(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-550485
(P2022-550485A)
(43)公表日　令和4年12月1日(2022.12.1)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｂ０６４
Ｃ０７Ｋ	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ０７Ｋ	*14/47*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/47		４Ｃ０８４
Ｃ０７Ｋ	*16/28*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28		４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*15/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全59頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-543798(P2022-543798)
(86)(22)出願日　令和2年9月23日(2020.9.23)
(85)翻訳文提出日　令和4年5月19日(2022.5.19)
(86)国際出願番号　PCT/EP2020/076566
(87)国際公開番号　WO2021/058563
(87)国際公開日　令和3年4月1日(2021.4.1)
(31)優先権主張番号　1913697.7
(32)優先日　令和1年9月23日(2019.9.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　500545366
キングス カレッジ ロンドン
イギリス国 ロンドン ダブリューシー２ アール ２エルエス ストランド
Ｓｔｒａｎｄ，Ｌｏｎｄｏｎ ＷＣ２Ｒ ２ＬＳ Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ
(74)代理人　100113376
弁理士　南条 雅裕
(74)代理人　100179394
弁理士　瀬田 あや子
(74)代理人　100185384
弁理士　伊波 興一朗
(74)代理人　100137811
弁理士　原 秀貢人
(72)発明者　マー ジョン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＤＡＰ１０／ＤＡＰ１２融合ポリペプチド

(57)【要約】
本発明は、ＤＮＡＸ活性化タンパク質１０（ＤＡＰ１０）ポリペプチドおよびＤＮＡＸ活性化タンパク質１２（ＤＡＰ１２）ポリペプチドを含む融合ポリペプチドに関する。本開示はまた、そのような融合タンパク質を含む細胞、および、がんの処置でのそれらの使用にも関する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ｉ）ＤＮＡＸ活性化タンパク質１０（ＤＡＰ１０）ポリペプチド、またはその機能性変異体および（ｉｉ）ＤＮＡＸ活性化タンパク質１２（ＤＡＰ１２）ポリペプチド、またはその機能性変異体を含む、融合ポリペプチド。
【請求項２】
請求項１に記載の融合ポリペプチドであって、
Ｎ末端からＣ末端に、式：
Ａ－Ｂ－Ｃ－Ｄ－Ｅ
を有し、
ここで
Ａ＝存在してよいＮ末端配列
Ｂ＝ＤＡＰ１０ポリペプチドまたはその機能性変異体
Ｃ＝存在してよいリンカー配列
Ｄ＝ＤＡＰ１２ポリペプチドまたはその機能性変異体
Ｅ＝存在してよいＣ末端配列
である、
融合ポリペプチド。
【請求項３】
前記ＤＡＰ１０ポリペプチドおよび／または前記ＤＡＰ１２ポリペプチドが哺乳類の配列である、請求項１または２に記載の融合ポリペプチド。
【請求項４】
前記ＤＡＰ１０ポリペプチドおよび／または前記ＤＡＰ１２ポリペプチドがヒト配列である、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項５】
前記ＤＡＰ１０ポリペプチドが、配列番号１のＤＡＰ１０ポリペプチドに対して、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＤＡＰ１０の機能性変異体である、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項６】
前記ＤＡＰ１０ポリペプチドが、配列番号１のＤＡＰ１０ポリペプチドのアミノ酸のいずれかを付加、削除または置換する１つまたは複数の（すなわち１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多い）点突然変異を有する配列番号１の機能性変異体である、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項７】
前記ＤＡＰ１０ポリペプチドが、配列番号１のトランケート型であるＤＡＰ１０ポリペプチドの機能性変異体である、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項８】
ＤＡＰ１０の前記トランケート型が、配列番号１のアミノ酸１９～９３、１９～６９、１～７１、１９～７１、１９～４８、４９～６９、４９～９３、または７０～９３を含む、またはからなる、請求項７に記載の融合ポリペプチド。
【請求項９】
前記ＤＡＰ１０ポリペプチドが、配列番号１～８のいずれか１つを含む、またはからなる、請求項１～４のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１０】
前記ＤＡＰ１２ポリペプチドが、配列番号９のＤＡＰ１２ポリペプチドに対して、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％配列同一性を有するアミ

ノ酸配列を含むＤＡＰ１２の機能性変異体である、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１１】
前記ＤＡＰ１２ポリペプチドが、配列番号９のＤＡＰ１２ポリペプチドのアミノ酸のいずれかを付加、削除または置換する１つまたは複数の（すなわち１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多い）点突然変異を有する配列番号８の機能性変異体である、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１２】
前記ＤＡＰ１２ポリペプチドが、配列番号９のトランケート型であるＤＡＰ１２ポリペプチドの機能性変異体である、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１３】
ＤＡＰ１２の前記トランケート型が、配列番号９のアミノ酸２２～１１３、６２～１１３、２２～６１または４１～６１を含む、またはからなる、請求項１２に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１４】
前記ＤＡＰ１２ポリペプチドが、配列番号９～１３のいずれか１つを含む、またはからなる、請求項１～９のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１５】
前記ＤＡＰ１０ポリペプチドおよびＤＡＰ１２ポリペプチドがリンカーによって連結されている、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１６】
前記リンカーが、配列番号１８～４６のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む、またはからなる、請求項１５に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１７】
前記リンカーが、配列番号３３または３８～４４のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む、またはからなる、請求項１５または１６に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１８】
前記融合ポリペプチドがＮ末端配列を含む、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１９】
前記融合ポリペプチドがＣ末端配列を含む、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項２０】
前記Ｎ末端またはＣ末端配列が、Ｈｉｓタグ、ＦＬＡＧタグ、Ａｒｇタグ、Ｔ７タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、Ｓタグ、ＡｖｉＴａｇ（商標）、アプタマータグ、ｍｙｃタグ、ＣＤ８αリーダー配列、４－１ＢＢエンドドメイン、Ｖ５タグ、またはＣＤ２７エンドドメインの１つまたは複数を含む、請求項１８または１９に記載の融合ポリペプチド。
【請求項２１】
前記Ｎ末端またはＣ末端配列が、ＣＤ８αリーダー配列、４－１ＢＢエンドドメインまたはＣＤ２７エンドドメインの１つまたは複数を含む、請求項２０に記載の融合ポリペプチド。
【請求項２２】
前記融合ポリペプチドが、配列番号６０～６３のいずれか一項に記載の配列を含む、またはからなる、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項２３】
請求項１～４のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドであって、
（ａ）配列番号８４を含まない；および／または
（ｂ）抗－ＥｐＣＡＭペプチドを含まない；および／または
（ｃ）配列番号８５を含まない；および／または

（ｄ）配列番号８６を含まない；および／または
（ｅ）配列番号８５および配列番号８６の両方とも含まない、
融合ポリペプチド。
【請求項２４】
前記融合ポリペプチドが、ＮＫＧ２Ｄポリペプチドをさらに含む連続したキメラポリペプチドの一部である、先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項２５】
前記融合ポリペプチドがＮＫＧ２Ｄポリペプチドと静電気的に会合している、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項２６】
前記ＮＫＧ２Ｄポリペプチドが、配列番号１４のヒトＮＫＧ２Ｄポリペプチドに対して、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２４または２５に記載の融合ポリペプチド。
【請求項２７】
前記ＮＫＧ２Ｄポリペプチドが、配列番号１４のＮＫＧ２Ｄポリペプチドのアミノ酸のいずれかを付加、削除または置換する１つまたは複数の（すなわち１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多い）点突然変異を有する配列番号１４の機能性変異体である、請求項２４～２６のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項２８】
前記ＮＫＧ２Ｄポリペプチドが、配列番号１４のトランケート型であるＮＫＧ２Ｄポリペプチドの機能性変異体である、請求項２４～２７のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項２９】
ＮＫＧ２Ｄの前記トランケート型が、配列番号１４のアミノ酸５２～２１６、７３～２１６または８２～２１６を含む、またはからなる、請求項２４～２８のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項３０】
前記連続したキメラポリペプチドが、配列番号６４～６９のいずれか１つの配列を含む、またはからなる、請求項２４または２６～２９のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。
【請求項３１】
先行する請求項のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドをコードする、単離された核酸配列。
【請求項３２】
配列番号６０～６９のいずれかをコードする核酸と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％または少なくとも約９９％配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項３１に記載の単離された核酸。
【請求項３３】
配列番号７０～７９のいずれか１つのヌクレオチド配列を含む、またはからなる、請求項３１に記載の単離された核酸。
【請求項３４】
請求項３１～３３のいずれか一項に記載の核酸を含む、ベクター。
【請求項３５】
レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである、請求項３４に記載のベクター。
【請求項３６】
請求項１～３０のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドを含む、宿主細胞。
【請求項３７】

請求項３１～３３のいずれか一項に記載の核酸または請求項３４または３５に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項３８】
Ｔ細胞またはＮＫ細胞である、請求項３６または３７に記載の宿主細胞。
【請求項３９】
請求項１～３０のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドを作製する方法であって、
請求項３７または３８に記載の宿主細胞を前記核酸の発現に適切な条件下で維持するステップを含み、それにより、前記核酸が発現されて融合ポリペプチドが生産される、
方法。
【請求項４０】
免疫応答性細胞を作製する方法であって、
（ｉ）請求項３１～３３のいずれか一項に記載の核酸または請求項３４もしくは３５に記載のベクターを前記免疫応答性細胞に形質導入するステップ、
および
（ｉｉ）融合ポリペプチドが発現されてＮＫＧ２Ｄポリペプチドと会合してＣＡＲを形成するように前記免疫応答性細胞を培養するステップ
を含む、
方法。
【請求項４１】
（ｉ）患者からＴ細胞および／またはＮＫ細胞を取得するステップ、（ｉｉ）請求項３１～３３のいずれか一項に記載の核酸または請求項３４もしくは３５に記載のベクターを前記Ｔ細胞および／またはＮＫ細胞に形質導入するステップ、および（ｉｉｉ）融合ポリペプチドが発現されてＮＫＧ２Ｄポリペプチドと会合してＣＡＲを形成するように前記Ｔ細胞および／またはＮＫ細胞を培養するステップを含む、方法。
【請求項４２】
請求項１～３０のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の核酸、請求項３４もしくは３５に記載のベクター、または請求項３６～３８のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む、医薬組成物。
【請求項４３】
薬学的または生理的に許容できる希釈剤および／または担体をさらに含む、請求項４２に記載の医薬組成物。
【請求項４４】
治療におけるまたは医薬としての使用のための、請求項１～３０のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の核酸、請求項３４もしくは３５に記載のベクター、請求項３６～３８のいずれか一項に記載の宿主細胞、または請求項４２もしくは４３に記載の医薬組成物。
【請求項４５】
病理学的障害の処置での使用のための、請求項１～３０のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の核酸、請求項３４もしくは３５に記載のベクター、請求項３６～３８のいずれか一項に記載の宿主細胞、または請求項４２もしくは４３に記載の医薬組成物。
【請求項４６】
病理学的障害の処置のための医薬の製造における、請求項１～３０のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の核酸、請求項３４もしくは３５に記載のベクター、請求項３６～３８のいずれか一項に記載の宿主細胞、または請求項４２もしくは４３に記載の医薬組成物の、使用。
【請求項４７】
病理学的障害に罹患している患者を処置する方法であって、
前記患者に、治療的に有効量の請求項１～３０のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の核酸、請求項３４もしくは３５に記載のベ

クター、請求項３６～３８のいずれか一項に記載の宿主細胞、または請求項４２もしくは４３に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、
方法。
【請求項４８】
前記病理学的障害が、固形腫瘍がん、軟組織腫瘍、転移病変および血液学的がん、例えば、肝臓がん、肺がん、乳がん、前立腺がん、リンパ系がん、結腸がん、腎がん、骨がん、膵がん、皮膚がん、頭頸部のがん、皮膚性または眼球内悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん、精巣がん、子宮がん、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、以下を含む慢性もしくは急性白血病：急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、小児の固形腫瘍、リンパ性リンパ腫、膀胱のがん、腎臓もしくは尿管のがん、腎盂の癌腫、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管新生、脊椎軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、カポシ肉腫、類表皮がん、扁平上皮細胞がん、Ｔ細胞リンパ腫、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、慢性骨髄性白血病－慢性期（ＣＭＬＣＰ）、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、皮膚性Ｔ細胞リンパ腫（ＣＴＣＬ）、末梢Ｔ細胞リンパ腫（ＰＴＣＬ）、肝細胞癌腫（ＨＣＣ）、胃腸間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、非小細胞肺癌腫（ＮＳＣＬＣ）、頭頸部の扁平上皮細胞癌腫（ＳＣＣＨＮ）、アスベストによって誘導されるものを含む環境的に誘導されるがん、および前記がんの組み合わせから選択されるがんである、請求項４４～４７のいずれか一項に記載の、使用のための融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞もしくは医薬組成物、使用、または方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＤＮＡＸ活性化タンパク質１０（ＤＡＰ１０）ポリペプチドおよびＤＮＡＸ活性化タンパク質１２（ＤＡＰ１２）ポリペプチドを含む融合ポリペプチドに関する。本開示はまた、そのような融合ポリペプチドを含む細胞、および、がんの処置におけるそれらの使用にも関する。
【背景技術】
【０００２】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）改変Ｔ細胞を用いた免疫療法は、Ｂ細胞悪性腫瘍および多発性骨髄腫の管理における変革をもたらすことが証明されている。しかしながら、この技術を固形腫瘍免疫療法に適用することは、腫瘍選択的標的の欠如によって妨げられている。ほとんどの腫瘍抗原は細胞内にあり、したがって、ＣＡＲ　Ｔ細胞によって簡単に認識されることができない。その結果として、現在開発中の固形腫瘍に向けられたＣＡＲのほとんどは、腫瘍細胞内で上方調節されているが正常組織ではより低いレベルで見られる標的に結合する。
【０００３】
高度の腫瘍選択性を示すいくつかの標的グループの１つはＮＫＧ２Ｄリガンドである。男性では、これらは、実質的に全てのタイプの腫瘍細胞上に異常に発現される８個のストレス誘導性タンパク質のグループ（ＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、ＵＬＢＰ１～６）を含む。さらに、ＮＫＧ２Ｄリガンドは、内皮、制御性Ｔ細胞および骨髄系由来サプレッサー細胞などの腫瘍関連間質エレメント上にも見られる（Ｐａｒｉｈａｒ，Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，２０１９，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．７（３）：３６３－３７５；Ｓｃｈｍｉｅｄｅｌ＆Ｍａｎｄｅｌｂｏｉｍ，２０１８，Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（９）２０４０）。ＮＫＧ２Ｄが遺伝学的に欠損したマウスは、上皮およびリンパ系悪性腫瘍の両方に関する免疫監視が損なわれている。ＮＫＧ２Ｄリガンドが安全な治療的標的である証拠は、健康組織には見られないという事実によって支持される。さらに、ＮＫＧ２Ｄ標的化ＣＡＲを含む現在進められている臨床試験は、フルダラビン／シクロホスファミドのリン

パ枯渇（ｌｙｍｐｈｏ　ｄｅｐｌｅｔｉｎｇ）化学療法と組み合わせた場合でさえ、重大な安全性問題が生じていない（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｃｅｌｙａｄ．ｃｏｍ／ｅｎ／ｎｅｗｓ／ｃｅｌｙａｄ－ｐｒｅｓｅｎｔｓ－ｕｐｄａｔｅ－ｏｎ－ａｕｔｏｌｏｇｏｕｓ－ａｌｌｏｇｅｎｅｉｃ－ｎｋｇ２ｄ－ｂａｓｅｄ－ｃａｒ－ｔ－ｔｈｅｒａｐｉｅｓ－ｉｎ－ｓｏｌｉｄ－ｔｕｍｏｒｓを参照）。

【０００４】

ＮＫＧ２Ｄ受容体は、ナチュラルキラー（ＮＫ）および一部のＴ細胞集団によって天然に発現される。それぞれのＮＫＧ２Ｄホモダイマーは、細胞膜内で相補的な荷電アミノ酸を介して２つのホモ二量体ＤＡＰ１０アダプター分子と会合する。この相互作用は、ＮＫＧ２Ｄの細胞表面発現および機能に必要である。ＤＡＰ１０は、ホスファチジルイノシトール３－キナーゼを介して共刺激を提供する能力がＣＤ２８と似ているが、重要なことに、制御性Ｔ細胞の不要な動員を促進するｐ５６ｌｃｋ結合モチーフがない（Ｋｏｆｌｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，２０１１，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１９：７６０－７６７）。ＤＡＰ１０共刺激の効能は、内部移行後にシグナル伝達するその持続的な能力によって強調される。しかしながら、ＤＡＰ１０は免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）がないので、ＮＫＧ２Ｄの結合は、完全なＴ細胞活性化をもたらさない。

【０００５】

共刺激（シグナル２としても知られる）に加えてＩＴＡＭ依存性シグナル１を提供するために（完全なＴ細胞活性化を生じさせるには両方のシグナルタイプが必要なので）、異なる方法を用いる様々なＣＡＲが開発されている。第１のＮＫＧ２Ｄ標的化ＣＡＲはＳｅｎｔｍａｎらによって開発され、ＣＤ３ζへのＮＫＧ２Ｄの融合からなる（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ，２００５，Ｂｌｏｏｄ　１０６：１５４４－１５５１）。名目上は第１世代ＣＡＲであるが、Ｔ細胞において内因性ＤＡＰ１０と会合し、シグナル１および２の両方が提供されることを意味している。このＣＡＲは現在、Ｃｅｌｙａｄ　Ｓ．Ａ．によってＣｙａｄ－０１として臨床開発中である。最近では、Ｃｈａｎｇら（２０１３，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．７３：１７７７－１７８６）は、外因性ＤＡＰ１０に加えて同一のＣＡＲを共発現するようにＮＫ細胞を改変した。ＤＡＰ１０によって提供されるものの代わりに代替形態の共刺激を提供するために、４－１ＢＢ（Ｓｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２４：２９５－３０５）またはＣＤ２８（Ｌｅｈｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ７：ｅ３１２１０）を取り込んだ２つのさらなるＮＫＧ２Ｄ　ＣＡＲも記載されている。これらのＣＡＲは全て、サイトカイン産生を伴うＴ細胞介在型の腫瘍細胞死滅化を可能にしたが、Ｃｈａｎｇらによって記載されるＣＡＲは一過的なインビボ抗腫瘍活性も示した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

ＮＫ細胞において見られるマウスＮＫＧ２Ｄの１つのアイソフォームは、ＤＡＰ１０およびＤＡＰ１２（単一のＩＴＡＭを含む）の両方とトランスで関連することができ、それにより、Ｔ細胞活性化のためのシグナル１およびシグナル２の両方を潜在的に送達する。この観察に基づき、本発明者らは、ＤＡＰ１０およびＤＡＰ１２の両方を含む融合ポリペプチドを改変した。ＮＫＧ２Ｄと同時発現すると、融合ポリペプチドおよびＮＫＧ２Ｄは、相補的な荷電アミノ酸残基を介して細胞膜において共会合し、完全なＴ細胞活性化をもたらすコンパクトなアダプターに基づくＣＡＲを形成する。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

したがって、本開示は、（ｉ）ＤＮＡＸ活性化タンパク質１０（ＤＡＰ１０）ポリペプチド、またはその機能性変異体および（ｉｉ）ＤＮＡＸ活性化タンパク質１２（ＤＡＰ１２）ポリペプチド、またはその機能性変異体を含む、融合ポリペプチドを提供する。ＤＡＰ１０ポリペプチド（またはその機能性変異体）およびＤＡＰ１２ポリペプチド（またはその機能性変異体）は、直接融合されてよく、または、リンカーによって結合されてもよ

い。融合ポリペプチドは、例えば、検出または精製を補助するため、発現を改善するため、または半減期を増大させるために、Ｎ末端またはＣ末端アミノ酸配列をさらに含んでよい。

【０００８】

一実施態様では、本開示は、Ｎ末端からＣ末端に、式：

Ａ－Ｂ－Ｃ－Ｄ－Ｅ

を有する融合ポリペプチドを提供し、

ここで

Ａ＝存在してよい（ｏｐｔｉｏｎａｌ）Ｎ末端配列

Ｂ＝ＤＡＰ１０ポリペプチドまたはその機能性変異体

Ｃ＝存在してよいリンカー配列

Ｄ＝ＤＡＰ１２ポリペプチドまたはその機能性変異体

Ｅ＝存在してよいＣ末端配列である。

【０００９】

一実施態様では、融合ポリペプチドは、ＷＯ２０１９／１８２４２５の配列番号１（本明細書では配列番号８４と呼ばれる）を含まない、またはからならない。一部の実施態様では、融合ポリペプチドは、抗－ＥｐＣＡＭペプチドを含まない。一部の実施態様では、融合ポリペプチドは、ＥｐＣＡＭ特異的抗原受容体を含まない。一部の実施態様では、融合ポリペプチドは、ＷＯ２０１９／１８２４２５の配列番号９（本明細書では配列番号８５と呼ばれる）を含まない、またはからならない。一部の実施態様では、ＤＡＰ１０ポリペプチドまたはその機能性変異体は、配列番号８５を含まない、またはからならない。一部の実施態様では、融合ポリペプチドは、ＷＯ２０１９／１８２４２５の配列番号１１（本明細書では配列番号８６と呼ばれる）を含まない、またはからならない。一部の実施態様では、ＤＡＰ１２ポリペプチドまたはその機能性変異体は、配列番号８６を含まない、またはからならない。一部の実施態様では、融合ポリペプチドは、配列番号８５および配列番号８６の両方とも含まない、またはからならない。

【００１０】

他の態様では、本開示は、本明細書中に記載の融合ポリペプチドをコードするＤＮＡおよびＲＮＡ分子を含む核酸分子（例えば単離された核酸分子）に関する。そのような核酸分子は、ＮＫＧ２Ｄポリペプチドまたはその機能性変異体をコードしてもよい。

【００１１】

本開示の核酸分子を含むベクター、特に発現ベクターも開示される。

【００１２】

本開示はまた、本明細書中に記載の融合ポリペプチドをコードする核酸および／またはベクターを含む宿主細胞も提供する。本発明の融合ポリペプチドを含む宿主細胞もまた、本明細書において提供される。

【００１３】

本開示はまた、本明細書中に記載の融合ポリペプチドを作製する方法も提供し、その方法は、本開示の宿主細胞を核酸の発現に適切な条件下で維持するステップを含み、それにより、組み換え核酸が発現されて融合ポリペプチドが生産される。

【００１４】

本開示はまた、本開示の融合ポリペプチド、核酸分子、ベクターまたは宿主細胞を含む医薬組成物も提供し、薬学的または生理的に許容できる担体をさらに含んでもよい。

【００１５】

本開示はまた、病状に罹患している患者を処置する方法も提供し、その方法は、本開示の融合ポリペプチド、核酸分子、ベクター、または融合ポリペプチドを含む宿主細胞を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。

【００１６】

本開示はまた、（ｉ）治療での使用のための、および（ｉｉ）本明細書中に開示の疾患または状態の処置のための医薬の製造における、本開示に係る融合ポリペプチド、核酸分

子、ベクター、宿主細胞または医薬組成物も提供する。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１】生産された構築物のそれぞれの構造を説明する図である。Ｎ１０１２は、外因性ヒトＮＫＧ２Ｄタンパク質および本発明に係る融合外因性ＤＡＰ１０／１２ホモダイマーを含む複合体を含む。Ｎ１０１２は、表２に示される配列番号６４を含む。ＮＫＧ２Ｄ複合体は、細胞内に既存の内因性ＤＡＰ１０と相互作用する外因性ヒトＮＫＧ２Ｄタンパク質を含んでおり、比較目的のみのために提供される。

【図２】Ｎ１０１２（図１に模式的に示される）またはＮＫＧ２Ｄ単独を発現するレトロウイルスプラスミドを用いたトランスフェクションの３日後の２９３Ｔ細胞における細胞表面および細胞内（ＩＣＳ）の両方におけるＮＫＧ２Ｄの発現を示し、非形質導入（ＵＴ）２９３Ｔ細胞と比較している。

【図３】ＮＫＧ２Ｄ単独またはＮ１０１２をコードするレトロウイルスベクターによる活性化未分画ヒトＴ細胞の形質導入後の、Ｔ細胞のＣＤ４$^+$サブセットにおける細胞表面ＮＫＧ２Ｄ発現の形質導入パーセンテージ（図３Ａ）および中央値蛍光強度（ＭＦＩ－図３Ｂ）を示す。ＵＴ　Ｔ細胞における発現およびＭＦＩも比較のために示す。

【図４】Ｎ１０１２、ＮＫＧ２Ｄまたはコントロール ＣＡＲを発現するために形質導入された活性化未分画Ｔ細胞のＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$サブセットにおける細胞表面ＮＫＧ２Ｄの代表的な発現パターンを示す。ＵＴ　Ｔ細胞におけるＮＫＧ２Ｄ発現を比較として提供する。

【図５】異なるＣＡＲ　Ｔ細胞：標的比でＮ１０１２$^+$、ＮＫＧ２Ｄ$^+$またはＵＴ　Ｔ細胞と共培養した後の１１個の異なる腫瘍細胞株の生存能力を示す。腫瘍細胞の生存能力を、ＭＴＴアッセイを用いて７２時間後に評価した。Ｔ細胞共培養の不存在で観察される生存能力のパーセンテージとして表す。

