

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7213799号
(P7213799)

(45)発行日 令和5年1月27日(2023.1.27)

(24)登録日 令和5年1月19日(2023.1.19)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	Z N A
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 K	35/15 (2015.01)	A 6 1 K	35/15	Z
A 6 1 P	5/02 (2006.01)	A 6 1 P	5/02	

請求項の数 21 (全47頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-519313(P2019-519313)
(86)(22)出願日	平成29年10月10日(2017.10.10)
(65)公表番号	特表2020-503841(P2020-503841)
	A)
(43)公表日	令和2年2月6日(2020.2.6)
(86)国際出願番号	PCT/IL2017/051133
(87)国際公開番号	WO2018/069927
(87)国際公開日	平成30年4月19日(2018.4.19)
審査請求日	令和2年9月23日(2020.9.23)
(31)優先権主張番号	62/406,005
(32)優先日	平成28年10月10日(2016.10.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73)特許権者	514007379 ザ ナショナル インスティチュート フ オー バイオテクノロジー イン ザ ネゲ ヴ, リミテッド イスラエル国, 8410501 ベエル - シエヴァ, キャンパス マルクス, ビ ルディング 39, ピー. オー. ピー. 653, ベン - グリオン ユニバーシティ オブ ザ ネゲヴ
(74)代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(74)代理人	100121511 弁理士 小田 直
(74)代理人	100202751 弁理士 岩堀 明代

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 非細胞傷害性改变細胞およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、前記細胞外ドメインが標的受容体結合ドメインであり、前記細胞内ドメインが膜貫通タンパク質の細胞内ドメインに由来し、かつ改変細胞において細胞傷害性の活性化シグナルを伝達することができないキメラ膜貫通ポリペプチドを含む、改変細胞と、薬学的に許容される担体、賦形剤または補助剤とを含む、医薬組成物。

【請求項2】

前記細胞内ドメインが、免疫細胞に発現しない膜貫通タンパク質に由来する細胞内ドメインであるか、または免疫受容体チロシン依存性活性化モチーフ(ITA M)ドメインを含む膜貫通タンパク質に由来する細胞内ドメインを含み、前記ITA Mドメインが、細胞傷害性の活性化シグナルを伝達することができないように変異している、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記細胞内ドメインが、細胞傷害性の活性化シグナルを伝達することができないように変異したCD3ゼータ鎖である、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記変異CD3ゼータ鎖が、ITA Mドメイン内の少なくとも1つのチロシンの変異を含む、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記改変細胞がリガンドとしての役割を果たし、それにより標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達を調節する、標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達の調節に使用するための、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記改変細胞が、前記標的細胞を死滅させない、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記調節することが、誘導すること、または阻害することを含み、かつ

a . 前記シグナル伝達を誘導することが、前記標的受容体のシグナル伝達ドメイン内の残基のリン酸化を含む；

b . 前記シグナル伝達を誘導することが、前記標的受容体の下流標的のレベルの上方制御を含む；

c . 前記シグナル伝達を阻害することが、前記標的受容体の下流標的のレベルの下方制御を含む

のうちの少なくとも 1 つである、請求項 5 または 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記標的受容体が疾患または障害に関連するものである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記標的受容体が、G H R、G L P 1 R、T r k B および P D - 1 から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 10】

前記標的受容体に関連する疾患または障害の治療に罹患している対象の治療に使用される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記改変細胞が、前記標的受容体を含む細胞を死滅させない、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記細胞が、前記疾患または障害の部位にホーミングすることができる、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

30

前記細胞が、

a . 前記対象に対して自家性である；

b . 前記対象に対して異種性である；

c . 免疫細胞であり、任意で、前記免疫細胞が、T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、B 細胞、骨髓性細胞、マクロファージ、単球、好中球、抗原提示細胞および樹状細胞から選択される；

d . ヒトドナー由来の初代ヒト細胞に由来するものであり、前記改変初代ヒト細胞が、ヒトの治療に使用するのに適している；

e . 体内的標的部位または細胞にホーミングすることができる；そして

f . 前記対象から抽出された初代細胞である

40

のうちの少なくとも 1 つである、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記対象の細胞上の前記標的受容体の活性化によって前記疾患もしくは障害を治療し、前記細胞外受容体結合ドメインが前記標的受容体のアゴニストを含む、または前記対象の細胞上の前記受容体の阻害によって前記疾患もしくは障害を治療し、前記細胞外受容体結合ドメインが前記標的受容体のアンタゴニストを含む、請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記標的受容体が、

a . G H R、G L P 1 R、T r k B および P D - 1 から選択される；

50

b . T r k B であり、かつ前記疾患または障害が神経疾患または神経障害であり、任意で、前記神経疾患または神経障害が、アルツハイマー病、うつ病、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症 (A L S) 、癲癇および脳腫瘍から選択される；

c . G L P 1 R であり、かつ前記疾患または障害が、代謝疾患もしくは代謝障害または心血管疾患もしくは心血管障害であり、任意で、前記代謝疾患または代謝障害が、糖尿病、肥満、糖原病、パーキンソン病およびミトコンドリア性ミオパチーから選択されるか、前記心血管疾患または心血管障害が、脳卒中、心筋梗塞、心虚血および冠動脈疾患から選択される；

d . G H R であり、かつ前記疾患または障害が成長疾患または成長障害であり、任意で、前記成長疾患または成長障害が、先端巨大症、成長ホルモン分泌不全症、癌、ターナー症候群およびプラダー・ウィリー症候群から選択される；そして

e . P D - 1 であり、かつ前記疾患または障害が、免疫疾患もしくは免疫障害または癌であり、任意で、前記免疫疾患または免疫障害が、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、グレーブス病、免疫介在性炎症およびセリック病から選択されるか、前記疾患または障害が癌であり、前記標的受容体結合ドメインが P D - 1 アンタゴニストを含むのうちの少なくとも 1 つである、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記改変細胞が、細胞傷害性ではない、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記細胞傷害性の活性化シグナルが、前記改変細胞において免疫細胞のエフェクター機能の活性化を誘導するシグナルである、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記改変細胞が、標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達を調節することができ、前記細胞内ドメインが、前記標的細胞に対して細胞傷害性であるシグナルを伝達することができない、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記シグナルが、

a . 前記細胞内ドメインのシグナル伝達ドメイン内の残基のリン酸化を含み；

b . 前記改変細胞からの少なくとも 1 つのサイトカインの分泌を誘導し、任意で、前記サイトカインがインターロイキン 2 (I L - 2) であり；そして

c . Z A P - 7 0 キナーゼの活性化を誘導する、

請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記組成物が少なくとも 1 0 0 万個の改変細胞を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記キメラ膜貫通ポリペプチドが、

a . 異なるタンパク質に由来する細胞外ドメインおよび細胞内ドメイン；

b . 前記標的受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを含む細胞外ドメイン；

c . 免疫グロブリン可変重鎖ドメイン (V H) および免疫グロブリン可変軽鎖ドメイン (V L) を含む標的受容体結合ドメイン；

d . 1 回膜貫通ドメインである膜貫通ドメイン；

e . C D 3 膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン；

f . 細胞外膜近位ドメインヒンジ領域であり、任意で、前記ヒンジ領域が C D - 8 ヒンジ領域を含む；

g . C D 3、 C D 2 8 、 O X - 4 0 、 C D 8 0 、 C D 8 6 および T 細胞受容体 (T C R) 以外の任意の膜貫通タンパク質の細胞内ドメインを含む細胞内ドメイン；

h . 活性化シグナルを伝達することができないよう変異した C D 3 ゼータ鎖を含む細胞内

10

20

30

40

50

ドメインであり、任意で、前記 C D 3 ゼータ鎖の少なくとも 1 つのチロシンが変異しているか、前記 C D 3 ゼータ鎖のすべてのチロシンが変異しており、任意で、前記少なくとも 1 つのチロシンまたはすべてのチロシンがフェニルアラニンに変異している；

i . 前記改変細胞が前記標的細胞に対して有害となるいかなるシグナルも伝達することができない細胞内ドメイン；

j . 不活性である細胞内ドメイン；そして

k . タグであり、任意で、前記タグが G F P タグおよび M y c タグから選択されるのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本願は、2016年10月10日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 4 0 6 , 0 0 5 号の優先権を主張するものであり、上記出願の内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は細胞療法の分野に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

様々な受容体と特異的に結合しアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することが明らかにされている抗体、抗体フラグメントおよびリガンドが多数存在する。このようなアゴニスト / アンタゴニスト物質はこれまで、様々な疾患の治療に使用されてきた。一方、このような分子を使用する際に大きな制約となるのが、分子を特定の器官、組織および / または特定の細胞型に標的化することの複雑さである。大きな分子に血液脳関門を通過させて実質領域の深部まで輸送するのは困難である。さらに、これらの分子は半減期が短いか、免疫原性が高いか、または意図する標的領域に全く到達しないことが多い。

【0 0 0 4】

これらの有望な治療用分子の細胞内送達は、上記の問題点の多くを回避し得る手段の 1 つとなる可能性がある。しかし、このような解決法は、細胞が所望の治療領域または疾患領域にホーミングすることができるかどうかにかかっている。さらに、免疫応答を誘導しない自家治療または同種治療を実施するためには、対象の体外で初代細胞を培養し拡大することが可能でなければならない。上記の治療用分子を送達するには、現在用いられている送達方法では、最良の場合でも免疫細胞を活性化し、それにより局所炎症を引き起こし、最悪の場合、治療する細胞を直接死滅させることもあり得ることから、免疫細胞が未開拓の 1 つの手段となっている。体内の場所を問わず疾患細胞に、その細胞に害を及ぼすとともに疾患領域の炎症を増大させることもなく治療用のアゴニストおよびアンタゴニストを送達する方法が大いに望まれている。

【発明の概要】

【0 0 0 5】

本発明は、標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達を調節する方法および標的受容体に関連する疾患または障害に罹患している対象を治療する方法を提供する。

【0 0 0 6】

第一の態様では、標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達を調節する方法であって、標的細胞を、少なくとも 1 つの細胞外標的受容体結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、細胞内ドメインがシグナルを伝達しないキメラ膜貫通ポリペプチドを含む、改変細胞と接触させることを含み、改変細胞がリガンドとしての役割を果たし、それにより標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達を調節する、方法が提供される。

【0 0 0 7】

また別の態様では、疾患または障害に罹患している対象を治療する方法であって、

10

20

30

40

50

- a . 疾患または障害の部位にホーミングすることができる細胞を準備することと、
 - b . 少なくとも 1 つの細胞外標的受容体結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、細胞内ドメインがいかなるシグナルも伝達することができず、標的受容体が疾患または障害に関連するものである、キメラ膜貫通ポリペプチドを細胞に発現させることと、
 - c . 対象にキメラ膜貫通ポリペプチドを発現する細胞を投与することとを含み、
- それにより疾患または障害に罹患している対象を治療する、方法が提供される。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態では、標的細胞によるシグナル伝達は、標的細胞内でのシグナル伝達カスケードを含む。いくつかの実施形態では、調節することは、誘導すること、または阻害することを含む。いくつかの実施形態では、シグナル伝達を誘導することは、標的受容体のシグナル伝達ドメイン内の残基のリン酸化を含む。いくつかの実施形態では、シグナル伝達を誘導することは、標的受容体の下流標的のレベルの上方制御を含む。いくつかの実施形態では、シグナル伝達を阻害することは、前記標的受容体の下流標的のレベルの下方制御を含む。

10

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、異なるタンパク質に由来する細胞外ドメインと細胞内ドメインとを含む。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、前記標的受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを含む。

20

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは、免疫グロブリン可変重鎖ドメイン (V H) と免疫グロブリン可変軽鎖ドメイン (V L) とを含む。いくつかの実施形態では、 V H と V L はペプチドリンカーによって連結している。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列 G G S S R S S S S G G G G S G G G G (配列番号 4) または G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 5) を含む。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは 1 回膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは C D 3 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、 C D 3 膜貫通ドメインは配列 L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L (配列番号 29) を含む。

30

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、細胞外膜近位ドメインヒンジ領域をさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は C D - 8 ヒンジ領域を含む。いくつかの実施形態では、 C D - 8 ヒンジ領域はアミノ酸配列 A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D (配列番号 7) を含む。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、シグナルは、前記細胞内ドメインのシグナル伝達ドメイン内の残基のリン酸化を含む。いくつかの実施形態では、シグナルは、免疫細胞のエフェクター機能の活性化を誘導する。いくつかの実施形態では、シグナルは、前記変形細胞からの少なくとも 1 つのサイトカインの分泌を誘導する。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つのサイトカインはインターロイキン 2 (I L - 2) である。いくつかの実施形態では、シグナルは Z A P - 7 0 キナーゼの活性化を誘導する。

40

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、変形細胞の表面での検出可能なキメラ膜貫通ポリペプチドの発見を可能にするのに十分な長さおよび電荷の人工アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変形細胞の表面でのキメラ膜貫通ポリペプチドの検出は F

50

ACSを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、前記改変免疫細胞の膜内のキメラ膜貫通ポリペプチドの移動を可能にするのに十分な長さおよび電荷の人工アミノ酸配列を含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、CD3、CD28、OX-40 CD80、CD86およびT細胞受容体(TCR)以外の任意の膜貫通タンパク質の細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、活性化シグナルを伝達することができないよう変異したCD3ゼータ鎖を含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、CD3ゼータ鎖は、アミノ酸配列 RAKFSRSAETAA
NLQDPNQLYNELNLLGRREYDVLEKKRARDPEMGGKQQRR
RNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRRGKGHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQTLAPR(配列番号30)を含む。

10

【0018】

いくつかの実施形態では、前記CD3ゼータ鎖の少なくとも1つのチロシンが変異しており、変異は、細胞内ドメインが活性化シグナルを伝達することができないようにするものである。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのチロシンはフェニルアラニンに変異している。いくつかの実施形態では、前記CD3ゼータ鎖の全チロシンが変異している。いくつかの実施形態では、全チロシンがフェニルアラニンに変異している。

20

【0019】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、アミノ酸配列 RAKFSRSAETAA
NLQDPNQLFNELNLLGRREEDVLEKKRARDPEMGGKQQRR
RNPQEGVFNALQKDKMAEAFSEIGTKGERRRRGKGHDGLFQ
GLSTATKDTFDALHMQTLAPR(配列番号31)を含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、改変細胞が標的細胞に対して有害となるいかなるシグナルも伝達することができない。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは不活性である。

【0021】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドはタグをさらに含む。いくつかの実施形態では、タグは、GFPタグおよびMyctタグから選択される。

30

【0022】

いくつかの実施形態では、標的受容体は疾患または障害に関連するものである。いくつかの実施形態では、標的受容体は、GHR、GLP1R、TrkBおよびPD-1から選択される。

【0023】

いくつかの実施形態では、標的受容体はTrkBであり、抗TrkB抗原結合ドメインは、配列番号10、配列番号11、配列番号12または配列番号13のいずれか1つで記載される配列と少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、配列番号18または配列番号20で記載されるアミノ酸配列を含む。

40

【0024】

いくつかの実施形態では、標的受容体はGLP1Rであり、抗GLP1R抗原結合ドメインは、配列番号14または配列番号15のいずれか1つで記載される配列と少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、配列番号22で記載されるアミノ酸配列を有する。

【0025】

いくつかの実施形態では、標的受容体はGHRであり、前記標的受容体結合ドメインは成長ホルモン(GH)を含む。いくつかの実施形態では、GHは、配列番号16で記載される配列と少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態

50

では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、配列番号 24 で記載されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、標的受容体は P D - 1 であり、抗 P D - 1 抗原結合ドメインは、配列番号 25 または配列番号 26 で記載される配列と少なくとも 70 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、配列番号 28 で記載されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、配列番号 18、20、22、24 または 28 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 95 % の配列同一性を有し、シグナルを伝達することができない。

10

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、改変細胞または準備する細胞は免疫細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、B 細胞、骨髓性細胞、マクロファージ、単球、好中球、抗原提示細胞および樹状細胞から選択される。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、改変細胞または準備する細胞は、ヒトドナー由来の初代ヒト細胞に由来するものであり、前記改変初代ヒト細胞は、ヒトの治療に使用するのに適したものである。いくつかの実施形態では、準備する細胞は対象に対して自家性である。いくつかの実施形態では、準備する細胞は対象に対して同種性である。

【 0 0 3 0 】

20

いくつかの実施形態では、標的細胞は培養されているものである。いくつかの実施形態では、標的細胞は対象内に存在するものである。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態では、準備することは、前記対象から初代細胞を抽出することを含む。

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、対象の細胞上の前記標的受容体の活性化によって疾患または障害を治療し、細胞外受容体結合ドメインは標的受容体のアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、対象の細胞上の受容体の阻害によって疾患または障害を治療し、細胞外受容体結合ドメインは標的受容体のアンタゴニストを含む。

30

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、標的受容体は T r k B であり、疾患または障害は神経疾患または神経障害である。いくつかの実施形態では、神経疾患または神経障害は、アルツハイマー病、うつ病、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症 (A L S) 、癲癇および脳腫瘍から選択される。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、標的受容体は G L P 1 R であり、疾患または障害は、代謝疾患もしくは代謝障害または心血管疾患もしくは心血管障害である。いくつかの実施形態では、代謝疾患または代謝障害は、糖尿病、肥満、糖原病、パークリンソン病およびミトコンドリア性ミオパチーから選択される。いくつかの実施形態では、心血管疾患または心血管障害は、脳卒中、心筋梗塞、心虚血および冠動脈疾患から選択される。

40

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、標的受容体は G H R であり、疾患または障害は成長疾患または成長障害である。いくつかの実施形態では、成長疾患または成長障害は、先端巨大症、成長ホルモン分泌不全症、癌、ターナー症候群およびプラダーリ・ウィリー症候群から選択される。

【 0 0 3 6 】

いくつかの実施形態では、標的受容体は P D - 1 であり、疾患または障害は、免疫疾患もしくは免疫障害または癌である。いくつかの実施形態では、免疫疾患または免疫障害は、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、グレーブス病、免疫介在性炎症およびセリアック病から選

