(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-511528
(P2020-511528A)
(43)公表日　令和2年4月16日(2020.4.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 47/64	***(2017.01)***	A61K	47/64		4B050
A61P 37/02	***(2006.01)***	A61P	37/02	ZNA	4B063
A61K 48/00	***(2006.01)***	A61K	48/00		4B065
A61K 35/76	***(2015.01)***	A61K	35/76		4C076
A61K 35/761	***(2015.01)***	A61K	35/761		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 186 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-568591 (P2019-568591)
(86)(22)出願日　平成30年3月2日 (2018.3.2)
(85)翻訳文提出日　令和1年11月1日 (2019.11.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/020704
(87)国際公開番号　WO2018/160993
(87)国際公開日　平成30年9月7日 (2018.9.7)
(31)優先権主張番号　62/466,601
(32)優先日　平成29年3月3日 (2017.3.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/484,063
(32)優先日　平成29年4月11日 (2017.4.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

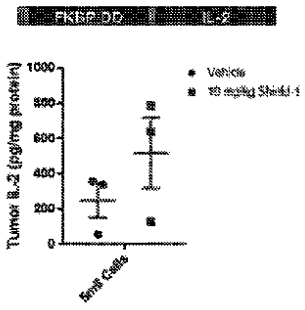
(71)出願人　519318535
オブシディアン　セラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３８，　ケンブリッジ，　マサチューセッツ　アベニュー　１０３０，　フォース　フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫療法のための組成物及び方法

(57)【要約】
本発明は、がん免疫療法のための生体回路系、エフェクターモジュール及び組成物を提供する。対象における抗がん免疫応答の誘導方法も提供する。
【選択図】図１９

Figure 19



【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１のエフェクターモジュールを含む、細胞または対象において免疫応答を誘導するための組成物であって、前記エフェクターモジュールが、少なくとも１つの免疫療法薬に作動可能に連結した第１の刺激応答エレメント（ＳＲＥ）を含み、前記少なくとも１つの免疫療法薬が、サイトカイン、安全スイッチ、調節スイッチ、キメラ抗原受容体及びそれらの組み合わせから選択される、前記組成物。
【請求項２】
前記第１のＳＲＥが、少なくとも１つの刺激に応答するか、または相互作用する、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記第１のＳＲＥが不安定化ドメイン（ＤＤ）である、請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
前記ＤＤが、親タンパク質または前記親タンパク質に比べて１、２、３またはそれ以上のアミノ酸変異を有する変異タンパク質に由来し、前記親タンパク質が：
（ａ）配列番号３のアミノ酸配列を有するヒトタンパク質ＦＫＢＰ、
（ｂ）配列番号１のアミノ酸配列を有するヒトＤＨＦＲ（ｈＤＨＦＲ）、
（ｃ）配列番号２のアミノ酸配列を有するＥ．ｃｏｌｉ　ＤＨＦＲ（ｅｃＤＨＦＲ）、
（ｄ）配列番号４のアミノ酸配列を有するＰＤＥ５、
（ｅ）配列番号５のアミノ酸配列を有するＰＰＡＲγ、
（ｆ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＡ２、
（ｇ）配列番号７のアミノ酸配列を有するＮＱＯ２、及び
（ｈ）配列番号２２４のアミノ酸配列を有するヒトＤＰＰＩＶ
から選択される、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
前記親タンパク質がｈＤＨＦＲであり、前記ＤＤが、Ｍ１ｄｅｌ、Ｖ２Ａ、Ｃ７Ｒ、Ｉ８Ｖ、Ｖ９Ａ、Ａ１０Ｔ、Ａ１０Ｖ、Ｑ１３Ｒ、Ｎ１４Ｓ、Ｇ１６Ｓ、Ｉ１７Ｎ、Ｉ１７Ｖ、Ｋ１９Ｅ、Ｎ２０Ｄ、Ｇ２１Ｔ、Ｇ２１Ｅ、Ｄ２２Ｓ、Ｌ２３Ｓ、Ｐ２４Ｓ、Ｌ２８Ｐ、Ｎ３０Ｄ、Ｎ３０Ｈ、Ｎ３０Ｓ、Ｅ３１Ｇ、Ｅ３１Ｄ、Ｆ３２Ｍ、Ｒ３３Ｇ、Ｒ３３Ｓ、Ｆ３５Ｌ、Ｑ３６Ｒ、Ｑ３６Ｓ、Ｑ３６Ｋ、Ｑ３６Ｆ、Ｒ３７Ｇ、Ｍ３８Ｖ、Ｍ３８Ｔ、Ｔ４０Ａ、Ｖ４４Ａ、Ｋ４７Ｒ、Ｎ４９Ｓ、Ｎ４９Ｄ、Ｍ５３Ｔ、Ｇ５４Ｒ、Ｋ５６Ｅ、Ｋ５６Ｒ、Ｔ５７Ａ、Ｆ５９Ｓ、Ｉ６１Ｔ、Ｋ６４Ｒ、Ｎ６５Ａ、Ｎ６５Ｓ、Ｎ６５Ｄ、Ｎ６５Ｆ、Ｌ６８Ｓ、Ｋ６９Ｅ、Ｋ６９Ｒ、Ｒ７１Ｇ、Ｉ７２Ｔ、Ｉ７２Ａ、Ｉ７２Ｖ、Ｎ７３Ｇ、Ｌ７４Ｎ、Ｖ７５Ｆ、Ｒ７８Ｇ、Ｌ８０Ｐ、Ｋ８１Ｒ、Ｅ８２Ｇ、Ｈ８８Ｙ、Ｆ８９Ｌ、Ｒ９２Ｇ、Ｓ９３Ｇ、Ｓ９３Ｒ、Ｌ９４Ａ、Ｄ９６Ｇ、Ａ９７Ｔ、Ｌ９８Ｓ、Ｋ９９Ｇ、Ｋ９９Ｒ、Ｌ１００Ｐ、Ｅ１０２Ｇ、Ｑ１０３Ｒ、Ｐ１０４Ｓ、Ｅ１０５Ｇ、Ａ１０７Ｔ、Ａ１０７Ｖ、Ｎ１０８Ｄ、Ｋ１０９Ｅ、Ｋ１０９Ｒ、Ｖ１１０Ａ、Ｄ１１１Ｎ、Ｍ１１２Ｔ、Ｍ１１２Ｖ、Ｖ１１３Ａ、Ｗ１１４Ｒ、Ｉ１１５Ｖ、Ｖ１１６Ｉ、Ｇ１１７Ｄ、Ｖ１２１Ａ、Ｙ１２２Ｃ、Ｙ１２２Ｄ、Ｙ１２２Ｉ、Ｋ１２３Ｒ、Ｋ１２３Ｅ、Ａ１２５Ｆ、Ｍ１２６Ｉ、Ｎ１２７Ｒ、Ｎ１２７Ｓ、Ｎ１２７Ｙ、Ｈ１２８Ｒ、Ｈ１２８Ｙ、Ｈ１３１Ｒ、Ｌ１３２Ｐ、Ｋ１３３Ｅ、Ｌ１３４Ｐ、Ｆ１３５Ｐ、Ｆ１３５Ｌ、Ｆ１３５Ｓ、Ｆ１３５Ｖ、Ｖ１３６Ｍ、Ｔ１３７Ｒ、Ｒ１３８Ｇ、Ｒ１３８Ｉ、Ｉ１３９Ｔ、Ｉ１３９Ｖ、Ｍ１４０Ｉ、Ｍ１４０Ｖ、Ｑ１４１Ｒ、Ｄ１４２Ｇ、Ｆ１４３Ｓ、Ｆ１４３Ｌ、Ｅ１４４Ｇ、Ｄ１４６Ｇ、Ｔ１４７Ａ、Ｆ１４８Ｓ、Ｆ１４８Ｌ、Ｆ１４９Ｌ、Ｐ１５０Ｌ、Ｅ１５１Ｇ、Ｉ１５２Ｖ、Ｄ１５３Ａ、Ｄ１５３Ｇ、Ｅ１５５Ｇ、Ｋ１５６Ｒ、Ｙ１５７Ｒ、Ｙ１５７Ｃ、Ｋ１５８Ｅ、Ｋ１５８Ｒ、Ｌ１５９Ｐ、Ｌ１６０Ｐ、Ｅ１６２Ｇ、Ｙ１６３Ｃ、Ｖ１６６Ａ、Ｓ１６８Ｃ、Ｄ１６９Ｇ、Ｖ１７０Ａ、Ｑ１７１Ｒ、Ｅ１７２Ｇ、Ｅ１７３Ｇ、Ｅ１７３Ａ、Ｋ１７４Ｒ、Ｉ１７６Ａ、Ｉ１７６Ｆ、Ｉ１７６Ｔ、Ｋ１７７Ｅ、Ｋ１７７Ｒ、Ｙ１７８Ｃ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８０Ｌ、Ｅ１８１Ｇ、Ｖ１８２Ａ、Ｙ１８３Ｃ、Ｙ１８３Ｈ、Ｅ１８４Ｒ、Ｅ１８４Ｇ、Ｋ１８５Ｒ、Ｋ１８５ｄｅ

ｌ、Ｋ１８５Ｅ、Ｎ１８６Ｓ、Ｎ１８６Ｄ、Ｄ１８７Ｇ、及びＤ１８７Ｎから選択される少なくとも１つの変異を有する変異タンパク質を含む、請求項４に記載の組成物。

【請求項６】

前記刺激が、トリメトプリム（ＴＭＰ）及びメトトレキサート（ＭＴＸ）から選択される、請求項５に記載の組成物。

【請求項７】

前記免疫療法薬がサイトカインである、請求項１に記載の組成物。

【請求項８】

前記サイトカインが、インターロイキン、インターフェロン、腫瘍壊死因子、トランスフォーミング増殖因子Ｂ、ＣＣケモカイン、ＣＸＣケモカイン、ＣＸ３Ｃケモカインまたは増殖因子である、請求項７に記載の組成物。

【請求項９】

前記サイトカインがインターロイキンであり、前記インターロイキンが、ＩＬ１、ＩＬ１－α、ＩＬ１－β、ＩＬ１－δ、ＩＬ１－ε、ＩＬ１－η、ＩＬ１－ζ、ＩＬ－ＲＡ、ＩＬ２、ＩＬ３、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ７、ＩＬ８、ＩＬ９、ＩＬ１０、ＩＬ１０Ｃ、ＩＬ１０Ｄ、ＩＬ１１ａ、ＩＬ１１ｂ、ＩＬ１３、ＩＬ１４、ＩＬ１６、ＩＬ１７、ＩＬ－１７Ａ、ＩＬ１７Ｂ、ＩＬ１７Ｃ、ＩＬ１７Ｅ、ＩＬ１７Ｆ、ＩＬ１８、ＩＬ１９、ＩＬ２０、ＩＬ２０Ｌ、ＩＬ２１、ＩＬ２２、ＩＬ２３、ＩＬ２３Ａ、ＩＬ２４、ＩＬ２５、ＩＬ２６、ＩＬ２７、ＩＬ２８、ＩＬ２９、ＩＬ３０、ＩＬ３１、ＩＬ３２、ＩＬ３３、ＩＬ３４、ＩＬ３６α、ＩＬ３６β、ＩＬ３６γ、ＩＬ３６ＲＮ、ＩＬ３７、ＩＬ３７ａ、ＩＬ３７ｂ、ＩＬ３７ｃ、Ｉｌ３７ｄ、ＩＬ３７ｅ、及びＩＬ３８からなる群から選択される、請求項８に記載の組成物。

【請求項１０】

前記インターロイキンが、配列番号５１のアミノ酸配列を有するＩＬ２である、請求項９に記載の組成物。

【請求項１１】

前記免疫療法薬が安全スイッチである、請求項１に記載の組成物。

【請求項１２】

前記安全スイッチが、カスパーゼ９、誘導性ＦＡＳ（ｉＦＡＳ）、誘導性カスパーゼ９（ｉｃａｓｐ９）、ＣＤ２０／抗ＣＤ２０抗体ペア、タンパク質タグ／抗タグ抗体、及び小型自殺遺伝子（ＲＱＲ８）から選択される、請求項１１に記載の組成物。

【請求項１３】

前記安全スイッチが、配列番号６５のアミノ酸配列を有するカスパーゼ９である、請求項１２に記載の組成物。

【請求項１４】

前記免疫療法薬が、調節スイッチをコードする、請求項１に記載の組成物。

【請求項１５】

前記調節スイッチが、ＦＯＸＰ３、Ｎｒ４ａ、ＦＯＸＯ、及びＮＦ－κＢから選択される、請求項１４に記載の組成物。

【請求項１６】

前記調節スイッチが、配列番号１０３～１０６のアミノ酸配列を有するＦＯＸＰ３である、請求項１５に記載の組成物。

【請求項１７】

前記免疫療法薬が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）であり、ＧＤ２　ＣＡＲ、Ｈｅｒ２　ＣＡＲ、ＢＣＭＡ　ＣＡＲ、ＣＤ３３　ＣＡＲ、ＡＬＫ　ＣＡＲ、ＣＤ２２　ＣＡＲ、及びＣＤ２７６　ＣＡＲから選択され、その各々が、細胞外部分、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、及び必要に応じて、１つ以上の共刺激ドメインを含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項１８】

前記ＣＡＲを、標準ＣＡＲ、スプリットＣＡＲ、オフスイッチＣＡＲ、オンスイッチＣ

ＡＲ、第１世代ＣＡＲ、第２世代ＣＡＲ、第３世代ＣＡＲ、または第４世代ＣＡＲとして設計する、請求項１７に記載の組成物。

【請求項１９】

前記細胞外標的部分が：

ｉ．Ｉｇ　ＮＡＲ、

ｉｉ．Ｆａｂフラグメント、

ｉｉｉ．Ｆａｂ’フラグメント、

ｉｖ．Ｆ（ａｂ）’２フラグメント、

ｖ．Ｆ（ａｂ）’３フラグメント、

ｖｉ．Ｆｖ、

ｖｉｉ．単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、

ｖｉｉｉ．ｂｉｓ－ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）２、

ｉｘ．ミニボディ、

ｘ．ダイアボディ、

ｘｉ．トライアボディ、

ｘｉｉ．テトラボディ、

ｘｉｉｉ．細胞内抗体、

ｘｉｖ．ジスルフィド安定化Ｆｖタンパク質（ｄｓＦｖ）、

ｘｖ．ユニボディ、

ｘｖｉ．ナノボディ、及び

ｘｖｉｉ．目的タンパク質、リガンド、受容体、受容体断片、またはペプチドアプタマーのいずれかに特異的に結合する抗体に由来する抗原結合領域

のいずれかから選択される、請求項１８に記載の組成物。

【請求項２０】

前記細胞外標的部分が、配列番号２４２～２５７及び４２２～４２９のアミノ酸配列を有するＡＬＫ標的部分、配列番号２５８～２６２及び４３０～４３２のアミノ酸配列を有するＣＤ２２標的部分、配列番号２６３～２７０及び４３３～４３６のアミノ酸配列を有するＣＤ２７６標的部分、配列番号２７１～３４９及び４３７～４６５のアミノ酸配列を有するＧＤ２標的部分、配列番号３５０～３５７のアミノ酸配列を有するＣＤ３３標的部分、配列番号３５８～３６５のアミノ酸配列を有するＢＣＭＡ標的部分、及び配列番号３６６～４２１及び４６６～４７３のアミノ酸配列を有するＨｅｒ２標的部分から選択される、請求項１７に記載の組成物。

【請求項２１】

（ａ）前記ＣＡＲの前記細胞内シグナル伝達ドメインが、Ｔ細胞受容体ＣＤ３ζまたはＦｃＲγ、ＦｃＲβ、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、及びＣＤ６６ｄからなる群から選択される細胞表面分子に由来する前記シグナル伝達ドメインであり；

（ｂ）前記共刺激ドメインが存在し、それが、２Ｂ４、ＨＶＥＭ、ＩＣＯＳ、ＬＡＧ３、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、グルココルチコイド誘発腫瘍壊死因子受容体（ＧＩＴＲ）、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、及びＢ７－Ｈ３からなる群から選択される、

請求項１７に記載の組成物。

【請求項２２】

前記膜貫通ドメインが、配列番号５２７～６２４のアミノ酸配列を有する、請求項１７に記載の組成物。

【請求項２３】

前記膜貫通ドメインが、配列番号６２８～６９４のアミノ酸配列を有するヒンジ領域をさらに含む、請求項１７に記載の組成物。

【請求項２４】

前記第１のエフェクターモジュールが：
（ａ）配列番号５２～５４のいずれかのアミノ酸配列を有するＩＬ２－ＤＤ、
（ｂ）配列番号７２～８０のいずれかのアミノ酸配列を有するカスパーゼ９－ＤＤ、
（ｃ）配列番号１０７～１１６のいずれかのアミノ酸配列を有するＦＯＸＰ３－ＤＤ、
（ｄ）配列番号７７５～７７７のいずれかのアミノ酸配列を有するＢＣＭＡ　ＣＡＲ－ＤＤ、及び
（ｅ）配列番号９０６のアミノ酸配列を有するＨＥＲ２－ＤＤ
のうちの１つ以上を含む、請求項１～２３のいずれかに記載の組成物。
【請求項２５】
前記少なくとも１つの免疫療法薬が、サイトカイン、安全スイッチ、調節スイッチ、キメラ抗原受容体及びそれらの組み合わせから選択される、請求項１～２４のいずれかに記載の組成物をコードするポリヌクレオチド。
【請求項２６】
前記ポリヌクレオチドが、ＤＮＡ分子またはＲＮＡ分子である、請求項２５に記載のポリヌクレオチド。
【請求項２７】
前記ポリヌクレオチドがＲＮＡであり、前記ＲＮＡがメッセンジャーＲＮＡである、請求項２６に記載のポリヌクレオチド。
【請求項２８】
化学修飾されている、請求項２７に記載のポリヌクレオチド。
【請求項２９】
時空間的に選択されたコドンを含む、請求項２６に記載のポリヌクレオチド。
【請求項３０】
前記ポリヌクレオチドが、プロモーター、リンカー、シグナルペプチド、タグ、切断部位及びターゲティングペプチドから選択される少なくとも１つの追加の特徴をコードする、請求項２７に記載のポリヌクレオチド。
【請求項３１】
前記キメラ抗原受容体が、ＧＤ２　ＣＡＲ、Ｈｅｒ２　ＣＡＲ、ＢＣＭＡ　ＣＡＲ、ＣＤ３３　ＣＡＲ、ＡＬＫ　ＣＡＲ、ＣＤ２２　ＣＡＲ、及びＣＤ２７６　ＣＡＲから選択される、請求項２５に記載のポリヌクレオチド。
【請求項３２】
前記少なくとも１つの免疫療法薬が、サイトカイン、安全スイッチ、調節スイッチ、キメラ抗原受容体及びそれらの組み合わせから選択される、請求項２５～３１のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項３３】
前記ベクターが、ウイルスベクターまたはプラスミドである、請求項３２に記載のベクター。
【請求項３４】
前記ベクターがウイルスベクターであり、前記ウイルスベクターがレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、組換えＡＡＶベクター、アデノウイルスベクター、または腫瘍溶解性ウイルスベクターである、請求項３３に記載のベクター。
【請求項３５】
前記ポリヌクレオチドが、請求項１～２４のいずれかの組成物をコードする、請求項３４に記載のベクター。
【請求項３６】
請求項１～２４のいずれかの組成物のいずれか、請求項２５～３１のいずれかのポリヌクレオチドを発現し、及び／または請求項３２～３５のいずれかのベクターで感染または形質移入した養子細胞移入（ＡＣＴ）用の免疫細胞。
【請求項３７】

前記免疫細胞が、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＮＫＴ細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、腫瘍浸潤性リンパ球（ＴＩＬ）、記憶Ｔ細胞、調節性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞、サイトカイン誘導性キラー（ＣＩＫ）細胞、樹状細胞、ヒト胚性幹細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、またはそれらの混合物である、請求項３６に記載の免疫細胞。

【請求項３８】

前記ＳＲＥが不安定化ドメインＤＤであり、前記ＤＤが、配列番号３のアミノ酸配列を有するヒトタンパク質ＦＫＢＰ、配列番号１～２のアミノ酸配列を有するＤＨＦＲ、配列番号４のアミノ酸配列を有するＰＤＥ５、配列番号５のアミノ酸配列を有するＰＰＡＲγ、配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＡ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を有するＮＱＯ２に由来する、請求項３６の免疫細胞。

【請求項３９】

前記ＤＤが親タンパク質に由来し、前記親タンパク質がｈＤＨＦＲであり、前記ＤＤが、Ｍ１ｄｅｌ、Ｖ２Ａ、Ｃ７Ｒ、Ｉ８Ｖ、Ｖ９Ａ、Ａ１０Ｔ、Ａ１０Ｖ、Ｑ１３Ｒ、Ｎ１４Ｓ、Ｇ１６Ｓ、Ｉ１７Ｎ、Ｉ１７Ｖ、Ｋ１９Ｅ、Ｎ２０Ｄ、Ｇ２１Ｔ、Ｇ２１Ｅ、Ｄ２２Ｓ、Ｌ２３Ｓ、Ｐ２４Ｓ、Ｌ２８Ｐ、Ｎ３０Ｄ、Ｎ３０Ｈ、Ｎ３０Ｓ、Ｅ３１Ｇ、Ｅ３１Ｄ、Ｆ３２Ｍ、Ｒ３３Ｇ、Ｒ３３Ｓ、Ｆ３５Ｌ、Ｑ３６Ｒ、Ｑ３６Ｓ、Ｑ３６Ｋ、Ｑ３６Ｆ、Ｒ３７Ｇ、Ｍ３８Ｖ、Ｍ３８Ｔ、Ｔ４０Ａ、Ｖ４４Ａ、Ｋ４７Ｒ、Ｎ４９Ｓ、Ｎ４９Ｄ、Ｍ５３Ｔ、Ｇ５４Ｒ、Ｋ５６Ｅ、Ｋ５６Ｒ、Ｔ５７Ａ、Ｆ５９Ｓ、Ｉ６１Ｔ、Ｋ６４Ｒ、Ｎ６５Ａ、Ｎ６５Ｓ、Ｎ６５Ｄ、Ｎ６５Ｆ、Ｌ６８Ｓ、Ｋ６９Ｅ、Ｋ６９Ｒ、Ｒ７１Ｇ、Ｉ７２Ｔ、Ｉ７２Ａ、Ｉ７２Ｖ、Ｎ７３Ｇ、Ｌ７４Ｎ、Ｖ７５Ｆ、Ｒ７８Ｇ、Ｌ８０Ｐ、Ｋ８１Ｒ、Ｅ８２Ｇ、Ｈ８８Ｙ、Ｆ８９Ｌ、Ｒ９２Ｇ、Ｓ９３Ｇ、Ｓ９３Ｒ、Ｌ９４Ａ、Ｄ９６Ｇ、Ａ９７Ｔ、Ｌ９８Ｓ、Ｋ９９Ｇ、Ｋ９９Ｒ、Ｌ１００Ｐ、Ｅ１０２Ｇ、Ｑ１０３Ｒ、Ｐ１０４Ｓ、Ｅ１０５Ｇ、Ａ１０７Ｔ、Ａ１０７Ｖ、Ｎ１０８Ｄ、Ｋ１０９Ｅ、Ｋ１０９Ｒ、Ｖ１１０Ａ、Ｄ１１１Ｎ、Ｍ１１２Ｔ、Ｍ１１２Ｖ、Ｖ１１３Ａ、Ｗ１１４Ｒ、Ｉ１１５Ｖ、Ｖ１１６Ｉ、Ｇ１１７Ｄ、Ｖ１２１Ａ、Ｙ１２２Ｃ、Ｙ１２２Ｄ、Ｙ１２２Ｉ、Ｋ１２３Ｒ、Ｋ１２３Ｅ、Ａ１２５Ｆ、Ｍ１２６Ｉ、Ｎ１２７Ｒ、Ｎ１２７Ｓ、Ｎ１２７Ｙ、Ｈ１２８Ｒ、Ｈ１２８Ｙ、Ｈ１３１Ｒ、Ｌ１３２Ｐ、Ｋ１３３Ｅ、Ｌ１３４Ｐ、Ｆ１３５Ｐ、Ｆ１３５Ｌ、Ｆ１３５Ｓ、Ｆ１３５Ｖ、Ｖ１３６Ｍ、Ｔ１３７Ｒ、Ｒ１３８Ｇ、Ｒ１３８Ｉ、Ｉ１３９Ｔ、Ｉ１３９Ｖ、Ｍ１４０Ｉ、Ｍ１４０Ｖ、Ｑ１４１Ｒ、Ｄ１４２Ｇ、Ｆ１４３Ｓ、Ｆ１４３Ｌ、Ｅ１４４Ｇ、Ｄ１４６Ｇ、Ｔ１４７Ａ、Ｆ１４８Ｓ、Ｆ１４８Ｌ、Ｆ１４９Ｌ、Ｐ１５０Ｌ、Ｅ１５１Ｇ、Ｉ１５２Ｖ、Ｄ１５３Ａ、Ｄ１５３Ｇ、Ｅ１５５Ｇ、Ｋ１５６Ｒ、Ｙ１５７Ｒ、Ｙ１５７Ｃ、Ｋ１５８Ｅ、Ｋ１５８Ｒ、Ｌ１５９Ｐ、Ｌ１６０Ｐ、Ｅ１６２Ｇ、Ｙ１６３Ｃ、Ｖ１６６Ａ、Ｓ１６８Ｃ、Ｄ１６９Ｇ、Ｖ１７０Ａ、Ｑ１７１Ｒ、Ｅ１７２Ｇ、Ｅ１７３Ｇ、Ｅ１７３Ａ、Ｋ１７４Ｒ、Ｉ１７６Ａ、Ｉ１７６Ｆ、Ｉ１７６Ｔ、Ｋ１７７Ｅ、Ｋ１７７Ｒ、Ｙ１７８Ｃ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８０Ｌ、Ｅ１８１Ｇ、Ｖ１８２Ａ、Ｙ１８３Ｃ、Ｙ１８３Ｈ、Ｅ１８４Ｒ、Ｅ１８４Ｇ、Ｋ１８５Ｒ、Ｋ１８５ｄｅｌ、Ｋ１８５Ｅ、Ｎ１８６Ｓ、Ｎ１８６Ｄ、Ｄ１８７Ｇ、及びＤ１８７Ｎから選択される少なくとも１つの変異を有する変異タンパク質を含む、請求項３８の免疫細胞。

【請求項４０】

特定の個々の対象に関して、自己、同種、同系、または異種である、請求項３９に記載の免疫細胞。

【請求項４１】

対象の腫瘍体積または腫瘍量の低減方法であって、請求項１～２４のいずれかの組成物、請求項２５～３１のいずれかのポリヌクレオチド、請求項３２～３５のいずれかのベクター、または請求項３６～４０のいずれかの免疫細胞と前記対象を接触させることを含む、前記低減方法。

【請求項４２】

対象における抗腫瘍免疫応答の提供方法であって、有効量の、請求項１～２４のいずれ

かの組成物、請求項２５～３１のいずれかのポリヌクレオチド、請求項３２～３５のいずれかのベクターまたは請求項３６～４０のいずれかの免疫細胞を前記対象に投与することを含む、前記提供方法。
【請求項４３】
対象における免疫応答の誘導方法であって、有効量の、請求項１～２４のいずれかの組成物、請求項２５～３１のいずれかのポリヌクレオチド、請求項３２～３５のいずれかのベクターまたは請求項３６～４０のいずれかの免疫細胞を前記対象に投与することを含む、前記誘導方法。
【請求項４４】
Ｔ細胞枯渇の予防または逆転をそれを必要とする対象において行う方法であって、前記方法が、治療有効量の、請求項１～２４のいずれかの組成物、請求項２５～３１のいずれかのポリヌクレオチド、請求項３２～３５のいずれかのベクター、請求項３６～４０のいずれかの免疫細胞を前記対象に投与することを含み、前記ＳＲＥが、刺激に応答し、免疫療法薬の発現及び／または機能を調整し、それによりＴ細胞枯渇を予防または逆転させる、前記予防または逆転方法。
【請求項４５】
前記免疫療法薬がキメラ抗原受容体である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記キメラ抗原受容体が、ＧＤ２　ＣＡＲ、ＢＣＭＡ　ＣＡＲ、ＣＤ３３　ＣＡＲ、Ｈｅｒ２　ＣＡＲ、ＡＬＫ　ＣＡＲ、ＣＤ２２　ＣＡＲ、またはＣＤ２７６　ＣＡＲである、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
哺乳類におけるがんの存在の検出方法であって、
（ａ）前記哺乳類由来の１つ以上の細胞を含む試料を、請求項１～２４のいずれかの組成物、請求項２５～３１のいずれかのポリヌクレオチド、請求項３２～３５のいずれかのベクター、または請求項３６～４０のいずれかの免疫細胞と接触させる工程、及び
（ｂ）複合体を検出する工程であって、前記複合体の検出が、前記哺乳類における前記がんの存在を示す、前記工程
を含む、前記検出方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ　ａｎｄ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙと題する２０１７年３月３日に出願された米国仮特許出願第６２／４６６，６０１号、Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ　ａｎｄ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙと題する２０１７年４月１１日に出願された米国仮特許出願第６２／４８４，０６３号、及びＣｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ　ａｎｄ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙと題する２０１７年８月８日に出願された米国仮特許出願第６２／５４２，４０２号に対する優先権を主張し、これらの各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。
【０００２】
配列表
本出願を、電子形式の配列表とともに提出する。配列表は、２０１８年３月２日に作成されたファイルサイズ１，５６６，１８９バイトの２０９５＿１２０７ＰＣＴ＿ＳＬ．ｔｘｔという名称のファイルとして提供する。配列表の電子形式の情報は、その全体を参照により本明細書に援用する。
【０００３】
本発明は、免疫療法のための組成物及び方法に関する。本発明において提供するものには、がん免疫療法で使用するための、生体回路系、エフェクターモジュール、刺激応答エ

レメント（ＳＲＥ）及び免疫療法薬のポリペプチド、それをコードするポリヌクレオチド、それらのポリペプチド及び／またはポリヌクレオチドを含むベクター及び細胞が含まれる。一実施形態では、組成物は、タンパク質の安定性を調整する不安定化ドメイン（ＤＤ）を含む。

【背景技術】

【０００４】

がん免疫療法は、腫瘍反応性免疫細胞、主にＴ細胞の殺腫瘍機能を若返らせることにより、がん細胞を根絶することを目的とする。抗腫瘍免疫エフェクター細胞を増加させることができるチェックポイント遮断、養子細胞移入（ＡＣＴ）及びがんワクチンの最近の開発を含むがん免疫療法の戦略は、いくつかの腫瘍で顕著な結果を生み出している。

【０００５】

宿主の抗腫瘍免疫及びがん免疫療法の影響は、３つの主要なハードルによって妨げられている：１）クローン欠失により、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数が少ない；２）腫瘍微小環境における自然免疫細胞の不十分な活性化と免疫寛容原性抗原提示細胞の蓄積；及び３）免疫抑制性の腫瘍微小環境の形成。特に、固形腫瘍では、免疫抑制性の腫瘍微小環境における有効な抗腫瘍応答が欠如するため、免疫療法レジメンの治療効果は依然として不十分である。多くの場合、腫瘍細胞は免疫寛容または免疫抑制を誘発し、真に外来性の腫瘍抗原であっても免疫寛容になるため、そのような免疫寛容は獲得される。がんワクチンとプレ活性化免疫エフェクター細胞（Ｔ細胞など）の養子移植は、腫瘍微小環境（ＴＭＥ）の阻害因子による抑制を受けるため、そのような免疫寛容はまた、活性かつ支配的でもある。

【０００６】

さらに、改変型Ｔ細胞の投与は、オンターゲット毒性／オフターゲット毒性及びサイトカイン放出症候群を招く可能性がある（Ｔｅｙ　Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２０１４，３：ｅ１７　１０．１０３８に概説）。

【０００７】

有害事象の場合には、トランスジェニック免疫療法薬の発現をオンまたはオフにできる調整可能なスイッチの開発が必要である。例えば、養子細胞療法の半減期は、非常に長く、不確定な場合がある。毒性は進行性である可能性があるため、注入した細胞を除去する安全スイッチが望まれる。トランスジェニックタンパク質レベルと発現ウィンドウを高い柔軟性で調整できるシステムと方法は、治療効果を高め、潜在的な副作用を低減することができる。

【０００８】

疾患治療、特にがん免疫療法のための調節可能な治療薬を開発するために、本発明は、免疫治療薬の発現を制御する生体回路系を提供する。生体回路系は、刺激と、その刺激に応答する少なくとも１つのエフェクターモジュールを備える。エフェクターモジュールは、刺激と結合し、刺激に応答する刺激応答エレメント（ＳＲＥ）、及びＳＲＥに作動可能に連結した免疫療法薬を含み得る。一実施例では、ＳＲＥは、その特異的リガンドの非存在下で不安定化され、その特異的リガンドに結合することにより安定化され得る不安定化ドメイン（ＤＤ）である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明は、免疫療法のための組成物及び方法を提供する。組成物は、細胞内または対象内で抗がん免疫応答を誘導する調整可能な系及び薬剤に関する。調整可能な系及び薬剤は、少なくとも１つの刺激に応答する少なくとも１つのエフェクターモジュールを含む生体回路系であってもよい。生体回路系は、不安定化ドメイン（ＤＤ）生体回路系、二量体化生体回路系、受容体生体回路系、及び細胞生体回路系であってもよいが、これらに限定されない。これらの系は、２０１６年４月１１日に出願された共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号、２０１７年３月３日に出願された第６２／４６６，５９６号及び国際

公開ＷＯ２０１７／１８０５８７でさらに教示されている（これらの各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【００１０】

いくつかの実施形態では、免疫応答を誘導するための組成物は、第１のエフェクターモジュールを含み得る。いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは、少なくとも１つのペイロードに作動可能に連結した第１の刺激応答エレメント（ＳＲＥ）を備えていてもよい。一態様では、ペイロードは免疫療法薬であってもよい。

