

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5840837号
(P5840837)

(45) 発行日 平成28年1月6日 (2016.1.6)

(24) 登録日 平成27年11月20日 (2015.11.20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 35/14 (2015.01)

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

A 6 1 K 35/14 Z

A 6 1 P 37/02

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 35/00

請求項の数 26 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-501025 (P2010-501025)
 (86) (22) 出願日 平成20年3月31日 (2008.3.31)
 (65) 公表番号 特表2010-523083 (P2010-523083A)
 (43) 公表日 平成22年7月15日 (2010.7.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/004251
 (87) 国際公開番号 W02008/121420
 (87) 国際公開日 平成20年10月9日 (2008.10.9)
 審査請求日 平成23年3月30日 (2011.3.30)
 (31) 優先権主張番号 60/921,144
 (32) 優先日 平成19年3月30日 (2007.3.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 500213834
 メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065,
 ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
 (74) 代理人 100102668
 弁理士 佐伯 憲生
 (74) 代理人 100147289
 弁理士 佐伯 裕子
 (74) 代理人 100158872
 弁理士 牛山 直子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 養子移入Tリンパ球における副刺激リガンドの構成性発現

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 8 0 及び 4 - 1 B B L を発現するように、C D 8 0 及び 4 - 1 B B L を形質導入された、抗原と結合する受容体を発現する T 細胞。

【請求項 2】

T 細胞が、調節性 T 細胞である、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 3】

T 細胞が、細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) である、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 4】

受容体が、主要な T 細胞刺激シグナル又は主要な T 細胞活性化シグナルを送達する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 5】

C D 8 0 及び 4 - 1 B B L が、構成的に発現される又は誘導的に発現される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 6】

C D 8 0 及び 4 - 1 B B L が、T 細胞の表面に構成的に発現される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 7】

C D 8 0 及び 4 - 1 B B L が、レトロウイルスベクターから発現される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 8】

レトロウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、請求項 7 に記載の T 細胞。

【請求項 9】

抗原が、腫瘍抗原又は病原体抗原である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 10】

抗原が、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、癌胎児抗原 (CEA)、IL13R、her-2、CD19、NY-ESO-1、HIV-1Gag、Lewis Y、Mart-1、gp100、チロシナーゼ、WT-1、hTERT、及びメソセリンからなる群より選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の T 細胞。

10

【請求項 11】

受容体が、T 細胞の表面に構成的に発現される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 12】

受容体が、組換え抗原受容体である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 13】

受容体が、キメラ抗原受容体である、請求項 12 に記載の T 細胞。

【請求項 14】

受容体が、Pz1 である、請求項 13 に記載の T 細胞。

20

【請求項 15】

受容体が、P28z である、請求項 13 に記載の T 細胞。

【請求項 16】

受容体が、内因性抗原受容体である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 17】

CD80 及び 4-1BBL をコードするベクターを含有してなる、ウイルス特異的 T 細胞。

【請求項 18】

ウイルス特異的 T 細胞が、サイトメガロウイルス (CMV)、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 及びインフルエンザウイルスの抗原からなる群より選択されるウイルスを認識する、請求項 17 に記載のウイルス特異的 T 細胞。

30

【請求項 19】

CD80 及び 4-1BBL をコードするベクターを含有してなる、腫瘍抗原特異的 T 細胞。

【請求項 20】

腫瘍抗原特異的 T 細胞が、CD80 及び 4-1BBL を発現する、請求項 19 に記載の腫瘍抗原特異的 T 細胞。

【請求項 21】

ベクターが、レトロウイルスベクターである、請求項 19 又は 20 に記載の腫瘍抗原特異的 T 細胞。

40

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の細胞を含有してなる、腫瘍、病原体感染、自己免疫障害又は同種移植に関連する症状を治療するためのキット。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載される T 細胞の有効量、及び薬学的に許容される賦形剤を含有してなる医薬組成物。

【請求項 24】

請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載される腫瘍抗原特異的 T 細胞の有効量、及び薬学的に許容される賦形剤を含有してなる、腫瘍を治療するための医薬組成物。

50

【請求項 2 5】

請求項 1 7 又は 1 8 に記載されるウイルス特異的 T 細胞の有効量、及び薬学的に許容される賦形剤を含有してなる、病原体感染を治療するための医薬組成物。

【請求項 2 6】

IL - 2、IL - 3、IL - 6、IL - 1 1、IL - 1 2、IL - 7、IL - 1 5、IL 2 1、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、 γ -インターフェロン、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、及びエリスロポエチンからなる群より選択される 1 又はそれ以上のサイトカインをさらに含有してなる、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0 0 0 1】**

(関連出願への相互参照)

本出願は米国仮特許出願第 6 0 / 9 2 1 , 1 4 4 号 (2 0 0 7 年 3 月 3 0 日出願) の優先権を主張し、その全内容は参照により本明細書中に組み込まれる。

【0 0 0 2】

この本文において引用される特許出願及び特許のそれぞれ、同様にまた、(それぞれの発行された特許の審査手続き期間中を含めて) 特許出願及び特許のそれぞれにおいて引用されるそれぞれの文書又は参考文献(「出願引用文献」)、また、これらの特許出願及び特許のいずれかに対応する P C T 及び国外の特許出願又は特許、ならびに / あるいは、これらの特許出願及び特許のいずれかの優先権を主張する P C T 及び国外の特許出願又は特許のそれぞれ、また、出願引用文献のそれぞれにおいて引用又は参照される文書のそれぞれが、本明細書により参照によって本明細書中に特に組み込まれ、また、本発明の手続きにおいて用いられる場合がある。より一般には、様々な文書又は参考文献が、この本文において、すなわち、請求項の前の参考文献リストで、又は、本文自体で、そのどちらかで引用されており、また、これらの文書又は参考文献(「本明細書中引用参考文献」)のそれぞれ、同様にまた、(製造者の何らかの仕様書、説明書などを含めて) 本明細書中引用参考文献のそれぞれにおいて引用されるそれぞれの文書又は参考文献が、本明細書により参照によって本明細書中に特に組み込まれる。

20

【0 0 0 3】

30

(連邦政府援助の研究のもとでなされた発明に対する権利の言及)

合衆国政府は補助金番号 P O 1 C A 5 9 3 5 0 によって本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】**【0 0 0 4】**

前立腺癌は合衆国において男性における最も頻発する癌であり、毎年ほぼ 3 1 , 0 0 0 人の死亡の原因である。早期に診断されたとき、癌は手術又は放射線によって効果的に治療することができる。手術後の残存疾患は放射線治療及び / 又はホルモン治療を必要とし、これらにより、腫瘍の進行及び転移を防止することができる。現在、ホルモン不応性の転移性前立腺癌の完全な治療法は存在しない。免疫療法は、原理的にはそのような癌の治療法を提供する標的療法である。癌組織への到達を可能とするための細胞傷害性 T リンパ球の十分な数の増殖を必要とする腫瘍免疫療法を行うためには、多くの障害が依然として残されている。効果的な T 細胞プライミングの制限及び腫瘍の拒絶反応の機構の 1 つには、多くの悪性腫瘍における副刺激リガンドが生来的に存在していないことがある。

40

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0 0 0 5】**

本発明は、抗原認識受容体及び副刺激リガンドの少なくとも 1 つを発現する免疫応答性細胞 (T 細胞及びナチュラルキラー (N K) 細胞を含む)、ならびに、腫瘍、感染性疾患及び他の病状を治療するためのその使用方法を提供する。

50

【課題を解決するための手段】**【0006】**

1つの態様において、本発明は、抗原と結合する受容体と、外因性の副刺激リガンド (costimulatory ligand) とを含む免疫応答性細胞を提供する。

【0007】

別の態様において、本発明は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70及びCD30Lのいずれか1つ又はそれ以上から選択されるポリペプチドをコードするベクター (例えば、発現ベクター) を発現するウイルス特異的T細胞を提供する。その態様の1つとしては、ウイルス特異的T細胞は、サイトメガロウイルス (CMV)、エプスタイン・バールウイルス (EBV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、及びインフルエンザウイルスからなる群から選ばれるウイルスの抗原のいずれか1つ又はそれ以上から選択されるウイルスを認識する。

10

【0008】

さらに別の態様において、本発明は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70及びCD30Lからなる群より選択されるポリペプチドをコードするベクターを発現する腫瘍抗原特異的T細胞を提供する。その態様の1つとしては、この細胞はCD80及び4-1BBLを発現する。別の態様においては、ベクターはレトロウイルス (例えば、レトロウイルス又はレンチウイルス) からなる。ベクターはまた、非ウイルス性であってもよい。

【0009】

20

さらに別の態様において、本発明は、いずれかの前記態様の免疫応答性細胞の有効量を投与することを含む、対象における免疫応答を調節する方法を提供する。その態様の1つとしては、この方法は免疫応答を増大又は低下させる。別の態様としては、この方法は、臓器移植に対する自己寛容を増大させるか、又は、臓器移植に対する耐性を増大させる。

【0010】

さらに別の態様において、本発明は、腫瘍抗原と結合する受容体、及び副刺激リガンドをコードするベクターとを含む免疫応答性細胞の有効量を投与することを含む、対象における腫瘍を治療又は予防する方法を提供する。その態様の1つとしては、腫瘍は、前立腺癌、結腸癌、乳癌及び神経膠芽細胞腫のいずれか1つ又はそれ以上から選択される。別の態様としては、腫瘍の抗原は、前立腺特異的膜抗原、CD19、NY-ESO-1、WT-1、hTERT又はメソセリンである。

30

【0011】

別の態様において、本発明は、抗原と結合する受容体、及び副刺激リガンドをコードするベクターとを含む免疫応答性細胞の有効量を投与することを含む、対象における耐性を強化する方法を提供する。その態様の1つとしては、この方法は、自己免疫疾患、又は、同種移植に関連する疾患を予防又は軽減する。

【0012】

さらに別の態様において、本発明は、ウイルス抗原と結合する受容体、及び副刺激リガンドをコードするベクターとを含む免疫応答性細胞の有効量を投与することを含む、対象における病原体感染を治療又は防止する方法を提供する。その態様の1つとしては、病原体は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物又は寄生虫である。別の態様において、ウイルスは、サイトメガロウイルス (CMV)、エプスタイン・バールウイルス (EBV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 及びインフルエンザウイルスのいずれか1つ又はそれ以上から選択される。さらに別の態様において、当該細胞は、T細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞又は細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) である。

40

【0013】

さらに別の態様において、本発明は、免疫応答性細胞を活性化する細胞内シグナル伝達ドメインと共役している抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードする核酸配列を、免疫応答性細胞に導入することを含む抗原特異的な免疫応答性細胞を産生するための方法を提供する。その態様の1つとしては、当該免疫応答性細胞は、T細胞、CTL又は

50

NK細胞である。別の態様としては、抗原結合ドメインは腫瘍抗原結合ドメインである。さらに別の態様としては、腫瘍抗原は前立腺特異的膜抗原（PSMA）である。さらに別の態様としては、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞、CTL細胞又はNK細胞を活性化するものである。さらに別の態様としては、細胞内シグナル伝達ドメインは鎖シグナル伝達ドメインである。

【0014】

別の態様において、本発明は、腫瘍抗原、並びに少なくとも1つの副刺激リガンドが、腫瘍壊死因子（TNF）リガンド、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーリガンド、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる1つ又はそれ以上から選択される少なくとも2つの副刺激リガンドを含む抗原提示複合体を含有してなるT細胞の有効量を対象に投与することからなる、治療が必要な対象における腫瘍を治療する方法を提供する。

10

【0015】

別の態様において、本発明は、腫瘍抗原、並びに少なくとも1つの副刺激リガンドが、腫瘍壊死因子（TNF）リガンド、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーリガンド、及びそれらの組合せのいずれか1つ又はそれ以上から選択される少なくとも2つの副刺激リガンドを含む抗原提示複合体を含有してなるナチュラルキラー（NK）細胞の治療有効量を対象に投与することからなる、対象における腫瘍を治療する方法を提供する。その態様の1つとしては、当該TNFリガンドは、4-1BBL、OX40L、CD70、CD30L、及びLIGHTからなる群から選ばれる1つ又はそれ以上から選択される。別の態様としては、Igスーパーファミリーリガンドは、CD80又はCD86から選択される。さらに別の態様としては、細胞は少なくとも2つの副刺激リガンドを発現し、その1つがTNFリガンド（例えば、4-1BBL）であり、他のひとつがIgスーパーファミリーリガンド（例えば、CD80）である。

20

【0016】

別の態様において、本発明は、ウイルス抗原に対して特異的な受容体、並びに少なくとも1つの副刺激リガンドが、腫瘍壊死因子（TNF）リガンド、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーリガンド、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる1つ又はそれ以上から選択される少なくとも2つの副刺激リガンドを含む抗原提示複合体とを含むT細胞の治療有効量を対象に投与することからなる、治療の必要がある対象における感染性疾患を治療する方法を提供する。

30

【0017】

さらに別の態様において、本発明は、ウイルス抗原に対して特異的な受容体、並びに少なくとも1つの副刺激リガンドが、腫瘍壊死因子（TNF）リガンド、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーリガンド、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる1つ又はそれ以上から選択される少なくとも2つの副刺激リガンドを含む抗原提示複合体とを含むナチュラルキラー（NK）細胞の治療有効量を対象に投与することからなる、対象における感染性疾患を治療する方法を提供する。その態様の1つとしては、対象は、免疫が低下している対象である。別の態様としては、TNFリガンドは、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lからなる群から選ばれる1つ又はそれ以上から選択される。さらに別の態様としては、Igスーパーファミリーリガンドは、CD80及びCD86からなる群から選ばれる1つ又はそれ以上から選択される。さらに別の態様としては、そのような少なくとも2つの副刺激リガンドが、TNFリガンド及びIgスーパーファミリーリガンドである。別の態様としては、TNFリガンドが4-1BBLであり、IgスーパーファミリーリガンドがCD80である。別の態様としては、抗原認識複合体が細胞の表面に構成的に発現される。別の態様としては、ウイルス抗原は、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン・バールウイルス（EBV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）又はインフルエンザウイルスに対して特異的な抗原である。別の態様としては、そのような少なくとも2つの副刺激リガンドは細胞の表面に構成的（constitutively）に発現される。

40

【0018】

50

別の態様において、本発明は、前記態様のいずれかの免疫応答性細胞の有効量、及び薬学的に許容される賦形剤を含有してなる医薬組成物を提供する。

【0019】

別の態様において、本発明は、前記態様のいずれかの腫瘍抗原特異的T細胞の有効量、及び薬学的に許容される賦形剤を含有してなる腫瘍を治療するための医薬組成物を提供する。

【0020】

別の態様において、本発明は、前記態様のウイルス特異的T細胞の有効量、及び薬学的に許容される賦形剤を含有してなる病原体感染を治療するための医薬組成物を提供する。その態様の1つとしては、組成物はさらに、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、
-インターフェロン又は -インターフェロン又は -インターフェロン、及び、エリスロポエチンからなる群から選ばれる1つ又はそれ以上から選択されるサイトカインを含有している。

【0021】

別の態様において、本発明は、抗原と結合する受容体と、外因性の副刺激リガンドとを含む免疫応答性細胞を含むキットを提供する。その態様の1つとしては、当該キットはさらに、腫瘍、病原体感染、自己免疫障害又は同種移植に関連する症状を有する対象の治療のために前記細胞を使用するための文書化された説明書を含む。

【0022】

いずれかの前記態様においては、本発明の方法はさらに、免疫応答性細胞又は副刺激リガンドを得る工程を含む。

前記態様のさらに他の態様においては、副刺激リガンドは構成的又は誘導的に発現される。前記態様のさらに他の態様においては、少なくとも2つの副刺激リガンドは構成的に発現される。

前記いずれかの態様においては、細胞は、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、及び調節性T細胞からなる群から選ばれる1つ又はそれ以上から選択される。

前記態様のさらに他の態様においては、抗原は腫瘍抗原又は病原体抗原であり、例えば、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、癌胎児抗原(CEA)、IL13R、her-2、CD19、NY-ESO-1、HIV-1Gag、Lewis Y、Mart-1、gp100、チロシナーゼ、WT-1、hTERT、及びメソセリンからなる群から選ばれるいずれか1つ又はそれ以上である。

前記態様のさらに他の態様においては、当該細胞は組換え抗原受容体及び/又は内因性抗原受容体を発現する。

前記態様のさらに他の態様においては、副刺激リガンドは、腫瘍壊死因子(TNF)リガンド(例えば、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30L)又は免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーリガンド(例えば、CD80及びCD86)である。

前記態様のさらに他の態様においては、免疫応答性細胞は少なくとも1つのTNFリガンド及び少なくとも1つのIgスーパーファミリーリガンドを発現する。

前記態様のさらに他の態様においては、当該細胞は4-1BBL及びCD80を発現する。

前記態様のさらに他の態様においては、抗原提示複合体及び/又は副刺激リガンドはT細胞の表面に構成的(constitutively)又は誘導的(inducibly)に発現される。

前記態様のさらに他の態様においては、副刺激リガンドはレトロウイルスベクターで発現される。

別の態様においては、腫瘍抗原は、前立腺特異的膜抗原、CD19、NY-ESO-1、WT-1又はhTERTである。

さらに他の態様においては、細胞は、そのような抗原に対する組換え受容体又は内因性

10

20

30

40

50

受容体を発現する。

さらに他の態様においては、副刺激リガンドは腫瘍壊死因子 (T N F) リガンド又は免疫グロブリン (I g) スーパーファミリーリガンドである。

さらに他の態様においては、 T N F リガンドは、 4 - 1 B B L 、 O X 4 0 L 、 C D 7 0 、 L I G H T 及び C D 3 0 L からなる群から選ばれるいずれか 1 つ又はそれ以上から選択される。

これらの態様においては、細胞内シグナル伝達ドメインは、鎖シグナル伝達ドメインである。

他の態様においては、 1 つの副刺激シグナルが、遺伝子改変抗原受容体を介して提供され、もう一方の副刺激シグナルが、副刺激リガンドを過剰発現することによって提供される。

10

さらに他の態様においては、 I g スーパーファミリーリガンドは、 C D 8 0 及び C D 8 6 からなる群より選択される。

【 0 0 2 3 】

(定義)

「 C D 8 0 ポリペプチド」とは、 I g スーパーファミリーリガンドとして作用する、 N C B I 参照番号 : N P _ 0 0 5 1 8 2 又はそのフラグメントに対して少なくとも 8 5 % の同一性を有するタンパク質を意味する。

【 0 0 2 4 】

「 C D 8 0 核酸分子」とは、 C D 8 0 ポリペプチドをコードする何れかのポリヌクレオチドを意味する。 1 つの例示的な C D 8 0 核酸分子は N M _ 0 0 5 1 9 1 である。

20

【 0 0 2 5 】

「 4 - 1 B B L ポリペプチド」とは、腫瘍壊死因子 (T N F) リガンドとして作用する、 N C B I 参照番号 : P 4 1 2 7 3 又は同 N P _ 0 0 1 5 5 2 あるいはそのフラグメントに対して少なくとも 8 5 % の同一性を有するタンパク質を意味する。

【 0 0 2 6 】

「 4 - 1 B B L 核酸分子」とは、 4 - 1 B B L ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【 0 0 2 7 】

「 O X 4 0 L ポリペプチド」とは、腫瘍壊死因子 (T N F) リガンドである、 N C B I 参照番号 : B A B 1 8 3 0 4 又は同 N P _ 0 0 3 3 1 7 あるいはそのフラグメントに対して少なくとも 8 5 % の同一性を有するタンパク質を意味する。

30

【 0 0 2 8 】

「 O X 4 0 L 核酸分子」とは、 O X 4 0 L ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【 0 0 2 9 】

「 C D 7 0 ポリペプチド」とは、腫瘍壊死因子 (T N F) リガンドとして作用する、 N C B I 参照番号 : N P _ 0 0 1 2 4 3 又はそのフラグメントに対して少なくとも 8 5 % の同一性を有するタンパク質を意味する。

【 0 0 3 0 】

「 C D 7 0 核酸分子」とは、 C D 7 0 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

40

【 0 0 3 1 】

「 L i g h t ポリペプチド」とは、腫瘍壊死因子 (T N F) リガンドとして作用する、 N C B I 参照番号 : N P _ 7 4 2 0 1 1 又はそのフラグメントに対して少なくとも 8 5 % の同一性を有するタンパク質を意味する。

【 0 0 3 2 】

「 L i g h t 核酸分子」とは、 L i g h t ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【 0 0 3 3 】

50

「CD30Lポリペプチド」とは、腫瘍壊死因子(TNF)リガンドとして作用する、NCBI参照番号: AAB97877又はそのフラグメントに対して少なくとも85%の同一性を有するタンパク質を意味する。

【0034】

「CD30L核酸分子」とは、CD30Lポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【0035】

「CD86ポリペプチド」とは、Igスーパーファミリーリガンドとして作用する、NCBI参照番号: P42081又はそのフラグメントに対して少なくとも85%の同一性を有するタンパク質を意味する。

【0036】

「CD86核酸分子」とは、CD86ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【0037】

「Pz1ポリペプチド」とは、Gong et al., (Neoplasia, 1:123-7, 1999)に記載されるタンパク質又はそのフラグメントに対して少なくとも85%の同一性を有するタンパク質を意味する。

【0038】

「P28zポリペプチド」とは、Maher et al., (Nature Biotechnology, Vol 20, Jan 2002, 70-75)に記載されるタンパク質又はそのフラグメントに対して少なくとも85%の同一性を有するタンパク質を意味する。鎖シグナル伝達ドメインもまた、Maher et al., (Nature Biotechnology, Vol 20, Jan 2002, 70-75)に記載される。

【0039】

本発明の方法において有用な核酸分子には、本発明のポリペプチド又はそのフラグメントをコードする何れかの核酸分子が含まれる。そのような核酸分子は、内因性の核酸配列と100%同一である必要はなく、しかし、典型的には、実質的な同一性を示す。内因性配列に対して「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは、典型的には、二本鎖核酸分子の少なくとも一方の鎖とハイブリダイゼーションすることができる。「ハイブリダイゼーションする」とは、二本鎖分子を、様々なストリンジェントな条件のもとで、相補的ポリヌクレオチド配列(例えば、本明細書中に記載される遺伝子)又はその一部分との間で対形成させることを意味する。(例えば、Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) Methods Enzymol., 152:399; Kimmel, A.R. (1987), Methods Enzymol., 152:507を参照のこと)。