50

択される。いくつかの実施形態では、疾患または障害は癌であり、標的受容体結合ドメインは P D - 1 アンタゴニストを含む。

【 0 0 3 7 】

また別の態様では、少なくとも 1 つの細胞外標的受容体結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、細胞内ドメインがシグナルを伝達しないキメラ膜貫通ポリペプチドを含む、改変細胞と、薬学的に許容される担体、賦形剤または補助剤とを含む、医薬組成物が提供される。

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、標的受容体に関連する疾患または障害の治療に使用するものである。いくつかの実施形態では、組成物は少なくとも 1 0 0 万個の改変細胞を含む。

10

【 0 0 3 9 】

以下に記載する詳細な説明から、本発明のさらなる実施形態および全適用範囲が明らかになるであろう。ただし、当業者には、この詳細な説明から本発明の趣旨および範囲に含まれる様々な変更および修正が明らかになることから、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい実施形態を示すものであると同時に、単なる例示を目的に記載されるものであることを理解するべきである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 0 】

【図 1 A】 p Tr k B、全長型 Tr k B およびアクチンを検出したウエスタンプロットの写真露出を示す図である。

20

【図 1 B】 図 1 A に示した p Tr k b の相対量をまとめた棒グラフである。リン酸化型の発現の標準化に作用および全長型 Tr k B を用いている。

【図 2】 培養細胞から分泌された I L - 2 の相対量を示す棒グラフである。結果は I L - 2 の E L I S A アッセイで得た O D レベル (波長 6 5 0) として示されている。

【図 3 - 1】 (3 A) Tr k B - My c - WT、(3 B) Tr k B - My c - Mut 、(3 C) Tr k B - G F P - WT、(3 D) Tr k B - G F P - Mut 、(3 E) G L P 1 R - My c - WT および (3 F) G L P 1 R - My c - Mut を B W 細胞に 、(3 G) G L P 1 R - My c - Mut を初代マウス T ヘルパー細胞にウイルスで形質導入した後の My c または G F P の表面発現のヒストグラムである。明灰色 - 未染色細胞 または未形質導入細胞、灰色 - My c の図に対する二次抗体単独の対照 (抗 A P C) 、黒色 - My c または G F P を形質導入した細胞。

30

【図 3 - 2】 (3 A) Tr k B - My c - WT、(3 B) Tr k B - My c - Mut 、(3 C) Tr k B - G F P - WT、(3 D) Tr k B - G F P - Mut 、(3 E) G L P 1 R - My c - WT および (3 F) G L P 1 R - My c - Mut を B W 細胞に 、(3 G) G L P 1 R - My c - Mut を初代マウス T ヘルパー細胞にウイルスで形質導入した後の My c または G F P の表面発現のヒストグラムである。明灰色 - 未染色細胞 または未形質導入細胞、灰色 - My c の図に対する二次抗体単独の対照 (抗 A P C) 、黒色 - My c または G F P を形質導入した細胞。

【図 3 - 3】 (3 A) Tr k B - My c - WT、(3 B) Tr k B - My c - Mut 、(3 C) Tr k B - G F P - WT、(3 D) Tr k B - G F P - Mut 、(3 E) G L P 1 R - My c - WT および (3 F) G L P 1 R - My c - Mut を B W 細胞に 、(3 G) G L P 1 R - My c - Mut を初代マウス T ヘルパー細胞にウイルスで形質導入した後の My c または G F P の表面発現のヒストグラムである。明灰色 - 未染色細胞 または未形質導入細胞、灰色 - My c の図に対する二次抗体単独の対照 (抗 A P C) 、黒色 - My c または G F P を形質導入した細胞。

40

【図 3 - 4】 (3 A) Tr k B - My c - WT、(3 B) Tr k B - My c - Mut 、(3 C) Tr k B - G F P - WT、(3 D) Tr k B - G F P - Mut 、(3 E) G L P 1 R - My c - WT および (3 F) G L P 1 R - My c - Mut を B W 細胞に 、(3 G) G L P 1 R - My c - Mut を初代マウス T ヘルパー細胞にウイルスで形質

50

導入した後の M y c または G F P の表面発現のヒストグラムである。明灰色 - 未染色細胞または未形質導入細胞、灰色 - M y c の図に対する二次抗体単独の対照（抗 A P C ）、黒色 - M y c または G F P を形質導入した細胞。

【図 4】抗 M y c 抗体との共インキュベーション後に M y c 含有構築物を発現する形質導入細胞から分泌された I L - 2 の相対量を示す棒グラフである。結果は I L - 2 の E L I S A アッセイで得た O D レベル（波長 650）として示されている。

【図 5】G L P 1 R 発現細胞との共インキュベーション後に M y c 含有構築物を発現する形質導入細胞から分泌された I L - 2 の相対量を示す棒グラフである。結果は I L - 2 の E L I S A アッセイで得た O D レベル（波長 650）として示されている。

【図 6】R a w 細胞から分泌された T N F アルファの相対量を示す棒グラフである。市販の E L I S A キットにより上清中のマウス T N F レベルを求めた。E L I S A アッセイの結果は O D - 650 として示されている。

【発明を実施するための形態】

【0041】

（発明の詳細な説明）

本発明は、標的細胞上の受容体の活性を調節することにより疾患を治療するための組成物および方法を提供する。本発明は、免疫系の細胞が体内に移動し器官内の特定のニッチに集積する能力を利用するものである。このような免疫細胞は、その膜に発現し係留される目的分子の送達プラットフォームとして使用される。係留される治療用分子は、免疫細胞活性化シグナルを伝達することができない細胞内ドメインを含むキメラ膜貫通ポリペプチドの細胞外ドメイン内にある。このようにして、治療用分子がその標的受容体にとどまるこことによって標的受容体が調節される（例えば、活性化または不活性化される）が、免疫細胞自体は活性化されない。

【0042】

第一の態様により、標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達を調節する方法であって、標的細胞を、少なくとも 1 つの細胞外標的受容体結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、細胞内ドメインがいかなるシグナルも伝達することができないキメラ膜貫通ポリペプチドを含む、改変細胞と接触させることを含み、それにより標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達を調節する、方法が提供される。

【0043】

また別の態様により、標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達を調節する方法であって、標的細胞を、少なくとも 1 つの細胞外標的受容体結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、細胞内ドメインが免疫細胞活性化シグナルを伝達することができないキメラ膜貫通ポリペプチドを含む、改変免疫細胞と接触させることを含み、それにより標的細胞の標的受容体によるシグナル伝達を調節する、方法が提供される。

【0044】

また別の態様により、疾患または障害に罹患している対象を治療する方法であって、
a . 免疫細胞を準備することと、
b . 少なくとも 1 つの細胞外標的受容体結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、前記細胞内ドメインが免疫細胞活性化シグナルを伝達することができず、前記標的受容体が前記疾患または障害に関連するものである、キメラ膜貫通ポリペプチドを前記免疫細胞に発現させることと、

c . 前記対象に前記キメラ膜貫通ポリペプチドを発現する前記免疫細胞を投与することとを含み、

それにより疾患または障害に罹患している前記対象を治療する、方法が提供される。

【0045】

また別の態様により、疾患または障害に罹患している対象を治療する方法であって、
a . 前記疾患または障害の部位にホーミングすることができる細胞を準備することと、
b . 少なくとも 1 つの細胞外標的受容体結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、前記細胞内ドメインが不活性であり、前記標的受容体が前記疾患または

10

20

30

40

50

障害に関連するものである、キメラ膜貫通ポリペプチドを前記細胞に発現させることと、
c. 前記対象に前記キメラ膜貫通ポリペプチドを発現する前記細胞を投与することと
を含み、

それにより疾患または障害に罹患している前記対象を治療する、方法が提供される。

【0046】

また別の態様により、少なくとも1つの細胞外標的受容体結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、細胞内ドメインが免疫細胞活性化シグナルを伝達することができない、キメラ膜貫通ポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインはいかなるシグナルも伝達することができない。

【0047】

本明細書で使用される「シグナル伝達」という用語は、細胞内シグナル伝達を指す。シグナル伝達は当該技術分野で周知であり、一連の分子事象を介してシグナルを伝達して細胞に生理学的变化をもたらすことを指す。いくつかの実施形態では、シグナル伝達は標的細胞内でのシグナル伝達カスケードを含む。いくつかの実施形態では、シグナル伝達はシグナル伝達タンパク質のリン酸化を含む。いくつかの実施形態では、シグナル伝達を誘導することは、標的受容体のシグナル伝達ドメイン内の残基のリン酸化を含む。いくつかの実施形態では、シグナル伝達を誘導することは、シグナル伝達カスケードのタンパク質のシグナル伝達ドメイン内の残基のリン酸化を含む。いくつかの実施形態では、リン酸化残基はチロシン残基である。いくつかの実施形態では、シグナル伝達を誘導することは、標的受容体の下流標的のレベルの上方制御を含む。いくつかの実施形態では、シグナル伝達を阻害することは、標的受容体の下流標的のレベルの下方制御を含む。

10

【0048】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達を誘導することは、シグナル伝達の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%の増大を含む。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。いくつかの実施形態では、シグナル伝達を阻害することは、シグナル伝達の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または100%の減少を含む。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。

【0049】

シグナル伝達の変化の測定は当該技術分野で周知であり、シグナル伝達の変化を確認する任意の方法を用いて本発明の方法を実施し得る。このような測定方法としては、特に限定されないが、標的受容体またはシグナル伝達カスケードで受容体の下流にあることが明らかにされている別のシグナル伝達タンパク質のシグナル伝達ドメインのリン酸化の測定が挙げられる。シグナル伝達によって上方制御または下方制御されることが明らかにされているタンパク質の発現レベルの測定を用いてもよい。このような分子の例としては、特に限定されないが、サイトカイン、転写因子およびエフェクタータンパク質が挙げられる。

30

【0050】

いくつかの実施形態では、標的細胞は患部組織の細胞である。いくつかの実施形態では、組織は、脳、筋肉、心臓、肺、脾臓、皮膚、肝臓、生殖器系、消化器系および分泌系から選択される。いくつかの実施形態では、標的細胞は血液細胞である。いくつかの実施形態では、標的細胞は免疫細胞である。いくつかの実施形態では、標的細胞は、ニューロン、筋細胞、骨細胞、血液細胞、リンパ細胞、線維芽細胞、免疫細胞、インスリン産生細胞および心臓細胞から選択される。

40

【0051】

いくつかの実施形態では、標的細胞は培養されているものである。いくつかの実施形態では、標的細胞は対象内にあるものである。いくつかの実施形態では、標的細胞は対象内にあるものであり、変更細胞は対象に対して同種性である。いくつかの実施形態では、標的細胞は対象内にあるものであり、変更細胞は対象に対して自家性である。いくつかの実施形態では、標的細胞は対象内にあるものであり、変更細胞は、対象に投与したときに免疫応答を誘発しないよう、または免疫応答の低下を誘発するようさらに変更されている。

50

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態では、標的受容体は疾患または障害に関連する受容体である。いくつかの実施形態では、標的受容体は、対象の疾患細胞または患部組織上にある。いくつかの実施形態では、標的受容体の活性化によって疾患または障害が治療または改善され、細胞外受容体結合ドメインは標的受容体のアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体の阻害によって疾患または障害が治療または改善され、細胞外受容体結合ドメインは標的受容体のアンタゴニストを含む。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用される疾患、障害または病態の「治療」または疾患、障害または病態を「治療すること」という用語は、その少なくとも 1 つの症状の緩和、その重症度の軽減またはその進行の阻害を包含する。治療は、疾患、障害または病態が完全に治癒することを意味する必要はない。効果的な治療であるためには、本明細書の有用な組成物が、疾患、障害もしくは病態の重症度を軽減するか、それに関連する症状の重症度を軽減するか、または患者もしくは対象の生活の質に改善をもたらすだけでよい。

10

【 0 0 5 4 】

改变細胞

また別の態様により、少なくとも 1 つの細胞外標的受容体結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、細胞内ドメインが免疫細胞活性化シグナルを伝達することができないキメラ膜貫通ポリペプチドを含む、改变細胞が提供される。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインはいかなるシグナルも伝達することができない。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは不活性である。いくつかの実施形態では、標的細胞を本発明の改变細胞と接触させることにより本発明の方法を実施する。いくつかの実施形態では、必要とする対象に本発明の改变細胞を投与することにより本発明の方法を実施する。

20

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態では、本発明の改变細胞は、体内の所望の位置または標的細胞にホーミングすることができる任意の細胞である。いくつかの実施形態では、本発明の改变細胞は、体内の疾患部位にホーミングすることができる任意の細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は線維芽細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は間葉系幹細胞 (M S C) である。いくつかの実施形態では、細胞は胚性幹細胞 (E S C) または人工多能性幹細胞 (I P S C) である。いくつかの実施形態では、細胞は多能性幹細胞 (P S C) である。いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、B 細胞、骨髓性細胞、マクロファージ、単球、好中球、抗原提示細胞および樹状細胞から選択される。いくつかの実施形態では、免疫細胞は T 細胞である。いくつかの実施形態では、T 細胞は C D 4 + T 細胞または C D 8 + T 細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、ホーミングおよびシナプス形成を促進するよう部分的に活性化されている。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、血液脳関門 (B B B) を通過することができる。いくつかの実施形態では、免疫細胞は血液精巣関門 (B T B) を通過することができる。

30

【 0 0 5 6 】

細胞のホーミングは、標的細胞または疾患細胞の位置または組織によって決まり得る。標的細胞が創傷にある実施形態では、改变細胞は線維芽細胞であり得る。標的細胞が脳にある実施形態では、改变細胞は C D 4 + T 細胞であり得る。標的細胞が脾臓にある実施形態では、改变細胞は B 細胞であり得る。

40

【 0 0 5 7 】

本発明の改变細胞は、アゴニストもしくはアンタゴニストまたは標的受容体を発現しその膜に係留するよう遺伝子改変されている。いくつかの実施形態では、アゴニスト / アンタゴニストは、以降、一本鎖アゴニスト / アンタゴニスト抗体 (S C A A B) と称する、標的受容体に対するアゴニスト / アンタゴニスト特性を有する一本鎖抗体である。本発明の細胞は、対象の体内の所望の標的部位へのアゴニスト / アンタゴニストの送達を媒介する担体細胞として使用される。いくつかの実施形態では、担体細胞は対象の体内に導入さ

50

れ、そこで所望の器官および／または特定のニッチに移動し集積する。細胞はアゴニストおよび／またはアンタゴニストの担体であるため、本発明の方法には改変細胞の細胞傷害性の活性化は必要ないことが当業者に理解されよう。実際、免疫細胞エフェクター機能の活性化が免疫応答を惹起し、かつ／または細胞を細胞傷害性にすることから、細胞のエフェクター機能の活性化は不利であり、望まれるものではない。

【0058】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、標的細胞上の標的受容体を活性化または阻害しようとするものであり、免疫細胞が結合時に完全に活性化した場合に起こりうる標的細胞の死滅を望むものではない。このため、本発明のキメラ膜貫通ポリペプチドは、免疫細胞活性化シグナルを伝達して標的細胞に害を及ぼすことができない細胞内領域を有するものであり、したがって、CD8⁺ T細胞およびNK細胞などの免疫細胞は標的と結合しても細胞傷害性になることはない。いくつかの実施形態では、本発明の改変免疫細胞は細胞傷害性ではない。いくつかの実施形態では、本発明の改変免疫細胞は、標的受容体と結合することにより細胞傷害性になることはない。いくつかの実施形態では、本発明の改変免疫細胞は、標的受容体との結合によってサイトカインを分泌することはない。いくつかの実施形態では、改変細胞は標的細胞に害を及ぼすことはない。いくつかの実施形態では、改変細胞は標的細胞を死滅させることはない。いくつかの実施形態では、改変細胞は標的細胞に有害なものではない。

10

【0059】

改変細胞が免疫細胞であるいくつかの実施形態では、細胞質ドメインは免疫細胞活性化シグナルを伝達することができない。改変細胞が免疫細胞であるいくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、改変細胞が標的細胞に害を及ぼす結果となり得るいかなるシグナルも細胞内に伝達することができない。改変細胞が免疫細胞であるいくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、細胞内にいかなるシグナルも伝達することができない。改変細胞が免疫細胞以外の別のホーミング細胞であるいくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、改変細胞が標的細胞に害を及ぼす結果となり得るいかなるシグナルも細胞内に伝達することができない。改変細胞が免疫細胞以外の別のホーミング細胞であるいくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、細胞内にいかなるシグナルも伝達することができない。

20

【0060】

いくつかの実施形態では、改変細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態では、改変細胞は、ヒトドナー由来の初代細胞に由来するものであり、前記改変初代ヒト細胞は、ヒトの治療に使用するのに適している。いくつかの実施形態では、初代細胞は、ヒトドナーから取り出した後、細胞培地で培養したものである。いくつかの実施形態では、改変細胞は、培養した初代細胞の娘細胞または子孫細胞である。ドナーに戻す初代細胞の培養は当該技術分野で周知であり、培養条件については、細胞をドナーに戻すのに適した健康状態に維持するのに使用し得るものであればいずれも適している。初代細胞培養に関する指示書については、2つの非限定的な例としてATCC、Sigma Aldrich社から入手することができる。いくつかの実施形態では、初代細胞を拡大培養し、拡大した改変細胞をドナーに戻す。いくつかの実施形態では、準備することは、患者から初代免疫細胞を抽出することを含む。

30

【0061】

「細胞培地」という用語は、細胞の増殖を可能にする任意の液体培地を指す。増殖培地は当該技術分野で公知であり、増殖させる細胞のタイプに応じて選択することができる。例えば、哺乳動物細胞の増殖に用いる増殖培地として、熱不活化ウシ胎児血清を添加することが可能なダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)がある。

40

【0062】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドを大量に発現させる効果的な条件下で改変細胞を培養する。いくつかの実施形態では、効果的な培養条件としては、特に限定されないが、タンパク質産生を可能にする効果的な培地、バイオリアクター、温度、pHおよび酸素の条件が挙げられる。一実施形態では、効果的な培地は、細胞を培養して本発明の