【００１１】

いくつかの実施形態では、免疫療法薬は、サイトカイン、安全スイッチ、調節スイッチ、キメラ抗原受容体及びその組み合わせから選択され得るが、これらに限定されない。

【００１２】

一態様では、組成物の第１のＳＲＥは、少なくとも１つの刺激に応答するか、または相互作用し得る。

【００１３】

いくつかの実施形態では、第１のＳＲＥは不安定化ドメイン（ＤＤ）を含み得る。ＤＤは、親タンパク質、または親タンパク質と比較して１つ、２つ、３つ、またはそれ以上のアミノ酸変異を有する変異タンパク質に由来し得る。いくつかの実施形態では、親タンパク質は、配列番号３のアミノ酸配列を有するヒトタンパク質ＦＫＢＰ；配列番号２のアミノ酸配列を有するヒトＤＨＦＲ（ｈＤＨＦＲ）；配列番号１のアミノ酸配列を有するＥ．ｃｏｌｉ　ＤＨＦＲ；配列番号４のアミノ酸配列を有するＰＤＥ５；配列番号５のアミノ酸配列を有するＰＰＡＲγ；配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＡ２；または配列番号７のアミノ酸配列を有するＮＱＯ２から選択され得るが、これらに限定されない。

【００１４】

一態様では、親タンパク質はｈＤＨＦＲであり、ＤＤは、Ｍ１ｄｅｌ、Ｖ２Ａ、Ｃ７Ｒ、Ｉ８Ｖ、Ｖ９Ａ、Ａ１０Ｔ、Ａ１０Ｖ、Ｑ１３Ｒ、Ｎ１４Ｓ、Ｇ１６Ｓ、Ｉ１７Ｎ、Ｉ１７Ｖ、Ｋ１９Ｅ、Ｎ２０Ｄ、Ｇ２１Ｔ、Ｇ２１Ｅ、Ｄ２２Ｓ、Ｌ２３Ｓ、Ｐ２４Ｓ、Ｌ２８Ｐ、Ｎ３０Ｄ、Ｎ３０Ｈ、Ｎ３０Ｓ、Ｅ３１Ｇ、Ｅ３１Ｄ、Ｆ３２Ｍ、Ｒ３３Ｇ、Ｒ３３Ｓ、Ｆ３５Ｌ、Ｑ３６Ｒ、Ｑ３６Ｓ、Ｑ３６Ｋ、Ｑ３６Ｆ、Ｒ３７Ｇ、Ｍ３８Ｖ、Ｍ３８Ｔ、Ｔ４０Ａ、Ｖ４４Ａ、Ｋ４７Ｒ、Ｎ４９Ｓ、Ｎ４９Ｄ、Ｍ５３Ｔ、Ｇ５４Ｒ、Ｋ５６Ｅ、Ｋ５６Ｒ、Ｔ５７Ａ、Ｆ５９Ｓ、Ｉ６１Ｔ、Ｋ６４Ｒ、Ｎ６５Ａ、Ｎ６５Ｓ、Ｎ６５Ｄ、Ｎ６５Ｆ、Ｌ６８Ｓ、Ｋ６９Ｅ、Ｋ６９Ｒ、Ｒ７１Ｇ、Ｉ７２Ｔ、Ｉ７２Ａ、Ｉ７２Ｖ、Ｎ７３Ｇ、Ｌ７４Ｎ、Ｖ７５Ｆ、Ｒ７８Ｇ、Ｌ８０Ｐ、Ｋ８１Ｒ、Ｅ８２Ｇ、Ｈ８８Ｙ、Ｆ８９Ｌ、Ｒ９２Ｇ、Ｓ９３Ｇ、Ｓ９３Ｒ、Ｌ９４Ａ、Ｄ９６Ｇ、Ａ９７Ｔ、Ｌ９８Ｓ、Ｋ９９Ｇ、Ｋ９９Ｒ、Ｌ１００Ｐ、Ｅ１０２Ｇ、Ｑ１０３Ｒ、Ｐ１０４Ｓ、Ｅ１０５Ｇ、Ａ１０７Ｔ、Ａ１０７Ｖ、Ｎ１０８Ｄ、Ｋ１０９Ｅ、Ｋ１０９Ｒ、Ｖ１１０Ａ、Ｄ１１１Ｎ、Ｍ１１２Ｔ、Ｍ１１２Ｖ、Ｖ１１３Ａ、Ｗ１１４Ｒ、Ｉ１１５Ｖ、Ｖ１１６Ｉ、Ｇ１１７Ｄ、Ｖ１２１Ａ、Ｙ１２２Ｃ、Ｙ１２２Ｄ、Ｙ１２２Ｉ、Ｋ１２３Ｒ、Ｋ１２３Ｅ、Ａ１２５Ｆ、Ｍ１２６Ｉ、Ｎ１２７Ｒ、Ｎ１２７Ｓ、Ｎ１２７Ｙ、Ｈ１２８Ｒ、Ｈ１２８Ｙ、Ｈ１３１Ｒ、Ｌ１３２Ｐ、Ｋ１３３Ｅ、Ｌ１３４Ｐ、Ｆ１３５Ｐ、Ｆ１３５Ｌ、Ｆ１３５Ｓ、Ｆ１３５Ｖ、Ｖ１３６Ｍ、Ｔ１３７Ｒ、Ｒ１３８Ｇ、Ｒ１３８Ｉ、Ｉ１３９Ｔ、Ｉ１３９Ｖ、Ｍ１４０Ｉ、Ｍ１４０Ｖ、Ｑ１４１Ｒ、Ｄ１４２Ｇ、Ｆ１４３Ｓ、Ｆ１４３Ｌ、Ｅ１４４Ｇ、Ｄ１４６Ｇ、Ｔ１４７Ａ、Ｆ１４８Ｓ、Ｆ１４８Ｌ、Ｆ１４９Ｌ、Ｐ１５０Ｌ、Ｅ１５１Ｇ、Ｉ１５２Ｖ、Ｄ１５３Ａ、Ｄ１５３Ｇ、Ｅ１５５Ｇ、Ｋ１５６Ｒ、Ｙ１５７Ｒ、Ｙ１５７Ｃ、Ｋ１５８Ｅ、Ｋ１５８Ｒ、Ｌ１５９Ｐ、Ｌ１６０Ｐ、Ｅ１６２Ｇ、Ｙ１６３Ｃ、Ｖ１６６Ａ、Ｓ１６８Ｃ、Ｄ１６９Ｇ、Ｖ１７０Ａ、Ｑ１７１Ｒ、Ｅ１７２Ｇ、Ｅ１７３Ｇ、Ｅ１７３Ａ、Ｋ１７４Ｒ、Ｉ１７６Ａ、Ｉ１７６Ｆ、Ｉ１７６Ｔ、Ｋ１７７Ｅ、Ｋ１７７Ｒ、Ｙ１７８Ｃ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８０Ｌ、Ｅ１８１Ｇ、Ｖ１８２Ａ、Ｙ１８３Ｃ、Ｙ１８３Ｈ、Ｅ１８４Ｒ、Ｅ１８４Ｇ、Ｋ１８５Ｒ、Ｋ１８５ｄｅｌ、Ｋ１８５Ｅ、Ｎ１８６Ｓ、Ｎ１８６Ｄ、Ｄ１８７Ｇ、及びＤ１８７Ｎから選択される少なくとも１つの変異を有する変異タンパク質を含む。

【００１５】
一態様では、ＳＲＥの刺激は、トリメトプリムまたはメトトレキサートであってもよい。
【００１６】
いくつかの実施形態では、免疫療法薬はサイトカインであってもよい。一態様では、サイトカインは、インターロイキン、インターフェロン、腫瘍壊死因子、トランスフォーミング増殖因子Ｂ、ＣＣケモカイン、ＣＸＣケモカイン、ＣＸ３Ｃケモカインまたは増殖因子であってもよい。いくつかの実施形態では、サイトカインはインターロイキンである。いくつかの実施形態では、インターロイキンは、ＩＬ１、ＩＬ１－α、ＩＬ１－β、ＩＬ１－δ、ＩＬ１－ε、ＩＬ１－η、ＩＬ１－ζ、ＩＬ－ＲＡ、ＩＬ２、ＩＬ３、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ７、ＩＬ８、ＩＬ９、ＩＬ１０、ＩＬ１０Ｃ、ＩＬ１０Ｄ、ＩＬ１１ａ、ＩＬ１１ｂ、ＩＬ１３、ＩＬ１４、ＩＬ１６、ＩＬ１７、ＩＬ－１７Ａ、ＩＬ１７Ｂ、ＩＬ１７Ｃ、ＩＬ１７Ｅ、ＩＬ１７Ｆ、ＩＬ１８、ＩＬ１９、ＩＬ２０、ＩＬ２０Ｌ、ＩＬ２１、ＩＬ２２、ＩＬ２３、ＩＬ２３Ａ、ＩＬ２４、ＩＬ２５、ＩＬ２６、ＩＬ２７、ＩＬ２８、ＩＬ２９、ＩＬ３０、ＩＬ３１、ＩＬ３２、ＩＬ３３、ＩＬ３４、ＩＬ３６α、ＩＬ３６β、ＩＬ３６γ、ＩＬ３６ＲＮ、ＩＬ３７、ＩＬ３７ａ、ＩＬ３７ｂ、ＩＬ３７ｃ、Ｉｌ３７ｄ、ＩＬ３７ｅ、及びＩＬ３８からなる群から選択される。
【００１７】
一態様では、インターロイキンは、配列番号５１のアミノ酸配列を有するＩＬ２であってもよい。
【００１８】
一態様では、免疫療法薬は安全スイッチであってもよい。いくつかの実施形態では、安全スイッチは、カスパーゼ９、誘導性ＦＡＳ（ｉＦＡＳ）、誘導性カスパーゼ９（ｉｃａｓｐ９）、ＣＤ２０／抗ＣＤ２０抗体ペア、タンパク質タグ／抗タグ抗体、及び小型自殺遺伝子（ＲＱＲ８）から選択され得る。一態様では、安全スイッチは、配列番号６５のアミノ酸配列を有するカスパーゼ９であってもよい。
【００１９】
一態様では、免疫療法薬は調節スイッチをコードし得る。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、ＦＯＸＰ３、Ｎｒ４ａ、ＦＯＸＯ、及びＮＦ－κＢから選択され得る。一態様では、調節スイッチは、配列番号１０３～１０６のアミノ酸配列を有するＦＯＸＰ３であってもよい。
【００２０】
一態様では、免疫療法薬はキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）であってもよい。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、ＧＤ２　ＣＡＲ、Ｈｅｒ２　ＣＡＲ、ＢＣＭＡ　ＣＡＲ、ＣＤ３３　ＣＡＲ、ＡＬＫ　ＣＡＲ、ＣＤ２２　ＣＡＲ、及びＣＤ２７６　ＣＡＲから選択され得る。本明細書に記載のＣＡＲは、細胞外部分、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、及び場合により１つ以上の共刺激ドメインを含み得る。
【００２１】
一態様では、ＣＡＲは、標準ＣＡＲ、スプリットＣＡＲ、オフスイッチＣＡＲ、オンスイッチＣＡＲ、第１世代ＣＡＲ、第２世代ＣＡＲ、第３世代ＣＡＲ、または第４世代ＣＡＲから選択され得るが、これらに限定されない。
【００２２】
いくつかの実施形態では、ＣＡＲの細胞外標的部分は、Ｉｇ　ＮＡＲ、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ）’２フラグメント、Ｆ（ａｂ）’３フラグメント、Ｆｖ、単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、ｂｉｓ－ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）２、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、細胞内抗体、ジスルフィド安定化ＦｖタンパクＦｖ（ｄｓＦｖ）、ユニボディ、ナノボディ、及び目的のタンパク質、リガンド、受容体、受容体断片またはペプチドアプタマーのいずれかに特異的に結合し得る抗体に由来する抗原結合領域から選択され得るが、これらに限定されない。
【００２３】

いくつかの実施形態では、細胞外標的部分は、配列番号２４２～２５７及び４２２～４２９のアミノ酸配列を有するＡＬＫ標的部分、配列番号２５８～２６２及び４３０～４３２のアミノ酸配列を有するＣＤ２２標的部分、配列番号２６３～２７０及び４３３～４３６のアミノ酸配列を有するＣＤ２７６標的部分、配列番号２７１～３４９及び４３７～４６５のアミノ酸配列を有するＧＤ２標的部分、配列番号３５０～３５７のアミノ酸配列を有するＣＤ３３標的部分、配列番号３５８～３６５のアミノ酸配列を有するＢＣＭＡ標的部分、ならびに配列番号３６６～４２１及び４６６～４７３のアミノ酸配列を有するＨｅｒ２標的部分から選択され得る。

【００２４】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、Ｔ細胞受容体ＣＤ３ζか、または、ＦｃＲγ、ＦｃＲβ、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、及びＣＤ６６ｄからなる群から選択される細胞表面分子に由来し得る。

【００２５】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、共刺激ドメインを含み得る。共刺激ドメインは、２Ｂ４、ＨＶＥＭ、ＩＣＯＳ、ＬＡＧ３、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、グルココルチコイド誘発腫瘍壊死因子受容体（ＧＩＴＲ）、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、及びＢ７－Ｈ３からなる群から選択され得る。

【００２６】

一実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、膜貫通ドメインに由来し得る。一態様では、膜貫通ドメインは、配列番号５２７～６２４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し得るが、これらに限定されない。

【００２７】

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールのＣＡＲは、膜貫通ドメインの近くにヒンジ領域をさらに含み得る。一態様では、ヒンジ領域は、配列番号６２８～６９４のいずれかからなる群から選択されるアミノ酸配列を有し得る。

【００２８】

一態様では、第１のエフェクターモジュールは、配列番号５２～５４のいずれかのアミノ酸配列を有するＩＬ２－ＤＤを含み得る。

【００２９】

一態様では、第１のエフェクターモジュールは、配列番号７２～８０のいずれかのアミノ酸配列を有するカスパーゼ９－ＤＤを含み得る。

【００３０】

一態様では、第１のエフェクターモジュールは、配列番号１０７～１１６のいずれかのアミノ酸配列を有するＦＯＸＰ３－ＤＤを含み得る。

【００３１】

一態様では、第１のエフェクターモジュールは、配列番号７７５～７７７のいずれかのアミノ酸配列を有するＢＣＭＡ　ＣＡＲ－ＤＤを含み得る。

【００３２】

一態様では、第１のエフェクターモジュールは、配列番号９０６のいずれかのアミノ酸配列を有するＨＥＲ２－ＤＤを含み得る。

【００３３】

本発明はまた、本発明の組成物をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【００３４】

一態様では、ポリヌクレオチドは、ＤＮＡまたはＲＮＡ分子であってもよい。一態様では、ポリヌクレオチドは、時空間的に選択されたコドンを含み得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはＲＮＡ分子であってもよい。一態様では、ＲＮＡ分子はメッセンジャー分子であってもよい。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子は化学的に修飾され

ていてもよい。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、時空間的に選択されたコドンを含み得る。

【００３５】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、プロモーター、リンカー、シグナルペプチド、タグ、切断部位、及び標的化ペプチドから選択されるがこれらに限定されない少なくとも１つの追加の特徴をさらに含み得る。

【００３６】

本発明はまた、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。一態様では、ベクターはウイルスベクターであってもよい。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、組換えＡＡＶベクター、アデノウイルスベクター、及び腫瘍溶解性ウイルスベクターであってもよい。

【００３７】

本発明はまた、本発明の組成物、本明細書に記載のポリヌクレオチドを発現し得る養子細胞移入（ＡＣＴ）用の免疫細胞を提供する。一態様では、免疫細胞を、本明細書に記載のベクターで感染させるか、または形質移入してもよい。ＡＣＴ用の免疫細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＮＫＴ細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、メモリーＴ細胞、調節性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞、サイトカイン誘導性キラー（ＣＩＫ）細胞、樹状細胞、ヒト胚性幹細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、またはその混合物から選択され得るが、これらに限定されない。

【００３８】

一態様では、免疫細胞は、不安定化ドメインＤＤを有してもよく、その場合、ＤＤは、配列番号３のアミノ酸配列を有するヒトタンパク質ＦＫＢＰ、配列番号１～２のアミノ酸配列を有するＤＨＦＲ、配列番号４のアミノ酸配列を有するＰＤＥ５、配列番号５のアミノ酸配列を有するＰＰＡＲγ、配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＡ２及び配列番号７のアミノ酸配列を有するＮＱＯ２に由来する。

【００３９】

一態様では、ＤＤは親タンパク質に由来してもよく、親タンパク質はｈＤＨＦＲであり、ＤＤは、Ｍ１ｄｅｌ、Ｖ２Ａ、Ｃ７Ｒ、Ｉ８Ｖ、Ｖ９Ａ、Ａ１０Ｔ、Ａ１０Ｖ、Ｑ１３Ｒ、Ｎ１４Ｓ、Ｇ１６Ｓ、Ｉ１７Ｎ、Ｉ１７Ｖ、Ｋ１９Ｅ、Ｎ２０Ｄ、Ｇ２１Ｔ、Ｇ２１Ｅ、Ｄ２２Ｓ、Ｌ２３Ｓ、Ｐ２４Ｓ、Ｌ２８Ｐ、Ｎ３０Ｄ、Ｎ３０Ｈ、Ｎ３０Ｓ、Ｅ３１Ｇ、Ｅ３１Ｄ、Ｆ３２Ｍ、Ｒ３３Ｇ、Ｒ３３Ｓ、Ｆ３５Ｌ、Ｑ３６Ｒ、Ｑ３６Ｓ、Ｑ３６Ｋ、Ｑ３６Ｆ、Ｒ３７Ｇ、Ｍ３８Ｖ、Ｍ３８Ｔ、Ｔ４０Ａ、Ｖ４４Ａ、Ｋ４７Ｒ、Ｎ４９Ｓ、Ｎ４９Ｄ、Ｍ５３Ｔ、Ｇ５４Ｒ、Ｋ５６Ｅ、Ｋ５６Ｒ、Ｔ５７Ａ、Ｆ５９Ｓ、Ｉ６１Ｔ、Ｋ６４Ｒ、Ｎ６５Ａ、Ｎ６５Ｓ、Ｎ６５Ｄ、Ｎ６５Ｆ、Ｌ６８Ｓ、Ｋ６９Ｅ、Ｋ６９Ｒ、Ｒ７１Ｇ、Ｉ７２Ｔ、Ｉ７２Ａ、Ｉ７２Ｖ、Ｎ７３Ｇ、Ｌ７４Ｎ、Ｖ７５Ｆ、Ｒ７８Ｇ、Ｌ８０Ｐ、Ｋ８１Ｒ、Ｅ８２Ｇ、Ｈ８８Ｙ、Ｆ８９Ｌ、Ｒ９２Ｇ、Ｓ９３Ｇ、Ｓ９３Ｒ、Ｌ９４Ａ、Ｄ９６Ｇ、Ａ９７Ｔ、Ｌ９８Ｓ、Ｋ９９Ｇ、Ｋ９９Ｒ、Ｌ１００Ｐ、Ｅ１０２Ｇ、Ｑ１０３Ｒ、Ｐ１０４Ｓ、Ｅ１０５Ｇ、Ａ１０７Ｔ、Ａ１０７Ｖ、Ｎ１０８Ｄ、Ｋ１０９Ｅ、Ｋ１０９Ｒ、Ｖ１１０Ａ、Ｄ１１１Ｎ、Ｍ１１２Ｔ、Ｍ１１２Ｖ、Ｖ１１３Ａ、Ｗ１１４Ｒ、Ｉ１１５Ｖ、Ｖ１１６Ｉ、Ｇ１１７Ｄ、Ｖ１２１Ａ、Ｙ１２２Ｃ、Ｙ１２２Ｄ、Ｙ１２２Ｉ、Ｋ１２３Ｒ、Ｋ１２３Ｅ、Ａ１２５Ｆ、Ｍ１２６Ｉ、Ｎ１２７Ｒ、Ｎ１２７Ｓ、Ｎ１２７Ｙ、Ｈ１２８Ｒ、Ｈ１２８Ｙ、Ｈ１３１Ｒ、Ｌ１３２Ｐ、Ｋ１３３Ｅ、Ｌ１３４Ｐ、Ｆ１３５Ｐ、Ｆ１３５Ｌ、Ｆ１３５Ｓ、Ｆ１３５Ｖ、Ｖ１３６Ｍ、Ｔ１３７Ｒ、Ｒ１３８Ｇ、Ｒ１３８Ｉ、Ｉ１３９Ｔ、Ｉ１３９Ｖ、Ｍ１４０Ｉ、Ｍ１４０Ｖ、Ｑ１４１Ｒ、Ｄ１４２Ｇ、Ｆ１４３Ｓ、Ｆ１４３Ｌ、Ｅ１４４Ｇ、Ｄ１４６Ｇ、Ｔ１４７Ａ、Ｆ１４８Ｓ、Ｆ１４８Ｌ、Ｆ１４９Ｌ、Ｐ１５０Ｌ、Ｅ１５１Ｇ、Ｉ１５２Ｖ、Ｄ１５３Ａ、Ｄ１５３Ｇ、Ｅ１５５Ｇ、Ｋ１５６Ｒ、Ｙ１５７Ｒ、Ｙ１５７Ｃ、Ｋ１５８Ｅ、Ｋ１５８Ｒ、Ｌ１５９Ｐ、Ｌ１６０Ｐ、Ｅ１６２Ｇ、Ｙ１６３Ｃ、Ｖ１６６Ａ、Ｓ１６８

Ｃ、Ｄ１６９Ｇ、Ｖ１７０Ａ、Ｑ１７１Ｒ、Ｅ１７２Ｇ、Ｅ１７３Ｇ、Ｅ１７３Ａ、Ｋ１７４Ｒ、Ｉ１７６Ａ、Ｉ１７６Ｆ、Ｉ１７６Ｔ、Ｋ１７７Ｅ、Ｋ１７７Ｒ、Ｙ１７８Ｃ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８０Ｌ、Ｅ１８１Ｇ、Ｖ１８２Ａ、Ｙ１８３Ｃ、Ｙ１８３Ｈ、Ｅ１８４Ｒ、Ｅ１８４Ｇ、Ｋ１８５Ｒ、Ｋ１８５ｄｅｌ、Ｋ１８５Ｅ、Ｎ１８６Ｓ、Ｎ１８６Ｄ、Ｄ１８７Ｇ、及びＤ１８７Ｎから選択される少なくとも１つの変異を有する変異タンパク質を含む。

【００４０】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、特定の個々の対象に関して、自己、同種、同系、または異種であってもよい。

【００４１】

本発明は、対象を本発明の免疫細胞と接触させることを含む、対象の腫瘍体積または腫瘍量を減少させる方法を提供する。また、本明細書において、系の免疫細胞を対象に投与することを含む、対象における抗腫瘍免疫応答の誘導方法を提供する。

【００４２】

本明細書ではまた、対象に免疫応答を誘導し、本発明の組成物、本発明のポリヌクレオチド、及び／または本発明の免疫細胞を対象に投与する方法も提供する。

【００４３】

本発明はまた、それを必要とする対象におけるＴ細胞の枯渇の予防または逆転方法を提供する。そのような方法は、治療有効量の本明細書に記載の組成物、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、または本明細書に記載の免疫細胞を対象に投与することを含み得る。そのような方法は、刺激に応答し、免疫療法薬の発現及び／または機能を調整し、それによりＴ細胞の枯渇を予防または逆転させるＳＲＥを含み得る。

【００４４】

いくつかの態様では、免疫療法薬はキメラ抗原受容体である。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、ＧＤ２　ＣＡＲ、ＢＣＭＡ　ＣＡＲ、ＣＤ３３　ＣＡＲ、Ｈｅｒ２　ＣＡＲ、ＡＬＫ　ＣＡＲ、ＣＤ２２　ＣＡＲ、またはＣＤ２７６　ＣＡＲであってもよい。

【００４５】

また、本明細書において、（ａ）哺乳類由来の１つ以上の細胞を含む試料を、本発明の組成物、ポリヌクレオチド、ベクターまたは免疫細胞と接触させ、（ｂ）複合体を検出する工程を含む、哺乳類におけるがんの検出方法を提供し、複合体の検出は、哺乳類におけるがんの存在を示し得る。

【００４６】

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは、刺激応答エレメント（ＳＲＥ）と、目的タンパク質（ＰＯＩ）を含む少なくとも１つのペイロードとを含む。

【００４７】

いくつかの実施形態では、ＳＲＥは不安定化ドメイン（ＤＤ）であってもよい。いくつかの実施例では、ＤＤは、タンパク質、例えば、ＦＫＢＰ（ＦＫ５０６結合タンパク質）、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＨＦＲ（ジヒドロ葉酸還元酵素）（ｅｃＤＨＦＲ）、ヒトＤＨＦＲ（ｈＤＨＦＲ）、または任意の目的タンパク質に由来する変異型ドメインである。これに関連して、生体回路系はＤＤ生体回路系である。

【００４８】

ペイロードは、がん免疫療法に使用する免疫療法薬、例えば、ＩＬ２などのサイトカイン、カスパーゼ９などの安全スイッチ、ＦＯＸＰ３をコードする調節スイッチ、ＢＣＭＡ　ＣＡＲ、ＣＤ３３　ＣＡＲ、ＧＤ２　ＣＡＲ、Ｈｅｒ２　ＣＡＲ、ＡＬＫ　ＣＡＲ、ＣＤ２２　ＣＡＲ、ＣＤ２７６　ＣＡＲなどのキメラ抗原受容体、または免疫応答を誘導できる任意の薬剤であってもよい。ＳＲＥとペイロードは、１つ以上のリンカーを介して作動可能に連結させてもよく、構成要素の位置は、エフェクターモジュール内で異なり得る。

【００４９】

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは、１つ以上の追加の特徴、例えば、リンカー配列（特定の配列及び長さを有する）、切断部位、調節エレメント（マイクロＲＮＡ標的部位などの目的タンパク質の発現を調節する）、エフェクターモジュールを特定の細胞位置または細胞内位置に導くシグナル配列、貫通配列、またはエフェクターモジュールを追跡するためのタグ及びバイオマーカーをさらに含み得る。

【００５０】

本発明は、単離された生体回路ポリペプチド、エフェクターモジュール、刺激応答エレメント（ＳＲＥ）及びペイロード、ならびに前述のいずれかをコードするポリヌクレオチド；本発明のポリヌクレオチドを含むベクター；及び本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド及びベクターを発現する細胞を提供する。ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ウイルスベクター及び細胞は、対象において抗腫瘍免疫応答を誘導するのに有用である。

【００５１】

いくつかの実施形態では、本発明のベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターには、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターが含まれ得るが、これらに限定されない。

【００５２】

いくつかの実施形態では、本発明のベクターは、ナノ粒子及びリポソームなどの非ウイルスベクターであってもよい。

【００５３】

本発明はまた、本発明の１つ以上のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはベクターを含むように改変した免疫細胞を提供する。細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、記憶Ｔ細胞、調節性Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＮＫ　Ｔ細胞、サイトカイン誘発性キラー（ＣＩＫ）細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、及び腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）などのＴ細胞を含む免疫エフェクター細胞であってもよい。改変した細胞は、疾患（例えば、がん）を治療するための養子細胞移入に使用してもよい。

【００５４】

本発明はまた、本発明の組成物を使用して対象において免疫応答を誘導する方法を提供する。また、本発明の組成物を使用して対象の腫瘍量を低減する方法、及びＴ細胞枯渇の予防または逆転方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００５５】

【図１】本発明の生体回路系の概要図を示す。生体回路は、刺激と、刺激に応答する少なくとも１つのエフェクターモジュールを備え、刺激への応答は、シグナルまたは結果を生成する。エフェクターモジュールは、少なくとも１つの刺激応答エレメント（ＳＲＥ）と１つのペイロードを含む。

【図２】１つのペイロードを保有する代表的なエフェクターモジュールを示す。シグナル配列（ＳＳ）、ＳＲＥ、及びペイロードは、切断部位なし（Ａ～Ｆ）または切断部位あり（Ｇ～Ｚ、及びＡＡ～ＤＤ）の様々な構成で位置させるか、または配置してもよい。エフェクターモジュールの各構成要素の間にオプションのリンカーを挿入してもよい。

【図３】２つのペイロードを保有し、切断部位を有さない代表的なエフェクターモジュールを示す。２つのペイロードは、互いに直接連結させても、分離させてもよい。

【図４】２つのペイロードを保有し、切断部位を有する代表的なエフェクターモジュールを示す。一実施形態では、構築物のＮ末端にＳＳを配置するが、その一方で、他の構成要素：ＳＲＥ、２つのペイロード及び切断部位は、異なる位置に配置してもよい（Ａ～Ｌ）。別の実施形態では、構築物のＮ末端に切断部位を配置する（Ｍ～Ｘ）。エフェクターモジュールの各構成要素の間にオプションのリンカーを挿入してもよい。

【図５】２つのペイロードを保有する本発明のエフェクターモジュールを示し、構築物のＮ末端にＳＲＥを配置するが（Ａ～Ｌ）、その一方で、ＳＳ、２つのペイロード及び切断部位は任意の構成とすることができる。エフェクターモジュールの各構成要素の間にオプションのリンカーを挿入してもよい。

【図６】２つのペイロードを保有する本発明のエフェクターモジュールを示し、構築物のＮ末端に、２つのペイロード（Ａ～Ｆ）または２つのペイロードのうちの１つ（Ｇ～Ｘ）のいずれかを配置し（Ａ～Ｌ）、その一方で、ＳＳ、ＳＲＥ、及び切断部位は任意の構成とすることができる。エフェクターモジュールの各構成要素の間にオプションのリンカーを挿入してもよい。
【図７】生体回路系内の刺激及びエフェクターモジュールの代表的な構成を示す。ＳＲＥに結合する遊離刺激（図７Ａ）または膜結合刺激（図７Ｂ）によって膜貫通エフェクターモジュールが活性化される。刺激に対する反応により、細胞内シグナル／ペイロードが切断され、下流のエフェクター／ペイロードが活性化される。
【図８】二重刺激－二重プレゼンター型の生体回路系を示し、２つの異なるプレゼンター（例えば、異なる細胞）に由来する２つの結合刺激（Ａ及びＢ）が単一のレシーバー（例えば、別の単一の細胞）の２つの異なるエフェクターモジュールに同時に結合し、下流のペイロードへの二重のシグナルを生成する。
【図９】二重刺激－単一プレゼンター型の生体回路系を示し、同一のプレゼンター（例えば、単一の細胞）に由来する２つの結合刺激（Ａ及びＢ）が別の単一細胞の２つの異なるエフェクターモジュールに同時に結合し、二重のシグナルを生成する。
【図１０】単一刺激－ブリッジ化レシーバー型の生体回路系を示す。この構成では、結合刺激（Ａ）がブリッジ細胞のエフェクターモジュールに結合し、シグナルを生成してペイロードを活性化し、これが最終レシーバー（たとえば、別の細胞）の別のエフェクターモジュールに対する刺激（Ｂ）となる。
【図１１】単一刺激－単一レシーバー型の生体回路系を示し、単一のレシーバーが２つのエフェクターモジュールを含み、これらが単一の刺激によって連続的に活性化される。
【図１２】二重活性化を必要とする生体回路系を示す。この実施形態では、一方の刺激が最初に膜貫通エフェクターモジュールに結合し、他方の刺激によって活性化されるレシーバー細胞を予備刺激しなければならない。レシーバーは、両方の刺激を検知した場合にのみ活性化される（Ｂ）。
【図１３】Ｓｈｉｅｌｄ－１がＤＤ－ＩＬ２レベルに及ぼす効果を示す折れ線グラフである。
【図１４】ＩＦＮγ陽性Ｔ細胞の出現頻度を示す。
【図１５Ａ－１】Ｔ細胞におけるＩＦＮγ産生を示す。
【図１５Ａ－２】Ｔ細胞におけるＩＦＮγ産生を示す。
【図１５Ｂ】ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒａ処理存在下でのＴ細胞増殖を示す。
【図１５Ｃ】ｉｎ　ｖｉｖｏ細胞移植後のヒト細胞の割合を示すドットプロットである。
【図１５Ｄ】ＣＤ４＋／ＣＤ８＋Ｔ細胞を示す散布図である。
【図１６Ａ】ＤＤ－ルシフェラーゼ発現細胞のルシフェラーゼレベルを示すウエスタンブロットである。
【図１６Ｂ】ルシフェラーゼ活性を示す。
【図１７】（図１７Ａ）ＦＯＸＰ３のＤＤ調節型発現を示すウエスタンブロットである。（図１７Ｂ）ＦＯＸＰ３のＤＤ調節型発現を示すウエスタンブロットである。
【図１８】導入遺伝子の発現に対するプロモーターの効果を表す棒グラフである。
【図１９】ｉｎ　ｖｉｖｏでのＨＣＴ１１６細胞からのＤＤ－ＩＬ２分泌のＳｈｉｅｌｄ－１調節を表す。
【図２０】異なる比率のＣＤ３／ＣＤ８ビーズで培養したＴ細胞の生存率を示す。
【図２１】リガンド処理によるＢＣＭＡ　ＣＡＲ陽性Ｔ細胞の割合を示す。
【発明を実施するための形態】
【００５６】
本発明の１つ以上の実施形態の詳細を、以下の付随する説明に記載する。本明細書に記載の材料及び方法と類似または同等の任意の材料及び方法を本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい材料及び方法を本明細書に記載する。本発明の他の特徴、目的及び利点は、記載から明らかになるであろう。記載において、文脈が明らかにそう

でないと指示しない限り、単数形は複数形も含む。他に定義されない限り、本明細書中で使用するすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有するものとする。矛盾する場合には、本記載が優先される。

【００５７】

Ｉ．序論

がん免疫療法は、がんに対する免疫系の反応性の誘導または回復を目的とする。免疫療法の研究における著しい進歩により、能動免疫療法と受動免疫療法に大まかに分類され得る様々な戦略が開発されている。一般的に、これらの戦略は、がん細胞を直接死滅させるために、または免疫抑制性の腫瘍微小環境に対抗するために利用され得る。能動免疫療法は、内在性の長期にわたる腫瘍抗原特異的免疫応答の誘導を目的とする。サイトカインなどの免疫応答修飾因子の非特異的刺激により、応答をさらに高めることができる。対照的に、受動免疫療法には、腫瘍抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞または抗体などの免疫エフェクター分子を宿主に投与するアプローチが含まれる。このアプローチは一時的なものであり、数回の施術が必要である。