【図６】１：１のＣＡＲ　Ｔ細胞：標的比で８個の異なる腫瘍細胞株と共培養中の、Ｎ１０１２、ＮＫＧ２ＤおよびＵＴ　Ｔ細胞によって分泌されたサイトカイン（ＩＦＮ－γ（図６Ａ）およびＩＬ－２（図６Ｂ））のレベルを示す。共培養上清を７２時間後に取り出し、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）によってサイトカインの存在について評価した。

【図７】異なるＣＡＲ　Ｔ細胞：標的比でＮ１０１２$^+$、ＮＫＧ２Ｄ$^+$またはＵＴ　Ｔ細胞と共培養した後の腫瘍および膵星ＰＳ１の生存能力を示す。図７Ａは、異なるＣＡＲ Ｔ細胞：標的比でＮ１０１２$^+$、ＮＫＧ２Ｄ$^+$またはＵＴ　Ｔ細胞と共培養した後の膵星ＰＳ１細胞の生存能力を示す。１：１のＣＡＲ　Ｔ細胞：標的比で添加した場合、Ｎ１０１２$^+$Ｔ細胞は、１：１比で一緒に増殖したＰＳ１およびＢｘＰＣ３細胞の両方からなる単一層の強力な溶解も示す（図７Ｂ）。これは、ＮＫＧ２Ｄ$^+$またはＵＴ　Ｔ細胞のいずれかを添加した際に観察される有効性の欠如と対照的である。両方の場合において、標的細胞の生存能力は、ＭＴＴアッセイによって４８時間後に評価されたものであり、Ｔ細胞共培養の不存在において観察される生存能力のパーセンテージとして表す。１：１のＣＡＲ　Ｔ細胞：標的比でＮ１０１２$^+$、ＮＫＧ２Ｄ$^+$またはＵＴ　Ｔ細胞と共培養した後の腫瘍細胞および間質細胞単一層の生存能力を図７Ｃ（ＢｘＰＣ３＿ＬＴ＋ＰＳ１）および図７Ｄ（ＰａＴＵ＋ＰＳ１）に示す。腫瘍および間質細胞の両方の強力な溶解がＮ１０１２$^+$Ｔ細胞で観察されたが、ＮＫＧ２ＤまたはＵＴ　Ｔ細胞のいずれかと共培養した場合、標的細胞生存能力の最小限の減少が観察された（図７Ｃ～Ｄ）。１：１のＣＡＲ　Ｔ細胞：標的比でＮ１０１２$^+$、Ａ２０２８ｚ$^+$、ＮＫＧ２Ｄ$^+$またはＵＴ　Ｔ細胞と共培養した後の腫瘍細胞および間質細胞の単一層の生存能力を図７Ｅおよび図７Ｆに示す（最大５回までの再刺激後）。図７ＧおよびＨは、上述の共培養中にＮ１０１２$^+$、Ａ２０２８ｚ$^+$、ＮＫＧ２Ｄ$^+$およびＵＴ　Ｔ細胞によって分泌されたＩＦＮ－γのレベルを示す。腫瘍単独から分泌されたＩＦＮ－γのレベルをネガティブコントロールとして決定した。図７ＩおよびＪは、Ｎ１０１２$^+$、ＮＫＧ２Ｄ$^+$またはＵＴ　Ｔ細胞との共培養後の腫瘍スフェロイドの生存能力を示す。図７Ｋは、腫瘍スフェロイドとの共培養中にＮ１０１２

$^{+}$、ＵＴ　Ｔ細胞および腫瘍単独によって分泌されたＩＦＮ－γのレベルを示す。
【図８】ＵＴ　Ｔ細胞、またはＮＫＧ２Ｄ単独を発現するＴ細胞と比較した場合の、Ｎ１０１２を発現するＴ細胞が複数ラウンドの繰り返し刺激（「再刺激」）を受ける能力を示す。Ｎ１０１２を発現するＴ細胞は、中皮腫（Ｊｕ７７）細胞および頭頸部（ＨＮ３＿ＬＵＣ）細胞（図８Ａ）の両方の溶解を複数サイクルの刺激を通して仲介することが可能であり（図８Ｂ）、その間、実質的な増殖（図８Ｃ）およびＴ細胞の増殖倍率（ｆｏｌｄ　ｅｘｐａｎｓｉｏｎ）（図８Ｄ）を示す。図８Ｂおよび８Ｄもまた、Ｎ１０１２を発現するＴ細胞が繰り返しラウンドの刺激を受けることができることを示し、ＲｅｎまたはＢｘＰ３＿ＬＴ細胞と培養した場合に実質的な増殖を示す。対照的に、ＵＴ　Ｔ細胞またはＮＫＧ２Ｄ単独を発現するＴ細胞は、最小限の標的細胞の溶解または増殖を示す。
【図９】腫瘍保有マウスにおけるインビボ評価のための、ＣＡＲ　Ｔ細胞のレトロウイルス形質導入によるエンジニアリングを示す。図９Ａは、Ｎ１０１２またはＮＫＧ２Ｄのいずれかで形質導入した後の、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞におけるＮＫＧ２Ｄの細胞表面発現を示す。ｐａｎ－ＥｒｂＢ標的化ＣＡＲ、Ｔ４（Ｄａｖｉｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２、Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．１８：５６５－５７６によって記載）を発現する同一ドナー由来のＴ細胞を用いて比較を行なった。また、Ｔ４内に含まれる４αβドメインが欠失しておりＣＤ２８ヒンジもわずかに変更されている（ＭＹＰＰＰＹ配列が１０アミノ酸の線状ｍｙｃタグ配列で置き換えられている）第２のｐａｎ－ＥｒｂＢ標的化ＣＡＲ（ＴＭＹと指定される）も用いた。図９Ｂは、マウスへの養子移入後の示される腫瘍細胞株に対する、残りのＴ細胞のインビトロ細胞傷害性機能を示す。
【図１０】生物発光イメージング（ＢＬＩ）によって確認される、ＮＳＧマウスにおけるインビボでのｆｆＬＵＣタグ化ＢｘＰＣ３細胞の増殖を示す。マウスの各群からのプールされたＢＬＩ放出を図１０Ａに示す。個々のマウスからの連続的な生物発光放出を図１０Ｂに示す。マウスの体重を図１０Ｃに示す。８８日目の腫瘍再チャレンジ後の個々のマウスからの連続的な生物発光放出を図１０Ｄに示す。実験の生存曲線（１４５日後に終了した）を図１０Ｅに示す。
【図１１】生物発光イメージング（ＢＬＩ）によって確認される、ＮＳＧマウスにおけるインビボでのｆｆＬＵＣタグ化ＢｘＰＣ３細胞の増殖を示す別の実験の結果を示す。処置群あたりのＢＬＩ平均全光度（光子／秒）を図１１Ａに示し、個々のマウスあたりのＢＬＩ全光度（光子／秒）を図１１Ｂに示す。４１日目（Ｔ細胞インフュージョンの２９日後）に腫瘍のないマウスに、ｆｆＬＵＣタグ化ＢｘＰＣ３細胞を再チャレンジ（ｉ．ｐ．）した（点線として示す）。
【図１２】生物発光イメージング（ＢＬＩ）によって確認される、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞を用いた処置後のＮＳＧマウスにおけるインビボでのｆｆＬＵＣタグ化Ｈ２２６悪性中皮腫細胞の増殖を示す。処置群あたりのＢＬＩ平均全光度（光子／秒）を図１２Ａに示し、個々のマウスあたりのＢＬＩ全光度（光子／秒）を図１２Ｂに示す。Ｔ細胞持続性および機能維持を確認するために、全ての腫瘍のないマウスに、初回の腫瘍接種の９１日後、さらに１×１０^{6}個のｆｆＬＵＣタグ化Ｈ２２６細胞をｉ．ｐ．接種した（再チャレンジはグラフで点線として示される）。
【図１３】ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞において発現した場合のＮＫＧ２Ｄ、Ｎ１０１２およびＣＹＡＤ－０１の表面発現を示す。
【図１４】ＢｘＰＣ３－ＬＴ、ＲｅｎまたはＪｕ７７細胞と共培養した場合の、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞の再刺激（図１４Ａ）および増殖潜在性（図１４Ｂ）をＣＹＡＤ－０１　Ｔ細胞およびＮＫＧ２Ｄ　Ｔ細胞に対して比較する。
【図１５】図１５Ａは、Ｎ１０１２$^{+}$、ＣＹＡＤ－０１またはＵＴ　Ｔ細胞との共培養後の腫瘍スフェロイドの生存能力を示す。図１５Ｂは、腫瘍スフェロイドとの共培養中のＴ細胞の増殖レベルを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
ＤＡＰ１０ポリペプチドおよびその機能性変異体

本明細書中に記載の融合ポリペプチドにおいて用いられるＤＡＰ１０ポリペプチドは、哺乳類、例えばヒトであってよい。野生型ヒトＤＡＰ１０は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ９ＵＢＫ５（配列番号１）を有するアミノ酸配列によってコードされる。これは９３ａａポリペプチドである。最初の１８ａａはシグナル／リーダー配列であると考えられ、アミノ酸１９～４８は細胞外ドメイン、アミノ酸４９～６９は膜貫通ドメイン、アミノ酸７０～９３は細胞質／細胞内ドメインであると考えられる。

【００１９】

一実施態様では、本開示の融合ポリペプチドで用いられるＤＡＰ１０ポリペプチドは、配列番号１のＤＡＰ１０ポリペプチドに対して少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、本開示の融合ポリペプチドで用いられるＤＡＰ１０ポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸配列を含む。

【００２０】

別の実施態様では、本開示の融合ポリペプチドで用いられる機能性変異体ＤＡＰ１０ポリペプチドは、ＤＡＰ１０のアミノ酸（例えば野生型ヒトＤＡＰ１０（配列番号１）のアミノ酸）のいずれかのアミノ酸を付加、削除または置換する１つまたは複数の（すなわち１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多い）点突然変異を含んでよい。

【００２１】

ＤＡＰ１０ポリペプチドのトランケート型もまた、本開示の融合ポリペプチドにおいて用いられ得る。例えば、配列番号１のアミノ酸１９～９３のみを含むＤＡＰ１０のトランケート型（すなわちアミノ酸１～１８（シグナル／リーダー配列）が欠失している）を、本開示の融合ポリペプチドにおいて用いてよい。かかる配列は本明細書において配列番号２と呼ばれる。他のトランケート型は、配列番号１のアミノ酸１９～６９を含んでよく、そのような配列はＤＡＰ１０の細胞外および膜貫通ドメインのみを含み、本明細書において配列番号３と呼ばれる。本発明において用いられるＤＡＰ１０のさらなるトランケート型は、配列番号１のアミノ酸１～７１（すなわち、シグナル／リーダー配列、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および、細胞質／細胞内ドメインの２アミノ酸）を含んでよく、本明細書において配列番号４と呼ばれる。本発明において用いられるＤＡＰ１０のさらなるトランケート型は、配列番号１のアミノ酸１９～７１（すなわち、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および、細胞質／細胞内ドメインの２アミノ酸）を含んでよく、本明細書において配列番号５と呼ばれる。本発明において用いられるＤＡＰ１０のさらなるトランケート型は、配列番号１のアミノ酸７０～９３（すなわち細胞内ドメイン）を含んでよく、本明細書において配列番号６と呼ばれる。本発明において用いられるＤＡＰ１０のさらなるトランケート型は、配列番号１のアミノ酸４９～９３（すなわち膜貫通および細胞質／細胞内ドメイン）を含んでよく、本明細書において配列番号７と呼ばれる。本発明において用いられるＤＡＰ１０のさらなるトランケート型は、配列番号１のアミノ酸４９～６９（すなわち膜貫通ドメイン）を含んでよく、本明細書において配列番号８と呼ばれる。

【００２２】

ＤＡＰ１０ポリペプチドの他の突然変異型またはトランケート型もまた、本開示における使用に適切である。一部の実施態様では、本開示におけるＤＡＰ１０ポリペプチドの機能性変異体として用いられるそのような突然変異型またはトランケート型は、配列番号１に示される野生型ポリペプチドの活性を維持する。

【００２３】

一実施態様では、本開示のＤＡＰ１０ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号１に示される野生型ポリペプチドの活性の少なくとも１０％（例えば２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％またはそれよりも多く）を維持する。一実施態様では、活性は、ＤＡＰ１０のチロシンリン酸化および／またはホスファチジルイノシトール３－キナーゼのｐ８５サブユニットおよび下流の

抗アポトーシスキナーゼ（ＡＫＴ）の動員および活性化の評価によって測定され得る。

【００２４】

ＤＡＰ１２ポリペプチドおよびその機能性変異体

本明細書中に記載の融合ポリペプチドにおいて用いられるＤＡＰ１２ポリペプチドは、哺乳類、例えばヒトであってよい。野生型ヒトＤＡＰ１２は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｏ４３９１４（配列番号９）を有するアミノ酸配列によってコードされる。最初の２１アミノ酸はシグナル／リーダー配列であると考えられ、アミノ酸２２～４０は細胞外ドメイン、アミノ酸４１～６１は膜貫通ドメイン、アミノ酸６２～１１３は細胞質／細胞内ドメインであると考えられる。

【００２５】

一実施態様では、本開示の融合ポリペプチドにおいて用いられるＤＡＰ１２ポリペプチドは、配列番号９のＤＡＰ１２ポリペプチドに対して、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、本開示の融合ポリペプチドにおいて用いられるＤＡＰ１２ポリペプチドは、配列番号９のアミノ酸配列を含む。

【００２６】

別の実施態様では、本開示の融合ポリペプチドにおいて用いられる機能性変異体ＤＡＰ１２ポリペプチドは、ＤＡＰ１２のアミノ酸（例えば野生型ヒトＤＡＰ１２（配列番号９）のアミノ酸）のいずれかのアミノ酸を付加、削除または置換する１つまたは複数の（すなわち１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多い）点突然変異を含んでよい。

【００２７】

ＤＡＰ１２ポリペプチドのトランケート型もまた、本開示の融合ポリペプチドにおいて用いられ得る。例えば、配列番号９のアミノ酸２２～１１３のみを含むＤＡＰ１２のトランケート型（すなわちアミノ酸１～２１（シグナル／リーダー配列）が欠失している）を、本開示の融合ポリペプチドにおいて用いてよい。かかる配列は本明細書において配列番号１０と呼ばれる。他のトランケート型は、配列番号９のアミノ酸６２～１１３を含んでよく、そのような配列は、ＤＡＰ１２の細胞質／細胞内ドメインのみを含んでおり、本明細書において配列番号１１と呼ばれる。他のトランケート型は、配列番号９のアミノ酸４１～６１（すなわち膜貫通ドメイン）を含んでよく、本明細書において配列番号１２と呼ばれる。別のトランケート型は配列番号９のアミノ酸２２～６１（すなわち細胞外および膜貫通ドメイン）を含んでよく、本明細書において配列番号１３と呼ばれる。

【００２８】

ＤＡＰ１２ポリペプチドの他の突然変異型またはトランケート型もまた、本開示における使用に適切である。本開示におけるＤＡＰ１２ポリペプチドの機能性変異体として用いられる突然変異型またはトランケート型は、配列番号９に示される野生型ポリペプチドの活性を維持し得る。

【００２９】

一実施態様では、本開示のＤＡＰ１２ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号９に示される野生型ポリペプチドの活性の少なくとも１０％（例えば２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％またはそれよりも多く）を維持する。一実施態様では、活性は、ＭＴＴのような機能性アッセイを用いて、ＥＬＩＳＡによってサイトカイン分泌を測定することによって測定され得る。

【００３０】

本発明の融合ポリペプチドと会合するポリペプチド

本発明の融合ポリペプチドは、他のポリペプチドと会合し得る。かかる会合は、静電気力に起因し得る（例えば、相補的な荷電アミノ酸によって提供される）。

【００３１】

本発明の融合ポリペプチドと会合し得るそのようなポリペプチドの一例は、ＮＫＧ２Ｄ

ポリペプチドである（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１９２（７）：１０５９－１０６７およびＲｏｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００４，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１７３（４）：２４７０－２４７８）。

【００３２】

一実施態様では、かかるポリペプチドは、本開示の融合ポリペプチドをコードする遺伝子を有する連続するキメラ構築物の一部として遺伝学的にコードされ得る。融合ポリペプチドおよび他のポリペプチドは、それから、翻訳中に分離されてよく（例えばリボソームのスキップペプチドを用いる）、または翻訳後切断によって分離されてよい（例えばフューリン切断部位を用いる）。融合ポリペプチドおよび他のポリペプチドはしたがって、存在してよいリンカーによって連結され得る。そのようなリンカーは、切断を促進するための切断部位を含んでよい。

【００３３】

ＮＫＧ２Ｄポリペプチドおよびその機能性変異体

本明細書中に記載のキメラポリペプチドにおいて用いられるＮＫＧ２Ｄポリペプチドは、哺乳類、例えばヒトであってよい。野生型ヒトＮＫＧ２Ｄは、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ２６７１８（配列番号１４）を有するアミノ酸配列によってコードされる。ポリペプチドは、細胞質ドメイン（アミノ酸１～５１）、膜貫通ドメイン（アミノ酸５２～７２）および細胞外ドメイン（アミノ酸７３～２１６）を含むと考えられる。

【００３４】

一実施態様では、本開示において用いられるＮＫＧ２Ｄポリペプチドは、配列番号１４のＮＫＧ２Ｄポリペプチドに対して少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、本開示において用いられるＮＫＧ２Ｄポリペプチドは、配列番号１４のアミノ酸配列を含む。

【００３５】

別の実施態様では、本開示において用いられる機能性変異体ＮＫＧ２Ｄポリペプチドは、ＮＫＧ２Ｄのアミノ酸（例えば、野生型ヒトＮＫＧ２Ｄ（配列番号１４）のアミノ酸）のいずれかのアミノ酸を付加、削除または置換する１つまたは複数の（すなわち１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多い）点突然変異を含んでよい。

【００３６】

ＮＫＧ２Ｄポリペプチドのトランケート型もまた、本開示のポリペプチドにおいて用いられ得る。例えば、配列番号１４のアミノ酸７３～２１６のみを含むＮＫＧ２Ｄのトランケート型（すなわち細胞外ドメイン）を本開示において用いてよい。かかる配列は本明細書において配列番号１５と呼ばれる。他のトランケート型は、配列番号１４のアミノ酸８２～２１６を含んでよく、そのような配列は、ＮＫＧ２Ｄの細胞外ドメインの部分を含んでおり、本明細書において配列番号１６と呼ばれる。さらなるトランケート型は、配列番号１４のアミノ酸５２～２１６（すなわち膜貫通および細胞外ドメイン）を含み、本明細書において配列番号１７と呼ばれる。

【００３７】

ＮＫＧ２Ｄポリペプチドの他の突然変異型またはトランケート型もまた、本開示において用いるのに有用である。もちろん、本開示におけるＮＫＧ２Ｄポリペプチドの機能性変異体として用いられる任意のそのような突然変異型またはトランケート型は、配列番号１４に示される野生型ポリペプチドの活性を好ましくは維持するべきである。

【００３８】

一実施態様では、本開示のＮＫＧ２Ｄポリペプチドの機能性変異体は、配列番号１４に示される野生型ポリペプチドの活性の少なくとも１０％（例えば２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％またはそれよりも多く）を維持する。一実施態様では、活性は、ＮＫＧ２Ｄリガンドに対する継続的な結合を確認するためのフローサイトメトリーを用いて、標的細胞溶解、サイトカイン分泌および共刺激を確認することを目的とする様々な細胞培養アッセイ（例えばＭＴＴお

よびＥＬＩＳＡ）によって、測定され得る。
【００３９】
リンカー
本開示に記載されるＤＡＰ１０およびＤＡＰ１２部分は、連続するポリペプチド鎖において互いに直接的に結合してよく、または、適切なリンカーを介して互いに間接的に結合してよい。リンカーはペプチドリンカーであってよい。ペプチドリンカーは融合ポリペプチドにおいて一般に用いられ、リンカーを選択または設計する方法はよく知られている（例えば、ＣｈｅｎＸ ｅｔ ａｌ．，２０１３，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．６５（１０）：１３５７０１３６９およびＷｒｉｇｇｅｒｓ Ｗ ｅｔ ａｌ．，２００５，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ８０：７３６－７４６を参照）。リンカーは、本開示の融合ポリペプチドを上述のキメラ構築物内の別のポリペプチド（例えばＮＫＧ２Ｄポリペプチド）に連結するために用いてもよい。
【００４０】
ペプチドリンカーは一般に、ｉ）フレキシブルリンカー、ｉｉ）ヘリックス形成リンカー、およびｉｉｉ）切断可能なリンカーに分類され、それぞれのタイプの例は当技術分野で知られている。１つの例では、フレキシブルリンカーは、本明細書中に記載の融合ポリペプチドに含められる。フレキシブルリンカーは、立体障害のないアミノ酸の大多数、例えばグリシンおよびアラニンを含んでよい。親水性アミノ酸Ｓｅｒもまた、フレキシブルリンカーにおいて慣習的に用いられる。フレキシブルリンカーの例は、制限されないが：ポリグリシン（例えば、$(Gly)_4$および$(Gly)_5$）、ポリアラニンポリ（Ｇｌｙ－Ａｌａ）、およびポリ（Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）（例えば、$(Gly_n-Ser_n)_n$または$(Ser_n-Gly_n)_n$を含み、各ｎは独立に、１以上の整数である）。
【００４１】
ペプチドリンカーは適切な長さであってよい。ペプチドリンカー配列は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、またはそれよりも多くのアミノ酸残基の長さであってよい。例えば、ペプチドリンカーは、約５～約５０アミノ酸長；約１０～約４０アミノ酸長；約１５～約３０アミノ酸長；または約１５～約２０アミノ酸長であってよい。ペプチドリンカーの長さの変動は、活性を維持または強化し得て、活性試験において優れた有効性を生じさせる。ペプチドリンカー配列は、天然または非天然起源アミノ酸からなってよく、または、天然および非天然起源アミノ酸の両方の混合からなってよい。
【００４２】
いくつかの態様では、アミノ酸グリシンおよびセリンは、リンカー配列内のアミノ酸を含む。特定の態様では、リンカー領域は、グリシンのリピート$(GSG_3)_n$（配列番号１８）のセットを含み、式中ｎは、１以上の正の整数である（例えば１～約２０）。より具体的には、リンカー配列はＧＳＧＧＧ（配列番号１９）であってよい。リンカー配列はＧＳＧＧ（配列番号２０）であってよい。特定の他の態様では、リンカー領域の方向（ｏｒｉｅｎｔａｔｉｏｎ）は、グリシンのリピート$(SerGly_3)_n$のセットを含み、式中ｎは１以上の正の整数である（例えば１～約２０）（配列番号２１）。
【００４３】
他の実施態様では、リンカーは、グリシン（Ｇ）およびセリン（Ｓ）をランダムまたは繰り返しのパターンで含んでよい。例えば、リンカーは$(GGGGS)_n$（配列番号２２）であってよく、式中ｎは１～２０、例えば１～４の範囲の整数である。特定の例では、ｎは４であり、リンカーはＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２３）である。別の特定の例では、ｎは３であり、リンカーはＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２４）である。
【００４４】
他の実施態様では、リンカーは、グリシン（Ｇ）、セリン（Ｓ）およびプロリン（Ｐ）をランダムまたは繰り返しのパターンで含んでよい。例えば、リンカーは（ＧＰＰＧＳ）

ｎであってよく、式中ｎは１～２０、例えば１～４の範囲の整数である。特定の一例では、ｎは１であり、リンカーはＧＰＰＧＳ（配列番号２５）である。

【００４５】

一般に、リンカーは、ヒトのような患者において投与した場合に免疫原性ではない。したがって、リンカーは、免疫原性が低いように、または免疫原性が低いと考えられるように、選択され得る。

【００４６】

本明細書中に記載のリンカーは例示的であり、リンカーは、ＧｌｕおよびＬｙｓなどの他のアミノ酸を必要に応じて含むことができる。ペプチドリンカーは、複数リピートの、例えば、（$Ｇ_{3}Ｓ$）（配列番号２６）、（$Ｇ_{4}Ｓ$）（配列番号２７）、（ＧＹＳ）（配列番号２８）、および／または（ＧｌｙＳｅｒ）（配列番号２９）を、必要に応じて含んでよい。特定の態様では、ペプチドリンカーは、複数リピートの、例えば、（$ＳＧ_{4}$）（配列番号３０）、（$ＳＧ_{3}$）（配列番号３１）、（$ＳＧ_{2}$）（配列番号３２）、$（ＳＧ）_{2}$（配列番号３３）または（ＳｅｒＧｌｙ）（配列番号３４）を含んでよい。

【００４７】

他の態様では、ペプチドリンカーは、組み合わせおよび複数の繰り返しのアミノ酸配列ユニット、例えば、（$Ｇ_{3}Ｓ$）＋（$Ｇ_{4}Ｓ$）＋（ＧｌｙＳｅｒ）（配列番号２６＋配列番号２７＋配列番号２９）を含んでよい。他の態様では、ＳｅｒをＡｌａで置換することができ、例えば、（$Ｇ_{4}Ａ$）（配列番号３５）または（$Ｇ_{3}Ａ$）（配列番号３６）である。さらに他の態様では、リンカーは、モチーフ$（ＥＡＡＡＫ）_{n}$を含み、式中ｎは１以上の正の整数、例えば１～約２０である（配列番号３７）。特定の態様では、ペプチドリンカーは、切断可能なリンカーを含んでもよい。