50

キメラポリペプチドを産生させる任意の培地を指す。いくつかの実施形態では、培地は通常、同化可能な炭素源、窒素源およびリン酸源ならびに適切な塩、ミネラル、金属、およびビタミンなどのその他の栄養素の入った水溶液を含む。いくつかの実施形態では、本発明の細胞を従来の発酵バイオリアクター、振盪フラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュおよびペトリプレートで培養することができる。いくつかの実施形態では、培養を組換え細胞に適した温度、pHおよび酸素含有量で実施する。いくつかの実施形態では、培養条件は当業者の専門知識の範囲内にあるものである。

【0063】

本明細書で使用される「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すのに互換的に使用される。別の実施形態では、本明細書で使用される「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、天然のペプチド、ペプチド模倣物（通常、非ペプチド結合またはその他の合成修飾を含む）ならびにペプチド類似体であるペプトイドおよびセミペプトイドあるいはその任意の組合せを包含する。別の実施形態では、記載されるペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質は、体内での安定性を高める、または細胞内への浸透能を高める修飾を有する。一実施形態では、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、天然のアミノ酸ポリマーに適用される。別の実施形態では、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然のアミノ酸の人工の化学的類似体である、アミノ酸ポリマーに適用される。

10

【0064】

本明細書で使用される「キメラ」ポリペプチドという用語は、異なる天然のタンパク質に由来する少なくとも2つのフラグメントが組み合わさって単一の非天然タンパク質になったポリペプチドを指す。キメラタンパク質は当業者に周知であり、ある既知のタンパク質に由来することがわかる1つの明確なドメインまたはフラグメントと、第二の既知のタンパク質に由来することがわかる少なくとも1つの他の明確なドメインまたはフラグメントとを有するものとなる。いくつかの実施形態では、天然のタンパク質はキメラタンパク質ではない。いくつかの実施形態では、異なるタンパク質由来のリーダー配列またはリーダーペプチドを有する天然のタンパク質はともにキメラペプチドとは見なさない。リーダー配列もリーダーペプチドも成熟タンパク質には発現しないため、ポリペプチドがキメラとなることに寄与するものであるとは考えられないことが理解されよう。いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、第一のタンパク質の細胞外ドメインと、第二のタンパク質由来の細胞内ドメインとを含む。

20

【0065】

本明細書で使用される「フラグメント」は、タンパク質の一部分であって、大きさまたは構造が依然としてそのタンパク質全体の一部として認識できる程度のものを指す。いくつかの実施形態では、フラグメントとはタンパク質全体のことである。本明細書で使用される「～に由来する」または「～に対応する」という用語は、当業者に公知のいずれか1つの適切な手段、例えば、当該技術分野の標準的プロトコルによる化学合成を用い、配列に関する知見に基づいてアミノ酸配列を構築することを指す。

30

【0066】

本明細書で使用される「リーダー配列」または「リーダーペプチド」は同義であり、膜内に挿入されるタンパク質のN末端にみられる15～30個の主に疎水性のアミノ酸を指す。リーダー配列は、膜内に挿入された後、成熟タンパク質から切断されることが最も多い。この配列は多くの場合、小胞体への適切な挿入、膜貫通タンパク質の正しい方向および細胞表面での安定した発現に必要とされる。一般に、細胞表面に発現するいずれの膜貫通タンパク質のリーダー配列でも、細胞表面に発現する他の任意の膜貫通タンパク質のリーダー配列と交換することができ、なおも安定した表面発現が得られる。理想的には、細胞内に優勢に発現するタンパク質、例えばミトコンドリアタンパク質などのリーダーペプチドは使用するべきではないが、表面での発現が得られるのであれば依然として選択肢となる。本発明のキメラ膜貫通ポリペプチドを細胞膜内に挿入し、ひいては細胞表面に効率

40

50

的に発現させるのに使用し得るリーダー配列の例としては、特に限定されないが、MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC (配列番号1)、MDMRVPAQLLGLLLWLWLSGARCQ (配列番号2) およびMATGSRSTSLLAFLGLCLPWLQEGSQA (配列番号3) が挙げられる。

【0067】

本明細書で使用される「膜貫通ポリペプチド」は、細胞膜内に係留し横断するタンパク質を指す。したがって、膜貫通ポリペプチドは、少なくとも細胞外アミノ酸と、少なくとも1つの細胞内アミノ酸と、細胞膜内にあるアミノ酸配列とを含むものでなければならない。膜貫通タンパク質は当該技術分野で周知であり、当業者には、GPI係留ポリペプチドが「膜貫通型」ではなく細胞内ドメインを持たないため、本発明のポリペプチドではないことが理解されよう。

10

【0068】

いくつかの実施形態では、本発明の改変細胞は2つ以上のキメラ膜貫通ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、単一のキメラ膜貫通ポリペプチドが2つ以上の標的受容体結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、2つ以上の標的受容体結合ドメインが同じ受容体を標的とする。いくつかの実施形態では、2つの異なる受容体結合ドメインが異なる受容体を標的とする。したがって、単一の改変細胞が2つ以上の標的受容体と2つ以上の標的細胞とを有することがある。

【0069】

細胞外ドメイン

20

いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは標的受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは抗体の抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは2つ以上の標的受容体結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは2つ以上の標的受容体と結合し得る。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、標的受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストを2つ以上含み得る。いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは、免疫グロブリン可変重鎖ドメイン (VH) と免疫グロブリン可変軽鎖ドメイン (VL) とを含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは2つ以上の抗体抗原結合ドメインを含む。本発明の方法は標的受容体を調節するためのものであるため、単に標的受容体とは結合するが、受容体を活性化することも阻害することもない細胞外ドメインは本発明の実施形態ではないことが理解されよう。さらに、単に改変細胞を標的細胞に標的化するために使用する標的受容体結合ドメインも標的受容体のシグナル伝達を調節するとは考えられず、これも本発明の実施形態ではない。

30

【0070】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、ポリペプチド鎖のフォールディングによって形成され、抗原の抗原決定基の特徴に相補的な内部表面の形状および電荷分布を有する三次元結合空間を持つ少なくとも1つの結合ドメインを含む、ポリペプチドまたはポリペプチドのグループを指す。抗体は通常、2つの同一のポリペプチド鎖の対を含み、各対が1つの「軽」鎖と1つの「重」鎖とを有する、四量体の形態をとる。各軽鎖 / 重鎖対の可変領域は抗体結合部位を形成する。抗体は任意の種に由来するものであり得る。抗体という用語は、特に限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fc (ab')2一本鎖抗体 (sVFC)、二量体可変領域 (ダイアボディ) およびジスルフィド結合した可変領域 (dsFv) を含めた結合フラグメントも包含する。特に、抗体は免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち、抗原結合部位を含む分子を含む。抗体フラグメントは、特に限定されないが、Fc領域またはそのフラグメントを含めた別の免疫グロブリンドメインと融合されていても、されていなくてもよい。当業者にはさらに、特に限定されないが、scFv - Fc融合体、可変領域 (例えば、VLおよびVH) - Fc融合体およびscFv - scFv - Fc融合体を含めたその他の融合産物を作製し得ることが理解されよう。

40

【0071】

50

いくつかの実施形態では、VHとVLはペプチドリンカーによって連結されている。抗体として使用する抗原結合フラグメントの設計にあたっては、VHとVLとの間のペプチドリンカーはよく知られており、標的受容体と良好に結合する結合ポケットの形成に効果的な任意のリンカーを使用し得る。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、アミノ酸配列GGSSRSSSSGGGGSGGGG（配列番号4）またはGGGGSGGGGSGGGGSGGGS（配列番号5）を含む。

〔 0 0 7 2 〕

いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは、少なくとも 0.1 pM、0.2 pM、0.3 pM、0.4 pM、0.5 pM、1 pM、5 pM、10 pM、20 pM、30 pM、40 pM、50 pM、60 pM、70 pM、80 pM、90 pM または 100 pM の解離定数 (Kd) で標的受容体と結合する。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは、0.1 ~ 100 pM、0.1 ~ 200 pM、0.1 ~ 300 pM、0.1 ~ 400 pM、0.1 ~ 500 pM、0.1 ~ 600 pM、0.1 ~ 700 pM、0.1 ~ 800 pM、0.1 ~ 900 pM、0.1 ~ 1000 pM、0.1 ~ 2000 pM、0.1 ~ 3000 pM、0.1 ~ 4000 pM、0.1 ~ 5000 pM、0.1 ~ 6000 pM、0.1 ~ 7000 pM、0.1 ~ 8000 pM、0.1 ~ 9000 pM、0.1 ~ 10000 pM、0.1 ~ 20000 pM、0.1 ~ 30000 pM、0.1 ~ 40000 pM、0.1 ~ 50000 pM、0.1 ~ 60000 pM、0.1 ~ 70000 pM、0.1 ~ 80000 pM、0.1 ~ 90000 pM、0.1 ~ 100000 pM、1 ~ 200 pM、1 ~ 300 pM、1 ~ 400 pM、1 ~ 500 pM、1 ~ 600 pM、1 ~ 700 pM、1 ~ 800 pM、1 ~ 900 pM、1 ~ 1000 pM、1 ~ 2000 pM または 1 ~ 3000 pM の Kd で標的受容体と結合する。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。

10

〔 0 0 7 3 〕

いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは、少なくとも 0.1 nM、0.2 nM、0.3 nM、0.4 nM、0.5 nM、1 nM、5 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM または 100 nM の 50% 最大有効濃度 (EC50) で標的受容体と結合する。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは、0.1 ~ 100 nM、0.1 ~ 200 nM、0.1 ~ 300 nM、0.1 ~ 400 nM、0.1 ~ 500 nM、0.1 ~ 600 nM、0.1 ~ 700 nM、0.1 ~ 800 nM、0.1 ~ 900 nM、0.1 ~ 1000 nM、0.1 ~ 2000 nM、0.1 ~ 3000 nM、0.1 ~ 4000 nM、0.5 ~ 100 nM、0.5 ~ 200 nM、0.5 ~ 300 nM、0.5 ~ 400 nM、0.5 ~ 500 nM、0.5 ~ 600 nM、0.5 ~ 700 nM、0.5 ~ 800 nM、0.5 ~ 900 nM、0.5 ~ 1000 nM、0.5 ~ 2000 nM、0.5 ~ 3000 nM、1 ~ 100 nM、1 ~ 200 nM、1 ~ 300 nM、1 ~ 400 nM、1 ~ 500 nM、1 ~ 600 nM、1 ~ 700 nM、1 ~ 800 nM、1 ~ 900 nM、1 ~ 1000 nM、1 ~ 2000 nM または 1 ~ 3000 nM の EC50 で標的受容体と結合する。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。

〔 0 0 7 4 〕

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインは当該技術分野で周知であり、一般に疎水性残基を含むものである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、天然のタンパク質に由来する既知の膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはマウス膜貫通タンパク質に由来する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはヒト膜貫通タンパク質に由来する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは合成膜貫通ドメインである。本発明の方法および組成物は、本発明のキメラポリペプチドを細胞膜内に係留し、細胞外領域に標的受容体結合ドメインがあり、細胞内領域が免疫細胞活性化シグナルを伝達することができない、任意の膜貫通ドメインを用いて実施し得る。

40

〔 0 0 7 5 〕

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは1回膜貫通ドメインである。いくつかの実

50

施形態では、膜貫通ドメインは奇数個の膜貫通領域を含む。当業者には、タンパク質内に偶数個の膜貫通領域が存在する場合、細胞内領域は、2つの膜貫通領域内にある細胞内ループとなることが理解されよう。いくつかの実施形態では、細胞内領域はタンパク質のC末端にある。いくつかの実施形態では、細胞内領域はタンパク質のN末端にある。いくつかの実施形態では、細胞内領域は2つの膜貫通ドメインの間の細胞内ループである。

【0076】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはCD3膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはCD3膜貫通ドメインからなる。いくつかの実施形態では、CD3膜貫通ドメインは配列LCYLLDGILFIFYGVITALYL(配列番号29)を含む。いくつかの実施形態では、CD3膜貫通ドメインは配列番号29で記載される配列からなる。

10

【0077】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドはヒンジ領域をさらに含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は細胞外領域である。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は膜近位ドメインである。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は細胞外膜近位ドメイン領域である。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は免疫グロブリンヒンジ領域を含む。抗体およびキメラタンパク質へのヒンジ領域の使用は当該技術分野で周知である。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域はVHドメインとVLドメインを連結する。いくつかの実施形態では、VHドメインとVLドメインとを含むポリペプチドのみがヒンジドメインを含む。

20

【0078】

いくつかの実施形態では、ヒンジ領域はCD-8ヒンジ領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域はCD-8ヒンジ領域からなる。いくつかの実施形態では、CD-8ヒンジ領域はアミノ酸配列ALSNNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLD(配列番号7)を含む。いくつかの実施形態では、CD-8ヒンジ領域は配列番号7で記載されるアミノ酸配列からなる。

【0079】

細胞内ドメイン

いくつかの実施形態では、本発明のキメラ膜貫通ポリペプチドの細胞内ドメインは、免疫細胞活性化シグナルを伝達することができない。いくつかの実施形態では、本発明のキメラ膜貫通ポリペプチドの細胞内ドメインは、改変細胞が標的細胞に害を及ぼす結果となるいかなるシグナルも伝達することができない。いくつかの実施形態では、本発明のキメラ膜貫通ポリペプチドの細胞内ドメインは、いかなるシグナルも伝達することができない。いくつかの実施形態では、本発明のキメラ膜貫通ポリペプチドの細胞内ドメインは不活性である。本明細書で使用される「不活性な」という用語は、タンパク質領域が決してシグナル伝達に影響を及ぼすことができないことを指す。不活性なタンパク質ドメインはシグナルを伝達することができないのみならず、シグナルを制御することも調節することもできない。不活性な細胞質ドメイン依然として、タンパク質が膜内で移動する能力に影響を及ぼし得るか、または膜内でのタンパク質の発現もしくは配向に影響を及ぼし得る。

30

【0080】

いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化はエフェクター機能活性化を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化は、サイトカインの分泌、抗体の放出、ZAP-10キナーゼの活性化、免疫細胞の増殖ならびにCD69、CD71、CD25、HLA-DRおよびCTL-A-4のうち少なくとも1つの表面の上方制御のうち少なくとも1つのものを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化はIL-2の分泌を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化シグナルはZAP-70キナーゼの活性化を誘導する。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化シグナルは、膜貫通タンパク質の細胞内ドメインのシグナル伝達ドメイン内の残基のリン酸化を含む。いくつかの実施形態では、残基はチロシン残基である。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化シグナルはエフェクター機

40

50

能の活性化を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化シグナルは、T細胞受容体複合体のタンパク質または共刺激タンパク質の細胞内ドメインのシグナル伝達ドメイン内のチロシンのリン酸化を含む。いくつかの実施形態では、共刺激タンパク質は、CD28、OX-40、CD80 (B7-1) およびCD86 (B7-2) のいずれか1つのものである。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化シグナルは、CD28、OX-40、CD80 およびCD86 のいずれか1つのものによるTCRの共刺激を含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化シグナルを伝達することは、共刺激シグナル伝達を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化シグナルを伝達することは、存在しなければシグナルが伝達されず、細胞が活性化されない任意の機能を含む。いくつかの実施形態では、シグナルを伝達することはキナーゼカスケードを含む。いくつかの実施形態では、シグナルを伝達することは、キナーゼ分子と共に刺激分子のタンパク質間結合を含む。

10

【0082】

いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化シグナルを伝達することができる細胞質ドメインは、免疫受容体チロシン依存性活性化モチーフ (ITAM) ドメインを含む。免疫細胞活性化受容体は当該技術分野で周知である。ITAMドメインを含み、シグナル伝達をできなくする変異がないとシグナル伝達ドメインを本発明のキメラポリペプチドの細胞質ドメインに使用することができない免疫細胞活性化タンパク質の非限定的な例を表1に記載する。

20

【0083】

30

40

50

【表 1】

記号	説明	Gcid
<u>SYK</u>	脾臓関連チロシンキナーゼ	GC09P090831
<u>NFAM1</u>	I T A M モチーフ 1 を有する N F A T 活性化タンパク質	GC22M042380
<u>STAM2</u>	シグナル伝達アダプター分子 2	GC02M152116
<u>STAM</u>	シグナル伝達アダプター分子	GC10P017645
<u>ZAP70</u>	T 細胞受容体関連プロテインキナーゼ 7 0 のゼータ鎖	GC02P097696
<u>TYROBP</u>	T Y R O タンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質	GC19M035904
<u>LCK</u>	L C K 癌原遺伝子、S r c ファミリーチロシンキナーゼ	GC01P032251
<u>FLNA</u>	フィラミン A	GC0XM154348
<u>CD79A</u>	C D 7 9 a 分子	GC19P041877
<u>CD247</u>	C D 2 4 7 分子	GC01M167399
<u>CARD9</u>	カスパーーゼ動員ドメインファミリーメンバー 9	GC09M136361
<u>FCER1G</u>	I g E 受容体 I g の F c フラグメント	GC01P161215
<u>CLEC4E</u>	C 型レクチンドメインファミリー 4 メンバー E	GC12M008535
<u>CD79B</u>	C D 7 9 b 分子	GC17M063928
<u>FCGR2A</u>	I g G 受容体 I I a の F c フラグメント	GC01P161505
<u>CD3E</u>	C D 3 e 分子	GC11P118304
<u>PIK3CB</u>	ホスファチジルイノシトール-4, 5-ビスリシン酸 3-キナーゼ触媒サブユニットベータ	GC03M138652
<u>RASGRP1</u>	R A S グアニル放出タンパク質 1	GC15M038488
<u>CD300LB</u>	C D 3 0 0 分子様ファミリーメンバー B	GC17M074520
<u>PILRB</u>	対イムノグロビン (I mmu n o g l o b i n) 様 2 型受容体ベータ	GC07P100353
<u>GCSAM</u>	胚中心関連シグナル伝達および移動	GC03M112120
<u>BCR</u>	B C R 、R h o G E F および G T P a s e 活性化タンパク質	GC22P023179
<u>CEACAM4</u>	癌胎児抗原関連細胞接着分子 4	GC19M041618
<u>GP6</u>	糖タンパク質 V I 血小板	GC19M055013
<u>GRB2</u>	増殖因子受容体結合タンパク質 2	GC17M075318
<u>SHC1</u>	S H C アダプタータンパク質 1	GC01M154962
<u>EZR</u>	エズリン	GC06M158765
<u>FCAR</u>	I g A 受容体の F c フラグメント	GC19P054983
<u>CD300LD</u>	C D 3 0 0 分子様ファミリーメンバー D	GC17M074579
<u>LYN</u>	L Y N 癌原遺伝子、S r c ファミリーチロシンキナーゼ	GC08P055879
<u>PLCG2</u>	ホスホリパーゼ C ガンマ 2	GC16P081773
<u>OSCAR</u>	破骨細胞関連免疫グロブリン様受容体	GC19M054094
<u>CD3D</u>	C D 3 d 分子	GC11M118338
<u>CD3G</u>	C D 3 g 分子	GC11P118344
<u>RHOH</u>	R a s ホモログファミリーメンバー H	GC04P040192
<u>FCGR2C</u>	I g G 受容体 I I c の F c フラグメント (遺伝子／偽遺伝子)	GC01P161551
<u>AKT1</u>	A K T セリン／トレオニンキナーゼ 1	GC14M104769