【００５８】

有意な進歩にもかかわらず、現在の免疫療法戦略の有効性は、関連する毒性により制限されている。これらは多くの場合、免疫療法に関連する狭い治療期間に関連しており、部分的には、臨床的に意味のある治療効果を得るために潜在的に致命的となる毒性の限界まで治療用量を押し上げる必要性から生じている。さらに、養子移入された免疫細胞は、多くの場合、予測不能に患者内で増殖し続けるため、ｉｎ　ｖｉｖｏでは用量が増大する。

【００５９】

免疫療法に関与する主要なリスクは、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）の正常組織発現に応答したＴ細胞活性化に起因するオンターゲットではあるがオフ腫瘍である副作用である。特定のＴＡＡに対してＴ細胞受容体を発現するＴ細胞を利用した臨床試験では、免疫療法に反応した皮膚発疹、大腸炎、難聴が報告された。

【００６０】

免疫療法はまた、免疫療法に応答して腫瘍細胞が殺傷される場合に出現する、オンターゲット、オン腫瘍の毒性をもたらし得る。有害作用として、腫瘍崩壊症候群、サイトカイン放出症候群、及び関連するマクロファージ活性化症候群が挙げられる。重要なことに、これらの有害作用は、腫瘍の破壊中に発生する場合があり、したがって、オン腫瘍の免疫療法が成功しても毒性が生じる可能性がある。したがって、免疫療法を調節可能に制御するアプローチは、毒性を低減し、効力を最大化する可能性があるため、非常に望ましいものである。

【００６１】

本発明は、がん免疫療法のための系、組成物、免疫療法薬及び方法を提供する。これらの組成物は、免疫療法における遺伝子発現と機能の調整可能な調節を提供する。本発明はまた、生体回路系、エフェクターモジュール、刺激応答エレメント（ＳＲＥ）及びペイロード、ならびに前述のいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。一態様では、本発明の系、組成物、免疫療法薬及び他の構成要素は、別個に加える刺激によって制御することができ、これにより、がん免疫療法を調節するための多大な自由度を提供する。さらに、本発明の系、組成物及び方法は、化学療法薬、小分子、遺伝子治療、及び抗体などの治療薬と組み合わせてもよい。

【００６２】

本発明の系及び組成物の調整可能な性質は、免疫療法の効力及び効力の持続時間を向上させる可能性を有する。本発明の組成物を使用して養子移入された細胞の生物学的活性を可逆的にサイレンシングすることにより、回復不能に殺傷して治療を終了させることなく、細胞治療の可能性を最大化することができる。

【００６３】

本発明は、患者への投与後の免疫療法の微調整の方法を提供する。これにより、免疫療

法の安全性と有効性が向上し、免疫療法の恩恵を受け得る対象集団が増加する。

【００６４】

ＩＩ．本発明の組成物

本発明によれば、少なくとも１つのエフェクターモジュール系をコアに含む生体回路系を提供する。そのようなエフェクターモジュール系は、１つ以上の刺激応答エレメント（ＳＲＥ）に関連するか、またはそれと一体化した少なくとも１つのエフェクターモジュールを含む。本発明の生体回路系の全体的なアーキテクチャを図１に示す。一般的に、刺激応答エレメント（ＳＲＥ）を、任意の目的タンパク質（ＰＯＩ）（例えば、免疫療法薬）であり得るペイロード構築物に作動可能に連結させ、エフェクターモジュールを形成してもよい。ＳＲＥは、特定の刺激、例えば小分子によって活性化されると、シグナルまたは結果を生成し、安定化シグナルもしくは不安定化シグナル、または任意の他のタイプの調節を永続化することにより、連結されたペイロードの転写レベル及び／またはタンパク質レベルを上方または下方に調節することができる。生体回路系の詳細な説明は、２０１６年４月１１日出願の共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号、２０１７年３月３日出願の第６２／４６６，５９６号及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示されている（各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。本発明によれば、免疫療法に使用する任意の薬剤の発現レベル及び活性を調整する、生体回路系、エフェクターモジュール、ＳＲＥ、及び構成要素を提供する。

【００６５】

本明細書中で使用する場合、「生体回路」または「生体回路系」とは、刺激及び刺激に応答する少なくとも１つのエフェクターモジュールを含む、生物系内の回路または生物系内で有用な回路として定義され、その場合、刺激への応答は、生物系内、生物系間、生物系の指標として、または生物系上の少なくとも１つのシグナルまたは結果を生成する。生物系とは、一般的に、任意の細胞、組織、器官、器官系、または動物、植物、真菌、細菌、もしくはウイルスなどの生物であると理解される。また、生体回路は、本発明により示される刺激またはエフェクターモジュールを使用して、診断、レポーター系、デバイス、アッセイまたはキットなどの無細胞環境においてシグナルまたは結果を与える人工回路であってもよいことも理解される。人工回路は、１つ以上の電子、磁気、または放射性の成分または部品に関連付けてもよい。

【００６６】

本発明によれば、生体回路系は、不安定化ドメイン（ＤＤ）生体回路系、二量体化生体回路系、受容体生体回路系、及び細胞生体回路系であってもよい。これらの系のいずれかは、これらの生体回路系の任意の他のものに対するシグナルとして作用し得る。

【００６７】

免疫療法のためのエフェクターモジュール及びＳＲＥ

本発明によれば、免疫療法に使用する任意の薬剤の発現レベル及び活性を調整する生体回路系、エフェクターモジュール、ＳＲＥ、及び構成要素を提供する。非限定的な例として、免疫療法薬は、抗体及びその断片及びバリアント、がん特異的Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）及びそのバリアント、抗腫瘍特異性キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、キメラスイッチ受容体、共阻害受容体またはリガンドの阻害剤、共刺激受容体及びリガンドのアゴニスト、サイトカイン、ケモカイン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、可溶性増殖因子、代謝因子、自殺遺伝子、ホーミング受容体、または細胞及び対象に免疫応答を誘発する任意の薬剤であってもよい。

【００６８】

上述のように、本発明の生体回路は、エフェクターモジュール系の構成要素として少なくとも１つのエフェクターモジュールを含む。本明細書中で使用する場合、「エフェクターモジュール」とは、少なくとも（ａ）１つ以上の刺激応答エレメント（すなわち、目的タンパク質（ＰＯＩ））を含む単一成分または多成分の構築物または複合体である。本明細書中で使用する場合、「刺激応答エレメント（ＳＲＥ）」とは、エフェクターモジュールの１つ以上のペイロードに結合、接続、連結、または会合するエフェクターモジュール

の構成要素であり、いくつかの場合では、１つ以上の刺激に対するエフェクターモジュールの応答性を担う。本明細書中で使用する場合、刺激に対するＳＲＥの「応答性」の性質は、共有または非共有相互作用、直接的または間接的な会合、または刺激に対する構造的または化学的反応を特徴とし得る。さらに、刺激に対する任意のＳＲＥの応答は、程度または種類の問題であり得る。応答は、部分的応答であってもよい。応答は、可逆的応答であってもよい。応答は、最終的に調節されたシグナルまたは出力をもたらし得る。そのような出力シグナルは、刺激に対する相対的な性質、例えば、１％～１００％の間の変調効果、または２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍もしくはそれ以上などの倍数での増加もしくは減少であってもよい。

【００６９】

いくつかの実施形態では、本発明は、タンパク質の発現、機能またはレベルの調節方法を提供する。いくつかの態様では、タンパク質の発現、機能またはレベルの調節とは、少なくとも約２０％、例えば、少なくとも約３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、または少なくとも２０～３０％、２０～４０％、２０～５０％、２０～６０％、２０～７０％、２０～８０％、２０～９０％、２０～９５％、２０～１００％、３０～４０％、３０～５０％、３０～６０％、３０～７０％、３０～８０％、３０～９０％、３０～９５％、３０～１００％、４０～５０％、４０～６０％、４０～７０％、４０～８０％、４０～９０％、４０～９５％、４０～１００％、５０～６０％、５０～７０％、５０～８０％、５０～９０％、５０～９５％、５０～１００％、６０～７０％、６０～８０％、６０～９０％、６０～９５％、６０～１００％、７０～８０％、７０～９０％、７０～９５％、７０～１００％、８０～９０％、８０～９５％、８０～１００％、９０～９５％、９０～１００％または９５～１００％の発現、機能またはレベルの調節を指す。

【００７０】

いくつかの実施形態では、本発明は、安定化比及び不安定化比を測定することにより、タンパク質、発現、機能またはレベルを調節する方法を提供する。本明細書中で使用する場合、安定化比は、ＳＲＥに特異的な刺激の非存在下での目的タンパク質の発現、機能、またはレベルに対する、刺激に応答した目的タンパク質の発現、機能、またはレベルの比として定義され得る。いくつかの態様では、安定化比は、少なくとも１、例えば、少なくとも１～１０、１～２０、１～３０、１～４０、１～５０、１～６０、１～７０、１～８０、１～９０、１～１００、２０～３０、２０～４０、２０～５０、２０～６０、２０～７０、２０～８０、２０～９０、２０～９５、２０～１００、３０～４０、３０～５０、３０～６０、３０～７０、３０～８０、３０～９０、３０～９５、３０～１００、４０～５０、４０～６０、４０～７０、４０～８０、４０～９０、４０～９５、４０～１００、５０～６０、５０～７０、５０～８０、５０～９０、５０～９５、５０～１００、６０～７０、６０～８０、６０～９０、６０～９５、６０～１００、７０～８０、７０～９０、７０～９５、７０～１００、８０～９０、８０～９５、８０～１００、９０～９５、９０～１００または９５～１００である。本明細書中で使用する場合、不安定化比は、構成的に発現し、ＳＲＥに特異的な刺激の非存在下での目的タンパク質の発現、機能、またはレベルに対する、エフェクターモジュールに特異的な刺激の非存在下での目的タンパク質の発現、機能、またはレベルの比として定義され得る。本明細書中で使用する場合、「構成的に」とは、ＳＲＥに連結しておらず、したがって刺激の存在下及び非存在下の両方で発現する目的タンパク質の発現、機能またはレベルを指す。いくつかの態様では、不安定化率は、少なくとも０、例えば少なくとも０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、または少なくとも０～０．１、０～０．２、０～０．３、０～０．４、０～０．５、０～０．６、０～０．７、０～０．８、０～０．９、０．１～０．２、０．１～０．３、０．１～０．４、０．１～０．５、０．１～０．６、０．１～０．７、０．１～０．８、０．１～０．９、０．２～０．３、０．２～０．４、０．２～０．５、０．２～０．６、０．２～０．７、０．２～０．８、０．２～０．９、０．３～０．４、０．３～０．５、０．３～０．６、０．３～０．７、０．３～０．８、０．３～

０．９、０．４～０．５、０．４～０．６、０．４～０．７、０．４～０．８、０．４～０．９、０．５～０．６、０．５～０．７、０．５～０．８、０．５～０．９、０．６～０．７、０．６～０．８、０．６～０．９、０．７～０．８、０．７～０．９または０．８～０．９である。

【００７１】

エフェクターモジュールのＳＲＥは、ペプチド、ペプチド複合体、ペプチド－タンパク質複合体、タンパク質、融合タンパク質、タンパク質複合体、タンパク質－タンパク質複合体から選択され得るが、これらに限定されない。ＳＲＥは、任意の天然もしくは変異タンパク質、または抗体に由来する１つ以上の領域を含み得る。この態様では、ＳＲＥは刺激に応答する場合のエレメントであり、細胞内局在、分子内活性化、及び／またはペイロードの分解を調整することができる。

【００７２】

いくつかの実施形態では、本発明のエフェクターモジュールは、１つ以上のシグナル配列（ＳＳ）、１つ以上の切断及び／またはプロセシング部位、１つ以上のターゲティング及び／または貫通ペプチド、１つ以上のタグ、及び／または１つ以上のリンカーなどの、エフェクターモジュールの発現及び調節を促進する追加の特性を含み得る。さらに、本発明のエフェクターモジュールは、誘導性プロモーター、エンハンサー配列、マイクロＲＮＡ部位、及び／またはマイクロＲＮＡターゲティング部位などの他の調節部分をさらに含んでもよい。各態様または調整されたモダリティは、エフェクターモジュールまたは生体回路に差次的に調整された特性をもたらし得る。例えば、ＳＲＥは不安定化ドメインを表し得るが、一方、タンパク質ペイロードの変異は、その切断部位または二量体化特性または半減期を変化させる場合があり、１つ以上のｍｉｃｒｏＲＮＡまたはｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位を含めることにより、細胞の脱ターゲティングまたは輸送特性が付与される場合がある。結果として、本発明は、その持続可能性において多因子的な生体回路を包含する。そのような生体回路は、１つ、２つ、３つ、４つ、またはそれ以上の調整された特性を含むように設計し得る。

【００７３】

いくつかの実施形態では、本発明のエフェクターモジュールは、発現を調整するための１つ以上のデグロンを含み得る。本明細書中で使用する場合、「デグロン」とは、タンパク質分解系による認識及び分解に十分なタンパク質内の最小配列を指す。デグロンの重要な特性は、デグロンが転移可能であることであり、すなわち、デグロンを配列に付加すると、その配列は劣化する。いくつかの実施形態では、デグロンを、不安定化ドメイン、ペイロード、またはその両方に付加してもよい。本発明のエフェクターモジュール内へのデグロンの組み込みは、エフェクターモジュールにさらなるタンパク質不安定性を付与し、これを用いて基底発現を最小化させてもよい。いくつかの実施形態では、デグロンは、Ｎデグロン、ホスホデグロン、熱誘導性デグロン、感光性デグロン、酸素依存性デグロンであってもよい。非限定的な例として、デグロンは、Ｔａｋｅｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．によって記載されたオルニチンデカルボキシラーゼデグロンであってもよい（Ｔａｋｅｕｃｈｉ Ｊ ｅｔ ａｌ．（２００８）．Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．２００８ Ｍａｒ １；４１０（２）：４０１－７；その内容はその全体を参照により援用する）。本発明において有用なデグロンの他の例として、国際特許公開第ＷＯ２０１７００４０２２号、第ＷＯ２０１６２１０３４３号、及び第ＷＯ２０１１０６２９６２号に記載されているデグロンが挙げられる；各々の内容はその全体を参照により援用する。

【００７４】

図２に示すように、１つのペイロード、すなわち１つの免疫療法薬を含む代表的なエフェクターモジュールの実施形態を示す。エフェクターモジュールの各構成要素は、切断部位なし（Ａ～Ｆ）または切断部位あり（Ｇ～Ｚ、及びＡＡ～ＤＤ）の様々な構成で位置させるか、または配置してもよい。エフェクターモジュールの各構成要素の間にオプションのリンカーを挿入してもよい。

【００７５】

図３～６は、２つのペイロード、すなわち２つの免疫療法薬を含む代表的なエフェクターモジュールの実施形態を示す。いくつかの態様では、同じＳＲＥ（例えば同じＤＤ）の調節下で、エフェクターモジュールに３つ以上の免疫療法薬（ペイロード）を含めてもよい。２つ以上の薬剤は、互いに直接連結するか、分離させてもよい（図３）。ＳＲＥは、構築物のＮ末端、構築物のＣ末端、または内部位置に配置してもよい。

【００７６】

いくつかの態様では、２つ以上の免疫療法薬は、同じタイプ、例えば２つの抗体、または異なるタイプ、例えば、ＣＡＲ構築物及びサイトカインＩＬ１２であってもよい。そのようなエフェクター分子を利用する生体回路及び構成要素を、図７～１２に示す。

【００７７】

いくつかの実施形態では、本発明の生体回路を改変して、その免疫原性を低下させてもよい。免疫原性は、異物と認識される物質に対する一連の複雑な反応の結果であり、これには、中和抗体及び非中和抗体の産生、免疫複合体の形成、補体活性化、マスト細胞活性化、炎症、過敏反応、及びアナフィラキシーが含まれ得る。タンパク質の配列、投与経路及び投与頻度、ならびに患者の母集団を含むがこれらに限定されないいくつかの要因が、タンパク質の免疫原性に寄与し得る。好ましい実施形態では、本発明の組成物を修飾して、本発明の組成物の免疫原性を低下させてもよい。いくつかの実施形態では、免疫原性を低下させるための修飾には、親配列に由来するプロセシングされたペプチドの主要組織適合抗原（ＭＨＣ）タンパク質への結合を低下させる修飾が含まれ得る。例えば、いずれかの一般的なＭＨＣ対立遺伝子に対して、高親和性で結合するために最小限の数の免疫エピトープが利用可能であるように、アミノ酸修飾を設計してもよい。既知のタンパク質配列のＭＨＣ結合エピトープを同定するいくつかの方法は、当技術分野で公知であり、本発明において有用であり得る。そのような方法は、米国特許公開第ＵＳ２００２０１１９４９２号、第ＵＳ２００４０２３０３８０号、及び第ＵＳ２００６０１４８００９号に開示されており；各々の内容はその全体を参照により援用する。

【００７８】

エピトープ同定及びその後の配列改変を適用して免疫原性を低下させてもよい。免疫原性エピトープの同定は、物理的方法、または電子計算的方法を用いて達成してもよい。エピトープ同定の物理的方法には、例えば、質量分析及び組織培養／細胞技術が含まれ得る。電子計算アプローチは、抗原プロセシング、抗原ローディング及び抗原提示の情報、構造データ及び／またはプロテオミクスデータを使用して、抗原プロセシングによって産生され、ＭＨＣの溝への良好な結合特性を有する非自己ペプチドを同定する。タンパク質の発現を指揮する１つ以上の変異を本発明の生体回路に導入して、その機能を維持させつつ、同時に、同定したエピトープの免疫原性をより低下させるかまたは無効化してもよい。

【００７９】

また、タンパク質修飾を使用して、抗原プロセシングならびにペプチドローディング、例えば、グリコシル化及びＰＥＧ化を妨害してもよい。また、本発明の組成物を、非古典的なアミノ酸側鎖を含むように設計して、免疫原性の低い組成物を設計してもよい。免疫原性を低下させるための国際特許公開第ＷＯ２００５０５１９７５号において検討されている方法のいずれも、本発明において有用であり得る（その内容はその全体を参照により援用する）。

【００８０】

一実施形態では、免疫細胞によって提示される免疫原性ペプチドに従って患者を層別化してもよく、本発明の組成物に関して治療上の利益があり得る適切な患者コホートを判定するパラメーターとして利用してもよい。

【００８１】

いくつかの実施形態では、免疫原性の低下は、イムノプロテアソームプロセシングを制限することにより達成され得る。プロテアソームは重要な細胞プロテアーゼであり、２つの形態が見出されている：すべての細胞型で発現し、活性型の、例えば、触媒サブユニットを含む構成的プロテアソーム、ならびに造血系の細胞で発現し、低分子量タンパク質（

ＬＭＰ）、すなわちＬＭＰ－２、ＬＭＰ－７及びＬＭＰ－１０と呼ばれる異なる活性サブユニットを含む免疫プロテアソーム。免疫プロテアソームは、ペプチダーゼ活性の変化と切断部位選好性を示し、多くのＭＨＣクラスＩエピトープのより効率的な遊離をもたらす。免疫プロテアソームの十分に説明された機能は、ＭＨＣクラスＩ分子の溝に適合するようにプロセシングされ得る疎水性Ｃ末端を有するペプチドを生成することである。Ｄｅｏｌ　Ｐらは、免疫プロテアソームが特定のペプチド結合の頻繁な切断をもたらし、それによって抗原提示細胞の表面に特定のペプチドをより速く出現させ；そしてペプチド量を高め得ることを示した（Ｄｅｏｌ　Ｐ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１７８（１２）７５５７－７５６２；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。この研究は、免疫プロテアソームプロセシングの低下が免疫原性の低下を伴う可能性があることを示している。いくつかの実施形態では、本発明の組成物をコードする配列を改変することにより、本発明の組成物の免疫原性を低下させて、免疫プロテアソームプロセシングを防止してもよい。また、本発明の生体回路を免疫プロテアソーム選択的阻害剤と併用して、同じ効果を達成してもよい。本発明において有用な阻害剤の例として、ＵＫ－１０１（Ｂｌｉ選択的化合物）、ＩＰＳＩ－００１、ＯＮＸ０９１４（ＰＲ－９５７）、及びＰＲ－９２４（ＩＰＳＩ）が挙げられる。

【００８２】

本発明の別の実施形態は：（ａ）哺乳類由来の１つ以上の細胞を含む試料を、本発明のＣＡＲ、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、または医薬組成物のいずれかと接触させ、それにより複合体を形成し、（ｂ）複合体を検出することを含む、哺乳類におけるがんの存在の検出方法を提供し、その場合、複合体の検出は、哺乳類におけるがんの存在を示す。試料は、任意の適切な方法、例えば、生検または剖検によって取得してもよい。生検とは、個体から組織及び／または細胞を取り除くことである。そのような除去は、取り除いた組織及び／または細胞に対して実験を行うために、個体から組織及び／または細胞を採取することであってもよい。この実験はまた、個体ががんを有するか、及び／またはがんに罹っているかどうかを判定するために使用してもよい。

【００８３】

哺乳類におけるがんの存在を検出する本発明の方法の実施形態に関して、哺乳類の細胞を含む試料は、全細胞、その溶解物、または全細胞溶解物の画分、例えば、核または細胞質画分、全タンパク質画分、または核酸画分を含む試料であり得る。試料が全細胞を含む場合、細胞は哺乳類の任意の細胞、例えば、腫瘍細胞を含む任意の器官または組織の細胞であり得る。接触は、哺乳類に対してｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで起こり得る。好ましくは、接触はｉｎ　ｖｉｔｒｏである。また、複合体の検出は、当技術分野で公知の多くの方法で行うことができる。例えば、本明細書に記載の本発明のＣＡＲ、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、または医薬組成物を、検出可能な標識、例えば、放射性同位体、フルオロフォア（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、フィコエリトリン（ＰＥ））、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、及び要素粒子（例えば、金粒子）で標識することができる。標的細胞を認識する能力及び抗原特異性について本発明の組成物を試験する方法は、当技術分野で公知である。例えば、Ｃｌａｙ　ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，１６３：５０７－５１　３（１９９９）は、サイトカイン（例えば、インターフェロン－γ、顆粒球／単球コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）またはインターロイキン２（ＩＬ２））の放出の測定方法を示している。さらに、Ｚｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，１７４：４４）５－４４２３（２００５）に記載されているように、細胞傷害性の測定によって抗ＣＤ２７６物質の機能を評価することができる。

【００８４】

いくつかの実施形態では、本発明の刺激は超音波刺激であってもよい。いくつかの実施形態では、本発明のＳＲＥは、機械感受性タンパク質に由来してもよい。一実施形態では、本発明のＳＲＥは、機械的に感受性のイオンチャネル、Ｐｉｅｚｏ　１であってもよい。

【００８５】
そのような場合の目的ペイロードの発現は、集束超音波刺激を提供することにより調整される。他の実施形態では、本発明のＳＲＥはカルシウムバイオセンサーに由来してもよく、本発明の刺激はカルシウムであってもよい。カルシウムは、機械感受性イオンチャネルの超音波誘導機械刺激によって生成してもよい。イオンチャネルの超音波活性化は、カルシウムの流入を引き起こし、それによって刺激が生成される。一実施形態では、機械感受性イオンチャネルはＰｉｅｚｏ　１である。機械センサーは、体内の特定の場所に空間制御を提供することから、使用するのに有利であり得る。
【００８６】
１．不安定化ドメイン（ＤＤ）
いくつかの実施形態では、本発明の生体回路系、エフェクターモジュール、及び組成物は、免疫療法薬の抗腫瘍免疫応答のタンパク質（ペイロード）機能の翻訳後調節に関する。一実施形態では、ＳＲＥは、安定化／不安定化ドメイン（ＤＤ）である。ＤＤに結合または相互作用する小分子リガンドの存在、非存在、または量は、そのような結合または相互作用により、ペイロード（複数可）の安定性、ひいてはペイロードの機能を調節することができる。結合及び／または相互作用の程度に応じて、ペイロードの変更された機能は異なり、したがってペイロード機能の「調整」を提供し得る。
【００８７】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のまたは当技術分野で公知の不安定化ドメインを、本明細書において示される免疫療法薬（ペイロード）のいずれかと関連させて、本発明の生体回路系のＳＲＥとして使用してもよい。不安定化ドメイン（ＤＤ）は、目的の標的タンパク質に付加することができる小さなタンパク質ドメインである。ＤＤは、タンパク質が細胞のユビキチン－プロテアソーム系によって急速に分解されるように、ＤＤ結合リガンドの非存在下で、目的の付着タンパク質を不安定化する（Ｓｔａｎｋｕｎａｓ，Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ，２００３，１２：１６１５－１６２４；Ｂａｎａｓｚｙｎｓｋｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ；２００６，１２６（５）：９９５－１００４；Ｂａｎａｓｚｙｎｓｋｉ，Ｌ．Ａ．，ａｎｄ Ｗａｎｄｌｅｓｓ，Ｔ．Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．；２００６，１３：１１－２１及びＲａｋｈｉｔ　Ｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ　Ｂｉｏｌ．２０１４；２１（９）：１２３８－１２５２に概説されている）。しかしながら、特定の小分子リガンドがリガンド結合パートナーとして意図したＤＤに結合すると、不安定性が逆転し、タンパク質機能が回復する。ＤＤ安定性の条件付きの性質により、安定したタンパク質から分解に対して不安定な基質への迅速かつ非摂動的な切り替えが可能になる。さらに、そのリガンド濃度依存性により、分解速度の調整可能な制御がさらに提供される。
【００８８】
いくつかの実施形態では、ＤＤの所望の特性として、ＤＤのリガンドの非存在下での低タンパク質レベル（すなわち、低い基底安定性）、大きなダイナミックレンジ、ロバストで予測可能な用量反応挙動、及び迅速な分解速度が挙げられ得るが、これらに限定されない。内在性分子ではなく、所望のリガンドに結合するＤＤが好ましい場合がある。
【００８９】
ＦＫＢＰ／ｓｈｉｅｌｄ－１系（Ｅｇｅｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２０１１，２８６（３６）：３２３２８－３１３３６；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）、ｅｃＤＨＦＲ及びそのリガンドトリメトプリム（ＴＭＰ）；いくつかのエストロゲン受容体拮抗薬によって調節することができるエストロゲン受容体ドメイン（Ｍｉｙａｚａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，２０１２，１３４（９）：３９４２－３９４５；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）；ならびにビリルビン誘導性蛍光タンパク質ＵｎａＧ及びその同族リガンドビリルビン（ＢＲ）に由来する蛍光不安定化ドメイン（ＦＤＤ）（Ｎａｖａｒｒｏ　ｅｔ　ａｌ．，ＡＣＳ　Ｃｈｅｍ　Ｂｉｏｌ．，２０１６，Ｊｕｎｅ　６；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）を含む、不安定化特性を有するいくつかのタンパク質ドメ

イン及びそれらの対の小分子が同定され、タンパク質発現の制御に使用されている。

【００９０】

公知のＤＤとしてはまた、米国特許第８，１７３，７９２号及び米国特許第８，５３０，６３６号に記載されているものも挙げられ、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【００９１】

いくつかの実施形態では、本発明のＤＤは、タンパク質の翻訳後調節が可能であることが承認されているいくつかの公知の配列に由来し得る。例えば、Ｘｉｏｎｇらは、ＡｒａｂｉｄｏｐｓｉｓのＡＣＳ７（１－アミノシクロプロパン－１－カルボン酸シンターゼ）の非触媒Ｎ末端ドメイン（５４残基）が、β－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）レポーターと融合させた場合に、ＧＵＳ融合タンパク質の蓄積を有意に低下させることができることを示している（Ｘｉｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｂｏｔ．，２０１４，６５（１５）：４３９７－４４０８）。Ｘｉｏｎｇらはさらに、外来性１－アミノシクロプロパン－１－カルボン酸（ＡＣＣ）処置と塩の両方が、ＡＣＳのＮ末端とＧＵＳ融合タンパク質の蓄積レベルをレスキューすることができることを示した。ＡＣＳのＮ末端は、ユビキチン－２６Ｓプロテアソーム経路を介してＡＣＳ７の安定性の調節を媒介する。

【００９２】

別の非限定的な例は、タンパク質の安定性を制御するトロポミオシン（Ｔｍ）の安定性制御領域（ＳＣＲ、残基９７～１１８）である。不安定化変異Ｌ１１０Ａ、及び安定化変異Ａ１０９Ｌは、トロポミオシンタンパク質のダイナミクスに劇的に影響を及ぼす（Ｋｉｒｗａｎ　ａｎｄ　Ｈｏｄｇｅｓ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２０１４，２８９：４３５６－４３６６）。そのような配列は、それらに結合してそれらの安定性を調節するリガンドについてスクリーニングすることができる。同定した配列及びリガンドの対は、本発明の構成要素として使用してもよい。

【００９３】

いくつかの実施形態では、本発明のＤＤは、既知のタンパク質から開発してもよい。野生型タンパク質の領域または部分またはドメインを、ＳＲＥ／ＤＤとして全体的または部分的に利用してもよい。それらを組み合わせたり、並べ替えたりして、新規ペプチド、タンパク質、領域またはドメインを作出し、そのいずれかをＳＲＥ／ＤＤとして、またはさらなるＳＲＥ及び／またはＤＤの設計の出発点として使用してもよい。

【００９４】

候補タンパク質に結合することが周知の小分子などのリガンドは、タンパク質応答におけるそれらの調節について試験することができる。小分子は、臨床的に安全であることが承認され、適切な薬物動態と分布を有し得る。いくつかの実施形態では、刺激は、不安定化ドメイン（ＤＤ）のリガンド、例えば、不安定化ドメインに結合し、不安定化ドメインに融合したＰＯＩを安定化する小分子である。いくつかの実施形態では、本発明のリガンド、ＤＤ及びＳＲＥは、限定するものではないが、２０１６年４月１１日に出願された同時係属中の共有米国仮出願第６２／３２０，８６４号の表２～４または２０１７年３月３日に出願された米国仮出願第６２／４６６，５９６号及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示されるもののいずれかを含み、これらの各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。ＤＤとそのリガンドの開発に使用し得るタンパク質のいくつかの例を表１に示す。

【表１－１】
表１．タンパク質及びその結合リガンド

タンパク質	タンパク質配列	タンパク質配列番号:	リガンド
E.coli ジヒドロ葉酸還元酵素(ecDHFR)(Uniprot ID: P0ABQ4)	MISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR	1	メトトレキサート(MTX)トリメトプリム(TMP)
ヒトジヒドロ葉酸還元酵素(hDHFR)(Uniprot ID: P00374)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	2	メトトレキサート(MTX)トリメトプリム(TMP)
FK506 結合タンパク質	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTI	3	Shield-1

【表１－２】

(FKBP) (Uniprot ID: P62942)	SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE		
ホスホジエステラーゼ5(PDE5), リガンド結合ドメイン (Uniprot ID: Uniprot ID O76074)	MEETRELQSLAAAVVPSAQTLKITDFSFSDFELSDLET ALCTIRMFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWILSVKKNYRKN VAYHNWRHAFNTAQCMFAALKAGKIQNKLTDLEILALL IAALSHDLDHRGVNNSYIQRSEHPLAQLYCHSIMEHHH FDQCLMILNSPGNQILSGLSIEEYKTTLKIIKQAILAT DLALYIKRRGEFFELIRKNQFNLEDPHQKELFLAMLMT ACDLSAITKPWPIQQRIAELVATEFFDQGDRERKELNI EPTDLMNREKKNKIPSMQVGFIDAICLQLYEALTHVSE DCFPLLDGCRKNRQKWQALAEQQ	4	シルデナフィル; バルデナフィル; タダラフィル
PPAR γ (PPARg), リガンド結合ドメイン (Uniprot ID: P37231；アミノ酸 317～505)	SVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLLKYGVHEII YTMLASLMNKDGVLISEGQGFMTREFLKSLRKPFGDFM EPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVIILSGDRPGLLN VKPIEDIQDNLLQALELQLKLNHPESSQLFAKLLQKMT DLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPLLQEIYKDLY	5	ポシグリタゾン ピオグリタゾン
炭酸脱水酵素 II(CA2) (Uniprot ID: P00918)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSA KPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDY WTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	6	セレコキシブ アセタゾラミド
NRH: キノン酸化還元酵素 2(NQO2) (Uniprot ID: P16083)	MAGKKVLIVYAHQEPKSFNGSLKNVAVDELSRQGCTVT VSDLYAMNLEPRATDKDITGTLSNPEVFNYGVETHEAY KQRSLASDITDEQKKVREADLVIFQFPLYWFSVPAILK GWMDRVLCQGFAFDIPGFYDSGLLQGKLALLSVTTGGT AEMYTKTGVNGDSRYFLWPLQHGTLHFCGFKVLAPQIS FAPEIASEEERKGMVAAWSQRLQTIWKEEPIPCTAHWH FGQ	7	イマチニブ メラトニン
ジペプチジルペプチダーゼ (DPPIV) (Uniprot ID: P27487)	MKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVVLLNKGTDDATAD SRKTYTLTDYLKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNI LVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFGHSINDYSISPDGQFI LLEYNYVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNT QWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGK EDIIYNGITDWVYEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQF NDTEVPLIEYSFYSDESLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTV KFFVVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHYLCDVT	224	シタグリプチン、サクサグリプチン、デナグリプチン

【表１－３】

	WATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVA RQHIEMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNEEG YRHICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALTSDYLYYI SNEYKGMPGGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCELNPERCQY YSVSFSKEAKYYQLRCSGPGLPLYTLHSSVNDKGLRVL EDNSALDKMLQNVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPP HFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWATYLAST ENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIE AARQFSKMGFVDNKRIAIWGWSYGGYVTSMVLGSGSGV FKCGIAVAPVSRWEYYDS		

