細胞において、該キメラタンパク質は、生存及び増強されたエフェクタ活性を提供する共刺激経路を開始させるはずである（シス効果）。CD40細胞、すなわち、腫瘍細胞、腫瘍内皮との相互作用においては（トランス効果）、細胞死を引き起こすはずであり、そして、相互作用する細胞が抗原提示細胞である場合はT細胞活性を更に支持するサイトカイン（例えば、IL-12）の分泌を誘導することができるはずである（図7）。

【0013】

一般的に、本発明に関連して、本明細書に特に規定のない限り、PD-1に由来する細胞外ドメイン（ECD）、膜貫通ドメイン（TMD）、及び4-1BBに由来する細胞内ドメイン（ICD）を含むか又はからなる融合タンパク質は、本明細書において「PD-1:4-1BB」又は「PD-1:BB」とも呼ばれる。同様に、PD-1に由来する細胞外ドメイン（ECD）、膜貫通ドメイン（TMD）、及びCD28に由来する細胞内ドメイン（ICD）を含むか又はからなる融合タンパク質は、本明細書において「PD-1:CD28」とも呼ばれる。同様に、CD40Lに由来する細胞外ドメイン（ECD）、膜貫通ドメイン（TMD）、及びCD28に由来する細胞内ドメイン（ICD）を含むか又はからなる融合タンパク質は、本明細書において「CD40L:CD28」又は「CD28:CD40L」とも呼ばれ（CD28のICDが逆であることに起因して本明細書においては「CD40L:CD28i」又は「CD28i:CD40L」とも呼ばれる；図8において変異体3）として示され、そして、図9～11で評価される例示的な融合タンパク質の実施態様も参照）、この場合、CD28のICDが融合タンパク質のN末端を形成し、そして、CD40LのECDがC末端を形成する。記号「TM」又は「tm」は、融合タンパク質に関連して、それぞれのコンストラクトにどの膜貫通ドメインが使用されているかを示す。例えば、「PD-1TM:BB」又は「PD-1tm:BB」は、融合タンパク質がPD-1の膜貫通ドメインを含むことを意味するが、一方、「PD-1:BBTM」又は「PD-1:BBtm」は、融合タンパク質が4-1BBの膜貫通ドメインを含むことを意味する。同様に、「CD28:CD40Ltm」又は「CD40Ltm:CD28」は、融合タンパク質がCD40Lの膜貫通ドメインを含むことを意味するが、一方、「CD40L:CD28TM」又は「CD28TM:CD40L」は、融合タンパク質がCD28の膜貫通ドメインを含むことを意味する。

【0014】

本明細書によれば、PD-1又はCD40L（例えば、PD-1）の細胞外ドメイン（ECD）、膜貫通ドメイン（TMD）、及び4-1BBの細胞内ドメイン（ICD）を含む融合タンパク質が提供される。本発明に関連して驚くべきことに見出された通り、このようなPD-1:BB融合タンパク質を発現しているT細胞は、ヒト黒色腫異種移植片において例示的に示されるように、PD-1:CD28融合タンパク質を発現しているT細胞と比較して増大し、そして、より速い増殖速度を示す。また、本発明に関連して驚くべきことに見出された通り、T細胞上で発現しているCD40L:CD28融合タンパク質は、B細胞を活性化させることができた（トランス効果；図10）ことに加えて、IFN- γ 分泌（図11Aを参照）及び細胞毒性（図11B）の増大等のT細胞の機能を支持する（シス効果）ことができた。

【0015】

すなわち、本発明に関連して見出された通り、4-1BB（CD137）のICDを含む融合タンパク質は、例えばヒト黒色腫異種移植片におけるT細胞で発現したとき、CD28のICDを含むコンストラクトと比較して、増殖速度の増大という形で優れた効果を示す。

【0016】

したがって、PD-1に由来するECDを有する本発明に関連して記載及び提供される融合タンパク質のECDは、好ましくは、当技術分野において公知である通り、回避機構の一部としてPD-L1を発現する腫瘍細胞の表面上のPD-L1/2に結合する機能を有する。本発明の融合タンパク質のECDが結合した際、4-1BBに由来するポリペプチドを含む融合タンパク質のICDは、好ましくは、シグナル伝達分子を活性化する作用を有し、それによって、宿主細胞（例えば、CD8⁺T細胞等のT細胞）の増殖及び/又はサイトカインの分泌を増大させる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

同様に、本発明によれば、CD40Lに由来するECDを有する本発明に関連して記載及び提供される融合タンパク質のECDは、好ましくは、当技術分野において公知である通り、回避機構の一部としてCD40を発現する腫瘍細胞の表面上のCD40に結合する機能を有する。本発明の融合タンパク質のECDが結合した際、CD28に由来するポリペプチドを含む融合タンパク質のICDは、好ましくは、シグナル伝達分子を活性化する作用を有し、それによって、宿主細胞（例えば、CD8⁺ T細胞等のT細胞）の増殖及び／若しくは生存、並びに／又はサイトカインの分泌、並びに／又は細胞毒性を増大させる。

【 0 0 1 8 】

本発明に関連して提供される融合タンパク質は、CD3 ドメインを更に含み得る。これは、特に、融合タンパク質がT細胞若しくは一般的にはTCR陰性細胞で発現しない場合、又は本発明の融合コンストラクトを発現している細胞においてTCR及び／若しくはCARが共形質導入されない（又は一般的には共発現しない）場合に適用可能であり得る。CD3のICDアミノ酸配列は、当技術分野において公知のデータベースから得ることができる（NP_932170）。一般的に、CD3 は、好ましくは、4-1BB又はCD28のタンパク質のICDの後に導入され得る。

【 0 0 1 9 】

本明細書に提供される融合タンパク質は、特に、PD-1に由来するポリペプチドを含有するECD、好ましくはPD-1のECD（例えば、ヒト又はマウス、好ましくはヒトのPD-1）、又はCD40Lに由来するポリペプチドを含有するECDをN末端に含み得る。これに関連して、用語「由来する」とは、具体的には、ECDに含有されるポリペプチドが、それぞれ、PD-1（例えば、ヒト又はマウス、好ましくはヒトPD-1）の少なくとも一部、好ましくはPD-1のECD、又はCD40Lの少なくとも一部を含むことを意味する。本明細書で使用する時、PD-1又はCD40Lに「由来する」という用語は、PD-1（ヒト又はマウス、好ましくはヒトのPD-1）若しくはCD40Lのネイティブ配列、又はその一部（例えば、ECD）と比較して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以下、又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されていることも許容する。例えば、ECDがCD40Lに由来する場合、本発明に関連して、CD40Lに由来するECDが図1の配列番号30において強調されているECDを含み得るか又はからなり得ることも想定される。これに関連して一実施態様では、それはCD40Lの可溶性部分（例えば、配列番号30のアミノ酸113～261；図8）であり得る。当業者であれば容易に認識できるように、融合タンパク質のECDでは、シグナルペプチド配列（当業者に認識可能であり、そして、本明細書において言及される特定の配列番号でも記載される）は、通常、融合タンパク質が膜に組み込まれる前、組み込まれている間、又は組み込まれた後に成熟タンパク質において切断される。また、本発明によれば、ECDがCD40Lに由来する場合、シグナルペプチドがPD-1に由来し得ることも可能である（図8）。すなわち、本明細書に記載及び提供される融合タンパク質又は該融合タンパク質を発現している宿主細胞に言及するとき、本発明によれば、融合タンパク質のECDがそれぞれのシグナルペプチドを欠いている場合があることも常に包含される。

【 0 0 2 0 】

本発明の一実施態様では、融合タンパク質は、ヒト又はマウスのPD-1、例えば、配列番号2に記載のヒトPD-1（配列番号2について図1に示されるシグナルペプチドを有する又は有しない）又はCD40L（図1の配列番号30において強調されている；配列番号30に係る完全ポリペプチド又は可溶性断片のみ（配列番号30のアミノ酸113～261）のECDのアミノ酸配列と比較して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含む、PD-1又はCD40Lに由来するポリペプチドを含有するECDを含み、該融合タンパク質は、それぞれ、PD-L1/2又はCD40への結合親和性を示す。このような結合親和性は、ネイティブなPD-1（例えば、ヒトPD-1）又はCD40LのそれぞれのリガンドであるPD-L1/2又はCD40への結合親和性と比較することができる。本発明に関連して、所与のポリペプチドがPD-L1/2又はCD40への結合親和性を示すかどうか

10

20

30

40

50

かを決定するために、ネイティブなヒトPD-1のPD-L1/2への又はCD40LのCD40への結合親和性と比較して少なくとも0.8倍、好ましくは少なくとも0.9倍、又はより好ましくは少なくとも1.0倍の、ネイティブなヒトPD-L1/2又はCD40への結合親和性を有するポリペプチドが、それぞれPD-L1/2又はCD40への結合親和性を示すとみなす。これに関連して、所与のポリペプチドのPD-L1/2又はCD40への結合親和性は、当技術分野において公知の方法によって測定することができ、そして、通常かつ好ましくは、モル濃度として表される K_D 値（解離定数）を測定することを含む。 K_D の観点でタンパク質の相互作用を測定するためのこのような方法は当技術分野において周知であり、そして、例えば、ELISA、フローサイトメトリー、表面プラズモン共鳴、biacore測定等を含む。

【0021】

本発明の一実施態様では、融合タンパク質は、配列番号2に係るPD-1のECDのアミノ酸配列（配列番号2について図1に示されるシグナルペプチドを有する又は有しない）を含むか又はからなるECDを含む。本発明の別の実施態様では、融合タンパク質は、図1の配列番号30において強調されているCD40LのECDのアミノ酸配列（配列番号30に係る完全ポリペプチド又は配列番号30のアミノ酸113～261に係る可溶性断片のみ）を含むか又はからなるECDを含む。

【0022】

本明細書に記載及び提供される融合タンパク質のECDは、ECDをより可撓性にするために、ECDのC末端にヒンジ及び/又はリンカーの領域を更に含み得る（例えば、融合タンパク質のECDとTMDとの間又はTMDがICDのC末端に位置する場合、融合タンパク質のECDとICDとの間）。典型的なヒンジ及び/又はリンカーの領域は当技術分野において公知であり、そして、抗体（例えば、IgG1、CD8アルファ）の定常領域（Fc）に由来するもの（例えば、Shirasu et al., *Anticancer Res* (2012), 32: 2377-2383及びCartellieri et al., *J Biomed Biotechnol* (2010), 956304を参照）（例えば、IgGFcスペーサー）、Gly/Serリンカー、又はフィラミン（例えば、Fil3スペーサー）を含む。更に、このようなリンカー又はヒンジの領域は、多量の炎症性サイトカインを分泌するNK細胞の活性化に起因する副作用を引き起こす場合もあるので、本発明に関連して、本明細書に記載及び提供される融合タンパク質はリンカー領域もヒンジ領域も含まないことが望ましい場合がある。すなわち、本発明の一実施態様では、融合タンパク質のECDは、リンカー領域もヒンジ領域も含まない。別の実施態様では、ECDがCD40Lに由来し、そして、ICDがCD28に由来する場合、例えば、図1の配列番号27又は28において適宜強調されているように、ECDのC末端に1つ以上のリンカー又はヒンジの領域、例えば、Gly/Serリンカー+Fcスペーサー（例えば、IgGFcスペーサー）及び/又はフィラミンリンカー（例えば、Fil3）が存在する。

【0023】

本明細書に提供される融合タンパク質は、ECDとICDとの間に機能可能に連結された又はICDのC末端に連結されたTMDを更に含む（例えば、ECDがCD40Lに由来し、そして、ICDがCD28に由来する場合）。一般的に、TMDは特定のTMDには限定されない。好ましくは、TMDは、融合タンパク質を発現している細胞（例えば、T細胞）の膜に融合タンパク質を安定に固定させることができ、そして、更に、ECDをPD-L1/2又はCD40にそれぞれ結合させることができ、そして、PD-L1/2又はCD40に結合した際、本明細書に記載及び例示される4-1BB、CD28、又はCD40Lに由来するポリペプチドを含有するICDのシグナル伝達を誘導することができる。本明細書に関連して、TMDは、特に、CD8（アルファ）、CD28、ICOS、PD-1、又は4-1BBに由来するものを含み得る。一実施態様では、ECDがCD40Lに由来し、そして、ICDがCD28に由来する場合、TMDはCD28（CD40L:CD28tm）又はCD40L（CD28:CD40Ltm）に由来する。例えば、融合タンパク質は、配列番号27、28、又は29に示されるアミノ酸配列を含むか又はからなる。TMDは、一般的に、任意の起源のものであってよいが、好ましくはマウス又はヒト、より好ましくはヒトである。

【0024】

本発明の一実施態様では、融合タンパク質のTMDは、CD8（アルファ）及び／又はICOSには由来しない。ECDがPD-1に由来し、そして、ICDが4-1BBに由来する場合、一実施態様ではTMDはCD28にも由来しない。

【0025】

本発明の一実施態様では、特にECDがPD-1に由来し、そして、ICDが4-1BBに由来する場合、又はTMDがCD28に由来する場合、特にECDがCD40Lに由来し、そして、ICDがCD28に由来する場合（例えば、図1の配列番号27又は28において強調されている）、融合タンパク質のTMDは、PD-1、4-1BB（例えば、ヒト又はマウス）に由来するポリペプチドを含む。本発明の特定の実施態様では、融合タンパク質のTMDは、PD-1、例えばヒト又はマウスのPD-1、特にヒトPD-1に由来するポリペプチドを含む。これに関連して、用語「由来する」とは、具体的には、特にECDがPD-1に由来し、そして、ICDが4-1BBに由来する場合、TMDに含有されるポリペプチドが、PD-1、4-1BB（例えば、ヒト又はマウス、好ましくはヒトのPD-1又は4-1BB）又はCD28の少なくとも一部を含む、好ましくはPD-1又は4-1BB（例えば、PD-1）のTMDであることを意味する。本明細書で使用する
10
とき、PD-1、4-1BB、又はCD28に「由来する」という用語は、PD-1、4-1BB（ヒト又はマウス、好ましくはヒトのPD-1又は4-1BB）若しくはCD28のネイティブ配列、又はその一部（例えば、TMD）と比較して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以下、又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されていることも許容する。