10

20

30

40

50

<u>BTK</u>	ブルトンチロシンキナーゼ	GC0XM101349	
<u>STAT1</u>	シグナル伝達性転写因子1	GC02M190964	
<u>EGF</u>	上皮増殖因子	GC04P109912	
<u>ITGB2</u>	インテグリンサブユニットベータ2	GC21M044885	
<u>CHUK</u>	保存されたヘリックスループーへリックス ユビキタスキナーゼ	GC10M100188	
<u>TLR2</u>	T o l l 様受容体2	GC04P153684	
<u>ICAM1</u>	細胞間接着分子1	GC19P010270	
<u>FYN</u>	F Y N 癌原遺伝子、S r c ファミリーチロシン キナーゼ	GC06M111660	
<u>PIK3R1</u>	ホスホイノシチドー3-キナーゼ調節サブユ ニット1	GC05P068215	10
<u>ITGA2B</u>	インテグリンサブユニットアルファ2b	GC17M044373	
<u>ITGB3</u>	インテグリンサブユニットベータ3	GC17P047254	
<u>ITGAV</u>	インテグリンサブユニットアルファV	GC02P186589	
<u>KRT18</u>	ケラチン18	GC12P052948	
<u>PTK2B</u>	タンパク質チロシンキナーゼ2ベータ	GC08P027311	
<u>CREB1</u>	C A M P 応答配列結合タンパク質1 ラディキシン	GC02P207529	
<u>RDX</u>	シグナル伝達性転写因子2	GC11M110134	
<u>STAT2</u>	核内受容体サブファミリー4グループAメン バー1	GC12M056341	
<u>NR4A1</u>	I g G 受容体I I b のF c フラグメント B 細胞リンカー	GC01P161663	
<u>FCGR2B</u>	N L R ファミリー1パインドメイン含有3	GC10M096191	20
<u>BLNK</u>	神経前駆細胞発現発生の下方制御4、E 3 ユビ キチンタンパク質リガーゼ	GC01P247415	
<u>NLRP3</u>	MSN	GC15M055826	
<u>NEDD4</u>	モエシン	GC0XP065588	
<u>MS4A1</u>	膜貫通4-ドメインA1	GC11P060474	
<u>LAT</u>	T 細胞活性化リンカー	GC16P028998	
<u>INPP5D</u>	イノシトールポリリン酸-5-ホスファター ゼD	GC02P233059	
<u>IL18R1</u>	インターロイキン18受容体1	GC02P102345	
<u>LCP2</u>	リンパ球細胞質タンパク質2	GC05M170246	
<u>S100A8</u>	S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質A8	GC01M153391	
<u>PTPRT</u>	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体T 型	GC20M042072	30
<u>SELPLG</u>	セレクチンPリガンド	GC12M108621	
<u>CD300A</u>	C D 3 0 0 a 分子	GC17P074466	
<u>CD244</u>	C D 2 4 4 分子	GC01M160799	
<u>SLAMF6</u>	S L A M ファミリーメンバー6	GC01M160454	
<u>ETV5</u>	E T S バリアント5	GC03M186046	
<u>IFNA1</u>	インターフェロンアルファ1	GC09P021441	
<u>NCR2</u>	神経細胞傷害性誘発受容体2	GC06P041303	
<u>RASA2</u>	R A S P 2 1 タンパク質活性化因子2	GC03P141487	
<u>LAT2</u>	T 細胞活性化リンカーファミリーメンバー2	GC07P074199	
<u>CD300C</u>	C D 3 0 0 c 分子	GC17M074544	
<u>CLEC1B</u>	C型レクチンドメインファミリー1メンバー B	GC12M011530	
<u>FCRL3</u>	F c 受容体様3	GC01M157674	40
<u>FHOD1</u>	ホルミン相同2ドメイン含有1	GC16M067263	
<u>TNIP3</u>	T N F A I P 3 相互作用タンパク質3	GC04M121131	
<u>PILRA</u>	対イムノグロビン(I m m u n o g l o b i n) 様2型受容体アルファ	GC07P100367	
<u>KLRF1</u>	キラー細胞レクチン様受容体F1	GC12P009827	
<u>SH2D4B</u>	S H 2 ドメイン含有4B	GC10P080914	
<u>TARM1</u>	T 細胞相互作用、骨髓性細胞受容体活性化1	GC19M054069	

【0084】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、免疫細胞に発現しない膜貫通タンパク質の細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、免疫細胞に発現するが細胞の活性化には関与しない膜貫通タンパク質の細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、免疫細胞活性化シグナルを伝達することができる細胞内ドメインであって、このシグナルを伝達することができないよう変異した細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは人工アミノ酸配列を含む。

【0085】

当業者には、細胞内ドメインがシグナル伝達以外の他の機能を有することが理解されよう。細胞内ドメインの長さ、電荷およびアミノ酸モチーフが、タンパク質および膜の動態の側面でもとりわけ、膜への適切な挿入、表面発現、タンパク質のフォールディング、タンパク質の再利用および寿命ならびに膜との移動を調節し得る。

10

【0086】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、少なくとも1個、3個、5個、10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、75個または100個のアミノ酸を含む。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、最大で10個、15個、20個、25個、30個、40個、45個、50個、75個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個または500個のアミノ酸を含む。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。

20

【0087】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは少なくとも1つの正荷電アミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、膜貫通ドメインの末端から5アミノ酸以内に少なくとも1つの正荷電アミノ酸を含む。正荷電アミノ酸には、リジン（K）、アルギニン（R）およびヒスチジン（H）ならびに正荷電合成アミノ酸が含まれる。当業者には、正電荷が膜内でのポリペプチドの適切な配向および安定した表面発現に役立ち得ることが理解されよう。

【0088】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、前記改变細胞の表面での検出可能なキメラ膜貫通ポリペプチドの発現を可能にするのに十分な長さおよび電荷のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、改变細胞表面でのキメラ膜貫通ポリペプチドの検出はFACSを含む。FACSはよく知られた技術であり、細胞透過化段階を含まない限り、タンパク質の表面発現を確認するのに用いることができる。いくつかの実施形態では、本発明のキメラ膜貫通ポリペプチドはタグをさらに含む。いくつかの実施形態では、タグは細胞外領域にある。いくつかの実施形態では、タグは細胞外領域にあり、このタグに対する抗体を用いて表面発現を確認する。いくつかの実施形態では、タグは細胞内領域にある。このタグは、受容体結合に干渉せず、安定した表面発現に干渉せず、細胞膜内のタンパク質の移動に干渉しないようにキメラタンパク質内の任意の位置に存在し得る。いくつかの実施形態では、タグはMy cタグおよび蛍光タグから選択される。いくつかの実施形態では、My cタグはアミノ酸配列EQKLISEEDL（配列番号6）を含む。いくつかの実施形態では、蛍光タグはGFPである。いくつかの実施形態では、GFPタグはeGFPである。いくつかの実施形態では、GFPタグは、アミノ酸配列MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTALKFICTTGKLPPWPVTLVTTLTYYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK（配列番号33）を含む。

30

【0089】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、改变細胞の膜内でのキメラ膜貫通ポリペ

40

50

プチドの移動を可能にするのに十分な長さおよび電荷のアミノ酸配列を含む。膜内のタンパク質の横方向の動きは、多数の因子、なかでもとりわけタンパク質の細胞質領域によって制御され得る。標的受容体の活性化には、標的細胞内のシナプスにキメラタンパク質がクラスター形成する必要がある。このため、キメラタンパク質が横方向の動きが可能であることを確認するのに活性化を用いることができる。さらに、タグを付けたタンパク質は、そのタグが蛍光性のものであれば、タグによって *in vivo* で可視化し得る。膜内でのキメラポリペプチドの横方向の動きを確認するのにライブフィールド顕微鏡法 (live field microscopy) および生細胞イメージングを用いることができる。

【0090】

10

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、小胞体 (ER) 保留シグナルもミトコンドリア標的化モチーフも含まない。ER保留シグナルは、通常長さがわずか3アミノ酸であり、リジンおよびアルギニンを含む短いモチーフであり、膜貫通タンパク質をER内に保留して細胞表面に発現させないようにするものである。ミトコンドリア標的化モチーフは、タンパク質を細胞膜ではなくミトコンドリアに標的化する短いアミノ酸配列である。本発明のポリペプチドは細胞表面に発現させなければならないため、ポリペプチドを細胞膜以外の細胞内位置および小器官に保留または標的化するモチーフおよびシグナルは避けるべきであるが、表面発現がある程度得られる限り、細胞内ドメインを用いてもよい。

【0091】

20

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、免疫細胞活性化シグナルを伝達することができるタンパク質以外の任意のタンパク質の未変形細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、CD3、CD28、OX-40 CD80、CD86 およびT細胞受容体 (TCR) 以外の任意のタンパク質の未変形細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、CD3、CD28、OX-40、CD80 およびCD86以外の任意のタンパク質の未変形細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、CD3以外の任意のタンパク質の未変形細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、CD3およびCD80以外の任意のタンパク質の未変形細胞内ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、CD3、CD28およびCD80以外の任意のタンパク質の未変形細胞内ドメインを含む。

30

【0092】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、免疫細胞活性化シグナルを伝達することができる任意のタンパク質の変異細胞内ドメインを含み、前記変異は、細胞内ドメインが活性化シグナルを伝達することができないようにするものである。いくつかの実施形態では、変異細胞内ドメインは、シグナル伝達ドメインの少なくとも1つのチロシン残基の変異を含む。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインはITAMドメインである。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインの全チロシン残基が変異している。いくつかの実施形態では、チロシンは、リン酸化されないアミノ酸に変異している。いくつかの実施形態では、チロシンはフェニルアラニンに変異している。

40

【0093】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、活性化シグナルを伝達することができないよう変異したCD3ゼータ鎖を含む。いくつかの実施形態では、CD3ゼータ鎖は、アミノ酸配列 RAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREYDVL EKKRARDPEMGGKQQRRNPQEGVYNALQDKMAEAYSEI GTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR (配列番号30) を含む。いくつかの実施形態では、変異CD3ゼータ鎖は、アミノ酸配列 RAKFSRSAETAANLQDPNQLFNELNLRGRRREEFDVLEKKRARDPEMGGKQQRRNPQEGVFNALQDKMAEAFSEIGTKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQTLAPR (配列番号31)

50

を含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、活性化シグナルを伝達することができないよう変異したCD80 (B7-1) 細胞質側末端を含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、TCRを共刺激することができないよう変異したCD80 (B7-1) 細胞質側末端を含む。いくつかの実施形態では、CD80細胞質側末端はアミノ酸配列 K C F C K H R S C F R R N E A S R E T N N S L T F G P E E L A L A E Q T V F L (配列番号32)を含む。いくつかの実施形態では、変異CD80細胞質側末端は、配列番号32のアミノ酸11~14にRRNEモチーフの変異を含む。いくつかの実施形態では、RRNEはAAAAに変異している。いくつかの実施形態では、変異CD80細胞質側末端は、細胞質側末端の少なくとも1つのセリンの変異を含む。いくつかの実施形態では、セリンはアラニンに変異している。いくつかの実施形態では、配列番号32の16位のセリンが変異している。いくつかの実施形態では、配列番号32の22位のセリンが変異している。いくつかの実施形態では、配列番号32の16位のセリンおよび22位のセリンが変異している。いくつかの実施形態では、RRNEモチーフおよび少なくとも1つのセリンが変異している。

10

【0095】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは不活性である。本明細書で使用される「不活性」ドメインは、いかなるシグナル伝達もすることができない。いくつかの実施形態では、不活性ドメインは一切機能を持たない。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインはいかなるシグナル伝達も不可能である。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、いかなるシグナル伝達能も消失するよう変異している。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、いかなる形でも免疫細胞活性化に寄与することができない。

20

【0096】

「胚性幹細胞」という用語は、ヒト胚の未分化内部塊に由来する幹細胞を指す。このような細胞は多能性であり、当業者に公知の手段によって任意の系列の細胞に分化する、または分化させることができある。hESCが未分化であると見なされるには、それが幹細胞マーカーを発現し続けるか、分化した細胞のマーカーを発現しないものでなければならない。

【0097】

30

ESC系は、NIH Human Embryonic Stem Cell Registryに、例えば、hESBGN-01、hESBGN-02、hESBGN-03、hESBGN-04 (BresaGen社) ; HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5、HES-6 (ES Cell International社) ; Mizz-hES1 (MizzMedi病院・ソウル国立大学) ; HSF-1、HSF-6 (カリフォルニア大学サンフランシスコ校) ; およびHI、H7、H9、HI3、H14 (ウィスコンシン大学卒業生研究財団 (WiCell研究所)) として記載されている。目的の幹細胞としては、他の靈長類由来の胚性幹細胞、例えばアカゲザル幹細胞およびマーモセット幹細胞なども挙げられる。幹細胞は、任意の哺乳動物種、例えば、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、げっ歯類、例えばマウス、ラット、ハムスター、靈長類などから入手され得る (Thomsonら (1998) Science 282: 1145 ; Thomsonら (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844 ; Thomsonら (1996) Biol. Reprod. 55: 254 ; Shambrottら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726, 1998)。ESCを培養すると通常、核・細胞質比が大きく、境界が明確で、核小体の目立つ平坦なコロニーとして増殖する。さらに、ESCは、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81およびアルカリホスファターゼを発現するが、SSEA-1は発現しない。ESCを作製し特徴を明らかにする方法の例が、例えば、米国特許第7,029,913号、同第5,843,780号および同第6,200,806号にみられる。国際公開第99/20741号、同第01/51616号および同第03/

40

50

0 2 0 9 2 0 号には、 h E S C を未分化の形態で増殖させる方法が記載されている。

【 0 0 9 8 】

「人工多能性幹細胞」または「 i P S C 」は、 P S C でない細胞（すなわち、 P S C よりも分化した細胞）に由来する多能性幹細胞（ P S C ）を意味する。 i P S C は、最終分化した細胞を含めた複数の異なる細胞型に由来するものであり得る。 i P S C は E S 細胞様の形態を有し、核・細胞質比が大きく、境界が明確で、核の目立つ平坦なコロニーとして増殖する。さらに、 i P S C は、特に限定されないが、アルカリホスファターゼ、 S S E A 3 、 S S E A 4 、 S o x 2 、 O c t 3 / 4 、 N a n o g 、 T R A 1 6 0 、 T R A 1 8 1 、 T D G F 1 、 D n m t 3 b 、 F o x D 3 、 G D F 3 、 C y p 2 6 a 1 、 T E R T および z f p 4 2 を含めた当業者に公知の 1 つまたは複数の重要な多能性マーカーを発現する。 i P S C を作製し特徴を明らかにする方法の例が、例えば、米国特許公開第 2 0 0 9 0 0 4 7 2 6 3 号、同第 2 0 0 9 0 0 6 8 7 4 2 号、同第 2 0 0 9 0 1 9 1 1 5 9 号、同第 2 0 0 9 0 2 2 7 0 3 2 号、同第 2 0 0 9 0 2 4 6 8 7 5 号および同第 2 0 0 9 0 3 0 4 6 4 6 号にみられる。 i P S C を作製するには一般に、体細胞に当該技術分野で公知の再プログラマ化因子（例えば、 O c t 4 、 S O X 2 、 K L F 4 、 M Y C 、 N a n o g 、 L i n 2 8 など）を供給して体細胞を再プログラマ化し多能性幹細胞にする。

【 0 0 9 9 】

P S C という用語は、由来に關係なく多能性幹細胞を指し、 P S C という用語は、 P S C のまた別の例である E S C および i P S C という用語ならびに胚性生殖幹細胞（ E G S C ）という用語を包含する。「胚性生殖幹細胞」（ E G S C ）、「胚性生殖細胞」または「 E G 細胞」は、生殖細胞および / または生殖前駆細胞、例えば始原生殖細胞、すなわち、精子および卵子になる細胞に由来する P S C を意味する。胚性生殖細胞（ E G 細胞）は、上記の胚性幹細胞と類似した特性を有するものと考えられる。 E G 細胞を作製し特徴を明らかにする方法の例が、例えば、米国特許第 7,153,684 号； M a t s u i , Y . ら (1992) C e l l 70 : 841 ; S h a m b l o t t , M . ら (2001) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 98 : 113 ; S h a m b l o t t , M . ら (1998) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 95 : 13726 ; および K o s h i m i z u , U . ら (1996) D e v e l o p m e n t , 122 : 1235 にみられる。 P S C は樹立された細胞系の形態であってよく、これらは、一次胚組織から直接入手しても、あるいは体細胞から誘導してもよい。 P S C は、本明細書に記載される方法の改変細胞であってもよい。