【0040】

例えば、ストリンジェントな塩濃度は通常、約750 mMのNaCl及び75 mMのクエン酸三ナトリウムよりも低く、好ましくは、約500 mMのNaCl及び50 mMのクエン酸三ナトリウムよりも低く、より好ましくは、約250 mMのNaCl及び25 mMのクエン酸三ナトリウムよりも低い。低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを有機溶媒(例えば、ホルムアミド)の非存在下で得ることができ、一方で、高ストリンジェントなハイブリダイゼーションは少なくとも約35%のホルムアミドの存在下で得ることができ、より好ましくは少なくとも約55%のホルムアミドの存在下で得ることができる。ストリンジェントな温度条件は通常、少なくとも約30 °Cの温度を含み、より好ましくは少なくとも約37 °Cの温度を含み、最も好ましくは少なくとも約42 °Cの温度を含む。様々なさらなるパラメーター、例えば、ハイブリダイゼーション時間、界面活性剤(例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS))の濃度、及び、キャリアDNAを含むこと、又は、キャリアDNAを除くことなどが、当業者には周知である。様々なレベルのストリンジェンシーが、これらの様々な条件を必要に応じて組み合わせることによって達成される。1つの好ましい態様において、ハイブリダイゼーションが、30 °Cで、750 mMのNaCl、75 mMのクエン酸三ナトリウム及び1%のSDSにおいて行われる。1つのより好ましい態様において、ハイブリダイゼーションが、37 °Cで、500 mMのNaCl、50 mMのクエン酸三ナトリウム、1%のSDS、35%のホルムアミド及び100

10

20

30

40

50

$\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子DNA(ssDNA)において行われる。1つの最も好ましい態様において、ハイブリダイゼーションが、42 で、250 mMのNaCl、25 mMのクエン酸三ナトリウム、1%のSDS、50%のホルムアミド及び200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のssDNAにおいて行われる。これらの条件に対する様々な有用な変更を、当業者は容易に見出せるだろう。

【0041】

ほとんどの適用について、ハイブリダイゼーションに続く洗浄工程もまた、ストリンジェンシーが異なる。洗浄のストリンジェントな条件を塩濃度によって、また、温度によって定義することができる。上記のように、洗浄のストリンジェンシーを、塩濃度を低下させることによって、又は、温度を上げることによって増大させることができる。例えば、10
洗浄工程のためのストリンジェントな塩濃度は、好ましくは、約30 mMのNaCl及び3 mMのクエン酸三ナトリウムよりも低く、最も好ましくは、約15 mMのNaCl及び1.5 mMのクエン酸三ナトリウムよりも低い。洗浄工程のためのストリンジェントな温度条件は、通常、少なくとも約25 の温度を含み、より好ましくは少なくとも約42
の温度を含み、一層より好ましくは少なくとも約68 の温度を含む。1つの好ましい態様において、洗浄工程が、25 で、30 mMのNaCl、3 mMのクエン酸三ナトリウム及び0.1%のSDSにおいて行われる。1つのより好ましい態様において、洗浄工程が、42 で、15 mMのNaCl、1.5 mMのクエン酸三ナトリウム及び0.1%のSDSにおいて行われる。1つのより好ましい態様において、洗浄工程が、68 で、15 mMのNaCl、1.5 mMのクエン酸三ナトリウム及び0.1%のSDSにおいて行われる。これらの条件に対するさらなる様々な有用な変更を、当業者は容易に見出せるだろう。ハイブリダイゼーション技術が当業者には周知であり、例えば、Benton and Davis
(Science, 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961, 1975); Ausubel et al., (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); 及び Sambrook et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)に記載されている。20

【0042】

「実質的に同一」とは、ポリペプチド又は核酸分子が、参照アミノ酸配列(例えば、本明細書中に記載されるアミノ酸配列のいずれか1つ)又は参照核酸配列(例えば、本明細書中に記載される核酸配列のいずれか1つ)に対して少なくとも50%の同一性を示すことを意味する。好ましくは、そのような配列は、比較のために使用される配列に対して、アミノ酸レベル又は核酸において、少なくとも60%が同一であり、より好ましくは80%又は85%が同一であり、より好ましくは、90%、95%又は99%までもが同一である。30

配列同一性は典型的には、配列分析ソフトウェア(例えば、Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705のSequence Analysis Software Package、BLASTプログラム、BESTFITプログラム、GAPプログラム又はPILEUP/PRETTYBOXプログラム)を使用して測定される。そのようなソフトウェアは、相同性の度合いを、様々な置換、欠失及び/又は他の修飾に対して割り当てることによって同一配列又は類似配列を一致させる。同類置換には、典型的には、下記の群の中での置換が含まれる: グリシン、アラニン; バリン、イソロイシン、ロイシン; アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン; セリン、トレオニン; リシン、アルギニン; 及び、フェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を求めるための1つの例示的な方法において、BLASTプログラムを使用することができ、e-3 ~ e-100の間における確率スコアにより、近い関係にある配列が示される。40

【0043】

「類似(アナログ)」とは、参照ポリペプチド又は参照核酸分子の機能を有する構造的 50

に関連するポリペプチド又は核酸分子を意味する。

【 0 0 4 4 】

本明細書中で使用される用語「リガンド」は、受容体に結合する分子を示す。具体的には、リガンドは別の細胞における受容体と結合し、これにより、細胞 - 細胞の認識を可能にする。

【 0 0 4 5 】

本明細書中で使用される用語「構成的発現」は、すべての生理学的条件のもとでの発現を示す。

【 0 0 4 6 】

本明細書中で使用される用語「キメラ抗原受容体 (C A R) 」は、T細胞を活性化することができる細胞内シグナル伝達ドメインに融合される腫瘍抗原結合ドメインを示す。最も一般的には、C A R の細胞外の結合ドメインがマウスモノクローナル抗体又はヒト化モノクローナル抗体に由来する。

【 0 0 4 7 】

「疾患」とは、細胞、組織又は器官の正常な機能を損なうか、又は、妨害する何れかの状態又は障害を意味する。疾患の例には、腫瘍、又は、細胞の病原体感染が含まれる。

【 0 0 4 8 】

「有効量」とは、腫瘍の継続した増殖、成長又は転移 (例えば、侵入又は移動) を停止し、改善し、又は阻害するために十分な量を意味する。

【 0 0 4 9 】

「耐性を強化する」とは、移植された器官又は組織を標的とする自己反応性細胞又は免疫応答性細胞の活性を妨げることを意味する。

【 0 0 5 0 】

「外因性」とは、細胞に内因的に存在しない核酸分子又はポリペプチド、あるいは、過剰発現したときに得られる機能的影響をもたらすために十分なレベルで存在しない核酸分子又はポリペプチドを意味する。従って、用語「外因性」は、細胞において発現される何れかの組換え核酸分子又は組換えポリペプチド (例えば、外来、異種など)、ならびに、過剰発現された核酸分子及びポリペプチドを包含する。

【 0 0 5 1 】

「異種の核酸分子又はポリペプチド」とは、細胞又は細胞から得られるサンプルに通常の場合には存在しない核酸分子 (例えば、c D N A 分子、D N A 分子又はR N A 分子) 又はポリペプチドを意味する。この核酸は別の生物に由来してもよく、あるいは、この核酸は、例えば、細胞又はサンプルにおいて通常の場合には発現されないm R N A 分子であってもよい。

【 0 0 5 2 】

「免疫応答性細胞」とは、免疫応答において機能する細胞、あるいは、その前駆体又は子孫を意味する。

【 0 0 5 3 】

「単離された細胞」とは、自然界においてその細胞に付随する分子成分及び / 又は細胞成分から分離される細胞を意味する。

【 0 0 5 4 】

本明細書中で使用される用語「腫瘍抗原結合ドメイン」は、腫瘍表面に存在する特定の抗原決定基又は1組の抗原決定基と特異的に結合することができるドメインを示す。

【 0 0 5 5 】

「薬剤を得る」におけるような用語「得る」は、薬剤 (あるいは示された物質又は材料) を購入すること、合成すること、又は、そうでない場合には獲得することを含むように意図されている。

【 0 0 5 6 】

「調節する」とは、正又は負に変えることを意味している。例示的な調節には、1 %、2 %、5 %、1 0 %、2 5 %、5 0 %、7 5 % 又は1 0 0 % の変化が含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

「腫瘍」とは、細胞又は組織の病理学的増殖、及び、他の組織又は器官へのそのその後の移動又は侵入によって特徴づけられる疾患を意図している。腫瘍の成長は典型的には抑制されず、進行性であり、また、正常な細胞の分裂増殖を誘発しない条件、又は、正常な細胞の分裂増殖の停止を生じさせる条件のもとで生じる。腫瘍は、膀胱、骨、脳、乳房、軟骨、神経膠、食道、卵管、胆嚢、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、神経組織、卵巣、膵臓、前立腺、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿生殖路、尿管、尿道、子宮及び膣からなる群より選択される器官、あるいは、その組織又は細胞タイプ（これらに限定されない）を含む、様々な細胞タイプ、組織又は器官を冒し得る。腫瘍は、肉腫、癌腫又は形質細胞腫（形質細胞の悪性腫瘍）のような、様々な癌を含む。本発明で利用できる例示的な腫瘍には、白血病（例えば、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄球性白血病、慢性リンパ性白血病）、真性赤血球増加症、リンパ腫（ホジキン病、非ホジキン病）、ヴァルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、及び、肉腫並びに癌腫（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝臓癌、ナイル管（nile duct）癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、神経鞘腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫及び網膜芽細胞腫）のような固形腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。1つの態様において、本発明のスクリーニング方法は、乳癌又は肺癌を治療するために有用な組成物を特定する。

10

20

【 0 0 5 8 】

「受容体」とは、1つ又はそれ以上のリガンドと選択的に結合する、細胞膜上に存在するポリペプチド又はその一部を意味する。

【 0 0 5 9 】

「認識する」とは、標的と選択的に結合することを意味する。ウイルスを認識するT細胞は典型的には、そのウイルスによって発現される抗原と結合する受容体を発現する。

30

【 0 0 6 0 】

「病原体」とは、疾患を引き起こし得るウイルス、細菌、真菌、寄生虫又は原生動物を意味する。

【 0 0 6 1 】

例示的なウイルスには、レトロウイルス科（retroviridae）（例えば、HIV-1（これはまた、HDTV-II、LAVE又はHTLV-II/LAV、あるいは、HIV-IIとしても示される）、及び、HIV-LPのような他の単離体のような、ヒト免疫不全ウイルス）；ピコルナウイルス科（Picornaviridae）（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カルシウイルス科（Calciviridae）（例えば、胃腸炎を引き起こす系統）；トガウイルス科（Togaviridae）（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビリダエ（Flaviridae）（例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス）；コロナウイルス科（Coronaviridae）（例えば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（Rhabdoviridae）（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（Filoviridae）（例えば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（Paramyxoviridae）（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）；オルトミクソウイルス科（Orthomyxoviridae）（例えば、インフルエンザウイルス）；ブンガビリダエ（Bungaviridae）（例えば、ハンターウイルス、ブンガ（bunga）ウイルス、フレボウイルス及びナイロウイルス）；アレナウイルス科（Are

40

50

naviridae) (出血熱ウイルス); レオウイルス科 (Reoviridae) (例えば、レオウイルス、オルビウイルス及びロタウイルス); ビルナウイルス科 (Birnaviridae); ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) (B型肝炎ウイルス); パルボウイルス科 (Parvoviridae) (パルボウイルス); パポーバウイルス科 (Papovaviridae) (乳頭腫ウイルス、ポリオマウイルス); アデノウイルス科 (Adenoviridae) (ほとんどのアデノウイルス); ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae) (1型及び2型の単純ヘルペスウイルス (HSV)、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、ヘルペスウイルス); ポックスウイルス科 (Poxviridae) (痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス); 及びイリドウイルス科 (Iridoviridae) (例えば、アフリカブタコレラウイルス); ; ならびに未分類ウイルス (例えば、デルタ型肝炎の媒介因子 (これは、B型肝炎ウイルスの欠損サテライトであると考えられる)、非A非B肝炎の媒介因子 (クラス1 = 体内感染型; クラス2 = 非経口感染型 (すなわち、C型肝炎)、ノーウォークウイルス及び関連ウイルス、ならびに、アストロウイルス) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0062】

例示的な細菌には、パストツレラ属 (*Pasteurella*)、ブドウ球菌属 (*Staphylococci*)、連鎖球菌属 (*Streptococcus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 菌種及びサルモネラ属 (*Salmonella*) の菌種が含まれるが、これらに限定されない。感染性細菌の具体的な例には、ヘリコバクター・ピロリス (*Helicobacter pylori*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borelia burgdorferi*)、レジオネラ・ニューモフィリア (*Legionella pneumophila*)、マイコバクテリウム属 (*Mycobacteriasps*) の菌種 (例えば、*M.tuberculosis*、*M.avium*、*M.intracellulare*、*M.kansaii*、*M.gordonea*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌)、連鎖球菌属 (ビリダンス群)、糞便連鎖球菌 (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*)、連鎖球菌属 (嫌気性菌種)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター・エスピー (*Campylobacter sp.*)、エンテロコッカス・エスピー (*Enterococcus sp.*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム・エスピー (*Corynebacterium sp.*)、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、パストツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、バクテロイデス・エスピー (*Bacteroides sp.*)、フソバクテリウム・ヌクレアツム (*Fusobacterium nucleatum*)、ストレプトバシラス・モニリフォルミス (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、フランベジアトレポネーマ (*Treponema pertenuis*)、レプトスピラ属 (*Leptospira*)、リケッチア属 (*Rickettsia*) 及びイスラエル放線菌 (*Actinomyces israelii*) が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0063】

「特異的に結合する」とは、本発明のポリペプチドを自然の状態を含むサンプル (例えば、生物学的サンプル) において、目的とするポリペプチドを認識し、かつ、これと結合するが、他の分子を実質的に認識し、かつ、これと結合しないポリペプチド又はそのフラグメントを意味する。

40

【0064】

本明細書中で使用される用語「腫瘍抗原」は、免疫応答を誘導することができる、腫瘍によって発現される何れかのポリペプチドを示す。

【0065】

「ウイルス抗原」とは、免疫応答を誘導することができる、ウイルスによって発現される任意のポリペプチドを意味する。

50

【 0 0 6 6 】

用語「含む」(「comprises」及び「comprising」など)は、米国特許法においてそれらに認められる幅広い意味を有することが意図され、「包含する(含む)」(「includes」及び「including」など)を意味することができる。

【 0 0 6 7 】

本明細書中で用いられているような、「治療」は、治療されている個人又は細胞の疾患経過を変化させようとするものにおける臨床的介入を示し、予防のために、又は、臨床病理学の経過中において、そのどちらかで行うことができる。治療の治療的効果には、限定されないが、疾患の発生又は再発を防止すること、症状の緩和、疾患の何らかの直接的又は間接的な病理学的結果の軽減、転移を防止すること、疾患進行の速度を低下させること、疾患状態の改善又は軽減、及び、寛解又は改善された予後が含まれる。疾患又は障害の進行を妨げることによって、治療は、罹患している対象又は診断された対象、あるいは、障害を有することが疑われる対象において障害に起因する悪化を防止することができるが、治療により、障害又は障害の症状の発症が、障害についての危険性を有する対象において、又は、障害を有することが疑われる対象において防止されることもある。

10

【 0 0 6 8 】

本明細書中で使用される用語「対象」は脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを示す。

【 0 0 6 9 】

本明細書中で使用される用語「免疫が低下している」は、免疫不全を有する対象を示す。そのような対象は、日和見感染症、すなわち、免疫系が健全である人では通常、疾患を引き起こさないが、免疫系が良好に機能しないか、又は、免疫系が抑制された人々を冒し得る生物によって引き起こされる感染症に非常に罹りやすい。

20

【 0 0 7 0 】

本発明の他の態様が下記の開示において記載され、これらは本発明の範囲内である。

【 0 0 7 1 】

下記の詳細な説明は、本発明を記載された具体的な態様に限定するために意図されるのではなく、例として示されるものであり、添付されている図面と併せて理解することができる。

【図面の簡単な説明】

30

【 0 0 7 2 】

【図1】図1a～図1fは、ヒトT細胞におけるCD80及び4-1BBの共発現が、周期的な刺激の後における顕著な増殖応答を、抗原提示細胞(APC)によりもたらされる副刺激を伴うことなく、それらの内因性のT細胞受容体を介して、又は、キメラ抗原受容体を介して誘発することを示す。 0.4×10^6 個の精製されたヒトTリンパ球を、CD3に対する抗体(OKT3)により活性化し、CD80、4-1BB、これら2つの組合せ、又は、対照ベクターがレトロウイルスにより形質導入されたTリンパ球の増大を定量化した(図1a、図1b)。形質導入の効率を遺伝子移入後48時間でFACS分析によって評価した(図1a)。示された副刺激リガンドが形質導入され、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のプレートに結合されたOKT3により毎週刺激されたCD8⁺T細胞の絶対数が図1bにグラフで示されている。検討をサイトメガロウイルス(CMV)特異的な記憶ドナーT細胞(図1c、図1d)及び遺伝子的にリダイレクトした自己T細胞(図1e、図1f)に拡大した。CMV-pp65特異的Tリンパ球をHLA-A*0201+pp65+人工APC上で短時間に増大させ、これに、CD80、4-1BB、又は、これら2つの組合せを形質導入した(図1c)。HLA-A*0201+pp65を提示するCaco-2腫瘍細胞による毎週の再刺激の後の、cに記載されるように富化及び形質導入されたCD8⁺pp65⁺T細胞の絶対数が、図1dに示されている。前立腺癌反応性のヒトTリンパ球を迅速に産生するために(図1e、図1f)、末梢血T細胞に、キメラ抗原受容体Pz1(Gade et al., Cancer Res., 65:9080-9088, 2005)、すなわち、腫瘍抗原PSMAに対して特異的なHLA非制限の抗原受容体をレトロウイルスにより

40

50

形質導入した。Pz1受容体は、ヒトCD3 シグナル伝達ドメインに融合されたPSMA結合性単鎖抗体フラグメントを含む。図1eにおいて、初代ヒトCD3⁺Tリンパ球に、Pz1を単独で、又は、CD80及び4-1BB Lとの組合せでレトロウイルスにより形質導入した。形質導入の効率をFACS分析によって評価した。LNCA P腫瘍の単層物と毎週共培養される、Pz1が形質導入されたヒトTリンパ球のT細胞増殖が、図1fに示されている。副刺激リガンドがT細胞(上段)又は腫瘍細胞(下段)において発現された。それぞれの活性化条件が、b、d及びfの右側図に示される模式図で描かれる。データは3つの独立した実験を表す。b、d及びfにおける各点は、3つのランダムに選ばれたウエルの平均 \pm s . e . m .を表す。*は 10^4 個未満の細胞を示す。

【図2】図2a~図2cは、CD80及び4-1BB Lが形質導入されたPz1⁺T細胞によるScid/beigeマウスにおける確立された前立腺特異的膜抗原(PSMA)前立腺癌腫瘍の根絶を示す。図2aは、 4×10^6 個の腫瘍細胞による全身接種(T細胞処置の0日目)の4週間後、及び、 4×10^6 個のCD8⁺Pz1⁺Tリンパ球又はPz1⁺CD80⁺4-1BB L⁺Tリンパ球の養子移入の後18日でのScid/beigeマウスにおけるホタルルシフェラーゼ⁺PC3-PSMA腫瘍のインビボ生物発光画像化及び対応する冠状面MRIスキャンを示す。ヒトCD19を標的とするキメラ抗原受容体19zを保有するT細胞の等しい数を対照群に注入した。従来の写真に重ねられた擬似カラー画像が示される。生物発光画像化及びMRIを使用して治療前及び後に画像化された同じ動物が示される。この2匹のマウスは、 $n = 10$ の全体を代表している。図2bは3つのグラフを示す。生物発光の腫瘍シグナルを28日間にわたって2日毎に1動物あたりで定量化した。画素が飽和している取得値は、群間の直接的な目視比較を可能とするために図に含められるが、より短い取得時間で繰り返された場合を除いて、光子の定量化のためには使用しなかった。グラフは、T細胞注入後の日数に対する光子数/秒/cm²/表面半径(sr)を示す。どの線も1匹の動物に対応しており、各ドットが、いずれかの示された時点における動物あたりの腹側取得及び背側取得の平均光子カウント数を表す。生存率が図2cにおいてカプラン・マイヤー曲線で例示される。

【図3】図3a~図3dは、CD80⁺4-1BB L⁺Tリンパ球の顕著であるが、腫瘍抗原に依存するインビボ増殖を示す。図3aは、 4×10^6 個の、CD8⁺の、コメツキムシルシフェラーゼ(click-luc)を発現するPz1形質導入Tリンパ球又はPz1⁺CD80⁺4-1BB L⁺形質導入Tリンパ球の注入後0日目、8日目及び18日目でのPC3-PSMA腫瘍保有Scid/beigeマウスにおける養子移入T細胞の比較用のインビボ生物発光の画像化を示す。抗原特異性対照として、等しい数の19z⁺CD80⁺4-1BB L⁺T細胞を注入した。T細胞による処置を、 4×10^6 個のPC3-PSMA腫瘍細胞を全身注入した4週間後に図2と同様に開始した。それぞれの図に示される1群あたり5匹のマウスは、 $n = 8$ /群の全体を代表している。画素が飽和している取得値は、直接的な目視比較を可能とするために図に示されるが、より短い取得時間で繰り返された場合を除いて、光子の定量化のためには使用していない。図3bは、3つのグラフを示す。連続する生物発光の画像化から得られるコメツキムシルシフェラーゼのシグナル強度をT細胞移入後16日間にわたって2日毎に集めた。どの線も1匹の動物を表しており、各ドットが、いずれかの示された時点における動物あたりの腹側取得及び背側取得の平均光子カウント数を表す。図3cは、T細胞移入後6日目の、Pz1⁺Tリンパ球又はPz1⁺CD80⁺4-1BB L⁺Tリンパ球のどちらかが注入された代表的な動物から調製された肺の単細胞懸濁物の擬似カラーFACS分析を示す。細胞を、キメラ抗原受容体Pz1に対して特異的なイディオタイプ抗血清により染色した。図3dにおいて、肺のPz1⁺T細胞の絶対数を(トリバンプルー陰性細胞の生存細胞総数 \times Pz1⁺T細胞の百分率)を示す。示される棒グラフは3匹のマウスの平均 \pm s . e . m .を表す。