【００４８】

リンカーは、さらなるドメインおよび／または特徴、例えば、フューリン切断部位（ＲＲＫＲ）（配列番号３８）、Ｐ２Ａリボソームのスキップペプチド（ＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ）（配列番号３９）および／またはＴ２Ａリボソームのスキップペプチド（ＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ）（配列番号４０）を含んでよい。これらのドメインを含むリンカーの例は、ＳＧＳＧ＋Ｐ２Ａリボソームのスキップペプチド（ＳＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ）（配列番号４１）、ＳＧＳＧ＋Ｔ２Ａリボソームのスキップペプチド（ＳＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ）（配列番号４２）、ならびに、フューリン切断部位も含むバージョン、すなわちフューリン切断部位＋ＳＧＳＧ＋Ｐ２Ａリボソームのスキップペプチド（ＲＲＫＲＳＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ）（配列番号４３）およびフューリン切断部位＋ＳＧＳＧ＋Ｔ２Ａリボソームのスキップペプチド（ＲＲＫＲＳＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ）（配列番号４４）を含む。本発明において用いられ得る代替のリボソームのスキップペプチドは、Ｆ２Ａ（ＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ）（配列番号４５）およびＥ２Ａ（ＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ）（配列番号４６）を含む。

【００４９】

<u>Ｎ末端配列およびＣ末端配列</u>

様々な配列を、本開示の融合ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に、または本明細書中に開示されるＮＫＧ２Ｄポリペプチドに付けてよい。これらは機能性、例えば、シグナルペプチ、精製タグ／配列、または半減期延長部分であってよく、または、スペーサー配列を単に含んでよい。あるいは、それらは、Ｔ細胞刺激機能のような機能を含んでよい。

【００５０】

精製タグおよびマーカー

精製を助けるために、様々なタグまたはマーカーを本開示の融合ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に付けてよい。任意の親和性タグを本開示の融合ポリペプチドと組み合わせて精製を助けてよい。かかる親和性タグの例は、Ｈｉｓタグ、ＦＬＡＧタグ、Ａｒｇタグ、Ｔ７タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、Ｓタグ、アプタマータグ、Ｖ５タグ、ＡｖｉＴａｇ（商標

）、ｍｙｃエピトープタグまたはこれらのタグの任意の組み合わせである。一実施態様では、親和性タグは、Ｈｉｓタグ（通常５～１０個のヒスチジン残基を含む）、例えば、６Ｈｉｓタグ（すなわちＨＨＨＨＨＨ）（配列番号４７）である。別の実施態様では、親和性タグは、ＦＬＡＧタグ（すなわちＤＹＫＤＤＤＤＫ）（配列番号４８）である。別の実施態様では、親和性タグは、ＡｖｉＴａｇ（商標）（すなわちＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ）（配列番号４９）である。別の実施態様では、親和性タグは、Ｖ５タグ（ＧＫＰＩＰＮＰＬＬＧＬＤＳＴ）（配列番号５０）または（ＩＰＮＰＬＬＧＬＤ）（配列番号５１）である。別の実施態様では、親和性タグは、９ｅ１０抗体によって認識されるｍｙｃエピトープタグである（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ）（配列番号５２）。本開示における使用のための様々な他のタグが当技術分野でよく知られている。

【００５１】

Ｎ末端に１つまたは複数のタグを含む、Ｃ末端に１つまたは複数のタグを含む、または、Ｎ末端およびＣ末端のそれぞれに１つまたは複数のタグを含む、親和性タグの組み合わせを用いてもよい。そのような組み合わせの例は、ＡｖｉＴａｇ（Ａ）と組み合わせたＨｉｓタグ（Ｈ）、または、ＡｖｉＴａｇ（Ａ）およびＦＬＡＧタグ（Ｆ）の両方と組み合わせたＨｉｓタグ（Ｈ）を含む。タグはいずれかの方向であってよく、したがって、ＡｖｉＴａｇ／Ｈｉｓタグは、Ｎ－ＡＨ－ＣまたはＮ－ＨＡ－Ｃの方向を有してよく、Ａｖｉ／Ｈｉｓ／ＦＬＡＧタグは、Ｎ－ＡＨＦ－Ｃ、Ｎ－ＦＨＡ－Ｃなどの方向を有してよい。

【００５２】

一実施態様では、本開示に係る融合ポリペプチドは、配列「ＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥＧＧＨＨＨＨＨＨＤＹＫＤＤＤＤＫ」（配列番号５３）を有する「ＡＨＦ」タグを含む。別の実施態様では、本開示に係る融合ポリペプチドは、配列「ＤＹＫＤＤＤＤＫＨＨＨＨＨＧＧＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ」（配列番号５４）を有する「ＦＨＡ」タグを含む。

【００５３】

ＣＤ８αリーダー配列（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ０１７３２のアミノ酸１～２１、または、アミノ酸１～１８を含む短縮された誘導体）は、一般に用いられるＴ細胞配列であり、本明細書において配列番号５５と呼ばれる。

【００５４】

共刺激配列

様々なＴ細胞共刺激活性化配列が、ＣＡＲ－Ｔ細胞をエンジニアリングするための以前の研究から知られている。これらもまた、本開示の融合ポリペプチドに加えられ得る。

【００５５】

４－１ＢＢエンドドメイン（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｑ０７０１１のアミノ酸２１４～２５５）もまた、Ｎ末端またはＣ末端配列として用いられ得る。４－１ＢＢエンドドメインは本明細書において配列番号５６と呼ばれる。４－１ＢＢエンドドメインは共刺激ドメインとして作用し得る。

【００５６】

ＣＤ２７エンドドメイン（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ２６８４２のアミノ酸２１３～２６０）もまた、Ｎ末端またはＣ末端配列として用いられ得る。ＣＤ２７エンドドメインは本明細書において配列番号５７と呼ばれる。ＣＤ２７エンドドメインは共刺激ドメインとして作用し得る。

【００５７】

ヒトＩｇＧ１ヒンジ（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ０ＤＯＸ５のアミノ酸２１８～２２９）もまた、Ｎ末端またはＣ末端配列として用いられ得る。ヒトＩｇＧ１ヒンジは配列番号５８と呼ばれる。

【００５８】

トランケート型ＣＤ８αヒンジ（Ｕｎｉｐｒｏｔ：Ｐ０１７３２のアミノ酸１３８～１８２）もまた、Ｎ末端またはＣ末端配列として用いられ得る。トランケート型ＣＤ８ａヒンジは配列番号５９と呼ばれる。

【００５９】

例示的な構築物

本開示は、表１における以下の例示的な融合ポリペプチド構築物を提供する。

【００６０】

表１：例示的なＤＡＰ１０／ＤＡＰ１２融合ポリペプチド構築物

名称	配列
DAP10（全配列– aa1-93)-DAP12 エンドドメイン(aa62-113)（配列番号 60)	MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP LLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYF LGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP YYK
CD8αリーダー-FLAG-DAP10（細胞外およびTM – aa19-69)-DAP12 エンドドメイン(aa62-113)（配列番号 61)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKQTTPGERSSLPAFYPGTS GSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFYFLGRLVPRGRGAA EAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK
CD8αリーダー–FLAG–ヒト IgG1 ヒンジ(aa 218-229 Uniprot ref P0DOX5)–DAP10（TMおよびエンドドメイン aa 49-93)–DAP12 エンドドメイン(aa 62-113)（配列番号 62)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKEPKSCDKTHTCPLLAGL VAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYFLGRLV PRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK
CD8αリーダー–トランケート型 CD8a ヒンジ(aa 138-182 Uniprot 参照 P01732)–DAP10（TMおよびエンドドメイン-aa 49-93)–DAP12 エンドドメイン(aa 62-113)（配列番号 63)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLLAGLVAADAVASLLIVGAV FLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQ RITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK

【００６１】

さらに、上述したように、本開示の融合ポリペプチドは、翻訳関連または翻訳後の切断のために、ＮＫＧ２Ｄポリペプチドを有する単一のキメラ構築物として発現され得る。かかる構築物において、発現の後に、翻訳されたポリペプチドは切断されて別個のポリペプチドが生じ、それから、自己会合してＣＡＲを形成する。一実施態様では、本開示の融合ポリペプチドは、ＮＫＧ２Ｄポリペプチドから切断される。かかる構築物の例を表２に示す。

【００６２】

表２：例示的なキメラ構築物

名称	配列
DAP10 (aa1-93)-DAP12 エンドドメイン(aa62-113)-フューリン切断-リンカー-P2A-NKG2D (aa1-216) (構築物 1) (配列番号 64) (N1012)	MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLA GLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYFLGRLVP RGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKRRKRS GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLK KSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAVAMGIRFIIMVAIWSA VFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQA SCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSI LSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV
CD8αリーダー-FLAG-DAP10 (aa19-69)-DAP12 (aa62-113)-フューリン切断-リンカー-T2A-DAP10 (aa1-93)-フューリン切断-リンカー-P2A- NKG2D (aa1-216) (構築物 3) (配列番号 65)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKQTTPGERSSLPAFYPGTS GSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFYFLGRLVPRGRGAA EAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKRRKRSGSGE GRGSLLTCGDVEENPGPMIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPA FYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSP AQEDGKVYINMPGRGRRKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGW IRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRE NASPFFFCCFIAVAMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCG PCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKED QDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGD CALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV
DAP10 (aa1-93)-DAP12 エンドドメイン(aa62-113)- フューリン切断-リンカー-P2A-NKG2D (aa1-216)-フューリン切断-リンカー-T2A-DAP10 (aa1-71)-4-1BB エンドドメイン(aa214-255) (構築物 8) (配列番号 66)	MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP LLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYF LGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP YYKRRKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGWIRGRRSRHSWEM SEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAV AMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKN NCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYI ENCSTPNTYICMQRTVRRKRSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMIHL GHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAG LVAADAVASLLIVGAVFLCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCEL

DAP10 (aa1-93)-DAP12 エンドドメイン(aa62-113)-フューリン切断-リンカー-P2A-NKG2D (aa1-216)-フューリン切断-リンカー-T2A-CD8α リーダー (aa1-21)-FLAG-DAP10 (aa19-71)-4-1BB エンドドメイン(aa214-255) (構築物9) (配列番号 67)	MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP LLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYF LGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP YYKRRKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGWIRGRRSRHSWEM SEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAV AMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKN NCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYI ENCSTPNTYICMQRTVRRKRSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMALP VTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCS GCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
DAP10 (aa1-93)-DAP12 エンドドメイン(aa62-113)-フューリン切断-リンカー-P2A-NKG2D (aa1-216)-フューリン切断-リンカー-T2A-DAP10 (aa1-71)-CD27 エンドドメイン(aa213-260) (構築物 10) (配列番号 68)	MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP LLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYF LGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP YYKRRKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGWIRGRRSRHSWEM SEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAV AMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKN NCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYI ENCSTPNTYICMQRTVRRKRSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMIHL GHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAG LVAADAVASLLIVGAVFLCQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREE EGSTIPIQEDYRKPEPACSP
DAP10 (aa1-93)-DAP12 エンドドメイン(aa62-113)-フューリン切断-リンカー-P2A-NKG2D (aa1-216)-フューリン切断-リンカー-T2A-CD8α リーダー (aa1-21)-FLAG-DAP10 (aa19-71)-CD27 エンドドメイン(aa213-260) (構築物 11) (配列番号 69)	MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP LLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYF LGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP YYKRRKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGWIRGRRSRHSWEM SEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAV AMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKN NCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYI ENCSTPNTYICMQRTVRRKRSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMALP VTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCS GCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCQRRKYRSNKGESPVEP AEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

【００６３】

本開示の融合ポリペプチドをコードする核酸分子

本開示の別の態様は、本開示の融合ポリペプチドまたはキメラ構築物をコードする核酸分子に関する。これはＤＮＡまたはＲＮＡとしてであってよい。本明細書において特に制限されない限り、その用語は、参照核酸と同様の特性を有しており天然起源ヌクレオチドと同様の様式で代謝される天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。かかる類似体の例は、制限されずに、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、メチルホスホネート、キラル－メチルリン酸塩、２－Ｏ－メチルリボヌクレオチド、ペプチド－核酸（ＰＮＡ）を含む。別段の指示がない限り、特定の核酸配列は黙示的に、保守的に改変さ

れたその変異体（例えば縮重コドン置換）および相補配列、ならびに、明確に示される配列も包含する。特に、以下に詳述するように、縮重コドン置換は、１つまたは複数の選択される（または全ての）コドンの３番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を作製することによって達成され得る（Ｂａｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９：５０８１；Ｏｈｔｓｕｋａ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０：２６０５－２６０８；およびＲｏｓｓｏｌｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ ８：９１－９８）。

【００６４】

したがって、本開示はまた、配列番号６０～６９のいずれか１つまたは複数のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸も提供する。

【００６５】

本開示はさらに、配列番号６０～６９のいずれかをコードする核酸と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％または少なくとも約９９％配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。配列同一性は典型的に、参照配列の全長に沿って測定される。

【００６６】

本開示はさらに、配列番号７０～７９のいずれか１つと少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％または少なくとも約９９％配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

【００６７】

本開示はまた、配列番号７０～７９のいずれか１つのヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本開示はまた、配列番号７０～７９のいずれか１つのヌクレオチド配列からなる核酸を提供する。

【００６８】

ポリヌクレオチド配列は、デノボ固相ＤＮＡ合成によって、または、既存配列（例えば以下の実施例に記載の配列）のＰＣＲ突然変異誘発によって、産生され得る。核酸の直接的な化学合成は、当技術分野で知られている方法、例えば、Ｎａｒａｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９７９，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．６８：９０のホスホトリエステル方法；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，１９７９，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．６８：１０９のホスホジエステル方法；Ｂｅａｕｃａｇｅ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｔｅｔｒａ．Ｌｅｔｔ．，２２：１８５９のジエチルホスホラミダイト方法；および、米国特許第４，４５８，０６６号の固体支持体方法によって達成され得る。ＰＣＲによってポリヌクレオチド配列に突然変異を導入することは、例えば、ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｈ．Ａ．Ｅｒｌｉｃｈ（Ｅｄ．），Ｆｒｅｅｍａｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，Ｎ．Ｙ．，１９９２；ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｉｎｎｉｓ ｅｔ ａｌ．（Ｅｄ．），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ，１９９０；Ｍａｔｔｉｌａ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：９６７；およびＥｃｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，１９９１，ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ １：１７に記載されるとおりに行なうことができる。

【００６９】

ベクター

本開示はまた、本開示の１つまたは複数の核酸分子を含むベクターも提供する。

【００７０】

宿主細胞における発現のために、融合ポリペプチドをコードする核酸は適切なベクター内に存在し得て、適切な宿主への導入後、当技術分野で知られている標準的なクローニング技術および発現技術に従って、配列が発現されて、コードされる融合ポリペプチドが生産され得る（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｈ，Ｅ．Ｆ．，ａｎｄ Ｍａ

ｎｉａｔｉｓ，Ｔ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ２ｎｄ，ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９に記載される）。本開示はまた、本開示に係る核酸配列を含むベクターにも関する。

【００７１】

様々な発現ベクターを用いて、本開示の融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現することができる。ウイルス系および非ウイルス発現ベクターの両方とも、宿主細胞、例えば哺乳類宿主細胞において融合ポリペプチドを生産するために用いることができる。非ウイルスベクターおよびシステムは、プラスミド、エピソームベクター（典型的にタンパク質またはＲＮＡを発現するための発現カセットを含む）、およびヒト人工染色体を含む（例えば、Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．１５：３４５を参照）。例えば、哺乳類（例えば、ヒト）細胞における本開示の融合ポリペプチドのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に有用な非ウイルスベクターは、ｐＴｈｉｏＨｉｓ Ａ、ＢおよびＣ、ｐｃＤＮＡ３．１／Ｈｉｓ、ｐＥＢＶＨｉｓ Ａ、ＢおよびＣ、（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）、ＭＰＳ Ｖベクター、および、他のタンパク質を発現するために当技術分野で知られている非常に多くの他のベクターを含む。有用なウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスに基づくベクター、ＳＶ４０、乳頭腫ウイルス、ＨＢＰエプスタイン・バーウイルス、ワクシニアウイルスベクターおよびセムリキ森林ウイルス（ＳＦＶ）に基づくベクターを含む。Ｂｒｅｎｔら、上記；Ｓｍｉｔｈ，１９９５，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４９：８０７；およびＲｏｓｅｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｃｅｌｌ ６８：１４３を参照。特に、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスベクターが、Ｔ細胞における発現に一般に用いられている。かかるベクターの例は、ＳＦＧレトロウイルス発現ベクターを含む（Ｒｉｖｉｅｒｅ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９２：６７３３－６７３７を参照）。一実施態様では、レンチウイルスベクターが用いられ、これらには、自己不活化レンチウイルスベクター（いわゆるＳＩＮベクター）が含まれる。

【００７２】

発現ベクターの選択は、ベクターが発現される意図される宿主細胞に依存する。哺乳類宿主細胞のための発現ベクターは、発現制御配列、例えば、複製起点、プロモーター、およびエンハンサー（例えば、Ｑｕｅｅｎ，ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．８９：４９－６８を参照）、必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結因子配列を含むことができる。これらの発現ベクターは通常、哺乳類の遺伝子由来または哺乳類のウイルス由来のプロモーターを含む。適切なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、段階特異的、および／または、調整可能または調節可能であってよい。有用なプロモーターは、限定されないが、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性ＭＭＴＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＭＲＰ ｐｏｌＩＩＩプロモーター、構成的ＭＰＳ Ｖプロモーター、テトラサイクリン誘導性ＣＭＶプロモーター（例えばヒト即時－初期ＣＭＶプロモーター）、構成的ＣＭＶプロモーター、ＥＦ１αプロモーター、ホスホグリセレートキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターおよび当技術分野で知られているプロモーター－エンハンサー組み合わせを含む。

【００７３】

形質転換生物の培養は、発現産物が宿主細胞によってより良好に認容されるコード配列に関する集団に偏ることなく、非誘導条件下で拡大することができる。プロモーターに加えて、他の調節エレメントもまた、本開示の抗体またはそのフラグメントの効率的な発現に必要または所望であり得る。これらのエレメントは典型的に、ＡＴＧ開始コドンおよび隣接リボソーム結合部位または他の配列を含む。さらに、発現効率は、使用する細胞系に

適切なエンハンサーを含めることによって増強され得る（例えば、Ｓｃｈａｒｆ　ｅｔａｌ．，１９９４，Ｒｅｓｕｌｔｓ　Ｐｒｏｂｌ．Ｃｅｌｌ　Ｄｉｆｆｅｒ．２０：１２５；およびＢｉｔｔｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５３：５１６を参照）。例えば、ＳＶ４０エンハンサーまたはＣＭＶエンハンサーを用いて、哺乳類宿主細胞における発現を増大させ得る。

【００７４】

本開示は、配列番号６０～６９のいずれかをコードする核酸と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％または少なくとも約９９％配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を含むクローニングベクターまたは発現ベクターを提供する。さらに、本開示は、配列番号６０～６９の１つまたは複数をコードする核酸を含むクローニングベクターまたは発現ベクターを提供する。本開示は、配列番号７０～７９のいずれか１つの核酸配列を含むクローニングベクターまたは発現ベクターを提供する。

【００７５】

宿主細胞

本開示のポリペプチド、本開示の核酸、本開示のベクター、またはそれらのいずれかまたは両方の組み合わせを含む宿主細胞が提供される。かかる細胞は一般に、本開示にかかる融合ポリペプチドの発現のために使用される。

【００７６】

核酸またはベクターは、標準的な技術によって宿主細胞内にトランスフェクトされ得る。

【００７７】

用語「トランスフェクション」の様々な形は、原核生物または真核生物の宿主細胞への外因性ＤＮＡの導入のために一般に用いられる多種多様の技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラントランスフェクションなどを含むことを意図する。

【００７８】

あるいは、核酸またはベクターは、形質導入によって宿主細胞内に送達され得る。例えば、上記に開示されるウイルスベクターは、核酸またはベクターの送達のために用いられ得る。

【００７９】

本開示の融合ポリペプチドを原核生物または真核生物の宿主細胞内で発現することが可能である。代表的な宿主細胞は、多くの大腸菌株、哺乳類細胞株、例えば、ＣＨＯ、ＣＨＯ－Ｋ１、およびＨＥＫ２９３；昆虫細胞、例えばＳｆ９細胞；および酵母細胞、例えばＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅおよびＰ．ｐａｓｔｏｒｉｓを含む。一実施態様では、宿主細胞は、免疫応答性細胞、例えば、ＮＫ細胞（初代ＮＫ細胞、またはＮＫ細胞株）またはＴ細胞（初代Ｔ細胞、またはＴ細胞株）である。他のタイプの宿主細胞は、マクロファージ、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、好中球およびインバリアントＮＫＴ（ｉＮＫＴ）細胞を含む。Ｔ細胞は、$CD4^+$または$CD8^+$Ｔ細胞であってよい。一実施態様では、宿主細胞はヒト細胞である。一実施態様では、宿主細胞はヒトＴ細胞である。別の実施態様では、宿主細胞は初代ヒトＴ細胞である。用いられ得る細胞株はＮＫ細胞株ＮＫ－９２を含む。

【００８０】

本開示の融合ポリペプチドを発現するための哺乳類宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（ＤＨ　ＦＲ選択可能マーカー（例えば、Ｒ．Ｊ．Ｋａｕｆｍａｎ　ａｎｄ　Ｐ．Ａ．Ｓｈａｒｐ，１９８２，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５９：６０１－６２１に記載される）とともに用いられるｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞（Ｕｒｌａｕｂ　ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，１９８０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：４２１６－４２２０に記載される）を含む）、ＮＳＯ骨髄腫細胞、ＣＯＳ細胞およびＳＰ２細胞を含む。一実施態様では、宿主細胞はＣＨＯ　Ｋ１ＰＤ細胞である。別の実施態様では、宿主

細胞はＮＳＯ１細胞である。特に、ＮＳＯ骨髄腫細胞との使用には、別の発現系は、ＷＯ８７／０４４６２、ＷＯ８９／０１０３６およびＥＰ３３８，８４１に示されるＧＳ遺伝子発現系である。融合ポリペプチドをコードする組み換え発現ベクターが哺乳類宿主細胞内に導入されると、融合ポリペプチドは、宿主細胞における融合ポリペプチドの発現または宿主細胞を増殖した培養培地中への融合ポリペプチドの分泌を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって生産され得る。融合ポリペプチドは、標準的なタンパク質精製方法を用いて培養培地から回収することができる。

【００８１】

生産方法

本開示はまた、本開示の融合ポリペプチドを含む免疫応答性細胞を生産する方法を提供する。そのような方法は、本開示の融合ポリペプチドをコードする核酸またはベクターを用いて細胞を形質導入するステップを含んでよい。その方法は、融合ポリペプチドが発現されてＮＫＧ２Ｄポリペプチドと会合してＣＡＲを形成するように細胞を培養するステップをさらに含んでよい。

【００８２】

一実施態様では、本開示は、（ｉ）本開示の融合ポリペプチドをコードする核酸またはベクターを免疫応答性細胞内に形質導入するステップ、および（ｉｉ）融合ポリペプチドが発現されてＮＫＧ２Ｄポリペプチドと会合してＣＡＲを形成するように免疫応答性細胞を培養するステップを含む、免疫応答性細胞を調製する方法を提供する。

【００８３】

さらなる一実施態様では、本開示は、（ｉ）患者からＴ細胞および／またはＮＫ細胞を取得するステップ、（ｉｉ）本開示の融合ポリペプチドをコードする核酸またはベクターをＴ細胞および／またはＮＫ細胞内に形質導入するステップ、および（ｉｉｉ）融合ポリペプチドが発現されてＮＫＧ２Ｄポリペプチドと会合してＣＡＲを形成するようにＴ細胞および／またはＮＫ細胞を培養するステップを含む方法を提供する。

【００８４】

免疫応答性細胞の培養のための様々な方法が当技術分野でよく知られている。例えば、Ｐａｒｅｎｔｅ－Ｐｅｒｅｉｒａ ＡＣ ｅｔ ａｌ．２０１４，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ１（２）：ｅ７，Ｇｈａｓｓｅｍｉ Ｓ ｅｔ ａｌ．２０１８，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｓ６（９）：１１００－１１０９、およびＤｅｎｍａｎ ＣＪ ｅｔ ａｌ．２０１２，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ７（１）：ｅ３０２６４を参照。

【００８５】

組成物

本開示はまた、本明細書中に記載の融合ポリペプチド、核酸、ベクターまたは宿主細胞を含む医薬組成物を提供する。かかる医薬組成物は、薬学的または生理的に許容できる希釈剤および／または担体を含むことができる。担体は一般に、意図される投与モードに適切であるように選択され、組成物のｐＨ、モル浸透圧濃度、粘性、透明性、色、等張性、匂い、無菌状態、安定性、溶解または放出の速度、吸着、または透過性などを改変する、維持する、または保存するための薬剤を含むことができる。典型的に、これらの担体は、水性またはアルコール性／水性の溶液、エマルションまたは懸濁液を含み、生理食塩水および／または緩衝化培地を含む。

【００８６】

医薬組成物内に包含させるのに適切な薬剤は、限定されないが、アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム）、バッファー（例えば、ホウ酸、バイカーボネート、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、クエン酸、リン酸、または他の有機酸）、充填剤（例えばマンニトールまたはグリシン）、キレート剤（例えばエチレンジアミンエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ））、錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、β－シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン）、充填剤、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マ