【００９５】

いくつかの実施形態では、本発明のＤＤは、表２に挙げるようなＦＫＢＰ　ＤＤまたはｅｃＤＨＦＲ　ＤＤであり得る。表２に挙げる変異アミノ酸の位置は、ｅｃＤＨＦＲ　ＤＤの場合は配列番号１のｅｃＤＨＦＲ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ：Ｐ０ＡＢＱ４）に対するものであり、ＦＫＢＰ　ＤＤの場合は配列番号３のＦＫＢＰ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ：Ｐ６２９４２）に対するものである。

【表２】

表２．ｅｃＤＨＦＲ　ＤＤ及びＦＫＢＰ　ＤＤ

DD	配列	配列番号:
ecDHFR(R12Y, Y100I)	MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGR HTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDV PEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDD WESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR	8
ecDHFR(野生型のアミノ酸 2～159)(R12Y, Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRH TWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVP EIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDW ESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR	9
ecDHFR(野生型のアミノ酸 2～159)(R12H, E129K)	ISLIAALAVDHVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRH TWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVP EIMVIGGGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYKPDDW ESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR	10
FKBP(F36V, L106P)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNK PFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHP GIIPPHATLVFDVELLKPE	11
FKBP(E31G, F36V, R71G, K105E)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSRDRNK PFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGATGHP GIIPPHATLVFDVELLELE	12

【００９６】

本発明の発明者らは、不安定化ドメインを開発するために使用し得るいくつかの候補ヒトタンパク質を試験及び同定した。表２に示すように、これらの候補には、ヒトＤＨＦＲ（ｈＤＨＦＲ）、ＰＤＥ５（ホスホジエステラーゼ５）、ＰＰＡＲγ（ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ）、ＣＡ２（炭水化物アンヒドラーゼＩＩ）及びＮＱＯ２（ＮＲＨ：キノン酸化還元酵素２）が含まれる。これらのタンパク質のタンパク質ドメインから

同定した不安定化ドメイン配列候補（テンプレートとして）に変異導入して、テンプレート候補ドメイン配列に基づく変異体ライブラリを生成してもよい。ＤＤライブラリ生成に使用する変異誘発戦略には、例えば構造ガイド情報を使用する部位特異的変異誘発；もしくは例えばエラープローンＰＣＲを用いるランダム変異誘発、または両方の組み合わせが含まれ得る。いくつかの実施形態では、ランダム変異誘発を用いて同定した不安定化ドメインを使用して、不安定化に必要であり得る候補ＤＤの構造特性を同定し、次いでこれを用いて、部位特異的変異誘発を使用して変異ライブラリをさらに生成してもよい。

【００９７】

いくつかの実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＨＦＲ（ｅｃＤＨＦＲ）に由来する新規ＤＤは、野生型ｅｃＤＨＦＲ配列のアミノ酸２～１５９を含み得る。これはＭ１ｄｅｌ変異と呼ばれる場合がある。

【００９８】

いくつかの実施形態では、ｅｃＤＨＦＲに由来する新規ＤＤは、野生型ｅｃＤＨＦＲ配列のアミノ酸２～１５９を含む場合があり（Ｍ１ｄｅｌ変異とも呼ばれる）、Ｍ１ｄｅｌ、Ｒ１２Ｙ、Ｒ１２Ｈ、Ｙ１００Ｉ、及びＥ１２９Ｋを含むがこれらに限定されない、１、２、３、４、５個またはそれ以上の変異を含み得る。

【００９９】

いくつかの実施形態では、ＦＫＢＰ由来の新規ＤＤは、野生型ＦＫＢＰ配列のアミノ酸２～１０７を有していてもよい。これはＭ１ｄｅｌ変異と呼ばれる場合がある。

【０１００】

いくつかの実施形態では、ＦＫＢＰ由来の新規ＤＤは、野生型ＦＢＫＰ配列のアミノ酸２～１０７を有していてもよく（Ｍ１ｄｅｌ変異とも呼ばれる）、Ｍ１ｄｅｌ、Ｅ３１Ｇ、Ｆ３６Ｖ、Ｒ７１Ｇ、Ｋ１０５Ｅ、及びＬ１０６Ｐを含むがこれらに限定されない、１、２、３、４、５個またはそれ以上の変異を含み得る。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、野生型タンパク質に比べて、リガンドに対する変化した、好ましくはより高い結合親和性を有する変異について、ＤＤ変異体ライブラリをスクリーニングしてもよい。ＤＤライブラリは、２つ以上のリガンドを使用してスクリーニングしてもよく、いくつかのリガンドで安定化されるが他のリガンドでは安定化されないＤＤ変異を優先的に選択してもよい。また、天然タンパク質に比べて、リガンドに優先的に結合するＤＤ変異も選択してもよい。そのような方法を用いて、ＤＤのリガンド選択とリガンド結合親和性を最適化してもよい。さらに、そのようなアプローチを使用して、オフターゲットリガンド結合によって引き起こされる有害な影響を最小限に抑えることができる。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、バーコードを使用して変異体ライブラリをスクリーニングすることにより、適切なＤＤを同定してもよい。そのような方法を用いて、異種変異体ライブラリ内の個々の変異体クローンを検出、同定、及び定量化してもよい。ライブラリ内の各ＤＤ変異体は、（互いに対して）異なるバーコード配列を有する場合がある。他の例では、ポリヌクレオチドはまた、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個またはそれ以上の核酸塩基に関して異なるバーコード配列を有し得る。ライブラリ内の各ＤＤ変異体は、複数のバーコード配列を有し得る。複数を使用する場合、各バーコードが任意の他のバーコードに対して一意であるように用いてもよい。あるいは、使用する各バーコードは一意ではなくてもよいが、使用するバーコードの組み合わせにより、個別に追跡できる一意の配列を作出してもよい。バーコード配列は、ＳＲＥの上流、ＳＲＥの下流、またはいくつかの例ではＳＲＥ内に配置してもよい。ＤＤ変異体は、バーコードによって、サンガー法や次世代シーケンシングなどの配列決定アプローチを用いて同定してもよいが、ポリメラーゼ連鎖反応や定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって同定してもよい。いくつかの実施形態では、各バーコードについて異なるサイズの産物を増幅するポリメラーゼ連鎖反応プライマーを使用して、アガロースゲル上の各バーコードを同定してもよい。他の例では、各バーコードは、各バーコードの標的化された増幅を可能にするユニークな定量的ポリメラ

ーゼ連鎖反応プローブ配列を有していてもよい。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、本発明のＤＤは、ヒトジヒドロ葉酸還元酵素（ｈＤＨＦＲ）に由来し得る。ｈＤＨＦＲは、ジヒドロ葉酸の還元を触媒する低分子の（１８ｋＤａ）酵素であり、様々な同化経路で重要な役割を果たす。ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）は、ニコチンアミドアデニンリン酸二水素（ＮＡＤＰＨ）の存在下で７，８－ジヒドロ葉酸（ＤＨＦ）を５，６，７，８テトラヒドロ葉酸（ＴＨＦ）に変換する必須酵素である。葉酸の構造類似体であるメトトレキサート（ＭＴＸ）などの抗葉酸薬は、天然の基質ＤＨＦよりもＤＨＦＲに強く結合し、主にジヒドロ葉酸還元酵素の阻害により葉酸代謝を妨害し、プリン及びピリミジン前駆体合成を抑制する。葉酸、ＴＱＤ、トリメトプリム（ＴＭＰ）、没食子酸エピガロカテキン（ＥＧＣＧ）及びＥＣＧ（没食子酸エピカテキン）などの他のｈＤＨＦＲの阻害剤も、ｈＤＨＦＲ変異体に結合し、その安定性を調節することができる。

【０１０４】

本発明の一態様では、本発明のＤＨＦＲ　ＤＤは、Ｖ２Ａ、Ｃ７Ｒ、Ｉ８Ｖ、Ｖ９Ａ、Ａ１０Ｔ、Ａ１０Ｖ、Ｑ１３Ｒ、Ｎ１４Ｓ、Ｇ１６Ｓ、Ｉ１７Ｎ、Ｉ１７Ｖ、Ｋ１９Ｅ、Ｎ２０Ｄ、Ｇ２１Ｔ、Ｇ２１Ｅ、Ｄ２２Ｓ、Ｌ２３Ｓ、Ｐ２４Ｓ、Ｌ２８Ｐ、Ｎ３０Ｄ、Ｎ３０Ｈ、Ｎ３０Ｓ、Ｅ３１Ｇ、Ｅ３１Ｄ、Ｆ３２Ｍ、Ｒ３３Ｇ、Ｒ３３Ｓ、Ｆ３５Ｌ、Ｑ３６Ｒ、Ｑ３６Ｓ、Ｑ３６Ｋ、Ｑ３６Ｆ、Ｒ３７Ｇ、Ｍ３８Ｖ、Ｍ３８Ｔ、Ｔ４０Ａ、Ｖ４４Ａ、Ｋ４７Ｒ、Ｎ４９Ｓ、Ｎ４９Ｄ、Ｍ５３Ｔ、Ｇ５４Ｒ、Ｋ５６Ｅ、Ｋ５６Ｒ、Ｔ５７Ａ、Ｆ５９Ｓ、Ｉ６１Ｔ、Ｋ６４Ｒ、Ｎ６５Ａ、Ｎ６５Ｓ、Ｎ６５Ｄ、Ｎ６５Ｆ、Ｌ６８Ｓ、Ｋ６９Ｅ、Ｋ６９Ｒ、Ｒ７１Ｇ、Ｉ７２Ｔ、Ｉ７２Ａ、Ｉ７２Ｖ、Ｎ７３Ｇ、Ｌ７４Ｎ、Ｖ７５Ｆ、Ｒ７８Ｇ、Ｌ８０Ｐ、Ｋ８１Ｒ、Ｅ８２Ｇ、Ｈ８８Ｙ、Ｆ８９Ｌ、Ｒ９２Ｇ、Ｓ９３Ｇ、Ｓ９３Ｒ、Ｌ９４Ａ、Ｄ９６Ｇ、Ａ９７Ｔ、Ｌ９８Ｓ、Ｋ９９Ｇ、Ｋ９９Ｒ、Ｌ１００Ｐ、Ｅ１０２Ｇ、Ｑ１０３Ｒ、Ｐ１０４Ｓ、Ｅ１０５Ｇ、Ａ１０７Ｔ、Ａ１０７Ｖ、Ｎ１０８Ｄ、Ｋ１０９Ｅ、Ｋ１０９Ｒ、Ｖ１１０Ａ、Ｄ１１１Ｎ、Ｍ１１２Ｔ、Ｍ１１２Ｖ、Ｖ１１３Ａ、Ｗ１１４Ｒ、Ｉ１１５Ｖ、Ｖ１１６Ｉ、Ｇ１１７Ｄ、Ｖ１２１Ａ、Ｙ１２２Ｃ、Ｙ１２２Ｄ、Ｙ１２２Ｉ、Ｋ１２３Ｒ、Ｋ１２３Ｅ、Ａ１２５Ｆ、Ｍ１２６Ｉ、Ｎ１２７Ｒ、Ｎ１２７Ｓ、Ｎ１２７Ｙ、Ｈ１２８Ｒ、Ｈ１２８Ｙ、Ｈ１３１Ｒ、Ｌ１３２Ｐ、Ｋ１３３Ｅ、Ｌ１３４Ｐ、Ｆ１３５Ｐ、Ｆ１３５Ｌ、Ｆ１３５Ｓ、Ｆ１３５Ｖ、Ｖ１３６Ｍ、Ｔ１３７Ｒ、Ｒ１３８Ｇ、Ｒ１３８Ｉ、Ｉ１３９Ｔ、Ｉ１３９Ｖ、Ｍ１４０Ｉ、Ｍ１４０Ｖ、Ｑ１４１Ｒ、Ｄ１４２Ｇ、Ｆ１４３Ｓ、Ｆ１４３Ｌ、Ｅ１４４Ｇ、Ｄ１４６Ｇ、Ｔ１４７Ａ、Ｆ１４８Ｓ、Ｆ１４８Ｌ、Ｆ１４９Ｌ、Ｐ１５０Ｌ、Ｅ１５１Ｇ、Ｉ１５２Ｖ、Ｄ１５３Ａ、Ｄ１５３Ｇ、Ｅ１５５Ｇ、Ｋ１５６Ｒ、Ｙ１５７Ｒ、Ｙ１５７Ｃ、Ｋ１５８Ｅ、Ｋ１５８Ｒ、Ｌ１５９Ｐ、Ｌ１６０Ｐ、Ｅ１６２Ｇ、Ｙ１６３Ｃ、Ｖ１６６Ａ、Ｓ１６８Ｃ、Ｄ１６９Ｇ、Ｖ１７０Ａ、Ｑ１７１Ｒ、Ｅ１７２Ｇ、Ｅ１７３Ｇ、Ｅ１７３Ａ、Ｋ１７４Ｒ、Ｉ１７６Ａ、Ｉ１７６Ｆ、Ｉ１７６Ｔ、Ｋ１７７Ｅ、Ｋ１７７Ｒ、Ｙ１７８Ｃ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８０Ｌ、Ｅ１８１Ｇ、Ｖ１８２Ａ、Ｙ１８３Ｃ、Ｙ１８３Ｈ、Ｅ１８４Ｒ、Ｅ１８４Ｇ、Ｋ１８５Ｒ、Ｋ１８５ｄｅｌ、Ｋ１８５Ｅ、Ｎ１８６Ｓ、Ｎ１８６Ｄ、Ｄ１８７Ｇ、及びＤ１８７Ｎなどの変異を含み得るが、これらに限定されない。

【０１０５】

一実施形態では、刺激は、翻訳後タンパク質レベルを調節するためにＳＲＥに結合する小分子である。一態様では、ＤＨＦＲリガンド：トリメトプリム（ＴＭＰ）及びメトトレキサート（ＭＴＸ）を使用して、ｈＤＨＦＲ変異体を安定化する。ｈＤＨＦＲに基づく不安定化ドメインを表３に挙げる。表３に挙げる変異アミノ酸の位置は、ヒトＤＨＦＲの場合、配列番号２のヒトＤＨＦＲ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ：Ｐ００３７４）に対するものである。表３中、変異を下線及び太文字で示す。表３において、「ｄｅｌ」は、野生型配列と比較したその位置での変異がアミノ酸の欠失であることを意味する。

【表３－１】

表３．ヒトＤＨＦＲ変異体及び新規不安定化ドメイン

変異体	アミノ酸配列	配列番号
hDHFR (I17V)	MVGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	13
hDHFR (F59S)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWSSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	14
hDHFR (N65D)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKDRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	15
hDHFR (K81R)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELREPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	16
hDHFR (A107V)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELVNKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	17

【表３－２】

hDHFR (Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	18
hDHFR (N127Y)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	19
hDHFR (M140I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIIQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	20
hDHFR (K185E)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEEND	21
hDHFR (N186D)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKDD	22
hDHFR (C7R, Y163C)	MVGSLNRIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPECPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	23
hDHFR (A10V, H88Y)	MVGSLNCIVVVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAYFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	24
hDHFR (Q36K, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFKRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	25
hDHFR (M53T, R138I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI TGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTIIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	26
hDHFR (T57A, I72A)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKAWFSIPEKNRPLKGRANLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	27
hDHFR (E63G, I176F)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPGKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP	28

【表３－３】

	ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGFKYKFEVYEKND	
hDHFR (G21T, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNTDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	29
hDHFR (L74N, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINNVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	30
hDHFR (V75F, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLFLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	31
hDHFR (L94A, T147A)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSADDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDAFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	32
DHFR (V121A, Y22I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSAIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	33
hDHFR (Y122I, A125F)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	34
hDHFR (H131R, E144G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	35
hDHFR (T137R, F143L)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVRRIMQDLESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	36
hDHFR (Y178H, E18IG)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKHKFGVYEKND	37
hDHFR (Y183H, K185E)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVHEEND	38

【表３－４】

hDHFR (V9A, S93R, P150L)	MVGSLNCIAAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRRLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFLEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	39
hDHFR (I8V, K133E, Y163C)	MVGSLNCVVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLELFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPECPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	40
hDHFR (L23S, V121A, Y157C)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDSPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSAYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK CKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	41
hDHFR (K19E, F89L, E181G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGENGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHLLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFGVYEKND	42
hDHFR (Q36F, N65F, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFFRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKFRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	43
hDHFR (G54R, M140V, S168C)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MRKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIVQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLCDVQEEKGIKYKFEVYEKND	44
hDHFR (V110A, V136M, K177R)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKADMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFMTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIRYKFEVYEKND	45
hDHFR (野生型のアミノ酸２～187 ; Q36F, Y122I, A125F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFFRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	46
hDHFR (N49D, F59S, D153G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQDLVI MGKKTWSSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIGLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	47
hDHFR (G21E, I72V, I176T)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNEDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRVNLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGTKYKFEVYEKND	48
hDHFR (L100P, E102G, Q103R,	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKPTGRS	225

10

20

30

40

【表３－５】

P104S, E105G, N108D, V113A, W114R, Y122C, M126I, N127R, H128Y, L132P, F135P, I139T, F148S, F149L, I152V, D153A, D169G, V170A, I176A, K177R, V182A, K185R, N186S)	GLADKVDMARIVGGSSVCKEAIRYPGHPKLPVTRTMQDFESDTSLPEVALEK YKLLPEYPGVLSGAQEEKGARYKFEAYERSD	
hDHFR (V2A, R33G, Q36R, L100P, K185R)	MAGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFGYFRRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKPTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYERND	226
hDHFR (G16S, I17V, F89L, D96G, K123E, M140V, D146G, K156R)	MVGSLNCIVAVSQNMSVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHLLSRSLDGALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYEEAMNHPGHLKLFVTRIVQDFESGTFFPEIDLER YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	227
hDHFR (F35L, R37G, N65A, L68S, K69E, R71G, L80P, K99G, G117D, L132P, I139V, M140I, D142G, D146G, E173G, D187G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYLQGMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKARPSEGGINLVLSREPKEPPQGAHFLSRSLDDALGLTEQP ELANKVDMVWIVDGSSVYKEAMNHPGHPKLFVTRVIQGFESGTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEGKGIKYKFEVYEKNG	228
hDHFR (I17N, L98S, K99R, M112T, E151G, E162G, E172G)	MVGSLNCIVAVSQNMGNGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDASRLTEQP ELANKVDTVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPGIDLEK YKLLPGYPGVLSDVQGEKGIKYKFEVYEKND	229
hDHFR (R138G, D142G, F143S, K156R, K158E, E162G, V166A, K177E, Y178C, K185E, N186S)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTGIMQGSESDTFFPEIDLER YELLPGYPGALSDVQEEKGIECKFEVYEESD	230
hDHFR (K81R, K99R, L100P,	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELREPPQGAHFLSRSLDDALRPTGQP	231

【表３－６】

E102G, N108D, K123R, H128R, D142G, F180L, K185E)	ELADKVDMVWIVGGSSVYREAMNRPGHLKLFVTRIMQGFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKLEVYEEND	
hDHFR (N14S, P24S, F35L, M53T, K56E, R92G, S93G, N127S, H128Y, F135L, F143S, L159P, L160P, E173A, F180L)	MVGSLNCIVAVSQSMGIGKNGDLSWPPLRNEFRYLQRMTTTSSVEGKQNLVI TGKETWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSGGLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMSYPGHLKLLVTRIMQDSESDTFFPEIDLEK YKPPPEYPGVLSDVQEAKGIKYKLEVYEKND	232
hDHFR (V2A, I17V, N30D, E31G, Q36R, F59S, K69E, I72T, H88Y, F89L, N108D, K109E, V110A, I115V, Y122D, L132P, F135S, M140V, E144G, T147A, Y157C, V170A, K174R, N186S)	MAGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRDGFRYFRRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWSSIPEKNRPLEGRTNLVLSRELKEPPQGAYLLSRSLDDALKLTEQP ELADEAGMVWVVGGSSVDKEAMNHPGHPKLSVTRIVQDFGSDAFFPEIDLEK CKLLPEYPGVLSDAQEERGIKYKFEVYEKSD	233
hDHFR (L28P, N30H, M38V, V44A, L68S, N73G, R78G, A97T, K99R, A107T, K109R, D111N, L134P, F135V, T147A, I152V, K158R, E172G, V182A, E184R)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPPRHEFRYFQRVTTTSSAEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPSKGRIGLVLSGELKEPPQGAHFLSRSLDDTLRLTEQP ELTNRVNMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLRPVVTRIMQDFESDAFFPEVDLEK YRLLPEYPGVLSDVQGEKGIKYKFEAYRKND	234
hDHFR (A10T, Q13R, N14S, N20D, P24S, N30S, M38T, T40A, K47R, N49S, K56R,	MVGSLNCIVTVSRSMGIGKDGDLSWPPLRSEFRYFQRTTATSSVEGRQSLVI MGKRTWFSTPERNRPLRGRANLVLSGELKGPPQGAHLLSRSLDGALKLTEQP ELADKVDVVRIVGGSSVDEEAMNHPGHLKLFVTRVMRGFESDTLFPGIDLGK RKLLPEYPGVLSDVREEKGIKYKLEVCGNN	235

【表３－７】

I61T, K64R, K69R, I72A, R78G, E82G, F89L, D96G, N108D, M112V, W114R, Y122D, K123E, I139V, Q141R, D142G, F148L, E151G, E155G, Y157R, Q171R, Y183C, E184G, K185del, D187N)		
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；I17V, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	236
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；Y122I, M140I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIIQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	237
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；N127Y, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	238
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；Y122I, H131R, E144G)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	239
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187;D22S, F32M, R33S, Q36S, N65S)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGSLPWPPLRNEMSYFSRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKSRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	240
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187;E31D, F32M, V116I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNDMRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIIGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	241
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；E162G, I176F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPGYPGVLSDVQEEKGFKYKFEVYEKND	854

【表３－８】

hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；K185E）	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEEND	855
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；Y122I, A125F）	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	856
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187;Q36F, N65F, Y122I）	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFFRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKFRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	857
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；N127Y）	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVYKEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	858
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；H131R, E144G）	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	859
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；I17V）	VGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	860
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；Y122I）	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	861
hDHFR（E162G, I176F）	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPGYPGVLSDVQEEKGFKYKFEVYEKND	862
hDHFR（野生型のアミノ酸２～187；Q36K, Y122I）	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFKRMTTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	863

【０１０６】

いくつかの実施形態では、リガンド結合を阻害しないＤＤ変異を優先的に選択してもよい。いくつかの実施形態では、ＤＨＦＲの残基の変異によってリガンド結合を向上させてもよい。変異のために選択するアミノ酸位置として、配列番号２の２２位のアスパラギン酸、配列番号２の３１位のグルタミン酸；配列番号２の３２位のフェニルアラニン；配列番号２の３３位のアルギニン；配列番号２の３６位のグルタミン；配列番号２の６５位の

アスパラギン；及び配列番号２の１１５位のバリンが挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明のＤＤにおいて、以下、Ｄ２２Ｓ、Ｅ３１Ｄ、Ｆ３２Ｍ、Ｒ３３Ｓ、Ｑ３６Ｓ、Ｎ６５Ｓ、及びＶ１１６Ｉを含むがこれらに限定されない１つ以上の変異を利用して、ＴＭＰ結合を向上させてもよい。変異アミノ酸の位置は、配列番号２の野生型ヒトＤＨＦＲ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ：Ｐ００３７４）に対するものである。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、ヒトＤＨＦＲ由来の新規ＤＤは、Ｍ１ｄｅｌ、Ｖ２Ａ、Ｃ７Ｒ、Ｉ８Ｖ、Ｖ９Ａ、Ａ１０Ｔ、Ａ１０Ｖ、Ｑ１３Ｒ、Ｎ１４Ｓ、Ｇ１６Ｓ、Ｉ１７Ｎ、Ｉ１７Ｖ、Ｋ１９Ｅ、Ｎ２０Ｄ、Ｇ２１Ｔ、Ｇ２１Ｅ、Ｄ２２Ｓ、Ｌ２３Ｓ、Ｐ２４Ｓ、Ｌ２８Ｐ、Ｎ３０Ｄ、Ｎ３０Ｈ、Ｎ３０Ｓ、Ｅ３１Ｇ、Ｅ３１Ｄ、Ｆ３２Ｍ、Ｒ３３Ｇ、Ｒ３３Ｓ、Ｆ３５Ｌ、Ｑ３６Ｒ、Ｑ３６Ｓ、Ｑ３６Ｋ、Ｑ３６Ｆ、Ｒ３７Ｇ、Ｍ３８Ｖ、Ｍ３８Ｔ、Ｔ４０Ａ、Ｖ４４Ａ、Ｋ４７Ｒ、Ｎ４９Ｓ、Ｎ４９Ｄ、Ｍ５３Ｔ、Ｇ５４Ｒ、Ｋ５６Ｅ、Ｋ５６Ｒ、Ｔ５７Ａ、Ｆ５９Ｓ、Ｉ６１Ｔ、Ｋ６４Ｒ、Ｎ６５Ａ、Ｎ６５Ｓ、Ｎ６５Ｄ、Ｎ６５Ｆ、Ｌ６８Ｓ、Ｋ６９Ｅ、Ｋ６９Ｒ、Ｒ７１Ｇ、Ｉ７２Ｔ、Ｉ７２Ａ、Ｉ７２Ｖ、Ｎ７３Ｇ、Ｌ７４Ｎ、Ｖ７５Ｆ、Ｒ７８Ｇ、Ｌ８０Ｐ、Ｋ８１Ｒ、Ｅ８２Ｇ、Ｈ８８Ｙ、Ｆ８９Ｌ、Ｒ９２Ｇ、Ｓ９３Ｇ、Ｓ９３Ｒ、Ｌ９４Ａ、Ｄ９６Ｇ、Ａ９７Ｔ、Ｌ９８Ｓ、Ｋ９９Ｇ、Ｋ９９Ｒ、Ｌ１００Ｐ、Ｅ１０２Ｇ、Ｑ１０３Ｒ、Ｐ１０４Ｓ、Ｅ１０５Ｇ、Ａ１０７Ｔ、Ａ１０７Ｖ、Ｎ１０８Ｄ、Ｋ１０９Ｅ、Ｋ１０９Ｒ、Ｖ１１０Ａ、Ｄ１１１Ｎ、Ｍ１１２Ｔ、Ｍ１１２Ｖ、Ｖ１１３Ａ、Ｗ１１４Ｒ、Ｉ１１５Ｖ、Ｉ１１５Ｌ、Ｖ１１６Ｉ、Ｇ１１７Ｄ、Ｖ１２１Ａ、Ｙ１２２Ｃ、Ｙ１２２Ｄ、Ｙ１２２Ｉ、Ｋ１２３Ｒ、Ｋ１２３Ｅ、Ａ１２５Ｆ、Ｍ１２６Ｉ、Ｎ１２７Ｒ、Ｎ１２７Ｓ、Ｎ１２７Ｙ、Ｈ１２８Ｒ、Ｈ１２８Ｙ、Ｈ１３１Ｒ、Ｌ１３２Ｐ、Ｋ１３３Ｅ、Ｌ１３４Ｐ、Ｆ１３５Ｐ、Ｆ１３５Ｌ、Ｆ１３５Ｓ、Ｆ１３５Ｖ、Ｖ１３６Ｍ、Ｔ１３７Ｒ、Ｒ１３８Ｇ、Ｒ１３８Ｉ、Ｉ１３９Ｔ、Ｉ１３９Ｖ、Ｍ１４０Ｉ、Ｍ１４０Ｖ、Ｑ１４１Ｒ、Ｄ１４２Ｇ、Ｆ１４３Ｓ、Ｆ１４３Ｌ、Ｅ１４４Ｇ、Ｄ１４６Ｇ、Ｔ１４７Ａ、Ｆ１４８Ｓ、Ｆ１４８Ｌ、Ｆ１４９Ｌ、Ｐ１５０Ｌ、Ｅ１５１Ｇ、Ｉ１５２Ｖ、Ｄ１５３Ａ、Ｄ１５３Ｇ、Ｅ１５５Ｇ、Ｋ１５６Ｒ、Ｙ１５７Ｒ、Ｙ１５７Ｃ、Ｋ１５８Ｅ、Ｋ１５８Ｒ、Ｌ１５９Ｐ、Ｌ１６０Ｐ、Ｅ１６２Ｇ、Ｙ１６３Ｃ、Ｖ１６６Ａ、Ｓ１６８Ｃ、Ｄ１６９Ｇ、Ｖ１７０Ａ、Ｑ１７１Ｒ、Ｅ１７２Ｇ、Ｅ１７３Ｇ、Ｅ１７３Ａ、Ｋ１７４Ｒ、Ｉ１７６Ａ、Ｉ１７６Ｆ、Ｉ１７６Ｔ、Ｋ１７７Ｅ、Ｋ１７７Ｒ、Ｙ１７８Ｃ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８０Ｌ、Ｅ１８１Ｇ、Ｖ１８２Ａ、Ｙ１８３Ｃ、Ｙ１８３Ｈ、Ｅ１８４Ｒ、Ｅ１８４Ｇ、Ｋ１８５Ｒ、Ｋ１８５ｄｅｌ、Ｋ１８５Ｅ、Ｎ１８６Ｓ、Ｎ１８６Ｄ、Ｄ１８７Ｇ、及びＤ１８７Ｎを含むがこれらに限定されない、１、２、３、４、５個またはそれ以上の変異を含み得る。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、ヒトＤＨＦＲ由来の新規ＤＤは、野生型ヒトＤＨＦＲ配列のアミノ酸２～１８７を含み得る。これはＭ１ｄｅｌ変異と呼ばれる場合がある。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、ヒトＤＨＦＲ由来の新規ＤＤは、野生型ヒトＤＨＦＲ配列のアミノ酸２～１８７（Ｍ１ｄｅｌ突異とも呼ばれる）を有していてもよく、Ｍ１ｄｅｌ、Ｖ２Ａ、Ｃ７Ｒ、Ｉ８Ｖ、Ｖ９Ａ、Ａ１０Ｔ、Ａ１０Ｖ、Ｑ１３Ｒ、Ｎ１４Ｓ、Ｇ１６Ｓ、Ｉ１７Ｎ、Ｉ１７Ｖ、Ｋ１９Ｅ、Ｎ２０Ｄ、Ｇ２１Ｔ、Ｇ２１Ｅ、Ｄ２２Ｓ、Ｌ２３Ｓ、Ｐ２４Ｓ、Ｌ２８Ｐ、Ｎ３０Ｄ、Ｎ３０Ｈ、Ｎ３０Ｓ、Ｅ３１Ｇ、Ｅ３１Ｄ、Ｆ３２Ｍ、Ｒ３３Ｇ、Ｒ３３Ｓ、Ｆ３５Ｌ、Ｑ３６Ｒ、Ｑ３６Ｓ、Ｑ３６Ｋ、Ｑ３６Ｆ、Ｒ３７Ｇ、Ｍ３８Ｖ、Ｍ３８Ｔ、Ｔ４０Ａ、Ｖ４４Ａ、Ｋ４７Ｒ、Ｎ４９Ｓ、Ｎ４９Ｄ、Ｍ５３Ｔ、Ｇ５４Ｒ、Ｋ５６Ｅ、Ｋ５６Ｒ、Ｔ５７Ａ、Ｆ５９Ｓ、Ｉ６１Ｔ、Ｋ６４Ｒ、Ｎ６５Ａ、Ｎ６５Ｓ、Ｎ６５Ｄ、Ｎ６５Ｆ、Ｌ６８Ｓ、Ｋ６９Ｅ、Ｋ６９Ｒ、Ｒ７１Ｇ、Ｉ７２Ｔ、Ｉ７２Ａ、Ｉ７２Ｖ、Ｎ７３Ｇ、Ｌ７４Ｎ、Ｖ７５Ｆ、Ｒ７８Ｇ、Ｌ８０Ｐ、Ｋ８１Ｒ、Ｅ８２Ｇ、Ｈ８８Ｙ、Ｆ８９Ｌ、Ｒ９２Ｇ、Ｓ９３Ｇ、Ｓ９３Ｒ、Ｌ９４Ａ、Ｄ９６Ｇ、Ａ９７Ｔ、Ｌ９８Ｓ、Ｋ９９Ｇ、Ｋ９９Ｒ、Ｌ１００Ｐ、Ｅ１０２Ｇ、Ｑ１０３Ｒ、Ｐ

１０４Ｓ、Ｅ１０５Ｇ、Ａ１０７Ｔ、Ａ１０７Ｖ、Ｎ１０８Ｄ、Ｋ１０９Ｅ、Ｋ１０９Ｒ、Ｖ１１０Ａ、Ｄ１１１Ｎ、Ｍ１１２Ｔ、Ｍ１１２Ｖ、Ｖ１１３Ａ、Ｗ１１４Ｒ、Ｉ１１５Ｖ、Ｉ１１５Ｌ、Ｖ１１６Ｉ、Ｇ１１７Ｄ、Ｖ１２１Ａ、Ｙ１２２Ｃ、Ｙ１２２Ｄ、Ｙ１２２Ｉ、Ｋ１２３Ｒ、Ｋ１２３Ｅ、Ａ１２５Ｆ、Ｍ１２６Ｉ、Ｎ１２７Ｒ、Ｎ１２７Ｓ、Ｎ１２７Ｙ、Ｈ１２８Ｒ、Ｈ１２８Ｙ、Ｈ１３１Ｒ、Ｌ１３２Ｐ、Ｋ１３３Ｅ、Ｌ１３４Ｐ、Ｆ１３５Ｐ、Ｆ１３５Ｌ、Ｆ１３５Ｓ、Ｆ１３５Ｖ、Ｖ１３６Ｍ、Ｔ１３７Ｒ、Ｒ１３８Ｇ、Ｒ１３８Ｉ、Ｉ１３９Ｔ、Ｉ１３９Ｖ、Ｍ１４０Ｉ、Ｍ１４０Ｖ、Ｑ１４１Ｒ、Ｄ１４２Ｇ、Ｆ１４３Ｓ、Ｆ１４３Ｌ、Ｅ１４４Ｇ、Ｄ１４６Ｇ、Ｔ１４７Ａ、Ｆ１４８Ｓ、Ｆ１４８Ｌ、Ｆ１４９Ｌ、Ｐ１５０Ｌ、Ｅ１５１Ｇ、Ｉ１５２Ｖ、Ｄ１５３Ａ、Ｄ１５３Ｇ、Ｅ１５５Ｇ、Ｋ１５６Ｒ、Ｙ１５７Ｒ、Ｙ１５７Ｃ、Ｋ１５８Ｅ、Ｋ１５８Ｒ、Ｌ１５９Ｐ、Ｌ１６０Ｐ、Ｅ１６２Ｇ、Ｙ１６３Ｃ、Ｖ１６６Ａ、Ｓ１６８Ｃ、Ｄ１６９Ｇ、Ｖ１７０Ａ、Ｑ１７１Ｒ、Ｅ１７２Ｇ、Ｅ１７３Ｇ、Ｅ１７３Ａ、Ｋ１７４Ｒ、Ｉ１７６Ａ、Ｉ１７６Ｆ、Ｉ１７６Ｔ、Ｋ１７７Ｅ、Ｋ１７７Ｒ、Ｙ１７８Ｃ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８０Ｌ、Ｅ１８１Ｇ、Ｖ１８２Ａ、Ｙ１８３Ｃ、Ｙ１８３Ｈ、Ｅ１８４Ｒ、Ｅ１８４Ｇ、Ｋ１８５Ｒ、Ｋ１８５ｄｅｌ、Ｋ１８５Ｅ、Ｎ１８６Ｓ、Ｎ１８６Ｄ、Ｄ１８７Ｇ、及びＤ１８７Ｎを含むがこれらに限定されない、１、２、３、４、５個またはそれ以上の変異を含み得る。