【 0 1 0 0 】

標的受容体

いくつかの実施形態では、標的受容体は、成長ホルモン受容体（ G H R ）、グルカゴン様ペプチド 1 受容体（ G L P 1 R ）、チロシン受容体キナーゼ B / トロポミオシン受容体キナーゼ B (T r k B) およびプログラム細胞死タンパク質 1 (P D - 1) から選択される。

【 0 1 0 1 】

いくつかの実施形態では、標的受容体は T r k B であり、標的受容体結合ドメインは、アミノ酸配列 D V V M T Q L P L S L P V I L G D Q A S I S C R S S Q S L I H S N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P F T F G S G T K L E I K R A (配列番号 10) を含む V L を含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は T r k B であり、標的受容体結合ドメインは、アミノ酸配列 Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y D I N W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P R D G S I K F N E K F K G K A T L T V D T S S S T A Y M E L H S L T S E D S A A Y F C A R R G R L L L Y G F A Y W G Q G T L V T V S A (配列番号 11) を含む V H を含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は T r k B であり、標的受容体結合ドメインは配列番号 10 と配列番号 11 とを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は T r k B であり、標的受容体結合ドメインは、アミノ酸配列 D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S

10

20

30

40

50

I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P N L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q G T H V P Y T F G G G T K L E I K R A (配列番号12)を含むVLを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体はTrkBであり、標的受容体結合ドメインは、アミノ酸配列Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V T L S C K A S G Y T F T D Y E M H W V K Q T P V H G L E W I G T I D P E T A G T A Y N N Q K F K G K A I L T A G K S S S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T G V T T W F A Y W G Q G T L V T V S A (配列番号13)を含むVHを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体はTrkBであり、標的受容体結合ドメインは配列番号12と配列番号13とを含む。

【0102】

10

いくつかの実施形態では、標的受容体はTrkBであり、標的受容体結合ドメインは、配列番号10、配列番号11、配列番号12および配列番号13のいずれか1つのものの類似体を含む。いくつかの実施形態では、標的受容体はTrkBであり、標的受容体結合ドメインは、配列番号10、配列番号11、配列番号12および配列番号13のいずれか1つのもののホモログを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体はTrkBであり、標的受容体結合ドメインは、配列番号10、配列番号11、配列番号12および配列番号13のいずれか1つのものと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、TrkBと結合することができる。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。

【0103】

20

本明細書で使用される「類似体」という用語は、本発明のポリペプチドと類似しているが同一ではなく、依然として標的受容体と結合することができる、ポリペプチドを指す。類似体は、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列になる欠失または変異を有し得る。本発明のポリペプチドの類似体はいずれも依然として、標的受容体と結合することができることが理解されるべきである。さらに、類似体は、本発明のポリペプチドのフラグメントと類似したものであってよいが、そのような場合、フラグメントは、本発明のポリペプチドの少なくとも50個の連続するアミノ酸を含むものでなければならない。いくつかの実施形態では、類似体またはホモログは、本明細書に記載されるマウスの抗体または抗原結合フラグメントのヒト類似体またはヒトホモログである。

【0104】

30

いくつかの実施形態では、標的受容体はTrkBであり、キメラ膜貫通ポリペプチドは、アミノ酸配列D V V M T Q L P L S L P V I L G D Q A S I S C R S S Q S L I H S N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P F T F G S G T K L E I K R A G G S S R S S S G G G G S G G G Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y D I N W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P R D G S I K F N E K F K G K A T L T V D T S S S T A Y M E L H S L T S E D S A A Y F C A R R G R L L L Y G F A Y W G Q G T L V T V S A X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L F N E L N L G R R E E F D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V F N A L Q K D K M A E A F S E I G T K G E R R R G K G H D G L F Q G L S T A T K D T F D A L H M Q T L A P R (配列番号18)またはD V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P N L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q G T H V P Y T F G G G T K L E I K R A G G S S R S S S G G G G S G G G G Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V T L S C K A S G Y T F T D Y E M H W V K Q T P V H G L E W I G T I D P E T A G T A Y N N Q K F K G K A I L T A G K S S S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T G V T T W F A Y W G Q G T L V T V S A X X A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P T T T P A P R P P T

40

50

P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D L C Y L L D G I L
 F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L F N E L N L G R
 R E E F D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V F N A L Q K D K M
 A E A F S E I G T K G E R R R G K G H D G L F Q G L S T A T K D T F D A L H M Q
 T L A P R E G R G S L L T C G D V E E N P G P M V S K G E E L F T G V V P I L V
 E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P
 W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R
 T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I
 L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V
 Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D
 H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K (配列番号 20)を含む。 10

【0105】

いくつかの実施形態では、標的受容体は G L P 1 R であり、標的受容体結合ドメインは、アミノ酸配列 Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S R V T Y M H W Y Q Q R S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W G N N P Q Y T F G G G T R L E I K R (配列番号 14)を含む V L を含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は G L P 1 R であり、標的受容体結合ドメインは、アミノ酸配列 Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G T G V G W I R Q P S G K G L E W L S H I W W D D V K R Y N P A L K S R L T I S R D T S Y S Q V F L R I A S V D T A D T A T Y Y C A R I L D G T G P M D Y W G Q G T S V T V S S (配列番号 15)を含む V H を含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は G L P 1 R であり、標的受容体結合ドメインは配列番号 14 と配列番号 15 とを含む。 20

【0106】

いくつかの実施形態では、標的受容体は G L P 1 R であり、標的受容体結合ドメインは、配列番号 14 および配列番号 15 のいずれか一方のものの類似体を含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は G L P 1 R であり、標的受容体結合ドメインは、配列番号 14 および配列番号 15 のいずれか一方のもののホモログを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は G L P 1 R であり、標的受容体結合ドメインは、配列番号 14 および配列番号 15 のいずれか一方と少なくとも 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 7 % または 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、 G L P 1 R と結合することができる。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。 30

【0107】

いくつかの実施形態では、標的受容体は G L P 1 R であり、キメラ膜貫通ポリペプチドは、アミノ酸配列 I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S R V T Y M H W Y Q Q R S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W G N N P Q Y T F G G G T R L E I K R G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G T G V G W I R Q P S G K G L E W L S H I W W D D V K R Y N P A L K S R L T I S R D T S Y S Q V F L R I A S V D T A D T A T Y Y C A R I L D G T G P M D Y W G Q G T S V T V S S X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L F N E L N L G R R E E F D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V F N A L Q K D K M A E A F S E I G T K G E R R R G K G H D G L F Q G L S T A T K D T F D A L H M Q T L A P R (配列番号 22)を含む。 40

【0108】

いくつかの実施形態では、標的受容体は G H R であり、標的受容体結合ドメインは成長ホルモン (G H) を含む。いくつかの実施形態では、 G H はヒト G H (h G H) である。いくつかの実施形態では、 h G h は、アミノ酸配列 E G S A D Y K D H D G D Y K D H D 50

IDEYKDDDDKFPТИPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFTDTYQEF
 EEA YIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKS
 NLELLRISLLIQSWLEPVQFLRSVVFANSLVYGA S DSNVY
 DLLKDLEEGIQTLMGRL EDGSPRTGQIFKQTYSKFDTN SH
 NDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQC RSVEGSCGF
 (配列番号16)を含む。いくつかの実施形態では、GHRは、GHRと結合することができるhGHのフラグメント、ホモログ、類似体または誘導体である。いくつかの実施形態では、GHRは、配列番号16と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0109】

10

本明細書で使用される「誘導体」という用語は、本発明のポリペプチドをベースとし、依然として標的受容体と結合することができる、任意のポリペプチドを指す。誘導体は、単なるポリペプチドのフラグメントであるわけでも、置き換えられた、または除去されたアミノ酸を有するもの(類似体)でもなく、むしろ、ポリペプチドに施された翻訳後修飾などの追加の修飾を有し得る。さらに、誘導体は本発明のポリペプチドのフラグメントの誘導体であってもよいが、そのような場合、フラグメントは、本発明のポリペプチドの少なくとも50個の連続するアミノ酸を含むものでなければならない。いくつかの実施形態では、本発明のキメラ膜貫通ポリペプチドは、本明細書に記載されるポリペプチドの誘導体である。いくつかの実施形態では、誘導体はポリペプチドのグリコシル化を含む。当業者には、安定した表面発現にポリペプチドのグリコシル化が必要であり得ることが理解されよう。

【0110】

20

いくつかの実施形態では、標的受容体はGHRであり、キメラ膜貫通ポリペプチドは、アミノ酸配列EGSADYKDH DGDYKDHDIDYKDDDDKFPТИPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFTDTYQEFEEA YIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKS NLELLRISLLIQSWLEPVQFLRSVVFANSLVYGA S DSNVY DLLKDLEEGIQTLMGRL EDGSPRTGQIFKQTYSKFDTN SH NDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQC RSVEGSCGF IMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRP
 EASRPAAGGAVHTRGLDLCYLLDGILFIFYGVIIITALYLRA KFSRSAETAANLQDPNQLFNELN LGRREEFDVLEKKRARD PEMGGKQQRRRN P QEGVFNALQKDKMAEA FSEIGTKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQTLAPR(配列番号24)を含む。

30

【0111】

40

いくつかの実施形態では、標的受容体はPD-1であり、標的受容体結合ドメインは、アミノ酸配列EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRASKGVSTSGY SYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLES GVPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGG T KVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C(配列番号25)を含むVLを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体はPD-1であり、標的受容体結合ドメインは、アミノ酸配列QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYM YWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDS STTTAYMELKSLQFD D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F

50

L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q
 F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
 N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
 Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
 P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N
 H Y T Q K S L S L S L G K (配列番号 26) を含む V H を含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は P D - 1 であり、標的受容体結合ドメインは配列番号 25 と配列番号 26 とを含む。

【0112】

いくつかの実施形態では、標的受容体は P D - 1 であり、標的受容体結合ドメインは、配列番号 25 および配列番号 26 のいずれか一方のものの類似体を含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は P D - 1 であり、標的受容体結合ドメインは、配列番号 25 および配列番号 26 のいずれか一方のもののホモログを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体は P D - 1 であり、標的受容体結合ドメインは、配列番号 25 および配列番号 26 のいずれか一方と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97% または 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、P D - 1 と結合することができる。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。

【0113】

いくつかの実施形態では、標的受容体は P D - 1 であり、キメラ膜貫通ポリペプチドは、アミノ酸配列 Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y
 M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D
 S S T T T A Y M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G
 T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F
 P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S
 S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E
 F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V
 Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W
 L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P
 S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H
 N H Y T Q K S L S L S L G K G G S S R S S S S G G G G S G G G E I V L T Q S P
 A T L S L S P G E R A T L S C R A S K G V S T S G Y S Y L H W Y Q Q K P G Q A P
 R L L I Y L A S Y L E S G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A
 V Y Y C Q H S R D L P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q
 L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
 E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P
 V T K S F N R G E C X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H F V P V F L P
 A K P T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T
 R G L D L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q
 D P N Q L F N E L N L G R R E E F D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P
 Q E G V F N A L Q K D K M A E A F S E I G T K G E R R R G K G H D G L F Q G L S
 T A T K D T F D A L H M Q T L A P R (配列番号 28) を含む。

【0114】

いずれの配列の X X も、これらのアミノ酸がキメラタンパク質のコード配列内の制限酵素部位によるものであり、いかなる機能的役割もないため、任意の 2 つのアミノ酸であっても、いずれのアミノ酸でなくてもよい。いくつかの実施形態では、X X はバリン - アスパラギン酸である。

【0115】

いくつかの実施形態では、本発明のキメラ膜貫通ポリペプチドは、その N 末端にリーダーペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、リーダーペプチドは、配列 M D M R

10

20

30

40

50

V P A Q L L G L L L W L S G A R C Q (配列番号2)を含むか、これよりなるものである。

【0116】

いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、配列番号18、20、22、24または28のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%の相同性または同一性を有し、免疫細胞活性化シグナルを伝達することができない。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。いくつかの実施形態では、キメラ膜貫通ポリペプチドは、配列番号18、20、22、24または28のいずれか1つのものの誘導体または類似体である。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。

10

【0117】

医薬組成物

また別の態様により、本発明のいずれかの改变細胞と、薬学的に許容される担体、賦形剤または補助剤とを含む、医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、治療有効量の本発明の改变細胞を含む。

【0118】

本明細書で使用される「担体」、「補助剤」または「賦形剤」という用語は、活性な物質ではない医薬組成物の任意の成分を指す。本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という用語は、無毒性で不活性な固体、半固体液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料、任意のタイプの製剤助剤、または生理食塩水などの単なる無菌水性媒体を指す。薬学的に許容される担体としての役割を果たし得る材料のいくつかの例として、ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖、コーンスタークおよびバレイショデンプンなどのデンプン、セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなど；トラガント末；麦芽、ゼラチン、タルク；カカオ脂および坐剤ワックスなどの賦形剤；油、例えばラッカセイ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油など；プロピレングリコールなどのグリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル、寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；無発熱物質水；等張食塩水、リンガー溶液；エチルアルコールおよびリン酸緩衝液ならびに医薬製剤に使用される無毒性で適合性のあるその他の物質がある。これに関連する適切な薬学的に許容される担体、賦形剤および希釈剤は当業者に周知であり、例えば、Merck Index, 第13版, Budavariら編, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. (2001)；CTFA (Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association) International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 第10版 (2004)；および「Inactive Ingredient Guide」, U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Office of Management (以上、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているものなどがある。本発明の組成物に有用な薬学的に許容される賦形剤、担体および希釈剤の例としては、蒸留水、生理的食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、ハンクス液およびDMSOが挙げられる。これらの追加の不活性成分ならびに効果的な製剤および投与方法は当該技術分野で周知であり、標準的なテキスト、例えばGoodman and Gillman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第8版, Gillmanら編, Pergamon Press (1990)；Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing社, Easton, Pa. (1990)；およびRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, Lippincott Wi

20

30

40

50

Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., (2005) (それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる)などに記載されている。本明細書に記載される組成物は、人工的に作製した構造物、例えばリポソーム、ISCOMS、徐放粒子およびペプチドまたはポリペプチドの血清中での半減期を増大させるその他の媒体などに含まれていてもよい。リポソームは、乳剤、泡状剤、ミセル、不溶性単分子膜、液晶、リン脂質分散剤、ラメラ層などを含む。本明細書に記載されるペプチドとともに使用するリポソームは、一般に中性および負荷電リン脂質とコレステロールなどのステロールとを含む標準的な小胞形成脂質から形成される。脂質の選択は一般に、リポソームの大きさおよび血中での安定性などの考慮事項によって決まる。リポソームの調製には、例えば、Coligan, J. Eら、Current Protocols in Protein Science, 1999, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに概説されているように、様々な方法を用いることができ、また米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号および同第5,019,369号も参照されたい。10

【0119】

担体は、本明細書に示される医薬組成物を全体で約0.1重量%～約99.99999重量%含み得る。

【0120】

「治療有効量」という用語は、哺乳動物の疾患または障害を治療するのに有効な細胞の数を指す。「治療有効量」という用語は、治療または予防による所望の結果を得るのに必要な用量および期間で有効な量を指す。正確な剤形およびレジメンについては、医師により患者の状態に応じて決定され得る。20

【0121】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも100万個、200万個、300万個、500万個、1,000万個、5,000万個または10,000万個の免疫細胞を含む。それぞれの可能性が本発明の個々の実施形態を表す。

【0122】

治療方法

いくつかの実施形態では、準備することは、対象から初代細胞を抽出することを含む。いくつかの実施形態では、対象から初代細胞を抽出することは、血液試料または血清試料を採取することを含む。いくつかの実施形態では、対象から初代細胞を抽出することは、リンパ試料を採取することを含む。いくつかの実施形態では、初代細胞は、キットを用いた単離である。このようなキットは当該技術分野では一般的なものであり、特に限定されないが、Miltenyi細胞単離および細胞分離キット、CD4+磁気ビーズキット、CD8+磁気ビーズキットなどがこれに含まれる。いくつかの実施形態では、抗体コンジュゲートカラムを用いて初代細胞を単離する。いくつかの実施形態では、FACS分取を用いて初代細胞を単離する。細胞分取には、標的細胞を同定する任意の適切なFACS抗体を使用し得る。30

【0123】

標的細胞での異種タンパク質の発現は当該技術分野で周知である。本発明キメラ膜貫通タンパク質を細胞に発現させる任意の方法を用いて本発明の方法を実施し得る。40

【0124】

本明細書で使用される「発現」という用語は、前記遺伝子産物の翻訳を含めたタンパク質の生合成を指す。したがって、タンパク質の発現は、核酸フラグメントの転写（例えば、mRNAもしくはその他の機能性RNAが生じる転写）および/またはRNAから前駆体タンパク質もしくは成熟タンパク質（ポリペプチド）への翻訳を指し得る。いくつかの実施形態では、発現とは細胞表面での発現のことである。いくつかの実施形態では、発現とは、リーダーペプチドを含む前駆体タンパク質の発現、そのペプチドの切断および成熟タンパク質の表面発現のことである。

【0125】

50

細胞内での異種転写物の発現は当業者に周知である。それは、多数ある方法のなかでも特に、トランسفエクション、ウイルス感染または細胞のゲノムの直接改変によって実施することができる。いくつかの実施形態では、異種転写物は、プラスミドなどの発現ベクターまたはウイルスベクター内にある。

【0126】

ベクター核酸配列には一般に、少なくとも細胞内で増殖するための複製起点と、任意選択で追加のエレメント、例えば異種ポリヌクレオチド配列、発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー）、選択マーカー（例えば抗生物質耐性）、ポリアデニン配列が含まれている。

【0127】

ベクターは、非ウイルス法またはウイルス法により送達するDNAプラスミドであり得る。ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターまたはポックスウイルスベクターであり得る。プロモーターは哺乳動物細胞内で活性なものであり得る。プロモーターはウイルスプロモーターであり得る。

【0128】

いくつかの実施形態では、異種転写物はプロモーターと作動可能に連結されている。「作動可能に連結されている」という用語は、目的のヌクレオチド配列が、そのヌクレオチド配列が（例えば、*in vitro*の転写/翻訳系で、またはベクターを宿主細胞に導入する場合は宿主細胞内で）発現できるよう1つまたは複数の調節エレメントと連結されていることを意味するものとする。