ンノース、またはデキストリン）、タンパク質（例えば、遊離血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色料、香料および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えばポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えばナトリウム）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール類（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック；ＰＥＧ；ソルビタンエステル；ポリソルベート、例えば、ポリソルベート２０またはポリソルベート８０；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロールまたはチロキサポール（ｔｙｌｏｘａｐａｌ））、安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）、浸透圧増強剤（例えば、ハロゲン化アルカリ金属、例えば、塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、またはマンニトールソルビトール）、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または製剤アジュバントを含む。

【００８７】

非経口ビヒクルは、食塩水、リンガーブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウムおよび乳酸リンガーを含む。適切な生理的に許容できる増粘剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチンおよびアルギン酸塩を含んでもよい。静脈内ビヒクルは、流体および栄養補充および電解質補充、例えばリンガーブドウ糖に基づくものを含む。場合によっては、組成物の浸透圧を調節するための薬剤、例えば、糖類、ポリアルコール類、例えば、マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを医薬組成物中に含んでよい。例えば、多くの場合において、組成物は実質的に等張であることが望ましい。保存剤および他の添加剤、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスが存在してもよい。正確な製剤化は投与ルートに依存する。医薬製剤に関するさらなる関連のある原理、方法および構成要素はよく知られている（例えば、Ａｌｌｅｎ，Ｌｏｙｄ Ｖ．Ｅｄ，（２０１２）Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，２２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎを参照）。

【００８８】

本開示の医薬組成物は、当技術分野で知られている様々な方法の１つまたは複数を用いて１つまたは複数の投与経路によって投与され得る。当業者によって理解されるように、投与の経路および／またはモードは、所望の結果に応じて異なる。本開示の医薬組成物のための投与経路は、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊椎または他の非経口の投与経路、例えば、注入またはインフュージョンによるものを含む。本明細書において用いられる語句「非経口投与」は、腸内および局所投与以外の投与モードを意味し、通常は注入によるものであり、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、硬膜外および胸骨内の注入およびインフュージョンを含む。一実施態様では、医薬組成物は腫瘍内に投与される。非経口投与を試みる場合、医薬組成物は通常、滅菌された発熱物質フリーの、非経口的に許容できる組成物の形態である。非経口注入に特に適切なビヒクルは、適切に保存された滅菌等張溶液である。医薬組成物は、凍結乾燥物、例えば凍結乾燥されたケークの形態であってよい。

【００８９】

あるいは、本明細書中に記載の医薬組成物は、非経口的でない経路によって、例えば、局所、上皮または粘膜の投与経路、例えば、鼻腔内、経口、経膣的、直腸、舌下または局所的に投与され得る。

【００９０】

ある特定の実施態様では、医薬組成物は皮下投与のためのものである。ポリペプチド治療薬（例えば、抗体、融合ポリペプチドなど）の皮下投与のための適切な製剤の成分および方法は当技術分野で知られており、例えば、ＵＳ２０１１／００４４９７７、ＵＳ８４６５７３９およびＵＳ８４７６２３９を参照。典型的に、皮下投与のための医薬組成物は

、適切な安定剤（例えば、メチオニンなどのアミノ酸、およびまたは、スクロースなどの糖類）、緩衝剤および強壮剤を含む。

【００９１】

典型的に、細胞療法では、宿主細胞を含む組成物が静脈内インフュージョンによって患者へ投与される。

【００９２】

使用および方法

本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞または医薬組成物は、対象へ投与することができ、疾患の処置、疾患症候の発症の予防および／または遅延のために用いられ得る。

【００９３】

したがって、本開示は、治療でのまたは医薬としての使用のための本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞または医薬組成物を提供する。本開示はさらに、病理学的障害の処置での使用のための本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞または医薬組成物を提供する。本開示はまた、病理学的障害の処置のための医薬の製造における本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞または医薬組成物の使用を提供する。本開示はさらに、病理学的障害に罹患している患者を処置する方法を提供し、その方法は、治療的に有効量の本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞または医薬組成物を上記患者へ投与するステップを含む。

【００９４】

本明細書において用いられる用語「病理学的障害」は、制限されないが、固形腫瘍がん、軟組織腫瘍、転移病変および血液学的がんを含むがんを含む。例えば、がんは、肝臓がん、肺がん、乳がん、前立腺がん、リンパ系がん、結腸がん、腎がん、骨がん、膵がん、皮膚がん、頭頸部のがん、皮膚性または眼球内悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん、精巣がん、子宮がん、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、以下を含む慢性もしくは急性白血病：急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、小児の固形腫瘍、リンパ性リンパ腫、膀胱のがん、腎臓もしくは尿管のがん、腎盂の癌腫、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管新生、脊椎軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、カポシ肉腫、類表皮がん、扁平上皮細胞がん、Ｔ細胞リンパ腫、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、慢性骨髄性白血病－慢性期（ＣＭＬＣＰ）、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、皮膚性Ｔ細胞リンパ腫（ＣＴＣＬ）、末梢Ｔ細胞リンパ腫（ＰＴＣＬ）、肝細胞癌腫（ＨＣＣ）、胃腸間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、非小細胞肺癌腫（ＮＳＣＬＣ）、頭頸部の扁平上皮細胞癌腫（ＳＣＣＨＮ）、アスベストによって誘導されるものを含む環境的に誘導されるがん、および上記がんの組み合わせであってよい。特に、がんは、乳がん、例えばエストロゲン受容体陽性（ＥＲｐｏｓ）乳がんおよび／または乳がんの転移形態であってよい。

【００９５】

一実施態様では、がんは固形腫瘍がんである。一実施態様では、病理学的障害の処置は、非腫瘍細胞、例えば腫瘍関連間質細胞の標的化を含む。そのような腫瘍関連間質細胞の例示的なタイプは、膵臓の間質細胞を含む。標的化され得る非腫瘍細胞の他のタイプは、マクロファージ、制御性Ｔ細胞および骨髄系由来サプレッサー細胞を含む。

【００９６】

一実施態様では、患者は、化学療法剤を用いて事前に処置されている。

【００９７】

一実施態様では、患者への宿主細胞の投与は、未処置の腫瘍と比較した場合、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または実に１００％の腫瘍サイズの低減をもたらす。

【００９８】
患者（ｐａｔｅｎｔ）に投与される宿主細胞の量は、投与経路、処置されるがん、患者の体重および／または患者の年齢を考慮すべきである。一般に、約１×１０^{6}～約１×１０^{11}個の細胞が患者に投与される。一実施態様では、約１×１０^{7}～約１×１０^{10}個の細胞、または約１×１０^{8}～約１×１０^{9}個の細胞が患者に投与される。
【００９９】
全般
配列同一性は、２つのポリペプチドのアミノ酸の位置における類似性を比較するために一般に用いられる標準的な方法によって決定され得る。ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡまたはＣｌｕｓｔａｌ　Ｏｍｅｇａのようなコンピュータープログラムを用いて、２つのポリペプチドはそれらのそれぞれのアミノ酸の最適なマッチングのために並べられる（一方または両方の配列の全長に沿って、または、一方または両方の配列の所定の部分に沿って）。プログラムは、デフォルトのオープニング・ペナルティおよびデフォルトのギャップ・ペナルティを与え、ＰＡＭ２５０のようなスコア付けマトリックス［標準的なスコア付けマトリックス；Ｄａｙｈｏｆｆら（Ａｔｌａｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，ｖｏｌ．５，ｓｕｐｐ．３（１９７８））を参照］をコンピュータープログラムとともに用いることができる。例えば、同一性（％）は以下のように計算することができる：一致マッチングの合計数に１００をかけて、それを一致範囲内の長い方の配列の長さおよび２つの配列を並べるために長い方の配列内に導入されたギャップ数の合計で割る。
【０１００】
本明細書の説明および特許請求の範囲全体を通して、単語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」および「含む（ｃｏｎｔａｉｎ）」およびその単語の変形、例えば「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」は、「制限されないが含む」を意味し、他の構成要素、整数またはステップを除外しない。さらに、文脈が別段の要求をしない限り、単数形は複数形を包含する：特に、不定冠詞が用いられる場合、文脈が別段の要求をしない限り、その説明は単数形と同様に複数形も包含すると理解されるべきである。
【０１０１】
数値ｘに関する用語「約」は、例えば、ｘ±５％を意味する。
【０１０２】
本開示の各態様の特徴は、任意の他の態様との関連で記載され得る。本出願の範囲において、先行する段落、特許請求の範囲および／または以下の説明および図面に記載される様々な態様、実施態様、例示、および代替、ならびに、特にそれらの個々の特徴は、独立に、または任意の組み合わせで取られ得ることが明確に意図される。すなわち、全ての実施態様および／または任意の実施態様の特徴は、そのような特徴が矛盾しない限り、任意の方法および／または組み合わせで組み合わせることができる。
【実施例】
【０１０３】
一般的方法
Ｔ細胞の単離およびレトロウイルス形質導入
末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、密度介在遠心分離によって健常者由来の血液試料から単離した。Ｔ細胞を、抗－ＣＤ３および抗－ＣＤ２８でコーティングした常磁性ビーズ（１：２　Ｔ細胞：ビーズ比）を用いて４８時間活性化した。１×１０^{6}個のＴ細胞を、３ｍＬレトロウイルス上清で事前に処理した、レトロネクチンでコーティングされたプレート上にプレーティングした。続いて、各ウェルを３ｍＬの新鮮なウイルス上清および１００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２で処理した。レトロウイルス形質導入を、安定なテナガザル白血病ウイルス（ＧＡＬＶ）－偽型２９３ＴＶｅｃ安定パッケージング細胞によって生産したウイルス粒子を用いて行なった。その後、Ｔ細胞に、ＲＰＭＩ１６４０培地中の１００ＩＵ／ｍＬ＋５％正常ヒトＡＢ血清を添加し、新鮮な培地およびＩＬ－２（１００ＩＵ／ｍ

Ｌ）を週に三度（ｔｈｒｉｃｅ）提供した。

【０１０４】

フローサイトメトリー

Ｔ細胞形質導入および２９３Ｔ細胞のトランスフェクションをフローサイトメトリーで評価し、示される場合は適切なアイソタイプコントロールと比較した。ＮＫＧ２Ｄに基づく構築物の発現を評価するために、マウス抗－ヒトＣＤ４－ＦＩＴＣ、マウス抗－ヒトＮＫＧ２Ｄ－ＰＥおよびマウス抗－ヒトＣＤ８－ＡＰＣで細胞を染色し、適切に補正した。$CD8^+$Ｔ細胞における高レベルの内因性ＮＫＧ２Ｄ発現に起因して、形質導入効率を非形質導入$CD4^+$Ｔ細胞におけるＮＫＧ２Ｄ発現に対して比較した。ｐａｎＥｒｂＢ－特異的Ｔ４およびＴＭＹ　ＣＡＲの発現を、ビオチン化ヤギ抗－ヒトＥＧＦを用いて、その後にＰＥコンジュゲート化ストレプトアビジンを用いて評価した。形質導入効率を、同一試薬を用いて染色した$N1012^+$Ｔ細胞との比較によって計算した。使用前に、非形質導入Ｔ細胞を必要な割合でスパイクすることによって構築物間の形質導入効率を正規化した。このことは、全ての条件が、CAR^+Ｔ細胞の合計数およびＴ細胞濃度全体について同一であることを確実にした。

【０１０５】

細胞内染色を行なうために、トランスフェクトされた２９３Ｔ細胞を４％ホルムアルデヒド中に室温で１０分間固定してから、透過処理溶液（ＰＢＳ＋０．５％ＢＳＡ＋０．１％サポニン）中で２回洗浄した。続いて、１００ｕＬの透過処理溶液の存在下で、５００ｎｇのＰＥ－コンジュゲート抗－ヒトＮＫＧ２Ｄ、または適切なアイソタイプコントロールを用いて細胞を染色した。細胞を透過処理溶液中でさらに２回洗浄後、フローサイトメトリーによって分析した。

【０１０６】

用量応答アッセイ

1×10^4個の腫瘍細胞を、９６ウェルプレートのウェル（１００μＬ）ごとにプレーティングして、３７℃および５％CO_2で一晩インキュベートした。２４時間後、Ｔ細胞を、１：１～１：６４の範囲のｌｏｇ２　ＣＡＲ　Ｔ細胞：腫瘍細胞比で添加した。７２時間後、Ｔ細胞を除去し、１００μＬのＭＴＴ溶液（５００μｇ／ｍＬ）を添加した後に、プレートを３７℃および５％CO_2でおよそ１時間インキュベートした。ＭＴＴ溶液の除去後、生じたホルマザン結晶をＤＭＳＯ中に可溶化し（１００μＬ／ウェル）、吸光度を５６０ｎｍで測定した。腫瘍細胞の生存能力を以下のとおりに計算した：（Ｔ細胞を含む単一層の吸光度／Ｔ細胞を含まない単一層の吸光度）＊１００。

【０１０７】

再刺激アッセイ

1×10^5個の腫瘍細胞を、２４ウェルプレートのトリプリケート・ウェルにプレーティングし、３７℃および５％CO_2で２４時間インキュベートした。２４時間後、1×10^5個のCAR^+Ｔ細胞を含む１ｍＬをウェルあたり与えた。７２時間後、Ｔ細胞を静かに除去し、ウェルを１ｍＬ　ＰＢＳでよく洗浄した。ＰＢＳを除去した後、１ｍＬのＭＴＴ（終濃度５００μｇ／ｍＬ）を各ウェルに添加してプレートを３７℃および５％CO_2でおよそ１時間インキュベートした。吸光度を適切なウェルにおいて５６０ｎｍで測定し、腫瘍細胞の生存能力を、「用量応答」のセクションに詳述したとおりに計算した。再刺激は、腫瘍細胞の生存能力が５０％未満と測定されるならば成功と考えた。

【０１０８】

プレートから除去したＴ細胞を４００ｘｇで５分間遠心分離して上清を除去した。ペレットを３．２ｍＬのＲ５培地中に再懸濁し、１ｍＬを、新鮮な腫瘍単一層（２４ウェルプレートのウェルあたり1×10^5個の腫瘍細胞）の各ウェルにトリプリケートで添加した。Ｔ細胞の合計数を、残っている２００μＬの小アリコートのトリパンブルー色素排除法によって評価した。

【０１０９】

ＥＬＩＳＡ

Ｔ細胞によるＩＦＮ－γおよびＩＬ－２の分泌を、Ｄｕｏ－ｓｅｔおよびＲｅａｄｙ－Ｓｔｅａｄｙ－Ｇｏ　ＥＬＩＳＡキットをそれぞれ用いて、共培養の開始の２４時間後に取り出した上清アリコートにおいて評価した。

【０１１０】

腫瘍スフェロイドの生成

腫瘍スフェロイドを生産するために、１×１０^{3}個の腫瘍細胞および１×１０^{3}個のＰＳ１星細胞を超低親和性９６ウェルプレートのウェルあたり添加して、３７℃および５％CO_2で７２時間インキュベートした。スフェロイドの生成を標準的な光学顕微鏡の可視化によって確認した。

【０１１１】

インビボ

１×１０^{5}個のホタルルシフェラーゼ（ｆｆＬＵＣ）タグ化ＢｘＰＣ３細胞を、ＮＳＧマウスの腹膜腔内に注入した。腫瘍接種の１２日後、マウス（ｎ＝５／群）を、ＰＢＳ、４×１０^{6}個の（Ｎ１０１２$^{+}$（Ｎ１０１２（ｌｏ））、Ｔ４$^{+}$またはＴＭＹ$^{+}$ＣＡＲＴ細胞）または１×１０^{7}個の（Ｎ１０１２（ｈｉ）またはＮＫＧ２Ｄ）ＣＡＲ$^{+}$Ｔ細胞のいずれかで腹腔内処置した。あるいは、ＮＳＧマウスに、１×１０^{6}個のｆｆＬＵＣタグ化Ｈ２２６悪性中皮腫細胞をｉ．ｐ．接種した。腫瘍接種の８日後、マウスをＰＢＳ、または４×１０^{6}個のＮ１０１２$^{+}$Ｔ細胞のいずれかで処置した。コントロールとして、マウスの１つの群を、ＮＫＧ２Ｄのみを発現する４×１０^{6}個のＴ細胞で処置した。

【０１１２】

腫瘍増殖をＢＬＩによって監視し、全てのデータを全光度（光子／秒）または処置あたりの平均全光度（光子／秒）として示した。マウスをよく監視し、健康不良の兆候について１週間に３回計量した。

【０１１３】

<u>実施例１：２９３Ｔ細胞におけるＮＫＧ２ＤおよびＤＡＰ１０／１２融合タンパク質の発現</u>

２９３Ｔ細胞に、ＤＡＰ１０／１２融合タンパク質Ｎ１０１２またはＮＫＧ２Ｄ発現カセットのいずれかを含むＳＦＧレトロウイルスプラスミド主鎖をトランスフェクトした。Ｎ１０１２（配列番号６４）は、外因性ヒトＮＫＧ２Ｄタンパク質および本発明に係る融合外因性ＤＡＰ１０／１２ホモダイマーを含む複合体を含む。Ｎ１０１２プラスミドは配列番号７４を含み、それは配列番号６４をコードしている。ＮＫＧ２Ｄの表面発現を７２時間後にフローサイトメトリーによって評価した。Ｎ１０１２プラスミドでトランスフェクトされた２９３Ｔ細胞の表面にはＮＫＧ２Ｄ発現が容易に検出されたが、コントロールＮＫＧ２Ｄをコードするプラスミドでトランスフェクトしたものの表面にはＮＫＧ２Ｄ発現は検出されなかった（図２、上パネル）。ＮＫＧ２Ｄ表面発現がＤＡＰ１０の発現に依存性であることを考慮すると、ＮＫＧ２Ｄ表面発現の欠如は、ＮＫＧ２ＤプラスミドにおけるＤＡＰ１０共発現の不存在によって説明することができた。ＮＫＧ２Ｄでトランスフェクトされた２９３Ｔ細胞における表面ＮＫＧ２Ｄ発現の欠如が低いトランスフェクションによるものでなかったことを確認するために、ＮＫＧ２Ｄの存在に関する細胞内染色を行なった。重要なことに、ＮＫＧ２Ｄの細胞内発現が、Ｎ１０１２またはＮＫＧ２Ｄプラスミドのいずれかでトランスフェクトされた２９３Ｔ細胞において観察された（図２、下パネル）。このことは、両方の構築物からのＮＫＧ２Ｄの発現が成功であることを示しており、また、ＮＫＧ２Ｄの表面発現を達成するためにはＤＡＰ１０共発現が必要であることを確認している。

【０１１４】

<u>実施例２：初代ヒトＴ細胞におけるＮ１０１２およびＮＫＧ２Ｄの発現</u>

初代ヒトＴ細胞を、抗－ヒトＣＤ３および抗－ヒトＣＤ２８抗体でコーティングされた常磁性ビーズを用いて活性化した。活性化の４８時間後、Ｎ１０１２またはＮＫＧ２Ｄを発現するようにレトロウイルス形質導入によってＴ細胞を改変した、ＮＫＧ２Ｄの表面発現をフローサイトメトリーによって評価し、ＣＤ４およびＣＤ８発現について共染色した

。ＮＫＧ２Ｄの発現パーセンテージ（図３Ａ）および中央値蛍光強度（ＭＦＩ、図３Ｂ）を、非形質導入Ｔ細胞に対して比較した。ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＮＫＧ２Ｄの内因性発現に起因して、データをＣＤ４＋Ｔ細胞に対してゲートした。示されるように、ＮＫＧ２ＤおよびＮ１０１２構築物の両方とも、初代ヒトＴ細胞の表面において高レベルで再現性よく発現され、ＵＴ　Ｔ細胞、またはコントロールＣＡＲを発現するＴ細胞とは対照的である（図４）。

【０１１５】

実施例３：標的細胞の破壊およびＮ１０１２　Ｔ細胞による認識の評価

細胞溶解能を評価するために、Ｎ１０１２＋Ｔ細胞を、５個の異なる腫瘍タイプ（中皮腫、卵巣がん、頭頸部扁平上皮細胞癌腫、膵がんおよび乳がん）を表わす１１個の異なるヒト腫瘍細胞株、または腫瘍関連間質細胞（ＰＳ１）と、異なるＥ：Ｔ比で共培養した。７２時間後、Ｔ細胞を除去し、ＭＴＴアッセイを行なって腫瘍細胞生存能力を評価した。腫瘍の生存能力の最小限の減少が、標的細胞をＵＴ　Ｔ細胞、またはＮＫＧ２Ｄを発現するＴ細胞のいずれかと共培養した場合に観察されたが、Ｎ１０１２＋Ｔ細胞は、全ての標的細胞株の強力な溶解を、低いＥ：Ｔ比でさえ示した（図５および図７ＡおよびＢ）。ＥＬＩＳＡによる共培養上清の分析は、Ｎ１０１２＋Ｔ細胞によるインターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）およびインターロイキン－２（ＩＬ－２）の両方の実質的な分泌を示したが、ＵＴ　Ｔ細胞またはコントロールＮＫＧ２Ｄ構築物を発現するＴ細胞による分泌は示さなかった（図６ＡおよびＢ）。これらのデータは、Ｎ１０１２＋Ｔ細胞が腫瘍関連間質細胞を含む幅広い様々な腫瘍タイプを認識および溶解する能力を示している。

【０１１６】

実施例４：腫瘍細胞および間質細胞の共培養物のＮ１０１２　Ｔ細胞による破壊の実証

Ｎ１０１２＋Ｔ細胞が、間質細胞の存在下で増殖した場合に腫瘍細胞を溶解する能力を維持するかどうか決定するために、腫瘍および間質細胞の両方を含む単一層と共培養した。これを達成するために、５×１０^{4}個の腫瘍細胞および５×１０^{4}個のＰＳ１星細胞を混合して、２４ウェルプレートのトリプリケート・ウェル内にプレーティングした。２４時間後、１×１０^{5}個のＴ細胞を添加して、プレートを７２時間インキュベートした。続いて、Ｔ細胞を除去して、腫瘍細胞および間質細胞の単一層の生存能力を、実施例３に詳述したとおりにＭＴＴアッセイによって評価した。腫瘍および間質細胞の両方の強力な溶解がＮ１０１２＋Ｔ細胞で観察されたが、ＮＫＧ２ＤまたはＵＴ　Ｔ細胞のいずれかと共培養した場合、標的細胞の生存能力の最小限の減少が観察された（図７Ｃ～Ｄ）。Ｎ１０１２＋Ｔ細胞およびＡ２０２８ｚ　ＣＡＲを発現するＴ細胞の両方とも、単離して増殖した（ｇｒｏｗｎ　ｉｎ　ｉｓｏｌａｔｉｏｎ）ＢｘＰＣ３＿ＬＴ細胞と同等の溶解を仲介した。ａ２０２８ｚＣＡＲは、αｖβ６インテグリンを標的化するｐＣＡＲである。このＣＡＲの標的化部分は、αｖβ６インテグリンに結合するＶＰＩ由来のＡ２０ＦＭＤＶ２の２０マーペプチド（配列番号８０）からなる。これは、ＣＤ１２４シグナルペプチド（Ｕｎｉｐｒｏｔ参照Ｐ２４３９４のａａ１～２５、配列番号８１）の下流に位置していた。標的化部分は、ＡＡＡリンカーを介して、ＣＤ２８の部分的細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン（ａａ１１４～２２０、Ｕｎｉｐｒｏｔ参照Ｐ１０７４７、配列番号８２）に融合されており、ＣＤ２８のＢ７結合残基（ａａ１１７～１２２）はヒトｃ－ｍｙｃのａａ４１０～４１９（Ｕｎｉｐｒｏｔ参照Ｐ０１１０６、配列番号５２）で置換されている。これは、ＣＤ２４７のａａ５２～１６４（Ｕｎｉｐｒｏｔ参照Ｐ２０９６３、配列番号８３）とインフレームで融合される。

【０１１７】

Ｎ１０１２＋Ｔ細胞は、ＢｘＰＣ３＿ＬＴ腫瘍細胞およびＰＳ１星細胞の両方を含む単一層の強力な溶解を維持したが、対照的に、Ａ２０２８ｚ　Ｔ細胞による有効性（図７Ｅ～Ｆ）およびサイトカイン分泌（図７Ｇ～Ｈ）は実質的に減少した。

【０１１８】

実施例５：Ｎ１０１２　Ｔ細胞による腫瘍スフェロイド破壊の実証

Ｎ１０１２＋Ｔ細胞が３Ｄシステム内で標的細胞溶解を仲介する能力を評価するために

、それらを腫瘍スフェロイドとともに共培養した。スフェロイド生成後、６×１０^{3}個のＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ　Ｖｉｏｌｅｔ標識Ｔ細胞をウェルあたり添加した。腫瘍細胞および星細胞の生存能力を、７２時間および１９２時間後に、蛍光顕微鏡を用いて、ＧＦＰおよびＲＦＰをそれぞれ測定することによって評価した。ＧＦＰおよびＲＦＰシグナルの定量化を、ＩｍａｇｅＪソフトウェアを用いて行ない、Ｔ細胞の不存在下で増殖したスフェロイドからの蛍光読取のパーセンテージとして表した。スフェロイドの強力な溶解がＮ１０１２$^{+}$Ｔ細胞で観察されたが、ＮＫＧ２ＤまたはＵＴ　Ｔ細胞では観察されなかった（図７Ｉ～Ｊ）。さらに、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞のみがＩＦＮ－γの分泌を示した（図７Ｋ）。