【図4】図4a~図4fは、誘導されたT細胞/腫瘍細胞クラスター形成の後における免疫学的シナプス内への、CD80、4-1BB L、及び、それらの受容体(CD28及び4-1BB)の共局在化の結果としてのシス作用でのT細胞の副刺激を示す。図4a~

図4 dにおいて、末梢血ヒトTリンパ球にPz 1を形質導入し、これを、dsRed - 単量体 - 4 - 1 B B L融合タンパク質及びCD 8 0をコードする二シストロンベクターによる2回目の遺伝子移入の前にLNCaP - CD 8 0細胞により再刺激した。CD 8 ⁺を陰性磁化分離した後、T細胞をFITC - コレラトキシンB (CTB)により標識し、改変されていないLNCaP腫瘍細胞とともに、又は、単独でインキュベーションした。固定化したコンジュゲートを透過処理し、指示された抗血清で染色し、共焦点顕微鏡観察によって可視化した。3つの独立した実験から得られるT細胞 - LNCaP細胞クラスターを無作為に選んだ。スケールバーは10 μ mである。分析したクラスター総数に対する、T細胞 - APC接合部における示された副刺激リガンド又は受容体の明確な濃度を有するクラスターの数、図4 a及び図4 bの下段右の図に示されている。図4 aは、4 - 1 B B L (これは、CD 8 ⁺のPz 1形質導入T細胞の表面にCD 8 0との組合せでds - Red融合タンパク質として発現される)の免疫学的シナプス内への分極を例示する10枚の共焦点顕微鏡写真の1組である。T細胞 / LNCaP腫瘍クラスターを、固定化、透過処理、及び、抗4 - 1 B B L抗血清とのインキュベーションの前に50分間インキュベーションした。図4 bでは、固定化したT細胞 - 腫瘍細胞クラスターを抗CD 8 0抗血清及び抗CD 2 8抗血清とインキュベーションした。ここでも、腫瘍抗原遭遇後の免疫学的シナプスにおける、CD 8 0の、その受容体 (CD 2 8) との共同在化を可視化している。図4 cは、免疫学的シナプスにおけるグランザイム - Bの増大した蓄積を例示する。この蓄積は、4 - 1 B B Lの、同じT細胞表面に発現されるそのリガンド (4 - 1 B B L) による機能的結合に依存している。初代ヒトTリンパ球を、図4 a、図4 bの場合と同様に遺伝子組み換えを行った。示されるように、Pz 1をコードするレトロウイルスベクターはまた、対照のshRNA又は4 - 1 B B L標的化shRNAを、本明細書中に下記のような、それらの3'LTRにおけるU6プロモーターの制御下で発現する。上段の細胞コンジュゲート (Pz 1⁺対照shRNA) 及び中段の細胞コンジュゲート (及びPz 1⁺CD 8 0⁺dsred 4 - 1 B B L⁺対照shRNA) は、同じウエルにおいて培養され、同じガラススライドにおいてLNCaPにコンジュゲート化されたCD 8 0⁺のdsred 4 - 1 B B L非形質導入Tリンパ球及びdsred 4 - 1 B B L形質導入Tリンパをそれぞれ表す。図4 dは、T細胞 - 抗原提示細胞の界面相におけるグランザイム - B - Alexa 647の本明細書中に下記するように計算された相対的集合指数 (RRI) 及び相対的強度を示す。それぞれの群におけるデータ点は、35個の分析されたコンジュゲートの計算値 (記号)、及び、3つの独立した実験のそれらの平均 (-) を示す。* P = 0.0001; ** P < 0.0001。図4 e、4 fには、単離した単一T細胞クローンにおけるNF - κ B - ルシフェラーゼアッセイが示されている。これらの結果は、副刺激シグナルを送達するオペラント機構としての自己副刺激を裏付けている。NF - κ B - ルシフェラーゼレポーターが安定的にトランスフェクトされたCD 3⁺CD 2 8⁺の4 - 1 B B - Jurkat T細胞クローンに、4 - 1 B B、4 - 1 B B L及びCD 8 0を共発現する三シストロンベクター、又は、対照ベクターをレトロウイルスにより形質導入した。バイスタンダー副刺激を排除するために、形質導入したTリンパ球を、コードされたタンパク質の最初の検出可能な表面発現の前に、OKT3被覆の96ウエルプレートにサブクローン化した。活性化後24時間で、ウエルにおけるT細胞だけの存在を顕微鏡観察で確認し、生物発光シグナルを個々の細胞レベルで測定した。図4 eは、Adobe Illustratorソフトウェアにより整理された、形質導入した単一T細胞の36個の生物発光取得値を示す。個々の細胞でのそれぞれの生物発光シグナルを定量化して、バックグラウンドの生物発光に対して正規化し、図4 fにおいてプロットした。

【図5】図5 a ~ 図5 eは、CD 8 0及び4 - 1 B B Lを呈示するTリンパ球が、改変されていない抗原特異的なバイスタンダーT細胞を物理的接触によってトランス副刺激することを示す。図5 aは、CD 8 0及びdsRed - 4 - 1 B B Lが形質導入されたバイスタンダーPz 1⁺Tリンパ球との物理的なT細胞 - T細胞接触が行われている間にLNCaP腫瘍細胞を巻き込むPz 1⁺T細胞の4枚の共焦点顕微鏡写真の1組を示す。細胞クラスターを、図4 a、図4 bに記載されるように誘導し、分析した。スケールバーは1

10

20

30

40

50

0 μm である。図5b～図5dでは、サイトメガロウイルス(CMV)血清陽性のHLA A2.1⁺ドナーの末梢Tリンパ球にPz1を形質導入したか、又は、Pz1、CD80及び4-1BBLを共形質導入した。並行して、同じドナーに由来するCMV特異的な遺伝子改変されていない細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を、本明細書中下記に記載されるような人工抗原提示細胞(AAPC)の共培養によって濃縮した。これらの細胞をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)により標識した。ビーズで分類したPz1⁺Tリンパ球(図5b)又はPz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺Tリンパ球(図5c)を、増大されたCMV反応性pp65⁺CTLに1:1の比率で混合して、表面pp65をHLA A2.1依存的な様式で、同様にまた、PSMAをHLA非依存的な様式で提示させるためにレトロウイルスにより形質導入した放射線照射Caco-2腫瘍細胞に曝した。或いは、ともにCaco-2腫瘍と結合しているPz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺T細胞とpp65⁺T細胞をトランスウエル膜で分離した(図5d)。それぞれの共培養条件が、左側に示される漫画で描かれる。腫瘍抗原接触後2日目に、CD8⁺T細胞上にゲート処理した細胞内のグランザイムBレベルをFACS分析によって定量化した(中央の図)。CFSE⁻(Pz1⁺)T細胞亜集団及びCFSE⁺(pp65⁺)T細胞亜集団のグランザイムB抗原提示細胞(APC)の平均蛍光強度(MFI)がそれぞれのプロフィルの上部にまとめられている。7日目に、pp65⁺T細胞画分と比較したCFSE希釈物及びPz1⁺を、pp65四量体及びCD8の染色後、フローサイトメトリーによって分析した(右側の図)。それぞれのプロフィルの上部に示されるCFSE-MFIはCD8⁺ゲーティング後のpp65⁺集団に基づいている。7日間の培養の後におけるCD8⁺pp65⁺T細胞の細胞総数が(図5e)にグラフで示される。それぞれの棒グラフは3つの無作為に選ばれたウエルの平均 \pm s.e.m.を表す。データは2つの独立した実験を表す。外因性サイトカインは共培養のどの時点においても添加しなかった。

【図6】図6a及び図6bは、腫瘍部位における養子移入したPSMA再命令Tリンパ球の蓄積が、Scid/beigeマウスにおいて、19z⁺CD80⁺4-1BBL⁺T細胞によってではなく、Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺T細胞によって増強されることを示す。図6aは、腫瘍標的化T細胞におけるコメツキムシルシフェラーゼ(Click-luc)に加えて、RM1、PGLS腫瘍及びRaji腫瘍における外因性ガウシア(Gaussia)ルシフェラーゼ(x-gaus-luc)の二重インビボ生物発光画像化を示す。1 $\times 10^6$ 個のCD19⁺x-gaus-luc⁺Raji腫瘍を全身注入した2週間後、及び、続いて5 $\times 10^5$ 個のPSMA⁺x-gaus-luc⁺RM1、PGLS腫瘍細胞を同じ動物に注入した2日後に、骨髄における確立された腫瘍(Raji)及び肺における確立された腫瘍(RM1)を、提示のように形質導入したT細胞の3つの細胞集団の組合せを用いて処置した。それぞれの動物が合計で12 $\times 10^6$ 個のCD8⁺キメラ抗原受容体⁺T細胞を受けた(4 $\times 10^6$ 個のT細胞/形質導入条件)。特に、3番目に示されるT細胞集団(Pz1⁺、Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺、19z⁺CD80⁺4-1BBL⁺、をそれぞれ、左側、中央、右側の列に)は、選択的腫瘍抗原結合の結果としてではなく、密集することに起因して、肺におけるT細胞/T細胞の相互作用を避けるために、1番目及び2番目に示されるT細胞を混合注入した12時間後に注入した。提示される時点で、x-gaus-luc⁺腫瘍細胞又はclick-luc⁺T細胞を生物発光画像によって観測した。0日目及び4日目において、腫瘍画像化とT細胞画像化との間で少なくとも4時間の時間により、生物発光シグナルがバックグラウンドレベルに戻ることが保証された。処置群あたり総数でn=5のScid/beigeマウスを画像化した。図6bは、4日間にわたるT細胞移入後1日毎の連続する生物発光画像化から得られるコメツキムシルシフェラーゼのシグナル強度を定量化する一連の6つのグラフである。どの線も1匹の動物を表しており、各ドットが、いずれかの示された時点における肺領域(上段)又は両方の大腿骨(下段)について測定された平均光子計数をそれぞれ表す。

【図7】図7は、T細胞で二重発現するCD80及び4-1BBLが、Pz1キメラ抗原受容体の鎖シグナル伝達ドメインと直列に融合されたCD28シグナル伝達エレメント

及びノ又は4-1BBシグナル伝達エレメントと比較して、優れたT細胞増殖を誘発することを示す。初代T細胞に、Pz1、CD28のシグナル伝達ドメインを鎖との直列で含有するP28z (Maher et al., Nature Biotechnology, Vol20, Jan 2002, 70-75)、又は、両者(CD28及び4-1BBのシグナル伝達領域)を含むP284-1BBzを形質導入した。或いは、Tリンパ球にP28z及び4-1BBLを共形質導入した(これはP28Z+4-1BBLと示される)。Pz1+CD80+4-1BBLは、両方のリガンド(CD80及び4-1BBL)を共発現するPz1+T細胞を示す。形質導入されたT細胞を、図1のもとで詳しく概説している条件下で、LNCaP腫瘍単層上で毎週刺激した(矢印によって示される)。CD8⁺のPz1を形質導入したヒトTリンパ球集団の増殖倍率がグラフに示されている。

10

【図8-1(1)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-1(2)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-1(3)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-2(1)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-2(2)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

20

【図8-2(3)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-3】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-4(1)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-4(2)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-4(3)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

30

【図8-5(1)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-5(2)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-5(3)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-5(4)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-6(1)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

40

【図8-6(2)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-7(1)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-7(2)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-7(3)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

【図8-7(4)】図8は、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lについてのアミノ酸配列を提供する。

50

【図 8 - 7 (5)】図 8 は、C D 8 0、4 - 1 B B L、O X 4 0 L、C D 7 0、L I G H T 及び C D 3 0 L についてのアミノ酸配列を提供する。

【図 8 - 7 (6)】図 8 は、C D 8 0、4 - 1 B B L、O X 4 0 L、C D 7 0、L I G H T 及び C D 3 0 L についてのアミノ酸配列を提供する。

【図 8 - 7 (7)】図 8 は、C D 8 0、4 - 1 B B L、O X 4 0 L、C D 7 0、L I G H T 及び C D 3 0 L についてのアミノ酸配列を提供する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 7 3 】

本発明は、抗原認識受容体及び副刺激リガンドの少なくとも 1 つを発現する遺伝子工学的に修飾された免疫応答性細胞（例えば、T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）細胞）を包含する細胞類、及び、抗原特異的な免疫応答の増強が望まれる腫瘍又はその他の病変の治療のための、それらの使用方法を提供する。本発明は、少なくとも部分的には、前立腺特異的膜抗原を標的とする共形質導入されたヒト T 細胞における C D 8 0 及び 4 - 1 B B L の構成的なレトロウイルス発現が、インビボにおける散在する十分に確立された前立腺癌腫瘍をほぼ全面的に根絶できること、及び顕著な腫瘍抗原依存的な T 細胞増殖を開始させることができたということを見出したことに基づいている。さらには、C D 8 0 及び 4 - 1 B B L を発現する T 細胞により、バイスタンダー（bystander）T 細胞を腫瘍部位において接触依存的かつ抗原特異的な様式でのトランス作用で副刺激することができた。まとめると、腫瘍の微小環境における免疫原性を高めることに加えて、最適に自己副刺激するための副刺激リガンドの構成的プールとしての遺伝子組み換え T 細胞により、従来の養子 T 細胞療法を上回る著しい進歩が示される。さらには、富化された C M V 特異的 T リンパ球を使用してエクスピボで明らかにされるように、この方法は腫瘍の治療に限定されず、抗原特異的な免疫応答における増強が望まれる広範囲の様々な適用に対して適しており、そのような適用には、腫瘍の治療だけでなく、病原体感染又は感染性疾患に対する免疫応答の強化、及び、自己免疫又は同種移植の関連での調節性 T 細胞における免疫寛容を強化することもまた含まれる。

【 0 0 7 4 】

造血系細胞系譜

哺乳動物の造血系（血液）細胞は、様々な生理学的活性を提供する。造血細胞は、リンパ系系譜、骨髄系系譜及び赤血球系系譜に分けられる。リンパ系系譜は、B 細胞、T 細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞を含み、抗体の産生、細胞免疫系の調節、血液における外来性病原体の検出、宿主にとって異物である細胞の検出などに備える。本明細書中で使用される用語「T 細胞」は、胸腺において成熟し、細胞媒介性免疫を主に担うリンパ球を示す。T 細胞は適応免疫系に關与する。本明細書中で使用される用語「ナチュラルキラー（NK）細胞」は、細胞媒介性免疫の一部であり、かつ、先天性免疫応答の期間中に作用するリンパ球を示す。これは、標的細胞に対するその細胞毒性効果を発揮するために事前の活性化を必要としない。細胞傷害性 T 細胞（CTL 細胞又はキラー T 細胞）は、感染を受けた体細胞又は腫瘍細胞の死を誘導することができる T リンパ球のサブセットである。

【 0 0 7 5 】

本発明の方法において使用される細胞

本発明は、抗原認識受容体及び副刺激リガンドの少なくとも 1 つを発現する細胞、ならびに、強化された免疫応答を必要とする、疾患の治療のためにそのような細胞を使用する方法を提供する。1 つの取り組みにおいて、腫瘍抗原特異的な T 細胞、NK 細胞、CTL 細胞又は他の免疫応答性細胞が、腫瘍の治療又は防止のための 1 つ又は複数の副刺激リガンドを選択的に富化するためのシャトルとして使用される。例えば、副刺激リガンドの 4 - 1 B B L 及び C D 8 0 を発現する T 細胞が、前立腺特異的膜抗原（PSMA）を認識し、これと結合するキメラ抗原受容体 P Z 1 を発現する T 細胞において構成的に共発現される。そのような細胞が、前立腺癌を治療又は防止するために、その必要性のあるヒト対象に投与される。別の取り組みにおいて、ウイルス抗原特異的な T 細胞、NK 細胞、CTL

細胞を、ウイルス疾患を治療するために使用することができる。例えば、C D 8 0 及び 4 - 1 B B L が、C M V を治療するために、サイトメガロウイルス (C M V) 特異的な細胞傷害性 T リンパ球において発現される。

【 0 0 7 6 】

腫瘍抗原特異的な T リンパ球 (及び N K 細胞)

本発明の方法において使用することができるタイプの腫瘍抗原特異的なヒトリンパ球には、限定されないが、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現するために遺伝子組み換え末梢ドナーリンパ球 (Sadelain, M., et al. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45)、及びヘテロダイマーを含む全長の腫瘍抗原認識 T 細胞受容体複合体を発現するために遺伝子組み換え末梢ドナーリンパ球 (Morgan, R.A., et al. 2006 Science, 314:126-129)、腫瘍生検物における腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) に由来するリンパ球培養物 (Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C., et al. 2000 J. Immunol 164:4382-4392)、及び人工抗原提示細胞 (A A P C) 又はパルス処理された樹状細胞を用いて選択的にインビトロで増殖された抗原特異的な末梢血白血球 (Dupont, J., et al. 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A., et al. 2003 Blood 102:2498-2505) が含まれる。T 細胞は自家、あるいは同種であるか、又はインビトロでの遺伝子組み換え前駆細胞又は幹細胞由来であってよい。

【 0 0 7 7 】

好適な腫瘍抗原 (抗原性ペプチド) の何れも、本明細書中に記載される腫瘍関連の態様における使用に好適である。抗原の供給源には、様々な癌タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。抗原を、ペプチドとして、あるいは、無傷のタンパク質又はその一部として発現させることができる。無傷のタンパク質又はその一部は野生型であってもよく、又は、変異させることもできる。1つの好適な抗原が前立腺特異的膜抗原 (P S M A) である。

【 0 0 7 8 】

ウイルス抗原特異的な T リンパ球 (及び N K 細胞)

例えば、免疫低下している対象における病原体感染又は他の感染性疾患の治療において使用される好適な抗原には、限定されないが、サイトメガロウイルス (C M V)、エプスタイン・バーウイルス (E B V)、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) 及びインフルエンザウイルスに存在するウイルス抗原が含まれる。

【 0 0 7 9 】

C T L の非精製供給源は、骨髓、胎児、新生児もしくは成人又は他の造血系細胞供給源、例えば、胎児肝臓、末梢血又は臍帯血のような、当該技術分野で公知の何れかのものであってよい。様々な技術を、この細胞を分離するために用いることができる。例えば、負の選択方法により、非 C T L を最初に除くことができる。m A b は、正及び負の選択の両方のための特定の細胞系譜及び / 又は分化段階に関連するマーカーを同定するために特に有用である。

【 0 0 8 0 】

最終分化した細胞の大きな集団を比較的粗い分離によって最初に除くことができる。例えば、磁石ビーズ分離を、非常に多数の無関係な細胞を除くために最初に使用することができる。好ましくは、全造血系細胞の少なくとも約 8 0 %、通常的には、全造血系細胞の少なくとも 7 0 % が細胞単離の前に除かれる。

【 0 0 8 1 】

分離のための手法には、密度勾配遠心分離 ; リセッティング ; 細胞密度を変える粒子へのカップリング ; 抗体被覆された磁石ビーズによる磁気分離 ; アフィニティークロマトグラフィー ; m A b に連結されるか、又は、m A b との併用で使用される細胞毒性剤 (これには、補体及び細胞毒素が含まれるが、これらに限定されない) ; 及び、固体マトリックス、(例えば、プレート、チップ) に結合された抗体によるパンニング、水簸、又は、他の好都合な技術の何れかが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 2 】

分離及び分析のための技術には、フローサイトメトリーが含まれるが、これに限定されない。この場合、フローサイトメトリーは様々な程度の精巧さを有することができ、例えば、複数のカラーチャンネル、低角度光散乱検出チャンネル及び鈍角光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルを有することができる。

【0083】

細胞を、ヨウ化プロピジウム（PI）のような、死細胞と会合する色素を用いることによって、死細胞に対する選択をすることができる。好ましくは、細胞が、2%ウシ胎児血清（FCS）又は0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）を含む培地において、あるいは、他の何れかの好適な、好ましくは無菌の等張性培地において集められる。

【0084】

従って、本発明は一般には、抗原と結合する受容体と、外因性の副刺激リガンド（例えば、CD80、4-1BBL、OX40L、CD70及びCD30L）とを含むウイルス特異的又は腫瘍特異的なT細胞のような、免疫応答性細胞を提供する。

【0085】

ベクター

免疫応答性細胞（例えば、T細胞、CTL細胞、NK細胞）の遺伝子組み換えは、実質的に均一な細胞組成物に組換えDNA構築物を形質導入することによって達成できる。好ましくは、レトロウイルスベクター（ガンマ-レトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターのどちらか）が、DNA構築物を細胞に導入するために用いられる。例えば、副刺激リガンドタンパク質（例えば、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT及びCD30Lのような、腫瘍壊死因子（TNF）リガンド、又は、CD80及びCD86のような、Igスーパーファミリーリガンド）をコードするポリヌクレオチド、あるいは、抗原又はその変異体又はそれらのフラグメントと結合する受容体をコードするポリヌクレオチドを、レトロウイルスベクターにクローン化することができ、発現を、その内因性プロモーターから、又は、レトロウイルスの長末端反復から、又は、目的とする標的細胞タイプに対して特異的なプロモーターから行わせることができる。非ウイルスベクターを同様に使用することができる。

【0086】

副刺激リガンド

少なくとも1つの副刺激リガンドとの相互作用により、T細胞の完全な活性化のために必要とされる抗原非特異的なシグナルがもたらされる。副刺激リガンドには、限定されないが、腫瘍壊死因子（TNF）リガンド、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-12、IL-15又はIL21など）、及び、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーリガンドが含まれる。