【０１１０】

２．刺激

本発明の生体回路は、１つ以上の刺激によって誘発される。刺激は、リガンド、外部添加または内在性代謝産物、規定のリガンドの有無、ｐＨ、温度、光、イオン強度、放射能、細胞の位置、対象部位、微小環境、１つ以上の金属イオンの存在または濃度から選択され得る。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、刺激はリガンドである。リガンドは、核酸ベース、タンパク質ベース、脂質ベース、有機、無機、または前述のものの任意の組み合わせであってもよい。いくつかの実施形態では、リガンドは、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、脂質誘導体、ステロール、ステロイド、代謝産物誘導体及び小分子からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、刺激は小分子である。いくつかの実施形態では、小分子は細胞透過性である。本発明に有用なリガンドとして、２０１６年４月１１日に出願された同時係属中の共有米国第６２／３２０，６８４号の表２、または２０１７年３月３日に出願された米国仮出願第６２／４６６，５９６号及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示されているリガンドが挙げられるが、これらに限定されず、各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。いくつかの実施形態では、小分子はＦＤＡ承認済みであり、安全であり、経口投与される。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、リガンドは、ジヒドロ葉酸レダクターゼに結合する。いくつかの実施形態では、リガンドは、ジヒドロ葉酸レダクターゼに結合し、また、その機能を阻害するが、本明細書ではそれをジヒドロ葉酸阻害剤と呼ぶ。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、リガンドは、ヒトＤＨＦＲの選択的阻害剤であってもよい。本発明のリガンドはまた、Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ種、Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ種、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ種、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ種、及びＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ種などの細菌及び寄生生物のジヒドロ葉酸還元酵素の選択的阻害剤であってもよい。他のＤＨＦＲに特異的なリガンドを修飾して、ヒトジヒドロ葉酸還元酵素への結合を向上させてもよい。

【０１１４】

ジヒドロ葉酸阻害剤の例として、トリメトプリム（ＴＭＰ）、メトトレキサート（ＭＴＸ）、プララトレキサート、ピリトレキシムピリメタミン、タロトレキシン、クロログアニド、ペンタミジン、トリメトレキサート、アミノプテリン、Ｃ１　８９８三塩酸塩、ペ

メトレキセド二ナトリウム、ラルチトレキセド、スルファグアニジン、フォロチン、イクラプリム、及びジアベリジンが挙げられるが、これらに限定されない。ＤＨＦＲ阻害剤の他の例として、Ｂａｓｉｌｌｅａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓによって開発されたＢＡＬ００３０５４３、ＢＡＬ００３０５４４及びＢＡＬ００３０５４５；ならびにＷＲ９９２１０、及びＰ２１８、Ｚｈａｎｇ Ｑ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｉｎｔ Ｊ Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ Ａｇｅｎｔｓ．２０１５ Ａｕｇ；４６（２）：１７４－１８２によって記載された阻害剤のいずれか（その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）が挙げられる。いくつかの阻害剤は、ヒトＤＨＦＲへの結合を劇的に低下させる嵩高いベンジル基を含む。いくつかの実施形態では、嵩高いベンジル基を含まないように阻害剤を設計して、ＴＭＰ結合を向上させてもよい。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、本発明のリガンドは、ポリグルタメートであってもよく、またはポリグルタミル化不可能であってもよい。天然の葉酸と同様に、ポリグルタミル化葉酸もグルタミン酸残基を含むため、細胞内ポリグルタミル化を受ける。対照的に、非ポリグルタミル化系抗葉酸剤はグルタミン酸残基を欠いているため、ポリグルタミル化には利用できない。いくつかの実施形態では、ポリグルタミル化リガンドは、細胞外にもはや輸送することができないため、細胞内保持を増加させることが好ましい場合がある。他の実施形態では、細胞内保持を減少させるために、非ポリグルタミル化リガンドが好ましい場合がある。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、本発明のリガンドには、ジヒドロ葉酸またはヒトＤＨＦＲに結合し得るその誘導体のいずれかが含まれ得る。いくつかの実施形態では、本発明のリガンドは、２，４，ジアミノ複素環式化合物であってもよい。いくつかの実施形態では、ジヒドロ葉酸の４－オキソ基を修飾してＤＨＦＲ阻害剤を生成してもよい。一実施例では、４－オキソ基を４－アミノ基で置き換えてもよい。プテリジン、キナゾリン、ピリドピリミジン、ピリミジン、及びトリアジンを含む様々なジアミノ複素環も、ＤＨＦＲ阻害剤を開発するための骨格として使用してもよく、本発明において使用してもよい。公知のＤＨＦＲ阻害剤と複合体化したＤＨＦＲの結晶構造を、より好適なＤＨＦＲリガンドの合理的な設計に利用してもよい。本明細書において使用するリガンドには、任意置換のアリールまたはヘテロアリール環に連結したプロパルギル基を有する２，４－ジアミノピリミジン環が含まれる（米国特許第８，４２６，４３２号に記載されているように；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、リガンドには、ＤＨＦＲへの結合を媒介することが知られているリガンドの部分を含むＴＭＰ由来リガンドが含まれる。また、リガンドを修飾して、他の葉酸代謝酵素へのオフターゲット結合を減少させ、ＤＨＦＲへの特異的結合を増加させてもよい。

【０１１８】

３．ペイロード：免疫療法薬

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、生物において免疫応答を誘導する免疫療法薬であってもよい。免疫療法薬は、サイトカイン、安全スイッチ（例えば、自殺遺伝子）、調節スイッチ、キメラ抗原受容体、または免疫応答を誘導する任意の薬剤であり得るが、これらに限定されない。一実施形態では、免疫療法薬は、細胞または対象において抗がん免疫応答を誘導する。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、本明細書に記載の共刺激分子及び／または細胞内ドメインのいずれかであってもよい。いくつかの実施形態では、それぞれ異なるＳＲＥの制御下にある１つ以上の共刺激分子を本発明で使用してもよい。ＳＲＥ調節共刺激分子はまた、第１世代ＣＡＲ、第２世代ＣＡＲ、第３世代ＣＡＲ、第４世代、または本明細書に記載の他のＣＡＲ設計とともに発現させてもよい。

【０１２０】
サイトカイン、ケモカイン、及び他の可溶性因子
本発明によれば、本発明のＣＡＲを本発明の他のペイロードと共に利用してもよく、それらは、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、ならびに免疫細胞、がん細胞及び他の細胞型によって産生される可溶性タンパク質であってもよく、これらは体内の細胞と組織の間の化学伝達物質として機能する。これらのタンパク質は、細胞の増殖、分化、移動、及び生存への影響から、いくつかのエフェクター活性に至るまで、幅広い生理学的機能を媒介する。例えば、活性化Ｔ細胞は、細胞傷害性機能のための様々なサイトカインを産生し、腫瘍細胞を排除する。
【０１２１】
いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、インターロイキン、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、インターフェロン（ＩＦＮ）、ＴＧＦβ及びケモカインを含むがこれらに限定されないサイトカイン、ならびにその断片、変異体、類似体、及び誘導体であってもよい。同じ遺伝子またはタンパク質に対する特定の遺伝子及び／またはタンパク質の命名法は、ダッシュ「－」などの句読点またはギリシャ文字などの記号を含むかまたは含まない場合があることは当技術分野において理解されている。これらが本明細書において含まれるか含まれないかにかかわらず、当業者によって理解されるように、その意味が変更されることを意味するものではない。例えば、ＩＬ２、ＩＬ２、ＩＬ　２は同じインターロイキンを指す。同様に、ＴＮＦアルファ、ＴＮＦα、ＴＮＦ－アルファ、ＴＮＦ－α、ＴＮＦアルファ及びＴＮＦ　αはすべて同じタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、免疫応答を刺激するサイトカインであってもよい。他の実施形態では、本発明のペイロードは、抗がん免疫応答に負の影響を与える、サイトカインのアンタゴニストであってもよい。
【０１２２】
いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、サイトカイン受容体、組換え受容体、その変異体、類似体、及び誘導体；またはサイトカインのシグナル成分であってもよい。
【０１２３】
いくつかの実施形態では、本発明のサイトカインを利用して、免疫療法に使用するＣＤ８＋T_{EM}、ナチュラルキラー細胞及び腫瘍浸潤性リンパ球（ＴＩＬ）細胞などの免疫細胞の増殖、生存、持続性、及び効力を向上させてもよい。他の実施形態では、２つ以上のＤＤ調節サイトカインで改変したＴ細胞を利用して、Ｔ細胞活性化及び腫瘍微小環境リモデリングの速度制御を提供する。一態様では、本発明は、サイトカイン療法に関連する毒性を最小限に抑えるための生体回路及び組成物を提供する。腫瘍量の軽減に成功したにもかかわらず、全身性サイトカイン療法は、多くの場合、重篤な用量制限的な副作用を発生させる。観察される毒性には２つの要因が寄与する（ａ）多面発現性であり、この場合、サイトカインは異なる細胞型に影響を与え、状況に応じて同じ細胞に反対の効果を生じる場合がある（ｂ）サイトカインは血清半減期が短いため、治療効果を達成するために高用量で投与する必要があり、これにより多面発現効果が悪化する。一態様では、本発明のサイトカインを利用して、有害作用の事象においてサイトカイン発現を調節してもよい。いくつかの実施形態では、本発明のサイトカインを、寿命を延長させるか、または特異性を強化するように設計して毒性を最小化してもよい。
【０１２４】
いくつかの実施形態では、本発明のペイロードはインターロイキン（ＩＬ）サイトカインであってもよい。インターロイキン（ＩＬ）は、免疫応答を調節するために白血球によって産生される糖タンパク質のクラスである。本明細書中で使用する場合、用語「インターロイキン（ＩＬ）」とは、任意の種または供給源に由来するインターロイキンポリペプチドを指し、完全長タンパク質ならびにタンパク質の断片または部分を含む。いくつかの態様では、インターロイキンのペイロードは、ＩＬ１、ＩＬ１α（ヘマトポエチン－１とも呼ばれる）、ＩＬ１β（カタボリン）、ＩＬ１δ、ＩＬ１ε、ＩＬ１η、ＩＬ１ζ、イ

ンターロイキン－１ファミリーメンバー１～１１（ＩＬ１Ｆ１～ＩＬ１Ｆ１１）、インターロイキン－１相同体１～４（ＩＬ１Ｈ１～ＩＬ１Ｈ４）、ＩＬ１関連タンパク質１～３（ＩＬ１ＲＰ１～ＩＬ１ＲＰ３）、ＩＬ２、ＩＬ３、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ７、ＩＬ８、ＩＬ９、ＩＬ１０、ＩＬ１０Ｃ、ＩＬ１０Ｄ、ＩＬ１１、ＩＬ１１ａ、ＩＬ１１ｂ、ＩＬ１２、ＩＬ１３、ＩＬ１４、ＩＬ１５、ＩＬ１６、ＩＬ１７、ＩＬ１７Ａ、Ｉｌ１７Ｂ、ＩＬ１７Ｃ、ＩＬ１７Ｅ、ＩＬ１７Ｆ、ＩＬ１８、ＩＬ１９、ＩＬ２０、ＩＬ２０様（ＩＬ２０Ｌ）、Ｉｌ２１、ＩＬ２２、ＩＬ２３、ＩＬ２３Ａ、ＩＬ２３－ｐ１９、ＩＬ２３－ｐ４０、ＩＬ２４、Ｉｌ２５、ＩＬ２６、ＩＬ２７、ＩＬ２８Ａ、ＩＬ２８Ｂ、ＩＬ２９、ＩＬ３０、ＩＬ３１、ＩＬ３２、ＩＬ３３、ＩＬ３４、ＩＬ３５、ＩＬ３６α、ＩＬ３６β、ＩＬ３６γ、ＩＬ３６ＲＮ、ＩＬ３７、ＩＬ３７ａ、ＩＬ３７ｂ、ＩＬ３７ｃ、ＩＬ３７ｄ、ＩＬ３７ｅ及びＩＬ３８から選択される。他の態様では、本発明のペイロードは、ＣＤ１２１ａ、ＣＤｗ１２１ｂ、ＩＬ２Ｒα／ＣＤ２５、ＩＬ２Ｒβ／ＣＤ１２２、ＩＬ２Ｒγ／ＣＤ１３２、ＣＤｗ１３１、ＣＤ１２４、ＣＤ１３１、ＣＤｗ１２５、ＣＤ１２６、ＣＤ１３０、ＣＤ１２７、ＣＤｗ２１０、ＩＬ８ＲＡ、ＩＬ１１Ｒα、ＣＤ２１２、ＣＤ２１３α１、ＣＤ２１３α２、ＩＬ１４Ｒ、ＩＬ１５Ｒα、ＣＤｗ２１７、ＩＬ１８Ｒα、ＩＬ１８Ｒβ、ＩＬ２０Ｒα、及びＩＬ２０Ｒβから選択されるインターロイキン受容体であってもよい。

【０１２５】

一実施形態では、本発明のペイロードはＩＬ２を含み得る。一態様では、本発明のエフェクターモジュールは、ＤＤ－ＩＬ２融合ポリペプチドであってもよい。ＤＤ－ＩＬ２及びその構成要素に対応するアミノ酸配列を、表４に記載する。表４のアミノ酸配列は、終止コドンを含む場合があり、これをアミノ酸配列の最後に「＊」を付して表に示す。

【表４－１】
表４．ＤＤ－ＩＬ２構築物の配列

分類記載	アミノ酸配列	アミノ酸配列	核酸配列番号／配列
IL2 シグナル配列	MYRMQLLSCIALSLALVTNS	49	55-56, 117-118
リンカー	EFSTEF	50	57
リンカー	MH	-	ATGCAC
IL2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFCQSIISTLT	51	58-59
FKBP (F36V, L106P)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSR DRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPE	11	60, 878-882
ecDHFR (野生型のアミノ酸 2～159) (R12Y, Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVI MGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEA IAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEG DTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR	9	61, 869-874
OT-IL2-001 (IL2シグナル配列-リンカー(EFSTEF)-FKBP (F36V, L106P)-リンカー(MH)-IL2-終止)	MYRMQLLSCIALSLALVTNSEFSTEFGVQVETISPGDGRT FPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQE VIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPH ATLVFDVELLKPEMHAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	52	62
OT-IL2-002 (IL2シグナル配列-IL2-終止)	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLD LQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	53	63

【表４－２】

OT-IL2-003 (IL2シグナル配列-リンカー(EFSTEF)-ecDHFR (野生型のアミノ酸 2～159) (R12Y, Y100I)-リンカー(MH)-IL2-終止)	MYRMQLLSCIALSLALVTNSEFSTEFISLIAALAVDYVIG MENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLP GRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIG GGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWES VFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRMHAPTSSSTKKTQLQL EHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	54	64

【０１２６】

本発明のいくつかの態様では、ＩＬ２ムテインをペイロードとして使用してもよい。本明細書中で使用する場合、用語「ムテイン」とは、タンパク質に変異、変化または変更を有する構築物、分子または配列であり、したがって、変異体、例えばタンパク質変異体、ムテインとしても知られる。したがって、「ＩＬ２ムテイン」はＩＬ２変異体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ２ムテインは野生型ＩＬ２タンパク質のバリアントであり、野生型ＩＬ２は配列番号５１のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、それは、ＩＬ２Ｒαβγを発現する細胞のみに結合及び活性化するが、ＩＬ２Ｒβγのみを発現する細胞には有意に結合または活性化しないＩＬ２バリアントを指す。いくつかの実施例では、ＩＬ２ムテインは、ＩＬ２ＲβまたはＩＬ２Ｒγのいずれかへの結合を担うＩＬ２の残基を、ＩＬ２ＲβまたはＩＬ２ＲγとＩＬ２の相互作用を無効にするように置換したＩＬ２タンパク質であってもよい。他の例では、ＩＬ２ムテインは、ＩＬ２Ｒαに対する高い親和性を付与する変異を含むＩＬ２タンパク質であってもよい。ＩＬ２ムテインは、ＮＫ細胞に対してＴ細胞を選択的に活性化するのに必要な高親和性ＩＬ２受容体（すなわち、ＩＬ２Ｒαβγ）を優先的に活性化することができるＩＬ２選択的アゴニスト（$IL2_{SA}$）であってもよい。いくつかの実施形態では、ＩＬ２ムテインは、低親和性ＩＬ２Ｒβγに優先的に結合するがＣＤ２５に対する親和性が低下したＩＬ２タンパク質であってもよい。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、ＩＬ２ムテインを使用して、Ｔｒｅｇ細胞を優先的に増殖または刺激してもよい。本明細書中で使用する場合、「Ｔｒｅｇ細胞を優先的に増殖または刺激する」とは、ＩＬ２ムテインが、調節性Ｔ細胞の増殖、生存、活性化及び／または機能を促進することを意味する。

【０１２８】

例示的なＩＬ２ムテインとして、Ｎ８８Ｒ置換（Ｓｈａｎａｆｅｌｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２０００，１８：１１９７－１２０２）、Ｖ９１Ｋ置換を有するＩＬ２（例えば、米国特許公開第ＵＳ２０１４０２８６８９８号）；Ｖ９１Ｋ置換、Ｃ１２５Ａ置換、３つの変異を有するＩＬ２：Ｖ６９Ａ、Ｎ７１Ｒ、Ｑ７４Ｐ；ＩＬ２Ｒαに高い親和性を有するＩＬ２ムテイン（Ｎ２９Ｓ、Ｙ３１Ｈ、Ｋ３５Ｒ、Ｔ３７Ａ、Ｋ４８Ｅ、Ｖ６９Ａ、Ｎ７１Ｒ、Ｑ７４Ｐ）；ＩＬ２Ｒαに高い親和性を有し、シグナル伝達活性が低下したＩＬ２ムテイン（Ｎ２９Ｓ、Ｙ３１Ｈ、Ｋ３５Ｒ、Ｔ３７Ａ、Ｋ４８Ｅ、Ｖ６９Ａ、Ｎ７１Ｒ、Ｑ７４Ｐ、Ｎ８８Ｄ）、ならびにＰＣＴ出願第１９９９０６０１２８号に記載されているＤ２０Ｈ、Ｄ２０Ｉ、Ｎ８８Ｇ、Ｎ８８Ｉ、Ｎ８８Ｒ、及びＱ１２６Ｌ置換が挙げられ得るがこれらに限定されず；その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。他の態様では、ＩＬ２ムテインとして、米国特許第４，５１８，５８４号；第５，１１６，９４３号；第５，２０６，３４４号；第６，９５５，８０７号；第７，１０５，６５３号；第７，３７１，３７１号；第７，８０３，３６１号；第８，１２４，０６６号；第８，３４９，３１１号；第８，７５９，４８６号；及び第９，２０６，２４３号；ＰＣＴ特許公開第ＷＯ２００５０８６７５１号及び第ＷＯ２０１２０８８４４６号；欧州特許第ＥＰ０２３４５９９号及び第ＥＰ０２００２８０号ならびにＳｉｍ，Ｇ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｒｅｓ；４（１１）：９８３－９９４に記載されているものを挙げてもよく；その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０１２９】

いくつかの態様では、ＩＬ２ムテインを、ＩＬ２ムテインの血清半減期を延長するポリペプチド、例えばＩｇＧ　Ｆｃフラグメントに融合させてもよい。好ましいＦｃ領域はヒトＩｇＧ由来であり、これにはＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４が含まれる。他の態様では、本発明のペイロードは、第２の機能的ポリペプチドを比較するＩＬ２融合タンパク質であってもよい。非限定的な例では、ＩＬ２融合タンパク質には、アポトーシス促進性Ｂｃｌ－２ファミリーポリペプチド（Ｂａｄ、Ｂｉｋ／Ｎｂｋ、Ｂｉｄ、Ｂｉｍ／Ｂｏｄ、Ｈｒｋ、ＢａｋまたはＢａｘなど）と融合させたＩＬ２またはＩＬ２ムテイ

ンポリペプチドが含まれる場合があり；そのような融合タンパク質は、ＩＬ２受容体を発現する標的細胞の細胞生存の阻害、細胞増殖の阻害、または細胞死またはアポトーシスの促進が可能であり得る。あるいは、ＩＬ２またはＩＬ２ムテインポリペプチドを、抗アポトーシスＢｃｌ－２ファミリーポリペプチド（Ｂｃｌ－$_{ＸＬ}$、Ｂｃｌ－ｗまたは Ｂｃｌ－２など）と融合させてもよい。融合タンパク質は、ＩＬ２受容体を発現する標的細胞の細胞生存を高め、細胞増殖を高め、または細胞死もしくはアポトーシスを抑制することができる可能性がある。例えば、米国特許公開第ＵＳ２０１６／０２２９９０１号参照。

【０１３０】

さらに、ＩＬ２融合タンパク質は、細胞間相互作用を促進することができ；したがって、抗がん免疫応答を促進するＩＬ２－ＧＭＣＳＦ融合タンパク質であってもよい（Ｗｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄ．，２０１６，１４：４１）。

【０１３１】

安全スイッチ

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、傷害性が重度の場合、養子移入した細胞を排除し、それによりＴ細胞療法の有害作用を軽減することができるＳＲＥ調節による安全スイッチを含み得る。免疫療法において養子移入したＴ細胞は、ＴＡＡの正常な組織発現に応答して正常な細胞を攻撃する場合がある。養子移入したＴ細胞のオン腫瘍標的活性でさえ、腫瘍溶解症候群、サイトカイン放出症候群、及び関連するマクロファージ活性化症候群などの傷害性をもたらし得る。安全スイッチを利用して、アポトーシス誘導または免疫監視によって不適切に活性化された養子移入細胞を排除してもよい。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、安全スイッチとして作用する誘導性キラー／自殺遺伝子を含み得る。養子移植免疫細胞に導入する場合、キラー／自殺遺伝子は、それらのアロ反応性を制御することができる。キラー／自殺遺伝子は、ＳＲＥの非治療的リガンド（例えばＤＤ）の投与により形質導入細胞の条件付きアポトーシスを可能にするアポトーシス遺伝子（例えば、任意のカスパーゼ遺伝子）であってもよい。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードはカスパーゼ９であってもよい。いくつかの例では、カスパーゼ９を改変し、基底発現を低下させ、カスパーゼ動員ドメイン（ＣＡＲＤ）を欠損させてもよい（米国特許第ＵＳ９４３４９３５Ｂ２号の配列番号２６及び配列番号２８；その内容はその全体を参照により援用する）。

【０１３４】

一実施形態では、本発明のペイロードは、自殺遺伝子系であるｉＣａｓｐ９／化学誘導型二量体化（ＣＩＤ）系であり、これは、ヒトＦＫ５０６タンパク質由来の薬物結合ドメインに融合させたカスパーゼ９遺伝子由来のポリペプチドからなる。生物学的に不活性な低分子ＡＰ１９０３（ｒｉｍｉｄｕｃｉｄ）の投与により、薬物結合ドメインの架橋及び融合タンパク質の二量体化、さらにはカスパーゼ９の二量体化が誘導される。これにより、下流エフェクターのカスパーゼ３の活性化と細胞アポトーシスの誘導が生じる（Ｓｔｒａａｔｈｏｆ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２００５．１０５：４２４７－４２５４；参照によりその全体を本明細書に援用する）。ｉＣａｓｐ９遺伝子を含むＣＡＲＴを使用した前臨床試験では、マウスモデルでのｉｎ ｖｉｖｏでのＣＡＲ Ｔ細胞の効果的な除去が示され、このアプローチの潜在的な有効性が示されている（Ｂｕｄｄｅ ｅｔ ａｌ，Ｐｌｏｓ Ｏｎｅ，２０１３，８：ｅ８２７４２．１０．１３７１；Ｈｏｙｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｌｅｕｋｅｍｉａ，２０１０；２４（６）：１１６０－１１７０）。一実施形態では、本発明のペイロードは、カスパーゼ９を含み得る。一態様では、本発明のエフェクターモジュールは、ＤＤ－カスパーゼ９融合ポリペプチドであってもよい。ＤＤ－カスパーゼ９は、表５に示すアミノ酸配列を有し得る。表５のアミノ酸配列は、終止コドンを含む場合があり、これをアミノ酸配列の最後に「＊」を付けて表に示す。

【表５－１】
表５．ＤＤ－カスパーゼ９構築物

分類記載/構築物ID	アミノ酸配列	アミノ酸配列番号	核酸配列番号/配列
カスパーゼ9	DEADRRLLRRCRLRLVEELQVDQLWDALLSRELFRPHMIEDIQ RAGSGSRRDQARQLIIDLETRGSQALPLFISCLEDTGQDMLAS FLRTNRQAAKLSKPTLENLTPVVLRPEIRKPEVLRPETPRPVD IGSGGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCR ESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLAL LELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDGCPVS VEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSY STFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVA NAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTS	65	81～82

【表５－２】

カスパーゼδCD	GVDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTS	66	83
リンカー	VDYPYDVPDYALD	67	84
リンカー	SGGGS	68	85, 69, 86
リンカー	QLIGMLQGLMRDL	908	909
リンカー	SG	-	AGCGGC
FKBP(F36V,L106P)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPE	11	60, 878 ～ 882
FKBP(F36V)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE	70	87
FKBP(E31G,F36V,R71G,K105E)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE	12	88, 883 ～ 889
ecDHFR(R12Y,Y100I)	MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR	8	89
ecDHFR(野生型のアミノ酸2～159)(R12Y,E129K)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYKPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR	71	90
ecDHFR(野生型のアミノ酸2～159)(R12Y,Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR	9	61, 869 ～ 874
hDHFR(Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	18	91
hDHFR(V75F,Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLFLSRELKEPPQG	31	92

【表５－３】

	AHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND		
hDHFR(L94A,T147A)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSS VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQG AHFLSRSADDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDAFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND	32	93
OT-CASP9-001(Met-FKBP(F36V,L106P)-リンカー(SGGGS)-カスパーゼ 9-終止)	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDR NKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGAT GHPGIIPPHATLVFDVELLKPESGGGSDEADRRLLRRCRLRLV EELQVDQLWDALLSRELFRPHMIEDIQRAGSGSRRDQARQLII DLETRGSQALPLFISCLEDTGQDMLASFLRTNRQAAKLSKPTL ENLTPVVLRPEIRKPEVLRPETPRPVDIGSGGFGDVGALESLR GNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEK LRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVV VILSHGCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSL GGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATP FQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGS WYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTS*	72	94
OT-CASP9-002(ecDHFR(R12Y,Y100I)-リンカー(SGGGS)-カスパーゼ 9-終止)	MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMG RHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACG DVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYE PDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRSGGGSDEADRRLL RRCRLRLVEELQVDQLWDALLSRELFRPHMIEDIQRAGSGSRR DQARQLIIDLETRGSQALPLFISCLEDTGQDMLASFLRTNRQA AKLSKPTLENLTPVVLRPEIRKPEVLRPETPRPVDIGSGGFGD VGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDH GALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIF NGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGS NPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVS WRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTS*	73	95
OT-CASP9-003(hDHFR(Y122I)-リンカー(SGGGS)-カスパーゼ 9-終止)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSS VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQG AHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKNDSGGGSDEADRRLLRRCRLRLVEELQVDQ LWDALLSRELFRPHMIEDIQRAGSGSRRDQARQLIIDLETRGS QALPLFISCLEDTGQDMLASFLRTNRQAAKLSKPTLENLTPVV	74	96

【表５－４】

	LRPEIRKPEVLRPETPRPVDIGSGGFGDVGALESLRGNADLAY ILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGC QASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLF FIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRT FDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKL FFKTS*		
OT-CASP9-004 (hDHFR(V75F, Y122I)-リンカー(SGGGS)- カスパーゼ9- 終止)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSS VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLFLSRELKEPPQG AHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKNDSGGGSDEADRRLLRRCRLRLVEELQVDQ LWDALLSRELFRPHMIEDIQRAGSGSRRDQARQLIIDLETRGS QALPLFISCLEDTGQDMLASFLRTNRQAAKLSKPTLENLTPVV LRPEIRKPEVLRPETPRPVDIGSGGFGDVGALESLRGNADLAY ILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGC QASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLF FIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRT FDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKL FFKTS*	75	97
OT-CASP9-005 (hDHFR(L94A, T147A)-リンカー(SGGGS)- カスパーゼ9- 終止)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSS VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQG AHFLSRSADDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDAFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKNDSGGGSDEADRRLLRRCRLRLVEELQVDQ LWDALLSRELFRPHMIEDIQRAGSGSRRDQARQLIIDLETRGS QALPLFISCLEDTGQDMLASFLRTNRQAAKLSKPTLENLTPVV LRPEIRKPEVLRPETPRPVDIGSGGFGDVGALESLRGNADLAY ILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGC QASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLF FIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRT FDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKL FFKTS*	76	98
OT-CASP9-006 (Met-Leu-Glu -FKBP(F36V)- リンカー	MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSR DRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGSGVDGFGDVGALESL RGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCE	77	99

【表５－５】

(SGGGS)-カスパーゼδCD-リンカー(QLIGMLQGLMRDL)-終止)	KLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCV VVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPS LGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDAT PFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSG SWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGC FNFLRKKLFFKTSQLIGMLQGLMRDL*		
OT-CASP9-007(Met-カスパーゼ9-リンカー(SG)-FKBP(E31G,F36V,R71G,K105E)-終止)	MDEADRRLLRRCRLRLVEELQVDQLWDALLSRELFRPHMIEDI QRAGSGSRRDQARQLIIDLETRGSQALPLFISCLEDTGQDMLA SFLRTNRQAAKLSKPTLENLTPVVLRPEIRKPEVLRPETPRPV DIGSGGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFC RESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLA LLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDGCPV SVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVAST SPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRV ANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSSGGVQVETISPGDG RTFPKRGQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEV IRGWEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLV FDVELLELE*	78	100
OT-CASP9-008(Met-カスパーゼ9-リンカー(SG)-ecDHFR(野生型のアミノ酸2～159)(R12Y,Y100I)-終止	MDEADRRLLRRCRLRLVEELQVDQLWDALLSRELFRPHMIEDI QRAGSGSRRDQARQLIIDLETRGSQALPLFISCLEDTGQDMLA SFLRTNRQAAKLSKPTLENLTPVVLRPEIRKPEVLRPETPRPV DIGSGGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFC RESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLA LLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDGCPV SVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVAST SPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRV ANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSSGISLIAALAVDYV IGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPG RKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRV IEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHD ADAQNSHSYCFEILERR*	79	101
OT-CASP9-009(Met-カスパーゼ9-ecDHFR(野生型のアミノ酸2～159)(R12Y,E129K)-終止)	MDEADRRLLRRCRLRLVEELQVDQLWDALLSRELFRPHMIEDI QRAGSGSRRDQARQLIIDLETRGSQALPLFISCLEDTGQDMLA SFLRTNRQAAKLSKPTLENLTPVVLRPEIRKPEVLRPETPRPV DIGSGGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFC RESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLA LLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDGCPV SVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVAST SPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRV	80	102

【表５－６】

	ANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSSGISLIAALAVDYV IGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPG RKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRV YEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYKPDDWESVFSEFHD ADAQNSHSYCFEILERR*		