【０１１９】

スフェロイド生存能力およびＴ細胞増殖を、フローサイトメトリーを用いて評価した。これを達成するために、スフェロイドをＴ細胞の添加後７２時間または１９２時間のいずれかにプレートから取り出し、フローサイトメトリーチューブ内に入れた（同一のＣＡＲＴ細胞で処理した最大５つまでのスフェロイドを同一チューブに添加した）。スフェロイドの脱凝集を、Ａｃｃｕｔａｓｅ溶液を用いて達成し、ピペットチップを通して十分に再懸濁した。生じた単一細胞懸濁液をＲＰＭＩ１６４０培地＋５％正常ヒトＡＢ血清中で洗浄し、その後に、計数ビーズを含むＰＢＳ中に再懸濁した。チューブあたり同数の計数ビーズを取得し、生じた腫瘍細胞の数（ＧＦＰおよびＲＦＰ蛍光によって評価する）およびＴ細胞の数（ＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ　Ｖｉｏｌｅｔ蛍光によって評価する）を決定した。データは、Ｔ細胞不存在下で増殖したスフェロイド中に存在するＧＦＰおよびＲＦＰ細胞の合計のパーセンテージとして示される。

【０１２０】

実施例６：Ｎ１０１２　Ｔ細胞による連続的な標的認識の実証

Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞が標的細胞の連続的な溶解（「再刺激」）を受ける能力を評価するために、それらを、単一層の破壊が観察されなくなるまで週に２回、新鮮な単一層と共培養した。ＵＴまたはＮＫＧ２Ｄ$^{+}$Ｔ細胞は最小限の標的細胞破壊を仲介し、増殖の証拠を示さなかったが、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞は、複数ラウンドの再刺激を通して強力な溶解を仲介した（図８Ａ～Ｂ）。標的細胞の破壊は、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞の実質的な増殖および拡大とも関連した（図８Ｃ～Ｄ）。

【０１２１】

ＣＹＡＤ－０１　ＮＫＧ２Ｄ　ＣＡＲおよびコントロールＴ細胞と比較すると、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞は、ＢｘＰＣ３＿ＬＴ細胞に対する有意により多くのラウンドの再刺激を受けた（図１４Ａ）。さらに、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞は、ＣＹＡＤ－０１　Ｔ細胞またはコントロールよりも実質的に大きな増殖も示した（図１４Ｂ）。

【０１２２】

実施例７：膵がんのインビボモデルにおけるＮ１０１２　Ｔ細胞の有効性

Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞が腫瘍細胞をインビボで標的化する能力を決定するために、Ｎ１０１２、ＮＫＧ２Ｄまたは２つの異なる繰り返しのｐａｎ－ＥｒｂＢ標的化ＣＡＲ（Ｔ４およびＴＭＹ）を発現するＴ細胞を生産した。初代ヒトＴ細胞における様々な構築物の発現（図９Ａ）、および、１：１比での７２時間の共培養後の３つの細胞株に対するＴ細胞細胞の有効性をインビトロで示した（図９Ｂ）。インビボでの機能を評価するために、腹腔内ホタルルシフェラーゼ（ｆｆＬＵＣ）タグ化ＢｘＰＣ３腫瘍をＮＳＧマウスにおいて１２日間確立した。腫瘍保有マウスを、ＰＢＳ、４×１０^{6}個の（Ｎ１０１２（ｌｏ）、Ｔ４またはＴＭＹ）Ｔ細胞、または１×１０^{7}個の（Ｎ１０１２（ｈｉ）またはＮＫＧ２Ｄ）形質導入Ｔ細胞で腹腔内処置した。腫瘍増殖を生物発光イメージングによって毎週測定し、マウスを週に三度計量した。データを、処置群あたりの平均全光度（光子／秒）（図１０Ａ）、または個々のマウスあたりの全光度（光子／秒）（図１０Ｂ）の両方で示す。ＮＫＧ２Ｄ$^{+}$、Ｔ４$^{+}$またはＴＭＹ$^{+}$Ｔ細胞が投与されたマウスにおける腫瘍負荷は、ＰＢＳが投与された場合と同じであり、有効性がないことが示唆された。対照的に、腫瘍は、Ｎ１０１２（ｌｏ）またはＮ１０１２（ｈｉ）で処置されたそれぞれ２／５マウスおよ

び４／５マウスにおいて完全に根絶した。これらのマウスは、Ｔ細胞投与の７６日後、腫瘍なしを維持していた。体重変化（％）の測定によって評価した場合に、毒性の証拠は観察されなかった（図１０Ｃ）。

【０１２３】

Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞がＮＳＧマウス内に生着して免疫学的記憶を提供することができるかどうか決定するために、腫瘍を完全に拒絶したマウスに、初回腫瘍接種の８８日後（Ｔ細胞インフュージョンの７６日後）に腹膜腔への１×１０^{5}個のｆｆＬＵＣタグ化ＢｘＰＣ３細胞の２回目の接種を与えた。発光の増加が腫瘍再チャレンジの２４時間後にＢＬＩによって観察されたが、マウスの４／５はその後、腫瘍サイズの実質的な減少を示し、したがって、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞の再活性化が示唆された（図１０Ｄ）。実験を１４５日後に終了し、生存曲線を作成し、それにより、Ｎ１０１２　Ｔ細胞の強力な抗腫瘍有効性が示された（図１０Ｅ）。

【０１２４】

膵がんモデルに対するＮ１０１２$^{+}$Ｔ細胞の有効性をインビボでさらに確認するために、反復実験を行なった。１×１０^{7}個のＣＡＲ$^{+}$またはコントロール非形質導入Ｔ細胞を、１×１０^{5}個のｆｆＬＵＣタグ化ＢｘＰＣ３細胞の接種の１２日後に、ＮＳＧマウスへｉ．ｐ．注入した。腫瘍増殖を生物発光イメージングによって毎週監視した。データを、処置群あたりの平均全光度（光子／秒）（図１１Ａ）、および個々のマウスあたりの全光度（光子／秒）（図１１Ｂ）の両方で示す。有意な持続した腫瘍回帰がＮ１０１２$^{+}$Ｔ細胞で処置されたマウスにおいて再度観察された。実際に、腫瘍は、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞で処置されたマウスの５／６において完全に根絶された。対照的に、ＵＴ　Ｔ細胞で処置されたマウスにおける腫瘍増殖の動態はＰＢＳが投与された場合と同一であった。これらのデータから、腫瘍根絶がＮ１０１２$^{+}$特有であったことが確認される。

【０１２５】

メモリーＴ細胞の潜在的形成を調べるために、４１日目（Ｔ細胞インフュージョンの２９日後）に腫瘍のないマウスに新鮮なボーラスの１×１０^{5}個のｆｆＬＵＣタグ化ＢｘＰＣ３細胞をｉ．ｐ．で再チャレンジした。マウスを４２日目に撮像し、腫瘍の取り込み（ｔａｋｅ）を確認した。その後のイメージングにより、再チャレンジしたマウスの５／５が腫瘍負荷を検出未満まで減少させ、マウスの３／５が長期の腫瘍コントロールを示すことが示された（図１１Ｂ）。これらのデータは、Ｎ１０１２　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、メモリーを形成することが可能であること、および、標的の再出現に応答して再活性化することが可能であることを示唆する。

【０１２６】

実施例８：悪性中皮腫のインビボモデルにおけるＮ１０１２　Ｔ細胞の有効性

別のインビボモデルにおいてＮ１０１２の有効性を確認するために、ＮＳＧマウスに１×１０^{6}個のｆｆＬＵＣタグ化Ｈ２２６悪性中皮腫細胞をｉ．ｐ．接種した。腫瘍接種の８日後、マウスをＰＢＳ、または４×１０^{6}個のＮ１０１２$^{+}$Ｔ細胞で処置した。コントロールとして、マウスの１つの群をＮＫＧ２Ｄのみを発現する４×１０^{6}個のＴ細胞で処置した。腫瘍増殖を生物発光イメージングによって毎週監視した。データを、処置あたり平均全光度（光子／秒）（図１２Ａ）、および、個々のマウスあたり全光度（光子／秒）（図１２Ｂ）として示す。一貫した腫瘍増殖がＰＢＳを投与されたマウスにおいて観察されたが、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞を投与されたマウスにおいて１００％腫瘍根絶が観察された。

【０１２７】

Ｔ細胞持続性および機能維持を確認するために、全ての腫瘍のないマウスに、初回の腫瘍接種の９１日後、さらなる１×１０^{6}個のｆｆＬＵＣタグ化Ｈ２２６細胞をｉ．ｐ．接種した。腫瘍の取り込みを、生物発光イメージングによって２４時間後に全てのマウスにおいて確認した。全ての再チャレンジマウスは腫瘍を拒絶し、Ｎ１０１２$^{+}$Ｔ細胞の持続性およびこれらのＴ細胞が長期の腫瘍コントロールを仲介する能力が確認された。

【０１２８】

実施例９：ＣＹＡＤ－０１　Ｔ細胞に対するＮ１０１２　Ｔ細胞の比較

Ｎ１０１２　Ｔ細胞の再刺激および増殖の潜在性をＣＹＡＤ－０１　Ｔ細胞と比較した。以前に記載されたように、ＣＹＡＤ－０１　ＣＡＲはＣＤ３ζへのＮＫＧ２Ｄの融合からなる（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ，２００５，Ｂｌｏｏｄ　１０６：１５４４－１５５１）。名目上は第１世代ＣＡＲであるが、それはＴ細胞において内因性ＤＡＰ１０と会合し、シグナル１および２の両方が提供されることを意味している。このＣＡＲは現在、Ｃｅｌｙａｄ　Ｓ．Ａ．によってＣＹＡＤ－０１として臨床開発中であり、したがって、比較目的のためだけにこれらの実施例において提供される。

【０１２９】

ＣＹＡＤ－０１の表面発現は、フローサイトメトリーによって評価した場合に初代ヒトＴ細胞において確認された（図１３）。

【０１３０】

簡単に説明すると、Ｎ１０１２またはＣＹＡＤ－０１　Ｔ細胞を、単一層の破壊が観察されなくなるまで週に２回、新鮮な単一層と共培養した。これを達成するために、1×10^5個の腫瘍細胞を２４ウェルプレートのトリプリケート・ウェルにプレーティングし、３７℃および５％CO_2で２４時間インキュベートした。２４時間後、1×10^5個のＣＡＲ＋　Ｔ細胞をウェルあたり1×10^5個のＣＡＲ＋／ｍＬの終濃度で添加した。７２時間後、Ｔ細胞を穏やかに除去し、ウェルを１ｍＬのＰＢＳで洗浄した。ＰＢＳの除去後、１ｍＬのＭＴＴ（終濃度５００μｇ／ｍＬ）を各ウェルに添加し、プレートを３７℃および５％CO_2でおよそ１時間インキュベートした。プレートを読み取り、腫瘍細胞生存能力を上記に詳述したとおりに計算した。再刺激は、腫瘍細胞生存能力が５０％未満と測定されるならば成功と考えた。

【０１３１】

標的細胞の認識に応答したＴ細胞増殖を調べるために、プレートから除去されたＴ細胞を４００ｘｇで5分間スピンし（ｓｐｉｎｏｃｕｌａｔｅｄ）、上清を除去した。ペレットを３．２ｍＬのＲ５培地中に再懸濁し、１ｍＬを新鮮な腫瘍単一層の各ウェルにトリプリケートで添加した。Ｔ細胞の合計数を、残っている２００μＬの小アリコートのトリパンブルー色素排除法によって評価した。

【０１３２】

ＣＹＡＤ－０１、ＮＫＧ２Ｄ　ＣＡＲおよびコントロールＴ細胞と比較した場合、Ｎ１０１２$^+$Ｔ細胞は、有意により多くのラウンドのＢｘＰＣ３＿ＬＴ細胞に対する再刺激を受けた（図１４Ａ）。さらに、Ｎ１０１２　Ｔ細胞は、ＣＹＡＤ－０１　Ｔ細胞またはコントロールよりも実質的に大きな増殖も示した（図１４Ｂ）。

【０１３３】

腫瘍スフェロイドと共培養した場合、スフェロイド生存能力の有意な減少がＮ１０１２$^+$Ｔ細胞で観察されたが、ＵＴコントロールＴ細胞では観察されず、機能性ＣＹＡＤ－０１　ＣＡＲを発現するＴ細胞でも観察されなかった（図１５Ａ）。Ｎ１０１２　Ｔ細胞は、ＵＴまたはＣＹＡＤ－０１　Ｔ細胞と比較して有意な増殖も示した（図１５Ｂ）。

【０１３４】

配列リスト

配列番号１（ヒトＤＡＰ１０全配列）

ＭＩＨＬＧＨＩＬＦＬＬＬＬＰＶＡＡＡＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳＧＣＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣＡＲＰＲＲＳＰＡＱＥＤＧＫＶＹＩＮＭＰＧＲＧ

【０１３５】

配列番号２（ＤＡＰ１０　ａａ１９～９３－リーダー配列が欠失している）

ＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳＧＣＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣＡＲＰＲＲＳＰＡＱＥＤＧＫＶＹＩＮＭＰＧＲＧ

【０１３６】

配列番号３（ＤＡＰ１０　ａａ１９～６９－細胞外／膜貫通ドメイン）

ＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳＧＣＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡ
ＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦ
【０１３７】
配列番号４（ＤＡＰ１０　ａａ１～７１）
ＭＩＨＬＧＨＩＬＦＬＬＬＬＰＶＡＡＡＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳ
ＧＣＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣ
【０１３８】
配列番号５（ＤＡＰ１０　ａａ１９～７１）
ＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳＧＣＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡ
ＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣ
【０１３９】
配列番号６（ＤＡＰ１０　ａａ７０～９３－細胞内ドメイン）
ＬＣＡＲＰＲＲＳＰＡＱＥＤＧＫＶＹＩＮＭＰＧＲＧ
【０１４０】
配列番号７（ＤＡＰ１０　ａａ４９～９３－膜貫通および細胞内ドメイン）
ＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣＡＲＰＲＲＳＰＡＱＥＤＧＫＶＹＩＮ
ＭＰＧＲＧ
【０１４１】
配列番号８（ＤＡＰ１０　ａａ４９～６９－膜貫通ドメイン）
ＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦ
【０１４２】
配列番号９（ヒトＤＡＰ１２全配列）
ＭＧＧＬＥＰＣＳＲＬＬＬＬＰＬＬＬＡＶＳＧＬＲＰＶＱＡＱＡＱＳＤＣＳＣＳＴＶＳＰ
ＧＶＬＡＧＩＶＭＧＤＬＶＬＴＶＬＩＡＬＡＶＹＦＬＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲ
ＫＱＲＩＴＥＴＥＳＰＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶＹＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫ
【０１４３】
配列番号１０（ＤＡＰ１２　ａａ２２～１１３－リーダー配列が欠失している）
ＬＲＰＶＱＡＱＡＱＳＤＣＳＣＳＴＶＳＰＧＶＬＡＧＩＶＭＧＤＬＶＬＴＶＬＩＡＬＡＶ
ＹＦＬＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥＳＰＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶ
ＹＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫ
【０１４４】
配列番号１１（ＤＡＰ１２　ａａ６２～１１３－細胞質／細胞内ドメイン）
ＹＦＬＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥＳＰＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶ
ＹＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫ
【０１４５】
配列番号１２（ＤＡＰ１２　ａａ４１～６１－膜貫通ドメイン）
ＧＶＬＡＧＩＶＭＧＤＬＶＬＴＶＬＩＡＬＡＶ
【０１４６】
配列番号１３（ＤＡＰ１２　ａａ２２～６１－細胞外および膜貫通ドメイン）
ＬＲＰＶＱＡＱＡＱＳＤＣＳＣＳＴＶＳＰＧＶＬＡＧＩＶＭＧＤＬＶＬＴＶＬＩＡＬＡＶ
【０１４７】
配列番号１４（ヒトＮＫＧ２Ｄ全配列）
ＭＧＷＩＲＧＲＲＳＲＨＳＷＥＭＳＥＦＨＮＹＮＬＤＬＫＫＳＤＦＳＴＲＷＱＫＱＲＣＰ
ＶＶＫＳＫＣＲＥＮＡＳＰＦＦＦＣＣＦＩＡＶＡＭＧＩＲＦＩＩＭＶＡＩＷＳＡＶＦＬＮ
ＳＬＦＮＱＥＶＱＩＰＬＴＥＳＹＣＧＰＣＰＫＮＷＩＣＹＫＮＮＣＹＱＦＦＤＥＳＫＮＷ
ＹＥＳＱＡＳＣＭＳＱＮＡＳＬＬＫＶＹＳＫＥＤＱＤＬＬＫＬＶＫＳＹＨＷＭＧＬＶＨＩ
ＰＴＮＧＳＷＱＷＥＤＧＳＩＬＳＰＮＬＬＴＩＩＥＭＱＫＧＤＣＡＬＹＡＳＳＦＫＧＹＩ
ＥＮＣＳＴＰＮＴＹＩＣＭＱＲＴＶ
【０１４８】
配列番号１５（ヒトＮＫＧ２Ｄ　ａａ７３～２１６－細胞外ドメイン）

ＩＷＳＡＶＦＬＮＳＬＦＮＱＥＶＱＩＰＬＴＥＳＹＣＧＰＣＰＫＮＷＩＣＹＫＮＮＣＹＱ
ＦＦＤＥＳＫＮＷＹＥＳＱＡＳＣＭＳＱＮＡＳＬＬＫＶＹＳＫＥＤＱＤＬＬＫＬＶＫＳＹ
ＨＷＭＧＬＶＨＩＰＴＮＧＳＷＱＷＥＤＧＳＩＬＳＰＮＬＬＴＩＩＥＭＱＫＧＤＣＡＬＹ
ＡＳＳＦＫＧＹＩＥＮＣＳＴＰＮＴＹＩＣＭＱＲＴＶ

【０１４９】

配列番号１６（ヒトＮＫＧ２Ｄ　ａａ８２～２１６－細胞外ドメイン）

ＬＦＮＱＥＶＱＩＰＬＴＥＳＹＣＧＰＣＰＫＮＷＩＣＹＫＮＮＣＹＱＦＦＤＥＳＫＮＷＹ
ＥＳＱＡＳＣＭＳＱＮＡＳＬＬＫＶＹＳＫＥＤＱＤＬＬＫＬＶＫＳＹＨＷＭＧＬＶＨＩＰ
ＴＮＧＳＷＱＷＥＤＧＳＩＬＳＰＮＬＬＴＩＩＥＭＱＫＧＤＣＡＬＹＡＳＳＦＫＧＹＩＥ
ＮＣＳＴＰＮＴＹＩＣＭＱＲＴＶ

【０１５０】

配列番号１７（ヒトＮＫＧ２Ｄ　ａａ５２～２１６－膜貫通および細胞外ドメイン）

ＰＦＦＦＣＣＦＩＡＶＡＭＧＩＲＦＩＩＭＶＡＩＷＳＡＶＦＬＮＳＬＦＮＱＥＶＱＩＰＬ
ＴＥＳＹＣＧＰＣＰＫＮＷＩＣＹＫＮＮＣＹＱＦＦＤＥＳＫＮＷＹＥＳＱＡＳＣＭＳＱＮ
ＡＳＬＬＫＶＹＳＫＥＤＱＤＬＬＫＬＶＫＳＹＨＷＭＧＬＶＨＩＰＴＮＧＳＷＱＷＥＤＧ
ＳＩＬＳＰＮＬＬＴＩＩＥＭＱＫＧＤＣＡＬＹＡＳＳＦＫＧＹＩＥＮＣＳＴＰＮＴＹＩＣ
ＭＱＲＴＶ

【０１５１】

配列番号１８（リンカー）

ＧＳＧ

【０１５２】

配列番号１９（リンカー）

ＧＳＧＧＧ

【０１５３】

配列番号２０（リンカー）

ＧＳＧＧ

【０１５４】

配列番号２１（リンカー）

ＳＧＧＧ

【０１５５】

配列番号２２（リンカー）

ＧＧＧＧＳ

【０１５６】

配列番号２３（リンカー）

ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ

【０１５７】

配列番号２４（リンカー）

ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ

【０１５８】

配列番号２５（リンカー）

ＧＰＰＧＳ

【０１５９】

配列番号２６（リンカー）

ＧＧＧＳ

【０１６０】

配列番号２７（リンカー）

ＧＧＧＧＳ

【０１６１】

配列番号２８（リンカー）

ＧＹＳ

【０１６２】
配列番号２９（リンカー）
ＧＳ
【０１６３】
配列番号３０（リンカー）
ＳＧＧＧＧ
【０１６４】
配列番号３１（リンカー）
ＳＧＧＧ
【０１６５】
配列番号３２（リンカー）
ＳＧＧ
【０１６６】
配列番号３３（リンカー）
ＳＧＳＧ
【０１６７】
配列番号３４（リンカー）
ＳＧ
【０１６８】
配列番号３５（リンカー）
ＧＧＧＧＡ
【０１６９】
配列番号３６（リンカー）
ＧＧＧＡ
【０１７０】
配列番号３７（リンカー）
ＥＡＡＡＫ
【０１７１】
配列番号３８（フューリン切断部位）
ＲＲＫＲ
【０１７２】
配列番号３９（Ｐ２Ａスキップペプチド）
ＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ
【０１７３】
配列番号４０（Ｔ２Ａスキップペプチド）
ＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ
【０１７４】
配列番号４１（ＳＧＳＧ＋Ｐ２Ａ）
ＳＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ
【０１７５】
配列番号４２（ＳＧＳＧ＋Ｔ２Ａ）
ＳＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ
【０１７６】
配列番号４３（フューリン＋ＳＧＳＧ＋Ｐ２Ａ）
ＲＲＫＲＳＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ
【０１７７】
配列番号４４（フューリン＋ＳＧＳＧ＋Ｔ２Ａ）
ＲＲＫＲＳＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ
【０１７８】
配列番号４５（Ｆ２Ａスキップペプチド）

ＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ
【０１７９】
配列番号４６（Ｅ２Ａスキップペプチド）
ＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ
【０１８０】
配列番号４７（Ｈｉｓタグ）
ＨＨＨＨＨＨ
【０１８１】
配列番号４８（ＦＬＡＧタグ）
ＤＹＫＤＤＤＤＫ
【０１８２】
配列番号４９（Ａｖｉタグ）
ＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ
【０１８３】
配列番号５０（Ｖ５タグ）
ＧＫＰＩＰＮＰＬＬＧＬＤＳＴ
【０１８４】
配列番号５１（Ｖ５タグ）
ＩＰＮＰＬＬＧＬＤ
【０１８５】
配列番号５２（Ｍｙｃタグ）
ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ
【０１８６】
配列番号５３（ＡＨＦタグ）
ＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥＧＧＨＨＨＨＨＨＤＹＫＤＤＤＤＫ
【０１８７】
配列番号５４（ＦＨＡタグ）
ＤＹＫＤＤＤＤＫＨＨＨＨＨＨＧＧＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ
【０１８８】
配列番号５５（ＣＤ８αリーダー配列）
ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰ
【０１８９】
配列番号５６（４－１ＢＢエンドドメイン）
ＫＲＧＲＫＫＬＬＹＩＦＫＱＰＦＭＲＰＶＱＴＴＱＥＥＤＧＣＳＣＲＦＰＥＥＥＥＧＧＣ
ＥＬ
【０１９０】
配列番号５７（ＣＤ２７エンドドメイン）
ＱＲＲＫＹＲＳＮＫＧＥＳＰＶＥＰＡＥＰＣＨＹＳＣＰＲＥＥＥＧＳＴＩＰＩＱＥＤＹＲ
ＫＰＥＰＡＣＳＰ
【０１９１】
配列番号５８（ヒトＩｇＧ１ヒンジ）
ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰ
【０１９２】
配列番号５９（トランケート型ＣＤ８αヒンジ）
ＴＴＴＰＡＰＲＰＰＴＰＡＰＴＩＡＳＱＰＬＳＬＲＰＥＡＣＲＰＡＡＧＧＡＶＨＴＲＧＬ
ＤＦＡＣＤ
【０１９３】
配列番号６０
ＭＩＨＬＧＨＩＬＦＬＬＬＬＰＶＡＡＡＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳ
ＧＣＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣＡＲＰＲＲＳＰＡＱ

ＥＤＧＫＶＹＩＮＭＰＧＲＧＹＦＬＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥ
ＳＰＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶＹＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫ

【０１９４】

配列番号６１

ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰＤＹＫＤＤＤＤＫＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰ
ＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳＧＣＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦ
ＹＦＬＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥＳＰＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶ
ＹＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫ

【０１９５】

配列番号６２

ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰＤＹＫＤＤＤＤＫＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣ
ＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣＡＲＰＲＲＳＰＡＱＥＤＧＫＶＹＩ
ＮＭＰＧＲＧＹＦＬＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥＳＰＹＱＥＬＱ
ＧＱＲＳＤＶＹＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫ

【０１９６】

配列番号６３

ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰＤＹＫＤＤＤＤＫＴＴＴＰＡＰＲＰＰＴＰ
ＡＰＴＩＡＳＱＰＬＳＬＲＰＥＡＣＲＰＡＡＧＧＡＶＨＴＲＧＬＤＦＡＣＤＬＬＡＧＬＶ
ＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣＡＲＰＲＲＳＰＡＱＥＤＧＫＶＹＩＮＭＰＧＲＧＹ
ＦＬＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥＳＰＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶＹ
ＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫ

【０１９７】

配列番号６４（構築物１／Ｎ１０１２）

ＭＩＨＬＧＨＩＬＦＬＬＬＬＰＶＡＡＡＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳ
ＧＣＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣＡＲＰＲＲＳＰＡＱ
ＥＤＧＫＶＹＩＮＭＰＧＲＧＹＦＬＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥ
ＳＰＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶＹＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫＲＲＫＲＳＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬ
ＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰＭＧＷＩＲＧＲＲＳＲＨＳＷＥＭＳＥＦＨＮＹＮＬＤＬＫＫＳ
ＤＦＳＴＲＷＱＫＱＲＣＰＶＶＫＳＫＣＲＥＮＡＳＰＦＦＦＣＣＦＩＡＶＡＭＧＩＲＦＩ
ＩＭＶＡＩＷＳＡＶＦＬＮＳＬＦＮＱＥＶＱＩＰＬＴＥＳＹＣＧＰＣＰＫＮＷＩＣＹＫＮ
ＮＣＹＱＦＦＤＥＳＫＮＷＹＥＳＱＡＳＣＭＳＱＮＡＳＬＬＫＶＹＳＫＥＤＱＤＬＬＫＬ
ＶＫＳＹＨＷＭＧＬＶＨＩＰＴＮＧＳＷＱＷＥＤＧＳＩＬＳＰＮＬＬＴＩＩＥＭＱＫＧＤ
ＣＡＬＹＡＳＳＦＫＧＹＩＥＮＣＳＴＰＮＴＹＩＣＭＱＲＴＶ

【０１９８】

配列番号６５（構築物３）

ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰＤＹＫＤＤＤＤＫＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰ
ＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳＧＣＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦ
ＹＦＬＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥＳＰＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶ
ＹＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫＲＲＫＲＳＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰＭＩ
ＨＬＧＨＩＬＦＬＬＬＬＰＶＡＡＡＱＴＴＰＧＥＲＳＳＬＰＡＦＹＰＧＴＳＧＳＣＳＧＣ
ＧＳＬＳＬＰＬＬＡＧＬＶＡＡＤＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦＬＣＡＲＰＲＲＳＰＡＱＥＤ
ＧＫＶＹＩＮＭＰＧＲＧＲＲＫＲＳＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰＭＧ
ＷＩＲＧＲＲＳＲＨＳＷＥＭＳＥＦＨＮＹＮＬＤＬＫＫＳＤＦＳＴＲＷＱＫＱＲＣＰＶＶ
ＫＳＫＣＲＥＮＡＳＰＦＦＦＣＣＦＩＡＶＡＭＧＩＲＦＩＩＭＶＡＩＷＳＡＶＦＬＮＳＬ
ＦＮＱＥＶＱＩＰＬＴＥＳＹＣＧＰＣＰＫＮＷＩＣＹＫＮＮＣＹＱＦＦＤＥＳＫＮＷＹＥ
ＳＱＡＳＣＭＳＱＮＡＳＬＬＫＶＹＳＫＥＤＱＤＬＬＫＬＶＫＳＹＨＷＭＧＬＶＨＩＰＴ
ＮＧＳＷＱＷＥＤＧＳＩＬＳＰＮＬＬＴＩＩＥＭＱＫＧＤＣＡＬＹＡＳＳＦＫＧＹＩＥＮ
ＣＳＴＰＮＴＹＩＣＭＱＲＴＶ

【０１９９】

配列番号６６（構築物８）

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCS
GCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQ
EDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETE
SPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKRRKRSGSGATNFSLL
KQAGDVEENPGPMGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKS
DFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAVAMGIRFI
IMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKN
NCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKL
VKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGD
CALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVRRKRSGSGEGRG
SLLTCGDVEENPGPMIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERS
SLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVG
AVFLCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE
EEGGCEL

【０２００】

配列番号６７（構築物９）

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCS
GCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQ
EDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETE
SPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKRRKRSGSGATNFSLL
KQAGDVEENPGPMGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKS
DFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAVAMGIRFI
IMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKN
NCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKL
VKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGD
CALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVRRKRSGSGEGRG
SLLTCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDD
DDKQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVA
ADAVASLLIVGAVFLCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE
EDGCSCRFPEEEEGGCEL

【０２０１】

配列番号６８（構築物１０）

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCS
GCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQ
EDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETE
SPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKRRKRSGSGATNFSLL
KQAGDVEENPGPMGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKS
DFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAVAMGIRFI
IMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKN
NCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKL
VKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGD
CALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVRRKRSGSGEGRG
SLLTCGDVEENPGPMIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERS
SLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVG
AVFLCQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPI
QEDYRKPEPACSP

【０２０２】

配列番号６９（構築物１１）

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCS
GCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQ

EDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETE
SPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKRRKRSGSGATNFSLL
KQAGDVEENPGPMGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKS
DFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAVAMGIRFI
IMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKN
NCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKL
VKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGD
CALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVRRKRSGSGEGRG
SLLTCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDD
DDKQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVA
ADAVASLLIVGAVFLCQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSC
PREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

【０２０３】

配列番号７０（配列番号６０のポリペプチドをコードする）

ATGATCCACCTGGGCCACATCCTGTTCCTGCTGCTGCTGC
CCGTGGCCGCTGCCCAGACCACCCCTGGCGAGCGGAGCAG
CCTGCCTGCCTTCTACCCTGGCACCAGCGGCAGCTGCAGC
GGCTGCGGCAGCCTGAGCCTGCCCCTGCTGGCCGGCCTGG
TGGCCGCCGACGCCGTGGCCAGCCTGCTGATCGTGGGCGC
CGTGTTCCTGTGCGCCAGGCCCCAGGCGGAGCCCtGCCCAG
GAGGACGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCGGCCGGGGCT
ACTTCCTGGGCAGGCTGGTGCCCAGGGGCAGGGGCGCTGC
CGAGGCTGCCACCCGGAAGCAGCGGATCACCGAGACCGAG
AGCCCCTACCAGGAGCTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTGT
ACAGCGACCTGAACACCCAGAGGCCCTACTACAAG

【０２０４】

配列番号７１（配列番号６１のポリペプチドをコードする）

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCTGCCTCTGGCTC
TGCTGCTGCACGCCGCTAGACCCGATTATAAGGACGACGA
CGACAAGCAGACCACCCCTGGCGAGCGGAGCAGCCTGCCT
GCCTTCTACCCTGGCACCAGCGGCAGCTGCAGCGGCTGCG
GCAGCCTGAGCCTGCCCCTGCTGGCtGGCCTGGTGGCCGC
CGACGCCGTGGCCAGCCTGCTGATCGTGGGCGCCGTGTTC
TACTTCCTGGGCAGGCTGGTGCCCAGGGGCAGGGGCGCTG
CCGAGGCTGCCACCCGGAAGCAGCGGATCACCGAGACCGA
GAGCCCCTACCAGGAGCTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTG
TACAGCGACCTGAACACCCAGAGGCCCTACTACAAG

【０２０５】

配列番号７２（配列番号６２のポリペプチドをコードする）

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCTGCCTCTGGCTC
TGCTGCTGCACGCCGCTAGACCCGATTATAAGGACGACGA
CGACAAGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACACACACATGC
CCTCTTctggccggCCTGGTGGCCGCCGACGCCGTGGCCA
GCCTGCTGATCGTGGGCGCCGTGTTCCTGTGCGCCAGGCC
CAGGCGGAGCCCtGCCCAGGAGGACGGCAAGGTGTACATC
AACATGCCCGGCCGGGGCTACTTCCTGGGCAGGCTGGTGC
CCAGGGGCAGGGGCGCTGCCGAGGCTGCCACCCGGAAGCA
GCGGATCACCGAGACCGAGAGCCCCTACCAGGAGCTGCAG
GGCCAGCGGAGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAGA
GGCCCTACTACAAG

【０２０６】

配列番号７３（配列番号６３のポリペプチドをコードする）

ＡＴＧＧＣＴＣＴＧＣＣＴＧＴＧＡＣＡＧＣＴＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＴＧＧＣＴＣ
ＴＧＣＴＧＣＴＧＣＡＣＧＣＣＧＣＴＡＧＡＣＣＣＧＡＴＴＡＴＡＡＧＧＡＣＧＡＣＧＡ
ＣＧＡＣＡＡＧＡＣＣＡＣＡＡＣＡＣＣＴＧＣＴＣＣＴＡＧＡＣＣＴＣＣＣＡＣＣＣＣＴ
ＧＣＴＣＣＣＡＣＣＡＴＣＧＣＣＡＧＣＣＡＧＣＣＣＣＴＧＡＧＣＣＴＧＡＧＡＣＣＣＧ
ＡＧＧＣＣＴＧＣＡＧＡＣＣＣＧＣＴＧＣＴＧＧＣＧＧＣＧＣＴＧＴＧＣＡＴＡＣＣＡＧ
ＡＧＧＣＣＴＧＧＡＴＴＴＣＧＣＣＴＧＣＧＡＣＣＴＴｃｔｇｇｃｃｇｇＣＣＴＧＧＴＧ
ＧＣＣＧＣＣＧＡＣＧＣＣＧＴＧＧＣＣＡＧＣＣＴＧＣＴＧＡＴＣＧＴＧＧＧＣＧＣＣＧ
ＴＧＴＴＣＣＴＧＴＧＣＧＣＣＡＧＧＣＣＣＡＧＧＣＧＧＡＧＣＣＣｔＧＣＣＣＡＧＧＡ
ＧＧＡＣＧＧＣＡＡＧＧＴＧＴＡＣＡＴＣＡＡＣＡＴＧＣＣＣＧＧＣＣＧＧＧＧＣＴＡＣ
ＴＴＣＣＴＧＧＧＣＡＧＧＣＴＧＧＴＧＣＣＣＡＧＧＧＧＣＡＧＧＧＧＣＧＣＴＧＣＣＧ
ＡＧＧＣＴＧＣＣＡＣＣＣＧＧＡＡＧＣＡＧＣＧＧＡＴＣＡＣＣＧＡＧＡＣＣＧＡＧＡＧ
ＣＣＣＣＴＡＣＣＡＧＧＡＧＣＴＧＣＡＧＧＧＣＣＡＧＣＧＧＡＧＣＧＡＣＧＴＧＴＡＣ
ＡＧＣＧＡＣＣＴＧＡＡＣＡＣＣＣＡＧＡＧＧＣＣＣＴＡＣＴＡＣＡＡＧ

【０２０７】

配列番号７４（配列番号６４／構築物１／Ｎ１０１２のポリペプチドをコードする）

ＡＴＧＡＴＣＣＡＣＣＴＧＧＧＣＣＡＣＡＴＣＣＴＧＴＴＣＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣ
ＣＣＧＴＧＧＣＣＧＣＴＧＣＣＣＡＧＡＣＣＡＣＣＣＣＴＧＧＣＧＡＧＣＧＧＡＧＣＡＧ
ＣＣＴＧＣＣＴＧＣＣＴＴＣＴＡＣＣＣＴＧＧＣＡＣＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＴＧＣＡＧＣ
ＧＧＣＴＧＣＧＧＣＡＧＣＣＴＧＡＧＣＣＴＧＣＣＣＣＴＧＣＴＧＧＣＣＧＧＣＣＴＧＧ
ＴＧＧＣＣＧＣＣＧＡＣＧＣＣＧＴＧＧＣＣＡＧＣＣＴＧＣＴＧＡＴＣＧＴＧＧＧＣＧＣ
ＣＧＴＧＴＴＣＣＴＧＴＧＣＧＣＣＡＧＧＣＣＣＡＧＧＣＧＧＡＧＣＣＣｔＧＣＣＣＡＧ
ＧＡＧＧＡＣＧＧＣＡＡＧＧＴＧＴＡＣＡＴＣＡＡＣＡＴＧＣＣＣＧＧＣＣＧＧＧＧＣＴ
ＡＣＴＴＣＣＴＧＧＧＣＡＧＧＣＴＧＧＴＧＣＣＣＡＧＧＧＧＣＡＧＧＧＧＣＧＣＴＧＣ
ＣＧＡＧＧＣＴＧＣＣＡＣＣＣＧＧＡＡＧＣＡＧＣＧＧＡＴＣＡＣＣＧＡＧＡＣＣＧＡＧ
ＡＧＣＣＣＣＴＡＣＣＡＧＧＡＧＣＴＧＣＡＧＧＧＣＣＡＧＣＧＧＡＧＣＧＡＣＧＴＧＴ
ＡＣＡＧＣＧＡＣＣＴＧＡＡＣＡＣＣＣＡＧＡＧＧＣＣＣＴＡＣＴＡＣＡＡＧＡＧＧＣＧ
ＧＡＡＡＡＧＧＴＣＴＧＧＧＡＧＴＧＧＧＧＣＴＡＣＣＡＡＴＴＴＣＴＣＴＣＴＣＣＴＣ
ＡＡＧＣＡＡＧＣＣＧＧＡＧＡＣＧＴＴＧＡＧＧＡＡＡＡＣＣＣＴＧＧａＣＣｃＡＴＧＧ
ＧＣＴＧＧＡＴＣＣＧＧＧＧＡＣＧＧＡＧＧＡＧＣＣＧＧＣＡＣＡＧＣＴＧＧＧＡＧＡＴ
ＧＡＧＣＧＡＧＴＴＣＣＡＣＡＡＣＴＡＣＡＡＣＣＴＧＧＡＣＣＴＧＡＡＧＡＡＧＡＧＣ
ＧＡＣＴＴＣＡＧＣＡＣＣＣＧＧＴＧＧＣＡＧＡＡＧＣＡＧＣＧＧＴＧＣＣＣＣＧＴＧＧ
ＴＧＡＡＧＡＧＣＡＡＧＴＧＣＣＧＧＧＡＧＡＡＣＧＣＣＡＧＣＣＣＣＴＴＣＴＴＣＴＴ
ＣＴＧＣＴＧＣＴＴＣＡＴＣＧＣＣＧＴＧＧＣｔＡＴＧＧＧＣＡＴＣＣＧＧＴＴＣＡＴＣ
ＡＴＣＡＴＧＧＴＧＧＣＣＡＴＣＴＧＧＡＧＣＧＣＣＧＴＧＴＴＣＣＴＧＡＡＣＡＧＣＣ
ＴＧＴＴＣＡＡＣＣＡＧＧＡＧＧＴＧＣＡＧＡＴＣＣＣＣＣＴＧＡＣＣＧＡＧＡＧＣＴＡ
ＣＴＧＣＧＧＣＣＣＣＴＧＣＣＣＣＡＡＧＡＡＣＴＧＧＡＴＣＴＧＣＴＡＣＡＡＧＡＡＣ
ＡＡＣＴＧＣＴＡＣＣＡＧＴＴＣＴＴＣＧＡＣＧＡＧＡＧＣＡＡＧＡＡＣＴＧＧＴＡＣＧ
ＡＧＡＧＣＣＡＧＧＣＣＡＧＣＴＧＣＡＴＧＡＧＣＣＡＧＡＡＣＧＣＣＡＧＣＣＴＧＣＴ
ＧＡＡＧＧＴＧＴＡＣＡＧＣＡＡＧＧＡＧＧＡＣＣＡＧＧＡＣＣＴＧＣＴＧＡＡＧＣＴＧ
ＧＴＧＡＡＧＡＧＣＴＡＣＣＡＣＴＧＧＡＴＧＧＧＣＣＴＧＧＴＧＣＡＣＡＴＣＣＣＣＡ
ＣＣＡＡＣＧＧＣＡＧＣＴＧＧＣＡＧＴＧＧＧＡＧＧＡＣＧＧＣＡＧＣＡＴＣＣＴＧＡＧ
ＣＣＣＣＡＡＣＣＴＧＣＴＧＡＣＣＡＴＣＡＴＣＧＡＧＡＴＧＣＡＧＡＡＧＧＧＣＧＡＣ
ＴＧＣＧＣＣＣＴＧＴＡＣＧＣＣＡＧＣＡＧＣＴＴＣＡＡＧＧＧＣＴＡＣＡＴＣＧＡＧＡ
ＡＣＴＧＣＡＧＣＡＣＣＣＣＣＡＡＣＡＣＣＴＡＣＡＴＣＴＧＣＡＴＧＣＡＧＣＧＧＡＣ
ＣＧＴＧ

【０２０８】

配列番号７５（配列番号６５／構築物３のポリペプチドをコードする）

ＡＴＧＧＣＴＣＴＧＣＣＴＧＴＧＡＣＡＧＣＴＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＴＧＧＣＴＣ

TGCTGCTGCACGCCGCTAGACCCGATTATAAGGACGACGA
CGACAAGCAGACCACCCCTGGCGAGCGGAGCAGCCTGCCT
GCCTTCTACCCTGGCACCAGCGGCAGCTGCAGCGGCTGCG
GCAGCCTGAGCCTGCCCCTGCTGGCtGGCCTGGTGGCCGC
CGACGCCGTGGCCAGCCTGCTGATCGTGGGCGCCGTGTTC
TACTTCCTGGGCAGGCTGGTGCCCAGGGGCAGGGGCGCTG
CCGAGGCTGCCACCCGGAAGCAGCGGATCACCGAGACCGA
GAGCCCCTACCAGGAGCTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTG
TACAGCGACCTGAACACCCAGAGGCCCTACTACAAGCGGA
GAAAGCGCtccGGCTCCGGCGAGGGCcgcGGCAGCCTGCT
GACCTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCCATGATC
CACCTGGGCCACATCCTGTTCCTGCTGCTGCTGCCCGTGG
CCGCTGCCCAAACAACACCGGCGAGAGATCCTCCTTGCC
CGCTTTCTATCCCGGAACATCCGGAAGCTGTtccggaTGT
GGATCCCTTTCTTTGccttgCTTGCTGGATTGGTCGCAG
CTGACGCTGTCGCTTCCCTCCTTATTGTCGGAGCTGTCTT
CCTGTGCGCCAGGCCCAGGCGGAGCCCtGCCCAGGAGGAC
GGCAAGGTGTACATCAACATGCCCGGCCGGGGCAGGCGGa
agcgctccGGGAGTGGGGCTACCAATTTCTCTCTCCTCAA
GCAAGCCGGAGACGTTGAGGAAAACCCTGGaCCcATGGGC
TGGATCCGGGGACGGAGGAGCCGGCACAGCTGGGAGATGA
GCGAGTTCCACAACTACAACCTGGACCTGAAGAAGAGCGA
CTTCAGCACCCGGTGGCAGAAGCAGCGGTGCCCCGTGGTG
AAGAGCAAGTGCCGGGAGAACGCCAGCCCCTTCTTCTTCT
GCTGCTTCATCGCCGTGGCtATGGGCATCCGGTTCATCAT
CATGGTGGCCATCTGGAGCGCCGTGTTCCTGAACAGCCTG
TTCAACCAGGAGGTGCAGATCCCCCTGACCGAGAGCTACT
GCGGCCCCTGCCCCAAGAACTGGATCTGCTACAAGAACAA
CTGCTACCAGTTCTTCGACGAGAGCAAGAACTGGTACGAG
AGCCAGGCCAGCTGCATGAGCCAGAACGCCAGCCTGCTGA
AGGTGTACAGCAAGGAGGACCAGGACCTGCTGAAGCTGGT
GAAGAGCTACCACTGGATGGGCCTGGTGCACATCCCCACC
AACGGCAGCTGGCAGTGGGAGGACGGCAGCATCCTGAGCC
CCAACCTGCTGACCATCATCGAGATGCAGAAGGGCGACTG
CGCCCTGTACGCCAGCAGCTTCAAGGGCTACATCGAGAAC
TGCAGCACCCCCAACACCTACATCTGCATGCAGCGGACCG
TG

【０２０９】

配列番号７６（配列番号６６／構築物８のポリペプチドをコードする）

ATGATCCACCTGGGCCACATCCTGTTCCTGCTGCTGCTGC
CCGTGGCCGCTGCCCAGACCACCCCTGGCGAGCGGAGCAG
CCTGCCTGCCTTCTACCCTGGCACCAGCGGCAGCTGCAGC
GGCTGCGGCAGCCTGAGCCTGCCCCTGCTGGCCGGCCTGG
TGGCCGCCGACGCCGTGGCCAGCCTGCTGATCGTGGGCGC
CGTGTTCCTGTGCGCCAGGCCCAGGCGGAGCCCtGCCCAG
GAGGACGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCGGCCGGGGCT
ACTTCCTGGGCAGGCTGGTGCCCAGGGGCAGGGGCGCTGC
CGAGGCTGCCACCCGGAAGCAGCGGATCACCGAGACCGAG
AGCCCCTACCAGGAGCTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTGT
ACAGCGACCTGAACACCCAGAGGCCCTACTACAAGAGGCG

GAAAAGGTCTGGGAGTGGGGCTACCAATTTCTCTCCTC
AAGCAAGCCGGAGACGTTGAGGAAAACCCTGGaCCcATGG
GCTGGATCCGGGGACGGAGGAGCCGGCACAGCTGGGAGAT
GAGCGAGTTCCACAACTACAACCTGGACCTGAAGAAGAGC
GACTTCAGCACCCGGTGGCAGAAGCAGCGGTGCCCCGTGG
TGAAGAGCAAGTGCCGGGAGAACGCCAGCCCCTTCTTCTT
CTGCTGCTTCATCGCCGTGGCtATGGGCATCCGGTTCATC
ATCATGGTGGCCATCTGGAGCGCCGTGTTCCTGAACAGCC
CTGCGGCCCCTGCCCCAAGAACTGGATCTGCTACAAGAAC
AACTGCTACCAGTTCTTCGACGAGAGCAAGAACTGGTACG
AGAGCCAGGCCAGCTGCATGAGCCAGAACGCCAGCCTGCT
GAAGGTGTACAGCAAGGAGGACCAGGACCTGCTGAAGCTG
GTGAAGAGCTACCACTGGATGGGCCTGGTGCACATCCCCA
CCAACGGCAGCTGGCAGTGGGAGGACGGCAGCATCCTGAG
CCCCAACCTGCTGACCATCATCGAGATGCAGAAGGGCGAC
TGCGCCCTGTACGCCAGCAGCTTCAAGGGCTACATCGAGA
ACTGCAGCACCCCCAACACCTACATCTGCATGCAGCGGAC
CGTGAGAAGAAAGAAGAAGCGGCAGCGGCGAGGGCAGAGGC
AGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGAC
ccATGATTCATCTCGGACATATTCTCTTTCTCTTGCTCTT
GCCTGTCGCTGCCGCTCAAACAACTCCCGGAGAAAGATCT
TCTCTCCCCGCTTTTTATCCCGGAACATCTGGATCTTGTT
CTGGATGTGGATCTTTGTCTCTCCCTCTCCTCGCTGGACT
CGTCGCAGCTGATGCTGTCGCTTCTCTCTTGATTGTCGGA
GCTGTCTTTTTGTGTAAGAGAGGCAGAAAGAAGCTGCTGT
ACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGACCCGTGCAGACCAC
CCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCAGATTCCCCGAGGAG
GAGGAGGGCGGCTGCGAGCTG

【０２１０】

配列番号７７（配列番号６７／構築物９のポリペプチドをコードする）

ATGATCCACCTGGGCCACATCCTGTTCCTGCTGCTGCTGC
CCGTGGCCCGCTGCCCAGACCACCCCTGGCGAGCGGAGCAG
CCTGCCTGCCTTCTACCCTGGCACCAGCGGCAGCTGCAGC
GGCTGCGGCAGCCTGAGCCTGCCCCTGCTGGCCGGCCTGG
TGGCCGCCGACGCCGTGGCCAGCCTGCTGATCGTGGGCGC
CGTGTTCCTGTGCGCCAGGCCCAGGCGGAGCCCtGCCCAG
GAGGACGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCGGCCGGGGCT
ACTTCCTGGGCAGGCTGGTGCCCAGGGGCAGGGGCGCTGC
CGAGGCTGCCACCCGGAAGCAGCGGATCACCGAGACCGAG
AGCCCCTACCAGGAGCTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTGT
ACAGCGACCTGAACACCCAGAGGCCCTACTACAAGAGGCG
GAAAAGGTCTGGGAGTGGGGCTACCAATTTCTCTCCTC
AAGCAAGCCGGAGACGTTGAGGAAAACCCTGGaCCcATGG
GCTGGATCCGGGGACGGAGGAGCCGGCACAGCTGGGAGAT
GAGCGAGTTCCACAACTACAACCTGGACCTGAAGAAGAGC
GACTTCAGCACCCGGTGGCAGAAGCAGCGGTGCCCCGTGG
TGAAGAGCAAGTGCCGGGAGAACGCCAGCCCCTTCTTCTT
CTGCTGCTTCATCGCCGTGGCtATGGGCATCCGGTTCATC
ATCATGGTGGCCATCTGGAGCGCCGTGTTCCTGAACAGCC