【0087】

TNFリガンド

腫瘍壊死因子（TNF）は、全身性炎症に関与するサイトカインであり、急性期反応を刺激する。その主要な役割は免疫細胞の調節にある。腫瘍壊死因子（TNF）リガンドは数多くの共通する特徴を共有している。これらのリガンドの大部分が、短い細胞質セグメント及び比較的長い細胞外領域を含有するII型膜貫通タンパク質（細胞外C末端）として合成される。TNFリガンドには、限定されないが、神経成長因子（NGF）、CD40L（CD40L）/CD154、CD137L/4-1BBL、腫瘍壊死因子（TNF）、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fasリガンド（FasL）、CD30L/CD153、腫瘍壊死因子（TNF）/リンホトキシン-（LT）、リンホトキシン-（LT）、CD257/B細胞活性化因子（BAFF）/Blys/THANK/Tall-1、グルココルチコイド誘導TNF受容体リガンド（GITRL）、及びTNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）、LIGHT（TNFSF14）が含まれる。

【0088】

Igスーパーファミリーリガンド

10

20

30

40

50

免疫グロブリン (I g) スーパーファミリーは、細胞の認識プロセス、結合プロセス又は接着プロセスに関与する細胞表面タンパク質及び可溶性タンパク質の大きな一群である。これらのタンパク質は構造的特徴を免疫グロブリンと共有する (それらは免疫グロブリンドメイン (f o l d) を有する)。免疫グロブリンスーパーファミリーリガンドには、限定されないが、C D 8 0 及び C D 8 6 (これらはともに、C D 2 8 に対するリガンドである) が含まれる。

【 0 0 8 9 】

腫瘍抗原特異的又はウイルス抗原特異的な細胞を提供するための細胞の最初の遺伝子組み換えのために、レトロウイルスベクターが一般には形質導入のために用いられるが、他の何れかの好適なウイルスベクター又は送達システムを使用することができる。少なくとも2つの副刺激リガンドを含む抗原提示複合体を含む細胞を提供するための細胞のその後の遺伝子組み換えのために、レトロウイルスによる遺伝子移入 (形質導入) が同様に効果的であることが判明している。レトロウイルス及び適切なパッケージングシステムの組合せもまた効果的であり、この場合、カプシドタンパク質が、ヒト細胞に感染するために機能的である。様々な両種指向性のウイルス産生細胞株が知られており、これらには、P A 1 2 (Miller, et al. (1985) Mol.Cell.Biol. 5:431-437) ; P A 3 1 7 (Miller, et al. (1986) Mol.Cell.Biol. 6:2895-2902) ; 及び C R I P (Danos, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464) が含まれるが、これらに限定されない。両種指向性でない粒子もまた好適である (例えば、V S V G エンベロープ、R D 1 1 4 エンベロープ又は G A L V エンベロープによる偽型粒子、及び他の当該技術分野で公知の何れかのもの) 。

【 0 0 9 0 】

形質導入の可能な方法には、細胞を、例えば、Bregni, et al ((1992) Blood 80:1418-1422) の方法によって、産生細胞と直接に共培養すること、あるいは、例えば、Xu, et al. ((1994) Exp. Hemat. 22:223230) の方法、及び、Hughes, et al. ((1992) J. Clin. Invest. 89:1817) の方法によって、適切な増殖因子及びポリカチオンを用いて、又は、それらを用いることなく、ウイルス上清単独又は濃縮されたベクターストックと培養することも含まれる。

【 0 0 9 1 】

他の形質導入用ウイルスベクターを、本発明の副刺激リガンドを免疫応答性細胞において発現させるために使用することができる。好ましいことに、選択したベクターは、高い感染効率、並びに安定な組込み及び発現を示す (例えば、Cayouette et al., Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido et al., Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer et al., Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini et al., Science 272:263-267, 1996; 及び Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997を参照のこと)。使用可能な他のウイルスベクターには、例えば、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター及びアデノ関連ウイルスベクター、ワクシニアウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、又は、ヘルペスウイルス (例えば、エプスタイン・バールウイルスなど) が含まれる (同様にまた、例えば、下記文献のベクターを参照のこと、Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis et al., BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev et al., Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet, 337:1277-1278, 1991; Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller et al., Biotechnology 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993; 及び Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995)。レトロウイルスベクターが特によく開発され、臨床環境で使用されている (Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderso et al., 米国特許第 5 , 3 9 9 , 3 4 6 号) 。

【 0 0 9 2 】

非ウイルス法もまた、細胞におけるタンパク質の発現のために用いることができる。例

10

20

30

40

50

えば、核酸分子は、核酸をリポフェクションの存在下で投与することによって (Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512 1983)、核酸をアシアロオロソムコイド - ポリリンシンコンジュゲート化の存在下で投与することによって (Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989)、又は、外科的条件下での顕微注入によって (Wolff et al., Science 247:1465 1990)、細胞内に導入することができる。遺伝子移入のための他の非ウイルス的手段には、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション及びプロトプラス融合を使用するインピボでのトランスフェクションが含まれる。リボソームもまた、DNAを細胞内に送達するために潜在的に有益であり得る。正常な遺伝子を対象の患部組織に移植することもまた、正常な核酸をエクスピボでの培養可能な細胞タイプ (例えば、自己又は異種の初代細胞又はその子孫) に移入することによって達成することができ、その後、その細胞 (又はその後代) が、標化組織に注入されるか、又は、全身に注入される。

【0093】

ポリヌクレオチド療法において使用されるcDNA発現を、いずれかの好適なプロモーター (例えば、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス40 (SV40) プロモーター又はメタロチオネインプロモーター) から誘導することができる。また、いずれかの好適な哺乳動物調節エレメントによって調節することができる。例えば、所望により、特異的な細胞型における遺伝子発現を優先的に誘導することが知られているエンハンサーを、核酸の発現を誘導するために使用することができる。使用するエンハンサーには、限定されないが、組織特異的又は細胞特異的なエンハンサーとして特徴づけられるエンハンサーが含まれてもよい。あるいは、ゲノムクローンが治療構築物として使用される場合には、調節は同族の調節配列によって媒介されてもよく、又は、所望により、上記で記載されたプロモーター又は調節エレメントのいずれかを含む、異種の供給源に由来する調節配列によって媒介されてもよい。

【0094】

得られる細胞は、その後、組み換えられていない細胞のための条件と類似する条件のもとで成長させることができ、それにより、組み換え細胞を様々な目的のために増殖及び使用することができる。

【0095】

ポリペプチド及びアナログ

本発明はまた、免疫応答性細胞で発現されるとき、それらの抗腫瘍活性を高める様式で改変される、PZ1、P28z、4-1BBL、OX40L、CD70、LIGHT、及びCD30Lのポリペプチド又はそれらのフラグメントを含んでいる。本発明は、アミノ酸配列又は核酸配列を、配列の変化を起こすことによって最適化する方法を提供する。そのような変化には、いくつかの変異、欠失、挿入又は翻訳後修飾が含まれてよい。本発明はさらに、本発明のいずれかの天然に存在するポリペプチドのアナログを含んでいる。アナログは、本発明の天然に存在するポリペプチドと、アミノ酸配列の違いによって、又は、翻訳後修飾によって、又は、その両方によって異なる場合がある。本発明のアナログは一般には、本発明の天然に存在するアミノ酸配列のすべて又は一部と少なくとも85%の同一性を示し、より好ましくは90%の同一性を示し、最も好ましくは95%の同一性又は99%までの同一性を示す。配列比較の長さは、少なくとも5、10、15又は20のアミノ酸残基であり、好ましくは少なくとも25、50又は75のアミノ酸残基であり、より好ましくは100超のアミノ酸残基である。ここでも、同一性の程度を確認する1つの例示的な方法では、BLASTプログラムを使用することができ、e-3~e-100の確率スコアにより、関連性の高い配列が示される。改変には、ポリペプチドのインピボ及びインピトロでの化学的誘導体化が含まれ、例えば、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化又はグリコシル化が含まれる；そのような改変を、ポリペプチドの合成又はプロセ

シング、あるいは、その後に続く、単離された修飾酵素による処理の期間中に生じさせることができる。アナログはまた、本発明の天然に存在するポリペプチドとは、一次配列における様々な変化によって異なる場合がある。これらには、遺伝子変異体（天然型及び誘導型の両方）（例えば、放射線照射又は硫酸エタンメチルへの暴露によって、あるいは、Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.) (C SH Press, 1989)、又は、Ausubel et al., supra)に記載されるような部位特異的変異誘発によるランダム変異から生じる変異体）が含まれる。L - アミノ酸以外の残基、例えば、D - アミノ酸又は天然に存在しないアミノ酸又は合成アミノ酸（例えば、 α - アミノ酸又は β - アミノ酸）を含有する環化されたペプチド、分子及びアナログもまた含まれる。

【0096】

10

全長のポリペプチドに加えて、本発明はまた、本発明のポリペプチド又はペプチドドメインのいずれか1つのフラグメントを提供する。本明細書中で使用される用語「フラグメント」は、少なくとも5個、10個、13個又は15個のアミノ酸を意味する。他の態様において、フラグメントは、少なくとも20個の連続するアミノ酸、少なくとも30個の連続するアミノ酸、又は少なくとも50個の連続するアミノ酸であり、また、他の態様では、少なくとも60個～80個、100個、200個、300個又はそれ以上の連続するアミノ酸である。本発明のフラグメントは、当業者に公知の方法によって産生することができ、又は通常のタンパク質処理（例えば、生物学的活性のために必要としないアミノ酸の新生ポリペプチドからの除去、あるいは選択的mRNAスプライシング事象又は選択的タンパク質処理事象によるアミノ酸の除去）からもたらされてもよい。

20

【0097】

非タンパク質アナログは、本発明のタンパク質の機能的活性を模倣するために設計された化学構造を有する。そのようなアナログは本発明の方法に従って投与される。そのようなアナログは、元のポリペプチドの生理学的活性を超える場合がある。アナログ設計の方法は当該技術分野で周知であり、アナログの合成は、得られるアナログが免疫応答性細胞で発現されたとき、元のポリペプチドの抗腫瘍活性を増大するように化学構造を修飾することによるそのような方法に従って実施できる。これらの化学的修飾には、代替となるR基を置換すること、及び基準ポリペプチドの特定の炭素原子における飽和度を変化させることが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、タンパク質アナログはインビボでの分解に対して比較的耐性であり、これにより、投与時により長期に及ぶ治療効果がもたらされる。機能的活性を測定するためのアッセイには、下記の実施例において記載されるものが含まれるが、それらに限定されない。

30

【0098】

投与

本発明の遺伝子組み換え免疫応答性細胞（例えば、T細胞、NK細胞、CTL細胞又はそれらの前駆体）を含む組成物を、腫瘍、病原体感染、又は感染性疾患を治療するために対象に全身的又は直接に与えることができる。1つの態様において、本発明の細胞が、目的とする器官（例えば、腫瘍に冒された器官）に直接に注入される。あるいは、遺伝子組み換え免疫応答性細胞を含む組成物が、例えば、循環系（例えば、腫瘍血管系）への投与によって、目的とする器官に間接的に与えられる。増殖剤及び分化剤を、T細胞、NK細胞、CTL細胞の産生をインビトロ又はインビボで増大させるために、細胞の投与前、投与中又は投与後に与えることができる。

40

【0099】

組み換えられた細胞を、何れかの生理学的に許容される賦形剤中で、通常の場合には血管内に投与することができるが、組み換えられた細胞を、骨、又は、細胞が再生及び分化のための適切な部位を見出し得る他の好都合な部位（例えば、胸腺）に導入してもよい。通常、少なくとも 1×10^5 個の細胞が投与され、これは最終的には 1×10^{10} 個以上に達する。本発明の遺伝子組み換え免疫応答性細胞は、精製された細胞集団を含むことができる。当業者は、蛍光活性化細胞分取（FACS）のような、様々な周知の方法を使用して、集団における遺伝子組み換え免疫応答性細胞の割合を容易に決定することができる

50

。遺伝子組み換え免疫応答性細胞を含む集団における純度の好ましい範囲は、約 50 % ~ 約 55 %、約 55 % ~ 約 60 %、及び約 65 % ~ 約 70 % である。より好ましくは、純度は約 70 % ~ 約 75 %、約 75 % ~ 約 80 %、約 80 % ~ 約 85 % である；さらにより好ましくは、純度は、約 85 % ~ 約 90 %、約 90 % ~ 約 95 %、及び約 95 % ~ 約 100 % である。投与量を、当業者は容易に調節することができる（例えば、純度の低下が、投与量の増大を必要とする場合がある）。細胞を注射、カテーテルなどによって導入することができる。所望により、様々な因子も含めることができ、これらには、インターロイキン（例えば、IL - 2、IL - 3、IL - 6、及び IL - 11、ならびに、それ以外のインターロイキン）、コロニー刺激因子（例えば、G - CSF、M - CSF 及び GM - CSF など）、インターフェロン（例えば、 α - インターフェロンなど）、及び、エリスロポエチンが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0100】

本発明の組成物には、遺伝子組み換え免疫応答性細胞又はその前駆体と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が含まれる。投与は自己又は異種であることが可能である。例えば、免疫応答性細胞又は前駆体を 1 人の対象から得て、同じ対象に、又は異なる適合し得る対象に投与することができる。

本発明の末梢血由来の免疫応答性細胞又はその子孫（例えば、インビボ、エクスピボ又はインピトロ由来）を、局所注入（カテーテル投与を含む）、全身注入、局所注入、静脈内注入又は非経口投与によって投与することができる。本発明の治療用組成物（例えば、遺伝子組み換え免疫応答性細胞を含有する医薬組成物）を投与するとき、治療用組成物は一般には、単位投与量の注入可能な形態（溶液、懸濁液、乳濁液）に製剤化される。

20

【0101】

製剤化

遺伝子組み換え免疫応答性細胞を含む本発明の組成物は、都合良くは、選択された pH に緩衝化されてよい無菌の液体製剤、例えば、等張水溶液、懸濁液、乳濁液、分散物又は粘性組成物として与えることができる。液体製剤は通常、ゲル、他の粘性組成物及び固体組成物より、調製することが容易である。加えて、液体組成物は、特に注射によって投与することが幾分より便利である。他方で、粘性組成物を、特定の組織とのより長い接触期間を提供するために、適切な粘度範囲において配合することができる。液体組成物又は粘性組成物は、例えば、水、生理食塩水、リン酸塩緩衝化生理食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液状ポリエチレングリコールなど）及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散用媒体であってよい担体を含むことができる。

30

【0102】

無菌の注射溶液を、本発明を実施する際に利用される遺伝子組み換え免疫応答性細胞を、所望のように、その他の成分の様々な量とともに、適切な溶媒の必要とする量に配合することによって調製することができる。そのような組成物は、好適な担体、希釈剤、又は賦形剤（例えば、無菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなど）との混合であってよい。組成物はまた、凍結乾燥することができる。組成物は、所望の投与経路及び製剤に依存して、様々な補助物質を含有できて、例えば、湿潤剤、分散剤又は乳化剤（例えば、メチルセルロース）、pH 緩衝化剤、ゲル化剤又は粘度増強添加剤、保存剤、矯味矯臭剤、着色剤などを含有できる。標準的教本、例えば、“REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE”，17th edition, 1985、これは参照により本明細書中に組み込まれる）などを、好適な製剤を、過度な実験を伴うことなく調製するために参考にすることができる。

40

【0103】

抗菌性保存剤、酸化防止剤、キレート剤、及び緩衝剤を包含する、組成物の安定性及び無菌性を高める様々な添加剤を加えることができる。微生物の作用を防止することを、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって保証することができる。注射用医薬品形態の長期に及ぶ吸収を、吸収を遅らせる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチン）の使用によってもたらしめることができる。しかしながら、本発明により、使用する何れかの賦形剤、希釈剤又

50

は添加剤は、遺伝子組み換え免疫応答性細胞又はその前駆体との適合性を有していなければならない。

【0104】

組成物は等張性にしてもよい。すなわち、組成物は、血液及び涙液と同じ浸透圧を有することができる。本発明の組成物の所望の等張性を、塩化ナトリウム、又は他の薬学的に許容される物質（例えば、デキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコール、あるいは、他の無機溶質又は有機溶質など）を使用して達成することができる。塩化ナトリウムが、特にナトリウムイオンを含有する緩衝液については好ましい。

【0105】

所望により、組成物の粘度を、薬学的に許容される増粘剤を使用して、選択されたレベルで維持することができる。容易かつ経済的に入手可能であり、また、共同して機能することが容易であるので、メチルセルロースが好ましい。他の好適な増粘剤には、例えば、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが含まれる。増粘剤の好ましい濃度は、選択された物質に依存する。重要な点は、選択した粘度を達成するであろう量を使用することである。明白ではあるが、好適な担体及び他の添加剤の選択は、正確な投与経路及び具体的な投与形態、例えば、液体投与形態の性質（例えば、組成物が、溶液、懸濁液、ゲル又は徐放性形態又は液体充填形態のような、別の液体形態に配合されることになるかどうか）に依存する。

【0106】

組成物の構成成分が、化学的に不活性であるように選択されなければならないこと、又本発明に記載されるような遺伝子組み換え免疫応答性細胞の生存性又は効力に影響を及ぼさないことを、当業者は認識されるだろう。このことは、化学及び薬学の原理に熟練した当業者には何ら問題とならず、あるいは、様々な問題を、標準的な教本を参照することによって、又は、本開示、及び、本明細書中に引用される文書から、（過度な実験を伴わない）簡単な実験によって容易に避けることができる。

【0107】

本発明の遺伝子組み換え免疫応答性細胞の治療的使用に関する1つの検討事項は、最適な効果を達成するために必要な細胞の量である。投与されるべき細胞の量は、治療されている対象に対して変化する。1つの態様において、 10^4 個～ 10^{10} 個の、 10^5 個～ 10^9 個の、又は 10^6 個～ 10^8 個の本発明の遺伝子組み換え免疫応答性細胞がヒト対象に投与される。好ましい態様において、少なくとも約 1×10^8 個の、 2×10^8 個の、 3×10^8 個の、 4×10^8 個の、及び 5×10^8 個の本発明の遺伝子組み換え免疫応答性細胞がヒト対象に投与される。どのくらいが効果的な用量であると見なされるかを正確に決めることは、具体的な対象のサイズ、年齢、性別、体重及び状態を含めて、それぞれの対象に対する個別的な要因に基づいてもよい。当業者は、投与量を本発明の開示及び当該技術分野における知識から容易に確認することができる。

【0108】

当業者は、本発明の組成物における細胞、ならびに、最適な添加剤、賦形剤及び/又は担体の量、また、本発明の方法において投与されるべき細胞、ならびに、最適な添加剤、賦形剤及び/又は担体の量を容易に決定することができる。典型的には、（活性な幹細胞（複数を含む）及び/又は薬剤（複数を含む）に加えて）任意の添加剤が、0.001～50%（重量）の量でリン酸塩緩衝生理食塩水中に存在して、有効成分が、約0.0001wt%～約5wt%（好ましくは約0.0001wt%～約1wt%、さらにより好ましくは約0.0001wt%～約0.05wt%）のように、マイクログラムからミリグラムの程度で存在する。従って、当然のことではあるが、動物又はヒトに投与される何れかの組成物について、及び何れかの特定の投与方法について、好適な動物モデル（例えば、齧歯類、例えば、マウスなど）における致死量（LD）及びLD50を確認することによるような、毒性を、並びに、好適な応答を誘発する、組成物（複数を含む）の投薬量、それにおける成分の濃度、及び組成物（複数を含む）の投与時期を決定することが好ましい。そのような決定には、当業者の知識、本発明の開示及び本明細書中に引用される文

10

20

30

40

50

書から、過度な実験を必要としない。また、連続投与のための期間を、過度な実験を伴うことなく確認することができる。

【0109】

治療方法

本明細書には、対象における腫瘍を治療する方法が提供される。本明細書には、免疫不全のヒト対象のような、対象における病原体感染又は他の感染性疾患を治療する方法も包含される。これらの方法は、所望の効果が現状の緩和又は再発の防止であるならば、本発明のT細胞、NK細胞又はCTL細胞の、所望の効果に到達するための有効量を投与することを含む。治療のために、投与される量は、所望の効果を生じるための有効な量である。有効量を単回で、又は一連の投与で提供できる。有効量をボラス剤で、又は連続灌流によって提供できる。

10

【0110】

「有効量」(又は「治療有効量」)は、治療において有益な又は所望の臨床結果をもたらすために十分な量である。有効量を単回又はそれ以上の投与量で対象に投与できる。治療に関して、有効量は、疾患の進行を緩和する、改善する、安定化する、反転する、又は遅延するために、あるいは、疾患の病理的帰結を減少させるために十分な量である。有効量は一般に症例毎に医師によって決定され、当業者の技能の範囲内である。有効量に到達するための適切な用量を決定する際に、典型的にはいくつかの因子を考慮に入れる。これらの因子には、対象の年齢、性別及び体重、治療する疾患、疾患の重篤度、ならびに、投与する抗原結合フラグメントの形態及び有効濃度を含む。

20

【0111】

抗原特異的T細胞を使用する養子免疫療法について、典型的には 10^9 個の範囲の細胞用量を注入する。遺伝子組み換え細胞を宿主に投与してその後分化が生じることにより、T細胞は特異的な抗原に対して特異的に指向するよう誘導される。T細胞の「誘導」には、抗原特異的T細胞を、例えば、欠失又はアネルギーによって不活性化することが含まれてもよい。不活性化は、例えば自己免疫障害において、耐性を確立又は再確立するために特に有用である。組み換え細胞は、当該技術分野で公知の方法の何れかによって投与でき、そのような方法は、これらに限定されないが、静脈内、皮下、鼻腔内、腫瘍内、クモ膜下、胸膜内、腹腔内、及び、胸腺へ直接を含んでいる。