【0026】

本発明に関連して示されている通り、4-1BBに由来するICDを有する融合タンパク質は、一般的に、CD28に由来するICD及びPD-1に由来するECDを有する類似のコンストラクトと比較して、宿主細胞（例えば、CD8⁺T細胞等のT細胞）の優れた増殖速度を示す。更に、PD-1に由来するTMDを含む融合タンパク質は、4-1BBに由来するTMDを含む融合タンパク質と比較して、形質導入されたT細胞においてサイトカイン（例えば、IFN γ 又はIL-2）の分泌速度を更に速くする。したがって、本発明の特定の実施態様では、融合タンパク質のTMDは、PD-1に由来するポリペプチド、例えば、ヒト又はマウスのPD-1、特にヒトPD-1を含むか又はからなる。

【0027】

本発明の一実施態様では、融合タンパク質は、ヒト又はマウスの4-1BB、例えば、配列番号6に記載のヒト4-1BBのTMDのアミノ酸配列と比較して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含む4-1BBに由来するポリペプチドを含有するTMDを含み、該融合タンパク質は、CD8⁺T細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、本明細書に記載及び例示される通り該CD8⁺T細胞をPD-L1/L2⁺標的細胞で刺激した際に該CD8⁺T細胞の増殖速度を増大させることができる。増殖は、CFSE色素希釈、すなわち、フローサイトメトリー（図5及び方法の説明「...TCR-D115 T細胞の増殖」に例示される）によって測定されるCFSE蛍光強度の減少、又は増殖を決定するために当技術分野において公知の任意の他の好適な方法、例えば、H³チミジン取り込み、BrdU取り込み等によって定量することができる。所与の融合タンパク質がレトロウイルスによって形質導入されたCD8⁺T細胞の増殖が、融合タンパク質が形質導入されていないCD8⁺T細胞と比較して1.0超である、例えば、少なくとも1.2倍、好ましくは少なくとも1.3倍、より好ましくは少なくとも1.5倍高い場合、融合タンパク質は増殖を増大させることができるとみなされる。CFSE希釈法を使用して、キメラ受容体を有しないT細胞（モック）とPD-1:BB又はPD-1:CD28の変異体を発現しているT細胞との間の平均蛍光活性（MFI）の比として増殖の差を計算することができる。1.0のMFI比は、増殖に差がないことを示し、一方、1.0超のMFI比は、増殖を示す。

【0028】

本発明の一実施態様では、融合タンパク質は、特にECDがPD-1に由来し、そして、ICDが4-1BBに由来する場合、配列番号6に係る4-1BBのTMDのアミノ酸配列を含むか又はか

10

20

30

40

50

らなるTMDを含む。

【0029】

本発明の一実施態様では、特にN末端のECDがCD40Lに由来し、そして、C末端のICDがCD28に由来する場合、融合タンパク質は、図1の配列番号27又は28において強調されているCD28のTMDのアミノ酸配列と比較して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含むCD28に由来するポリペプチドを含有するTMD（ICDのN末端又はC末端、好ましくはICDのN末端に位置し得る）を含み、該融合タンパク質は、図10に示されるように、TCR-T58細胞において発現したときB細胞の活性化速度を増大させることができる。融合タンパク質が形質導入されていないTCR-T58細胞によるB細胞の活性化速度と比較して、B細胞の活性化の増大が1.2倍超、好ましくは1.3倍、より好ましくは少なくとも1.5倍である場合、融合タンパク質は活性化を増大させることができるとみなされる。

10

【0030】

本発明の別の実施態様では、特にC末端のECDがCD40Lに由来し、そして、N末端のICDがCD28に由来する場合、融合タンパク質は、図1の配列番号29において強調されているCD40LのTMDのアミノ酸配列と比較して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含むCD40Lに由来するポリペプチドを含有するTMD（好ましくはICDとECDとの間に位置し得る）を含み、該融合タンパク質は、図10に示されるTCR-T58細胞において発現したとき、B細胞の活性化速度を増大させることができる。B細胞の活性化の増大が、融合タンパク質が形質導入されていないTCR-T58細胞によるB細胞の活性化速度と比較して1.2倍超、好ましくは少なくとも1.3倍、より好ましくは少なくとも1.5倍である場合、融合タンパク質は活性化を増大させることができるとみなされる。

20

【0031】

本発明の一実施態様では、融合タンパク質は、ヒト又はマウスのPD-1、例えば、配列番号8に記載のヒトPD-1のアミノ酸配列と比較して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含むPD-1に由来するポリペプチドを含有するTMDを含み、該融合タンパク質は、CD8⁺T細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、該CD8⁺T細胞をPD-L1/L2⁺標的細胞で刺激した際にIFN γ 及び／又はIL-2の分泌を増大させることができる。所与の融合タンパク質が、CD8⁺T細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、該CD8⁺T細胞をPD-L1/L2⁺標的細胞で刺激した際にIFN γ 及び／又はIL-2の分泌を増大させることができるかどうかの評価は、当技術分野において公知であり、また本明細書にも記載及び例示される方法によって実施することができる（本明細書において以下に例示される「共培養及びサイトカインアッセイ」も参照）。所与の融合タンパク質がIFN γ 及び／又はIL-2の分泌を増大させることができるかどうかを評価するために、融合タンパク質がレトロウイルスによって形質導入されたCD8⁺T細胞のIFN γ 及び／又はIL-2の分泌レベルを、該融合タンパク質が形質導入されていない同等のCD8⁺T細胞のIFN γ 及び／又はIL-2の分泌レベルと比較する。この目的のために、両CD8⁺T細胞（一方は融合タンパク質が形質導入されており、他方は形質導入されていない）を、本明細書に記載及び例示されるPD-L1/L2⁺標的細胞で刺激し、続いて、IFN γ 及び／又はIL-2の分泌レベルを測定する。融合タンパク質が形質導入されたCD8⁺T細胞及び形質導入されていない対照CD8⁺T細胞は、通常、同じドナーに由来する。例えば、トランスジェニックヒトT細胞にレトロウイルスによって形質導入して、前記4-1BBに由来するポリペプチドを含有する融合タンパク質を発現させ、次いで、1:2の比でHEK/Tyr又はHEK/Tyr/PD-L1の細胞と共に培養してよい。次いで、共培養上清を16時間後に収集し、そして、製造業者のプロトコールに従ってサンドイッチELISA（BD）又はBio-Plex（Bio-Rad）によって分析してよい。形質導入されたTCRがCD8⁺T細胞でしか機能せず、そして、C

30

40

50

D8⁺/CD4⁺T細胞比が変動する場合、以下の式を適用して、測定されたサイトカインの量を、細胞懸濁液内のTCR⁺CD8⁺T細胞の百分率（フローサイトメトリーによって決定）に対して正規化することができる：

【数 1】

$$\frac{100\% \text{ TCR+CD8+ T細胞によって生成されたサイトカイン}}{\text{測定されたサイトカイン濃度}} = \frac{\text{FCによって検出されたTCR+CD8+ T細胞の\%}}{\text{FCによって検出されたTCR+CD8+ T細胞の\%}} \times 100$$

【 0 0 3 2 】

IFN 及びIL-2の分泌レベルを測定する方法は当技術分野において周知であり、また、本明細書にも例示されており、そして、特にELISA、Bio-Plex、細胞内フローサイトメトリー（ICS）等を含む。所与の融合タンパク質がレトロウイルスによって形質導入されたCD8⁺T細胞のIFN 及びIL-2の分泌レベルが、融合タンパク質が形質導入されていないCD8⁺T細胞と比較して少なくとも1.2倍、好ましくは少なくとも1.3倍、より好ましくは少なくとも1.5倍高い場合、融合タンパク質はIFN 及びIL-2の分泌レベルを増大させることができるとみなされる。

【 0 0 3 3 】

本発明の一実施態様では、融合タンパク質は、配列番号8に係るPD-1のTMDのアミノ酸配列を含むか又はからなるTMDを含む。別の実施態様では、特にN末端のECDがCD40Lに由来し、そして、C末端のICDがCD28に由来する場合、融合タンパク質はTMD（ICDのN末端又はC末端、好ましくはICDのN末端に位置し得る）を含み、該TMDは図1の配列番号27又は28において強調されているCD28のTMDのアミノ酸配列を含むか又はからなる。本発明の更に別の実施態様では、特にC末端のECDがCD40Lに由来し、そして、N末端のICDがCD28に由来する場合、融合タンパク質はTMD（好ましくはICDとECDとの間に位置し得る）を含み、該TMDは図1の配列番号29において強調されているCD40LのTMDのアミノ酸配列を含むか又はからなる。

【 0 0 3 4 】

本明細書に提供される融合タンパク質は、TMDのC末端に機能可能に連結された（具体的には、ECDがPD-1に由来し、そして、ICDが4-1BBに由来する融合タンパク質の場合）又はTMDのC末端若しくはN末端に機能可能に連結された（具体的には、ECDがCD40Lに由来し、そして、ICDがCD28に由来する融合タンパク質の場合）ICDを更に含む。本発明の融合タンパク質のICDは、4-1BB（CD137）又はCD28に由来するポリペプチドを含む。これに関連して、用語「由来する」とは、具体的には、ICDに含有されるポリペプチドが、4-1BB（例えば、ヒト又はマウス、好ましくはヒトの4-1BB）の少なくとも一部、好ましくは（ヒト）4-1BBのICD、又はCD28の少なくとも一部を含むことを意味する。本明細書で使用するとき、4-1BB又はCD28に「由来する」という用語は、4-1BB（ヒト又はマウス、好ましくはヒトの4-1BB）若しくはCD28のネイティブ配列、又はその一部（例えば、ICD）と比較して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以下、又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されていることも許容する。本発明の特定の実施態様では、融合タンパク質のICDは、4-1BBのICDに由来するポリペプチド、例えば、ヒト又はマウスの4-1BB、具体的には、ヒトの4-1BBを含む。本発明の別の実施態様では、特にECDがCD40Lに由来し、そして、ICDがCD28に由来する場合、融合タンパク質は、例えば図1の配列番号27、28、又は29（特にECDが融合タンパク質のN末端に位置し、そして、ICDが融合タンパク質のC末端（TMDのC末端又はN末端、好ましくはTMDのC末端）に位置する場合、配列番号27又は28に係る；そして、特にICDが融合タンパク質のN末端に位置し、そして、ECDが融合タンパク質のC末端に位置する場合、配列番号29に係る）において強調されているアミノ酸配列を含むか又はからなる、CD28のICDに由来するポリペプチドを含む。

【 0 0 3 5 】

本発明の一実施態様では、融合タンパク質は、ヒト又はマウスの4-1BB、例えば、配列

10

20

30

40

50

番号 4 に記載のヒト 4-1BB の ICD のアミノ酸配列と比較して 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含む 4-1BB に由来するポリペプチドを含有する ICD を含み、該融合タンパク質は、CD8⁺ T 細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、本明細書に記載及び例示される通り該 CD8⁺ T 細胞を PD-L1/L2⁺ 標的細胞で刺激した際に該 CD8⁺ T 細胞の増殖速度を増大させることができる。

【0036】

本発明の別の実施態様では、融合タンパク質は、図 1 の配列番号 27、28、又は 29（特に ECD が融合タンパク質の N 末端に位置し、そして、ICD が融合タンパク質の C 末端（TMD の C 末端又は N 末端、好ましくは TMD の C 末端）に位置する場合、配列番号 27 又は 28 に係る；そして、特に ICD が融合タンパク質の N 末端に位置し、そして、ECD が融合タンパク質の C 末端に位置する場合、配列番号 29 に係る）において強調されている CD28 の ICD のアミノ酸配列と比較して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含む CD28 に由来するポリペプチドを含有する ICD を含み、該融合タンパク質は、図 10 に示される TCR-T58 細胞において発現したとき、B 細胞の活性化速度を増大させることができる。B 細胞の活性化の増大が、融合タンパク質が形質導入されていない TCR-T58 細胞による B 細胞の活性化速度と比較して 1.2 倍超、好ましくは少なくとも 1.3 倍、より好ましくは少なくとも 1.5 倍である場合、融合タンパク質は活性化を増大させることができるとみなされる。

【0037】

本発明の一実施態様では、融合タンパク質は、配列番号 4 に係る 4-1BB の ICD のアミノ酸配列を含むか又はからなる ICD を含む。

【0038】

本発明の一実施態様では、本明細書に提供及び記載される融合タンパク質は、PD-1 に由来する ECD、4-1BB に由来する TMD、及び 4-1BB に由来する ICD を含むか又はからなる。一実施態様では、全てのドメインは、対応するヒトドメインに由来する。特定の実施態様では、本発明の融合タンパク質は、配列番号 22 のアミノ酸配列（図 22 について図 1 に示されるシグナルペプチドを有する又は有しない）と比較して 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を含むか又はからなり、該融合タンパク質は、本明細書に記載される通り PD-L1/2 結合親和性を示し、そして、該融合タンパク質は、CD8⁺ T 細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、本明細書に記載及び例示される通り該 CD8⁺ T 細胞を PD-L1/L2⁺ 標的細胞で刺激した際に該 CD8⁺ T 細胞の増殖速度を増大させることができる。本発明の更なる特定の実施態様では、融合タンパク質は、配列番号 22 に係るアミノ酸（配列番号 22 について図 1 に示されるシグナルペプチドを有する又は有しない）を含むか又はからなる。