【０１３５】

いくつかの例では、ｉＣａｓｐ９／ＣＩＤ系は、ｒｉｍｉｄｕｃｉｄの非存在下で基底の二量体化率を示し、意図しない細胞死をもたらすことが示されている。ｉＣａｓｐ９／ＣＩＤの発現レベルの調節は、ｉＣａｓｐ９／ＣＩＤ系の効力を最大化するうえで重要である。ｉＣａｓｐ９／ＣＩＤ系の調節または調整に、本発明の生体回路及び／またはそれらの構成要素のいずれかを利用して、その有用性を最適化してもよい。二量体化誘導アポトーシスパラダイムで使用するタンパク質の他の例として、Ｆａｓ受容体、Ｆａｓ関連タンパク質のデスエフェクタードメイン、ＦＡＤＤ、カスパーゼ１、カスパーゼ３、カスパーゼ７及びカスパーゼ８が挙げられ得るが、これらに限定されない（Ｂｅｌｓｈａｗ Ｐ．Ｊ．ｅｔ ａｌ，Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ．，９９６，３：７３１－７３８；ＭａｃＣｏｒｋｌｅ Ｒ．Ａ．ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ，１９９８，９５：３６５５－３６６０；Ｓｐｅｎｃｅｒ，Ｄ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｂｉｏｌ．１９９６；６：８３９－８４７；各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、本発明の安全スイッチは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ＴＫ）及びシトシンデアミナーゼ（ＣＤ）などの代謝酵素を含み得る。ＨＳＶ－ＴＫは、アシクロビル及びガンシクロビル（ＧＣＶ）を含むヌクレオシド類似体をリン酸化して、三リン酸型ヌクレオシドを生成する。これは、ＤＮＡに組み込まれると連鎖の停止及び細胞死を引き起こす。哺乳類のチミジンキナーゼとは異なり、ＨＳＶ－ＴＫはＧＣＶなどのヌクレオシド類似体に対して１０００倍高い親和性を特徴とし、哺乳類細胞における自殺遺伝子としての使用に適している。シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）は、５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）を細胞傷害性５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）に変換することができる（Ｔｉｒａｂｙ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＭＳ Ｌｅｔｔ．，１９９８，１６７：４１－４９）。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、本発明の安全スイッチは、ＣＡＲ改変型Ｔ細胞で共発現し得るＣＹＰ４Ｂ１変異体（自殺遺伝子として）を含み得る（Ｒｏｅｌｌｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎ Ｔｈｅｒ．，２０１６，Ｍａｙ １９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｇｔ．２０１６．３８）。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、細胞死を誘導することができる融合構築物、例えば、式Ｓｔ－Ｒ１－Ｓ１－Ｑ－Ｓ２－Ｒ２を有するポリペプチドを含む場合があり、式中、Ｓｔはストーク配列であり、Ｒ１／２及びＱは異なるエピトープであり；及びＳ１／２は、任意のスペーサー配列である（国際特許公開第ＷＯ２０１３１５３３９１号参照；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、安全スイッチは、養子移入した細胞の原形質膜で発現する抗原に特異的に結合する治療抗体によって媒介され得る。抗原抗体相互作用により、抗原に対する特定のモノクローナル抗体を投与した後、細胞を除去することができる。非限定的な例として、本発明のペイロードは、安全スイッチを媒介するために使用する抗原及び抗体のペア、例えば、ＣＤ２０及び抗ＣＤ２０抗体（Ｇｒｉｆｆｉｏｅｎ ｅｔ ａｌ．，

Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃａ，２００９，９４：１３１６－１３２０）、タンパク質タグ及び抗タグ抗体（Ｋｉｅｂａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，２００８，１０５：６２３－６２８）、抗ＣＤ２０モノクローナル抗体投与後のＣＤ３４の選択、細胞の追跡、及び細胞の削除を可能にするＣＤ３４（マーカー部分として）及びＣＤ２０（自殺部分として）に由来する小型自殺遺伝子（ＲＱＲ８）複合エピトープ（Ｐｈｉｌｉｐ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２０１４，１２４：１２７７－１２８７）；トランケート型ヒトＥＧＦＲポリペプチド及び抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２０１１，１１８：１２５５－１２６３）；ならびに、米国特許出願公開第ＵＳ２０１５００９３４０１号に記載されているような構造式を有する小型ポリペプチド安全スイッチを含む場合があり；その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０１４０】

調節スイッチ

養子細胞療法（ＡＣＴ）の有用性は、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）の発症率が高いことから制限されてきた。ＧＶＨＤは、養子移入したＴ細胞が免疫応答を誘発し、宿主組織の損傷が生じる場合に発症する。宿主抗原が移植細胞により認識されることにより、急性ＧＶＨＤを意味する炎症促進性サイトカインストームカスケードが引き起こされる。ＧＶＨＤは、エフェクターと免疫系の調節アームとの間の不均衡として特徴付けられる。いくつかの実施形態では、本発明のペイロードを、調節スイッチとして使用してもよい。本明細書中で使用する「調節スイッチ」とは、標的細胞内で発現する場合に、免疫系の調節アームを強化することにより移植片に対する耐性を高めるタンパク質を指す。

【０１４１】

一実施形態では、調節スイッチは、調節性Ｔ（Ｔｒｅｇ細胞）の増殖を優先的に促進するペイロードを含み得る。Ｔｒｅｇは、胸腺の高親和性リガンド上で積極的に選択され、自己抗原に対する寛容性に重要な役割を果たす別個の細胞集団である。さらに、Ｔｒｅｇは、外来抗原に対する末梢性寛容において役割を果たすことも示されている。Ｔｒｅｇは免疫寛容を促進するため、本発明の組成物によるＴｒｅｇの増殖は、ＧＶＨＤを制限するために望ましい場合がある。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、調節スイッチとして、ＮＦκβ、ＦＯＸＯ、核受容体Ｎｒ４ａ、レチノイン酸受容体α、ＮＦＡＴ、ＡＰ－１及びＳＭＡＤなどのＴ　ｒｅｇ活性化因子が挙げられ得るが、これらに限定されない。そのような因子により、Ｔ細胞でのＦｏｒｋ　ｈｅａｄｂｏｘ　Ｐ３（ＦＯＸＰ３）の発現が生じ、調節性Ｔ細胞プログラムの活性化とＴ細胞の増殖が生じる。

【０１４３】

一実施形態では、調節スイッチは、Ｔ細胞の転写調節因子であるＦＯＸＰ３であってもよい。ＦＯＸＰ３の機能はＮＦＡＴの機能を抑制することであり、これにより、ＩＬ２及びエフェクターＴ細胞サイトカインを含む多くの遺伝子の発現の抑制が誘導される。ＦＯＸＰ３は、ＣＤ２Ｓ、細胞傷害性Ｔリンパ球抗原である細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ４）、グルココルチコイド誘導性ＴＮＦ受容体ファミリー遺伝子（ＧＩＴＲ）、及び葉酸受容体４などの遺伝子の転写活性化因子としても機能する。ＦＯＸＰ３は、ＲＯＲＣ（ＲＡＲ関連オーファン受容体Ｃ）に拮抗することにより、ＩＬ１７産生ヘルパーＴ細胞（Ｔｈ１７）の分化を抑制する。エキソン２を欠損するＦＯＸＰ３のアイソフォーム（ＦＯＸＰ３δ２）、またはエキソン７（ＦＯＸＰ３δ７）も調節スイッチとして使用してもよい。一態様では、本発明のエフェクターモジュールは、ＤＤ－ＦＯＸＰ３融合ポリペプチドであってもよい。ＤＤ－ＦＯＸＰ３は、表６に示すアミノ酸配列を含み得る。表６のアミノ酸配列は、終止コドンを含む場合があり、これをアミノ酸配列の最後に「＊」を付けて表に示す。

【表６－１】
表６：ＤＤ－ＦＯＸＰ３構築物

構築物／分類記載	アミノ酸配列	アミノ酸配列番号	核酸配列番号
リンカー	sgggs	68	85, 69, 86
リンカー	SG	-	AGCGGC
FKBP(F36V, L106P)	gvqvetispgdgrtfpkrgqtcvvhytgmledgkkvdssrdrnkpfkfmlgkqevirgweegvaqmsvgqrakltispdyaygatghpgiipphatlvfdvellkpe	11	60, 878～882
FKBP(E31G, F36V, R71G, K105E)	gvqvetispgdgrtfpkrgqtcvvhytgmlgdgkkvdssrdrnkpfkfmlgkqevirgweegvaqmsvgqgakltispdyaygatghpgiipphatlvfdvellele	12	88, 883～889
ecDHFR(R12Y, Y100I)	misliaalavdyvigmenampwnlpadlawfkrntlnkpvimgrhtwesigrplpgrkniilssqpgtddrvtwvksvdeaiaacgdvpeimvigggrvieqflpkaqklylthidaevegdthfpdyepddwesvfsefhdadaqnshsycfeilerr	8	89
ecDHFR(野生型のアミノ酸2～159)(R12Y, Y100I)	isliaalavdyvigmenampwnlpadlawfkrntlnkpvimgrhtwesigrplpgrkniilssqpgtddrvtwvksvdeaiaacgdvpeimvigggrvieqflpkaqklylthidaevegdthfpdyepddwesvfsefhdadaqnshsycfeilerr	9	61, 869～874
全長FOXP3	mpnprpgkpsapslalgpspgaspswraapkasdllgargpggtfqgrdlrggahasssslnpmppsqlqlptlplvmvapsgarlgplphlqallqdrphfmhqlstvdahartpvlqvhplespamisltppttatgvfslkarpglppginvaslewvsrepallctfpnpsaprkdstlsavpqssypllangvckwpgcekvfeepedflkhcqadhlldekgraqcllqremvqsleqqlvlekeklsamqahlagkmaltkassvassdkgsccivaagsqgpvvpawsgpreapdslfavrrhlwgshgnstfpeflhnmdyfkfhnm	103	911

【表６－２】

	rppftyatlirwaileapekqrtlneiyhwftrmfaffrnhp atwknairhnlslhkcfvrvesekgavwtvdelefrkkrsqr psrcsnptpgp*		
全長FOXP3のアミノ酸2～431	pnprpgkpsapslalgpspgaspswraapkasdllgargpgg tfqgrdlrggahasssslnpmppsqlqlptlplvmvapsgar lgplphlqallqdrphfmhqlstvdahartpvlqvhplespa misltppttatgvfslkarpglppginvaslewvsrepallc tfpnpsaprkdstlsavpqssypllangvckwpgcekvfeep edflkhcqadhlldekgraqcllqremvqsleqqlvlekekl samqahlagkmaltkassvassdkgsccivaagsqgpvvpaw sgpreapdslfavrrhlwgshgnstfpeflhnmdyfkfhnmr ppftyatlirwaileapekqrtlneiyhwftrmfaffrnhpa twknairhnlslhkcfvrvesekgavwtvdelefrkkrsqrp srcsnptpgp	104	912
FOXP3δ2	mpnprpgkpsapslalgpspgaspswraapkasdllgargpg gtfqgrdlrggahasssslnpmppsqlqlstvdahartpvlq vhplespamisltppttatgvfslkarpglppginvaslewv srepallctfpnpsaprkdstlsavpqssypllangvckwpg cekvfeepedflkhcqadhlldekgraqcllqremvqsleqq lvlekeklsamqahlagkmaltkassvassdkgsccivaags qgpvvpawsgpreapdslfavrrhlwgshgnstfpeflhnmd yfkfhnmrppftyatlirwaileapekqrtlneiyhwftrmf affrnhpatwknairhnlslhkcfvrvesekgavwtvdelef rkkrsqrpsrcsnptpgp	105	913
FOXP3δ2	pnprpgkpsapslalgpspgaspswraapkasdllgargpgg tfqgrdlrggahasssslnpmppsqlqlstvdahartpvlqv hplespamisltppttatgvfslkarpglppginvaslewvs repallctfpnpsaprkdstlsavpqssypllangvckwpgc ekvfeepedflkhcqadhlldekgraqcllqremvqsleqql vlekeklsamqahlagkmaltkassvassdkgsccivaagsq gpvvpawsgpreapdslfavrrhlwgshgnstfpeflhnmdy fkfhnmrppftyatlirwaileapekqrtlneiyhwftrmfa ffrnhpatwknairhnlslhkcfvrvesekgavwtvdelefr kkrsqrpsrcsnptpgp	106	914
OT-FOXP3-001(FoxP3-終止)	MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPG GTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGA RLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESP AMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALL CTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEE PEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEK LSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPA WSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNM	107	193

【表６－３】

	RPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHP ATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQR PSRCSNPTPGP*		
OT-FOXP3-002(FoxP3δ2-終止)	MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPG GTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLSTVDAHARTPVLQ VHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWV SREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPG CEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQ LVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGS QGPVVPAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMD YFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMF AFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEF RKKRSQRPSRCSNPTPGP*	108	194
OT-FOXP3-003(Met-FKBP(F36V,L106P)-リンカー(SGGGS)-全長FOXP3のアミノ酸2～431-終止)	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRD RNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPESGGGSPNPRPGKPSAPSL ALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHA SSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQD RPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGV FSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDST LSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLL DEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMAL TKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLFAV RRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAI LEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLH KCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGP*	109	195
OT-FOXP3-004(ecDHFR(R12Y,Y100I)-リンカー(SGGGS)-全長FOXP3のアミノ酸2～431-終止)	MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIM GRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAA CGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFP DYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRSGGGSPNPR PGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQG RDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPL PHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISL TPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPN PSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFL KHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQ AHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPR EAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFT YATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKN AIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCS NPTPGP*	110	196

【表６－４】

OT-FOXP3-005(FoxP3-リンカー(SG)-FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E)-終止)	MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPG GTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGA RLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESP AMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALL CTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEE PEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEK LSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPA WSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNM RPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHP ATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQR PSRCSNPTPGPSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGM LGDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQG AKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	111	197
OT-FOXP3-006(FoxP3-リンカー(SG)-ecDHFR(野生型のアミノ酸2～159)(R12Y, Y100I)-終止)	MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPG GTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGA RLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESP AMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALL CTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEE PEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEK LSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPA WSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNM RPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHP ATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQR PSRCSNPTPGPSGISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAW FKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRV TWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTH IDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEIL ERR*	112	198
OT-FOXP3-007(Met-FKBP(F36V, L106P)-リンカー(SG)-FOXP3δ2のアミノ酸2～396-終止)	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRD RNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPESGPNPRPGKPSAPSLALG PSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSS SLNPMPPSQLQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTT ATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPR KDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQA DHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAG KMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDS LFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLI RWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHN LSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPG P*	113	199
OT-FOXP3	MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIM	114	200

【表６－５】

-008(ecDHFR(R12Y, Y100I)-リンカー(SG)-FOXP3δ2のアミノ酸2～396-終止)	GRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRSGPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGP*		
OT-FOXP3-009(FoxP3δ2-リンカー(SG)-FKBP(E31G, F36V, R71G, K105E)-終止)	MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGPSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	115	201
OT-FOXP3-010(FoxP3δ2-リンカー(SG)-ecDHFR（野生型のアミノ酸2～159)(R12Y, Y100I)-終止)	MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGPSGISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR*	116	202

【０１４４】

抗体

いくつかの実施形態では、抗体、その断片及びバリアントは、本発明のペイロードである。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、限定するものではないが、２０１６年４月１１日に出願された同時係属中の共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号の表５、または２０１７年３月３日に出願された米国特許出願第６２／４６６，５９６号及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示されるもののいずれかを含み、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０１４６】

抗体断片及びバリアント

いくつかの実施形態では、抗体断片及びバリアントは、インタクトな抗体由来の抗原結合領域を含み得る。抗体断片及びバリアントの例として、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、及びＦｖフラグメント；二重特異性抗体；直鎖抗体；単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）などの単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられ得るが、これらに限定されない。抗体のパパイン消化により、「Ｆａｂ」フラグメントと呼ばれる２つの同一の抗原結合断片が生成され、それぞれが単一の抗原結合部位を有する。また、残りの「Ｆｃ」フラグメントも生成され、この断片の名称は、容易に結晶化する能力を反映したものである。ペプシン処理により、２つの抗原結合部位を有し、抗原との架橋が依然として可能なＦ（ａｂ’）２フラグメントが生成する。本発明の医薬組成物、生体回路、生体回路構成要素、ＳＲＥまたはペイロードを含むエフェクターモジュールは、これらの断片の１つ以上を含み得る。

【０１４７】

本明細書の目的のために、「抗体」は、重鎖及び軽鎖可変ドメインならびにＦｃ領域を含み得る。本明細書中で使用する場合、用語「天然抗体」とは、通常、２つの同一の軽（Ｌ）鎖及び２つの同一の重（Ｈ）鎖からなる約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質を指す。抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子は公知であり、それぞれを構成するセグメントは十分に特徴付けられ、記載されている（Ｍａｔｓｕｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．１９９８，１８８（１１）：２１５１－６２及びＬｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２００４，１０３（１２）：４６０２－４６０９；各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。各軽鎖は、１つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結するが、一方、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。また、各重鎖と軽鎖は、一定の間隔を置いた鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖の一端には可変ドメイン（ＶＨ）があり、その後にいくつかの定常ドメインが続く。各軽鎖は、一端に可変ドメイン（ＶＬ）を有し、他端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第１の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列する。

【０１４８】

本明細書中で使用する場合、用語「可変ドメイン」とは、抗体間で配列が大幅に異なり、特定の抗原に対する各特定の抗体の結合及び特異性に用いられる、抗体重鎖及び軽鎖の両方に見出される特定の抗体ドメインを指す。可変ドメインには、超可変領域が含まれる。本明細書中で使用する場合、用語「超可変領域」とは、抗原結合に関与するアミノ酸残基を含む可変ドメイン内の領域を指す。超可変領域内に存在するアミノ酸は、抗体の抗原結合部位の一部となる相補性決定領域（ＣＤＲ）の構造を決定付ける。本明細書中で使用する場合、用語「ＣＤＲ」とは、標的抗原またはエピトープに相補的な構造を含む抗体の領域を指す。抗原と相互作用しない可変ドメインの他の部分は、フレームワーク（ＦＷ）領域と呼ばれる。抗原結合部位（抗原接合部位またはパラトープとしても知られる）は、特定の抗原と相互作用するのに必要なアミノ酸残基を含む。抗原結合部位を構成する正確な残基は通常、結合した抗原との共結晶学によって解明されるが、他の抗体との比較に基づく計算評価も使用することができる（Ｓｔｒｏｈｌ，Ｗ．Ｒ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ

Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ ＰＡ．２０１２．Ｃｈ．３，ｐ４７－５４、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。ＣＤＲを構成する残基の決定は、Ｋａｂａｔ（Ｗｕ ｅｔ ａｌ．，ＪＥＭ，１９７０，１３２（２）：２１１－２５０及びＪｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０００，２８（１）：２１４－２１８、各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）、Ｃｏｔｈｉａ（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，１９６，９０１，Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９８９，３４２，８７７、及びＡｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９７，２７３（４）：９２７－９４８、各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）、Ｌｅｆｒａｎｃ（Ｌｅｆｒａｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２００５，１：３）及びＨｏｎｅｇｇｅｒ（Ｈｏｎｅｇｇｅｒ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２００１，３０９（３）：６５７－７０、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）によって示されるものを含むがこれらに限定されないナンバリングスキームの使用を含み得る。

【０１４９】

ＶＨ及びＶＬドメインはそれぞれ３つのＣＤＲを有する。本明細書中では、ＶＬ ＣＤＲは、可変ドメインポリペプチドに沿ってＮ末端からＣ末端に移動する場合の出現順で、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２及びＣＤＲ－Ｌ３と呼ばれる。本明細書中では、ＶＨ ＣＤＲは、可変ドメインポリペプチドに沿ってＮ末端からＣ末端に移動する場合の出現順で、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２及びＣＤＲ－Ｈ３と呼ばれる。ＣＤＲのそれぞれは、ＣＤＲ－Ｈ３以外は標準構造を優先しており、ＣＤＲ－Ｈ３は、抗体間で配列と長さが非常に可変であり、抗原結合ドメインに様々な３次元構造をもたらし得るアミノ酸配列を有する（Ｎｉｋｏｌｏｕｄｉｓ，ｅｔ ａｌ．，ＰｅｅｒＪ．２０１４，２：ｅ４５６）。いくつかの場合では、関連する抗体のパネル間でＣＤＲ－Ｈ３を分析して抗体の多様性を評価してもよい。ＣＤＲ配列を決定する様々な方法が当技術分野で公知であり、それらを公知の抗体配列に適用してもよい（Ｓｔｒｏｈｌ，Ｗ．Ｒ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ ＰＡ．２０１２．Ｃｈ．３，ｐ４７－５４、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０１５０】

本明細書中で使用する場合、用語「Ｆｖ」とは、完全な抗原結合部位を形成するのに必要な抗体上の最小断片を含む抗体断片を指す。これらの領域は、非共有結合で緊密に結合した１つの重鎖と１つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。Ｆｖフラグメントはタンパク質分解により生成することができるが、大部分は不安定である。通常、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間に可撓性のリンカーを挿入する（単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）を形成するために）ことにより、または重鎖及び軽鎖可変ドメインの間にジスルフィド架橋を導入することにより、安定したＦｖフラグメントを生成するための組換え方法が当技術分野で公知である（Ｓｔｒｏｈｌ，Ｗ．Ｒ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ ＰＡ．２０１２．Ｃｈ．３，ｐ４６－４７、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０１５１】

本明細書中で使用する場合、用語「軽鎖」とは、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてκ及びλと呼ばれる２つの明らかに異なるタイプのうちの１つに割り当てられた任意の脊椎動物種由来の抗体の構成要素を指す。重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体を異なるクラスに割り当てることができる。インタクトな抗体には：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭの５つの主要なクラスがあり、これらのいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、及びＩｇＡ２に分類され得る。

【０１５２】
本明細書中で使用する場合、用語「単鎖Ｆｖ」または「ｓｃＦｖ」とは、ＶＨ及びＶＬ抗体ドメインの融合タンパク質を指し、これらのドメインは、可撓性のペプチドリンカーによって単一のポリペプチド鎖に連結される。いくつかの実施形態では、Ｆｖポリペプチドリンカーにより、ｓｃＦｖが抗原結合に望ましい構造を形成できるようにする。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖを、ファージディスプレイ法、酵母ディスプレイ法、または他のディスプレイ法と組み合わせて利用し、その場合、ｓｃＦＶを、表面メンバー（例えば、ファージコートタンパク質）と関連付けて発現させ、所定の抗原に対する高親和性ペプチドの同定に使用してもよい。

【０１５３】
分子遺伝学を用いて２つのｓｃＦｖをタンデムに設計し、「タンデムｓｃＦｖ」（ｔａｓｃＦｖ）と呼ばれる、リンカードメインによって分離された単一のポリペプチドにすることができる。２つの異なるｓｃＦｖの遺伝子を含むｔａｓｃＦｖを構築すると、「二重特異性単鎖可変フラグメント」（ｂｉｓ－ｓｃＦｖ）が生成される。２つのｔａｓｃＦｖのみが商業企業によって臨床的に開発されており；両方とも、腫瘍学的適応症のためのＭｉｃｒｏｍｅｔによる活発な初期段階の開発における二重特異性薬剤であり、「二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）」として記載されている。ブリナツモマブは、フェーズ２のＢ細胞非ホジキンリンパ腫に対するＴ細胞応答を増強する抗ＣＤ１９／抗ＣＤ３二重特異性ｔａｓｃＦｖである。ＭＴ１１０は、フェーズ１の固形腫瘍に対するＴ細胞応答を増強する抗ＥＰ－ＣＡＭ／抗ＣＤ３二重特異性ｔａｓｃＦｖである。二重特異性、四価の「ＴａｎｄＡｂ」もまた、Ａｆｆｉｍｅｄによって研究されている（Ｎｅｌｓｏｎ，Ａ．Ｌ．，ＭＡｂｓ．，２０１０，Ｊａｎ－Ｆｅｂ；２（１）：７７－８３）。マキシボディ（ＩｇＧのＦｃ（ＣＨ２－ＣＨ３ドメイン）のアミノ末端に融合させた二価ｓｃＦｖ）もまた含まれ得る。

【０１５４】
本明細書中で使用する場合、用語「二重特異性抗体」とは、２つの異なる抗原に結合することができる抗体を指す。そのような抗体は、通常、少なくとも２つの異なる抗体に由来する領域を含む。二重特異性抗体として、Ｒｉｅｔｈｍｕｌｌｅｒ，Ｇ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．２０１２，１２：１２－１８，Ｍａｒｖｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００５．Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ．２００５，２６（６）：６４９－６５８及びＳｃｈａｅｆｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ．２０１１，１０８（２７）：１１１８７－１１１９２に記載の二重特異性抗体のいずれかを挙げてもよく、その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０１５５】
本明細書中で使用する場合、用語「ダイアボディ」とは、２つの抗原結合部位を有する低分子の抗体断片を指す。ダイアボディは機能性二重特異性単鎖抗体（ｂｓｃＡｂ）である。ダイアボディは、軽鎖可変ドメインＶＬに接続された重鎖可変ドメインＶＨを同一ポリペプチド鎖中に含む。同一鎖上の２つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメインを別の鎖の相補ドメインと強制的にペアリングさせ、２つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えばＥＰ４０４，０９７；ＷＯ９３／１１１６１；及びＨｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．，“Ｄｉａｂｏｄｉｅｓ”：Ｓｍａｌｌ ｂｉｖａｌｅｎｔ ａｎｄ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｒａｇｍｅｎｔｓ．ＰＮＡＳ，１９９３．９０：６４４４－６４４８）により完全に記載されており；その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０１５６】
用語「細胞内抗体」とは、抗体が産生される細胞から分泌されないが、その代わりに１つ以上の細胞内タンパク質を標的とする抗体の形態を指す。細胞内抗体は、細胞内輸送、転写、翻訳、代謝プロセス、増殖シグナル伝達及び細胞分裂を含むがこれらに限定されない多数の細胞プロセスに影響を及ぼすために使用してもよい。いくつかの実施形態では、

本発明の方法は、細胞内抗体に基づく療法を含み得る。いくつかのそのような実施形態では、本明細書中に開示する可変ドメイン配列及び／またはＣＤＲ配列を、細胞内抗体に基づく療法のための１つ以上の構築物に組み込んでもよい。

【０１５７】

本明細書中で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な細胞（またはクローン）の集団から得られる抗体を指し、すなわち、モノクローナル抗体の産生中に生じる可能性のあるバリアントを除けば（そのようなバリアントは一般的に少量でしか存在しない）、集団に含まれる個々の抗体は同一であり、及び／または同じエピトープに結合する。通常、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対向する。

【０１５８】

修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られるという抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈すべきではない。本明細書中のモノクローナル抗体には、その重鎖及び／または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、その一方で、鎖（複数可）の残部は、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびにそのような抗体の断片の対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）が含まれる。

【０１５９】

本明細書中で使用する場合、用語「ヒト化抗体」とは、１つ以上の非ヒト（例えばマウス）抗体源（複数可）由来の最小部分と１つ以上のヒト免疫グロブリン源に由来する残部を含むキメラ抗体を指す。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、その場合、レシピエント抗体由来の超可変領域の残基が、所望の特異性、親和性、及び／または性能を有する、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの非ヒト種抗体（ドナー抗体）由来の超可変領域の残基に置換される。一実施形態では、抗体は、ヒト化完全長抗体であってもよい。非限定的な例として、米国特許公開第ＵＳ２０１３０３０３３９９号に示される方法を用いて抗体をヒト化してもよく、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０１６０】

本明細書中で使用する場合、用語「抗体バリアント」とは、改変型抗体（天然または開始抗体に対して）または構造及び／または機能において天然または開始抗体に類似する生体分子（例えば、抗体模倣体）を指す。抗体バリアントは、天然の抗体に比べて、アミノ酸配列、組成、または構造が変更されている場合がある。抗体バリアントには、アイソタイプが変更された抗体（例えば、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、またはＩｇＭ）、ヒト化バリアント、最適化バリアント、多重特異性抗体バリアント（例えば、二重特異性バリアント）、及び抗体断片が含まれるが、これらに限定されない。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物、生体回路、生体回路の構成要素、ＳＲＥまたはペイロードを含むエフェクターモジュールは、抗体模倣体であってもよい。本明細書中で使用する場合、用語「抗体模倣体」とは、抗体の機能または効果を模倣し、それらの分子標的に特異的かつ高親和性で結合する任意の分子を指す。いくつかの実施形態では、抗体模倣体は、フィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン（Ｆｎ３）をタンパク質骨格として組み込むように設計したモノボディであってもよい（ＵＳ６，６７３，９０１；ＵＳ６，３４８，５８４）。いくつかの実施形態では、抗体模倣体は、アフィボディ分子、アフィリン、アフィチン、アンチカリン、アビマー、Ｃｅｎｔｙｒｉｎ、ＤＡＲＰＩＮＳＴＭ、Ｆｙｎｏｍｅｒ及びＫｕｎｉｔｚ及びドメインペプチドを含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の抗体模倣体であってもよい。他の実施形態では、抗体模倣体は、１つ以上の非ペプチド領域を含み得る。

【０１６２】

一実施形態では、抗体は、改変型Ｆｃ領域を含む場合がある。非限定的な例として、改変型Ｆｃ領域は、米国特許公開第ＵＳ２０１５００６５６９０号に記載されている方法により作製してもよく、またはそこに記載されている任意の領域であってよく、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードに、２つ以上のエピトープに結合する多重特異性抗体をコードしてもよい。本明細書中で使用する場合、用語「マルチボディ」または「多重特異性抗体」とは、２つ以上の可変領域が異なるエピトープに結合する抗体を指す。エピトープは、同じまたは異なる標的上にあってもよい。一実施形態では、多重特異性抗体は、国際特許公開第ＷＯ２０１１１０９７２６号及び米国特許公開第ＵＳ２０１５０２５２１１９号に記載されている方法により生成及び最適化してもよく、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。これらの抗体は、高い特異性と高い親和性で複数の抗原に結合することができる。

【０１６４】

特定の実施形態では、多重特異性抗体は、同じまたは異なる抗原上の２つの異なるエピトープを認識する「二重特異性抗体」である。一態様では、二重特異性抗体は、２つの異なる抗原に結合することができる。そのような抗体は、通常、少なくとも２つの異なる抗体由来の抗原結合領域を含む。例えば、二重特異性モノクローナル抗体（ＢｓＭＡｂ、ＢｓＡｂ）は、２つの異なるモノクローナル抗体の断片からなる人工タンパク質であるため、ＢｓＡｂは２つの異なるタイプの抗原に結合することができる。二重特異性抗体のフレームワークには、Ｒｉｅｔｈｍｕｌｌｅｒ，Ｇ．，２０１２．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，２０１２，１２：１２－１８；Ｍａｒｖｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ．２００５，２６（６）：６４９－６５８；及びＳｃｈａｅｆｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ．２０１１，１０８（２７）：１１１８７－１１１９２に記載されているもののいずれかが含まれる場合があり、これらの各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。「三機能性二重特異性」抗体と呼ばれる新世代のＢｓＭＡｂが開発されている。これらは、２つの重鎖と２つの軽鎖からなり、それぞれが２つの異なる抗体に由来し、２つのＦａｂ領域（腕部）が２つの抗原に対向し、Ｆｃ領域（脚部）が２つの重鎖を含み、第３の結合部位を形成する。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、ペイロードに、単一の抗原結合ドメインを含む抗体をコードしてもよい。これらの分子は非常に小さく、フルサイズのｍＡｂで観察される分子量の約１０分の１である。さらなる抗体として、ラクダ及びラマに見出される軽鎖を欠く重鎖抗体の抗原結合可変重鎖領域（ＶＨＨ）に由来する「ナノボディ」が挙げられ得る（Ｎｅｌｓｏｎ，Ａ．Ｌ．，ＭＡｂｓ．２０１０．Ｊａｎ－Ｆｅｂ；２（１）：７７－８３）。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、抗体を「小型化」してもよい。ｍＡｂの小型化の最良の例は、Ｔｒｕｂｉｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓの小型モジュール式免疫医薬品（ＳＭＩＰ）である。これらの分子は、一価または二価であり得、１つのＶＬ、１つのＶＨ抗原結合ドメイン、及び１つまたは２つの定常「エフェクター」ドメインを含み、すべてがリンカードメインによって接続された組換え単鎖分子である。おそらく、そのような分子は、定常ドメインによって付与される免疫エフェクター機能を保持しつつ、断片によって獲得される組織浸透性または腫瘍浸透性の増加という利点を提供する可能性がある。少なくとも３つの「小型化」ＳＭＩＰが臨床開発段階に移行した。Ｗｙｅｔｈと共同開発した抗ＣＤ２０ ＳＭＩＰであるＴＲＵ－０１５は、最も進んだプロジェクトであり、関節リウマチ（ＲＡ）のフェーズ２に進んでいる。全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）及びＢ細胞リンパ腫の以前の試みは最終的に中止された。ＴｒｕｂｉｏｎとＦａｃｅｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙは、ＣＬＬ及び他のリンパ系腫瘍の治療のための抗ＣＤ３７ ＳＭＩＰであるＴＲＵ－０１６の開発で協力しており、これはフェーズ２に達したプロジェクトである。Ｗｙｅｔｈは、ＲＡ、ＳＬＥ、及びおそらくは多発性硬化症などの自己免疫疾患

の治療に対して、抗ＣＤ２０　ＳＭＩＰであるＳＢＩ－０８７をライセンスしたが、これらのプロジェクトは臨床試験の初期段階にとどまっている（Ｎｅｌｓｏｎ，Ａ．Ｌ．，ＭＡｂｓ，２０１０．Ｊａｎ－Ｆｅｂ；２（１）：７７－８３）。