【0112】

治療的方法

本発明は、その必要のある対象において免疫応答を増大させるための方法を提供する。1つの態様において、本発明は、対象において腫瘍を治療又は予防する方法を提供する。本発明は、従来の治療的介入に従順しない前立腺癌又は転移性前立腺癌を有する対象を治療するために特に有用な治療法を提供する。治療に対する好適なヒト対象は、典型的には臨床基準により区別される2つの治療群を含む。「進行した疾患」又は「高い腫瘍負荷」を有する対象が、臨床的に測定可能な腫瘍を有する対象である。臨床的に測定可能な腫瘍は、(例えば、触診、CA Tスキャン、ソノグラム、マンモグラム又はX線;それら自身ではこの集団を同定するには十分ではない、陽性の生化学的又は組織病理学的マーカーによる)腫瘍の質量に基づいて検出可能な腫瘍である。本発明において具体的に例示される医薬組成物が、対象の疾患を緩和するという目的において、抗腫瘍応答を誘発するためにこれらの対象に投与される。理想的には、結果として腫瘍質量の減少がもたらされるが、何らかの臨床的改善は利益となる。臨床的改善には、腫瘍のリスク又は進行速度の低下、あるいは、病理的帰結の減少が含まれる。

30

40

【0113】

好適な対象の第2群は、「アジュバント群」として当該技術分野で公知である。これは、腫瘍の病歴を有したことがあるが、別の治療法に対して応答性であった個人である。先の治療法には、これらに限定されないが、外科的切除、放射線療法及び従来の化学療法が含まれる。結果的に、これらの個人は、臨床的に測定可能な腫瘍を何ら有していない。しかしながら、これらの個人は、最初の腫瘍部位の近くであるか、又は、転移によるかのど

50

ちらかで、疾患進行のリスクがあることが疑われる。この群はさらに、高リスク個人及び低リスク個人に細分化することができる。この細分化は、最初の治療の前又は後で観測される特徴に基づいて行われる。これらの特徴は臨床技術分野で公知であり、それぞれの異なる腫瘍について適切に定義される。高リスクのサブグループの典型的な特徴は、腫瘍が隣接組織に侵入しているか、又はリンパ節の関与を示す個人である。

【0114】

別の一群は、腫瘍に対する遺伝的素因を有しているが腫瘍の臨床的徴候を未だ明白に示していない群である。例えば、乳癌に関連する遺伝子突然変異について検査で陽性であるが未だ出産可能な年齢である女性は、予防的手術の実施に該当する程度にまで腫瘍が発生するのを防止するための治療において、本明細書中に記載される1つ又はそれ以上の抗原結合フラグメントの受容を望むことができる。

10

【0115】

下記の腫瘍のいずれかを有するヒト腫瘍対象が、特に好適な対象である：神経膠芽細胞腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、腺癌、神経膠腫、軟組織肉腫及び様々な癌腫（前立腺癌及び小細胞肺癌を含む）。好適な癌腫にはさらに、腫瘍学の分野で公知のいずれかが含まれ、これらには、星状膠細胞腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、乏突起神経膠腫、脳室上衣細胞腫、髓芽細胞腫、未分化神経外胚葉性腫瘍（PNET）、軟骨肉腫、骨原性肉腫、膵管腺癌、小細胞肺腺癌及び大細胞肺腺癌、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、扁平上皮癌、気管支肺癌、上皮腺癌、並びに、それらの肝臓転移物、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、ヘパトーム、胆管癌、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、基底細胞癌、汗腺癌、乳頭状癌、脂腺癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、髓芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髓膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、多発性骨髄腫、ヴァルデンシュトレームマクログロブリン血症、並びに、重鎖病、乳腫瘍（例えば、導管腺癌及び小葉腺癌など）、子宮頸部の扁平上皮癌及び腺癌、子宮及び卵巣の上皮癌、前立腺腺癌、膀胱の移行扁平上皮癌、B細胞リンパ腫及びT細胞リンパ腫（結節性及びびまん性）、形質細胞腫、急性白血病及び慢性白血病、悪性メラノーマ、軟組織肉腫及び平滑筋肉腫が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0116】

対象が、疾患の進行した形態を有する場合、治療の目的には、疾患進行の緩和又は逆行、及び/あるいは、副作用の改善が含まれてもよい。対象が、それについて既に治療を受けている疾患の病歴を有する場合、治療の目的には典型的には、再発のリスクの低下又は遅延が含まれる。

30

【0117】

従って、本発明は、腫瘍抗原と結合する受容体と、副刺激リガンドをコードするベクターとを含む免疫応答性細胞の有効量を投与することを含む、対象において腫瘍を治療又は防止する方法を提供する。1つの態様において、腫瘍は、前立腺癌、結腸癌、乳癌及び神経膠芽細胞腫からなる群より選択される。別の態様において、腫瘍抗原は、前立腺特異的膜抗原、CD19、NY-ESO-1、WT-1又はhTERTである。

40

【0118】

別の取り組みにおいて、本発明は、抗原と結合する受容体と、副刺激リガンドをコードするベクターとを含む免疫応答性細胞の有効量を投与することを含む、対象において耐性を増強する方法を提供する。1つの態様において、この方法は、自己免疫応答疾患、又は、同種移植に関連する疾患を予防又は軽減する。

【0119】

副刺激リガンドの構成的表面発現の結果として、養子移入されたヒトT細胞又はヒトNK細胞には、副刺激リガンドを欠いている本質的に免疫抗原性が低い又は免疫不全の環境において、増強された増殖能、細胞溶解能及び生存能が賦与される。さらには、腫瘍又はウイルス感染へのそれらの局在化、及び、それらの増殖の後、副刺激リガンドを発現する

50

T細胞は、腫瘍部位又はウイルス感染部位を、生理学的な抗腫瘍応答又は抗ウイルス応答に關与する広範囲の免疫細胞（腫瘍浸潤性のリンパ球、NK-、NK T-細胞、樹状細胞及びマクロファージ）のための伝導性の高い環境に変える。

【0120】

他の態様において、本発明は、病原体感染（例えば、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、寄生虫感染又は原生動物感染）を有する対象を治療するための方法を提供する。本発明は、免疫低下している対象において免疫応答を高めるために特に有用である。本発明の方法を使用する治療の影響を受けやすい例示的なウイルス感染には、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン・バールウイルス（EBV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）及びインフルエンザウイルスの感染が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0121】

従って、本発明は、本明細書中に記載されるような免疫応答性細胞の有効量を投与することを含む、対象において病原体感染を治療又は防止する方法を提供する。

【0122】

キット

本発明は、腫瘍、病原体感染、免疫障害又は同種移植に関連する症状を治療又は防止するためのキットを提供する。1つの態様において、キットは、1つ又はそれ以上の副刺激リガンドを含む免疫応答性細胞の有効量を単位用量形態で含有する治療用又は予防用組成物を含む。いくつかの態様において、キットは、治療用又は予防用ワクチンを含む滅菌容器を含み、そのような容器は、ボックス、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、ポーチ、プリスターバック又は当該技術分野で公知の他の好適な容器形態が可能である。そのような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、メタルフォイル又は薬剤を保持するために好適な他の材料から産生することができる。

20

【0123】

所望により、免疫応答性細胞は、腫瘍、病原体感染、免疫障害又は同種移植に関連する症状を有する、あるいはこれらを発症する危険性がある対象にこの細胞を投与するための説明書と一緒に提供される。説明書は一般には、腫瘍、病原体感染、免疫障害又は同種移植に関連する症状の治療又は防止のために組成物を使用することについての情報を含む。他の態様において、説明書は下記のうちの少なくとも1つを含む：治療剤の説明；腫瘍、病原体感染、免疫障害又は同種移植、あるいは、それらの症状を治療する又は防止するための投与計画及び投与；注意；警告；適応症；使用禁忌；過量情報；有害反応；動物薬理学；臨床研究；及び/又は参考文献。説明書は、（存在するときには）容器に直接に印刷されるか、又は容器に添付されるラベルとして、あるいは、容器内又は容器とともに供給される別個のシート、パンフレット、カード又はフォルダーであってよい。

30

組換え方法は当該技術分野で周知である。本発明の実施では、別途示されない限り、当業者の範囲内である、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来技術が用いられる。そのような技術は、文献において、例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” second edition (Sambrook et al., 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Handbook of Experimental Immunology” (Weil & Blackwell, eds); “Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (Miller & Calos, eds, 1987); “Current Protocols in Molecular Biology” (Ausubel et al., eds., 1987); “PCR: The Polymerase Chain Reaction” (Mullis et al., eds., 1994); 及び “Current Protocols in Immunology” (Coligan et al., eds., 1991) などにおいて詳しく説明される。これらの技術はポリヌクレオチド及びポリペプチドの産生に適用することができる、また、そのようなものとして、本発明を組み立てる際に、また、本発明を実施する際に考慮することができる。特に有用な技術が下記の欄において検討される。

40

【0124】

（実施例）

下記の実施例は本発明をさらに説明するものであり、これらの例示により本発明がこれ

50

に限定されるものではない。

【実施例 1】

【0125】

抗原提示細胞 (APC) による副刺激無しで、内因性 T 細胞受容体又はキメラ抗原受容体を介する周期的な刺激により、CD80 及び 4-1BB L を共発現する T 細胞は、顕著な増殖応答をもたらす。

T 細胞における副刺激リガンドの構成的発現が、APC が媒介する副刺激の代わりになり得るかどうかを評価するために、ヒト初代 T 細胞の T 細胞の応答を 3 つの実験系において最初に調べた。抗 CD3 (OKT3) が媒介する T 細胞活性化を使用して、CD80 及び 4-1BB L を形質導入した末梢血 T リンパ球の増加を定量化した (図 1 a)。ここで、この形質導入した T リンパ球を、どちらかのリガンドを単独で形質導入した T 細胞、又は何ら形質導入していない T 細胞と比較した。副刺激リガンド非存在下の反復性の T 細胞受容体 (TCR) の刺激のみでは、最初の再刺激の後、T 細胞を増殖できず、T 細胞数の急速な減少をまねいた (図 1 b)。際立って対照的に、OKT3 に刺激された CD80 + 4-1BB L + T 細胞は、21 日間にわたる平均して 237 倍より高い増殖を誘発した。これに対して、どちらかのリガンドを単独で形質導入した T 細胞の増殖は、平均して 1/8.1 に低下した ($p < 0.0001$)。これらの結果に基づいて、副刺激による T 細胞のコンセプトを臨床的に関連する養子 T 細胞療法の応用に拡張するために、サイトメガロウイルス (CMV) に特異的な記憶ドナー T 細胞 (memory donor T cell)、及び分化抗原に特異的な、遺伝子的にリダイレクトした自己 T 細胞 (genetically redirected autologous T cell) の 2 種の T 細胞に適用した。HLA-A*0201 + pp65 + 人工 APC²⁴ の上で一時的に増殖させた CMV - pp65 に特異的な T リンパ球に、CD80 及び 4-1BB L を形質導入した (図 1 c)。HLA-A*0201 + pp65 を形質導入した結腸腫瘍細胞株 Caco-2 に曝した後、CD80 及び 4-1BB L の両方の副刺激リガンドを有する T 細胞は、減少し続ける対照群の T 細胞数と比較して、著しく高い (209 倍、 $p < 0.0001$) 増殖を示した (図 1 d)。

【0126】

腫瘍反応性のヒト T リンパ球を迅速に産生するために、末梢血 T 細胞に、キメラ抗原受容体 Pz1 (Gade et al., Cancer Res. 65:9080-9088, 2005)、すなわち腫瘍抗原 PSMA に対して特異的な非 HLA 制限抗原受容体をレトロウイルスにより形質導入した。Pz1 受容体は、ヒト CD3 シグナリングドメインと融合する PSMA 結合性単鎖抗体フラグメントを含み、臨床試験において現在使用されている他のキメラ抗原受容体と構造的に類似している。CD80 及び 4-1BB L を共発現する Pz1 + T 細胞 (図 1 e) は、PSMA⁺、CD80⁻、CD86⁻、4-1BB L⁻ LNCaP 細胞による週 3 回の刺激の後、顕著な増殖応答を示した (平均して 1042 倍の増殖、図 1 f の上段のグラフ)。この増大は、CD80 及び 4-1BB L を、T 細胞においてではなく、腫瘍細胞において発現させたときに得られた増加 (図 1 f の下段のグラフ) よりも 9 倍大きかった ($p < 0.0001$)。さらなる分析では、従来法で刺激した T リンパ球と比較して、CD80 及び 4-1BB L を共発現する T 細胞を PSMA に曝すことによる IL-2 及び IFN- γ のより増大した誘導、更にはより大きいそれらの抗原特異的な細胞溶解能及び低下した آپトトーシス感受性が観察された (データは示さず)。同時に、CD80 の存在又は不存在で、OX40 L、CD27 L (CD70) 又は CD30 L を含む TNF リガンドファミリー⁵ を他のメンバーを検討した結果、CD80 及び 4-1BB L の組合せが、最も強力であることが見出された (データは示さず)。

【0127】

全体として、これらのインビトロでの検討は、CD80 及び 4-1BB L を共発現する T リンパ球が、不十分な TCR 活性化を強力に促進でき、さらに APC が提供する副刺激の欠如の代用になり得ることを明らかにしている。

【実施例 2】

【0128】

10

20

30

40

50

CD80及び4-1BBLを共発現するT細胞は、確立された全身性腫瘍を根絶する。

本発明者らのCD80⁺4-1BBL⁺T細胞の効力をインビボで調べるために、PSMA⁺PC-3腫瘍細胞(Gong et al., Neoplasia 1:123-7,1999、これはその全体を参照により本明細書に取り込まれる)を利用して、多病巣性の確立された前立腺癌のモデルを作成した。養子T細胞療法を開始する前に、腫瘍を静脈内に接種し、4週間後に、二形態の生物発光及び磁気共鳴画像化を使用して可視化した。肺、頸部リンパ節、骨髄及び肝臓を主要疾患部位として同定した(図2a)。このモデルにおいて、腫瘍を接種した後、CD80又は4-1BBLのいずれか又は両者を発現するか、あるいはどちらも発現しない、 8×10^6 個のそれぞれのPSMA標的化T細胞の単回静脈注射により、4週間処置した。

10

【0129】

形質導入していないT細胞と同様に、標的のPSMA⁺腫瘍をインビトロで溶解できなかったCD19標的化T細胞の 8×10^6 個で処置された対照マウスは、腫瘍組織量がマウスを屠殺しなければならなくなるまで絶え間なく増大した(図2b、図2c)。Pz1⁺T細胞による処置では、短期間で腫瘍組織量の減少をもたらしたが、その後は末期腫瘍への進行が続き(図2b)、これにより、12日間のわずかながらの延命効果しかなかった($p = 0.0001$ 、図2c)。PSMA標的化T細胞におけるCD80又は4-1BBLのどちらか単独での構成的発現は、この治療において、ほんのわずかに増強しただけであり、生存期間の中央値をそれぞれ63日及び66日に延長した(それぞれ、 $p = 0.077$ 、 $p = 0.056$)。CD80及び4-1BBLを共発現するT細胞は、有意な応答を誘導し、養子T細胞導入後4日目に腫瘍組織量を1/3.3に減少させた($p = 0.0028$)。Pz1⁺T細胞処置群と比較して、16日後に1/1375への減少が得られた($p = 0.0002$)。10匹中7匹の処置動物が、Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺Tリンパ球を注入した後200日間、腫瘍を有しないままであり、他の処置群又は対照群の全てにおいて、腫瘍を有しない動物は0匹であった(図2c)。治療効果が十分ではなかった3匹のマウスは最初、再発する前に顕著な腫瘍退行を示し(図2b)、100日間生存した(図2c)。

20

【実施例3】

【0130】

インビボでのT細胞の増殖は顕著で、抗原特異的である。

30

インビボでのT細胞の遊走及び蓄積を腫瘍局在化及び腫瘍組織量に関連して追跡及び定量化するために、養子移入したT細胞をさらに、コメツキムシRed-ルシフェラーゼ(Ponomarev et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004 May; 31(5):740-51)で標識した(CBR-luc、図3a)。Pz1⁺T細胞で処置したマウスの連続画像化は、T細胞注入後4日目にピークに達するシグナルを示し、優れた増加が示された(図3b)。その後、低レベルのシグナルが18日目まで検出可能であった。Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺T細胞の場合には、ピークシグナルが8日目に検出され(Pz1⁺T細胞よりも41倍高い低位光子計数(nadir photon count)、 $p = 0.0009$)、その後、徐々にシグナルが低下したが、いくつかの動物では、生物発光が100日目まで依然として検出できた(図3b)。19z1⁺Tリンパ球には無いCD80及び4-1BBLの共発現の効果(図3b)が、増殖を生じさせるために抗原刺激を必要とするということと一致していることは、重要である。1群あたり3匹の処置マウスにおける肺の単細胞懸濁物のフローサイトメトリー分析及びT細胞計数では、実際のT細胞数が、得られた生物発光シグナル強度と極めてよく一致していることが確認された(図3c、図3d)。従って、これらの結果は、CD80及び4-1BBLを共発現するT細胞は、完全でないとしても、最終的な減衰状態に入る前に、抗原依存的に実質的なT細胞クリアランスを拡張させることを明らかにした。

40

【実施例4】

【0131】

副刺激リガンドCD80及び4-1BBLのそれぞれの受容体であるCD28及び4-

50

1 B B との免疫学的シナプス (immunological synapse) における接触が、機能的 T 細胞の自己副刺激に先行する。

構成的に発現した副刺激リガンドが T 細胞をシス作用で活性化するかどうかを検討するために、これらのリガンドが T 細胞の活性化においてそれらのコグネイト受容体とともに共局在化するかという問題を最初に検討した。C D 2 8 及び 4 - 1 B B はともに、免疫学的シナプスの中心膜区画へ集められた後に、T 細胞受容体 (T C R) のシグナル伝達を増幅する^{3 1 ~ 3 3}。従って、T 細胞と腫瘍細胞の接触領域への C D 8 0 及び 4 - 1 B B L の共局在化が、自己副刺激のための必要条件であると推察される。4 - 1 B B L の分布を共焦点顕微鏡によって可視化するために、細胞質ドメインを単量体 d s R e d と融合し、このタンパク質を P z 1 を形質導入した C D 8 + T リンパ球において C D 8 0 と共発現させた。10 10 改変されていない C D 2 8 + 4 - 1 B B L + L N C a P 細胞と混合する直前に、T 細胞を、シナプス形成後の脂質ラフトクラスターを可視化するためにフルオレセインイソチオシアナート複合化コレラトキシン サブユニット (F I T C - C T B) で標識化した。L N C a P 腫瘍との結合に続いて、4 - 1 B B L 及び C D 8 0、更には 4 - 1 B B 及び C D 2 8 が、コレラトキシン - F I T C 陽性 T 細胞と腫瘍細胞の接触領域に集められた (図 4 a、図 4 b)。この相互作用の機能的結果を調べるために、グランザイム B (G R B) の共局在化を観察した。まばらではあるが、明確な G R B 凝縮が、P z 1 発現 C D 8 + T 細胞及びその同族腫瘍標的のクラスターにおける接触域の近くに局在化した (図 4 c、図 4 d) を分析して、定量化した。T 細胞と腫瘍細胞の接合部への G R B に集められた中央値は、C D 8 0 + 4 - 1 B B L + T 細胞において 2 . 2 倍に増幅された (p = 0 . 0 0 0 1)。20 0 1)。これらの観測の差異が、実際に同じ細胞内の 4 - 1 B B L と 4 - 1 B B との結合の結果であったことを確認するために、4 - 1 B B の発現を、4 - 1 B B L 及び 4 - 1 B B 特異的 s h R N A の安定的共発現によってノックダウンさせた (データは示さず)。4 - 1 B B のノックダウンは、すべての画像化された細胞クラスターにおける T 細胞接合部での 4 - 1 B B L の存在にもかかわらず、シナプスの近くにおける G R B 密度を著しく低下させた (1 / 2 . 0 2 に低下、p < 0 . 0 0 0 1)。これらの知見は、免疫学的シナプスにおける抗原誘導的な接触の後に、副刺激リガンドが、同じ T 細胞表面上でその受容体と機能的に結合することを強く示唆している。

【 0 1 3 2 】

自己副刺激をさらに明らかにするために、内因性の 4 - 1 B B / 4 - 1 B B L 相互作用を、直近に形質導入した T 細胞における 4 - 1 B B L の最も初期の発現後に分析することができる、単一細胞アッセイを行った。これを実施するために、ホタルルシフェラーゼを、C D 3 + C D 2 8 + 4 - 1 B B - の J u r k a t T 細胞 (J N L) のクローンにおいて N F - B (4 - 1 B B シグナル伝達の重要な下流側のエフェクター) の転写制御下で最初に発現させた。散発的なバイスタンダー副刺激による N F - B 誘導を排除するために、J N L 細胞を、4 - 1 B B、4 - 1 B B L 及び C D 8 0 をコードするレトロウイルスベクターに曝し、その 4 時間後、すなわち、最初の検出可能な表面遺伝子発現のかなり前に (データは示さず)、限界希釈によってサブクローン化し、プレートに結合された O K T 3 によって直ちに刺激した。図 4 e に示されるように、単離された C D 8 0 + C D 2 8 + 4 - 1 B B L + 4 - 1 B B + T 細胞は、対照ベクターを形質導入した J N L 細胞とは対照的に、N F - B を顕著に上向き調節した。発光シグナルを、(製品仕様書の) Method s に記載されるように、単一の多重形質導入細胞を含有している 3 6 ウエルで観察した。40 40 2 つのリガンド対の共発現は N F - B 依存的シグナルを 3 . 8 倍に増大させた (対照 J N L と比較して; p < 0 . 0 0 0 1; 図 4 f)。このアッセイの何れの時点でも副刺激リガンドの唯一の供給源は単離された T 細胞自身の表面であったのだから、この N F - B による上向き調節は自己副刺激の影響だけを反映したものであった。

【実施例 5】

【 0 1 3 3 】

抗原特異的なバイスタンダー (bystander) T 細胞のインビトロでのトランス副刺激
副刺激リガンドの構成的発現は、遺伝子組み換え T 細胞をトランス作用で副刺激 T 細胞