【0039】

本発明の別の実施態様では、本明細書に提供及び記載される融合タンパク質は、CD40L に由来する ECD、CD28 又は CD40L に由来する TMD（ECD が融合タンパク質の N 末端に位置し、そして、ICD が融合タンパク質の C 末端（TMD の C 末端又は N 末端、好ましくは TMD の N 末端）に位置する場合は CD28；ICD が融合タンパク質の N 末端に位置し、そして、ECD が融合タンパク質の C 末端に位置する場合は CD40L）、及び CD28 に由来する ICD を含むか又はからなる。一実施態様では、全てのドメインは、対応するヒトドメインに由来する。特定の実施態様では、本発明の融合タンパク質は、図 1 の配列番号 27、28、又は 29 のアミノ酸配列と比較して（配列番号 27 及び 28 については、27 又は 28 について図 1 に示されるシグナルペプチドを有する又は有しない；配列番号 29 については、配列番号 29 に係る完全ポリペプチド又は配列番号 29 のアミノ酸 113～261 に係るその可溶性断片と比較して）0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は

挿入を有するアミノ酸配列を含むか又はからなり、該融合タンパク質は、本明細書に記載されるCD40結合親和性を示し、そして、該融合タンパク質は、図10に示されるTCR-T58細胞において発現したとき、B細胞の活性化速度を増大させることができる。本発明の更なる特定の実施態様では、融合タンパク質は、配列番号27、28、又は29のアミノ酸配列（配列番号27、28、又は29について図1に示されるシグナルペプチドを有する又は有しない）を含むか又はからなる。

【0040】

本発明の一実施態様では、本明細書に提供及び記載される融合タンパク質は、PD-1に由来するECD、PD-1に由来するTMD、及び4-1BBに由来するICDを含むか又はからなる。一実施態様では、全てのドメインは、対応するヒトドメインに由来する。特定の実施態様では、本発明の融合タンパク質は、配列番号24のアミノ酸配列（図24について図1に示されるシグナルペプチドを有する又は有しない）と比較して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個以下のアミノ酸の置換（好ましくは、保存的又は高度に保存的な置換）、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を含むか又はからなり、該融合タンパク質は、本明細書に記載されるPD-L1/2結合親和性を示し、そして、該融合タンパク質は、CD8⁺T細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、本明細書に記載及び例示される通り該CD8⁺T細胞をPD-L1/L2⁺標的細胞で刺激した際にIFN γ 及び／又はIL-2の分泌を増大させることができる。これに関連して、所与の融合タンパク質が、CD8⁺T細胞の増殖速度を増大させることに加えて該融合タンパク質がレトロウイルスによって形質導入された該CD8⁺T細胞のIFN γ 及び／又はIL-2の分泌レベルを増大させることができるかどうかを評価するために、該融合タンパク質が形質導入されていない同等のCD8⁺T細胞の増殖速度／IFN γ 及び／又はIL-2の分泌レベルと比較する。増殖及びIFN γ ／IL-2の分泌速度を評価する方法は当技術分野において公知であり、そして、本明細書において上及び下に記載及び例示される。

【0041】

本発明の更なる特定の実施態様では、融合タンパク質は、配列番号24に係るアミノ酸（配列番号24について図1に示されるシグナルペプチドを有する又は有しない）を含むか又はからなる。

【0042】

本明細書で使用する時、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈上特に明確に指示されない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「試薬」に対する言及は、このような様々な試薬のうちの1つ以上を含み、そして、「方法」に対する言及は、変更され得るか又は本明細書に記載される方法に置き換えられ得る当業者に公知の等価な工程及び方法に対する言及を含む。

【0043】

特に指定しない限り、一連の要素の前に記載される用語「少なくとも」は、該一連の全ての要素を指すと理解すべきである。当業者は、単なるルーチンな実験を用いて、本明細書に記載される本発明の特定の実施態様に対する多くの等価物を認識するか又は説明することができる。このような等価物は、本発明に包含されることを意図する。

【0044】

用語「及び／又は」は、本明細書のどこで使用されようと、「及び」、「又は」、及び「前記用語によって接続される要素の全て又は任意の他の組み合わせ」の意味を含む。

【0045】

用語「約」又は「およそ」は、本明細書で使用する時、所与の値又は範囲の20%以内、好ましくは10%以内、そして、より好ましくは5%以内を意味する。

【0046】

以下の本明細書及び特許請求の範囲全体を通して、文脈上特に必要とされない限り、用語「含む」及びその変形は、指定の整数又は工程又は整数若しくは工程の群を含むことを意味するが、任意の他の整数又は工程又は整数若しくは工程の群を除外することを意味するものではないと理解される。本明細書で使用する時、用語「含む」は、用語「含有す

10

20

30

40

50

る」若しくは「包含する」、又は時に、本明細書で使用する時、用語「有する」に置き換えられ得る。

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用する時、「からなる」は、特許請求の範囲の構成要素に指定されていない任意の要素、工程、又は成分を除外する。本明細書で使用する時、「から本質的になる」とは、特許請求の範囲の基本的及び新規の特徴に著しい影響を与えることのない材料又は工程を除外しない。

【 0 0 4 8 】

本明細書における各場合において、用語「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」のいずれも、他の 2 つの用語のいずれかに置き換えられ得る。

10

【 0 0 4 9 】

本発明は、本明細書に記載される具体的な方法論、プロトコル、及び試薬等に限定されるものではなく、それ自体として変動し得ることを理解すべきである。本明細書で使用する専門用語は、具体的な実施態様を説明する目的のためだけのものであり、そして、特許請求の範囲によってのみ規定される本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【 0 0 5 0 】

本明細書の文書全体を通して引用される全ての刊行物及び特許（全ての特許、特許出願、科学刊行物、製造業者の仕様書、説明書等を含む）は、上記又は下記のいずれかであろうと、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。本明細書におけるいずれも、本発明が先行発明によってこのような開示に先行する権利を与えるものではないと認めると解釈すべきではない。参照により組み入れられる事柄が本明細書と矛盾するか又は不整合である程度に、本明細書は任意のこのような事柄に取って代わる。

20

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用する時、「保存的」置換は、以下の表 1 において「例示的な置換」として列挙されている置換を意味する。「高度に保存的な」置換は、本明細書で使用する時、以下の表 I において「好ましい置換」という見出しの下に示されている置換を意味する。

【 0 0 5 2 】

30

40

50

【表 1】

表I アミノ酸置換

オリジナル	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala;	ile
Lys (K)	arg; gin; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala;	leu

【0053】

用語「ポリペプチド」は、本明細書において用語「タンパク質」と等しく使用される。タンパク質（通常30個未満のアミノ酸を有するその断片、好ましくは生物学的に活性のある断片及びペプチドを含む）は、共有ペプチド結合を介して互いに結合している（その結果、アミノ酸鎖が生じる）1個以上のアミノ酸を含む。用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用するとき、典型的には10個超のアミノ酸を含む分子の群を記載する。ポリペプチドは、更に、二量体、三量体、及びより高級なオリゴマー等の多量体を形成し得る、すなわち、1個超のポリペプチド分子からなる。このような二量体、三量体等を形成するポリペプチド分子は、同一であっても、同一でなくてもよい。したがって、このような多量体の対応する高次構造は、ホモ又はヘテロ二量体、ホモ又はヘテロ三量体等と呼ばれる。ヘテロ多量体の例は抗体分子であり、これは、その天然に存在する形態では、2本の同一のポリペプチド軽鎖及び2本の同一のポリペプチド重鎖からなる。用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化等の翻訳後修飾によって修飾されている、天然に修飾されたポリペプチド/タンパク質も指す。このような修飾は、当技術分野において周知である。

【0054】

用語「アミノ酸」又は「アミノ酸残基」は、本明細書で使用するとき、典型的には、アラニン(Ala又はA)；アルギニン(Arg又はR)；アスパラギン(Asn又はN)；アスパラギン酸(Asp又はD)；システイン(Cys又はC)；グルタミン(Gln又はQ)；グルタミン酸(Glu又はE)；グリシン(Gly又はG)；ヒスチジン(His又はH)；イソロイシン(He又はI)；ロイシン(Leu又はL)；リジン(Lys又はK)；メチオニン(Met又はM)；フェニルアラニン(Phe又はF)；プロリン(Pro又はP)；セリン(Ser又はS)；スレオニン(Thr又はT)；トリプトファン(Trp又はW)；チロシン(Tyr又はY)；及びバリン(Val又はV)からなる群から選択されるタンパクを構成するアミノ酸等の

当技術分野において認識されている定義を有するアミノ酸を指すが、必要に応じて修飾アミノ酸、合成アミノ酸、又は希アミノ酸を使用してもよい。一般的に、アミノ酸は、非極性側鎖（例えば、Ala、Cys、He、Leu、Met、Phe、Pro、Val）；負に帯電している側鎖（例えば、Asp、Glu）；正に帯電している側鎖（例えば、Arg、His、Lys）；又は非荷電極性側鎖（例えば、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、及びTyr）を有するものに分類することができる。

【0055】

一般的に、本明細書で使用するとき、用語「融合タンパク質」は、異なる起源に由来するポリペプチド部分で作製されるタンパク質に関する。したがって、「キメラタンパク質」、「キメラコンストラクト」、「融合コンストラクト」等として理解することもできる。通常、融合タンパク質は、元々別個のタンパク質をコードしていた2つ以上の遺伝子（又は好ましくはcDNA）の接合を通して作製されたタンパク質を指す。この融合遺伝子（又は融合cDNA）の翻訳によって、好ましくは元の各タンパク質に由来する機能特性を有する単一のポリペプチドが生じる。組み換え融合タンパク質は、生物学的研究又は処置において使用するために組み換えDNA技術によって人工的に作製される。本発明の融合タンパク質の生成に関する更なる詳細は、当技術分野において公知であり、そして、本明細書に記載及び例示される。

【0056】

本発明は、更に、本明細書に提供及び記載される融合タンパク質をコードしている核酸分子に関する。また、本発明は、本明細書に記載及び提供される融合タンパク質の一部のみをコードしている、例えば、融合タンパク質のECD、TMD、及び/又はICDのみをコードしている核酸分子に関する。例えば、本発明は、本発明に係る融合タンパク質又はその一部（例えば、ECD、TMD、及び/又はICD）がコードされている限り、配列番号1、3、5、7、21、若しくは23に係る核酸分子、又は核酸結合を介して連結されているこれらの組み合わせに関する。また、本発明は、本発明に係る融合タンパク質又はその一部（例えば、ECD、TMD、及び/又はICD）がコードされている限り、配列番号1、3、5、7、21、若しくは23に係る核酸分子、又は核酸結合を介して連結されているこれらの組み合わせと比較して、30、27、24、21、18、15、12、9、6、3、又は0個のヌクレオチドが置換（好ましくは、翻訳されるアミノ酸が変化しないサイレント突然変異）、欠失、又は挿入されている核酸分子に関する。原則として、本発明は、好ましくは、本明細書に具体的に記載及び具現化される融合タンパク質をコードしている核酸に関する。一般的に、配列番号13及び14は、それぞれ、ヒトのCD28の核酸及びアミノ酸の配列を示し、CD28の主な転写産物が示されている。更に、CD28が更なるスプライス変異体（例えば、インフレームドナースプライス変異体又はインフレームコーディングエキソンが欠損している変異体）でも存在することに鑑みて、このような変異体又はその一部（特にそのTMD）も本明細書に記載及び提供される融合タンパク質の一部に包含される。一般的に、配列番号13及び14は、それぞれ、ヒトのCD28の核酸及びアミノ酸の配列を示し、CD28の主な転写産物が示されている。

【0057】

本明細書で使用するとき、特に具体的に定義しない限り、用語「核酸」又は「核酸分子」は、「オリゴヌクレオチド」、「核酸鎖」、「ポリヌクレオチド」等の同義語として使用され、そして、1個、2個、又はそれ以上のヌクレオチドを含むポリマーを意味する。用語「核酸分子」は、ポリヌクレオチドに含まれるプリン及びピリミジンの塩基を含む塩基の配列に関し、該塩基は、核酸分子の一次構造を表す。本明細書では、用語「核酸分子」は、DNA、cDNA、ゲノムDNA、RNA、DNAの合形成態、及びこれら分子のうちの2つ以上を含む混合ポリマーを含む全ての種類の核酸を含み、そして、好ましくは、DNA及びcDNAに関する。当業者であれば容易に認識できるように、本明細書に提供される核酸配列はDNAの配列を表し、また、TがUによって置き換えられている対応するRNA配列も含む。用語「核酸分子」は、一般的に、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む。「核酸分子」は、当業者であれば容易に認識されるように、例えば、エンドヌクレアーゼ及び/又はエ