TGTTCAACCAGGAGGTGCAGATCCCCCTGACCGAGAGCTA
CTGCGGCCCCTGCCCCAAGAACTGGATCTGCTACAAGAAC
AACTGCTACCAGTTCTTCGACGAGAGCAAGAACTGGTACG
AGAGCCAGGCCAGCTGCATGAGCCAGAACGCCAGCCTGCT
GAAGGTGTACAGCAAGGAGGACCAGGACCTGCTGAAGCTG
GTGAAGAGCTACCACTGGATGGGCCTGGTGCACATCCCCA
CCAACGGCAGCTGGCAGTGGGAGGACGGCAGCATCCTGAG
CCCCAACCTGCTGACCATCATCGAGATGCAGAAGGGCGAC
TGCGCCCTGTACGCCAGCAGCTTCAAGGGCTACATCGAGA
ACTGCAGCACCCCCAACACCTACATCTGCATGCAGCGGAC 10
CGTGAGAAGAAAGAGAAGCGGCAGCGGCGAGGGCAGAGGC
AGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGAC
cTatggctctgcctgtgacagctctgctgctgcctctggc
tctgctgctgcacgccgctagacccgattataaggacgac
gacgacaagCAAACAACTCCCGGAGAAAGATCTTCTCTCC
CCGCTTTTTATCCCGGAACATCTGGATCTTGTTCTGGATG
TGGATCTTTGTCTCTCCCTCTCCTCGCTGGACTCGTCGCA
GCTGATGCTGTCGCTTCTCTCTTGATTGTCGGAGCTGTCT
TTTGTGTAAGAGAGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTT
CAAGCAGCCCTTCATGAGACCCGTGCAGACCACCCAGGAG 20
GAGGACGGCTGCAGCTGCAGATTCCCCGAGGAGGAGGAGG
GCGGCTGCGAGCTG

【０２１１】

配列番号７８（配列番号６８／構築物１０のポリペプチドをコードする）

ATGATCCACCTGGGCCACATCCTGTTCCTGCTGCTGCTGC
CCGTGGCCGCTGCCCAGACCACCCCTGGCGAGCGGAGCAG
CCTGCCTGCCTTCTACCCTGGCACCAGCGGCAGCTGCAGC
GGCTGCGGCAGCCTGAGCCTGCCCCTGCTGGCCGGCCTGG
TGGCCGCCGACGCCGTGGCCAGCCTGCTGATCGTGGGCGC
CGTGTTCCTGTGCGCCAGGCCCAGGCGGAGCCCtGCCCAG 30
GAGGACGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCGGCCGGGGCT
ACTTCCTGGGCAGGCTGGTGCCCAGGGGCAGGGGCGCTGC
CGAGGCTGCCACCCGGAAGCAGCGGATCACCGAGACCGAG
AGCCCCTACCAGGAGCTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTGT
ACAGCGACCTGAACACCCAGAGGCCCTACTACAAGAGGCG
GAAAAGGTCTGGGAGTGGGGCTACCAATTTCTCTCTCCTC
AAGCAAGCCGGAGACGTTGAGGAAAACCCTGGaCCcATGG
GCTGGATCCGGGGACGGAGGAGCCGGCACAGCTGGGAGAT
GAGCGAGTTCCACAACTACAACCTGGACCTGAAGAAGAGC
GACTTCAGCACCCGGTGGCAGAAGCAGCGGTGCCCCGTGG 40
TGAAGAGCAAGTGCCGGGAGAACGCCAGCCCCTTCTTCTT
CTGCTGCTTCATCGCCGTGGCtATGGGCATCCGGTTCATC
ATCATGGTGGCCATCTGGAGCGCCGTGTTCCTGAACAGCC
TGTTCAACCAGGAGGTGCAGATCCCCCTGACCGAGAGCTA
CTGCGGCCCCTGCCCCAAGAACTGGATCTGCTACAAGAAC
AACTGCTACCAGTTCTTCGACGAGAGCAAGAACTGGTACG
AGAGCCAGGCCAGCTGCATGAGCCAGAACGCCAGCCTGCT
GAAGGTGTACAGCAAGGAGGACCAGGACCTGCTGAAGCTG
GTGAAGAGCTACCACTGGATGGGCCTGGTGCACATCCCCA
CCAACGGCAGCTGGCAGTGGGAGGACGGCAGCATCCTGAG 50

CCCCAACCTGCTGACCATCATCGAGATGCAGAAGGGCGAC
TGCGCCCTGTACGCCAGCAGCTTCAAGGGCTACATCGAGA
ACTGCAGCACCCCCCAACACCTACATCTGCATGCAGCGGAC
CGTGAGAAGAAAGAAAGAGAAGCGGCAGCGGCGAGGGCAGAGGC
AGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGAC
ccATGATTCATCTCGGACATATTCTCTTTCTCTTGCTCTT
GCCTGTCGCTGCCGCTCAAACAACTCCCGGAGAAAGATCT
TCTCTCCCCGCTTTTTATCCCGGAACATCTGGATCTTGTT
CTGGATGTGGATCTTTGTCTCCTCCCTCTCCTCGCTGGACT
CGTCGCAGCTGATGCTGTCGCTTCTCTCTTGATTGTCGGA
GCTGTCTTTTTGTGTCAGAGGCGGAAGTACCGGAGCAACA
AGGGCGAGAGCCCCGTGGAGCCTGCCGAGCCCTGCCACTA
CAGCTGTCCCCGGGAGGAGGAGGGCAGCACCATCCCCATC
CAGGAGGACTACCGGAAGCCCGAGCCTGCCTGCAGCCCC
【０２１２】
配列番号７９（配列番号６９／構築物１１のポリペプチドをコードする）
ATGATCCACCTGGGCCACATCCTGTTCCTGCTGCTGCTGC
CCGTGGCCGCTGCCCAGACCACCCCTGGCGAGCGGAGCAG
CCTGCCTGCCTTCTACCCTGGCACCAGCGGCAGCTGCAGC
GGCTGCGGCAGCCTGAGCCTGCCCCTGCTGGCCGGCCTGG
TGGCCGCCGACGCCGTGGCCAGCCTGCTGATCGTGGGCGC
CGTGTTCCTGTGCGCCAGGCCCAGGCGGAGCCCtGCCCAG
GAGGACGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCGGCCGGGGCT
ACTTCCTGGGCAGGCTGGTGCCCAGGGGCAGGGGCGCTGC
CGAGGCTGCCACCCGGAAGCAGCGGATCACCGAGACCGAG
AGCCCCTACCAGGAGCTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTGT
ACAGCGACCTGAACACCCAGAGGCCCTACTACAAGAGGCG
GAAAAGGTCTGGGAGTGGGGCTACCAATTTCTCTCTCCTC
AAGCAAGCCGGAGACGTTGAGGAAAACCCTGGaCCcATGG
GCTGGATCCGGGGACGGAGGAGCCGGCACAGCTGGGAGAT
GAGCGAGTTCCACAACTACAACCTGGACCTGAAGAAGAGC
GACTTCAGCACCCGGTGGCAGAAGCAGCGGTGCCCCGTGG
TGAAGAGCAAGTGCCGGGAGAACGCCAGCCCCTTCTTCTT
CTGCTGCTTCATCGCCGTGGCtATGGGCATCCGGTTCATC
ATCATGGTGGCCATCTGGAGCGCCGTGTTCCTGAACAGCC
TGTTCAACCAGGAGGTGCAGATCCCCCTGACCGAGAGCTA
CTGCGGCCCCTGCCCCAAGAACTGGATCTGCTACAAGAAC
AACTGCTACCAGTTCTTCGACGAGAGCAAGAACTGGTACG
AGAGCCAGGCCAGCTGCATGAGCCAGAACGCCAGCCTGCT
GAAGGTGTACAGCAAGGAGGACCAGGACCTGCTGAAGCTG
GTGAAGAGCTACCACTGGATGGGCCTGGTGCACATCCCCA
CCAACGGCAGCTGGCAGTGGGAGGACGGCAGCATCCTGAG
CCCCAACCTGCTGACCATCATCGAGATGCAGAAGGGCGAC
TGCGCCCTGTACGCCAGCAGCTTCAAGGGCTACATCGAGA
ACTGCAGCACCCCCCAACACCTACATCTGCATGCAGCGGAC
CGTGAGAAGAAAGAAAGAGAAGCGGCAGCGGCGAGGGCAGAGGC
AGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGAC
cTatggctctgcctgtgacagctctgctgctgcctctggc
tctgctgctgcacgccgctagacccgattataaggacgac
gacgacaagCAAACAACTCCCGGAGAAAGATCTTCTCTCC

ＣＣＧＣＴＴＴＴＴＡＴＣＣＣＧＧＡＡＣＡＴＣＴＧＧＡＴＣＴＴＧＴＴＣＴＧＧＡＴＧ
ＴＧＧＡＴＣＴＴＴＧＴＣＴＣＴＣＣＣＴＣＴＣＣＴＣＧＣＴＧＧＡＣＴＣＧＴＣＧＣＡ
ＧＣＴＧＡＴＧＣＴＧＴＣＧＣＴＴＣＴＣＴＣＴＴＧＡＴＴＧＴＣＧＧＡＧＣＴＧＴＣＴ
ＴＴＴＴＧＴＧＴＣＡＧＡＧＧＣＧＧＡＡＧＴＡＣＣＧＧＡＧＣＡＡＣＡＡＧＧＧＣＧＡ
ＧＡＧＣＣＣＣＧＴＧＧＡＧＣＣＴＧＣＣＧＡＧＣＣＣＴＧＣＣＡＣＴＡＣＡＧＣＴＧＴ
ＣＣＣＣＧＧＧＡＧＧＡＧＧＡＧＧＧＣＡＧＣＡＣＣＡＴＣＣＣＣＡＴＣＣＡＧＧＡＧＧ
ＡＣＴＡＣＣＧＧＡＡＧＣＣＣＧＡＧＣＣＴＧＣＣＴＧＣＡＧＣＣＣＣ

【０２１３】

配列番号８０（Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド）

ＮＡＶＰＮＬＲＧＤＬＱＶＬＡＱＫＶＡＲＴ

【０２１４】

配列番号８１（ＣＤ１２４シグナルペプチド）

ＭＧＷＬＣＳＧＬＬＦＰＶＳＣＬＶＬＬＱＶＡＳＳＧＮ

【０２１５】

配列番号８２（ＣＤ２８　ａａ１１４～２２０）

ＩＥＶＭＹＰＰＰＹＬＤＮＥＫＳＮＧＴＩＩＨＶＫＧＫＨＬＣＰＳＰＬＦＰＧＰＳＫＰＦ
ＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶＲＳＫＲＳＲＬＬＨＳＤＹＭＮ
ＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨＹＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲＳ

【０２１６】

配列番号８３（ＣＤ２４７　ａａ５２～１６４）

ＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧ
ＲＤＰＥＭＧＧＫＰＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲ
ＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲ

【０２１７】

配列番号８４（ＷＯ２０１９／１８２４２５の配列番号１）

ＭＧＷＳＣＩＩＬＦＬＶＡＴＡＴＧＶＨＳＱＩＱＬＶＱＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳ
ＣＫＴＳＧＹＴＦＴＤＹＳＭＨＷＶＮＱＡＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＥＴＧＥＰＴＹＴ
ＤＤＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＹＬＱＩＮＮＬＫＮＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲ　ＴＡ
ＶＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＧＥＧＳＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳ
ＡＳＬＧＥＲＶＳＬＴＣＲＡＳＱＥＩＳＧＳＬＳＷＬＱＱＫＰＤＧＴＩＫＲＬＩＹＡＡＳ
ＴＬＮＳＧＶＰＫＲＦＳＧＲＲＳＧＳＤＹＳＬＴＩＳＳＬＥＳＥＤＦＶＤＹＹＣＬＱＹＳ
ＳＹＰＷＳＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＥＰＫＳＰＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＳＨＴＱＰＬＧＶＦＬ
ＦＰＰＫＰＫＤＱＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶ
ＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫ
ＶＳＮＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴＫＮＱ
ＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧ
ＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷＱＥＧＮＶＦＳＣＳＶＬＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳ
ＬＳＬＧＫＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶＡＲＰＲＲＳＰＡ
ＱＥＤＧＫＶＹＩＮＭＰＧＲＧＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥＳＰ
ＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶＹＳＤＬＮＴＱＲＰＹＹＫＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱ
ＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧＲＤＰＥＭＧＧＫＰＱＲＲＫＮＰＱＥ
ＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡ
ＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲ

【０２１８】

配列番号８５（ＷＯ２０１９／１８２４２５の配列番号９）

ＡＲＰＲＲＳＰＡＱＥＤＧＫＶＹＩＮＭＰＧＲＧ

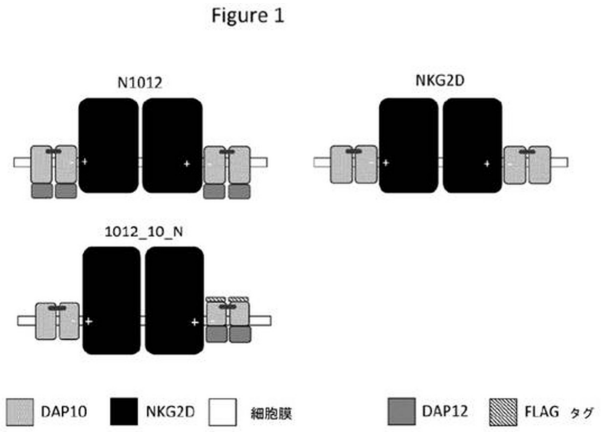
【０２１９】

配列番号８６（ＷＯ２０１９／１８２４２５の配列番号１１）

ＧＲＬＶＰＲＧＲＧＡＡＥＡＡＴＲＫＱＲＩＴＥＴＥＳＰＹＱＥＬＱＧＱＲＳＤＶＹＳＤ
ＬＮＴＱＲＰＹＹＫ

【図面】

【図１】



【図２】

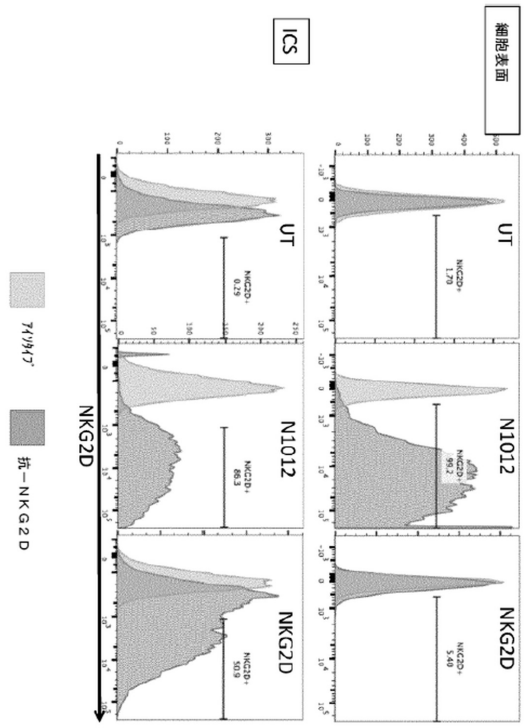


Figure 2

【図３】

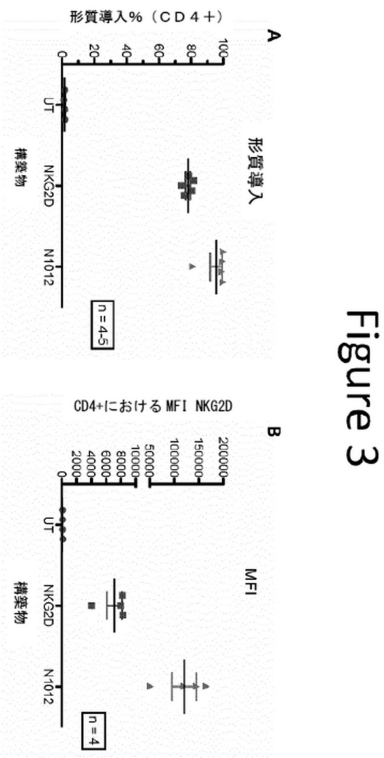


Figure 3

【図４】

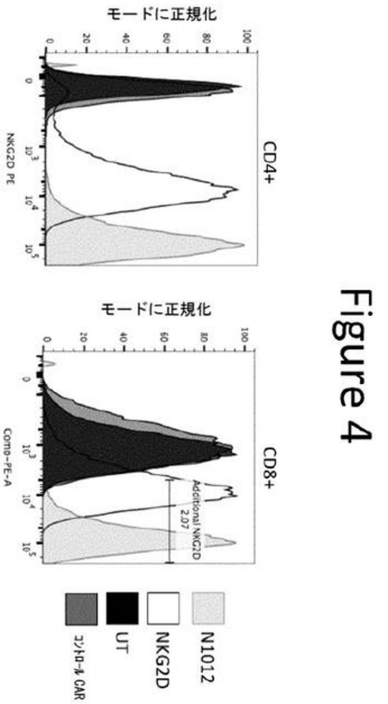


Figure 4

【図５】

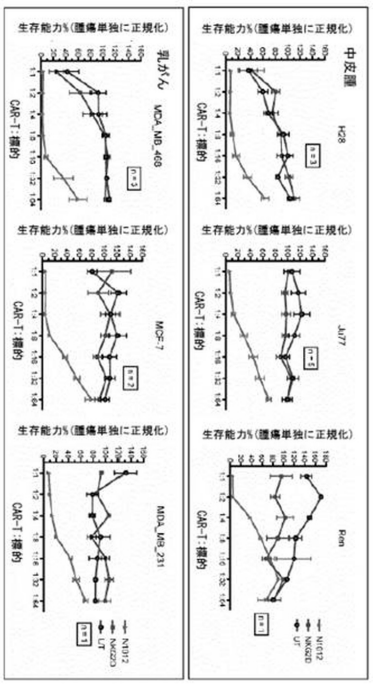


Figure 5

【図５－ＣＯＮＴ】

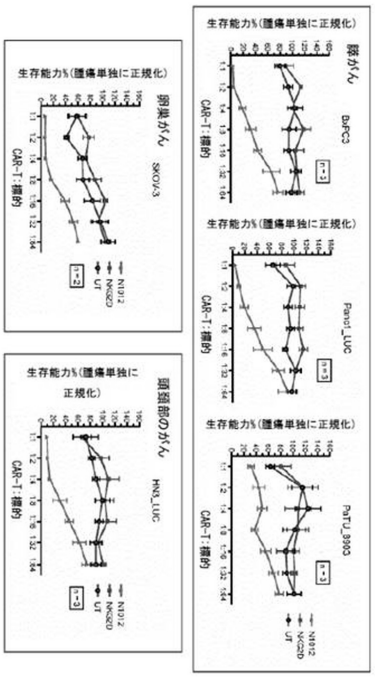


図５（続き）

【図６Ａ】

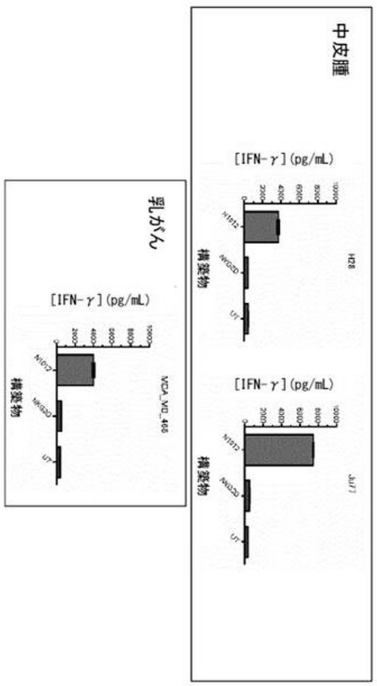


図６Ａ；ＩＦＮ－γ

【図６Ａ－ＣＯＮＴ】

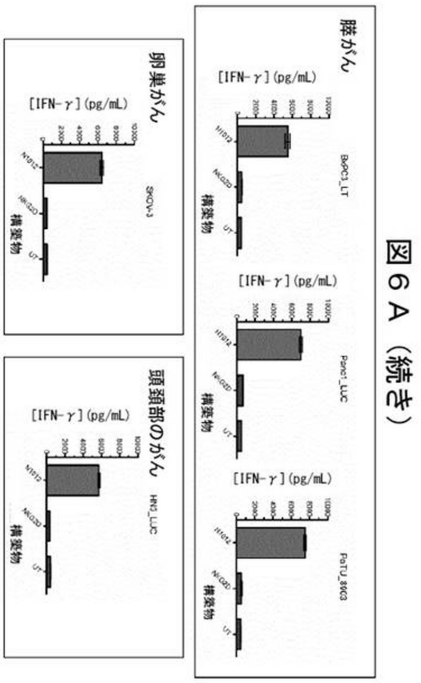


図６Ａ（続き）

【図６Ｂ】

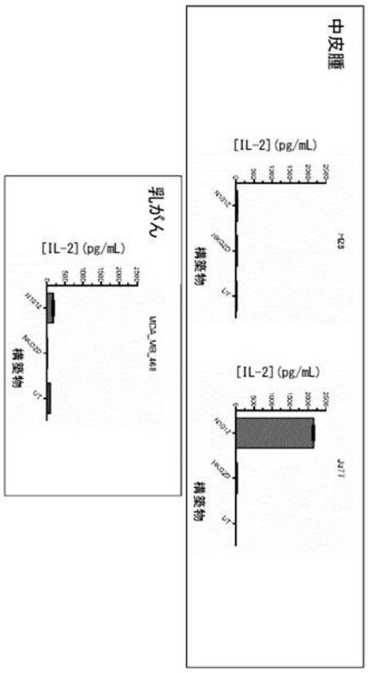


図６Ｂ；ＩＬ－２

【図６Ｂ－ＣＯＮＴ】

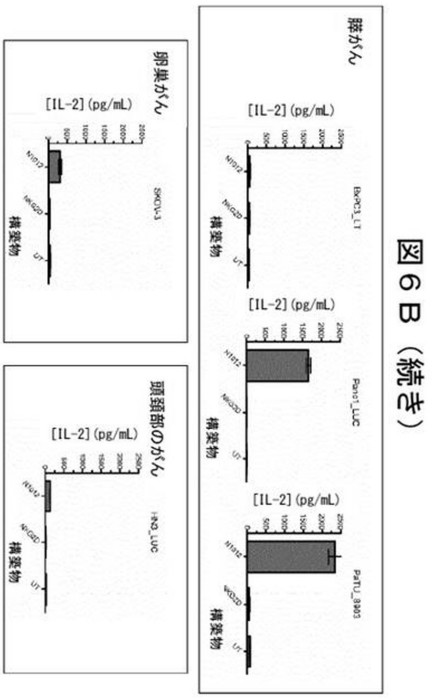


図６Ｂ（続き）

【図７】

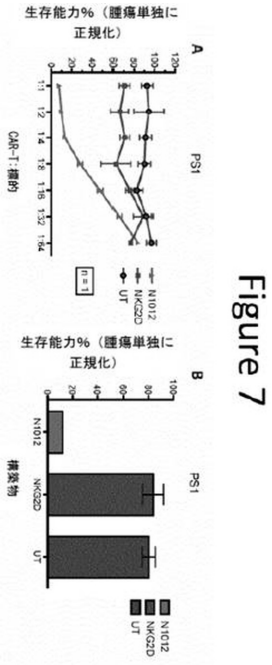


Figure 7

【図７－ＣＯＮＴ－１】

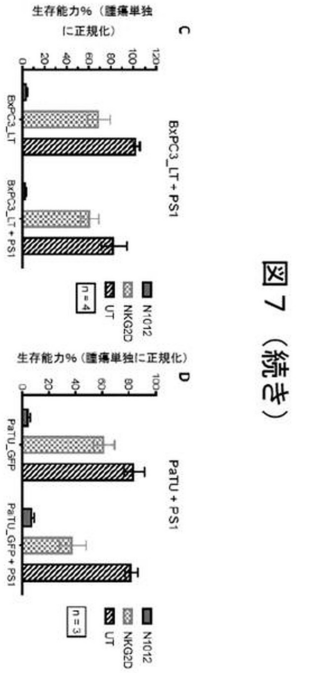


図７（続き）

【図７－ＣＯＮＴ－２】

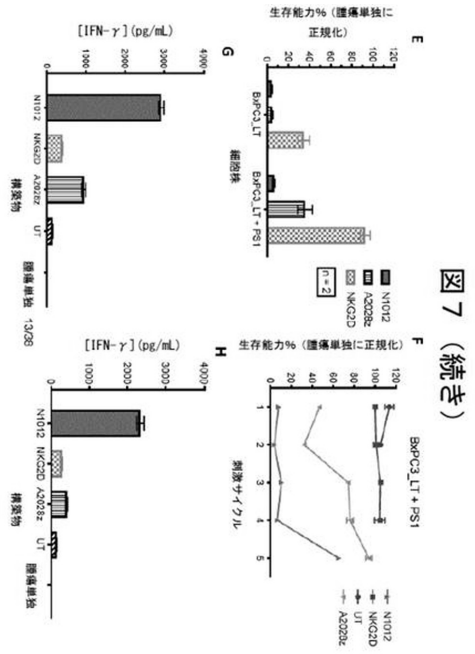
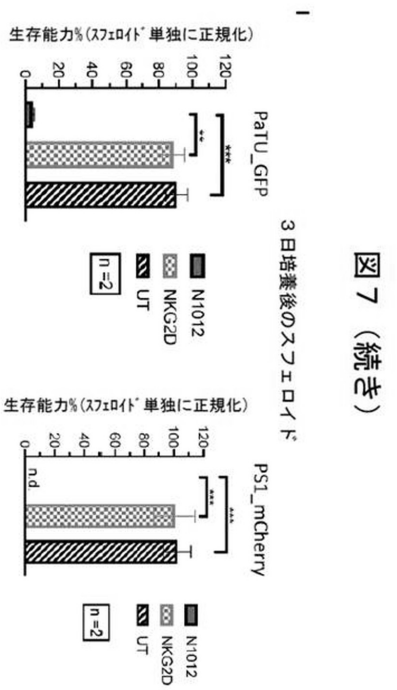