【0129】

いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション（例えば、*From*ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5824 (1985) に記載されている）、熱ショック、ウイルスベクターによる感染、微小なビーズもしくは粒子のマトリックス内もしくは表面に核酸を含む微小粒子の高速衝撃による貫通（*Klein*ら, *Nature* 327.70-73 (1987)）および/またはこれらに類似したものを含めた標準的な方法によりベクターを細胞内に導入する。

【0130】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、RNAポリメラーゼ、すなわち、RNAポリメラーゼIIの開始部位付近にクラスター化した転写制御モジュール群を指す。プロモーターは別個の機能的モジュールからなり、各モジュールは約7~20bpのDNAからなり、転写活性化因子またはリプレッサータンパク質の1つまたは複数の認識部位を含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、核酸配列はRNAポリメラーゼII (RNAP II) およびP01 II) によって転写される。RNAP IIは真核細胞にみられる酵素である。この酵素は、DNAの転写を触媒してmRNAならびに大部分のsnRNAおよびマイクロRNAの前駆体を合成する。

【0132】

いくつかの実施形態では、哺乳動物発現ベクターとしては、特に限定されないが、*In vitro*社から入手可能なpCDNA3、pCDNA3.1(±)、pGL3、pZeosV2(±)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81、Promega社から入手可能なpCI、Stratagene社から入手可能なpMBac、pPbac、pBKR-SVおよびpBKC-MV、Clontech社から入手可能なpTRESならびにその誘導体が挙げられる。

【0133】

いくつかの実施形態では、レトロウイルスなどの真核ウイルスに由来する調節エレメン

10

20

30

40

50

トを含む発現ベクターを本発明に使用する。SV40ベクターとしては、pSVT7およびpMT2が挙げられる。いくつかの実施形態では、ウシパピローマウイルスに由来するベクターとしてはpBV-1MTHAが挙げられ、エプスタインバーウイルスに由来するベクターとしてはpHEBOおよびp205が挙げられる。その他の例示的ベクターとしては、pMSG、pAV009/A+、pMTO10/A+、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVEおよびSV-40初期プロモーター、SV-40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーターまたは真核細胞での発現に効果的であることが示されているその他のプロモーターの指令下でタンパク質を発現させる任意の他のベクターが挙げられる。

10

【0134】

いくつかの実施形態では、水平感染および標的化特異性などの利点が得られる組換えウイルスベクターを *in vivo* 発現に使用する。一実施形態では、水平感染は、例えばレトロウイルスの生活環に本来みられるものであり、単一の感染細胞から多数の子孫ビリオンが生じて出芽し、隣接する細胞に感染する過程である。一実施形態では、その結果、大部分が最初に元のウイルス粒子に感染していなかった広い領域が短時間で感染する。一実施形態では、水平に伝播することができないウイルスベクターが生じる。一実施形態では、所望の目的が特定の遺伝子を局所的な数の標的細胞にのみ導入することである場合、この特徴が有用なものであり得る。

20

【0135】

本発明の発現ベクターを細胞内に導入するのに様々な方法を用いることができる。このような方法については、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Changら, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vegaら, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Use, Butterworths, Boston Mass. (1988) および Gilboaら [Biotechniques 4(6): 504-512, 1986] に全般的に記載されており、例えば、安定な、または一過性のトランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションおよび組換えウイルスベクターによる感染がこれに含まれる。さらに、ポジティブ・ネガティブ選択法については米国特許第5,464,764号および同第5,487,992号を参照されたい。

30

【0136】

本発明の発現構築物は、(キメラ膜貫通ポリペプチドをコードする)挿入するコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含む以外に、発現するポリペプチドの安定性、產生、精製、収率または活性を最適化するよう操作された配列も含み得ることが理解されよう。

40

【0137】

また別の態様により、本発明のキメラ膜貫通タンパク質をコードする人工発現ベクターが提供される。

【0138】

本明細書で使用される「投与すること」、「投与」という用語およびこれに類する用語は、妥当な医療行為において活性薬剤を含有する組成物を治療効果がえられるように対象に送達する任意の方法を指す。その他の適切な投与経路としては、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、頭蓋内、脳室内、髄腔内または腹腔内を挙げ得る。当業者には、免疫細胞にはホーミング能があるため、局所的な補給による治療にも全身投与で十分であることが理解

50

されよう。いくつかの実施形態では、投与を疾患部位に直接実施する。このような場合の非限定的な例には、脳疾患に対する頭蓋内投与、皮膚疾患に対する局所投与および筋疾患に対する筋肉内投与がある。

【0139】

投与する用量は、レシピエントの年齢、健康状態および体重、併用治療の種類（実施している場合）、治療頻度ならびに所望の効果の性質に左右される。

【0140】

いくつかの実施形態では、改変細胞を対象に投与する。いくつかの実施形態では、治療有効量の改変細胞を対象に投与する。いくつかの実施形態では、治療有効量の改変細胞を含む医薬組成物を対象に投与する。

10

【0141】

いくつかの実施形態では、ある標的分子が関連していることが明らかにされている任意の疾患、障害または病態であって、その分子の活性化または阻害が正の効果を示すことが明らかにされている疾患、障害または病態を治療するのに本発明の方法を用い得る。いくつかの実施形態では、正の効果は、上記の疾患、障害または病態の症状の何らかの改善である。いくつかの実施形態では、正の効果は、症状の重症度または持続期間の何らかの減少である。いくつかの実施形態では、正の効果は、対象の生活の質の何らかの改善である。

【0142】

いくつかの実施形態では、標的受容体はTrkBであり、疾患または障害は神経疾患または神経障害である。いくつかの実施形態では、神経疾患または神経障害は、アルツハイマー病、うつ病、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、癲癇および脳腫瘍から選択される。いくつかの実施形態では、神経疾患または神経障害は、脳由来神経栄養因子（BDNF）に関連する疾患または障害である。いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは抗TrkB抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、TrkB抗原結合ドメインは、市販の抗TrkB抗体に由来するものである。

20

【0143】

いくつかの実施形態では、標的受容体はGLP1Rであり、疾患または障害は、代謝疾患もしくは代謝障害または心血管疾患もしくは心血管障害である。いくつかの実施形態では、代謝疾患または代謝障害は、糖尿病、肥満、糖原病、パーキンソン病およびミトコンドリア性ミオパチーから選択される。いくつかの実施形態では、代謝疾患または代謝障害はミトコンドリア疾患またはミトコンドリア性障害である。いくつかの実施形態では、代謝疾患はグルコース恒常性の疾患である。いくつかの実施形態では、心血管疾患または心血管障害は、脳卒中、心筋梗塞、心虚血および冠動脈疾患から選択される。いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは抗GLP1R抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、GLP1R抗原結合ドメインは、市販の抗GLP1R抗体に由来するものである。

30

【0144】

いくつかの実施形態では、標的受容体はGHRであり、疾患または障害は成長疾患または成長障害である。いくつかの実施形態では、成長疾患または成長障害は、先端巨大症、成長ホルモン分泌不全症、癌、ターナー症候群およびプラダーリ・ウィリー症候群から選択される。いくつかの実施形態では、成長疾患または成長障害は、hGHの投与により治療することができる任意の疾患または障害である。いくつかの実施形態では、hGHで治療することができる疾患は筋疾患である。いくつかの実施形態では、筋疾患は筋消耗性疾患および筋ジストロフィーから選択される。いくつかの実施形態では、筋消耗性疾患は、多発性硬化症、悪液質およびサルコペニアから選択される。いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーは、デシェンヌ型筋ジストロフィー（Deschene's muscular dystrophy）、ベッカー型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィーおよび顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーから選択される。いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインはGHを含む。いくつかの実施形態では、GHはhGHである。

40

【0145】

50

いくつかの実施形態では、標的受容体は P D - 1 であり、疾患または障害は、免疫疾患もしくは免疫障害または癌である。いくつかの実施形態では、免疫疾患または免疫障害は、狼瘡、関節リウマチ、乾癬、グレーブス病、免疫介在性炎症およびセリアック病から選択される。いくつかの実施形態では、疾患または障害は癌であり、標的受容体結合ドメインは P D - 1 アンタゴニストを含む。いくつかの実施形態では、標的受容体結合ドメインは抗 P D - 1 抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、 P D - 1 抗原結合ドメインは、市販の抗 P D - 1 抗体に由来するものである。

【 0 1 4 6 】

参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 9 1 1 9 1 0 号、同第 2 0 1 4 / 0 7 7 5 0 7 4 号、同第 2 0 1 3 / 0 6 5 0 4 6 9 号、同第 2 0 1 5 0 9 6 5 8 4 1 号、同第 2 0 0 9 / 0 3 9 2 2 4 4 号、同第 2 0 0 7 / 0 3 7 4 5 6 9 号ならびに米国特許第 9 , 3 5 8 , 2 8 7 号；同第 8 , 5 0 1 , 6 9 3 号および同第 9 , 3 2 8 , 1 5 4 号には、 G L P 1 - R 可変重鎖および軽鎖の供給源として使用し得る G L P 1 - R アゴニスト抗体の非限定的な例が記載されている。

【 0 1 4 7 】

参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 5 1 6 1 8 7 号、同第 2 0 0 8 / 0 6 8 2 5 0 5 号、同第 2 0 1 0 / 0 6 9 7 9 8 3 号および米国特許第 7 , 4 5 9 , 1 5 6 号；同第 7 , 7 5 0 , 1 2 2 号；同第 8 , 6 4 2 , 0 3 5 号；同第 9 , 0 2 8 , 8 2 0 号には、 T r k B 可変重鎖および軽鎖の供給源として使用し得る T r k B アゴニスト抗体の非限定的な例が記載されている。

【 0 1 4 8 】

参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 7 , 4 2 7 , 6 6 5 号；同第 7 , 7 2 2 , 8 6 8 号；同第 7 , 5 9 5 , 0 4 8 号；同第 7 , 4 8 8 , 8 0 2 号；同第 8 , 0 0 8 , 4 4 9 号；同第 7 , 9 4 3 , 7 4 3 号；同第 9 , 1 8 1 , 3 4 2 号および同第 8 , 6 1 7 , 5 4 6 号には、可変重鎖および軽鎖の供給源として使用し得る P D - 1 または P D - L 1 アゴニスト抗体の非限定的な例が記載されている。

【 0 1 4 9 】

参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 7 , 5 9 2 , 0 0 7 号；同第 7 , 1 0 9 , 0 0 3 号；同第 7 , 0 3 4 , 1 2 1 号；同第 7 , 6 0 5 , 2 3 8 号；同第 7 , 4 5 2 , 5 3 5 号には、 C T L A 4 可変重鎖および軽鎖の供給源として使用し得る C T L A 4 アゴニスト抗体の非限定的な例が記載されている。

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、改变細胞を部分的に活性化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、部分的活性化は、ホーミング能および／または標的細胞とのシナプス形成能を含む。いくつかの実施形態では、部分的活性化は、エフェクター機能活性化および／または細胞傷害性の活性化を含まない。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、標的細胞でのシグナル伝達の調節を判定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、標的受容体の調節を判定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、改变細胞が細胞傷害性ではないことを判定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、改变免疫細胞が活性化されていないことを判定することをさらに含む。

【 0 1 5 2 】

いくつかの実施形態では、判定することは、少なくとも 1 つのシグナル伝達タンパク質のリン酸化を判定することを含む。いくつかの実施形態では、判定することは、標的受容体のシグナル伝達ドメイン内の残基のリン酸化を判定することを含む。いくつかの実施形態では、判定することは、シグナル伝達カスケードのタンパク質のシグナル伝達ドメイン内の残基のリン酸化を判定することを含む。いくつかの実施形態では、リン酸化残基はチロシン残基である。いくつかの実施形態では、判定することは、標的受容体の下流標的のレベルの上方制御を判定することを含む。いくつかの実施形態では、判定することは、標

10

20

30

40

50

的受容体の下流標的のレベルの下方制御を判定することを含む。

【0153】

本明細書で数値とともに使用される「約」という用語は記載数値の±10%を指す。例えば、長さ約1000ナノメートル(nm)は長さ1000nm±100nmを指す。

【0154】

本明細書および添付の請求項で使用される単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上明らかに別の意味を表す場合を除き、複数形の指示対象を包含することが留意される。したがって、例えば、「ポリヌクレオチド(a polynucleotide)」に言及する場合、複数のこのようなポリヌクレオチドが包含され、「ポリヌクレオチド(the polynucleotide)」に言及する場合、1つまたは複数のポリペプチドおよび当業者に公知のその等価物への言及などが包含される。さらに、請求項はあらゆる任意選択の要素を除外するよう起草され得ることが留意される。したがって、この記述は、請求項の要素の記載に関連して「単に」、「~のみ」などの排他的用語を使用する、または「消極的」限定を用いるための先行詞としての役割を果たすことを意図するものではない。

10

【0155】

「A、BおよびCなどのうち少なくとも1つ」に類似した慣用的表現が使用される場合、このような構文は一般に、当業者であればその慣用的表現を理解するであろう(例えば、「A、BおよびCのうち少なくとも1つのものを有するシステム」には、限定されないが、Aを単独で、Bを単独で、Cを単独で、AとBをともに、AとCをともに、BとCをともに、および/またはAとBとCをともに有するシステムなどが包含され得る)という意味で意図されるものである。当業者にはさらに、説明、請求項または図面を問わず、2つ以上の代替用語を示す離接語および/または離接句は実質的にいずれも、その用語のうちの1つを、その用語のうちのいずれかを、またはその用語をともに含む可能性を企図するものと理解するべきであることが理解されよう。例えば、「AまたはB」という句は、「A」、「B」または「AおよびB」の可能性を含むことが理解されよう。

20

【0156】

明確にするため別個の実施形態との関連で記載される本発明の特定の特徴が、単一の実施形態の形で組み合わさってもたらされる場合もあることが理解される。これとは逆に、簡潔にするため単一の実施形態との関連で記載される本発明の様々な特徴が、別個に、または任意の適切な部分的組合せの形でもたらされることもある。本発明に属する実施形態のあらゆる組合せが、ありとあらゆる組合せが個別にかつ明確に開示された場合と同様に、本発明に具体的に包含され本明細書に開示される。さらに、様々な実施形態およびその要素のあらゆる部分的組合せについても、ありとあらゆる部分的組合せが個別にかつ明確に本明細書に開示された場合と同様に、本発明に具体的に包含され本明細書に開示される。

30

【0157】

限定することを意図するものでない以下の実施例を検討すれば、本発明のさらなる目的、利点および新規な特徴が当業者に明らかになるであろう。さらに、以下の実施例では、上に詳述され、のちの請求項の節で特許請求される本発明の様々な実施形態および態様がそれぞれ実験的に裏付けられる。

40

【0158】

以下の実施例では、上に詳述され、のちの請求項の節で特許請求される本発明の様々な実施形態および態様が実験的に裏付けられる。

【0159】

(実施例)

本明細書で用いる命名法および本発明に用いる実験法には一般に、分子技術、生化学的技術、微生物学的技術および組換えDNA技術が含まれる。このような技術は文献で十分に説明されている。例えば、「Molecular Cloning: A laboratory Manual」, Sambrookら(1989); 「Current Protocols in Molecular Biology」第I~III巻, Ausube

50

l , R . M . 編 (1 9 9 4) ; Ausubelら , 「 C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y 」 , John Wiley and Sons , Baltimore , Maryland (1 9 8 9) ; Perbal , 「 A P r a c t i c a l G u i d e t o M o l e c u l a r C l o n i n g 」 , John Wiley & Sons , New York (1 9 8 8) ; Watsonら , 「 R e c o m b i n a n t D N A 」 , S c i e n t i f i c A m e r i c a n B o o k s , New York ; Birrenら (編) 「 G e n o m e A n a l y s i s : A L a b o r a t o r y M a n u a l S e r i e s 」 , 第 1 ~ 4 卷 , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , New York (1 9 9 8) ; 米国特許第 4 , 6 6 6 , 8 2 8 号 ; 同第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号 ; 同第 4 , 8 0 1 , 5 3 1 号 ; 同第 5 , 1 9 2 , 6 5 9 号および同第 5 , 2 7 2 , 0 5 7 号に記載されている方法論 ; 「 C e l l B i o l o g y : A L a b o r a t o r y H a n d b o o k 」 , 第 I ~ I I I 卷 , C e l l i s , J . E . 編 (1 9 9 4) ; Freshney 著 「 C u l t u r e o f A n i m a l C e l l s - A M a n u a l o f B a s i c T e c h n i q u e 」 , Wiley - L i s s , N . Y . (1 9 9 4) , 第 3 版 ; 「 C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y 」 第 I ~ I I I 卷 , Coligan J . E . 編 (1 9 9 4) ; S t i t e s ら (編) , 「 B a s i c a n d C l i n i c a l I m m u n o l o g y 」 (第 8 版) , Appleton & Lange , Norwalk , C T (1 9 9 4) ; M i s h e l l および Shiigi (編) , 「 S t r a t e g i e s f o r P r o t e i n P u r i f i c a t i o n a n d C h a r a c t e r i z a t i o n - A L a b o r a t o r y C o u r s e M a n u a l 」 C S H L P r e s s (1 9 9 6) (上記のいずれも参照により組み込まれる) を参照されたい。その他的一般的な参考文献については、本明細書全体を通じて記載されている。

【 0 1 6 0 】

材料および方法

キメラ膜貫通タンパク質のクローニングおよび B W 5 1 4 7 細胞のレトロウイルス形質導入

抗 TrkB には、リーダーペプチド - VL - リンカー - VH - ヒンジ - TM 細胞質内部分 - GFP (TrkB - GFP - WT) および VL - リンカー - VH - ヒンジ - 変異 TM 細胞質内部分 - GFP (TrkB - GFP - Mut) および VL - リンカー - VH - Myc - ヒンジ - TM 細胞質内部分 (TrkB - Myc - WT) および VL - リンカー - VH - Myc - ヒンジ - 変異 TM 細胞質内部分 (TrkB - Myc - Mut) を含むキメラ膜貫通 (TM) タンパク質配列を合成した。 GLP1R および PD-1 には、リーダーペプチド - VL - リンカー - VH - MYC + ヒンジ - TM - 細胞質内部分を含むキメラ膜貫通タンパク質配列を 2 種類合成した。