10

20

30

40

50

キソヌクレアーゼから核酸分子を保護するために、天然又は人工のヌクレオチドアナログに加えて、非天然の又は誘導体化されたヌクレオチド塩基を更に含み得る。

【0058】

本発明は、更に、本明細書に記載及び提供される核酸分子を含むベクターに関する。

【0059】

用語「ベクター」は、本明細書で使用する時、一般的に、自律的に複製することができる線状又は環状の核酸分子の全ての種類を含み、好適な宿主細胞である。このようなベクターは、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、又は好ましくはレトロウイルスのベクター）、及び宿主細胞において本発明の融合タンパク質を安定に又は一過的に翻訳させ、そして、構成的に又は条件的に発現させるために宿主細胞に遺伝子を輸送及び導入するのに好適な当技術分野において公知の他のベクター又はシャトルを含むが、これらに限定されない。ベクターは、通常細胞ゲノムには組み込まれないが、組み込まれてもよい。本明細書に記載及び提供される核酸分子を含む本発明に係るベクターは、好ましくは、宿主細胞において本発明の融合タンパク質を安定的に発現させる（発現ベクター）。本発明のベクターは、マーカー遺伝子、プロモータ及び／又はエンハンサの配列（本発明の核酸分子に機能可能に連結された）、それぞれの宿主細胞に好適な複製起点、制限酵素部位、マルチクローニングサイト、標識、及び当技術分野において公知の更なる機能ユニットを更に含み得る。ベクターは、特に、ウイルス（それ自体ベクターとみなされ得る）等のシャトルを介して宿主細胞に導入されてもよく、そのまま宿主細胞に形質転換又は形質導入されてもよい。ベクターは、好ましくは、それが形質転換又は形質導入されるそれぞれの宿主細胞に適するように適応される。当業者は、異なる宿主細胞が異なる種類のベクターを必要とすることを容易に理解する。例えば、本明細書に示される通り、ベクター（プラスミド）pGEMは、細菌細胞を形質転換するのに好適なベクターであり、一方、レトロウイルスベクターpMP71は、真核細胞（例えば、T細胞）に形質導入するのに好適である。

【0060】

本発明の一実施態様では、本発明のベクターは、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターである。好適なレトロウイルスベクターの例は当技術分野において公知であり、そして、例えば、pMP71-PRE (Leisegang, K Mol Med (2008), 86(5): 573-583)、SAMEN CMV/S Ra, LZRS-id3-IHRES (Heemskerk et al., J. Exp. Med. 186 (1997), 1597-1602)、FeLV (Neil et al., Nature 308 (1984), 814-820)、SAX (Kantoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 6563-6567)、pDOL (Desiderio, J. Exp. Med. 167 (1988), 372-388)、N2 (Kasid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 473-477)、LNL6 (Tiberghien et al., Blood 84 (1994), 1333-1341)、pZip NEO (Chen et al., J. Immunol. 153 (1994), 3630-3638)、LASN (Mullen et al., Hum. Gene Ther. 7 (1996), 1123-1129)、pGIXsNa (Taylor et al., J. Exp. Med. 184 (1996), 2031-2036)、LCNX (Sun et al., Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048)、SFG (Gallardo et al., Blood 90 (1997)、LXSN (Sun et al., Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048)、SFG (Gallardo et al., Blood 90 (1997), 952-957)、HMB-Hb-Hu (Vieillard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 11595-11600)、pMV7 (Cochlovius et al., Cancer Immunol. Immunother. 46 (1998), 61-66)、pSTITCH (Weitjens et al., Gene Ther 5 (1998), 1195-1203)、pLZR (Yang et al., Hum. Gene Ther. 10 (1999), 123-132)、pBAG (Wu et al., Hum. Gene Ther. 10 (1999), 977-982)、rKat.43.267bn (Gilham et al., J. Immunother. 25 (2002), 139-151)、pLGSN (Engels et al., Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168)、pMP71 (Engels et al., Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168)、pGCSAM (Morgan et al., J. Immunol. 171 (2003), 3287-3295)、pMSGV (Zhao et al., J. Immunol. 174 (2005), 4415-4423)、又はpMX (de Witte et al., J. Immunol. 181 (2008), 5128-5136)を含む。本発明の特定の実施態様では

10

20

30

40

50

、ベクターは、pMP71-PRE又はpMP71である。

【0061】

本発明は、更に、本明細書に記載及び提供される核酸分子又はベクターを含む宿主細胞に関する。一実施態様では、本発明の宿主細胞は、本明細書に記載及び提供される核酸分子又はベクターで形質導入又は形質転換される。

【0062】

一般的に、本明細書で使用する時、特に具体的に定義しない限り、用語「形質導入された」又は「形質転換された」（並びに「形質導入」又は「形質転換」）等は互換的に使用され得、そして、一般的に、宿主細胞の種類にかかわらず、そして、導入の方法（例えば、（化学的）形質転換、（ウイルス）形質転換、エレクトロポレーション、トランスフェクション等）にかかわらず、核酸分子及び／又はベクターの宿主細胞への任意の種類の導入を意味する。

【0063】

核酸分子及び／又はベクターは、宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれてもよく、染色体外であってもよい（すなわち、一過性発現）。宿主細胞において一過性発現を達成するのに好適な方法の例は、当技術分野において公知であり、そして、mRNAトランスフェクションを含む。一実施態様では、核酸分子及び／又はベクターは、ゲノムに安定的に組み込まれる。

【0064】

本明細書に記載及び提供される核酸分子又はベクターを含む本明細書に関連して記載及び提供される宿主細胞は、好ましくは、本発明の融合タンパク質を安定的に又は一過的に（例えば、安定的に）（構成的に又は条件的に）発現させることができる。宿主細胞は、一般的に、任意の好適な核酸分子又はベクターを用いて任意の方法によって形質導入又は形質転換され得る。一実施態様では、宿主細胞には、上記本発明の融合タンパク質又はその一部（例えば、ECD、TMD、及び／又はICD）をコードしている核酸分子を含むレトロウイルス又はレンチウイルス（例えば、レトロウイルス）のベクターが形質導入される。

【0065】

一実施態様では、本発明の宿主細胞には、上記本発明の融合タンパク質又はその一部（例えば、ECD、TMD、及び／又はICD）をコードしている核酸分子を含むレトロウイルスベクターが形質導入され、そして、該融合タンパク質又はその一部が安定的に（構成的に又は条件的に）発現される。好ましくは、宿主細胞は、次いで、融合タンパク質をその膜において安定的に発現し、本発明の融合タンパク質のECDが表面に向き、TMDは（主に）膜に埋め込まれ、そして、ICDが細胞質に向く。

【0066】

本発明に関連して、本明細書に記載及び提供される核酸分子又はベクターを含む宿主細胞は、該核酸分子又は該ベクターが形質導入、形質転換、又は他の方法で宿主細胞に導入された、遺伝子操作された細胞に関する。既に記述した通り、本発明の宿主細胞は、本発明の融合タンパク質を一過的に又は安定的に発現する細胞であり得る。例えば、本発明の融合タンパク質をコードしている核酸分子は、レトロウイルス又はレンチウイルス（例えば、レトロウイルス）の形質導入によって細胞のゲノムに安定的に組み込まれ得る。PD-1-BB融合タンパク質は、本明細書に提供される形質導入細胞の膜において発現する。融合タンパク質のPD-1部分のECDは細胞表面に位置し、一方、TMD及びICD細胞内は、膜に結合しているが、細胞表面上では検出不可能である。PD-1ポリペプチドのECDの検出は、抗体若しくは本明細書に記載されるPD-1のECDに特異的に結合する他の結合分子を使用することによって、例えば、ELISA若しくはフローサイトメトリーによって、又は顕微鏡によって実施され得る。本発明の形質導入細胞は、例えば、CD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、ダブルネガティブ T細胞、NK（ナチュラルキラー）細胞、細胞、マクロファージ、樹状細胞に加えて、細菌細胞（例えば、大腸菌）及び更なる真核生物を含む本発明の核酸分子又はベクターを貯蔵及び／又は複製するのに好適な細胞であり得る。一実施態様では、本発明の宿主細胞は、T細胞、例えば、CD8⁺ T細胞である。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

本発明の宿主細胞には、本明細書に記載及び提供される融合タンパク質をコードしている核酸分子又はベクターが形質導入され得る。好ましくは、本明細書に提供及び記載される宿主細胞には、更なる核酸分子、例えば、T細胞受容体（TCR）又はキメラ抗原受容体（CAR）をコードしている核酸分子が共形質導入され得る。このような共形質導入（又は本明細書に記載及び例示される細胞に核酸分子を導入する他の方法）は、当技術分野において公知であり、また、本明細書にも記載及び例示される。

【 0 0 6 8 】

本発明に係る好適な宿主細胞の例は、T細胞、例えば、CD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、TCR-T58又はTCR-D115等（であるがこれらに限定されない）のTCR T細胞、ダブルネガティブ / T細胞、NK（ナチュラルキラー）細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞に加えて、細菌細胞（例えば、大腸菌）及び更なる真核生物を含む本発明の核酸分子又はベクターを貯蔵及び／又は複製するのに好適な細胞を含むが、これらに限定されない。該細胞は、自己であっても非自己であってもよいが、好ましくは自己である。また、該細胞は、当業者に容易に明らかである通り、同種であっても非同種であってもよい。一実施態様では、本発明の宿主細胞は、CD8⁺ T細胞である。

10

【 0 0 6 9 】

また、本発明は、本明細書に記載及び提供される本発明の宿主細胞を調製する方法であって、

（１）本明細書に記載及び提供される核酸分子又はベクターを上記宿主細胞に形質導入又は形質転換することと；

20

（２）工程（１）の形質導入された宿主細胞を好適な培地中で培養して、前記細胞を成長させ、そして、前記核酸分子又は前記ベクターによってコードされている融合タンパク質を発現させることと；

（３）前記宿主細胞を前記培地から回収することとを含む方法に関する。

【 0 0 7 0 】

本発明の好ましい実施態様では、宿主細胞は、人体外で形質導入又は形質転換される。ドナー（例えば、ヒトドナー）由来の細胞（例えば、CD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、TCR-T58又はTCR-D115等（であるがこれらに限定されない）のTCR T細胞）を得、単離し、そして、培養する方法は、当技術分野において公知であり、そして、特に採血及び骨髓摘出を含む。

30

【 0 0 7 1 】

本発明の方法によれば、宿主細胞には、当技術分野において公知の任意の方法によって、本明細書に記載及び提供される核酸分子又はベクターが形質導入又は形質転換又は他の方法で提供され得る。このような方法は、特に、（化学的）形質転換、（ウイルス）形質導入、エレクトロポレーション、トランスフェクション等を含む。一実施態様では、宿主細胞にレトロウイルスベクターが形質導入される。

【 0 0 7 2 】

本発明に従って調製される宿主細胞は、本明細書に記載される任意の宿主細胞であり得る。一実施態様では、宿主細胞は、T細胞、例えば、CD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、TCR-T58又はTCR-D115等（であるがこれらに限定されない）のTCR T細胞である。

40

【 0 0 7 3 】

また、本発明は、本明細書に提供される調製方法によって得ることができる宿主細胞に関する。

【 0 0 7 4 】

本発明は、更に、本発明によって記載及び提供される融合タンパク質、核酸分子、ベクター、及び／又は宿主細胞を含む医薬組成物に関する。このような医薬組成物は、患者（好ましくはヒト患者）、具体的には、上記宿主細胞のドナーに投与されるのに好適である。したがって、本発明は、また、本発明によって記載及び提供される融合タンパク質、核

50

酸分子、ベクター、及び／又は宿主細胞を含む医薬組成物を含む投与によって疾患又は障害を処置する方法に関する。

【 0 0 7 5 】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容し得る担体及び更なる成分、例えば、生薬を更に含み得る。該医薬組成物は、PD-1リガンド（例えば、PD-L1又はPD-L2）及び／又はCD40の発現に関連する疾患又は障害の処置に特に有用である。このような疾患及び障害は、当業者に公知であり、そして、具体的には様々な種類の癌、例えば、肺癌、胃癌、腎細胞癌、結腸癌、乳癌、卵巣癌、尿路上皮癌、黒色腫、膵臓癌、骨髄腫、ホジキンリンパ腫、網膜芽腫、白血病、子宮頸癌、食道癌、神経膠腫、非ホジキンリンパ腫、肝細胞癌、口腔癌、及びその他を含む（がこれらに限定されない）。本明細書に提供される医薬組成物によって処置され得る更なる疾患及び障害は、特にPD-L1/L2及び／又はCD40が発現している場合、（慢性）ウイルス感染症及び（慢性）炎症を含む。

10

【 0 0 7 6 】

本発明は、更に、本発明に関連して記載及び提供される融合タンパク質、核酸分子、ベクター、及び／又は宿主細胞を含むキット又はキットインパーツに関する。

【 0 0 7 7 】

本発明は、更に、以下の項目に関する。

（ 1 ）

（ a ） N末端にPD-1に由来するポリペプチドを含む細胞外ドメインと；

（ b ） 膜貫通ドメインと；

（ c ） C末端に4-1BBに由来するポリペプチドを含む細胞内ドメインと；

20

を含む融合タンパク質。

（ 2 ） 前記膜貫通ドメインが、PD-1又は4-1BB、好ましくはPD-1に由来するポリペプチドを含む、項目 1 記載の融合タンパク質。

（ 3 ） CD3 ドメインを更に含む、項目 1 又は 2 記載の融合タンパク質。

（ 4 ） 前記細胞外ドメインが、リンカーもヒンジドメインも含まない、項目 1 ～ 3 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

（ 5 ） 前記細胞外及び／又は前記膜貫通のドメインに含まれる前記PD-1に由来するポリペプチドが、ヒトPD-1に由来するポリペプチドである、項目 1 ～ 4 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

30

（ 6 ） 前記膜貫通及び／又は前記細胞内のドメインに含まれる前記4-1BBに由来するポリペプチドが、ヒト4-1BBに由来するポリペプチドである、項目 1 ～ 5 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

（ 7 ） 前記PD-1に由来するポリペプチドを含有する細胞外ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列と比較して 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個のアミノ酸の置換、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含み、前記融合タンパク質が、PD-L1/2結合親和性を示す、項目 1 ～ 6 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