10

20

30

40

50

へすることも可能にする。注目すべきことに、 $CD80^+4-1BBL^+T$ 細胞及び $CD80^+4-1BBL^-T$ 細胞とを含む三細胞クラスターが、図4に示される共焦点による検討において時々確認された(図5a)。トランス副刺激の機能的証拠を提供するために、 $CD80$ 及び $4-1BBL$ を発現するPSMA特異的T細胞を、 $CD80$ 又は $4-1BBL$ を形質導入していないカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)標識のT細胞と混合する共培養系を考案した。これらのCFSE標識したCMVpp65特異的T細胞が自己のバースタンダー $Pz1^+CD80^+4-1BBL^+T$ リンパ球によって効果的に副刺激されたことを見出した(図5b、図5c)。トランスウエル膜によるそれらの分離が、細胞の接触依存的メカニズムと一致して、GRBの強力な誘導及びpp65キラー細胞において開始された顕著なT細胞の増殖を大きく低下させているので(図5d)、2つのT細胞集団の間での物理的接触は、CMV反応性の細胞傷害性Tリンパ球の増殖のための必要条件であった。

【実施例6】

【0134】

腫瘍浸潤T細胞のインビボでのトランス副刺激

本発明者らは、これらの観測から、T細胞媒介のトランス副刺激がインビボで作用するかを調べることに到った。この目的のために、次の公知の2つの動物モデルを組み合わせた。腫瘍が肺に限定されるRM1-PSMA腫瘍モデル(Gade et al., Cancer Res. 65:9080-9088, 2005)、及び腫瘍細胞が骨髄に選択的にコロニーを形成するRaji腫瘍モデル(Brentjens et al., Nat Med. 2003 Mar;9(3):279-86)である。すべてのマウスを、 $Pz1$ を形質導入したT細胞(これはCBR-1ucも発現した(図3))で処置した。次いで、ルシフェラーゼ陰性の $Pz1^+T$ 細胞(これは $CD80$ 及び $4-1BBL$ を発現するか、又は、 $CD80$ 及び $4-1BBL$ を有しないかのいずれかである)を動物に注入した。腫瘍細胞におけるガウシア-ルシフェラーゼ(GaLuc)の発現、及び、 $Pz1^+$ のT細胞におけるCBR-1ucの発現により、腫瘍の進行、並びにT細胞の空間的及び時間的な蓄積を同時にモニターするための二重生物発光画像化の使用が可能であった。すべての処置群において養子移入後6時間(0日目)で、CBR-1uc $^+$ リンパ球の類似の組織分布及び生物発光シグナルが観測された(図6a)。2日目に、CBR-1uc $^+Pz1^+T$ 細胞に対する $Pz1^+CD80^+4-1BBL^+T$ 細胞の効果は未だ大きくなかった(中央値で1.2倍、バースタンダーとしての $Pz1^+T$ 細胞と比較して、 $p=0.0947$)。CBR-1ucシグナルはその後、対照の $Pz1^+T$ 細胞を与えたマウスでは減衰した(図6a)。対照的に、 $Pz1^+CD80^+4-1BBL^+T$ リンパ球を与えたマウスでは、胸部領域にわたって記録したこの光子計数が、平均して6.5倍に増大した($p=0.0122$ 、図6a、図6b)。重要なことに、この効果は、PSMA標的化T細胞に対して選択的であった。これは、共注入したCBR-1uc $^+$ の19z1形質導入T細胞が、これは両大腿骨において確立されたRaji腫瘍を浸潤しているが、何れの時点でも胸部の生物発光シグナルを著しく増大させなかったからである(4日目に中央値で1.5倍に増大、 $p=0.0947$ 、図6a、図6b)。まとめると、インビトロ及びインビボでのこれらのデータは、 $CD80^+4-1BBL^+T$ 細胞が、副刺激をトランス作用で提供することによってT細胞の応答を局所的に増強することを示唆している。

【0135】

Tリンパ球において $CD80$ を構成的に提示したことは、 $CD28$ に対する副刺激リガンドとしては機能するが、T細胞増殖の負の調節因子(例えば、高い親和性でのCTL A-4など)にも関与し得る(Hodi et al., Clin Cancer Res. 2007 Sep 15;13:5238-42)。T細胞に発現する $CD80$ が媒介する治療的に望ましくないT細胞自己阻害を回避するために、Tリンパ球を、キメラ抗原受容体P28z(Maher et al., Nature Biotechnology, Vol20, Jan 2002, P70-75)と共に形質導入して、 $4-1BBL$ をT細胞表面に発現させた(図7)。この二重融合受容体(dual fusion receptor)P28zは、TCR及び $CD28$ の両方のシグナル伝達部位を含有する。P28zを介するシグナル伝達は、持続し

10

20

30

40

50

たT細胞増殖をもたらすことはできなかったが、4 - 1 B B Lの共発現は、増殖応答を14日目までに10倍を超えて顕著に高めた。しかしながら、両方の全長リガンドがP z 1を形質導入したTリンパ球の表面に発現されるとき、相乗作用的なC D 8 0 - 4 - 1 B B L副刺激シグナルが依然として最強であった（P 2 8 Z + 4 - 1 B B Lよりもおよそ2倍高い、図7）。従って、キメラ抗原受容体の構築物に融合されたC D 2 8シグナル伝達エレメントによって中継されるC D 2 8シグナルは、P z 1 + 4 - 1 B B L + Tリンパ球に、増強した増殖特性をもたらすことはできるが、それは、P z 1 + 4 - 1 B B L + C D 8 0 + T細胞において観測されるほど顕著なT細胞増殖ではない。

【0136】

癌免疫療法の主要な目標は、腫瘍反応性Tリンパ球に対する安全かつ効果的な副刺激を提供することである。遺伝子手法を使用した場合、T細胞自身が強力な副刺激を提供することが明らかにされた。ヒト初代C M V特異的細胞及びP S M A標的化T細胞における副刺激リガンドの構成的発現は、A P Cにおけるこれらのリガンドの非存在を補っただけでなく、従来のA P Cによって誘発される増殖応答を超える増殖応答もまた誘導した（図1）。副刺激リガンドの分析により、C D 8 0及び4 - 1 B B Lが、本発明者らの実験条件下で、毎週繰り返した抗原刺激による顕著なT細胞増殖を可能にする、最強のT細胞活性化を提供したことが示された。C D 8 0 + 4 - 1 B B L + T細胞は、優れた増殖、サイトカイン分泌、インビトロでの生存、並びに、インビボでの増殖及び持続性を示し、腫瘍保有マウスにおける注入後1週間で、C D 8 0及び4 - 1 B B Lを形質導入していないP S M A特異的T細胞と比較して、40倍～50倍より大きいT細胞バイオマスをもたらした（図3）。C D 8 0 / 4 - 1 B B Lを形質導入していないP S M A特異的T細胞で処置した動物が一樣に疾患により死亡した一方で、C D 8 0 + 4 - 1 B B L + を与えた同じT細胞の注入により、処置したマウスの大部分において、確立されている全身性P C - 3腫瘍を効果的に根絶させた（図2）。非常に興味深い腫瘍モデルにおいて得られた、これらの知見は、T細胞における副刺激リガンドの構成的な高レベルの発現についての生物学的活性及び顕著な効力を強調するものである。

【0137】

この強化された応答の根底にある機構を調べるために、腫瘍結合前及び後におけるT細胞上のC D 8 0及び4 - 1 B B L、並びににそれらの受容体の空間的分布を最初に分析した。C D 2 8及び4 - 1 B B Lが、免疫学的シナプスの中心の超分子活性化クラスターの内部においてT C Rの極近くに蓄積することが知られている。C D 8 0、C D 4 0 L及びC D 7 0を含む、A P Cによって発現される副刺激リガンドがシナプスに分極する。このことは、免疫学的シナプスが、副刺激リガンド - 受容体の相互作用を促進及び伝播するための整列した接触領域を提供するという考えを裏付けている。このモデルと一致して、T細胞にコードされるC D 8 0及び4 - 1 B B Lが、C D 2 8及び4 - 1 B B Lと一緒に、T細胞と、L N C a P腫瘍細胞との間の接触領域に向かって分極した（図4）。この共局在化の機能的結果が、4 - 1 B B Lを有していないT細胞においてではなく、4 - 1 B B L + 4 - 1 B B L + 病巣を含有しているシナプスにおいて、抗原接触後、微小管に沿ってT細胞 - A P C境界に向かって輸送されるG R Bの蓄積によって示される（図4）。従って、免疫学的シナプスは、明らかに、自己副刺激を組織化するために十分に好適である。

【0138】

直近に形質導入したT細胞における4 - 1 B B L及び4 - 1 B B Lのデノボ発現により、隣接T細胞からの何れの可能な寄与も伴うことなくN F - κ Bを活性化させた、単一細胞アッセイにおいて自己副刺激を明らかにした。N F - κ Bの発現を、形質導入直後の単一クローンの物理的分離の後、副刺激リガンドの発現を検出することができた数時間前にリアルタイムで可視化した（図4）。従って、自己副刺激が、Tリンパ球を、腫瘍細胞を含む最適ではないA P Cの不良な副刺激能力を超えるものに行っている可能性がある。さらには、T細胞における4 - 1 B B Lの構成的な細胞表面での発現は、リガンドが一時的に上向き調節させた受容体（例えば、4 - 1 B B Lなど）と引き続き結合する準備状態にあることを保証することによって「要求に応じた」副刺激を保証している。4 - 1 B B Lのその

10

20

30

40

50

受容体との物理的相互作用が、初期のラフト再組織化の間に、又はシナプスの中心での対向する細胞膜の折り重なるの間に生じ得ると推測できる。この影響は、 $CD80^+4-1BBL^+$ T細胞増殖が繰り返しのインビトロ抗原暴露に応答して徐々に弱まっていることから、自己制御されると考えられる（図1）。インビボでのT細胞増殖もまた自己制限された（図3）。これは、抗原刺激のT細胞を枯渇させる腫瘍の排除、及び弱まった副刺激シグナル伝達に起因する可能性がある。

【0139】

理論にとらわれることは望まないが、本発明者らの検討はまた、トランス副刺激を、Tリンパ球における $CD80$ 及び $4-1BBL$ の高レベル発現を介して免疫性を増強するためのメカニズムとして裏付けている。従って、 $CD80$ 又は $4-1BBL$ の非存在下でAPCに提示された抗原と結合するT細胞の増殖機能及びエフェクター機能が、両方のリガンドを提示するT細胞のインビトロ共培養又はインビボ共投与により増幅された。インビトロでの細胞混合及びトランスウエルでの検討では、他の細胞型（例えば、線維芽細胞又はバースタンダー腫瘍細胞など）について報告されているトランス作用と一致して、トランス副刺激が細胞-細胞接触を必要としたことが示された（図5）。トランス副刺激はまた、異なる部位に分離する2つの異なる腫瘍を保有するマウスにおいて例示されるように、器官特異的な様式でインビボで誘導された（図6）。

【0140】

副刺激は、腫瘍微小環境内の隣接T細胞に送達され得るので、T細胞が媒介するトランス副刺激は、興味深い新しい治療的取り組みを開拓するものである。樹状細胞はしばしば腫瘍微小環境内で副刺激リガンドを十分に上向き調節することができないため、この特徴は特に有益である。可溶性因子（例えば、インターロイキン-2など）はT細胞の目的に寄与できるが、細胞-細胞接触におけるその依存性は他の腫瘍浸潤性T細胞に対するトランス副刺激により効果的に制限される。理論にとらわれることは望まないが、トランス作用でのトランス副刺激のインビボでのT細胞の競合の影響は、究極的には、内因性の腫瘍浸潤性リンパ球の多様な集団の集合を経由する抗腫瘍免疫応答を幅広いものにすることができ、従って、腫瘍抗原を回避することの予防に役立つ。

【0141】

まとめると、ヒトTリンパ球における $CD80$ 及び $4-1BBL$ の発現は、腫瘍微小環境における従来のAPCの媒介による副刺激の欠如を回避するための生物学的に有効な手段であることが示された。この方法は、形質導入した抗原受容体、更にはそれらの内因性TCRを介して活性化されるT細胞に対して適用可能である。従って、T細胞が媒介する副刺激は、自己若しくはトランス、又はその両方であろうとも、養子T細胞療法によって治療されている広範囲の悪性腫瘍及び感染性疾患において有用であるだろう。

【0142】

本発明の態様

前記の説明から、本発明を様々な用法及び条件に合わせて適用するために、様々な変法及び改変が、本明細書中に記載の本発明に対して行われてもよいことを理解されたい。そのような態様もまた、本発明の範囲内である。

【0143】

本明細書中の変数の何らかの定義における構成要素の列举の詳述では、その変数の様々な定義が、列举された構成要素のいずれか1つの構成要素として、又は、列举された構成要素の組合せ（又は部分的組合せ）として含まれる。本明細書中に記載の種々の態様は、それらの態様がいずれか1つの態様として、あるいは、いずれかの他の態様又はその一部分との組合せなどを包含している。

【図 1】

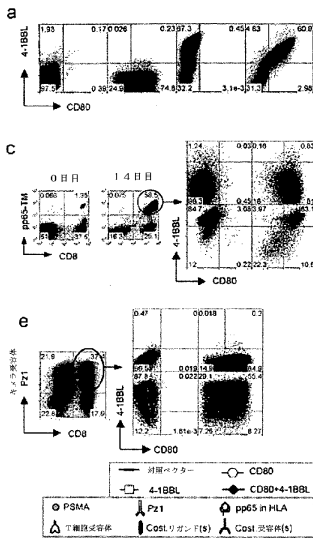
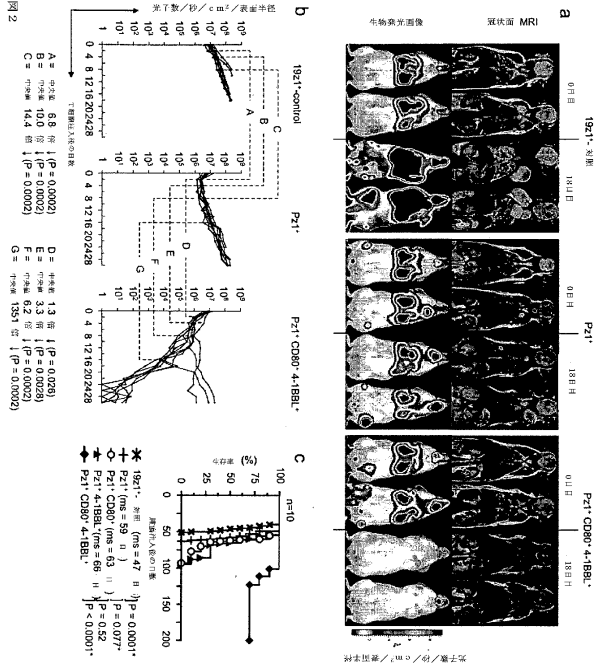


図 1

【図 2】



【図 3】

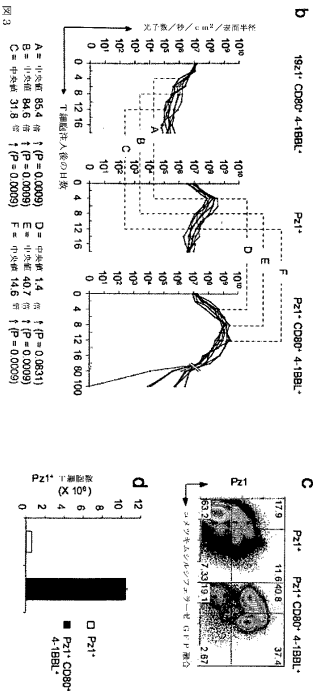


図 3

【図 4】

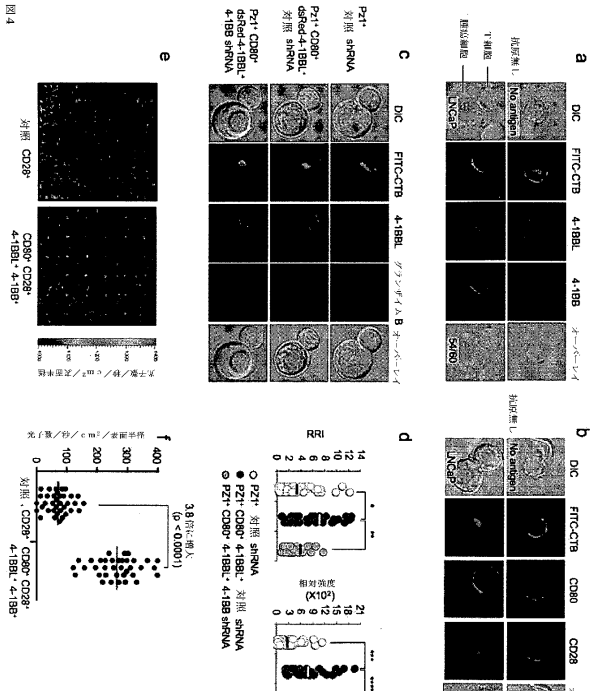


図 4

【 図 6 】

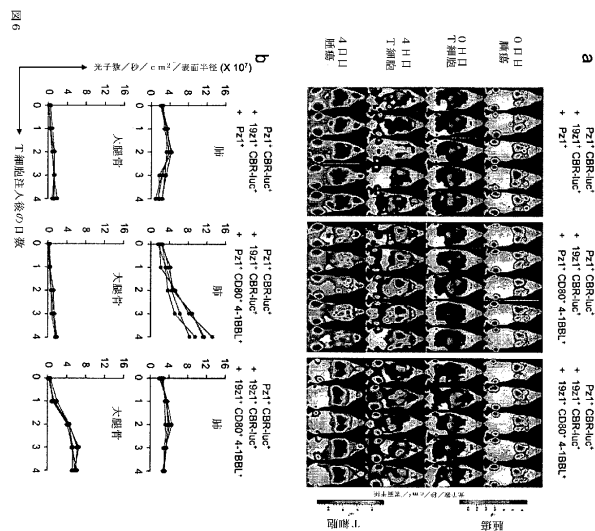


图 5

【圖 7】

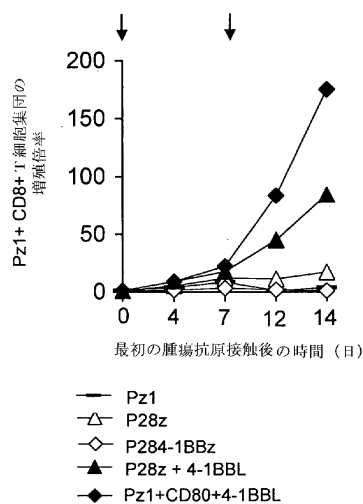


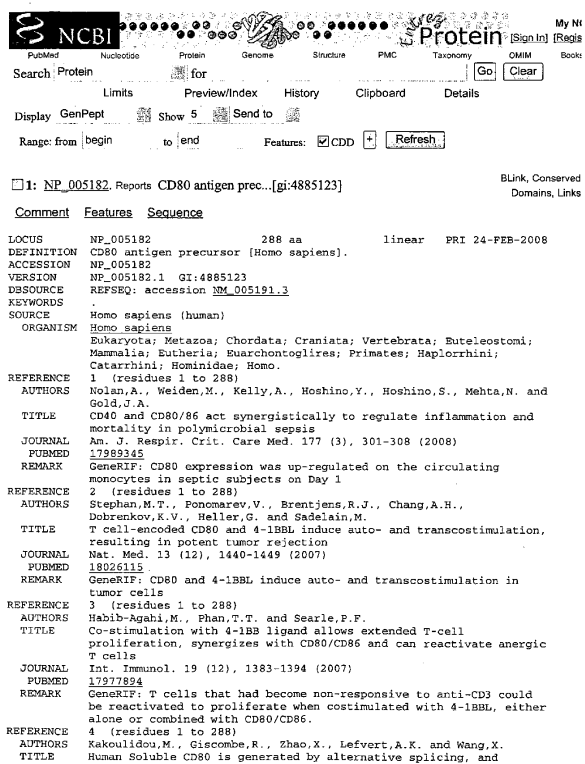
图 7

【 図 8 - 1 (1) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

图 8-1 (1)

Page 1 of 3



【図 8 - 1 (2)】

NCBI Sequence Viewer v2.0

図 8-1 (2)

Page 2 of 3

JOURNAL PUBMED	17953528
REMARK	GeneRIF: sCD80 in human serum adds a new member to the family of soluble receptors, implying a network of soluble costimulatory factors with functional relevance
REFERENCE	5 (residues 1 to 288)
AUTHORS	Dopheide, J.F., Sester, U., Schlitt, A., Horstick, G., Rupprecht, H.J., Munzel, T. and Blankenberg, S.
TITLE	Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in vitro
JOURNAL PUBMED	17925605
REMARK	GeneRIF: CD40, CD80 and CD86 are upregulated in cultured monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease
REFERENCE	6 (residues 1 to 288)
AUTHORS	Weiskirchen, R., Pino, J.D., Macaluso, T., Bister, K. and Beckerle, M.C.
TITLE	The cytoskeleton-rich protein family of highly related LIM domain proteins
JOURNAL PUBMED	7459425
REFERENCE	7 (residues 1 to 288)
AUTHORS	Freeman, G.J., Disteche, C.M., Gribben, J.G., Adler, D.A., Freedman, A.S., Dougery, J. and Nadler, L.M.
TITLE	The gene for B7, a costimulatory signal for T-cell activation, maps to chromosomal region 3q13.3-3q21
JOURNAL PUBMED	1370389
REFERENCE	8 (residues 1 to 288)
AUTHORS	Selvakumar, A., Mohanraj, B.K., Eddy, R.L., Shows, T.B., White, P.C. and Dupont, B.
TITLE	Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7
JOURNAL PUBMED	1377173
REFERENCE	9 (residues 1 to 288)
AUTHORS	Freeman, G.J., Gray, G.S., Gimmi, C.D., Lombard, D.B., Zhou, L.J., White, M., Fingerhuth, J.D., Gribben, J.G. and Nadler, L.M.
TITLE	Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7
JOURNAL PUBMED	1714935
REFERENCE	10 (residues 1 to 288)
AUTHORS	Freeman, G.J., Freedman, A.S., Segall, J.M., Lee, G., Whitman, J.F. and Nadler, L.M.
TITLE	B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells
JOURNAL PUBMED	2794510
COMMENT	VALIDATED REFSEQ: This record has undergone validation or preliminary review. The reference sequence was derived from BP225173.1, BC042665.1 and AC073352.22.
	Summary: The B-lymphocyte activation antigen B7-1 (formerly referred to as B7) provides regulatory signals for T lymphocytes as a consequence of binding to the CD28 (MIM 186760) and CTLA4 (MIM 123890) ligands of T cells. [supplied by OMIM].