【 0 1 6 1 】

使用した WT マウスゼータ TM - 細胞質内配列は、 L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q T L A P R (配列番号 8) である。使用した変異ゼータ TM - 細胞質内配列は、 L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L F N E L N L G R R E E F D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V F N A L Q K D K M A E A F S E I G T K G E R R R G K G H D G L F Q G L S T A T K D T F D A L H M Q T L A P R (配列番号 9) である。

【 0 1 6 2 】

作製した 8 種類の配列は、 M D M R V P A Q L L G L L L W L S G A R C Q (配列番号 2) の N 末端リーダーペプチドを有する以下のものであった :

TrkB - Myc - WT :

D V V M T Q L P L S L P V I L G D Q A S I S C R S S Q S L I H S N G N T Y L H W

10

20

30

40

50

Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P F T F G S G T K L E I K R A G G S S R S
 S S S G G G G S G G G Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T
 F T S Y D I N W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P R D G S I K F N E K F K G K A
 T L T V D T S S S T A Y M E L H S L T S E D S A A Y F C A R R G R L L L Y G F A
 Y W G Q G T L V T V S A X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H F V P V F
 L P A K P T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V
 H T R G L D L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N
 L Q D P N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R
 N P Q E G V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E R R R G K G H D G L Y Q G 10
 L S T A T K D T Y D A L H M Q T L A P R (配列番号17)。

TrkB - Myc - Mut :

D V V M T Q L P L S L P V I L G D Q A S I S C R S S Q S L I H S N G N T Y L H W
 Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P F T F G S G T K L E I K R A G G S S R S
 S S S G G G G S G G G Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T
 F T S Y D I N W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P R D G S I K F N E K F K G K A
 T L T V D T S S S T A Y M E L H S L T S E D S A A Y F C A R R G R L L L Y G F A
 Y W G Q G T L V T V S A X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H F V P V F
 L P A K P T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V
 H T R G L D L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N
 L Q D P N Q L F N E L N L G R R E E F D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R
 N P Q E G V F N A L Q K D K M A E A F S E I G T K G E R R R G K G H D G L F Q G
 L S T A T K D T F D A L H M Q T L A P R (配列番号18)。

TrkB - GFP - WT :

D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W
 Y L Q K P G Q S P N L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 S R V E A E D L G V Y F C S Q G T H V P Y T F G G G T K L E I K R A G G S S R S
 S S S G G G G S G G G Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V T L S C K A S G Y T
 F T D Y E M H W V K Q T P V H G L E W I G T I D P E T A G T A Y N N Q K F K G K 30
 A I L T A G K S S S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T G V T T W F A Y W G
 Q G T L V T V S A X X A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P T T T P A P R P
 P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D L C Y L L D G
 I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L Y N E L N L
 G R R E E Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V Y N A L Q K D
 K M A E A Y S E I G T K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H
 M Q T L A P R E G R G S L L T C G D V E E N P G P M V S K G E E L F T G V V P I
 L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P
 V P W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q
 E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G
 N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G
 S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K
 R D H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K (配列番号19)。

TrkB - GFP - Mut :

D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W
 Y L Q K P G Q S P N L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 S R V E A E D L G V Y F C S Q G T H V P Y T F G G G T K L E I K R A G G S S R S
 S S S G G G G S G G G Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V T L S C K A S G Y T
 F T D Y E M H W V K Q T P V H G L E W I G T I D P E T A G T A Y N N Q K F K G K 40
 A I L T A G K S S S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T G V T T W F A Y W G
 N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G
 S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K
 R D H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K (配列番号19)。

10

20

30

40

50

Q G T L V T V S A X X A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P T T T P A P R P
 P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D L C Y L L D G
 I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L F N E L N L
 G R R E E F D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V F N A L Q K D
 K M A E A F S E I G T K G E R R R G K G H D G L F Q G L S T A T K D T F D A L H
 M Q T L A P R E G R G S L L T C G D V E E N P G P M V S K G E E L F T G V V P I
 L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P
 V P W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q
 E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G
 N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G
 S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K
 R D H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K (配列番号20) .

GLP1R - Myc - WT :

I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S R V T Y M H W Y Q Q R S G T
 S P K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D
 A A T Y Y C Q Q W G N N P Q Y T F G G G T R L E I K R G G G G S G G G G S G G G
 G S G G G G S Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G
 T G V G W I R Q P S G K G L E W L S H I W W D D V K R Y N P A L K S R L T I S R
 D T S Y S Q V F L R I A S V D T A D T A T Y Y C A R I L D G T G P M D Y W G Q G
 T S V T V S S X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P
 T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L
 D L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N
 Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G
 V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T
 K D T Y D A L H M Q T L A P R (配列番号21)。

GLP1R - Myc - Mut :

I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S R V T Y M H W Y Q Q R S G T
 S P K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D
 A A T Y Y C Q Q W G N N P Q Y T F G G G T R L E I K R G G G G S G G G G S G G G
 G S G G G G S Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G
 T G V G W I R Q P S G K G L E W L S H I W W D D V K R Y N P A L K S R L T I S R
 D T S Y S Q V F L R I A S V D T A D T A T Y Y C A R I L D G T G P M D Y W G Q G
 T S V T V S S X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P
 T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L
 D L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N
 Q L F N E L N L G R R E E F D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G
 V F N A L Q K D K M A E A F S E I G T K G E R R R G K G H D G L F Q G L S T A T
 K D T F D A L H M Q T L A P R (配列番号22)。

PD - 1 - Myc - WT :

Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A
 P G Q G L E W M G G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y
 M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S
 A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T
 Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V
 F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D
 G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
 C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
 N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
 D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S

10

20

30

50

L S L S L G K G G S S R S S S S G G G S G G G E I V L T Q S P A T L S L S P
 G E R A T L S C R A S K G V S T S G Y S Y L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A
 S Y L E S G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S
 R D L P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S
 V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S
 T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R
 G E C X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P T T P
 A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D L C Y
 L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L Y N
 E L N L G R R E E Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V Y N A
 L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y
 D A L H M Q T L A P R (配列番号27)

PD-1-Myc-Mut:

Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A
 P G Q G L E W M G G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T A Y
 M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S
 A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T
 Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V
 F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D
 G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
 C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
 N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
 D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
 L S L S L G K G G S S R S S S S G G G S G G G E I V L T Q S P A T L S L S P
 G E R A T L S C R A S K G V S T S G Y S Y L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A
 S Y L E S G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S
 R D L P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S
 V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S
 T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R
 G E C X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H F V P V F L P A K P T T P
 A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D L C Y
 L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L F N
 E L N L G R R E E F D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V F N A
 L Q K D K M A E A F S E I G T K G E R R R G K G H D G L F Q G L S T A T K D T F
 D A L H M Q T L A P R (配列番号28)。

【0163】

V L および V H の代わりに h G H アミノ酸配列を使用した配列をさらに 2 種類、上記の通りに作製した。内在性 h G H リーダーペプチド M A T G S R T S L L A F G L L C L P W L Q (配列番号34) を使用した。

【0164】

G H R - M y c - W T :

E G S A D Y K D H D G D Y K D H D I D Y K D D D D K F P T I P L S R L F D N A M
 L R A H R L H Q L A F D T Y Q E F E E A Y I P K E Q K Y S F L Q N P Q T S L C F
 S E S I P T P S N R E E T Q Q K S N L E L L R I S L L L I Q S W L E P V Q F L R
 S V F A N S L V Y G A S D S N V Y D L L K D L E E G I Q T L M G R L E D G S P R
 T G Q I F K Q T Y S K F D T N S H N D A L L K N Y G L L Y C F R K D M D K V E
 T F L R I V Q C R S V E G S C G F X X E Q K L I S E E D L A L S N S I M Y F S H
 F V P V F L P A K P T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A
 A G G A V H T R G L D L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A

10

20

30

40

50

ETAANLQDPNQLYNELNLGRRE EYDVLEKKRARDPEMGGK
QQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR (配列番号23)。

G H R - M y c - M u T :

EGSADYKDHDGDYKDHIDYKDDDDKFPТИPLSRLFDNAM
LRAHRLHQLAFTDYQEFE EAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCF
SESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL L I Q S W L E P V Q F L R
SVFANSLVYGASDSNVYD L L K D L E E G I Q T L M G R L E D G S P R
TGQIFKQTYSKFDTN SHN D ALLKNYGLLYC F R K D M D K V E
TFLRIVQC RS VEGSCGFXXE QKL I S E E D L A L S N S I M Y F S H
FVPVFLPAKPTTPAPR P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A
AGGA V H T R G L D L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A
ETAANLQDPNQLFNE LNLGRRE E F D V L E K K R A R D P E M G G K
QQRRRNPQEGVFNALQKDKMAEAFSEIGTKGERRRGKGHD
GLFQGLSTATKDTFDALHMQTLAPR (配列番号24)。上記のいずれ
の配列も、XXは任意のアミノ酸であっても、いずれのアミノ酸でなくてもよい。XXは
、タンパク質をコードする核酸配列内の制限酵素部位によるものである。使用した実際の
タンパク質では、XXがバリン-アスパラギン酸であった。

【0165】

全10種類の配列をレトロウイルスベクターpMP71-G-PREにクローニングし
た。DH5アルファ(Invitrogen社)を用いてプラスミドを増幅し、Maxi
prep Plasmid DNA Kit(Invitrogen社)で精製した。10
cmのプレートでパッケージング細胞系Platinum-E(Cell Biolabs
社)にプラスミドDNA 20μgおよびPolyJet(商標)(SigmaGen社)
60μLをトランスフェクトした。16時間後、培地をRPMI完全培地10mLと交
換した。24時間後および48時間後、レトロウイルス上清を収集し、0.45μmのフ
ィルターでろ過した。RetroNectinでコートしたプレート(12.5μg/mL
; TaKaRa社、Clontech社)にB W 5 1 4 7細胞(1×10⁶個/mL)
をウイルス上清とともに播き、4μg/mLの硫酸プロタミン(Sigma-Aldrich
社)とともに32、90分間、1500gで遠心接種した。

【0166】

TrkB-T2AのクローニングならびにRAW5147細胞、3T3細胞およびHE
K293細胞のレトロウイルス感染。

T2A-GFPを有するpMP71-PRE発現ベクターにマウスTrkB cDNA
(Sino Biological社)をクローニングした。10cmのプレートでパッ
ケージング細胞系Platinum-E(Cell Biolabs社)にプラスミドDN
A 20μgおよびPolyJet(商標)(SigmaGen社)60μLをトランス
フェクトした。16時間後、培地をDMEM完全培地10mLと交換した。24時間後お
および48時間後、レトロウイルス上清を収集し、0.45μmのフィルターでろ過した。
簡潔に述べれば、ヒト胎児脳(HEK293T)細胞、RAW5147細胞および3T3
細胞を24ウェルプレート(NUNC社)に播種した。翌日、細胞をウイルス上清および
4μg/mLの硫酸プロタミン(Sigma-Aldrich社)とともにインキュベー
トした。分取(FACS Aria細胞分取器(BD biosciences社、サンノ
ゼ、カリフォルニア州、米国))から48~72時間後、形質導入されたT細胞を染色し
解析した。

【0167】

TrkB受容体とキメラTrkB抗体との間の相互作用に関するin vitro試験
細胞ベースの結合アッセイでは、TrkB受容体を発現するRaw264.7細胞をD
MEMベースの培地(10%FBS、PSN)に入れ12ウェルプレート(Nunc社)
に播種した。集密度85~95%に達した後、細胞を2回洗浄し、0.2%FBSを含む

10

20

30

40

50

D M E M メイダ (me i d a) を 4 時間加えた。次いで、細胞を洗浄し、F B S を含まないD M E M で 1 時間インキュベートした後、ニューロトロphin または B W 5 1 4 7 細胞を加えた。その後、T r k B 発現 R a w 2 6 4 . 7 細胞を B D N F (5 0 n g / m l) およびキメラ受容体を有する B W 5 1 4 7 細胞とともに 3 0 分間および 1 時間インキュベートした。共培養した細胞を回収し、ウエスタンプロット解析用に処理した。

【 0 1 6 8 】

ウエスタンプロット法解析

プロテアーゼ阻害剤 (S i g m a 社) およびホスファターゼ阻害剤 (S i g m a 社) を含有する R I P A 緩衝液 (5 0 m M トリス - C l 、 p H 8 . 0 、 1 5 0 m M N a C l 、 1 % T r i t o n 、 0 . 5 % ドデシル硫酸ナトリウム) 中で細胞を溶解させた。溶解物 3 0 ~ 5 0 μ g を 1 2 % トリス - グリシン S D S - P A G E ゲル上で分離し、次いで P V D F またはニトロセルロース膜に写した。膜を p T r k B (T y r 7 0 6 / 7 0 7) 、 C e 1 1 S i g n a l i n g 社の全長型 T r k B (T r k B (8 0 E 3)) およびアクチンに対する抗体とともにインキュベートした。W e s t e r n B r i g h t Q u a n t u m (A d v a n s t a 社) をシグナルの可視化に用いた。バイオイメージング解析装置 (F u s i o n - F X ; V i l b e r 社、フランス) を用いて画像を取得し、 I m a g e J プログラムを用いて解析した。リン酸化 T r k B のウエスタンプロットの定量化。デンシトメトリー (I m a g e J) を用いてウエスタンプロットのバンドの総合密度の値を求め、データをアクチンおよび全長型 T r k B に正規化した。

【 0 1 6 9 】

サイトカイン E L I S A

T r k B 受容体を発現する R a w 2 6 4 . 7 細胞と R a w 2 6 4 . 7 細胞を D M E M ベースの培地 (1 0 % F B S 、 P S N) に入れ 9 6 ウェルプレート (N u n c 社) に播種した。集密度 8 5 ~ 9 5 % に達した後、細胞を 2 回洗浄し、 0 . 2 % F B S を含む D M E M メイダ (me i d a) 1 0 0 u l を 4 時間加えた。4 時間後、 F B S を含まない D M E M 培地 1 0 0 u l に B W 5 1 4 7 細胞を入れウェルに一晩加えた。1 6 時間後、上清を収集し、サンドイッチ E L I S A 法 (B i o L e g e n d 社) で製造業者の指示通りに I L - 2 に関して解析した。試料を 3 連で解析した。

【 0 1 7 0 】

統計解析

統計解析はいずれも G r a p h P a d P r i s m v e r s i o n 5 . 0 2 f o r W i n d o w s (G r a p h P a d S o f t w a r e 社、サンディエゴ、カリフォルニア州) で実施した。図の説明文に示されるように、変数をいずれも平均値 S E M または S D で表す。p 値を一元配置 A N O V A 検定で算出した。

【 0 1 7 1 】

実施例 1 . T r k B - M y c を発現する B W 細胞または T r k B - G F P キメラ受容体細胞は標的 R A W - T r k B 細胞に T r k B のリン酸化を誘導する。

T R A M M I C S 発現細胞が標的細胞上のチロシン受容体キナーゼ B (T r k B) 受容体のリン酸化を誘導することができるかどうかを試験するため、以下の実験を実施した。T r k B を安定に発現する R A W 2 6 4 . 7 細胞を作製した。この R A W - T r k B 細胞を未形質転換 B W 5 1 4 7 、変異型 (M u t) ゼータ鎖を有する B W - T r k B - G F P (配列番号 2 0) および B W - T r k B - M y c - M u t (配列番号 1 8) と 3 0 分間および 6 0 分間インキュベートした。この実験の結果を図 1 A ~ 1 B に示す。図 1 A では、 1 4 5 k D a の位置に T r k B のチロシン 7 0 6 のリン酸化に対応するタンパク質バンドがみられ、図 1 B はこれを定量化したものである。未変換 B W 5 1 4 7 細胞 (図 1 B 、番号 5) との共培養と比較すると、 3 0 分間の共培養後の R A W - T r k B 細胞のリン酸化 T r k B (p T r k B) のレベルが B W - T r k B - G F P - M u t 細胞 (図 1 B 、番号 6) との共培養では増大し、 B W - T r k B - M y c - M u t 細胞 (図 1 B 、番号 7) との共培養ではそれより大幅に増大していた。1 時間の共培養後、 B W T r k B - G F P - M u t 細胞 (図 1 B 、番号 9) および B W T r k B - M y c - M u t 細胞 (

10

20

30

40

50

図1B、番号10とともに、RAW-TrkB細胞でのpTrkB誘導がみられた。基準として総TrkB受容体発現レベルおよびアクチン負荷対照の発現レベルを用いた。

【0172】

実施例2. 標的細胞のTrkB受容体との結合時のキメラ受容体発現BW細胞によるIL-2産生。

次に、野生型または変異型ITAM領域を有するキメラ受容体を発現するBW細胞にIL-2の分泌を誘導することができるかどうかを検討した。TrkB受容体を発現するRaw264.7細胞およびWT Raw264.7細胞を96ウェルプレートのDMEMベースの培地(10%FBS、PSN)に播種した。集密度85~95%に達した後、細胞を2回洗浄し、0.2%FBSを含むDMEM培地100u1を4時間加えた。4時間後、FBSを含まないDMEM培地100u1にBW5147細胞を入れウェルに加えて一晩インキュベートした。16時間後、共培養した細胞から上清を収集し、サンドイッチELISA法により製造業者の指示通りにIL-2に関して解析した。試料を3連で解析した。

10

【0173】

野生型ITAM領域を有するBW TrkB-Mycを発現する細胞のみが、TrkB受容体を過剰発現するRAW細胞と結合したときにIL-2を産生することができた(図2、番号8)。内因性に少量のTrkB受容体を発現するWT RAW細胞とのインキュベーションでは、それより有意に低いレベルのIL-2が誘導された(図2、番号7)。変異ゼータ鎖を含む受容体の場合、WT RAW細胞(図2、番号10)またはTrkB受容体を過剰発現するRAW細胞(図2、番号11)のいずれとインキュベートしたかどうかに関係なく、BW細胞の活性化は観察されなかった。