（ 8 ） 前記4-1BBに由来するポリペプチドを含有する細胞内ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列と比較して 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個のアミノ酸の置換、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含み、前記融合タンパク質が、CD8⁺ T細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、前記CD8⁺ T細胞をPD-L1/2⁺ 標的細胞で刺激した際に前記CD8⁺ T細胞の増殖速度を増大させることができる、項目 1 ～ 7 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

40

（ 9 ） 前記PD-1に由来するポリペプチドを含有する膜貫通ドメインが、配列番号 8 のアミノ酸配列と比較して 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個のアミノ酸の置換、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を含み、前記融合タンパク質が、CD8⁺ T細胞にレトロウイルスによって形質導入されたとき、前記CD8⁺ T細胞をPD-L1/2⁺ 標的細胞で刺激した際にIFN 及び／又はIL-2の分泌を増大させることができる、項目 2 ～ 8 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

（ 10 ） 前記細胞外ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、項目 1 ～ 9 のいづ

50

れか一項記載の融合タンパク質。

(11) 前記細胞内ドメインが、配列番号4のアミノ酸配列を含む、項目1～10のいずれか一項記載の融合タンパク質。

(12) 前記膜貫通ドメインが、配列番号8のアミノ酸配列を含む、項目1～11のいずれか一項記載の融合タンパク質。

(13) 項目1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質をコードしている核酸分子。

(14) 項目13記載の核酸分子を含むベクター。

(15) 項目13記載の核酸分子又は項目14記載のベクターを含む宿主細胞。

(16) 項目13記載の核酸分子又は項目14記載のベクターが形質導入された項目15記載の宿主細胞。

10

(17) 前記核酸分子又は前記ベクターが、前記宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれている、項目15又は16記載の宿主細胞。

(18) レトロウイルス形質導入を介して形質導入されている項目16又は17記載の宿主細胞。

(19) 項目13記載の核酸分子によってコードされている融合タンパク質を安定的に発現している、項目15～18のいずれか一項記載の宿主細胞。

(20) CD8⁺T細胞である、項目15～19のいずれか一項記載の宿主細胞。

(21)

(1) 項目13記載の核酸分子又は項目14記載のベクターを宿主細胞に形質導入することと；

20

(2) 工程(1)の形質導入された宿主細胞を好適な培地中で培養して、前記細胞を成長させ、そして、前記核酸分子又は前記ベクターによってコードされている融合タンパク質を発現させることと；

(3) 前記宿主細胞を前記培地から回収することとを含む、項目15～20のいずれか一項記載の宿主細胞を調製する方法。

(22) 項目21記載の方法によって得ることができる宿主細胞。

(23) 項目1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質、項目13記載の核酸分子、項目14記載のベクター、及び/又は項目15～20若しくは22のいずれか一項記載の宿主細胞を含む医薬組成物。

(24) 癌及び慢性ウイルス感染症の処置において使用するための、項目1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質、項目13記載の核酸分子、項目14記載のベクター、項目15～20若しくは22のいずれか一項記載の宿主細胞、又は項目23記載の医薬組成物。

30

(25) 項目1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質、項目13記載の核酸分子、項目14記載のベクター、及び/又は項目15～20若しくは22のいずれか一項記載の宿主細胞を含むキット又はキットインパーツ。

【図面の簡単な説明】

【0078】

特に指定しない限り、配列についての一般的なレジェンド：

太字：シグナルペプチド（通常、成熟タンパク質において切断される）；下線付き：TMD；イタリック及び太字：ICD；ヌクレオチド配列の大文字：コドン最適化配列

40

【図1】配列番号1：核酸配列ECDヒトPD-1 配列番号2：アミノ酸配列ECDヒトPD-1 配列番号3：核酸配列ICDヒト4-1BB 配列番号4：アミノ酸配列ICDヒト4-1BB 配列番号5：核酸配列TMDヒト4-1BB 配列番号6：アミノ酸配列TMDヒト4-1BB 配列番号7：核酸配列TMDヒトPD-1 配列番号8：アミノ酸配列TMDヒトPD-1 配列番号9：核酸配列ヒトPD-1 配列番号10：アミノ酸配列ヒトPD-1 配列番号11：核酸配列ヒト4-1BB 配列番号12：アミノ酸配列ヒト4-1BB 配列番号13：核酸配列ヒトCD28 配列番号14：アミノ酸配列ヒトCD28 配列番号15：核酸配列マウスPD-1 配列番号16：アミノ酸配列マウスPD-1 配列番号17：核酸配列マウス4-1BB 配列番号18：アミノ酸配列マウス4-1BB 配列番号19：核酸配列マウスCD28 配列番号20：アミノ酸配列

50

マウスCD28 配列番号 2 1 : 核酸配列ヒトPD-1:BBTM 配列番号 2 2 : アミノ酸配列ヒトPD-1:BBTM 配列番号 2 3 : 核酸配列ヒトPD-1TM:BB 配列番号 2 4 : アミノ酸配列ヒトPD-1TM:BB 配列番号 2 5 : 核酸配列ヒトPD-1:CD28TM 配列番号 2 6 : アミノ酸配列ヒトPD-1:CD28TM 配列番号 2 7 : Gly/Ser (G/S)リンカー及びIgGFcスパーサーを有するアミノ酸配列CD40L:CD28tm ; ・PD1SP (PD-1由来のシグナルペプチド、最初の下線付き配列部分) ・CD40L由来のECD (配列番号 3 0 のaa 1 1 3 ~ 2 6 1) ・GS - リンカー (2 番目の下線付き配列部分) ・IgGFc (太字のスパーサー) ・CD28TM (3 番目の下線付き配列部分) ・CD28由来のICD (aa 1 4 8 ~ 2 2 0、太字イタリック) 配列番号 2 8 : Gly/Ser (G/S)リンカー及びFil3スパーサーを有するアミノ酸配列CD40L:CD28tm ; ・PD1SP (PD-1由来のシグナルペプチド、最初の下線付き配列部分) ・CD40L由来のECD (配列番号 3 0 のaa 1 1 3 ~ 2 6 1) ・GS - リンカー (2 番目の下線付き配列部分) ・Fil3 (太字のスパーサー) ・CD28TM (3 番目の下線付き配列部分) ・CD28由来のICD (aa 1 4 8 ~ 2 2 0、太字イタリック) 配列番号 2 9 : N末端における逆CD28 ICD、短いCD40 ICD断片、CD40L由来のTMD、及びC末端におけるCD40L由来のECDを有するCD28:CD40Ltm ・CD40L (配列番号 3 0 のaa 1 4 ~ 2 6 1) ・CD28ICD逆 (太字イタリック; aa 1 8 0 ~ 2 2 0) 配列番号 3 0 : ネイティブCD40L配列・ICD (太字イタリック) ・TM (下線付き) ・ECD

【図 2】キメラPD-1共刺激受容体の設計 アミノ酸 (aa) は、それぞれのヒト親タンパク質に対応する。PD-1 ECDについては、シグナルペプチド配列が除去されて、成熟タンパク質が示されていることに留意する。

【図 3】レトロウイルス形質導入後のTCR-T58⁺ CD8⁺ T細胞におけるキメラ受容体の発現 HLA-A2拘束性チロシナーゼ特異的T細胞受容体TCR-T58を安定的に発現するヒトT細胞に、指定のキメラ受容体をコードしているベクターをレトロウイルスによって形質導入した。後で使用するために、形質導入後の15日間後にT細胞を凍結させた。T細胞を解凍後、及び、T細胞を共培養実験 (50 U/mL IL-2を含有する培地中で3日間培養) で使用する前に、T細胞表面上の受容体発現をフローサイトメトリーによって評価した。抗PD-1染色によって決定されたPD-1:28tm、PD-1:BBtm、及びPD-1tm:BBの表面発現を示す代表的なFACSヒストグラムを示す。数字は、受容体陽性細胞の%及び対応するMFIである。黒線のヒストグラム及び黒色の数字は、アイソタイプ染色に対応し、赤線のヒストグラム及び赤色の数字は、PD-1染色に対応する。

【図 4】TCR誘導性サイトカイン分泌に対するキメラ受容体の効果 指定のキメラ受容体を発現しているTCR-T58⁺ T細胞 (図 3 を参照) を、(HEK/tyr)又はHEK/tyr/PD-L1と共に16時間共培養した。上清を除去し、そして、IFN 及びIL-2の含量をELISAによって決定した。グラフは、IFN (左) 及びIL-2 (右) の分泌に対するキメラ受容体の発現の効果を表す。各実験につき、HEK/tyrとの共培養及びHEK/tyr/PD-L1との共培養の間のサイトカインのx倍変化を計算した。実施した全ての実験から (n = 2 ~ 3) x倍変化の平均を決定し、そして、棒グラフで提示した。エラーバーはSEMである。統計解析は、二要因分散分析 (acc to Sidak) を使用した。* p < 0 . 0 2 *** p < 0 . 0 0 0 2 ; **** p < 0 . 0 0 0 1 ; ns = 有意差無し

【図 5】NSGマウスにおけるヒト黒色腫異種移植片の環境におけるT細胞増殖に対するキメラ受容体の効果 TCR-D115 T細胞 (HLA-A2 / チロシナーゼ) についてのペプチド-MHC複合体 (pMHC) を発現しているSK-Mel23ヒト黒色腫細胞を、免疫不全NSGマウスの側腹部にs.c.注入した。共受容体が発現していない (モック形質導入) CFSE標識されたTCR-T58⁺ T細胞及びそれぞれキメラ受容体PD-1tm:BB又はPD-1:CD28tmを発現しているものを、確立された異種移植片 (802 mm³、SEM ± 83、約17日) に腫瘍内注入した。T細胞注入の1日間、2日間、4日間、6日間、及び11日間後、腫瘍を収集し、単一細胞懸濁液に解離させ、そして、フローサイトメトリーに使用した。腫瘍環境における増殖履歴を決定するための手段として、T細胞 (CD8⁺、CD4⁺、及びCD4⁺CD8⁺ダブルネガティブ (dbl⁻) 細胞) におけるCFSE染色強度を評価した。TCR-D115⁺ CD8⁺T細胞は、腫瘍細胞によって活性化され、そして、活性化によりdbl⁻表現型を獲得することができ

る。CD8⁺及びdbI⁻ T細胞は、同等のCFSE希釈を示し、そして、1つの集団として表される。CD4⁺ T細胞は、黒色腫細胞を認識することができないので、pMHC特異的に増殖することができない。CD4⁺ T細胞におけるCFSE希釈は、T細胞注入の6日間後までみられず、そして、活性化CD8⁺T細胞によって産生されるサイトカインに起因して生じた可能性が最も高い（不図示）。i.t.注入の1日及び2日後のCD8⁺/dbI⁻ T細胞のCFSE染色の代表的なヒストグラムを示す。各ヒストグラムは、1頭のマウスの1つの腫瘍に対応する。数字は、CFSEの平均蛍光強度を示す。縦軸は、まだ増殖を開始していなかった細胞の指標となるオリジナルのCFSE強度を示す。1日目及び2日目に、キメラ受容体PD-1tm:BBを共発現したCD8⁺/dbI⁻ T細胞が、それぞれ、キメラ受容体を有しないか又はPD-1:CD28tm受容体を発現しているCD8⁺/dbI⁻ T細胞と比較して、より低いCFSE強度を有することが観察された。4日目、CD8⁺/dbI⁻ T細胞は、キメラ受容体発現とは独立に同等のCFSE希釈を示した（不図示）。PD-1tm:BBを発現しているT細胞によるCFSEの早期希釈は、これらT細胞がより強く腫瘍細胞と反応し、そして、キメラ受容体を有しないT細胞又はキメラ受容体PD-1:CD28tmを発現しているT細胞よりも早く増殖を開始したことを示す。上の2本の線（緑）がTCR-D115/PD-1tm:BB 中央の2本の線（赤）がTCR-D115/PD-1:CD28tm 下の2本の線（青）がTCR-D115/モック（対照）

10

【図6】TCR-D115及びTCR-T58 T細胞（HLA-A2 / チロシナーゼ）についてのペプチド-MHC複合体（pMHC）を発現しているSK-Mel23ヒト黒色腫細胞を、免疫不全NSGマウスの側腹部にs.c.注入した。共受容体が発現していないCFSE標識されたTCR-D115 T細胞（モック）及びキメラ受容体PD-1tm:BBを発現しているものを、確立された異種移植片（802 mm³、SEM ± 8.3、約17日）に腫瘍内注入した。T細胞注入前、並びに注入後2日目及び7日目に、ノギスを使用して腫瘍体積を測定した。改変楕円体計算式を使用して腫瘍体積を計算した；体積 = (長さ × 幅²) × 0.52。マウスを殺し、そして、腫瘍を単一細胞懸濁液に解離させ、そして、腫瘍当たりのT細胞をフローサイトメトリーによって計数した（CD45+細胞（g 腫瘍）。N = 時点及びT細胞当たり3頭のマウス。A）に示されているように、TCR-D115/PD-1tm:BB T細胞は、2日目にキメラ受容体を有しないT細胞よりもるかに多い腫瘍内細胞数に達し、そして、この数は7日目もまだ高かった。細胞数がより多くなるのと同時に、TCR-D115/PD-1tm:BB T細胞は良好な腫瘍管理を達成し、2日目における出発体積と比較して腫瘍体積が減少し、そして、7日目もまだ腫瘍が良好に管理されていた（7日目における腫瘍体積の平均倍数変化は2と比較して1.7）（B）。