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=4885123>

3/31/2008

【図 8 - 1 (3)】

NCBI Sequence Viewer v2.0

図 8-1 (3)

Page 3 of 3

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..288 /organism="Homo sapiens" /db_xref="taxon:9606" /chromosome="3" /map="3q13.3-q21"
Protein	1..288 /product="CD80 antigen precursor" /note="costimulatory molecule variant IgV-CD80; CD80 antigen (CD28 antigen ligand 1, B7-1 antigen); costimulatory factor CD80; B-lymphocyte activation antigen B7"
sig_peptide	1..34 /calculated_mol_wt=3754
mat_peptide	35..288 /product="CD80 antigen" /calculated_mol_wt=29312
Region	37..139 /region_name="IG" /note="Immunoglobulin; smart00409"
Region	37..135 /region_name="V-set" /note="Immunoglobulin V-set domain. This domain is found in antibodies as well as neural protein P0 and CTL4 amongst others; pfam07686"
Region	143..227 /region_name="C2-set_2" /note="CD80-like C2-set immunoglobulin domain. These domains belong to the immunoglobulin superfamily; pfam08205"
CDS	1..288 /db_xref="CCDS:CCDS2989.1" /db_xref="GeneID:541" /db_xref="NM_005191.3:396..1262" /db_xref="NM_005191.3:396..1262" /db_xref="NM_005191.3:396..1262"
ORIGIN	1 nghttrrgts psckopyinff qlilvlagish fcsqvihtvk evkevaticsc ghnvsvveela 61 qriyqgkxk kmvltmsgd mlwpeykmr tiffdtmle ivialtrpd egtyevovik 121 yekdafkreh laetvlskva dftptsladl eiptanirri icsstgqfpe phlewlepe 181 elnaintvts qdpetalyav sskldfmmnt nhsfmclky ghlvrgqfn wnttkqehfp 241 dnllpewait lsvngifvci clctycfapn crerrnerl zresvrvp

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Aug 28 2007 16:53:43

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=4885123>

3/31/2008

【図 8 - 2 (1)】

NCBI Sequence Viewer v2.0

図 8-2 (1)

Page 1 of 3

NCBI	Protein	My NCBI
Published	Nucleotide	Genome
Structure	PMC	Taxonomy
OMIM	Book	
Search Protein	for	Clear
Limits	Previous/Index	History
Clipboard	Details	
Display GenPept	Show 5	Send to
Range: from	begin	to
end	Features:	<input checked="" type="checkbox"/> CDD <input type="checkbox"/> Refresh
P1: P41273. Reports Tumor necrosis fa...[gi:728739]		
Comment	Features	Sequence
LOCUS	P41273	254 aa linear PRI 04-DEC-2007
DEFINITION	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9 (4-1BB ligand) (4-1BBL)	
ACCESSION	P41273	
VERSION	P41273.1 GI:728739	
DBSOURCE	SwissProt: locus TNF9_HUMAN, accession P41273; extra accessions: Q24352	
	created: Feb 1, 1995	
	sequence updated: Feb 1, 1995	
	annotation updated: Dec 4, 2007	
	xrefs: H03398.1, AAA53134.1, BC104805.1, AA104806.1, BC104807.1, AA104808.1, 119427	
	xrefs (non-sequence databases): RefSeq:NP_003802.1, UniGene:Hs.1524, DIP:DIP:3020N, Ensembl:ENSG00000125657, GeneID:8744, KEGG:hsa:8744, E-InvDB:HX0040144, HGNC:11939, MIM:606182, PharmKB:PA36629, ArrayExpress:P41273, CleanEX:HS_TNFSF9, GenomOnline:ENSG00000125657, GO:0005102, GO:0005915, GO:0008283, GO:0007267, GO:0007165, InterPro:PF00229, SMART:SM00207, PROSITE:PS00251, PROSITE:PS50049	
KEYWORDS	Cytokine; Membrane; Polymorphism; Signal-anchor; Transmembrane.	
SOURCE	Homo sapiens (human)	
ORGANISM	Homo sapiens	
	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.	
REFERENCE	1 (residues 1 to 254)	
AUTHORS	Alderson, M.R., Smith, C.A., Tough, T.W., Davis-Smith, T., Armitage, R.J., Falk, B., Roux, E., Baker, E., Sutherland, G.R., Din, W.S. and Goodwin, R.G.	
TITLE	Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand	
JOURNAL PUBMED	Eur. J. Immunol. 24 (9), 2219-2227 (1994)	
REMARK	S086337	
REFERENCE	2 (residues 1 to 254)	
AUTHORS	Gerhard, D.S., Wagner, L., Feingold, E.A., Shenmen, C.M., Grouse, L.H., Schuler, G., Klein, S.L., Old, S., Rasooly, R., Good, P., Guyer, M., Peck, A.M., Derge, J.G., Lipman, D., Collins, F.S., Jang, W., Sherry, S., Feolo, M., Misquitta, L., Lee, E., Rotmistrovsky, K., Greenhut, S.F., Schaefer, C.F., Bustow, K., Bonner, T.J., Hausler, D., Kent, J., Kiekhäus, M., Furey, T., Brent, M., Prange, C., Schreiber, K.,	

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=728739>

3/31/2008

【図 8 - 2 (2)】

NCBI Sequence Viewer v2.0

図 8-2 (2)

Page 2 of 3

	Shapiro, N., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Hsie, F., Driscoll, T., Soares, M.B., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Ustin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Piao, Y., Dudekula, D.B., Ko, M.S., Kawakami, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Gruber, C.E., Smith, M.R., Simmons, B., Moore, T., Waterman, R., Johnson, S.L., Ruan, Y., Wei, C., Mathavan, S., Gunaratne, P.H., Wu, J., Garcia, A.M., Hulyk, S.W., Fuh, E., Yuan, Y., Sneed, A., Kowis, C., Hodgson, A., Muzny, D.M., McPherson, J., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Kettaman, M., Madan, A., Rodriguez, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madari, A., Young, A.C., Wetherby, K.D., Granite, S.J., Kwong, P.N., Brinkley, C.P., Pearson, R.L., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Griffith, M., Griffith, O.L., Krzywinski, M.I., Liao, N., Morin, R., Palmquist, D., Petrescu, A.S., Skalska, U., Smailus, D.E., Stott, J.M., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J., Holt, R.A., Baross, A., Marra, M.A., Clifton, S., Makowski, K.A., Bosak, S. and Malek, J.
CONSTRMT	MGC Project Team
TITLE	The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)
JOURNAL	Genome Res. 14 (10B), 2121-2127 (2004)
PUBMED	15489234
REMARK	NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE MRNA]. TISSUE=Lung Erratum [Genome Res. 2006 Jun;16(6):804. Morrin, Ryan [corrected to Morrin, Ryan]]
COMMENT	On or before Feb 16, 2007 this sequence version replaced gi:121941506, gi:7512264. [FUNCTION] Cytokine that binds to TNFSF9. Induces the proliferation of activated peripheral blood T-cells. May have a role in activation-induced cell death (AICD). May play a role in cognate interactions between T-cells and B-cells/macrophages. [SUBUNIT] Homotrimer (Potential). [SUBCELLULAR LOCATION] Membrane; Single-pass type II membrane protein. [TISSUE SPECIFICITY] Expressed in brain, placenta, lung, skeletal muscle and kidney. [SIMILARITY] Belongs to the tumor necrosis factor family.
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..254 /organism="Homo sapiens" /db_xref="taxon:9606"
gene	1..254 /gene="TNFSF9"
Protein	1..254 /gene="TNFSF9" /product="Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9"
Region	1..254 /gene="TNFSF9" /region_name="Mature chain" /experiment="experimental evidence, no additional details recorded" /note="Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9. /FTD=PMO_0000185501."
Region	1..28 /gene="TNFSF9" /region_name="Topological domain" /inference="non-experimental evidence, no additional details recorded"

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=728739>

3/31/2008

【 8 - 2 (3) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-2 (3)

Page 3 of 3

```
Region /note="Cytoplasmic (Potential)."  
17  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="Variant"  
/experiment="experimental evidence, no additional details  
recorded"  
/note="P -> A (in dbSNP:rs442511). /FTId=VAR_011928."  
29..49  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="Transmembrane region"  
/inference="non-experimental evidence, no additional  
details recorded"  
/note="Signal-anchor for type II membrane protein  
(Potential)."  
35..41  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="Compositionally biased region"  
/experiment="experimental evidence, no additional details  
recorded"  
/note="Poly-Leu."  
50..254  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="Topological domain"  
/inference="non-experimental evidence, no additional  
details recorded"  
/note="Extracellular (Potential)."  
91..238  
/gene="TNFSF9"  
/region_name="TNF"  
/note="Tumor Necrosis Factor; TNF superfamily members  
include the cytokines: TNF (TNF-alpha), LT  
(lymphotoxin-alpha, TNF-beta), CD40 ligand, Apo2L (TRAIL),  
Fas ligand, and osteoprotegerin (OPG) ligand; cd00184"  
/db_xref="CDD:29146"  
order(19,142,144,199,204,234,238)  
/gene="TNFSF9"  
/site_type="other"  
/note="trimer interface"  
/db_xref="CDD:29146"  
order(110,111,116,162,169,176)  
/gene="TNFSF9"  
/site_type="other"  
/note="receptor binding sites"  
/db_xref="CDD:29146"  
  
ORIGIN  
1 meyasdasld peapwppapr ararcvlpva lvagl11111 laaacavfla cpwsvsgara  
61 spgsaasprl regpslddd paglidlrgq mfaqlvaqnv lliidgplaw sdglagvsl  
121 tgglsykedk kelvavakagv yvvfqlqlr rvvagegss vslahlppl raaagaalaa  
181 ltvdlppase earmsfgfg grllhlsaq rlgvnhitea rahawqltq gtvglgfrv  
241 tpeipagipe prse  
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Aug 28 2007 16:53:42

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=728739>

3/31/2008

【 8 - 3 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-3

Page 1 of 2

NCBI Sequence Viewer v2.0

Search Protein for Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenPept Show 5 Send to

Range: from begin to end Features: Refresh

1: BAB18304. Reports OX40 ligand [Homo...[gi:11275538]

Features Sequence

LOCUS BAB18304 67 aa linear PRI 19-OCT-2004

DEFINITION OX40 ligand [Homo sapiens].

ACCESSION BAB18304

VERSION BAB18304.1 GI:11275538

DBSOURCE accession AB042988.2

KEYWORDS

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1

AUTHORS Hikami, K., Tsuchiya, N. and Tokunaga, K.

TITLE New variations in human OX40 ligand (CD134L) gene

JOURNAL Genes Immun. 1 (8), 521-522 (2000)

PUBMED 11275538

REFERENCE 2 (residues 1 to 67)

AUTHORS Hikami, K., Tsuchiya, N. and Tokunaga, K.

TITLE Direct Submission

SUBMITTED (19-MAY-2000) Koki Hikami, University of Tokyo, Department of Human Genetics; 7-3-1 Hongu, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan (E-mail:kokihikami@mail.gco.ne.jp, Tel:81-3-5841-3693, Fax:81-3-5802-8619)

FEATURES

source

1..67

/organism="Homo sapiens"

/db_xref="taxon:9606"

/chromosome="1"

/map="1q25"

1..67

/product="OX40 ligand"

1..67

/gene="OX40L"

/coded_by="join (AB042988.2:55..207,AB042988.2:462..510)."

ORIGIN

1 mervpgleen vgnairprfe rnklllvavv igqglgllcf tyiolhfsal gvshryprig
61 sikvqft
//

Protein

CDS

ORIGIN

1 mervpgleen vgnairprfe rnklllvavv igqglgllcf tyiolhfsal gvshryprig
61 sikvqft
//

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=11275538>

3/31/2008

【 8 - 4 (1) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-4 (1)

Page 1 of 3

NCBI Sequence Viewer v2.0

Search Protein for Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenPept Show 5 Send to

Range: from begin to end Features: CDD Refresh

1: NP_001243. Reports tumor necrosis fa...[gi:4507605]

Comment Features Sequence

LOCUS NP_001243 193 aa linear PRI 11-FEB-2008

DEFINITION tumor necrosis factor ligand superfamily, member 7 [Homo sapiens].

ACCESSION NP_001243

VERSION NP_001243.1 GI:4507605

DBSOURCE REFSEQ: accession NM_001252.3

KEYWORDS

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (residues 1 to 193)

AUTHORS Yang, Z.Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E. and Ansell, S.M.

TITLE CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells

JOURNAL Blood 110 (7), 2537-2544 (2007)

PUBMED 17619291

REMARK GeneRIF: reveal a novel role for non-Hodgkin lymphoma B cells in the development of intratumoral regulatory T cells

REFERENCE 2 (residues 1 to 193)

AUTHORS van Oosterwijk, M.P., Juwana, H., Arcus, R., Tesselaar, K., van Oers, M.H., Eldering, E. and van Lier, R.A.

TITLE CD27-CD70 interactions sensitize naive CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development

JOURNAL Int. Immunol. 19 (6), 713-718 (2007)

PUBMED 1751442

REMARK GeneRIF: CD27-CD70 interactions may promote Th1 cell formation by permitting naive T cells to respond to differentiation signals and by promoting survival of activated effector T cells.

REFERENCE 3 (residues 1 to 193)

AUTHORS Diegemann, J., Junker, K., Loncarevic, I.F., Michel, S., Schimmel, B. and von Eggeling, F.

TITLE Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in lymphocytes

JOURNAL Neoplasia 8 (11), 933-938 (2006)

PUBMED 17132225

REMARK GeneRIF: Apoptosis mediated by exposure to the CD70 secreted by tumor cells may contribute to the failure of renal cell carcinoma patients to develop an effective lymphocyte-mediated antitumor response

REFERENCE 4 (residues 1 to 193)

AUTHORS Adam, P.J., Terrett, J.A., Steers, G., Stockwin, L., Loader, J.A.,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=4507605>

3/31/2008

【 8 - 4 (2) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-4 (2)

Page 2 of 3

NCBI Sequence Viewer v2.0

Search Protein for Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenPept Show 5 Send to

Range: from begin to end Features: CDD Refresh

1: NP_001243. Reports tumor necrosis fa...[gi:4507605]

Comment Features Sequence

LOCUS NP_001243 193 aa linear PRI 11-FEB-2008

DEFINITION tumor necrosis factor ligand superfamily, member 7 [Homo sapiens].

ACCESSION NP_001243

VERSION NP_001243.1 GI:4507605

DBSOURCE REFSEQ: accession NM_001252.3

KEYWORDS

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (residues 1 to 193)

AUTHORS Yang, Z.Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E. and Ansell, S.M.

TITLE CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells

JOURNAL Blood 110 (7), 2537-2544 (2007)

PUBMED 17619291

REMARK GeneRIF: reveal a novel role for non-Hodgkin lymphoma B cells in the development of intratumoral regulatory T cells

REFERENCE 2 (residues 1 to 193)

AUTHORS van Oosterwijk, M.P., Juwana, H., Arcus, R., Tesselaar, K., van Oers, M.H., Eldering, E. and van Lier, R.A.

TITLE CD27-CD70 interactions sensitize naive CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development

JOURNAL Int. Immunol. 19 (6), 713-718 (2007)

PUBMED 1751442

REMARK GeneRIF: CD27-CD70 interactions may promote Th1 cell formation by permitting naive T cells to respond to differentiation signals and by promoting survival of activated effector T cells.

REFERENCE 3 (residues 1 to 193)

AUTHORS Diegemann, J., Junker, K., Loncarevic, I.F., Michel, S., Schimmel, B. and von Eggeling, F.

TITLE Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in lymphocytes

JOURNAL Neoplasia 8 (11), 933-938 (2006)

PUBMED 17132225

REMARK GeneRIF: Apoptosis mediated by exposure to the CD70 secreted by tumor cells may contribute to the failure of renal cell carcinoma patients to develop an effective lymphocyte-mediated antitumor response

REFERENCE 4 (residues 1 to 193)

AUTHORS Adam, P.J., Terrett, J.A., Steers, G., Stockwin, L., Loader, J.A.,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=4507605>

3/31/2008

【 8 - 4 (3) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-4 (3)

Page 3 of 3

cytokine is also reported to play a role in regulating B-cell activation, cytotoxic function of natural killer cells, and immunoglobulin synthesis.

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Entrez Gene record to access additional publications.

FEATURES

source

Location/Qualifiers

1..193

/organism="Homo sapiens"

/db_xref="taxon:9606"

/chromosome="19"

/map="19p13"

Protein

1..193

/product="tumor necrosis factor ligand superfamily, member 7"

/note="CD70 antigen; CD27 ligand; surface antigen CD70; Ki-24 antigen; tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7"

/calculated_mol_wt=20987

58..189

/region_name="TNF"

/note="Tumor Necrosis Factor; TNF superfamily members include the cytokines: TNF (TNF-alpha), LT (lymphotoxin-alpha, TNF-beta), CD40 ligand, Apo2L (TRAIL), Fas ligand, and osteoprotegerin (OPG) ligand; cd00184"

/db_xref="CDD:29146"

order(61,105,107,154,159,185,189)

/site_type="other"

/note="trimer interface"

/db_xref="CDD:29146"

order(76..77,84,119,126,129)

/site_type="other"

/note="receptor binding sites"

/db_xref="CDD:29146"

CDS

1..193

/gene="CD70"

/coded_by="NM_001252.3:151..732"

/db_xref="CCDS:CCDS12170.1"

/db_xref="GeneID:970"

/db_xref="HGNC:11937"

/db_xref="HPRD:18515"

/db_xref="MIM:602840"

ORIGIN

1 mpeegagccv rrrpygcivr aalvvcvlg viclvvcvlg faqagqqlp eslgpvael

61 qlnhtpgqgq pylvagggpa lgrsflhpg idkgqlrihr dglmvhivg tlaicsetta

121 srhpttialv gicpasarl slrlsfhsg ctiaqriltp largdtlctn lgtllpsrn

181 tdtftfgvav vrp

//

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Aug 28 2007 16:53:42

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=4507605>

3/31/2008

【 8 - 5 (3) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-5 (2)

Page 2 of 4

REFERENCE

AUTHORS

TITLE

LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway

JOURNAL

Biochem. Biophys. Res. Commun. 359 (2), 379-384 (2007)

PUBMED

17542278

REMARK

GeneRIF: in addition to activating NF-kappaB/p52, LIGHT also activates Stat3 through the NIK pathway

REFERENCE

AUTHORS

Gill, R.M., Coleman, N.M. and Hunt, J.S.

TITLE

Differential cellular expression of LIGHT and its receptors in early gestation human placentas

JOURNAL

J. Reprod. Immunol. 74 (1-2), 1-6 (2007)

PUBMED

17010447

REMARK

GeneRIF: LIGHT system may regulate early to middle stages of placental development via cell-specific, temporally programmed expression of the ligand and its receptors, and may also assist in preserving placental immune privilege.

REFERENCE

AUTHORS

Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R. and Kwon, B.S.

TITLE

A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis

JOURNAL

J. Biol. Chem. 274 (20), 13733-13736 (1999)

PUBMED

10318773

REFERENCE

AUTHORS

Harpoot, J.A., McDonnell, P.C., Brigham-Burke, M., Lyn, S.D., Minton, J., Tan, K.B., Dede, K., Spampinato, J., Silverman, C., Hensley, P., DiPrinzio, R., Emery, J.G., Deen, K., Eichman, C., Chabot-Fletcher, M., Truneh, A. and Young, P.R.

TITLE

Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth

JOURNAL

J. Biol. Chem. 273 (42), 27548-27556 (1998)

PUBMED

9765287

REFERENCE

AUTHORS

Zhai, Y., Guo, R., Hsu, T.L., Yu, G.L., Ni, J., Kwon, B.S., Jiang, G.W., Lu, J., Tan, J., Ugustus, M., Carter, K., Rojas, L., Zhu, P., Lincoln, C., Endress, G., Xing, L., Wang, S., Oh, K.O., Gentz, R., Ruben, S., Lippman, M.E., Hsieh, S.L. and Yang, D.

TITLE

LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer

JOURNAL

J. Clin. Invest. 102 (6), 1142-1151 (1998)

PUBMED

9739048

REFERENCE

AUTHORS

Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Brush, J., Goddard, A. and Ashkenazi, A.

TITLE

Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3

JOURNAL

Curr. Biol. 8 (9), 525-528 (1998)

PUBMED

9560343

REFERENCE

AUTHORS

Mauri, D.N., Ebner, R., Montgomery, R.L., Kochel, K.D., Cheung, T.C., Yu, G.L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., Spear, P.G. and Ware, C.F.

TITLE

LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator

JOURNAL

Immunity 8 (1), 21-30 (1998)

PUBMED

9462508

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=25952147>

3/31/2008

【 8 - 5 (1) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-5 (1)

Page 1 of 4

NCBI

Published Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books

Search Protein for Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenPept Show 5 Send to

Range: from begin to end Features: ☐ SNP ☒ CDD

☐ 1: NP_742011. Reports tumor necrosis fa...[gi:25952147]

Comment **Features** **Sequence**

LOCUS

NP_742011 204 aa linear PRI 16-MAR-2008

DEFINITION

tumor necrosis factor ligand superfamily, member 14 isoform 2 [Homo sapiens].

ACCESSION

NP_742011

VERSION

NP_742011.1 GI:25952147

DISOURCE

REFSEQ: accession NM_172014.1

KEYWORDS

SOURCE

Homo sapiens (human)

ORGANISM

Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE

AUTHORS

1 (residues 1 to 204)

Pawlak, K., Pawlak, D. and Myśliwiec, M.

TITLE

LIGHT-a new member of the TNF superfamily in the plasma, dialysate and urine of uremic patients; the impact of residual diuresis and presence of viral hepatitis

JOURNAL

Clin. Biochem. 40 (16-17), 1240-1244 (2007)

PUBMED

17526752

REMARK

GeneRIF: The plasma levels of LIGHT seem to be similar in hemodialysis (HD) patients and healthy subjects and were not affected by gender, age, the mean period of HD history, disease etiology, type of medication and type of using dialysis membrane.

REFERENCE

AUTHORS

2 (residues 1 to 204)

Celik, S., Langer, H., Stellos, K., May, A.E., Shankar, V., Kurz, K., Katus, H.A., Gawaz, M.P. and Dengler, T.J.

TITLE

Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium

JOURNAL

Thromb. Haemost. 98 (4), 798-805 (2007)

PUBMED

17938804

REMARK

GeneRIF: platelet-associated LIGHT is involved in adhesion of platelets to endothelium while soluble LIGHT induces a pro-inflammatory state in vascular endothelial cells

REFERENCE

AUTHORS

3 (residues 1 to 204)

Loeffler, M., LeNegrate, G., Krajewska, M. and Reed, J.C.

TITLE

Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth

JOURNAL

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (31), 12879-12883 (2007)

PUBMED

17521123

REMARK

GeneRIF: attenuated Salmonella typhimurium expressing LIGHT inhibited growth of primary tumors, as well as the dissemination of pulmonary metastases, in various mouse tumor models employing

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=25952147>

3/31/2008

【 8 - 5 (3) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-5 (3)

Page 3 of 4

COMMENT

REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AY028261.1](#) and [AF064090.1](#).

Summary: The protein encoded by this gene is a member of the tumor necrosis factor (TNF) ligand family. This protein is a ligand for TNFRSF14, which is a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, and which is also known as a herpesvirus entry mediator (HVEM). This protein may function as a costimulatory factor for the activation of lymphoid cells and as a deterrent to infection by herpesvirus. This protein has been shown to stimulate the proliferation of T cells, and trigger apoptosis of various tumor cells. This protein is also reported to prevent tumor necrosis factor alpha mediated apoptosis in primary hepatocyte. Two alternatively spliced transcript variant encoding distinct isoforms have been reported.

Transcript Variant: This variant (2) lacks an in-frame coding segment compared to variant 1, resulting an isoform (2) that lacks an internal region, as compared to isoform 1.

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Entrez Gene record to access additional publications.

FEATURES

source

Location/Qualifiers

1..204

/organism="Homo sapiens"

/db_xref="taxon:9606"

/chromosome="19"

/map="19p13.3"

Protein

1..204

/product="tumor necrosis factor ligand superfamily, member 14 isoform 2"

/note="delta transmembrane LIGHT; tumor necrosis factor superfamily member LIGHT; herpesvirus entry mediator A; tumor necrosis factor receptor-like 2; ligand for herpesvirus entry mediator"

/calculated_mol_wt=22265

58..202

/region_name="TNF"

/note="Tumor Necrosis Factor; TNF superfamily members include the cytokines: TNF (TNF-alpha), LT (lymphotoxin-alpha, TNF-beta), CD40 ligand, Apo2L (TRAIL), Fas ligand, and osteoprotegerin (OPG) ligand; cd00184"

/db_xref="CDD:29146"

order(61,106,108,166,171,198,202)

/site_type="other"

/note="trimer interface"

/db_xref="CDD:29146"

order(79..80,85,127,134,139)

/site_type="other"

/note="receptor binding sites"

/db_xref="CDD:29146"

CDS

1..204

/gene="TNFSF14"

/coded_by="NM_172014.1:383..997"

/note="isoform 2 is encoded by transcript variant 2"

/db_xref="GeneID:8740"

/db_xref="HGNC:11930"

/db_xref="MIM:604520"

ORIGIN

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=25952147>

3/31/2008

【 8 - 5 (4) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-5 (4)

Page 4 of 4