20

【0174】

実施例3. T細胞へのトランスフェクション後のキメラ受容体の発現

T細胞上でのキメラ受容体の膜関連発現を評価するため、マウスT細胞系BW5147.3(ATCC(登録商標)TIB-47)または初代マウスTヘルパー細胞を用いた。細胞に6種類の異なるキメラ受容体をコードする組換えレトロウイルスベクターを形質導入した。形質導入から48~72時間後、MyC発現(MyCタグがキメラ受容体の一部である場合)またはGFP発現(GFPがキメラ受容体の一部である場合)の染色を用いて、細胞を受容体陽性細胞に関して分取した(図3A~3G)。いずれの場合も表面での明らかなキメラ受容体の高発現が観察された。具体的には、TrkB-Myc-WT(図3A、配列番号17)、TrkB-Myc-Mut(図3B、配列番号18)、GLP1R-Myc-WT(図3E、配列番号21)、GLP1R-Myc-Mut(図3F、配列番号22)、TrkB-GFP-WT(図3C、配列番号19)およびTrkB-GFP-Mut(図3D、配列番号20)がBW細胞の表面に高発現した。さらに、GLP1R-Myc-Mut(図3G、配列番号22)も形質導入マウスTヘルパー細胞の表面に高発現することがわかった。

30

【0175】

実施例4. プラスチック結合抗MyC抗体によるキメラ受容体発現BW細胞の活性化。

プラスチック結合抗MyC抗体によりMyC含有キメラタンパク質を発現するT細胞を活性化させてIL-2を分泌させることができるかどうかを試験するため、以下の実験を実施した。6種類の異なるMyC含有構築物、すなわち、実施例3で言及した4種類のMyC含有構築物およびGH-MyC-WT(配列番号23)、GH-MyC-Mut(配列番号24)をBW細胞に発現させた。得られた6種類の細胞系を、漸増量(コーティング溶液中2500~4.8ng/ml)のプラスチックと結合した市販の抗MyC Abと16~18時間インキュベートした(50000個/96プレートウェル)。抗CD16(コーティング溶液中2500ng/ml)を抗MyCに対する陰性対照として用いた。一晩インキュベートした後、市販のELISAキットにより上清中のmIL-2レベルを求めた。

40

【0176】

50

WT ゼータ鎖を含む構築物を発現する細胞にはいずれも明らかな活性化が観察され (IL-2 分泌に基づく)、さらに、IL-2 分泌の強度は、用いたプラスチック結合抗 Myc 抗体の量と直接相関していた (図 4)。発現した受容体に変異ゼータ鎖が含まれている場合、用いた最大濃度の抗 Myc 抗体でも活性化は観察されなかった。

【0177】

したがって、抗 TrKb VL - リンカー - VH 配列、抗 GLP1R VL - リンカー - VH 配列または成長ホルモン (GH) 配列のいずれか 1 つとともに Myc タグおよび WT ゼータ鎖を含むキメラ受容体は、プラスチック結合抗 Myc によって効率的に活性化されるとする結論が導かれた。この結果から、キメラ受容体は機能的であり、標的側からの適切なシグナル (ここではプラスチック結合抗 Myc 抗体により模倣した) が存在すると、T 細胞の膜上に動員され凝集して機能的シナプスを形成し得ることがわかる。さらに、標的と相互作用した後、T 細胞によるいかなる活性化を防止するのにも、ゼータ鎖上にチロシン (Y) からフェニルアラニン (F) への単一アミノ酸変異が 6 つあれば十分であることは明らかである。

10

【0178】

実施例 5. GLP1R を有する標的細胞による GLP1R キメラ受容体発現 T 細胞の活性化

次に、GLP1R を発現する細胞 (CHO - GLP1R、カタログ番号 M00451、GenScript 社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州、米国) がキメラ抗 GLP1R 受容体を発現する T 細胞を活性化させて IL-2 を分泌させることができるかどうかを検討した。図 5 に、GLP1R - Myc - WT または GLP1R - Myc - Mut を発現する T 紹介、キメラ受容体 (BW5147) のない T 紹介および T 紹介を加えていない CHO - GLP1R (PBS) を示す。対照として、T 紹介の代わりに GLP1R アゴニストのエキセンジン 4 (Exn4) も加えた。最初に、市販の GLP1R 発現 CHO 紹介を予め播種し、24 時間付着させた。T 紹介または対照と 18 時間インキュベートした後、上清を回収し、市販の ELISA キットによりマウス IL-2 のレベルを求めた。

20

【0179】

T 紹介が GLP1R - Myc - WT を発現する場合のみ明らかな活性化が観察され (IL-2 分泌に基づく)、この活性化 (IL-2 分泌) は、加えた T 紹介の量と直接相関していた (図 4)。キメラ受容体 GLP1R - Myc - mut を発現する T 紹介を加えた場合を含めた他のいずれの場合も活性化は測定されなかった。以上の結果は、変異ゼータ鎖が、キメラタンパク質が関与する方法に関係なく T 紹介を活性化させないとする主張を裏付けるものである。

30

【0180】

実施例 6. 適切なキメラ受容体を発現するエフェクター細胞とインキュベートした標的 RAW 紹介からの mTNF 発現。

GLP1R - Myc - Mut を発現する BW 紹介自体は活性化することができないことが明らかになったため、同紹介が GLP1R を発現する紹介を活性化させて mTNF を分泌させることができるかどうか検討した。RAW264.7 紹介 (RAW264.7 ATCC (登録商標) TIB-71 (商標)) は、生来的にマウス GLP1R を発現するマウスマクロファージ / 単球紹介系である。GLP1R が活性化すると、この RAW 紹介による TNF 分泌が誘導されることがわかっている。WT BW 紹介、キメラ抗 GLP1R 受容体を発現する BW 紹介または GLP1R アゴニストの Exn4 と共にインキュベートした後、Raw 紹介の上清を回収し、市販の ELISA キットにより上清中のマウス TNF レベルを求めた (図 6)。

40

【0181】

GLP1R - Myc - Mut を発現する T 紹介と標的 RAW 紹介を共インキュベートした場合のみ標的 RAW 紹介の明らかな活性化が観察された (mTNF に基づく)。T 紹介を加えなかった場合 (それぞれ Raw 単独 (低濃度 1 μg/ml の LPS で処理) および LPS 処理を実施しなかった RAW (LPS 無し) のカラム)、RAW 紹介の活性化

50

レベルは低いか皆無であった。受容体を発現しないT細胞を加えた場合（B W 5 1 4 7）、活性化が若干観察されたが、抗G L P 1 R受容体を発現するT細胞を加えた場合と比較して有意に低い値である。この実験の設定の有効性を示す陽性対照は、G L P 1 Rアゴニストでありキメラ受容体と同程度のT N F 発現を誘導するエキセンジン4（E x n 4）を加えたものである。

【0182】

したがって、変異型ゼータ鎖を含むキメラ抗G L P 1 R受容体を発現するT細胞には、G L P 1 R受容体発現する標的細胞をG L P 1 R受容体を介して活性化させる効果があるとする結論が導かれる。この結果は、キメラ受容体が、ゼータが変異していても機能的であり、適切な受容体を発現する標的細胞から強力な応答を誘導することが可能であることを示している。

10

【0183】

実施例7．抗P D - 1 S C A A Bを用いた免疫細胞の負の調節の遮断

P D 1陽性N K細胞と、抗P D 1 S C A A B（配列番号28）を発現する免疫細胞とをインキュベートする。次に、P D - 1 L陽性腫瘍細胞を加え、N K活性化を測定する。あるいは、抗原媒介性T細胞活性化アッセイを用いてN K細胞活性化をアッセイする。

【0184】

ここまで、本発明をその特定の実施形態とともに説明してきたが、当業者には多数の代替形態、修正形態および変形形態が明らかにならうことは明白である。したがって、添付の請求項の趣旨および広い範囲に含まれるそのような代替形態、修正形態および変形形態はすべて包含されるものとする。

20

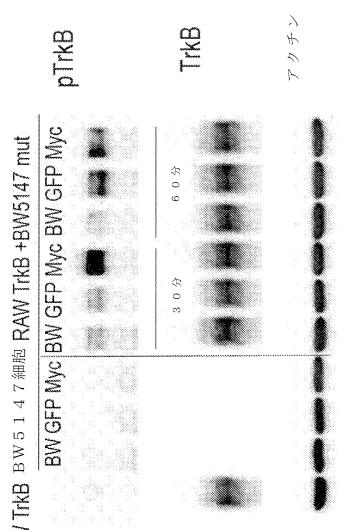
30

40

50

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



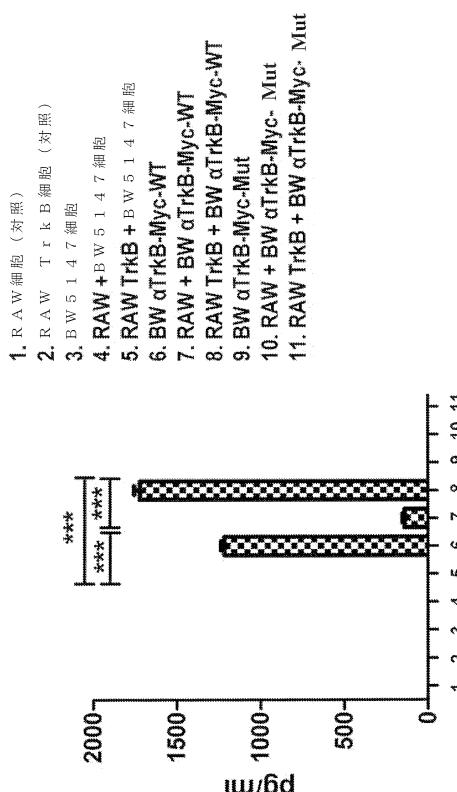
10

20

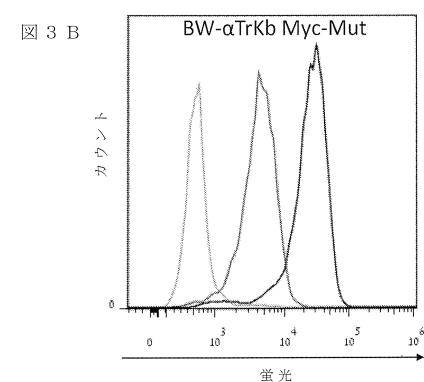
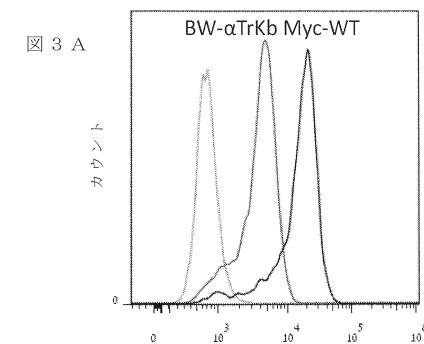
30

40

【図 2】

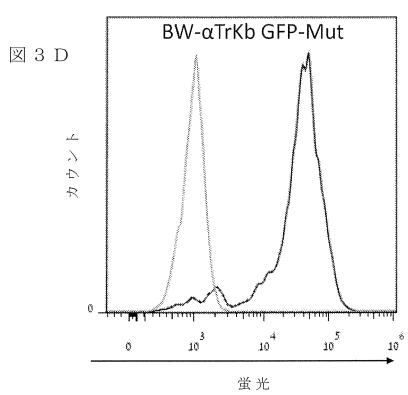
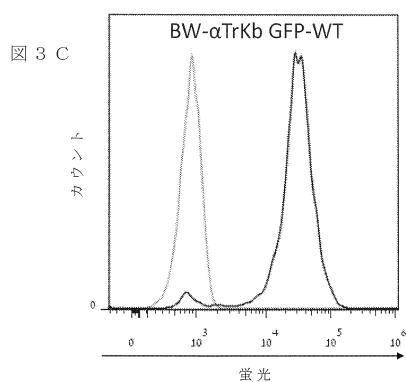


【図 3 - 1】

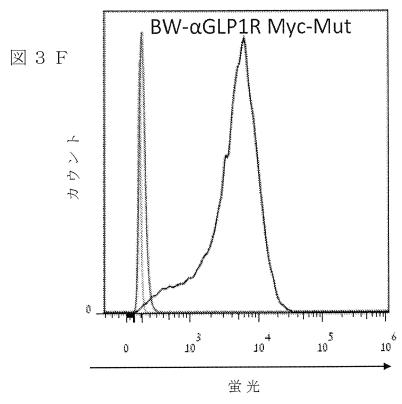
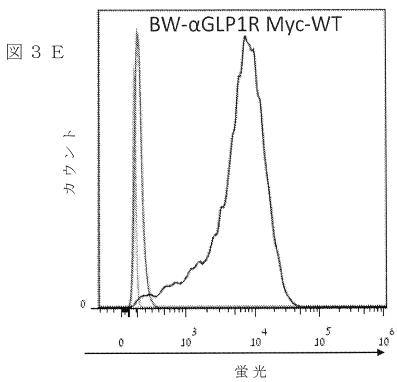


50

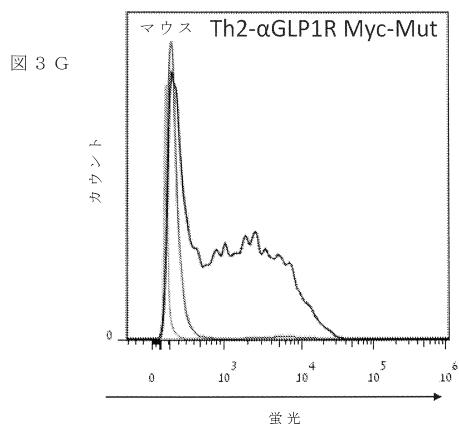
【図 3 - 2】



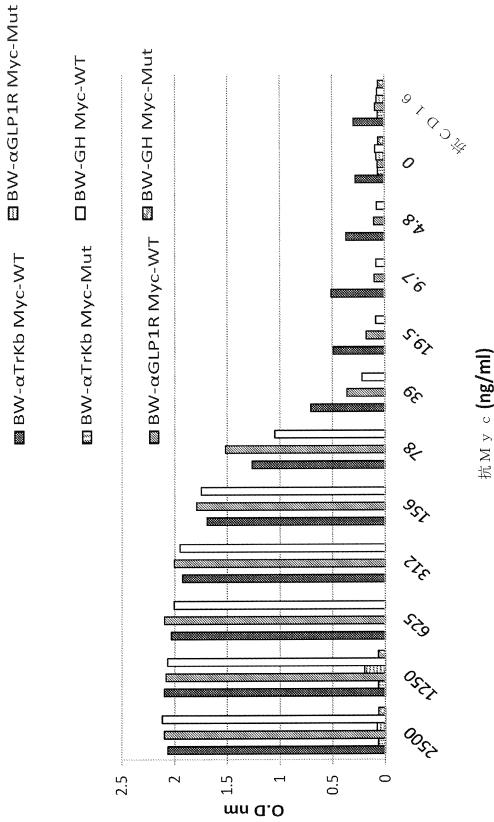
【図 3 - 3】



【図 3 - 4】



【図 4】



10

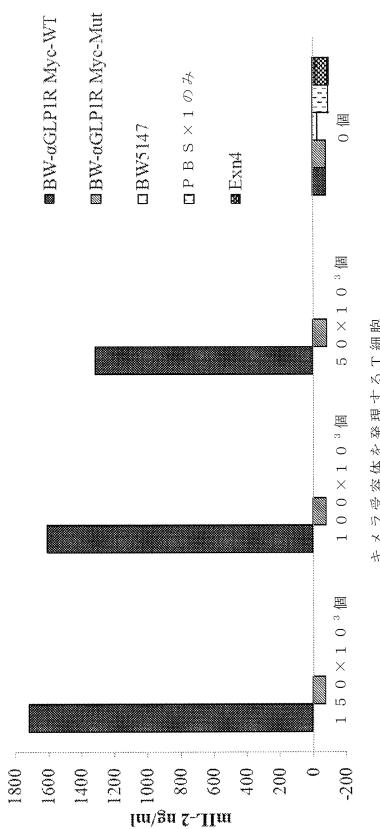
20

30

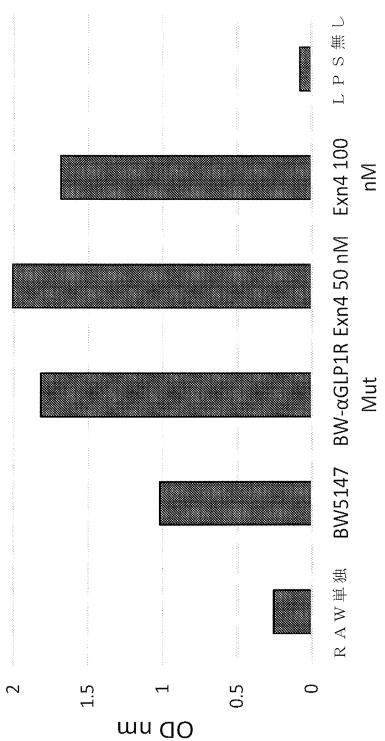
40

50

【図 5】



【図 6】



【配列表】

0007213799000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z
C 1 2 N 5/078(2010.01)	C 1 2 N 5/10
	C 1 2 N 5/078

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 モンソネゴ, アロン

イスラエル国, 7 9 5 2 5 0 0 モシャブ ニア バニム, モシャブ ニア バニム ナンバー 4 5 1

(72)発明者 ポルガドール, アングル

イスラエル国, 8 5 3 3 8 0 0 レハヴィム, 1 1 タヴラン ストリート

(72)発明者 アトラス, 口エー

イスラエル国, 5 3 1 0 1 0 2 ギヴァタイム, ピー. オー ボックス 2 1 3

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 特表2 0 1 5 - 5 1 6 8 1 8 (J P , A)

国際公開第2 0 0 7 / 1 4 2 2 4 1 (WO , A 1)

J. Immunol. (2009) vol.183, issue 9, p.5563-5574

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

A 6 1 K 3 5 / 1 2

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 K 3 5 / 1 5

A 6 1 K 3 8 / 1 6

C 1 2 N 1 5 / 6 2

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

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