20

30

【図7】ヒトT細胞で発現しているCD40L:28キメラタンパク質の予想効果 1) トランスジーンを発現しているT細胞に対するシス活性-支持的効果：T細胞における融合タンパク質のライゲーションは、CD28シグナル伝達を誘導し、ひいては、TCRシグナル、CTLエフェクタ機能、及び生存を支持し、より優れた腫瘍殺傷につながる。2) 抗原提示細胞（APC）に対するトランス効果：APCにおけるCD40の活性化はAPCを刺激して、CTLエフェクタ機能を増強するサイトカイン（IL-12）及びケモカインを分泌させる。3) 内皮に対するトランス効果：腫瘍内皮で発現しているCD40のライゲーションは、内皮のアポトーシスを引き起し、それによって、腫瘍の血管支持を破壊する。4) 腫瘍細胞に対するトランス効果：腫瘍細胞で発現しているCD40のライゲーションは、腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こす。

40

【図8】異なるリンカー及びドメインの配向を有する3つの異なるコンストラクトを作製する。 1) CD40LFc:28；2) CD40LFil:28；3) CD40L:28i

【図9】安定なレトロウイルス形質導入後のヒトT細胞におけるCD40L:28コンストラクトの発現特性 ヒトT細胞にレトロウイルスによって形質導入してキメラタンパク質を発現させ、そして、表面タンパク質の発現を7日目及び17日目に分析した。表面発現は7日目に検出されたが、T細胞が静止状態に達するのと同時に17日目まで発現が消失した（図9A）。表面発現は、TCR特異的活性化後に再度達成された（図9B）。したがって、これらキメラタンパク質は、T細胞支持が必要とされるとき及び場所に応じて誘導可能な表面存在を示す。

50

【図10】T細胞において発現しているキメラCD40L:28タンパク質は、B細胞を活性化することができる(トランス効果)。T細胞を一次B細胞と共に1:1の比で24時間共培養した。その後、細胞を収集し、そして、フローサイトメトリーによってCD86及びFasについて分析した。バーは、B細胞における分析されたマーカーの平均蛍光強度を示す。キメラタンパク質のCD40L-ECFは、B細胞において観察されたCD86及びFasの高発現によって証明されるように、機能的に活性であった。B細胞活性化の別のマーカーであるCD83についても同様の効果がみられた(不図示)。3つの異なるコンストラクトは、ネイティブCD40Lタンパク質と同様、又はそれ以上の段階的活性を示した。

【図11】TCR-T58 T細胞において発現しているキメラCD40L:28タンパク質は、T細胞の機能を支持する(シス効果)。キメラタンパク質(crtI)を有しないTCR-T58トランスジェニックT細胞又はネイティブCD40L若しくはレトロウイルス形質導入後にキメラタンパク質を発現しているTCR-T58トランスジェニックT細胞を、黒色腫細胞株(SK-Mel 23、FM86、TCRリガンド及びCD40について陽性)と共培養した。A)48時間共培養上清においてIFN- γ を測定した。B)4時間の共培養後に黒色腫腫瘍細胞に対する細胞毒性を測定した(クロム放出アッセイ)。示される結果は、5:1エフェクタ:標的比から得られたものである。両アッセイから分かるように、キメラタンパク質を発現しているT細胞は、より多くのIFN- γ を分泌し、そして、対照と比較して腫瘍細胞に対するより高い細胞毒性を示した。したがって、キメラタンパク質のCD28-ICDは、機能的に活性である、すなわち、キメラタンパク質を発現しているT細胞のエフェクタ活性を増強する。

【0079】

本発明は、更に、以下の実施例によって説明される。更に、本明細書に記載される実施例及び特定の実施態様は、本発明をこのような特定の実施態様に限定すると解釈されてはならない。

【0080】

実施例

キメラ受容体をコードしているプラスミド

キメラ受容体配列は、Geneart, Life Technologiesに注文した。該配列は、凍結乾燥粉末として納品され、そして、ヌクレアーゼ不含水に0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で溶解させた。増幅については、標準的なプラスミド調製法に従ってTOP10又はMACH1の大腸菌をGeneartコンストラクトで化学的に形質転換した。

【0081】

ヒト一次T細胞へのivtRNAのエレクトロポレーション

ivtRNAを調製するために、キメラ受容体配列をpGEMにクローニングした。HindIII又はHindII及びEcoRI(New England Biolabs)を使用して、pGEMベクター(S. Milosevic, Medigene GmbH, Martinsried, Germanyによって提供)へのクローニングを行った。製造業者のプロトコールに従って、mMESSAGEmMACHINEキット(Ambion)を使用してpGEMプラスミドからivtRNAを生成した。Gene Pulser Xcell(Bio-Rad)を使用して、900Vで2.3ms、ヒト一次T細胞にivtRNA 20 μg をエレクトロポレーションで導入した。

【0082】

ヒト一次T細胞のレトロウイルス形質導入

キメラ受容体配列をpMP71-PREベクターにクローニングした(レトロウイルス形質導入については、Leisegang 2008、引用文中)。T細胞のレトロウイルス形質導入を上記の通り行った(Leisegang 2008、引用文中)。10%ヒト血清、1%L-グルタミン、1%非必須アミノ酸、1%ピルビン酸ナトリウム、及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン(全てInvitrogen)+100U/mL IL-2(Cancernova)を添加したRPMI1640中1ウェル当たり 1×10^6 /mLの細胞密度で、健常ドナー由来のヒトPBMCを24ウェルプレートにプレーティングし、そして、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OKT3(E. Kremmer, Helmholtz Center Munich, Germanyによって提供)及び1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗CD28(BD Pharmingen)で2日間活性化させた。

【 0 0 8 3 】

製造業者のプロトコールに従ってTransIT（登録商標）-LT1試薬（Mirus）を使用して、記載の通り（Leisegang et al., Clin Cancer Res (2010), 16(8): 2333-2343）、両種指向性のキメラ受容体をコードしているレトロウイルスを生成した。48時間後にウイルス上清を収集し、そして、遠心分離によってRetroNectin（登録商標）（10 µg/mL、Takara）でコーティングされたプレートに結合させた。

【 0 0 8 4 】

2日間活性化させたPBMCを、24時間にわたってウイルスでコーティングされたプレートに添加し、次いで、新たにウイルスでコーティングされたプレートに分割し、そして、更に3日間培養した。形質導入されたPBMCをコーティングされていないプレートに移し、そして、更に少なくとも12日間培養して、IL-2の量を50 U/mLに減少させた。抗PD-1抗体（BioLegend）を使用して形質導入後12日目に受容体の発現を決定した。

10

【 0 0 8 5 】

細胞培養

HLA-A2⁺HEK293細胞に形質導入してチロシナーゼ（HEK/Tyr）又はチロシナーゼ及びPD-L1（HEK/Tyr/PD-L1）を発現させることによって、HEK/Tyr及びHEK/Tyr/PD-L1を生成した。形質導入後、HEK293細胞を単一細胞クローニングし、そして、同等のHLA-A2及びチロシナーゼの発現についてクローンを選択した。1% L-グルタミン、1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸ナトリウム、1% ペニシリン/ストربتマイシン（RPMI塩基性）+ 12% FCSを添加したRPMI-1640中で、SK-Mel23（M.C. Panelli, NIH, Bethesda, USAから供与）、HEK/Tyr、及びHEK/Tyr/PD-L1を増殖させた。

20

【 0 0 8 6 】

キメラ受容体の発現及びT細胞の増殖を決定するためのマルチパラメータフローサイトメトリー

LSRII（BD）でフローサイトメトリー分析を実施した。2% ヒト血清、0.1% アジ化ナトリウム、及び2 mM EDTA（いずれもSigma-Aldrich）を添加したPBS（Invitrogen）中で細胞を染色した。抗CD3-PE-Cy7、抗マウスTCR - 定常領域 - PB（いずれもBioLegend）、抗CD4-APC-A780、抗PD-1-APC（いずれもeBioscience）、抗CD8-V500（BD）及び7-AAD（Sigma-Aldrich）を使用して、ヒトキメラ受容体及びトランスジェニックTCRの発現を分析した。

30

【 0 0 8 7 】

抗HLA-A2（ATCC Hb54）+抗マウスIgG1-A488（Invitrogen）、抗PD-L1-FITC（BD）、抗チロシナーゼ（Upstate）+抗マウスIgG2a-A647（Invitrogen）、及び7-AADを使用して、HEK293細胞を分析した。

【 0 0 8 8 】

CFSE、抗CD45-PE-Cy7、抗CD8-PB（BD）、CD4-APC-A780、抗PD-1-APC、及び7-AADを使用して、異種移植片腫瘍に注入した後のT細胞を分析した。CD45⁺白血球を選択し、そして、生存及び単一の細胞をゲーティングした後、CD8⁺、CD4⁺、及びdβ1⁺の細胞においてCFSE強度を分析した。FlowJo 8.8.7ソフトウェアを使用してデータを解析した。

40

【 0 0 8 9 】

T細胞に対する融合タンパク質の効果を評価するための共培養及びサイトカインアッセイ
TCR-T58又はTCR-D115トランスジェニックヒトT細胞にivtRNAをエレクトロポレーションで導入するか又はレトロウイルスベクターを形質導入して、キメラ受容体を発現させ、次いで、1:2の比でHEK/Tyr又はHEK/Tyr/PD-L1の細胞と共に培養した。共培養上清を16時間後に収集し、そして、製造業者のプロトコールに従ってサンドイッチELISA（BD）又はBio-Plex（Bio-Rad）によって分析した。
形質導入されたTCRであるT58及びD115がCD8⁺T細胞でしか機能せず、そして、CD8⁺/CD4⁺T細胞比が実験間で変動したので、測定されたサイトカインの量を、細胞懸濁液内のTCR⁺CD8⁺T細胞の百分率（フローサイトメトリーによって決定）に対して正規化した

50

。以下の式を適用した：

【 0 0 9 0 】

NSGマウス

NSGマウスはCharles Riverから入手した。NOD/scid IL2Rgnull (NSG) マウスは、自然免疫の低下を特徴とする非肥満糖尿病 (NOD) マウスの遺伝的バックグラウンドに対して品種改良したものである。NSGマウスは、PRKDC遺伝子における機能喪失型突然変異であるprkdcscid突然変異を有し、その結果、B細胞及びT細胞の発生におけるV(D)J組み換え中にDNA鎖切断の修復が不完全になる。この重症複合免疫不全 (scid) は、T細胞及びB細胞の大きな減少を特徴とする。更に、NSGマウスは、IL-2受容体のガンマ鎖にnull突然変異 (IL2Rgnull) を有して、NK細胞の分化をブロックする。自然免疫の欠陥及び適応免疫の不在により、NSGマウスは、ヒト腫瘍異種移植片の養子T細胞療法に適したモデル系となる。

10

【 0 0 9 1 】

ヒト黒色腫異種移植片モデル

動物実験は地元当局によって承認され、法的規制に従って実施された。7 ~ 11 週齢の雄マウスに、 5×10^6 個のHLA-A2⁺チロシナーゼ⁺ヒト黒色腫細胞SK-Mel23 (Monica C. Panelli, NIH, Bethesda, USAに供与) をs.c.注入した。PD-L1/L2に加えて、TCR-D115及びTCR-T58のリガンドを形成するために必要なHLA-A2及びチロシナーゼを発現するので (Wilde et al., Blood (2009), 114: 2131-2139)、この黒色腫系統を選択した。マウス実験のためにTCR-D115を発現しているT細胞を選択したが、その理由は、確立された腫瘍を根絶するには不十分な低い結合力でSK-Mel23を認識することができるためである。

20

【 0 0 9 2 】

802 mm^3 (SEM = ± 83) のサイズに達するまで、約16日間腫瘍を成長させた。楕円体の体積を決定するための式を使用して腫瘍サイズ (mm^3) を計算した： $\frac{4}{3} \times \pi \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ 。

【 0 0 9 3 】

ヒトSK-Mel23異種移植片の腫瘍環境におけるTCR-D115 T細胞の増殖

細胞追跡色素、すなわち、CFDA-SEを使用して細胞増殖を評価する。該色素は細胞膜を透過し、そして、蛍光カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (すなわち、CFSE) に変換される。各細胞分裂において、CFSEの蛍光強度を半分にして、T細胞の増殖をモニタリングする。

30

【 0 0 9 4 】

ここでは、キメラ受容体を発現していない又は発現しているTCR-D115 T細胞を、37 °Cで8分間 $0.15 \mu\text{M}$ CFDA-SEで標識した。FACSで反応を停止させ、T細胞をPBSで2回洗浄し、そして、 10×10^7 細胞 / mLの濃度でPBSに再懸濁させた。T細胞懸濁液 $50 \mu\text{L}$ を、確立されたs.c. SK-Mel23異種移植片 (802 mm^3 、SEM = ± 83) にi.t.注入した。

【 0 0 9 5 】

i.t.注入の1、2、4、6、及び11日間後に腫瘍を収集した。機械的及び酵素的に分解することによって単一細胞懸濁液を調製し (Prinz et al., J Immunol (2012), 188: 5990-6000)、そして、フローサイトメトリー分析のために使用した。

40

【 0 0 9 6 】

クロム放出アッセイ

^{51}Cr で標識された黒色腫細胞を、96ウェルV底プレートにおいて2000細胞 / ウェルの一定細胞数で標的として使用した。エフェクタ細胞の四段階滴定のデュープリケート測定を用いて実験を実施した。平行ウェルにおいて、T細胞を含まない標的細胞をインキュベートして、 ^{51}Cr の自発的放出を決定した。4時間後に上清を収集し、そして、cpm測定のために計数プレート (PerkinElmer) に移した。標識された標的細胞をcpm測定のための計数に直接移すことによって、最高cpmを決定した。特異的溶解の百分率を以下の通