```
1 meesvrvpav fvdgdqtdip ftrigrshrr qscsvardgp agaweqllge rrshevnpea
61 hlgamsals: gsggpllvct qglafslrl syhdgalvvt kagyyiyak vslgvvgcpl
121 glastithgi yktrpypce lcllysqsp cgratssarv wdsdflgvy vhlageeevv
181 vrldelivr lrdgtzryfg afmv
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Aug 28 2007 16:53:42

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=25952147>

3/31/2008

【 8 - 6 (2) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-6 (2)

Page 2 of 2

```
1 mdpglqgaln gmappgdam hvpgswash lgttsryfy lttalalcl vftvarimvl
61 vvgtrdsipn spdnvplkkg ncsedllcil krapfkksa ylvakhlkx tkiswnkdg
121 lhgvrtydgn lvigfpglyf iicqlqflvq cpnnsvdllkx ellinkhikk qxlvtvcesg
181 mqtghvyqnl sqfllidydv nttisavndvt xxyidustfp lenvlisiflx snsd
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Aug 28 2007 16:53:42

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=2815515>

3/31/2008

【 8 - 6 (1) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-6 (1)

Page 1 of 2

NCBI Protein

Search Protein for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenPept Show 5 Send to

Range: from begin to end Features: ☒ CDD Refresh

1: AAB97877. Reports CD30L protein [Homo.][gi:2815515]

Sequence

LOCUS AAB97877 234 aa linear PRI 28-JAN-1998

DEFINITION CD30L protein [Homo sapiens].

ACCESSION AAB97877

VERSION AAB97877.1 GI:2815515

DBSOURCE locus HSCD30L1 accession AF006381.1
locus HSCD30L2 accession AF006382.1
locus HSCD30L3 accession AF006383.1
locus HSCD30L4 accession AF006384.1

KEYWORDS

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.
1 (residues 1 to 234)
Croager, E.J. and Abraham, L.J.
TITLE Characterisation of the human CD30 ligand gene structure
JOURNAL Biochim. Biophys. Acta 1353 (3), 231-235 (1997)
PMID 9349718
REFERENCE 2 (residues 1 to 234)
Croager, E.J. and Abraham, L.J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (02-JUN-1997) Biochemistry, University of Western
Australia, Entrance 2, Hackett Drive, Nedlands, Western Australia
6907, Australia
COMMENT Method: conceptual translation.
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..234
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="9"
/map="9q33"
1..234
/product="CD30L protein"
Region 104..220
/region_name="TNF"
/note="Tumor Necrosis Factor; TNF superfamily members
include the cytokines: TNF (TNF-alpha), LT
(lymphotxin-alpha, TNF-beta), CD40 ligand, Apo2L (TRAIL),
Fas ligand, and osteoprotegerin (OPG) ligand; cd00184"
/db_xref="CDD:29146"
Site order(107,140,142,190,195)

BLink, Conserved
Domains, Links<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=2815515>

3/31/2008

【 8 - 7 (1) 】

NCBI Sequence Viewer v2.0

8-7 (1)

Page 1 of 7

NCBI Protein

Search Protein for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenPept Show 5 Send to

Range: from begin to end Features: ☒ CDD Refresh

1: P42081. Reports T-lymphocyte acti...[gi:1168851]

Comment Features Sequence

LOCUS P42081 329 aa linear PRI 15-JAN-2008

DEFINITION T-lymphocyte activation antigen CD86 precursor (Activation B7-2
antigen) (CTLA-4 counter-receptor B7.2) (B70) (FUN-1) (B063).

ACCESSION P42081

VERSION P42081.1 GI:1168851

DBSOURCE swissprot: locus CD86_HUMAN, accession P42081;
class: standard.
extra accessions: A0N0P0, Q13655, Q6FHB1, Q6GTS4, Q7M4L5
created: Nov 1, 1995.
sequence updated: Nov 1, 1995.
annotation updated: Jan 15, 2008.
xrefs: UD4343.1, AAB03814.1, L25259.1, AAA58389.1, CR541844.1,
CAC46642.1, EF064748.1, ABA841931.1, BC040261.1, ABA40261.1,
U17722.1, ABA86473.1, U17717.1, U17718.1, U17719.1, U17721.1,
A48754, JC7605, 1185, 1NCN
xref (non-sequence databases): UniGene: Hs.171182, PDBsum: 1185,
PDBsum: 1NCN, Intact: P42081, Ensembl: ENSG00000114013, KEGG: hsa:942,
H-invDB: HIX0024331, HGNC: 1705, HPA: CAB004319, MIM: 601020,
PharmGKB: PA25243, LinkHub: P42081, ArrayExpress: P42081,
CleanEx: HS_CD86, GeneOnline: ENSG00000114013, GO: 0016021,
GO: 0005886, GO: 0015026, GO: 0005515, GO: 0016563, GO: 0007267,
GO: 0008284, GO: 0045066, GO: 0045404, GO: 0043017, GO: 0045630,
GO: 0045941, InterPro: IPR015651, InterPro: IPR007110,
InterPro: IPR013783, InterPro: IPR003006, InterPro: IPR013106,
InterPro: IPR003596, Gene3D: G3DSA:2.60.40.10,
PANTHER: PTHR11712:SF45, Pfam: PF01566, SMART: SM00406,
PROSITE: PS00835, PROSITE: PS00290

KEYWORDS 3D-structure; Alternative splicing; Glycoprotein; Host-virus
interaction; Immunoglobulin domain; Membrane; Polymorphism;
Receptor; Signal; Transmembrane; Ubl conjugation.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.
1 (residues 1 to 329)
Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L.
and Somoza, C.
TITLE B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28
JOURNAL Nature 366 (6450), 76-79 (1993)
PMID 7594153
REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE (MRNA) (ISOFORM 2).

BLink, Conserved
Domains, Links<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=1168851>

3/31/2008

【図 8 - 7 (2)】

NCBI Sequence Viewer v2.0

図 8-7 (2)

Page 2 of 7

REFERENCE 2 (residues 1 to 329)
AUTHORS Freeman,J.G., Gribben,J.G., Boussiotis,V.A., Ng,J.W., Restivo,V.A. Jr., Lombard,L.A., Gray,G.S. and Nadler,L.M.
TITLE Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation
JOURNAL Science 262 (5135), 909-911 (1993)
PUBMED 7694153
REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA] (ISOFORM 1).
REFERENCE 3 (residues 1 to 329)
AUTHORS Magistrelli,G., Caron,G., Gauchat,J.F., Jeannin,P., Bonnefoy,J.Y. and Delneste,Y.
TITLE Identification of an alternatively spliced variant of human CD86 mRNA
JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (5), 1211-1215 (2001)
PUBMED 11162656
REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA] (ISOFORM 3).
REFERENCE 4 (residues 1 to 329)
AUTHORS Halleck,A., Ebert,L., Moundinya,M., Schick,M., Eisenstein,S., Neubert,P., Kstrang,K., Schattner,B., Shen,B., Henze,S., Mar,W., Korn,B., Zuo,D., Hu,Y. and LaBaer,J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (??-JUN-2004)
REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE MRNA] (ISOFORM 2).
REFERENCE 5 (residues 1 to 329)
AUTHORS Livingston,R.J., Shaffer,T., McFarland,I., Nguyen,C.P., Stannway,I.B., Rajkumar,N., Johnson,E.J., da Ponte,S.H., Willa,H., Ahearn,M.O., Bertucci,C., Acklestad,J., Carroll,A., Swanson,J., Gildersleeve,H.I. and Nickerson,D.A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (??-OCT-2005)
REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [GENOMIC DNA].
REFERENCE 6 (residues 1 to 329)
AUTHORS Gerhard,D.S., Wagner,D., Feingold,E.A., Shenmen,C.M., Grouse,L.H., Schuler,G., Klein,S.L., Old,S., Rasooly,R., Good,P., Guyer,M., Peck,A.M., Derge,J.G., Lipman,D., Collins,F.S., Jang,W., Sherry,S., Feolo,M., Misquitta,L., Lee,E., Rotmistrovsky,K., Greenhut,S.P., Schaefer,C.F., Buetow,K., Bonner,T.I., Haussler,D., Kent,J., Kiekhäus,M., Furey,T., Brent,M., Prange,C., Schreiber,K., Shapiro,N., Bhat,N.K., Hopkins,R.F., Hsie,F., Driscoll,T., Soares,M.B., Casavant,T.L., Scheetz,T.E., Brownstein,M.J., Usdin,T.B., Toshiyuki,S., Carninci,P., Piao,Y., Dudekula,D.B., Ko,M.S., Kawakami,K., Suzuki,Y., Sugano,S., Gruber,C.E., Smith,M.R., Simmons,B., Moore,T., Waterman,R., Johnson,S.L., Ruan,Y., Wei,C.L., Mathavan,S., Gunaratne,P.H., Wu,J., Garcia,A.M., Hulyk,S.W., Puh,E., Yuan,Y., Sned,A., Kowis,C., Hodgson,A., Muzny,D.M., McPherson,J., Gibbs,R.A., Fahey,J., Helton,E., Kettelman,M., Madan,A., Rodrigues,S., Sanchez,A., Whiting,M., Madari,A., Young,A.C., Wetherby,K.D., Granite,S.J., Kwong,P.N., Brinkley,C.P., Pearson,R.L., Bouffard,G.G., Blakeely,R.W., Green,E.D., Dickson,M.C., Rodriguez,A.C., Grimmond,J., Schmutz,J., Myers,R.M., Butterfield,Y.S., Griffith,M., Griffith,O.L., Krzywinski,M.I., Liao,N., Morin,R., Palmquist,D., Petrescu,A.S., Skalska,U., Smalls,D.E., Stott,J.M., Schmerch,A., Schein,J.E., Jones,G.J., Holt,R.A., Baross,A., Marra,M.A., Clifton,S., Makowski,K.A., Bosak,S. and Malek,J.
CONSTRM MGC Project Team
TITLE The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)
JOURNAL Genome Res. 14 (10B), 2121-2127 (2004)
PUBMED 15489334

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=1168851>

3/31/2008

【図 8 - 7 (3)】

NCBI Sequence Viewer v2.0

図 8-7 (3)

Page 3 of 7

REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE MRNA] (ISOFORM 1), AND VARIANT THR-310
TISSUE=Brain
Erratum:[Genome Res. 2006 Jun;16(6):804. Morrin, Ryan [corrected to Morin, Ryan]]
REFERENCE 7 (residues 1 to 329)
AUTHORS Jellis,C.L., Wang,S.S., Rennert,P., Borriello,F., Sharpe,A.H., Green,N.R. and Gray,G.S.
TITLE Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86)
JOURNAL Immunogenetics 42 (2), 85-89 (1995)
PUBMED 7541777
REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [GENOMIC DNA] OF 7-329.
TISSUE=Foieskin
REFERENCE 8 (residues 1 to 329)
AUTHORS Lanier,L.L., O'Fallon,S., Somoza,C., Phillips,J.H., Linsley,P.S., Okumura,K., Ito,D. and Azuma,M.
TITLE CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL
JOURNAL J. Immunol. 154 (1), 97-105 (1995)
PUBMED 7527824
REMARK CHARACTERIZATION.
REFERENCE 9 (residues 1 to 329)
AUTHORS Engel,P., Gribben,J.G., Freeman,G.J., Zhou,L.J., Nozawa,Y., Abe,M., Nadler,L.M., Wakana,H. and Tedder,T.F.
TITLE The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen
JOURNAL Blood 84 (5), 1402-1407 (1994)
PUBMED 7520767
REMARK IDENTIFICATION AS CD86.
REFERENCE 10 (residues 1 to 329)
AUTHORS Goto,E., Ishido,S., Sato,Y., Ohgimoto,S., Ohgimoto,K., Nagano-Fujii,M. and Hotta,H.
TITLE c-MYC, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins M1R1 and M1R2 and has similar activity
JOURNAL J. Biol. Chem. 278 (17), 14657-14668 (2003)
PUBMED 12582153
REMARK UBIQUITINATION, AND INTERACTION WITH MARCH8.
COMMENT On or before Feb 27, 2007 this sequence version replaced gi:74721835, gi:74757610, gi:627415, gi:25392201. (FUNCTION) Receptor involved in the costimulatory signal essential for T-lymphocyte proliferation and interleukin-2 production, by binding CD28 or CTLA-4. May play a critical role in the early events of T-cell activation and costimulation of naive T-cells, such as deciding between immunity and anergy that is made by T-cells within 24 hours after activation. Isoform 2 interferes with the formation of CD86 clusters, and thus acts as a negative regulator of T-cell activation. (SUBUNIT) Interacts with MARCH8. Interacts with human herpesvirus 8 M1R2 protein (Probable). (SUBCELLULAR LOCATION) Membrane; Single-pass type I membrane protein. (ALTERNATIVE PRODUCTS) Event=Alternative splicing; Named isoforms=3; Name=1; IsoId=P42081-1; Sequence=Displayed; Name=2; IsoId=P42081-3; Sequence=VSP_023124; Name=3; Synonym=CD86 deltaE0; IsoId=P42081-2; Sequence=VSP_009125. (TISSUE SPECIFICITY) Expressed by activated B-lymphocytes and monocytes. (PTM) Polyubiquitinated; which is promoted by MARCH8 and results in endocytosis and lysosomal degradation.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=1168851>

3/31/2008

【図 8 - 7 (4)】

NCBI Sequence Viewer v2.0

図 8-7 (4)

Page 4 of 7

[SIMILARITY] Contains 1 Ig-like C2-type (immunoglobulin-like) domain.
[SIMILARITY] Contains 1 Ig-like V-type (immunoglobulin-like) domain.
[WEB RESOURCE] Name=Wikipedia; Note=CD86 entry; URL='http://en.wikipedia.org/wiki/CD86'.
FEATURES
source Location/Qualifiers
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
1..329
gene /gene="CD86"
/note="synonym: CD28LG0"
1..329
Protein /gene="CD86"
/product="T-lymphocyte activation antigen CD86 precursor"
1..329
Region /gene="CD86"
/region_name="Signal"
/inference="non-experimental evidence, no additional details recorded"
/notes="Potential."
1..6
Region /gene="CD86"
/region_name="Splicing variant"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
/note="Missing (in isoform 2). /FTId=VSP_023124."
22..234
Region /gene="CD86"
/region_name="Splicing variant"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
/note="Missing (in isoform 3). /FTId=VSP_009125."
24..329
Region /gene="CD86"
/region_name="Mature chain"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
/note="T-lymphocyte activation antigen CD86. /FTId=PRO_000014550."
24..247
Region /gene="CD86"
/region_name="Topological domain"
/inference="non-experimental evidence, no additional details recorded"
/note="Extracellular (Potential)."
27..31
Region /gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
27
Region /gene="CD86"
/region_name="Conflict"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
/note="K -> E (in Ref. 7; AAA68473)."
33..131
Region /gene="CD86"

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=1168851>

3/31/2008

【図 8 - 7 (5)】

NCBI Sequence Viewer v2.0

図 8-7 (5)

Page 5 of 7

/region_name="Domain"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
/note="Ig-like V-type."
33
/gene="CD86"
/site_type="glycosylation"
/inference="non-experimental evidence, no additional details recorded"
/note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
35..110
/gene="CD86"
/region_name="TGV"
/note="Immunoglobulin V-Type; smart00406"
/db_xref="CDD:47715"
36..38
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
bond(40,110)
/gene="CD86"
/bond_type="disulfide"
/inference="non-experimental evidence, no additional details recorded"
/note="Potential."
47
/gene="CD86"
/site_type="glycosylation"
/inference="non-experimental evidence, no additional details recorded"
/note="N-linked (GlcNAc...) (Potential)."
54..58
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
64..69
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
80..84
/gene="CD86"
/region_name="Hydrogen bonded turn"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
85..88
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
90..92
/gene="CD86"
/region_name="Hydrogen bonded turn"
/experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
95..97
/gene="CD86"
/region_name="Beta-strand region"

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=1168851>

3/31/2008

【图 8 - 7 (7)】

Page 7 of 7

```

Site      213
          /gene="CD86"
          /site_type="glycosylation"
          /inference="non-experimental evidence, no additional
          details recorded"
          /note="M-linked (GlcNAc...) (Potential).*"
Region    248..268
          /gene="CD86"
          /region_name="Transmembrane region"
          /inference="non-experimental evidence, no additional
          details recorded"
          /note="Potential.*"
Region    269..329
          /gene="CD86"
          /region_name="Topological domain"
          /inference="non-experimental evidence, no additional
          details recorded"
          /note="Cytoplasmic (Potential).*"
Region    310
          /gene="CD86"
          /region_name="Variant"
          /experiment="experimental evidence, no additional details
          recorded"
          /note="A -> T (in dbSNP:rs1219055) . /FTID=VAR_014650.*"
Region    323
          /gene="CD86"
          /region_name="Variant"
          /experiment="experimental evidence, no additional details
          recorded"
          /note="D -> N (in dbSNP:rs9286248) . /FTID=VAR_021917.*"
ORIGIN
1   mdpqctmgle nltvtfmll sgaaplkiga fynedapide qfanesqsl selvfwgqd
61   enlvlnveyl gkekdavhs kymgtfzds dwtlrllh gikdkgelyc iihkkptgm
121  irihemmel svanfenge ipvenitn vylntcas hygeppkms vllrtknti
181  ayvls rmeqsk dvalylys idvafspdv tsmmficll edcktlilas pneltdsqp
241  pppdhpiqv avlptbviy mvfvlilwv kkkkrmpns kqgntmre efsqekrek
301  ilhpersed qrvfkasks scdksdctf

```

Aug 28 2007 16:53:42

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/10	(2006.01)	A 6 1 P 31/10
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00
A 6 1 P 33/02	(2006.01)	A 6 1 P 33/02
A 6 1 P 31/20	(2006.01)	A 6 1 P 31/20
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 31/16	(2006.01)	A 6 1 P 31/16

(72)発明者 マイケル サデレイン
 アメリカ合衆国 1 0 0 2 8 ニューヨーク州, ニューヨーク, イースト 8 9 ストリート
 4 0 1

(72)発明者 マティーアス シュテファン
 アメリカ合衆国 0 2 2 1 5 マサチューセッツ州, ボストン, クイーンズベリー ストリート
 1 1 1, アpartment 1 4

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 Cell Immunol, 2 0 0 3 年, Vol.222, p.45-57
 Proc Natl Acad Sci USA, 2 0 0 4 年, Vol.101, No.5, p.1291-1296
 Mol Ther, 2 0 0 6 年, Vol.13, Supplement 1, p.S103, Abstract No.269
 Blood, 2 0 0 5 年, Vol.106, No.11, p.372a, Abstract No.1278
 Cancer Res, 2 0 0 5 年, Vol.65, No.19, p.9080-9088
 Nat Med, 2 0 0 7 年 1 1 月 1 8 日, Vol.13, No.12, p.1440-1449

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 9
 C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)
 P u b M e d