図７（続き）

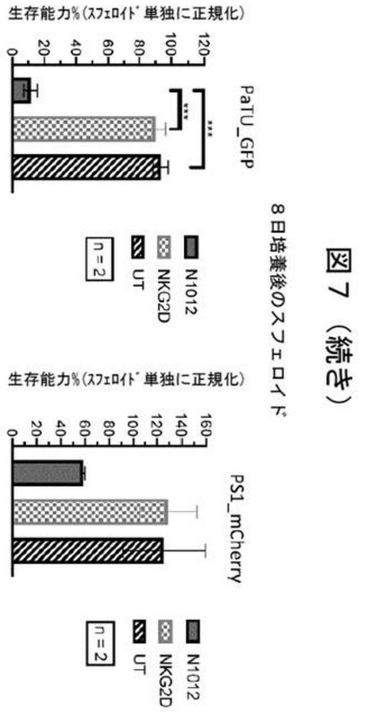
【図７－ＣＯＮＴ－３】



3日培養後のスフェロイド

図７（続き）

【図７－ＣＯＮＴ－４】

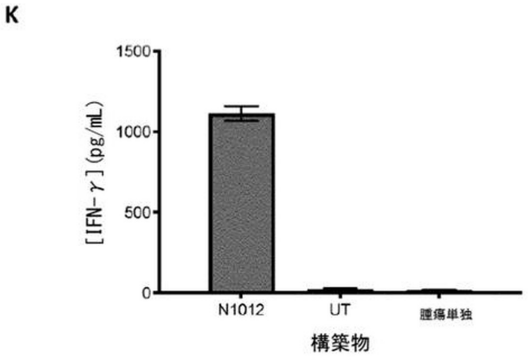


8日培養後のスフェロイド

図７（続き）

【図７－ＣＯＮＴ－５】

図７（続き）



【図８Ａ】

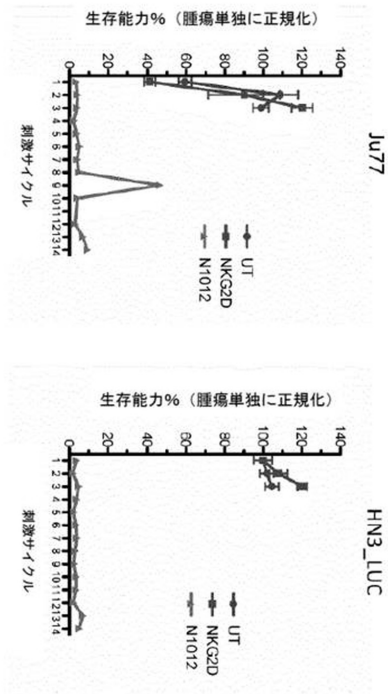


Figure 8A

【図８Ｂ】

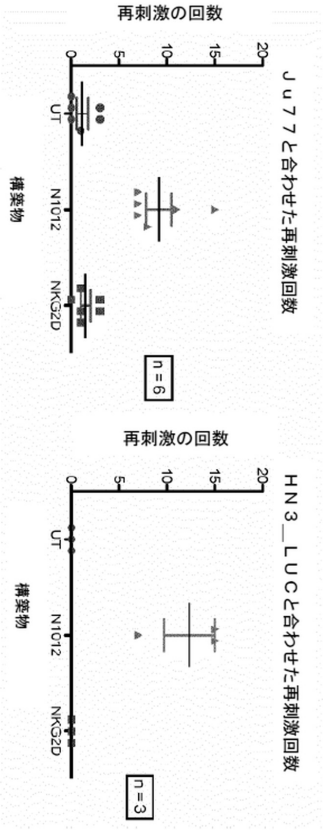


Figure 8B

【図８Ｃ】

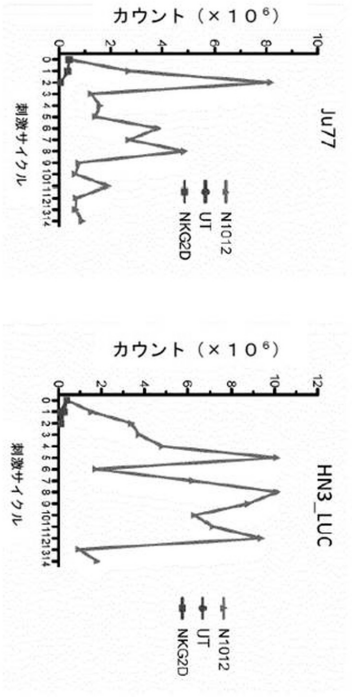


Figure 8C

【図８Ｂ－ＣＯＮＴ】

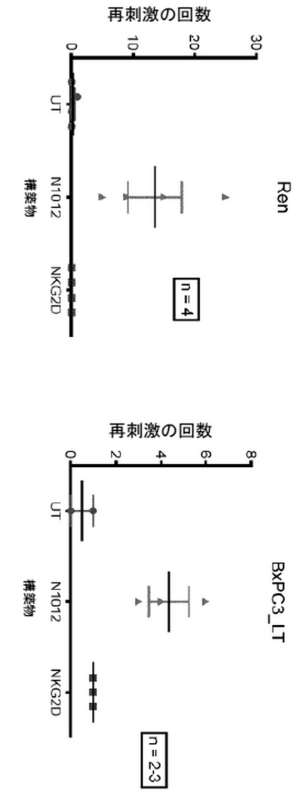


図８Ｂ（続き）

【図８Ｄ】

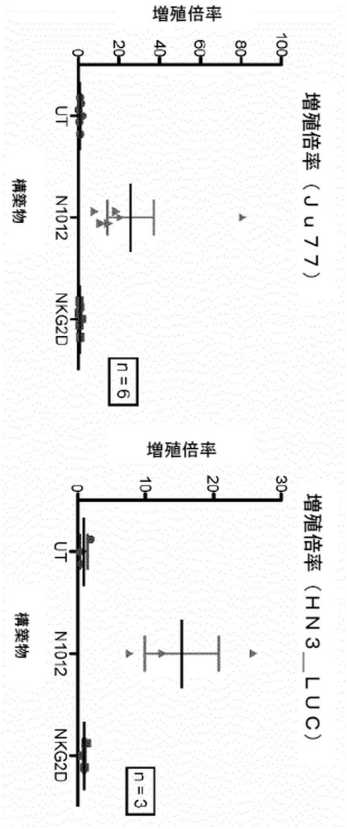
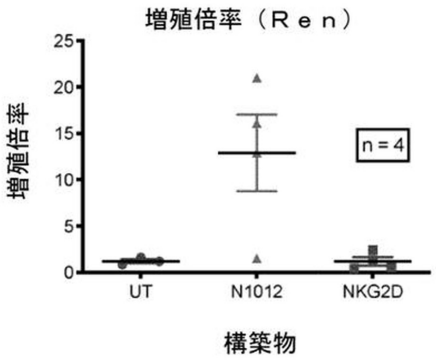


Figure 8D

【図８Ｄ－ＣＯＮＴ】

図８Ｄ（続き）



【図９Ａ】

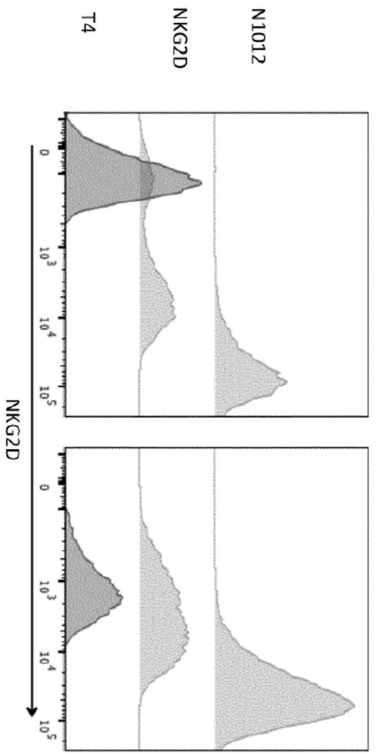
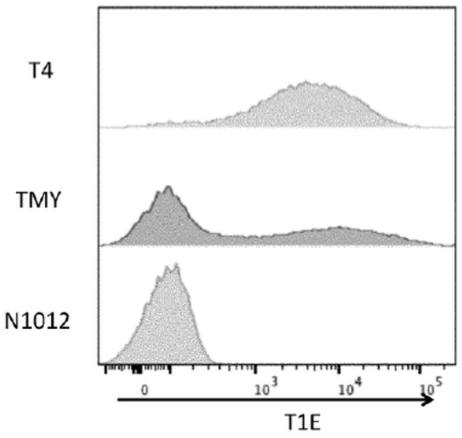


Figure 9A

【図９Ａ－ＣＯＮＴ】

図９Ａ（続き）



【図９Ｂ】

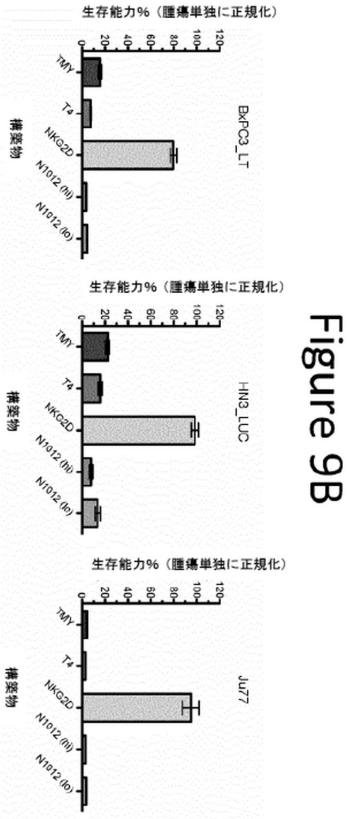


Figure 9B

【図１０Ａ】

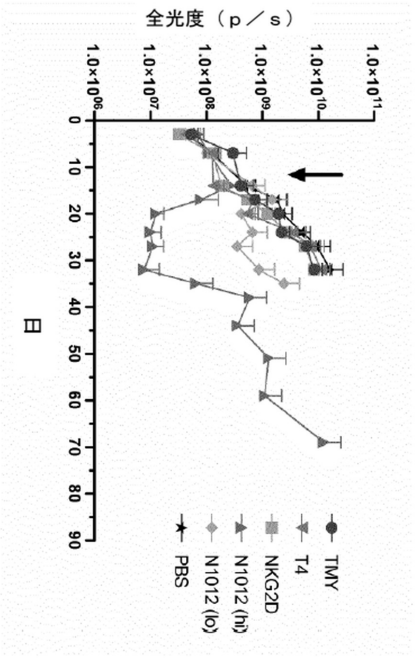


Figure 10A

【図１０Ｂ】

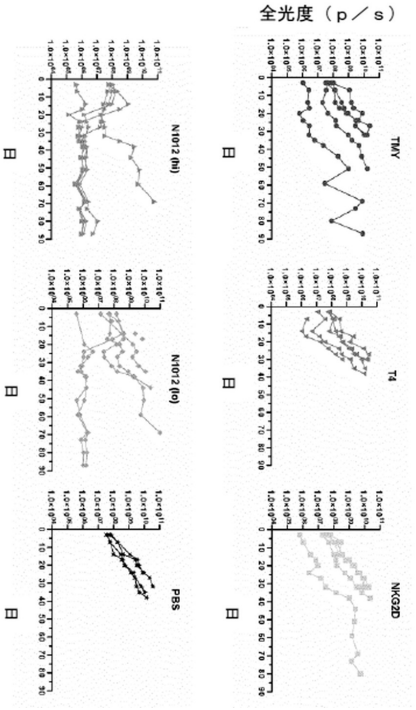


Figure 10B

【図１０Ｃ】

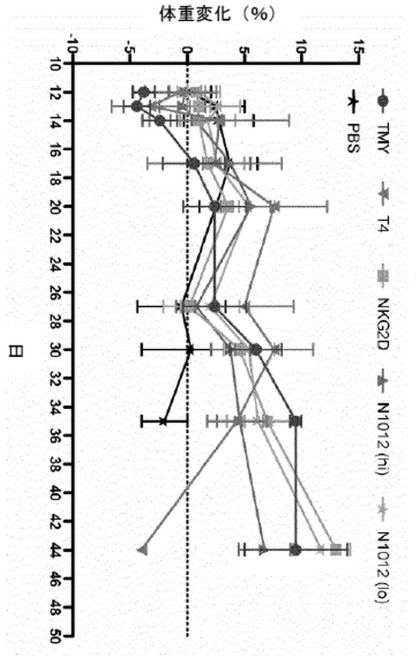


Figure 10C

【図１０Ｄ】

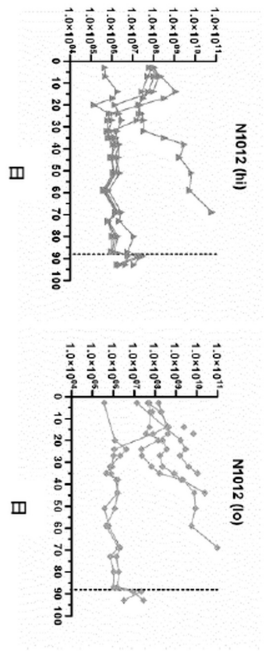


Figure 10D

【図１０Ｅ】

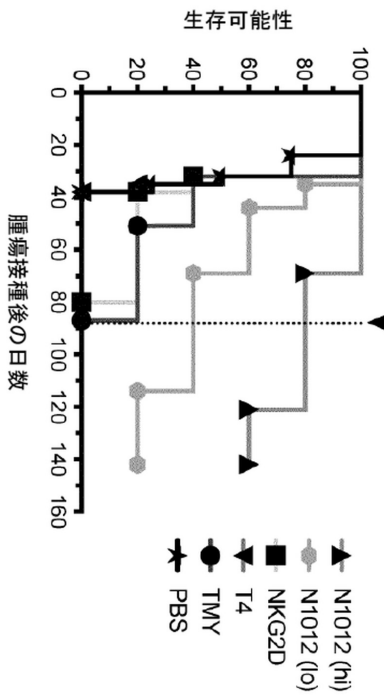


Figure 10E

【図１１Ａ】

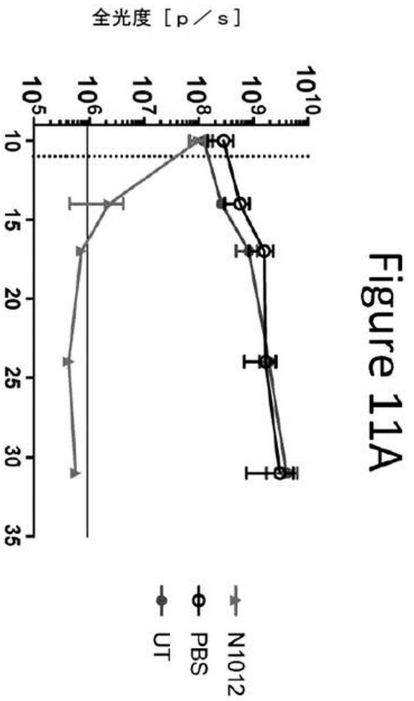


Figure 11A

【図１１Ｂ】

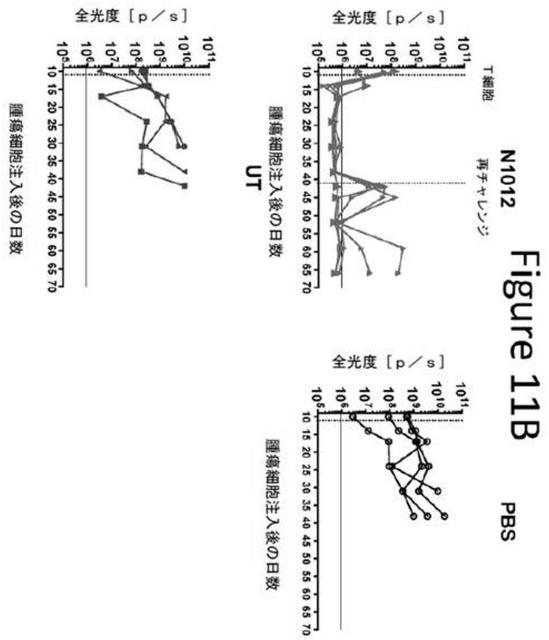


Figure 11B

【図１２Ａ】

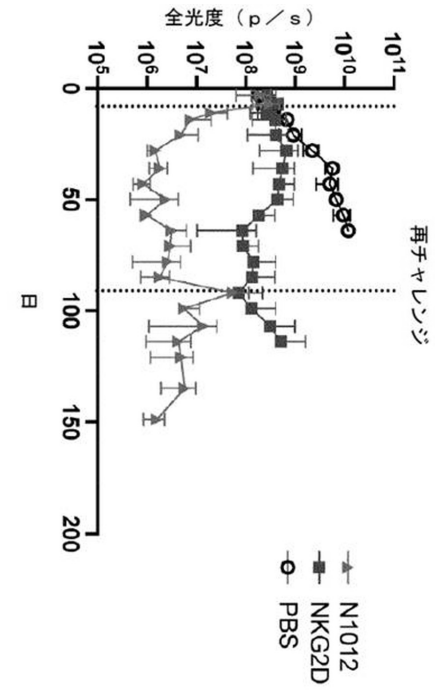


Figure 12A

【図１２Ｂ】

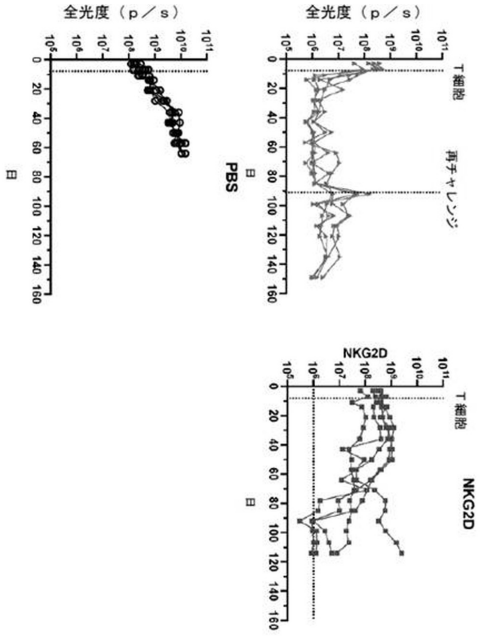


Figure 12B

【図１３】

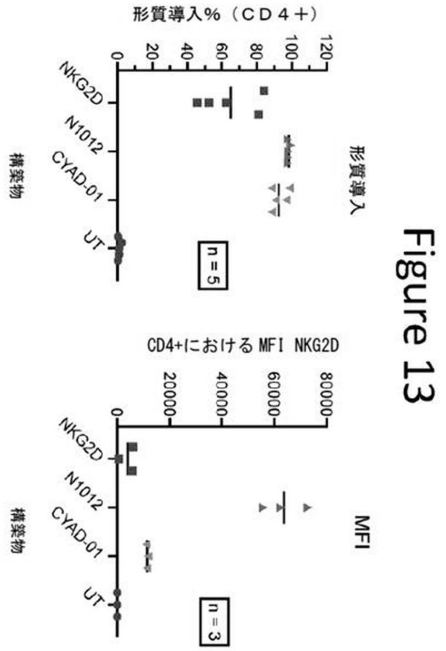


Figure 13

【図１４】

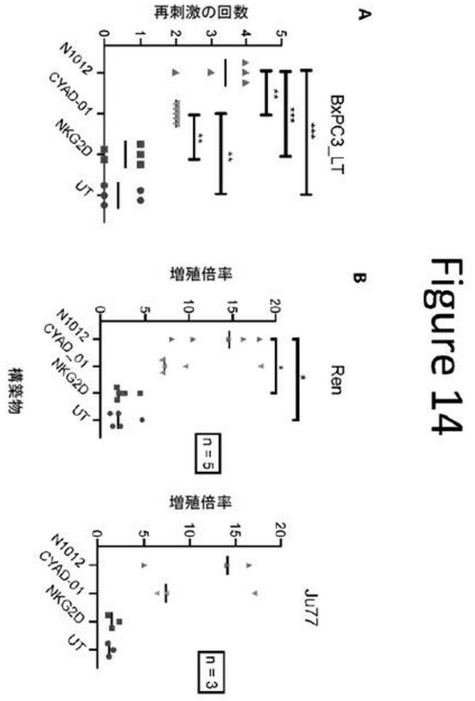


Figure 14

【図１５Ａ】

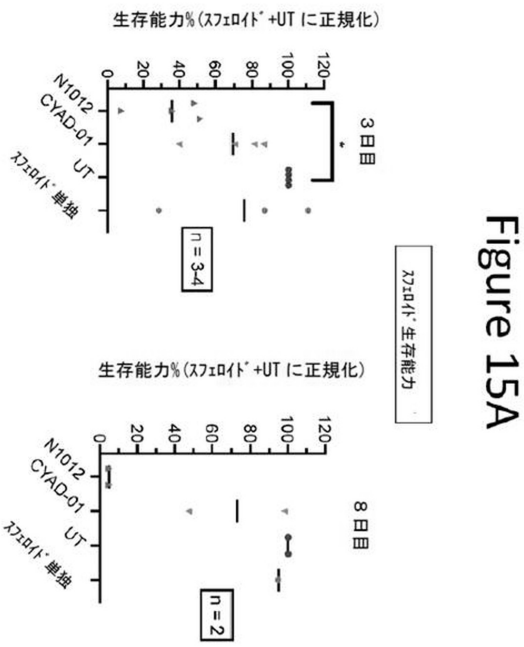
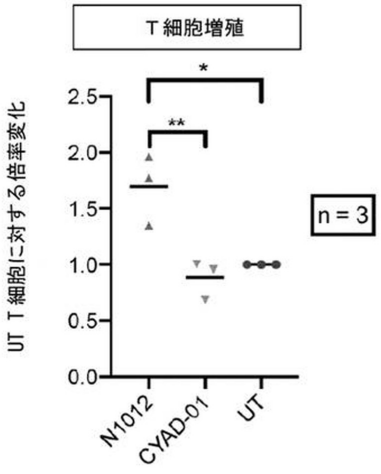


Figure 15A

【図１５Ｂ】

Figure 15B



【配列表】

2022550485000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/076566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/725 A61P35/00 A61K35/17 A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2019/182425 A1 (SLBIGEN INC [KR]) 26 September 2019 (2019-09-26) cited in the application sequences 1, 9, 11 -----	1-48
A	US 2018/002438 A1 (KAUFMAN DAN SAMUEL [US] ET AL) 4 January 2018 (2018-01-04) figure 2B -----	1-48
A	WO 2019/077165 A1 (INST CURIE [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR] ET AL.) 25 April 2019 (2019-04-25) figures 1, 5A page 40, last paragraph sequences 7, 8, 10, 11, 13 ----- -/--	1-48

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 December 2020	15/01/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schmitz, Till

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/076566

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TSUKASA NABEKURA ET AL: "Cutting Edge: NKG2D Signaling Enhances NK Cell Responses but Alone Is Insufficient To Drive Expansion during Mouse Cytomegalovirus Infection", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 199, no. 5, 31 July 2017 (2017-07-31) , pages 1567-1571, XP055741836, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1700799 the whole document -----	1-48
A	BRIAN RABINOVICH ET AL: "NKG2D splice variants: a reexamination of adaptor molecule associations", IMMUNOGENETICS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 58, no. 2-3, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 81-88, XP019331711, ISSN: 1432-1211, DOI: 10.1007/S00251-005-0078-X the whole document -----	1-48

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2020/076566

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019182425 A1	26-09-2019	KR 20190111843 A	02-10-2019
		KR 20190111844 A	02-10-2019
		WO 2019182422 A1	26-09-2019
		WO 2019182425 A1	26-09-2019
US 2018002438 A1	04-01-2018	AU 2016211438 A1	10-08-2017
		CA 2975384 A1	04-08-2016
		CN 107428843 A	01-12-2017
		EP 3250587 A1	06-12-2017
		EP 3674315 A1	01-07-2020
		ES 2789330 T3	26-10-2020
		JP 2018505174 A	22-02-2018
		US 2018002438 A1	04-01-2018
		US 2020291125 A1	17-09-2020
		WO 2016123333 A1	04-08-2016
WO 2019077165 A1	25-04-2019	EP 3697809 A1	26-08-2020
		US 2020331975 A1	22-10-2020
		WO 2019077165 A1	25-04-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/867(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*1/15 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15		
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		
Ｃ１２Ｐ	*21/02 (2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｎ	*5/078(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/078		
Ｃ０７Ｋ	*14/715(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/715		
Ｃ０７Ｋ	*14/725(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/725		
Ｃ０７Ｋ	*14/705(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/705		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｐ	*37/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*38/17 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/17		
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．プルロニック

(72)発明者 英国 ダブリュシー２アール ２エルエス， ロンドン ストランド， キングス・カレッジ・ロンドン
デイビース デイビッド マーク
英国 ダブリュシー２アール ２エルエス， ロンドン ストランド， キングス・カレッジ・ロンドン

Ｆターム（参考） 4B064 AG01 AG20 CA19 CC24 DA05
4B065 AA92X AA92Y AA94X AA94Y AB01 AC12 AC14 BA01 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 BA41 CA53 DC50 NA14 ZB091 ZB092 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262 ZC411 ZC412
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 BC83 NA14 ZB09 ZB21 ZB26 ZC41
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 EA22 EA28 FA74