【０１６７】

小型化抗体の一実施例は、「ユニボディ」と呼ばれ、ヒンジ領域がＩｇＧ４分子から除去されている。ＩｇＧ４分子は不安定で、軽－重鎖ヘテロダイマーを相互に交換することができるが、ヒンジ領域の削除により重鎖と重鎖のペアリングが完全に防止され、非常に特異的な一価の軽鎖／重鎖ヘテロダイマーを維持しつつ、Ｆｃ領域を保持してｉｎ　ｖｉｖｏでの安定性と半減期を確保している。この構成は、ＩｇＧ４とＦｃＲの相互作用が不十分であり、一価ユニボディが細胞内シグナル伝達複合体の形成を促進できないため、免疫活性化または発がん性増殖のリスクを最小化し得る（例えば、Ｎｅｌｓｏｎ，Ａ．Ｌ．，ＭＡｂｓ，２０１０．Ｊａｎ－Ｆｅｂ；２（１）：７７－８３参照）。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、単一の単量体可変抗体ドメインからなる抗体断片である単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ、またはナノボディ）をコードする場合がある。これは、抗体全体と同様に、特定の抗原に選択的に結合することができる。一態様では、ｓｄＡｂは「ラクダＩｇ」または「ラクダ科ＶＨＨ」であってもよい。本明細書中で使用する場合、用語「ラクダＩｇ」とは、重鎖抗体の最小の公知の抗原結合ユニットを指す（Ｋｏｃｈ－Ｎｏ　ｌｔｅ，ｅｔ　ａｌ，ＦＡＳＥＢ　Ｊ．，２００７，２１：３４９０－３４９８）。「重鎖抗体」または「ラクダ科抗体」とは、２つのＶＨドメインを含み、軽鎖を含まない抗体を指す（Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　Ｌ．ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１９９９，２３１：２５－３８；国際特許公開第ＷＯ１９９４／０４６７８号及び第ＷＯ１９９４／０２５５９１号；及び米国特許第６，００５，０７９号）。別の態様では、ｓｄＡｂは「免疫グロブリン新規抗原受容体」（Ｉｇ　ＮＡＲ）であってもよい。本明細書中で使用する場合、用語「免疫グロブリン新規抗原受容体」とは、１つの可変新規抗原受容体（ＶＮＡＲ）ドメインと５つの定常新規抗原受容体（ＣＮＡＲ）ドメインのホモダイマーからなるサメ免疫レパートリー由来の抗体のクラスを指す。Ｉｇ　ＮＡＲは、免疫グロブリンベースの最小の公知のタンパク質骨格のいくつかを表し、非常に安定しており、効率的な結合特性を有する。固有の安定性は、（ｉ）マウス抗体に見出される従来の抗体ＶＨ及びＶＬドメインに比べて、かなりの数の荷電及び親水性の表面露出残基を提示する、基礎となるＩｇ骨格；及び（ｉｉ）ループ間ジスルフィド架橋、及びループ内水素結合パターンを含む、相補的決定領域（ＣＤＲ）ループの安定化構造的特徴の両方に起因する。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードに、細胞内抗体をコードしてもよい。細胞内抗体は、抗体を産生する細胞から分泌されるのではなく、１つ以上の細胞内タンパク質を標的とする抗体の一種である。細胞内抗体は、細胞内で発現及び機能し、また、細胞内輸送、転写、翻訳、代謝プロセス、増殖シグナル伝達、細胞分裂を含むがこれらに限定されない多数の細胞プロセスに影響を及ぼすために使用してもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法には、細胞内抗体に基づく療法が含まれる。いくつかのそのような実施形態では、本明細書中に開示する可変ドメイン配列及び／またはＣＤＲ配列を、細胞内抗体に基づく療法のための１つ以上の構築物に組み込む。例えば、細胞内抗体は、１つ以上の糖化細胞内タンパク質を標的とし得るか、または１つ以上の糖化細胞内タンパク質と代替タンパク質との間の相互作用を調節し得る。

【０１７０】

細胞内抗体を哺乳類細胞の異なる区画内で細胞内発現させることにより、内在性分子の機能の遮断または調節が可能である（Ｂｉｏｃｃａ，ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．１９９０，９：１０１－１０８；Ｃｏｌｂｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．２００４，１０１：１７６１６－１７６２１）。細胞内抗体は、タンパク質の折り畳み、タンパク質－タンパク質相互作用、タンパク質－ＤＮＡ相互作用

、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、及びタンパク質修飾を変化させることができる。細胞内抗体は、表現型ノックアウトを誘発し、標的抗原への直接結合、細胞内輸送の迂回、または結合パートナーとの結合の阻害により、中和剤として機能することができる。標的抗原に対する高い特異性と親和性により、細胞内抗体は、特定の標的分子の特定の結合相互作用を遮断する一方で、他の分子には影響を及ぼさないという利点を有する。

【０１７１】

ドナー抗体由来の配列を用いて、細胞内抗体を開発してもよい。細胞内抗体は、多くの場合、単離されたＶＨ及びＶＬドメインなどの単一ドメイン断片として、または細胞内の単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）抗体として組換え発現させる。例えば、細胞内抗体は、多くの場合、単一のポリペプチドとして発現し、可撓性リンカーポリペプチドによって結合した重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含む単鎖抗体を形成する。通常、細胞内抗体は、ジスルフィド結合を欠いており、特異的結合活性により標的遺伝子の発現または活性を調節することができる。単鎖細胞内抗体は、多くの場合、組換え核酸分子から発現し、細胞内に保持されるように設計する（例えば、細胞質、小胞体、またはペリプラズムに保持される）。細胞内抗体は：（Ｍａｒａｓｃｏ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，１９９３，９０：７８８９－７８９３；Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１９９４，５：５９５－６０１；Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４，ＰＮＡＳ，９１：５９３２－５９３６；Ｍａｃｉｅｊｅｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．，１：６６７－６７３；Ｍａｒａｓｃｏ，１９９５，Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈ，１：１－１９；Ｍｈａｓｈｉｌｋａｒ，ｅｔ ａｌ．，１９９５，ＥＭＢＯ Ｊ．１４：１５４２－５１；Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐ．，７：１５１５－１５２５；Ｍａｒａｓｃｏ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．４：１１－１５，１９９７；Ｒｏｎｄｏｎ ａｎｄ Ｍａｒａｓｃｏ，１９９７，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５１：２５７－２８３；Ｃｏｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ １７：２４４５－５６；Ｐｒｏｂａ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７５：２４５－２５３；Ｃｏｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ １７：２４４５－２４５６；Ｈａｓｓａｎｚａｄｅｈ，ｅｔ ａｌ．，１９９８，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４３７：８１－６；Ｒｉｃｈａｒｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：６３５－４４；Ｏｈａｇｅ ａｎｄ Ｓｔｅｉｐｅ，１９９９，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９１：１１１９－１１２８；Ｏｈａｇｅ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９１：１１２９－１１３４；Ｗｉｒｔｚ ａｎｄ Ｓｔｅｉｐｅ，１９９９，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．８：２２４５－２２５０；Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２３１：２０７－２２２；Ａｒａｆａｔ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７：１２５０－６；ｄｅｒ Ｍａｕｒ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：４５０７５－８５；Ｍｈａｓｈｉｌｋａｒ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．９：３０７－１９；及びＷｈｅｅｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００３，ＦＡＳＥＢ Ｊ．１７：１７３３－５；ならびにこれらに引用される参考文献）で開示及び概説されているような、当技術分野で公知の方法を使用して生成してもよい。

【０１７２】

いくつかの態様では、本発明のペイロードに、米国特許第５，０９１，５１３号に記載されている生合成抗体をコードしてもよく、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。そのような抗体は、生合成抗体結合部位（ＢＡＢＳ）として振る舞う領域を構成するアミノ酸の１つ以上の配列を含み得る。この部位は、１）非共有結合またはジスルフィド結合した合成ＶＨ及びＶＬ二量体、２）ＶＨ及びＶＬがポリペプチドリンカーによって結合したＶＨ－ＶＬまたはＶＬ－ＶＨ単鎖、または３）個々のＶＨまたはＶＬドメインを含む。結合ドメインは、別個の免疫グロブリンに由来し得る連結されたＣＤＲ及びＦＲ領域を含む。生合成抗体はまた、例えば、酵素、毒素、結合部位、または固定化媒体もしくは放射性原子への付着部位として機能する他のポリペプチド配列を含む場合がある。生合成抗体の産生方法、抗体のｉｎ ｖｉｖｏ生成により誘発され得る任意の特異性を有

するＢＡＢＳの設計方法、及びその類似体の産生方法を開示する。
【０１７３】
いくつかの実施形態では、ペイロードに、米国特許第８，３９９，６２５号に示されている抗体アクセプターフレームワークを備えた抗体をコードしてもよい。そのような抗体アクセプターフレームワークは、目的抗体からのＣＤＲの受容に特に好適であり得る。
【０１７４】
一実施形態では、抗体は、条件的活性型生物学的タンパク質であってもよい。抗体を使用して、野生型の通常の生理学的条件で可逆的または不可逆的に不活性化される条件的活性型生物学的タンパク質を生成し、また、そのような条件的活性型生物学的タンパク質及びそのような条件的活性型生物学的タンパク質の使用を提供してもよい。そのような方法及び条件的活性型タンパク質は、例えば、国際公開第ＷＯ２０１５１７５３７５号及び第ＷＯ２０１６０３６９１６号及び米国特許公開第ＵＳ２０１４０３７８６６０号に示されており、これらの各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。
【０１７５】
抗体の調製
モノクローナルであるかポリクローナルであるかに関わらず、抗体の調製は、当技術分野で公知である。抗体の産生技術は、当技術分野で周知であり、例えば、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ “Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８８；Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ “Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９９及び“Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ｃｕｒｒｅｎｔ ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ａｄｖａｎｃｅｓ Ｄｒｉｖｉｎｇ ｔｈｅ Ｓｔｒｏｎｇｅｓｔ Ｇｒｏｗｔｈ Ａｒｅａ ｉｎ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｙ”Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，２０１２に記載されている。
【０１７６】
本明細書に記載の抗体ならびにその断片及びバリアントは、組換えポリヌクレオチドを用いて産生することができる。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、抗体、その断片またはバリアントの少なくとも１つをコードするモジュール設計を有する。非限定的な例として、ポリヌクレオチド構築物に、以下の設計のいずれかをコードしてもよい：（１）抗体の重鎖、（２）抗体の軽鎖、（３）抗体の重鎖及び軽鎖、（４）リンカーによって分離された重鎖及び軽鎖、（５）ＶＨ１、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３ドメイン、リンカー及び軽鎖、または（６）ＶＨ１、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３ドメイン、ＶＬ領域、及び軽鎖。これらの設計はいずれも、任意のドメイン及び／または領域間にオプションのリンカーを含む場合がある。本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載の抗体またはその構成要素部分のいずれかを出発分子として使用して、標準クラスの免疫グロブリンを産生するように設計してもよい。
【０１７７】
また、当技術分野で周知であり、例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７に記載されている技術を使用して、ファージ抗体ライブラリから組換え抗体断片を単離してもよい。組換え抗体断片は、細菌での組換えにより生成された大規模ファージ抗体ライブラリに由来するものであってもよい（Ｓｂｌａｔｔｅｒｏ ａｎｄ Ｂｒａｄｂｕｒｙ，２０００，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １８：７５－８０；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。
【０１７８】
免疫療法に使用する抗体
いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、腫瘍特異性抗原（ＴＳＡ）及び腫瘍

関連抗原（ＴＡＡ）に特異的な抗体、その断片及びバリアントであってもよい。抗体は、ＴＳＡ／ＴＡＡを発見し結合するまで体内を循環する。ひとたび結合すると、抗体は、免疫系の他の部分を動員し、ＡＤＣＣ（抗体依存性細胞傷害）及びＡＤＣＰ（抗体依存性細胞食作用）を高めて腫瘍細胞を破壊する。本明細書中で使用する場合、用語「腫瘍特異性抗原（ＴＳＡ）」とは、腫瘍細胞で産生される抗原性物質を意味し、宿主生物内に抗腫瘍免疫応答を引き起こすことができる。一実施形態では、ＴＳＡは腫瘍新生抗原であってもよい。腫瘍抗原特異性抗体は、同じ抗原を発現している腫瘍細胞に対する補体依存性細胞傷害反応を媒介する。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、腫瘍特異性抗原（ＴＳＡ）、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）、病原体関連抗原、またはその断片は、ペプチドまたはインタクトなタンパク質またはその一部として発現させることができる。インタクトなタンパク質またはその一部は、天然であるか、または変異誘発することができる。本明細書に記載のがんまたはウイルス誘発がんに関連する抗原は、当技術分野で周知である。そのようなＴＳＡまたはＴＡＡは、既にがんに関連していてもよく、または当技術分野で公知の任意の方法によって同定してもよい。

【０１８０】

一実施形態では、抗体はＧＤ２ガングリオシドであってもよい。一実施形態では、本発明のペイロードは、ＧＤ２抗原に特異的な抗体、その断片及びバリアントであってもよい。腫瘍細胞表面に発現するガングリオシドは、がん免疫療法の標的とすることができる。ＧＤ２は、分子式Ｃ７４Ｈ１３４Ｎ４０３２のジシアロガングリオシドである。ガングリオシドは、ほとんどの細胞膜の外表面に見出される酸性スフィンゴ糖脂質である。これらは、高い抗原濃度、調節の欠如、多くの腫瘍における相対的な均一性、及びサイトカインによる上方制御の可能性のため、免疫療法の理想的な標的である。多くの腫瘍は糖脂質の組成と構造に異常がある。ＧＤ２は、神経外胚葉または上皮起源の腫瘍、実質的にすべての黒色腫、及び骨肉腫及び軟部肉腫由来の腫瘍試料のおよそ５０％を含む、広範囲のヒト腫瘍において見出されている。ＧＤ２に高い親和性を有する抗体として、１Ｂ７、２Ｈ１２、１Ｇ２、１Ｅ９、１Ｈ３、２Ｆ５、２Ｆ７、３１Ｆ９、３１Ｆ９Ｖ２、３２Ｅ２、ｃｈｌ４．１８、ｈｕｌ４．１８、３Ｆ８、８Ｂ６、４Ｂ５、１Ａ７、Ａ１Ｇ４、ＧＤ２ミモトープ、ｈｕｌ４．１８Ｋ３２２Ａ、５Ｆ１１、３Ｇ６、１４ｇ２ａ、及び１４．１８が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、ＧＤ抗体は１４ｇ２ａ抗体である（Ｍｕｊｏｏ　Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１；４９（１１）：２８５７－６１；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。これらのＧＤ２抗体のいずれかは、Ｌｏｎｇ　Ａ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｎａｔ　Ｍｅｄ．２１（６）：５８１－９０に記載されている；その内容はその全体を参照により援用する）。

【０１８１】

一実施形態では、抗原はＨＥＲ２抗原である。一実施形態では、本発明のペイロードは、ＨＥＲ２抗原に特異的な抗体、その断片及びバリアントであってもよい。ＨＥＲ２は、ヒト上皮細胞増殖因子受容体２関連がん遺伝子のがん遺伝子産物であり、１８５ｋＤａの分子量を有し、チロシンキナーゼドメインを有する膜貫通受容体タンパク質である。ＨＥＲ２は、ＨＥＲ１（ＥＧＦＲ、ＥＲＢＢ１）、ＨＥＲ２（ｎｅｕ、ＥＲＢＢ－２）、ＨＥＲ２（ＥｒｂＢ－３）、及びＨｅｒ４（ＥｒｂＢ－４）からなるＥＧＦＲファミリーのメンバーであり、細胞内チロシン残基において、そのホモ二量体形成または別のＥＧＦＲ受容体ＨＥＲ１、ＨＥＲ３、ＨＥＲ４とのヘテロ二量体形成により、自己リン酸化されることが知られており、また、この方法で活性化される。それにより、正常細胞及び腫瘍細胞の細胞増殖、分化、及び生存において重要な役割を果たす。いくつかの実施形態では、本発明において有用なＨＥＲ２抗体には、３Ｂ５（Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ／ＢＡＹＥＲより）、２Ｃ４（ＡＴＣＣ　ＨＢ－１２６９７）、７Ｃ２（ＡＴＣＣ　ＨＢ－１２２１５）、ＡｐｏＢ１７Ｆ／ｏｃＨＥＲ２、８Ａ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－４５６５）、Ａ１０Ａ１２（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－４５６６）、９Ｇ６、７Ｈ４、ＡｌＯＥ９、Ａ１２Ｄ

６、Ａ６Ｂ１２、Ａ１０Ｅ１１、Ｂ３Ｇ４、Ａ５Ｃ７、１３Ａ１１、１１Ｃ１１、１３Ｅ１１、Ｈｅｒ２Ｂｉ（ＯＫＴ３　ｘ　９１８４）、Ｈｅｒ２Ｂｉ（ＯＫＴ３　ｘ　Ｈｅｒｃ）、７Ｆ３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－１２２１６）、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－１、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－２、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－３、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－４、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－６、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－７、５２０Ｃ９、ＣＢ－１１（Ｎｏｖｏｃａｓｔｒａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ製）、ＮＣＬＢ１２（Ｎｏｖｏｃａｓｔｒａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ製）、ヒト化２Ｃ４変異体５６０、ヒト化２Ｃ４変異体５６１、ヒト化２Ｃ４変異体５６２、ヒト化２Ｃ４変異体５６８、ヒト化２Ｃ４変異体５６９、ヒト化２Ｃ４変異体５７０、ヒト化２Ｃ４変異体５７１、ヒト化２Ｃ４変異体５６８６９、３Ｅ８、３Ｈ４、Ｃｌ　１１（ＮｅｏＭａｒｋｅｒｓ）、ＨＥＲ－８１、４５２Ｆ２　７３６Ｇ９、７４１Ｆ８、７５８Ｇ５、７６１Ｂ１０、抗ｐ１８５ＨＥＲ２／ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）、抗ＣＤ３／抗ｐ１８５ＨＥＲ２、Ｈｕ４Ｄ５－８及びバリアント、４Ｄ５－Ｈ、ＣＢ１１（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ製）、６Ｅ９、２Ｈ１１、５Ｂ８、７Ｄ３、ＨＥＲ５０、ＨＥＲ６６、ＨＥＲ７０、ｓｃＦｖ　Ｃ６．５、ｓｃＦｖ　Ｃ６ＭＬ３－９（ＭＬ３．９またはＣ６ＭＬ３．９）、ｓｃＦｖ　Ｃ６ＭＨ３－Ｂ１（Ｂ１またはＣ６ＭＨ３．Ｂ１）、ｓｃＦｖ　Ｃ６－Ｂ１Ｄ２（Ｂ１Ｄ２またはＣ６ＭＨ３－Ｂ１Ｄ２）、ＡＬＭ、Ｌ８７、Ｎ２８、Ｎ１２、ＭＧｒ６、９ＧＧ．１０（Ｎｅｏｍａｒｋｅｒｓ）、ＭＧＦｃ－５（Ｖ３７９Ｍ）、ＭＧＦｃ－９（Ｆ２４３Ｉ、Ｖ３７９Ｌ）、ＭＧＦｃ－１０（Ｋ２８８Ｎ、Ａ３３０Ｓ、Ｐ３９６Ｌ）、ＭＧＦｃ－１３（Ｋ３３４Ｅ、Ｔ３５９Ｎ、Ｔ３６６Ｓ）、ＭＧＦｃ－２７（Ｇ３１６Ｄ、Ａ３７８Ｖ、Ｄ３９９Ｅ）、ＭＧＦｃ－３７（Ｋ２４８Ｍ）、ＭＧＦｃ－３９（Ｅ２９３Ｖ、Ｑ２９５Ｅ、Ａ３２７Ｔ）、ＭＧＦｃ－３８（Ｋ３９２Ｔ、Ｐ３９６Ｌ）、ＭＧＦｃ－４１（Ｈ２６８Ｎ、Ｐ３９６Ｌ）、ＭＧＦｃ－２３（Ｋ３３４Ｅ、Ｒ２９２Ｌ）、ＭＧＦｃ－　４４、ＭＧＦｃ－４５、ＭＤＸ－２１０、１７．６．４、ＨＥＲ２－ＰＹ１２４８、ＭＡｂ７４、ＦＲＰ５、ＴＡｂ２５０、ＨＥＲ－８１、ＰＮ２Ａ、ｍＡｂ１９１９２４（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＩＤＭｌ、ｓｃＦｖ２３、Ａｂ－３、Ａｂ－５、２５０２Ａ、Ｒｅｘｏｍｕｎ、ＭＡＢ－１１２９（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）、及びＭＭ－１１１が含まれ得る。一実施形態では、高親和性を有する抗体は、表７に記載するＨＥＲ２抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のいずれかに由来し得る。

【０１８２】

本発明の一実施形態では、抗原はＣＤ３３である。一実施形態では、本発明のペイロードは、ＣＤ３３抗原に特異的な抗体、その断片及びバリアントであってもよい。急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）は、米国で２番目に多い急性白血病である。白血病疾患に対して一般的に適用される治療として、照射及び／または化学療法が挙げられる。しかしながら、非常に多くの場合、化学療法を生き残った細胞がＡＭＬ白血病幹細胞（ＡＭＬ－ＬＳＣ）に富んでおり、再増殖して再発を引き起こし得る細胞のリザーバを構成するため、治療を受ける患者の６５～８０％は再発する。ＡＭＬ－ＬＳＣは、他のＣＤ３３を含む細胞表面抗原の特徴的なセットを発現する。ＣＤ３３（シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３）またはＳＩＧＬＥＣ３（ＵＮＩＰＲＯＴ　ＩＤ：Ｐ２０１３８）は、骨髄系細胞に発現する膜貫通受容体である。通常、骨髄特異的と考えられているが、いくつかのリンパ系細胞にも認められる。ＣＤ３３は、シアル酸に結合するため、レクチンのＳＩＧＬＥＣファミリーのメンバーである。ＣＤ３３を標的とする例示的な抗体として、Ｍ１９５、Ｍ２Ｈ１２、ＤＲＢ２、Ｍｙ９－６が挙げられ得るが、これらに限定されない。一実施形態では、抗体はＭｙ９．６に由来する。いくつかの実施形態では、高親和性を有する抗体は、表７に記載するＣＤ３３抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のいずれかに由来し得る。

【０１８３】

一実施形態では、本発明の抗原は、ＣＤ２６９とも呼ばれるＢＣＭＡ（Ｂ細胞成熟抗原）である。一実施形態では、本発明のペイロードは、ＢＣＭＡ抗原に特異的な抗体、その断片及びバリアントであってもよい。ＢＣＭＡ抗原（ＵＮＩＰＲＯＴ　ＩＤ：Ｑ０２２２３）は、遺伝子ＴＮＦＲＳ１７によってコードされている。ＢＣＭＡはＴＮＦ受容体スー

パーファミリーのメンバーである。ＢＣＭＡは、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）及び増殖誘導リガンド（ＡＰＲＩＬ）に結合する。非悪性細胞の中で、ＢＣＭＡは主に形質細胞、及び成熟Ｂ細胞のサブセットにおいて発現するが、Ｔ細胞及びＮＫ細胞では発現しないことが報告されている。したがって、ＢＣＭＡは多発性骨髄腫の治療に適した治療薬候補である。ＢＣＭＡを標的とする例示的な抗体として、ＢＣＭＡ５０、ＢＣＭＡ３０、Ｃ１１Ｄ５．３及びＣ１３Ｆ１２．１が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、抗体はＣ１１Ｄ５．３に由来する。いくつかの実施形態では、高親和性を有する抗体は、表７に記載するＢＣＭＡ抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のいずれかに由来し得る。

【０１８４】

一実施形態では、本発明の抗原はＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３としても知られる）である。一実施形態では、本発明のペイロードは、ＣＤ２７６に特異的な抗体、その断片、及びバリアントであってもよい。ＣＤ２７６は、小児固形腫瘍や成人のがん腫を含む様々なヒト腫瘍で発現する。国際特許公開ＷＯ２０１７０４４６９９及びＷＯ２０１４１６０６２７（その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）に示されるＣＤ２７６抗体のいずれかは、本発明において有用であり得る。いくつかの実施形態では、高親和性を有する抗体は、表７に記載するＣＤ２７６抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のいずれかに由来し得る。

【０１８５】

一実施形態では、本発明の抗原はＡＬＫタンパク質である。発生的に調節される細胞表面受容体チロシンキナーゼであるＡＬＫは、腫瘍関連抗原として、染色体転座から生じる融合タンパク質として発現することが知られている。がん関連ＡＬＫは、未分化大細胞白血病におけるヌクレオホスホミン（ＮＰＭ）に関連する２；５転座として最初に記述された。融合タンパク質は、ＡＬＫに融合したＮＰＭの細胞内成分からなる。いくつかの実施形態では、ＡＬＫ抗原は、タンパク質の細胞外部分であってもよい。ＡＬＫに特異的な抗体、断片及びバリアントのいずれも、本発明において有用であり得る。一実施形態では、国際特許公開ＷＯ２０１５０６９９２２に記載されているＡＬＫ抗体（その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。いくつかの実施形態では、高親和性を有する抗体は、表７に記載するＡＬＫ抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のいずれかに由来し得る。

【０１８６】

一実施形態では、本発明の抗原はＣＤ２２抗原である。一実施形態では、本発明のペイロードは、ＣＤ２２に特異的な抗体、その断片、及びバリアントであってもよい。ＣＤ２２は、免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーに属する系統制限Ｂ細胞抗原である。ＣＤ２２は、Ｂ細胞リンパ腫及び白血病（例えば、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）及びバーキットリンパ腫）の６０～７０％で発現し、Ｂ細胞発生の初期段階の細胞表面上または幹細胞上には存在しない。いくつかの実施形態では、抗体、その断片、及びバリアントは、国際特許公開ＷＯ２０１６１４９５７８、ＷＯ２０１４０６５９６１、及びＷＯ２０１３０５９５９３Ａ１に示されているもののいずれかであってもよい（各々の内容はその全体を参照により援用する）。いくつかの実施形態では、高親和性の抗体は、表７に記載するＣＤ２２抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のいずれかに由来し得る。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、表７のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を有する可変重鎖及び可変軽鎖を含む抗原結合領域を含み得る。

【表７－１】
表７：可変重鎖及び軽鎖の配列

標的	分類記載及びクローン名	供給源	抗体鎖	配列番号
ALK	ALK15 VH	WO2015069922の配列番号1	VH	242
ALK	ALK48 VH	WO2015069922の配列番号3	VH	243
ALK	ALK53 VH	WO2015069922の配列番号5	VH	244
ALK	ALK58 VH	WO2015069922の配列番号7	VH	245
ALK	ヒト化ALK15 VH	WO2015069922の配列番号9	VH	246
ALK	ヒト化ALK48 VH	WO2015069922の配列番号11	VH	247
ALK	ヒト化ALK53 VH	WO2015069922の配列番号13	VH	248
ALK	ヒト化ALK58 VH	WO2015069922の配列番号15	VH	249
ALK	ALK15 VL	WO2015069922の配列番号2	VL	250
ALK	ALK48 VL	WO2015069922の配列番号4	VL	251
ALK	ALK53 VL	WO2015069922の配列番号6	VL	252
ALK	ALK58 VL	WO2015069922の配列番号8	VL	253
ALK	ヒト化ALK15 VL	WO2015069922の配列番号10	VL	254
ALK	ヒト化ALK48 VL	WO2015069922の配列番号12	VL	255
ALK	ヒト化ALK53 VL	WO2015069922の配列番号14	VL	256
ALK	ヒト化ALK58 VL	WO2015069922の配列番号16	VL	257
CD22	CD22 VL	WO2016149578の配列番号14	VL	258
CD22	CD22（HA22またはBL22）VL	WO2013059593の配列番号1	VL	259
CD22	CD22 VH	WO2016149578の配列番号13	VH	260
CD22	CD22（HA22またはBL22）VH	WO2013059593の配列番号3	VH	261
CD22	CD22（HA22またはBL22）VH	WO2013059593の配列番号4	VH	262
CD276	CD276 VH	WO2017044699の配列番号7	VH	263
CD276	CD276 VH（CD276.6(m856)）	WO2014160627の配列番号7	VH	264
CD276	CD276 VH（CD276.1(m851)）	WO2014160627の配列番号17	VH	265
CD276	CD276 VH（CD276.17(m8517)）	WO2014160627の配列番号26	VH	266
CD276	CD276 VL	WO2017044699の配列番号8	VL	267

【表７－２】

CD276	CD276 VL (CD276.6 (m856))	WO2014160627の配列番号8	VL	268
CD276	CD276 VL (CD276.1 (m851))	WO2014160627の配列番号18	VL	269
CD276	CD276 VL (CD276.17 (m8517))	WO2014160627の配列番号27	VL	270
GD2	3F8 重鎖可変	WO2011160119の配列番号1	VH	271
GD2	3F8 軽鎖可変	WO2011160119の配列番号2	VL	272
GD2	3F8 重鎖可変	WO2011160119の配列番号3	VH	273
GD2	ヒト化3F8 重鎖可変	WO2011160119の配列番号4	VH	274
GD2	ヒト化3F8 軽鎖可変	WO2011160119の配列番号5	VL	275
GD2	ヒト化3F8 重鎖2可変	WO2011160119の配列番号6	VH	276
GD2	ヒト化3F8 軽鎖2可変	WO2011160119の配列番号7	VL	277
GD2	ヒト化3F8 重鎖可変	WO2011160119の配列番号8	VH	278
GD2	ヒトGD2 重鎖可変	WO2010002822A1の配列番号16	VH	279
GD2	ヒトGD2 軽鎖可変	WO2010002822A1の配列番号32	VL	280
GD2	キメラCh3F8 重鎖-γ1	Cheung et al., Oncoimmunology, 2012, 1(4):477-486	VH	281
GD2	キメラCh3F8 軽鎖-κ	Cheung et al., Oncoimmunology, 2012, 1(4):477-486	VL	282
GD2	ヒト化Hu3F8 重鎖-γ1	Cheung et al., Oncoimmunology, 2012, 1(4):477-486	VH	283
GD2	ヒト化Hu3F8 軽鎖-κ	Cheung et al., Oncoimmunology, 2012, 1(4):477-486	VL	284
GD2	キメラCh3F8 重鎖-γ4	Cheung et al., Oncoimmunology, 2012, 1(4):477-486	VH	285
GD2	ヒト化Hu3F8 重鎖-γ4	Cheung et al., Oncoimmunology, 2012, 1(4):477-486	VL	286
GD2	GD2 VH	WO2016134284の配列番号17	VH	287
GD2	GD2 VL	WO2016134285の配列番号18	VL	288
GD2	マウスKM666 VH (重鎖可変領域)配列	WO2015132604の配列番号9	VH	289
GD2	ヒト化KM666 VH配列	WO2015132604の配列番号10	VH	290
GD2	マウスKM666 VL (軽鎖可変領域)配列	WO2015132604の配列番号11	VL	291

【表７－３】

GD2	ヒト化 KM666 VL 配列	WO2015132604 の配列番号 12	VL	292
GD2	GD2 VL	US20040203100 の配列番号 1	VL	293
GD2	GD2 VH	US20040203100 の配列番号 2	VH	294
GD2	マウス KM666 VH（重鎖可変領域)配列	US20170066838 の配列番号 9	VH	295
GD2	ヒト化 KM666 VH 配列	US20170066838 の配列番号 10	VH	296
GD2	マウス KM666 VL（軽鎖可変領域)配列	US20170066838 の配列番号 11	VL	297
GD2	ヒト化 KM666 VL 配列	US20170066838 の配列番号 12	VL	298
GD2	GD2 VL	US20160304620 の配列番号 3	VL	299
GD2	GD2 VH	US20160304620 の配列番号 4	VH	300
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 2	VH	301
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 4	VL	302
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 6	VH	303
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 8	VL	304
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 10	VH	305
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 12	VL	306
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 14	VH	307
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 16	VL	308
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 18	VH	309
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 20	VL	310
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 22	VH	311
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 24	VL	312
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 26	VH	313
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 28	VL	314
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 30	VH	315
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 32	VL	316
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 34	VH	317
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 36	VH	318
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 38	VL	319
GD2	GD2 VH	US20150353645 の配列番号 40	VH	320
GD2	GD2 VL	US20150353645 の配列番号 42	VL	321
GD2	GD2 VL	US20150139942 の配列番号 3	VL	322
GD2	GD2 VH	US20150139942 の配列番号 4	VH	323
GD2	GD2 VL	US20150139942 の配列番号 7	VL	324
GD2	GD2 VH	US20150139942 の配列番号 8	VH	325
GD2	GD2 VH	US20130287691 の配列番号 16	VH	326
GD2	GD2 VL	US20130287691 の配列番号 32	VL	327
GD2	GD2 VH	US20130287691 の配列番号 40	VH	328
GD2	GD2 VL	US20130287691 の配列番号 42	VL	329
GD2	GD2 VL	US20140134162 の配列番号 3	VL	330

【表７－４】

GD2	GD2 VH	US20140134162 の配列番号 4	VH	331
GD2	GD2 VH	WO2017055385 の配列番号 20	VH	332
GD2	GD2 VL	WO2017055385 の配列番号 20	VL	333
GD2	GD2 VH	WO2013189516 の配列番号 3	VH	334
GD2	GD2 VL	WO2013189516 の配列番号 4	VL	335
GD2-O-アセチル化	KM8B6 GD2-O-アセチル化重鎖可変	WO2008043777 の配列番号 1	VH	336
GD2-O-アセチル化	KM8B6 GD2-O-アセチル化軽鎖可変	WO2008043777 の配列番号 2	VL	337
GD2-O-アセチル化	O-アセチル化-GD2 ガングリオシド軽鎖可変領域	WO2015067375 の配列番号 6	VL	338
GD2-O-アセチル化	O-アセチル化-GD2 ガングリオシド重鎖可変領域	WO2015067375 の配列番号 7	VH	339
GD2-O-アセチル化	GD2 VL	US20160068608 の配列番号 7	VL	340
GD2-O-アセチル化	GD2 VH	US20160068608 の配列番号 8	VH	341
GD2-O-アセチル化	GD2 VL (8B6)	WO2014177271A1 の配列番号 7	VL	342
GD2-O-アセチル化	GD2 VH (8B6)	WO2014177271A1 の配列番号 8	VH	343
GD2-O-アセチル化	GD2 VL	WO2014177271A1 の配列番号 9	VL	344
GD2-O-アセチル化	GD2 VH	WO2014177271A1 の配列番号 10	VH	345
ガングリオシド (GD2を含む)	GMab1-VH	WO2012071216 の配列番号 11	VH	346
ガングリオシド (GD2	GMab1-VH	WO2012071216 の配列番号 12	VL	347

【表７－５】

を含む)				
ガングリオシド (GD2を含む)	GMab1-VL	WO2012071216の配列番号13	VH	348
ガングリオシド (GD2を含む)	GMab2-VH	WO2012071216の配列番号14	VL	349
CD33	抗 CD33 VH(クローンM195)	WO2015150526の配列番号11	VH	350
CD33	抗 CD33 VL(クローンM195)	WO2015150526の配列番号12	VL	351
CD33	抗 CD33 VH(クローンM2H12)	WO2015150526の配列番号13	VH	352
CD33	抗 CD33 VL(クローンM2H12)	WO2015150526の配列番号14	VL	353
CD33	抗 CD33 VH(クローンDRB2)	WO2015150526の配列番号15	VH	354
CD33	抗 CD33 VL(クローンDRB2)	WO2015150526の配列番号16	VL	355
CD33	抗 CD33 VH(クローンMy9-6)	WO2015150526の配列番号17	VH	356
CD33	抗 CD33 VL(クローンMy9-6)	WO2015150526の配列番号18	VL	357
BCMA	BCMA VH(クローンBCMA-50)	WO2015158671の配列番号11	VH	358
BCMA	BCMA VL(クローンBCMA-50)	WO2015158672の配列番号12	VL	359
BCMA	BCMA VH(クローンBCMA-30)	WO2015158673の配列番号13	VH	360
BCMA	BCMA VL(クローンBCMA-30)	WO2015158674の配列番号14	VL	361
BCMA	BCMA VH(クローンC11D5.3)	WO2015158675の配列番号15	VH	362
BCMA	BCMA VL(クローンC11D5.3)	WO2015158676の配列番号16	VL	363
BCMA	BCMA VH(クローンC13F12.1)	WO2015158677の配列番号17	VH	364
BCMA	BCMA VL(クローンC13F12.1)	WO2015158678の配列番号18	VL	365
Her2	トラスツズマブ	WO2017093844の配列番号1	VH	366