50

り計算した：特異的溶解% = (実験的cpm - 自発的cpm) / (最高cpm - 自発的cpm) × 100。

【 0 0 9 7 】

統計

図面のレジェンドにおいて指定されている統計検定は、GraphPad Prism 6ソフトウェアを使用して実施した。

【 0 0 9 8 】

結果

結果を図面に示す。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 - 1】

配列番号 1

ATGCAGATTCTCAGGCCCTTGCCCTGTCTGTGGGCTGTGCTCCAGCTGGGATGGC
GGCCTGGCTGGTTTCTGGACAGCCCGACAGACCTGGAACCCCTACATTTTCCCC
TGCCCTGCTGGTCGTGACCGAGGGCGACAATGCCACCTTCACCTGTAGCTTCAGCAAC
ACCAGCGAGAGCTTCGTGCTGAACTGGTACAGAATGAGCCCGAGCAACGAGCCGACA
AGCTGGCCGCTTCCCCAGGATAGATCTCAGCCCGGCCAGGATTGCCGGTTCAGAGT
GACCCAGCTGCCAACGGCCGGGACTTCCACATGTCTGTCTGCGGGCCAGACGGAA
CGACAGCGGCACATATCTGTGCGGCGCCATCAGCCTGGCCCCAAGGCCAGATCAAA
GAGAGCCTGAGAGCCGAGCTGAGAGTGACCGAGAGAAAGGCCGAAGTGCCCTACCGCC
CACCTAGCCCATCTCCAAGACCTGCCGGCCAG

配列番号 2

MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSALLVTEGDNATFTCSFSNT
SESVLWNYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFVTLQPNGRDFHMSVVRARRNDS
GTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQ

配列番号 3

AAGCGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTCATCGGCCCCGTGC
AGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCCGTTTCCCGAGGAAGAAGAGGGGG
GCTGCGAGCTCTAA

配列番号 4

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSRCFPEEEEGGCEL

配列番号 5

ATTATCTCATTTCTCCTGGCCCTGACCTCTACCGCCCTGCTGTTTCTGCTGTTCTTCTG
ACCTGCGGTTTCAGCGCTGTG

配列番号 6

IISFFLALTSTALLFLFLTLRFVSV

配列番号 7

TTCCAGACACTGGTCGTGGGAGTCGTGGGCGGCCCTGCTGGGATCTCTGGTGCTGCTCG
TGTGGGTGCTGGCCGTGATC

【図 1 - 2】

配列番号 8

FQTLVGVGVGGLLSLVLLVWVLA

配列番号 9

atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtggtgggtggtgacaaclgggctggggccaggaaggtttctagactccca
gacaggccctggaaacccccccacttctccccagccctgctggtggtgacgaaggggacaacgccaacttccactgagcttc
tccaacacatogagagcttctgclaaactgglaaccgcatlgagccccagcaaccagacggacaagcggccgcttcccgga
ggaccgagccagcccgccgaggaclgcccgttccgclgclacacaactggccaaaggcgclgacttccacatgagcgtggca
gggccccgagcaatgacagcggcacctacctclgltggggccatctccclggcccccaaggcgagatcaagagagcctgag
ggcagagctcagggtgacagagagaagggcagaagtgcccaagccccagccctcaccagggccagccgagccag
ttccaaacctggtggtggtgclgclggtggcgccclgclgggagcclggtgclgclggttgggtcctggtccgtctatclgctccggg
ccgacagagggaacaataggagccagcgccacggccagccctgaaggaggacccctcagccgclgclgclgcltclggtga
ctatggggagctggatttccagtgccgagagaaggcccgagcccccgclgcccclgclgclgagcagacggaggtatgcc
ccattgcttcttagcggaatgggcacctcatcccccgcccgaggggctcagcgtgacggcccttaggtgcccagccactgg
gcctgaggatggacactgctcttggccctctga

配列番号 10

MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSALLVTEGDNATFTCSFSNT
SESVLWNYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFVTLQPNGRDFHMSVVRARRNDS
GTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQ**FQTLVGVGVGGLLS**
LVLVWVLAVCRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSDVYGELDFQWREKTEPPVPV
VPEQTEYATIVFPSGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

配列番号 11

atgggaacacagclgtlacaacataglagccactclgtgclggtlcccaacttgagaggacaagacatlgcaggatcctgtagt
aactgcccagctggtaacttclglaataacaggaaatcagatttgcagtcctcltcccaaatagtttccagcgacaggtggga
caaaggacctlgacataltgcaggcagltglaaagglttltcaggaccaggaaggagltgtccaccacgaatgcagagltg
gactgcaactcagggtttcacitgcccggggcaggatlgcagcatgtgltgaacaggattglaaacaaggltcaagaactgacaaa
aaaagggtglaaagactgtgtgttggacatttaacgatcagaacgtggcatctgtcgacccctggacaaactgttltggatgga
aagctgtgtgtgaaatgggaacgaaggagagggaaggtgtgtgtggaacctccagccgacctctctcggggagcatctctgt
gaccccgccgtccctgogagagagccaggacactctccgagatcatctcttcttctgtgogctgacgtogactgtgtctctc
clgtclgtctctcagctccgttttclgtgtttaaocggggcagaagaacactctgtatatttcaaacaccatttatgagacca
gtacaaactactcaaggagaagaltggcgtgtagtggccgatttccagaagaagaaggaggatgtgaactgtga

配列番号 12

MGNSCYNIVATLLLVLFN**FERT**RLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQR
TCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKGCKD

10

20

30

40

50

【 図 1 - 3 】

CCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAR
EPGHSPQIIFFLALTTALLFLFLTLRFSSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTEEDGCS
CRFPEEEEGGCEL

配列番号 13

[illegible]

配列番号 14

MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASHKGLDSA
VEVCVVGNYSQQLQVYSKTGFNC DGKLGNESVT FYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYL
DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFGPSKPF VWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFVWRSKRSRL
LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

配列番号15

[illegible]

配列番号 16

MWVRQVPWSFTWAVLQLSWQSGWLLEVPNGPWRSLTFYPAWLTVSEGANATFTCSLSN
 WSEDLMLNWNRLSPSNQTEKQAAFCNGLSQPVQDARFQIIQLPNRHDFHMILDTRRNDS
 GIYLCGAILSPHAKIEESPGAELVTERILETSTRYPSPSPKPEGRFGQGMVIGIMSALVGIPVL

【 図 1 - 5 】

配列番号 21

ATGCAGATTCTCAGGCCCTTGGCTGTGCTGTGGGCTGTGCTCCAGCTGGGATGGC
GGCCTGGCTGTTTCTTGGAACAGCCCGACAGACCTTGGAAACCCCTTACATTTTCCC
TGCCCTGTGCTGTGAGCAGGAGGCGCAATGACCATTTACCTGTAGCTTCAGCAAG
ACCAAGCAGAGAGCTTGTGCTGCAACTGGTACAGAAATGAGCCCAAGACCAAGACGACA
AGCTGGCCGCTTCCCCGAGGATAGATCTCAGCCCCGCCAGGACTGCCGGTTCAGAGT
GACCCAGCTGCCCAAGGGCCGGGACTTCACATATGTCTGTGCGGGCCAGACGAA
CGACAGCGGCACATATCTGTGCGGCGCCATCAGCCTGGCCCCAAGGCCAGTACAA
GAGAGCTGAGACGCTGAGAGTGAAGTACGACGAGGCGGCAAGTCTCTACCGCC
CACCCTAGCCCATCTCCAAGACCTGCCGGCCAGATTATCTATTCTTCTGGCCCTGAC
CTCTACCGCCCTGCTGTTTCTGTGTTCTTTCTAGCCTGCGGTTACGCTCGTG**AAGC**
GGGGCAGAAAGAGCTGCTGTATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCTGTCAGA
GCACCCAGGAAGAGGACGGCTGCTCTCCGCGTTTCCGAGGAAGAGAGGGGGGC
TGCGACGCTCAA

配列番号 22

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPFTSPALLVTEGDNATFTCSFSNT
 SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCFRVLTQLPNGRDFHMSVVRARRNDS
 GTYLCGAISLAPKAQIKESLRaelRVtERRAEVPTAHPSPSPRAGQ**IIFFLALTSTALLFLF**
FLTLRFSSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGCSCRFEEEEG

配列番号23

ATGCAGATTCTCTCAGGCTCCTTTGGCCTGTCGTGTGGGCCGTGCTCCAGCTGGGATGCG
GGCCCTGGATGGTTCCTGGACAGCCCCGACAGACCCCTGGAAACCCCTACATTTTCCCT
TGCCCTCTGCTGTCGTGACCGAGGCCGACCAATGCCACCTTCACTCTGAGCTTCAGCAAC
ACCAAGCGAGAGCTCTGTGCTGAAGCTGCACAGATGAGCCCGACACAGACAGCAGCA
AGCTGGCCGCCCTTCCCGAGGATAGATGTCAGCCGCGCCAGGACTGCCCGTTTCAGAGT
GACCCAGCTGCCAACGGCCGGGACTTCCACATGTCTGTGTGCGGCCAGACGGAA
CGACAGCCGACATATCTGTGCGCGCCATCAGAGCTGGCCCCAAGCGGCAGATCAAA
GAGAGCCTGAGAGCCGAGCTGAGATGACCGAGAGAGGCCCAAGTCCCTACCCGC
CACCTTAGCCCATCTCCAAAGACTGCCGCGCAGTTTCCAGACAGCTGGTCTGGGAGTCG
TGGCGGCCCTGCTGGGATCTCTGGTGCTGCTCGTGTGGTGCTGGCCGTGATCAAGC
GGGGCAGAAAGAGCTGCTGTATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCTGTCGAGA
CCACCCAGGAAGAGGACGGCTGCTCTGCCGGTTTCCGAGGAAGAAGAGGGGGGGC
TCGACCTGCTCAA

【 図 1 - 4 】

LLAWALAVFCSTSMSEARGAGSKDDTLKEEPSAAPVPSVAYEELDFQGREGTPELPTACV
HTEYATIVFTEGLGASAMGRRGSADGLQGPRPPRHEDGHCSWPL

配列番号 17

algggaacaaactgttacaagtggggttcattgctgcgtcagtgggctcgtgagaagtggggacgtgcagacgaactctctgtga
taactgtcagctgtgttactctgcgcaaaatcaaaccaactgcgcagagagctgcctccagacttccttccagcatagggtgaca
cctggaactgaatactgtcagagtgctgtgcaggctgttccaggtaacgaagatttgccttaccacacacgcgtgagtgctgtgagtg
taactgagtgattcattgtgtggcgacacgtgcacaaactgttgaaagagctgcagcgtctgcagcgtgtcaactgaacgaacgag
gttgcaaaactgtagctggggaacatttaagaccacgaacgtgactcgtgctcgtcagacctggagcaaacgtctctctagaaggga
aggctgtgcttgtaagacggggaacacgaacgaaggagctggggaggaacacgaactccttgcagtgcttactctgttctctgc
gtgcagcatcgttggttaattcccccaattatccaagcaacatttaagaagaaccactggagcagctcgaagggaagatgtctgtga
cgtgcagactgcacgaagggaagaaggagggagggagggagctgactgcgtgtga

配列番号18

MGNNCNVNVVIVLLVGCEKVGAVQNSCDNCQPGTFCRKNYPNVCCKSPSTFSSIGGGQN
CNICRVCAGYFFRKKFCSSTHNAECEIEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSL
GTENDQNGTGALCPRWNTCLDGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPSTISVTEGGPGG
HSLQVLTLFLATLALLALIFITLFSVLKWRKKFPHIFKQPFKKTGAAQEEDACSRCPQE
EELGGGGGYEL

配列番号19

aigacacitcaggctcgtctgtcttggtctcaactctcttcagttcaaglaacagaataaagaatttgglaaagcagtcgccccgtc
 tlggttagatgacaacagaggtcagcctcagctcaggtattcttcaaacctctcgcagaagaattcgggctaccctgcatacag
 ggcgtgaacacgacgagtggaagctctgtcgggaatgggaatttgaactcagccccgttcgtcgcaagatccgagctcaactg
 cgcgtgatttcttgacaacacacagacagcttcgtcttcgttcacgcacgtcactacacagcaattattctctcgaattctc
 gttcaltgtaacctcgccttacciaacacagagaggagcaatgggaactattattacataaaagagaacactcttgcatactca
 gtacatccaaagcgtttgggacgtctgtgtgtctgacgagcttctgtatggctcagtagcaagtgctcttgtgttatcgtg
 acaaaatgtagaagaacacagactctcaagtgactcaatgacacagactccccgggctgggctcactgaagaaacgtcttcc
 acagcttgcacccctgcagagacgtcttcagcgtcagccgcctcga

配列番号 20

MTLRLLFLALNFFSVQVTENKILVKQSPLLVDSEVLSLCRYSYNLLAKEFRASLYKGVNSD
VEVCVGNGNFTYQPQFRSNAEFNCDGDFDNETVTFRLWNLHVNHDTIYFKIEFYPPPYL
DNERSGNTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWALVVAGVLCYGLLVTVLALCVIWTNSRRNRLLQV
TTMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRP

【 図 1 - 6 】

配列番号 24

MQIPQAPWPVVVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVTGEDNATFTCSFSNT
SESVLNLWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPQDCRFVTVQLPNGRDFHMSVVRARRNDS
GTYLCAISLAPAKAIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLLVGVGVGGLGS
LVLLVWVLAVIKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG

配列番号 25

ATGCAGATTCTCAGGCCCTTGGCCTGTGCTGTGGGCTGTGCTCCAGCTGGGATGGC
GGCCTGGCTGGTTTTCTGGAACAGCCCCGACAGACCTTGAACCCCCCTACATTTTCCCC
TGCCCTGCTGGTCTGACCGGAGGGCGACAATGCCATTTCCACTGTAGCTTCAGCAAC
ACACGAGAGCTGGTGGTCTGACTGACTGGTACAGTACGCCCCAGCAACACGACGACA
AGCTGGCCGCTTCCCCGAGGATAGATCTCAGCCCGGCCAGGATTGCCGGTTCAGAGT
GACCCAGCTGCCCAAGGGCCGGGACTTCACATGTCTGTGTCGGGGCAGACGGAA
CGACAGCGGCATATCTGTGCGCGGCATCAGGCTGGCCCCAAGGCCGACGACAA
GAGAGCTGAGACCTGACAGTACAGTAGTACGACGAGGAGGGCCGAAGTGCCTACCGCC
CACCCTAGCCCATCTCCAAGACTGCCGGCGAGTTCTGGGTGCTGGTGGTCTGGGGC
GAGTGTGGCCTGTTACAGCCTGCTGTAGCCGTGGCCTTTCATCATCTTTGGGTGCG
CAGCAAGCGGAGCGGGCTGTCACAGCGACTACATGAATACGCCCCAGACGGC
CAGGCCCCCAGAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCCCTCCGAGAGATTCGCCGCT
ACAGAAGCTGA

配列番号 26

MQIQAPQWPVVVAVLQLGWRPGWFLDSPRPWNPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNT
SESFVLNRYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFVTVLQPNGRDFHMSVVRARRNDS
GTYLCAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAQGFWVLVWGGVLACYS
LLVTVAIFIWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHQYPAPPRDFAAYRS

配列番号 27

MQIPQAPWPVWVAVLQLQWRMKGQDQNPQIAAHVISEASSKTSV.LQWAEKGYYTMSNN
 LPTVKGQSLTKVRGQLYYQAVQTVFCNREASSAGPIASLCLKSPGRGRIFLRAANTHYS
 AKPCGQKQHLGQVFEFLQPQAVFVNVNDSQVSHGTFSGFLKL.GGGGSGGGGDEPK
 SCDKTHTPCCPAPACGVSFLFPPKPKDMLRIQTEPVTVCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTPREEQYNGSTRVSVSLTVLHGDWLNGKEYCKVCSNKVALPIAEKITSK
 GQKPREPQYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFGYPSIDAEVWESNGGPPENNYKTPPVL
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGPSKPFWWLVV
 VGGVLACYSLTVAFIIFWVRSKRSLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR
 S

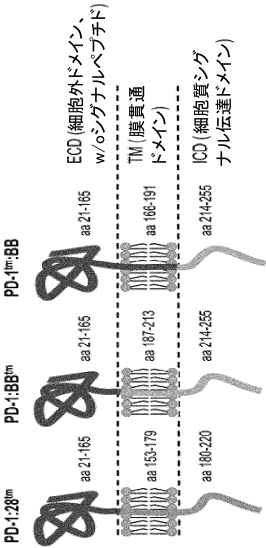
【 図 1 - 7 】

配列番号 28
MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNN
LVTLENGKQLTVKRQGLYYIAQVTFCSNREASSQAPFIASCLKSPGRFERILLRAANTHSS
AKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKLGGGSGGGGDDGQ
ACNPSSACRAVGRGLQPKGVRVKETADFKVYTKGAGSGELKVTVKGPKGEERVKQKDLG
DGVYGFEEYPMVPGTYIVTITWGGQNGRSPFEVKVGPSPFWVLVVVGGVLCYSLLVTV
AFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

配列番号 29
MRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSATGLPISMKIFMYLLTVFL
ITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFV
KDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLE
NGKQLTVKRQGLYYIAQVTFCSNREASSQAPFIASCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPC
GQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL

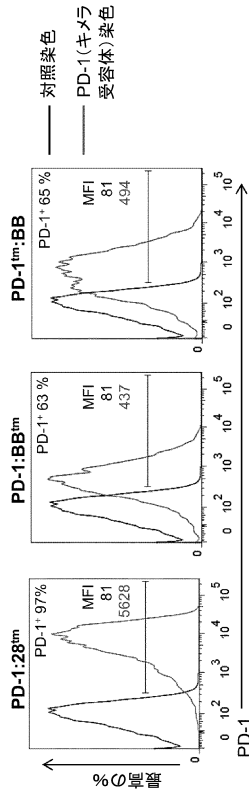
配列番号 30
MIETYNTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFV
FMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHV
ISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIAQVTFCSNREASSQA
PFIASCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSH
GTGFTSFGLLKL

【 図 2 】

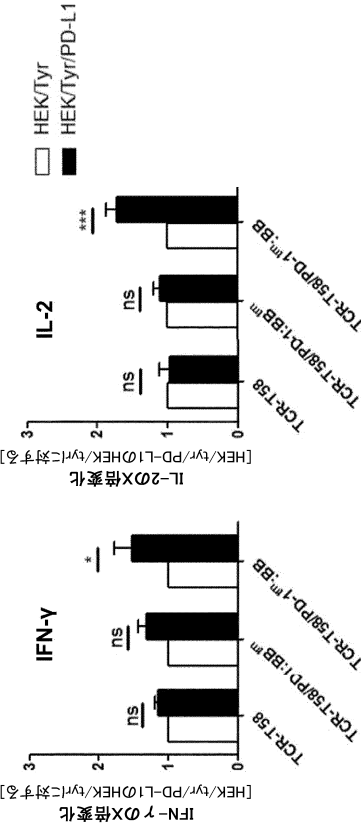


10

【 図 3 】



【 図 4 】



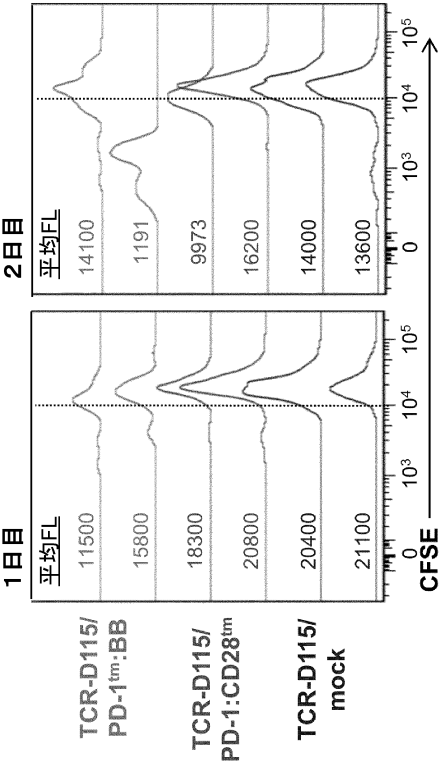
20

30

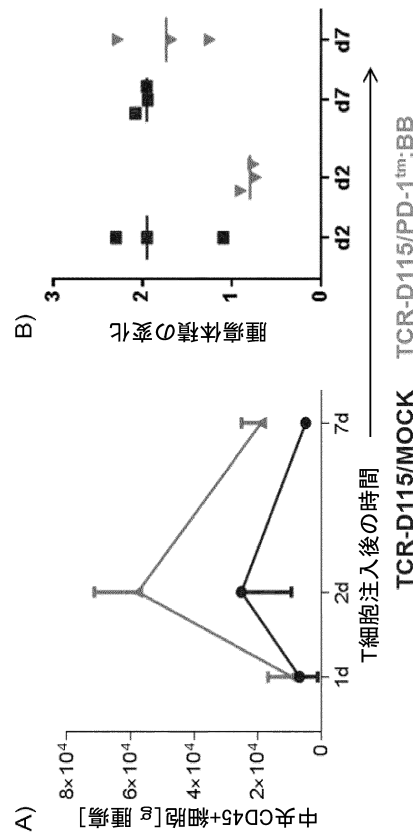
40

50

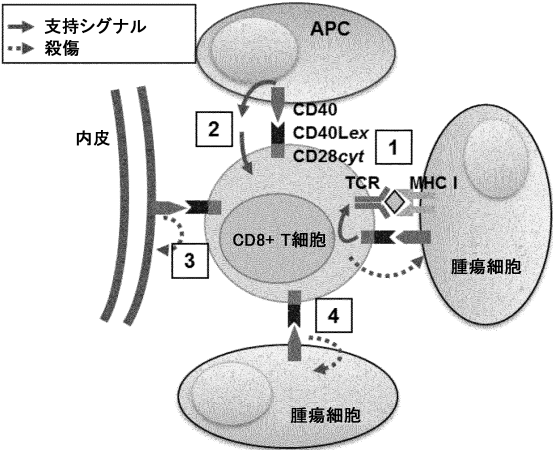
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

1)	PD-1シグナル ペプチド (20 aa)	可溶性・CD40L (113-261 aa)	Gly/Ser/リンカー (10 aa)	IGF1Rスベーター (232 aa)	CD28 ext (148-152 aa)	CD28 TM4細胞質 (153-220 aa)
2)	PD-1シグナル ペプチド (20 aa)	可溶性・CD40L (113-261 aa)	Gly/Ser/リンカー (10 aa)	IGF1Rスベーター (96 aa)	CD28 ext (148-152 aa)	CD28 TM4細胞質 (153-220 aa)
3)	CD28 cyt (逆) (180-220 aa)	CD40L cyt (短縮) (14-22 aa)	CD40L TM (23-46 aa)	CD40L 細胞外 (47-261 aa)		

10

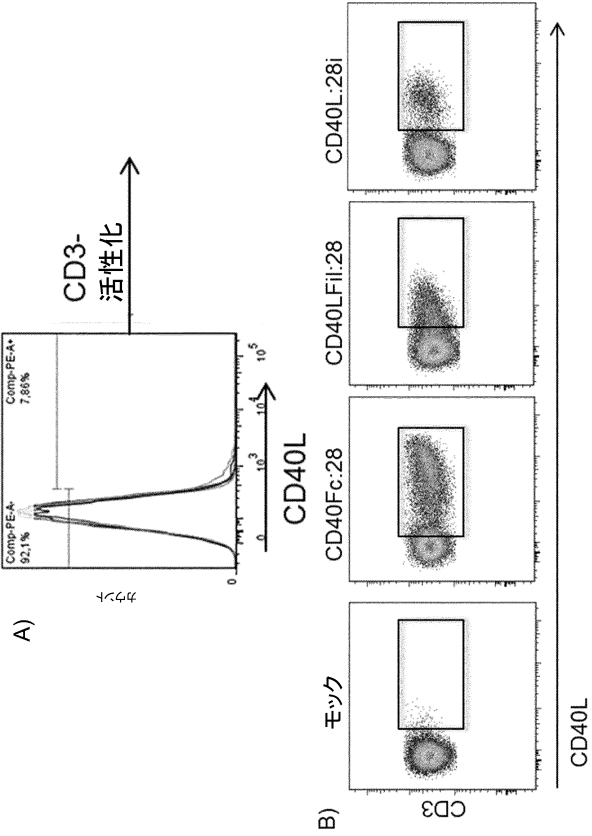
20

30

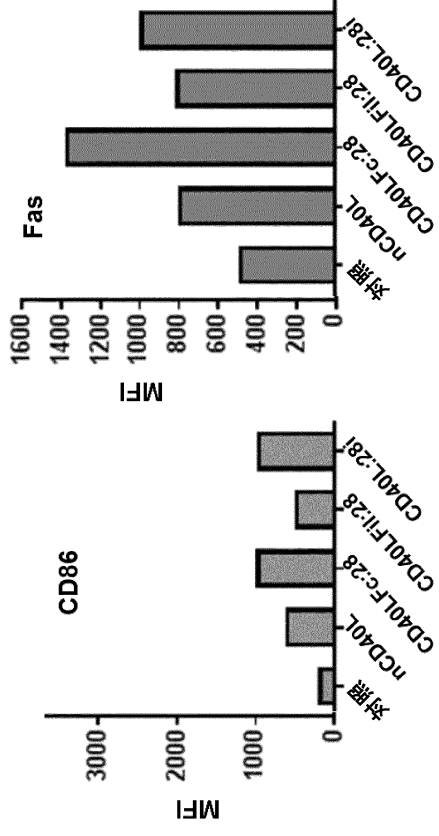
40

50

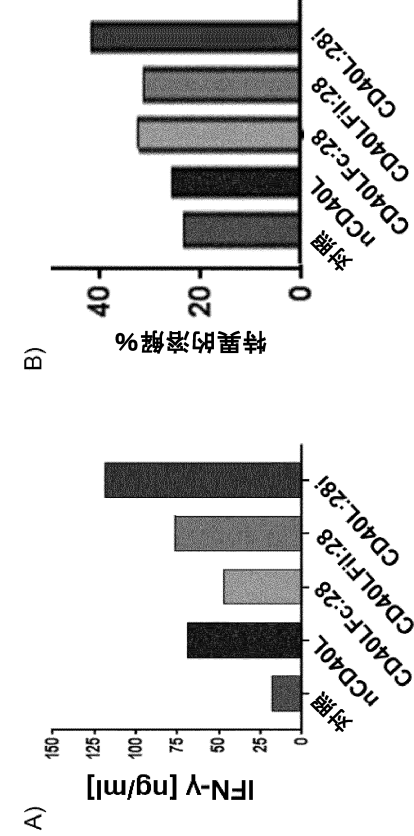
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007250519000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12

オイトシュトラセ 5

(72)発明者

ヴァイツ, シュテファン

ドイツ国、8 5 3 5 4 フライジング、フィンケンガッセ 3

審査官

小倉 梢

(56)参考文献

JNCI Natl. Cancer Inst. , 2015年 , Vol. 107, djv146 , p. 1-10

Am. J. Transl. Res. , 2015年 , Vol. 7 , p. 460-473

SCHLENKER, Ramona , Chimeric co-stimulatory receptors as a strategy to improve the performance of T cells in the tumor environment , Dissertation , p. 1-132 , 2015年

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 4 / 8 2 5

C 0 7 K 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q