【表７－６】

	(Herceptin)			
Her2	トラスツズマブ(Herceptin)	WO2017093844の配列番号7	VL	367
Her2	ヒトMAb 4D5-5	US8,075,890の配列番号1	VL	368
Her2	ヒトMAb 4D5-5	US8,075,890の配列番号2	VH	369
Her2	コンセンサス抗体可変ドメイン	US8,075,890の配列番号3	VL	370
Her2	コンセンサス抗体可変ドメイン	US8,075,890の配列番号4	VH	371
Her2	マウスMAb 4D5	US8,075,890の配列番号5	VL	372
Her2	マウスMAb 4D5	US8,075,890の配列番号6	VH	373
Her2	N29	WO1993003741の配列番号	VH	374
Her2	N29	WO1993003741の配列番号	VL	375
Her2	2C4	US7,981,418の配列番号1	VL	376
Her2	2C4	US7,981,418の配列番号2	VH	377
Her2	バリアント574/ペルツズマブ	US7,981,418の配列番号3	VL	378
Her2	バリアント574/ペルツズマブ	US7,981,418の配列番号4	VH	379
Her2	ヒトVLコンセンサス(ヒトκ.1,軽鎖κサブグループ1)	US7,981,418の配列番号5	VL	380
Her2	ヒトVHコンセンサス(ヒトIII,重鎖サブグループIII)	US7,981,418の配列番号6	VH	381
Her2	ペルツズマブ	US7,981,418の配列番号13	VL	382
Her2	ペルツズマブ	US7,981,418の配列番号14	VH	383
Her2	トラスツズマブ/ヒトMAb 4D5-8	US7,981,418の配列番号15	VL	384
Her2	トラスツズマブ/ヒトMAb 4D5-8	US7,981,418の配列番号16	VH	385
Her2	バリアント型ペルツズマブ軽鎖配列	US7,981,418の配列番号17	VL	386
Her2	バリアント型ペルツズマブ重鎖配列	US7,981,418の配列番号18	VH	387
Her2	3.F2モノクローナル抗体	WO2001009187の配列番号2	VH	388
Her2	3.F2モノクローナル抗体	WO2001009187の配列番号4	VL	389
Her2	1.D2モノクローナル抗体	WO2001009187の配列番号6	VH	390

【表７－７】

Her2	1.D2 モノクローナル抗体	WO2001009187 の配列番号 8	VL	391
Her2	2.E8 モノクローナル抗体	WO2001009187 の配列番号 10	VH	392
Her2	2.E8 モノクローナル抗体	WO2001009187 の配列番号 12	VL	393
Her2	2C4	US7,097,840 の配列番号 4	VL	394
Her2	バリアント 574/ペルツズマブ	US7,097,840 の配列番号 5	VL	395
Her2	ヒト VL サブグループ	US7,097,840 の配列番号 6	VL	396
Her2	4D5	WO2003068801 の配列番号 14	VH	397
Her2	ヒト 4D5-8	WO2003087131 の配列番号 1	VL	398
Her2	組換えヒト MAb	US20040254108 の配列番号 50	VH	399
Her2	組換えヒト MAb	US20040254108 の配列番号 52	VL	400
Her2	her2VHCH-SM5-1 VH；ヒト κ 鎖定常(CH)	US20040254108 の配列番号 54	VH	401
Her2	her2VLCL-SM5-1 VL；ヒト κ 鎖定常(CL)	US20040254108 の配列番号 56	VL	402
Her2	her2VH/Fc/FL-組換えヒト MAb VH；IgG1 Fc；Flt3 リガンド細胞外領域(hFLex)	US20040254108 の配列番号 58	VH	403
Her2	her2VH/Fc/リンカー/FL-組換えヒト MAb；IgG1 Fc;リンカー;Flt3 リガンド細胞外領域(hFLex)	US20040254108 の配列番号 60	VH	404
Her2	Herceptin Fab	US20050260711A1 の配列番号 9	VL	405
Her2	Herceptin Fab	US20050260711A1 の配列番号 10	VH	406
Her2	ペルツズマブ、シグナルペプチド配列あり	US20060018899 の配列番号 17	VL	407
Her2	ペルツズマブ、シグナルペプチド配列あり	US20060018899 の配列番号 18	VH	408
Her2	ペリプラズム Fab-4D5	US7,632,924 の配列番号 30	VL	409
Her2	ペリプラズム Fab-4D5	US7,632,924 の配列番号 31	VH	410
Her2	トラスツズマブ A88C	US7521541 の配列番号 6	VH	411
Her2	トラスツズマブ A121C	US7521541 の配列番号 7	VH	412
Her2	トラスツズマブ V110C	US7521541 の配列番号 8	VL	413
Her2	B1D2	US7,332,585 の配列番号 42	VH	414
Her2	B1D2	US7,332,585 の配列番号 47	VL	415

【表７－８】

Her2	Fab63	US20100047230の配列番号7	VH	416
Her2	Fab63	US20100047230の配列番号8	VL	417
Her2	Herceptin	US20160256561の配列番号3	VH	418
Her2	抗her2/neu抗体、シグナルペプチドあり	US9,534,057の配列番号1	VH	419
Her2	抗her2/neu抗体、シグナルペプチドあり	US9,534,057の配列番号2	VL	420
抗Her2/neu-抗CD3	抗Her2/neu-抗CD3二重特異性抗体 VH	WO2014079000A1の配列番号3	VH	421

【０１８８】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードはキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）であってもよく、それは、免疫細胞（例えば、Ｔ細胞及びＮＫ細胞）に形質導入した場合に、ＣＡＲの細胞外標的部分によって認識される分子を発現する標的（例えば、腫瘍細胞）に対して免疫細胞をリダイレクトすることができる。

【０１８９】

本明細書中で使用する場合、用語「キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）」とは、Ｔ細胞の表面上のＴＣＲを模倣する合成受容体を指す。一般的に、ＣＡＲは細胞外標的化ドメイン、膜貫通ドメイン／領域及び細胞内シグナル伝達／活性化ドメインからなる。標準的なＣＡＲ受容体では、構成要素：細胞外ターゲティングドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達／活性化ドメインは、単一の融合タンパク質として直鎖状に構築される。細胞外領域は、特定の腫瘍抗原または他の腫瘍細胞表面分子を認識するターゲティングドメイン／部分（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。細胞内領域は、ＴＣＲ複合体のシグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ３ζのシグナル領域）、及び／または１つ以上の共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）及びＯＸ－４０（ＣＤ１３４）由来のドメインを含み得る。例えば、「第１世代ＣＡＲ」は、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインのみを有する。Ｔ細胞の持続性と増殖を増強するために、共刺激細胞内ドメインが追加され、ＣＤ３ζシグナルドメインに加えて１つの共刺激シグナル伝達ドメインを有する第２世代ＣＡＲ、及びＣＤ３ζシグナルドメインに加えて２つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを有する第３世代ＣＡＲが生み出される。ＣＡＲは、Ｔ細胞で発現する場合、ＣＡＲの細胞外ターゲティング部分によって決定される抗原特異性をＴ細胞に与える。最近では、ホーミング遺伝子や自殺遺伝子などの１つ以上のエレメントを追加して、第４世代ＣＡＲと呼ばれる、より適格で安全なＣＡＲのアーキテクチャを開発することも望まれている。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、細胞外ターゲティングドメインを、ヒンジ（間隙ドメインまたはスペーサーとも呼ばれる）及び膜貫通領域を介して細胞内シグナル伝達ドメインに結合させる。ヒンジは、細胞外ターゲティングドメインを、細胞膜を横断し、細胞内シグナル伝達ドメインに接続する膜貫通ドメインに接続する。ターゲティング部分が結合する標的タンパク質のサイズ、及びターゲティングドメイン自体のサイズと親和性に起因して、がん細胞に対するＣＡＲ形質転換細胞の効力を最適化するために、ヒンジを変化させる必要がある場合がある。標的細胞に対するターゲティング部分の認識及び結合により、細胞内シグナル伝達ドメインは、活性化シグナルをＣＡＲ　Ｔ細胞に導き、これは１つ以上の細胞内共刺激ドメインからの「第２シグナル」によってさらに増幅される。ＣＡＲ　Ｔ細胞は、活性化されると、標的細胞を破壊することができる。

【０１９１】
いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲを２つの部分に分割してもよく、各部分を二量体化ドメインに連結し、その結果、二量体化を引き起こす入力により、インタクトな機能的受容体の組立てが促進される。ＷｕとＬｉｍは最近、細胞外ＣＤ１９結合ドメインと細胞内シグナル伝達エレメントを分離し、ＦＫＢＰドメイン及びＦＲＢ＊（ＦＫＢＰ－ラパマイシン結合のＴ２０８９Ｌ変異体）ドメインに連結させ、これらがラパマイシンアナログＡＰ２１９６７の存在下でヘテロ二量体化する、スプリットＣＡＲを報告した。スプリット受容体はＡＰ２１９６７の存在下で組み立てられ、特異的な抗原結合とともにＴ細胞を活性化する（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ，，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０１５，６２５（６２５８）：ａａｂ４０７７）。

【０１９２】
いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲを誘導性ＣＡＲとして設計してもよい。Ｓａｋｅｍｕｒａらは最近、ＣＤ１９　ＣＡＲ構築物へのＴｅｔ－Ｏｎ誘導系の組み込みを報告した。ＣＤ１９　ＣＡＲは、ドキシサイクリン（Ｄｏｘ）の存在下でのみ活性化する。Ｓａｋｅｍｕｒａは、Ｄｏｘ存在下でのＴｅｔ－ＣＤ１９ＣＡＲ　Ｔ細胞は、従来のＣＤ１９ＣＡＲ　Ｔ細胞に比べて、ＣＤ１９$^{+}$細胞株に対して同等に細胞傷害性であり、ＣＤ１９刺激時に同等のサイトカイン産生及び増殖を有することを報告した（Ｓａｋｅｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏ．Ｒｅｓ．，２０１６，Ｊｕｎ　２１，電子版）。一実施例では、このＴｅｔ－ＣＡＲは、本発明のＳＲＥ（例えば、ＤＤ）の制御下にあるエフェクターモジュールのペイロードであってもよい。デュアルシステムは、形質導入したＴ細胞のＣＡＲ発現のオン／オフをより柔軟に提供する。

【０１９３】
本発明によれば、本発明のペイロードは、第１世代のＣＡＲ、または第２世代のＣＡＲ、または第３世代のＣＡＲ、または第４世代のＣＡＲであってもよい。ＣＡＲ構築物を含む代表的なエフェクターモジュールの実施形態を、図１３～１８に示す。いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、細胞外ドメイン、ヒンジ及び膜貫通ドメインならびに細胞内シグナル伝達領域からなる完全ＣＡＲ構築物であってもよい。他の実施形態では、本発明のペイロードは、リーダー配列、ホーミングエレメント及び安全スイッチ、またはそのような構成要素の組み合わせを含むがこれらに限定されない、ＣＡＲアーキテクチャ及び機能を向上させる、細胞外ターゲティング部分、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、１つ以上の共刺激ドメイン、ならびに他の追加のエレメントを含む、完全ＣＡＲ構築物の構成要素であってもよい。

【０１９４】
本発明の生体回路及び組成物により調節されるＣＡＲは調整可能であり、それによりいくつかの利点を提供する。可逆的なオン／オフスイッチ機構により、ＣＡＲ－Ｔ細胞の過剰な増殖によって引き起こされる急性毒性を管理することができる。本発明のＳＲＥを使用するパルス状のＣＡＲ発現は、リガンドレベルをサイクル化することにより達成され得る。リガンドによるＣＡＲの調節は、抗原の喪失によって誘発される腫瘍エスケープを相殺し、慢性的な抗原曝露による持続性シグナル伝達によって引き起こされる機能的消耗を回避し、ＣＡＲ発現細胞のｉｎ　ｖｉｖｏでの持続性を向上させるのに有効である可能性がある。

【０１９５】
いくつかの実施形態では、本発明の生体回路及び組成物を利用してＣＡＲ発現を下方制御し、腫瘍崩壊症候群によって引き起こされるオンターゲット、オン組織の傷害性を制限してもよい。抗腫瘍効果に続く本発明のＣＡＲの発現の下方制御は、（１）正常組織における抗原発現により引き起こされるオンターゲット、オフ腫瘍の傷害性、（２）ｉｎ　ｖｉｖｏでの抗原非依存的活性化を予防し得る。

【０１９６】
細胞外ターゲティングドメイン／部分
本発明によれば、ＣＡＲの細胞外標的部分は、所定の標的分子、例えば腫瘍細胞上の新

生抗原を高い特異性及び親和性で認識及び結合する任意の薬剤であってもよい。標的部分は、腫瘍細胞上の標的分子に特異的に結合する抗体及びそのバリアント、または腫瘍細胞上の標的分子に結合する能力に基づいてランダム配列プールから選択されたペプチドアプタマー、または腫瘍細胞上の標的分子に結合することができるバリアントもしくはその断片、または天然Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）由来の抗原認識ドメイン（例えば、ＨＩＶ感染細胞を認識するＣＤ４細胞外ドメイン）、またはサイトカイン受容体を有する標的細胞の認識を誘導する結合サイトカインなどの外来の認識成分、または受容体の天然リガンドであってもよい。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲのターゲティングドメインは、標的分子、例えば腫瘍特異性抗原（ＴＳＡ）を特異的に認識する抗体に由来する、Ｉｇ　ＮＡＲ、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ）’２フラグメント、Ｆ（ａｂ）’３フラグメント、Ｆｖ、単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、ｂｉｓ－ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）２、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Ｆｖタンパク質（ｄｓＦｖ）、ユニットボディ、ナノボディ、または抗原結合領域であってもよい。一実施形態では、ターゲティング部分はｓｃＦｖ抗体である。ｓｃＦｖドメインは、ＣＡＲ　Ｔ細胞の表面で発現し、その後がん細胞上の標的タンパク質に結合すると、ＣＡＲ　Ｔ細胞をがん細胞の近くに維持し、Ｔ細胞の活性化を引き起こすことができる。ｓｃＦｖは、通常の組換えＤＮＡ技術を用いて生成することができ、これについて本発明において考察する。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲのターゲティング部分として天然リガンドを使用してもよい。そのような天然リガンドは、ｓｃＦｖの範囲内の親和性で抗原に結合可能であってもよく、相補的受容体を発現する標的細胞にＴ細胞特異性及びエフェクター機能を向け直すことができる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲのターゲティング部分は、ＨＥＲ３及びＨＥＲ４の天然リガンドであるニューレグリン－１（ＮＲＧ１）；ＶＥＧＦＲの天然リガンドであるＶＥＧＦ；ＩＬ１３Ｒａ２に結合するＩＬ１３野生型タンパク質またはＩＬ１３ムテイン、例えばＥ１３Ｙ；ＮＫＧ２Ｄ受容体の天然リガンドであるＮＫＧ２Ｄリガンド；ＣＤ２７のリガンドであるＣＤ７０；ならびにＢＣＭＡ８及び膜貫通アクチベーター及びＣＡＭＬ相互作用因子（ＴＡＣＩ）に対する天然の高親和性リガンドである増殖誘導リガンド（ＡＰＲＩＬ）であってもよい。米国特許公開第ＵＳ２０１６０３６２４６７Ａ１号に示されているリガンドベースのＢＣＭＡ　ＣＡＲはいずれも、その内容の全体を参照により援用する。

【０１９９】

一実施形態では、ＣＡＲのターゲティング部分は、抗原、例えば、ガングリオシド、増殖因子受容体、レクチンまたは他の任意の細胞表面抗原を認識し得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、表７または表８に記載する配列のいずれかが本発明において有用であり得る。

【０２００】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲのターゲティング部分は、腫瘍特異性抗原（ＴＳＡ）、例えば、タンパク質コード配列を変化させ、したがって新規外来抗原を創生する遺伝子変異または転写の変化が原因で、腫瘍細胞でのみ発現するがん新生抗原を認識し得る。遺伝的変化は、天然同族タンパク質（すなわち、正常細胞で発現する分子）の遺伝的置換、挿入、欠失、または任意の他の遺伝的変化から生じる。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、本発明のターゲティング部分は、表８のアミノ酸配列を有するｓｃＦｖであってもよい。

【表８－１】
表８．ｓｃＦｖ配列

標的	分類記載及びクローン名	供給源	配列番号
ALK	ALK15 scFv	WO2015069922 の配列番号 17	422
ALK	ALK48 scFv	WO2015069922 の配列番号 18	423
ALK	ALK53 scFv	WO2015069922 の配列番号 19	424
ALK	ALK58 scFv	WO2015069922 の配列番号 20	425
ALK	ヒト化 ALK15 scFv	WO2015069922 の配列番号 21	426
ALK	ヒト化 ALK48 scFv	WO2015069922 の配列番号 22	427
ALK	ヒト化 ALK53 scFv	WO2015069922 の配列番号 23	428
ALK	ヒト化 ALK58 scFv	WO2015069922 の配列番号 24	429
CD22	CD22(m971) scFv	WO2014065961 の配列番号 9	430
CD22	CD22(HA22 または BL22) scFv	WO2013059593 の配列番号 5	431
CD22	CD22(HA22 または BL22) scFv	WO2013059593 の配列番号 6	432
CD276	CD276 scFv	WO2017044699 の配列番号 21	433
CD276	CD276 scFv(CD276.6)	WO2014160627 の配列番号 10	434
CD276	CD276 scFv(CD276.1)	WO2014160627 の配列番号 19	435
CD276	CD276 scFv(CD276.17)	WO2014160627 の配列番号 28	436
GD2	hu3F8/ヒト OKT3 scFv	WO2011160119 の配列番号 23	437
GD2	hu3F8/C8.2.5 scFv	WO2011160119 の配列番号 24	438
GD2 を含むガングリオシド	DMab14-86184 scFv	WO2012071216 の配列番号 6	439
GD2 を含むガング	GMab1 scFv	WO2012071216 の配列番号 20	440

【表８－２】

リオシド			
GD2 を含むガングリオシド	GMab2 scFV	WO2012071216 の配列番号 21	441
GD2 を含むガングリオシド	DMab14 scFV	WO2012071216 の配列番号 22	442
GD2	GD2 scFv	WO2016134286 の配列番号 19	443
GD2	GD2 scFv	WO2016134287 の配列番号 20	444
GD2	GD2 scFv	WO2016134288 の配列番号 21	445
GD2	マウス KM666 配列	WO2015132604 の配列番号 7	446
GD2	ヒト化 KM666 配列	WO2015132604 の配列番号 8	447
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 11	448
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 12	449
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 13	450
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 14	451
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 15	452
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 16	453
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 17	454
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 18	455
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 19	456
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 20	457
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 21	458
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 22	459
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 23	460
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 24	461
GD2	GD2 scFv	US20160032009 の配列番号 25	462
GD2	マウス KM666 scFv 配列	US20170066838 の配列番号 7	463
GD2	ヒト化 KM666 scFv 配列	US20170066838 の配列番号 8	464
GD2	GD2(クローン 1A7) scFv	20050287148A1 の配列番号 1	465
Her2	F5	US9,388,244 の配列番号 1	466
Her2	C1	US9,388,244 の配列番号 2	467
抗 Her2/neu-抗 CD3	抗 Her2/neu-抗 CD3 二重特異性抗体 scFv	WO2014079000A1 の配列番号 1	468
Her2	F5	US7,332,580 の配列番号 1	469
Her2	HER3.B12	US7,332,580 の配列番号 6	470
Her2	FL/Fc/HER2Fv-Flt3 リガンド細胞外領域(hFLex)；IgG1 Fc；組換えヒト MAb ScFv	US20040254108 の配列番号 62	471
Her2	ペリプラズム 6×-His(配列番号 933) C 末端 scFv-4D5	US7,632,924 の配列番号 26	472

【表８－３】

Her2	ペリプラズム 6×-His(配列番号 933) N 末端 scFv-4D5	US7,632,924 の配列番号 28	473

【０２０２】

細胞内シグナル伝達ドメイン

ＣＡＲ融合ポリペプチドの細胞内ドメインは、その標的分子に結合した後、免疫エフェクター細胞にシグナルを伝達し、細胞溶解活性（例えば、サイトカイン分泌）またはヘルパー活性を含む、免疫エフェクター細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも１つを活性化する。したがって、細胞内ドメインは、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の「細胞内シグナル伝達ドメイン」を含む。

【０２０３】

いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を使用することができる。他の態様では、そのドメインがエフェクター機能シグナルを伝達する場合、インタクトな鎖の代わりに細胞内シグナル伝達ドメインの短縮部分を使用してもよい。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）として知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。細胞質シグナル伝達配列を含むＩＴＡＭの例として、ＴＣＲ　ＣＤ３ζ、ＦｃＲγ、ＦｃＲβ、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、及びＣＤ６６ｄに由来するＩＴＡＭが挙げられる。一例実施では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）シグナル伝達ドメインである。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞内領域は、免疫エフェクター細胞に追加のシグナルを提供する１つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。これらの共刺激シグナル伝達ドメインを、シグナル伝達ドメインと併用して、ＣＡＲ改変した免疫細胞（ＣＡＲ　Ｔ細胞など）の増殖、活性化、記憶、持続性、及び腫瘍根絶効率をさらに向上させることができる。いくつかの場合では、共刺激シグナル伝達領域は、１つ以上の細胞内シグナル伝達分子及び／または共刺激分子の１、２、３、または４つの細胞質ドメインを含む。共刺激シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＧＩＴＲ（グルココルチコイド誘発腫瘍壊死因子受容体）、ＬＦＡ－１（リンパ球機能関連抗原－１）、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３を含むがこれらに限定されない共刺激分子の細胞内／細胞質ドメインであってもよい。一実施例では、共刺激シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８の細胞質ドメインに由来する。別の実施例では、共刺激シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）の細胞質ドメインに由来する。別の実施例では、共刺激シグナル伝達ドメインは、米国特許第９，１７５，３０８号に示されているようなＧＩＴＲの細胞内ドメインであってもよく；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞内領域は、ＭＨＣクラスＩ分子、ＴＮＦ受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化タンパク質（ＳＬＡＭ）、例えば、ＣＤ４８、ＣＤ２２９、２Ｂ４、ＣＤ８４、ＮＴＢ－Ａ、ＣＲＡＣＣ、ＢＬＡＭＥ、ＣＤ２Ｆ－１０、ＳＬＡＭＦ６、ＳＬＡＭＦ７、活性化ＮＫ細胞受容体、ＢＴＬＡ、Ｔｏｌｌリガンド受容体、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、Ｂ７－Ｈ３、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＧＩＴＲ、ＢＡＦＦＲ、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＳＬＡＭＦ７、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ３０、

ＮＫｐ４６、ＣＤ１９、ＣＤ４、ＣＤ８α、ＣＤ８β、ＩＬ２Ｒβ、ＩＬ２Ｒγ、ＩＬ７Ｒα、ＩＬ１５Ｒａ、ＩＴＧＡ４、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＴＧＡ４、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＴＧＡ４、ＩＡ４、ＣＤ４９Ｄ、ＩＴＧＡ６、ＶＬＡ－６、ＣＤ４９ｆ、ＩＴＧＡＤ、ＣＤ１１ｄ、ＩＴＧＡＥ、ＣＤ１０３、ＩＴＧＡＬ、ＣＤ１１ａ、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＡＭ、ＣＤ１１ｂ、ＩＴＧＡＸ、ＣＤ１１ｃ、ＩＴＧＢ１、ＣＤ２９、ＩＴＧＢ２、ＣＤ１８、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＢ７、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＤ２Ｃ　ＳＬＰ７６、ＴＮＦＲ２、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴＡＭ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＰＳＧＬ１、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ６９、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙ１０８）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＬＴＢＲ、ＬＡＴ、ＣＤ２７０（ＨＶＥＭ）、ＧＡＤＳ、ＳＬＰ－７６、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＣＤ１９ａ、ＣＤ８３と特異的に結合するリガンド、ＤＡＰ１０、ＴＲＩＭ、ＺＡＰ７０、キラー細胞免疫グロブリン受容体（ＫＩＲ）、例えば、ＫＩＲ２ＤＬ１、ＫＩＲ２ＤＬ２／Ｌ３、ＫＩＲ２ＤＬ４、ＫＩＲ２ＤＬ５Ａ、ＫＩＲ２ＤＬ５Ｂ、ＫＩＲ２ＤＳ１、ＫＩＲ２ＤＳ２、ＫＩＲ２ＤＳ３、ＫＩＲ２ＤＳ４、ＫＩＲ２ＤＳ５、ＫＩＲ３ＤＬ１／Ｓ１、ＫＩＲ３ＤＬ２、ＫＩＲ３ＤＬ３、及びＫＩＲ２ＤＰ１；レクチン関連ＮＫ細胞受容体、例えば、Ｌｙ４９、Ｌｙ４９Ａ、及びＬｙ４９Ｃからなる群から選択されるタンパク質由来の機能的シグナル伝達ドメインを含み得る。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞内シグナル伝達ドメインは、ＪＡＫ－ＳＴＡＴ由来のシグナル伝達ドメインを含み得る。他の実施形態では、本発明の細胞内シグナル伝達ドメインは、ＤＡＰ－１２（細胞死関連タンパク質１２）由来のシグナル伝達ドメインを含み得る（Ｔｏｐｆｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２０１５，１９４：３２０１－３２１２；及びＷａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２０１５，３：８１５－８２６）。ＤＡＰ－１２はＮＫ細胞の重要なシグナル伝達受容体である。ＤＡＰ－１２によって媒介される活性化シグナルは、特定の腫瘍細胞及びウイルス感染細胞に対するＮＫ細胞の細胞傷害性応答の誘発において重要な役割を果たす。ＤＡＰ１２の細胞質ドメインには、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）が含まれる。したがって、ＤＡＰ１２由来のシグナル伝達ドメインを含むＣＡＲは、ＮＫ細胞の養子移入に使用してもよい。

【０２０８】

いくつかの実施形態では、別個の共刺激ドメインを組み込んだ２つ以上のＣＡＲで改変し、別個のＤＤにより調節されるＴ細胞を使用して、下流のシグナル伝達の速度制御を提供してもよい。

【０２０９】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞内ドメインは、表９のアミノ酸配列を含み得る。

【表９－１】
表９．細胞内シグナル伝達及び共刺激

ドメイン	配列	配列番号
2B4 共刺激ドメイン	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYS	474
CD27 共刺激ドメイン	HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP	475
CD272(BTLA1)共刺激ドメイン	RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS	476
CD272(BTLA1)共刺激ドメイン	CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS	477
CD28 共刺激	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	478
CD28 共刺激ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	479
CD28 共刺激ドメイン	FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	480
CD28 共刺激ドメイン	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	481
CD28 共刺激ドメイン	RSKRSRGGHSDYIVINMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	482
CD28 共刺激シグナル伝達領域	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	483
CD30 共刺激ドメイン	RRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK	484
GITR 共刺激ドメイン	HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV	485
HVEM 共刺激ドメイン	CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH	486
ICOS 共刺激ドメイン	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL	487
ICOS 共刺激シグナル伝	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL	488

【表９－２】

達ドメイン		
LAG-3 共刺激領域	HLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL	489
OX40 共刺激ドメイン	ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	490
OX40 共刺激ドメイン	RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	491
4-1BB 細胞内ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTIQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	492
4-1BB シグナル伝達ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGYEL	493
4-1BB-CD3ζ細胞内ドメイン	TGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	494
4-1BB-Z エンドドメイン融合体	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	495
CD127 細胞内ドメイン	KRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVE GFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSAC DAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQ GQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQ	496
CD137 細胞内ドメイン	RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	497
CD148 細胞内ドメイン	RKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVG ISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHSKKD FIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKCVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDI TVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPDTTDLLINFRY LVRDYMKQSPPESPILVHCSAGVGRTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRM HRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKT NGYIA	498
CD27 細胞内ドメイン	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP	499
CD28 細胞内ドメイン	FAAYRS	500
CD28 シグナル伝達鎖	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP YAPPRDFAAYRS	501
CD28 シグナル伝達ドメイン	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	502

【表９－３】

CD28 シグナル伝達ドメイン	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	503
CD28 シグナル伝達ドメイン	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	504
CD28,4-1BB,及び/またはCD3ζ シグナル伝達ドメイン	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	505
CD28/CD3C	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	506
CD28-OXZ 細胞内ドメイン	RSKRSRLLHSDYNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGG SFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR	507
CD28-4-1BB 細胞内ドメイン	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCEL	508
CD28-4-1BB 細胞内ドメイン	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	509
CD28-CD3ζ 細胞内ドメイン	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	510
CD28-CD3 ζ 細胞内ドメイン	KRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	511
CD3δ 鎖細胞内シグナル伝達ドメイン	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDIT RLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDV IATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWA RNK	512
CD3δ 鎖細胞内シグナル伝達ドメイン	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDIT RLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALLRNDQVYQPLRDRD DAQYSHLGGNWARNK	513
CD3δ 鎖細胞内シグナル伝達ドメ	DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN	514

【表９－４】

イン		
CD3δ 細胞内ドメイン	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	515
CD3δ 細胞内ドメイン	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	516
CD3ε 細胞内ドメイン	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI	517
CD3ε 細胞内ドメイン	NPDYEPIRKGQRDLYSGLNQR	518
CD3γ 細胞内ドメイン	MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN	519
CD3γ 細胞内ドメイン	DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN	520
CD3ζ 細胞内ドメイン	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	521
CD3ζ 細胞内ドメイン	NQLYNELNLGRREEYDVLDKR	522
CD3ζ ドメイン 2(NM_000734.3)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	523
CD3ζ 細胞内ドメイン	DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ	524
CD3ζ 細胞内ドメイン	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	525
CD3ζ 細胞内ドメイン	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	526
CD3ζ 細胞内ドメイン	RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	527
CD3ζ 細胞内ドメイン	RVKFSRSADAPAYQQGEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	528
CD3ζ 細胞	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEVDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE	529

【表９－５】

内ドメイン	GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
CD3ζ 細胞内ドメイン	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLVGIVLTLLVCRLKIQVRKAAIT SYEKSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAVSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	530
CD3ζ 細胞内ドメイン	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	531
CD3ζ 細胞内ドメイン	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQ EGLY	532
CD3ζ 細胞内ドメイン	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	533
CD3ζ 細胞内ドメイン	RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	534
CD3ζ 細胞内ドメイン	EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK	535
CD3ζ 細胞内ドメイン	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	536
CD3ζ 細胞内ドメイン	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP	537
CD3ζ 細胞内ドメイン	DPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	538
CD3ζ 細胞内ドメイン	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	539
CD40 細胞内ドメイン	RSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	540
CD79A 細胞内ドメイン	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPH NSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKSHGGIYVCRVQEGN ESYQQSCGTYLRVRQPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKR WQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLE KP	541
CD79A 細胞内ドメイン	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPH NSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNEPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGI ILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGL QGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	542
CD79A 細胞内ドメイン	ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG	543
CD8 細胞内	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI	544

【表９－６】

ドメイン	YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR	
CD8 細胞内ドメイン	FVPVFLPAKPITTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR	545
CD8a 細胞内ドメイン	PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI	546
CTLA4 細胞内ドメイン	AVSLSKMLKKRSPLTTGVFVKMAPTEAECEKQFQPYFIPIN	547
CTLA4 細胞内ドメイン	AVSLSKMLKKRSPLTTGVYMNMTPRRPECEKQFQPYAPPRDFAAYRS	548
DAP10 細胞内ドメイン	RPRRSPAQDGKVYINMPGRG	549
DAP12 細胞内ドメイン	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVL IALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYY K	550
DAP12 細胞内ドメイン	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVL IALAVYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	551
DAP12 細胞内ドメイン	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRL VPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	552
DAP12 細胞内ドメイン	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRL VPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	553
DAP12 細胞内ドメイン	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVL IALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYY K	554
DAP12 細胞内ドメイン	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVL IALAVYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	555
DAP12 細胞内ドメイン	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRL VPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	556
DAP12 細胞内ドメイン	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRL VPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	557
DAP12 細胞内ドメイン	ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ	558
GITR 細胞内ドメイン	RSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV	559
ICOS 細胞内ドメイン	TKKKYSSSVHDPNGEFMFMRAVNTAKKSRLTDVTL	560
IL- 15Ra 細胞内ドメイン	KSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL	561
OX40-CD3ζ 細胞内ドメイン	RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	562
ZAP70 細胞	MPDPAAHLPFFYGSISRAEAEEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHDVRF	563

【表９－７】

内ドメイン	HHFPIERQLNGTYAIAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQP GVFDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSL TREEAERKLYSGAQTDGKFLLRPRKEQGTYALSLIYGKTVYHYLISQDKAGKYCIP EGTKFDTLWQLVEYLKLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAHPSTLTHP QRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKLFLKRDN LLIADIELGCGNFGSVRQGVYRMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIMHQ LDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMG MKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLK WYAPECINFRKFSSRSDVWSYGVTMWEALSYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQGKRMEC PPECPPELYALMSDCWIYKWEDRPDFLTVEQRMRACYYSLASKVEGPPGSTQKAEA ACA	
CD28 細胞内ドメイン	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLH KGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDIYFC KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSL LVTVAFIIFWVR	564
4-1BB 細胞内ドメイン	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQEL TKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPG ASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDG	565
Fcε 受容体Iγ 鎖細胞内ドメイン	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAIT SYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ	566
Fcε 受容体Iγ 鎖細胞内ドメイン	DGVYTGLSTRNQETYETLKHE	567
Fcε 受容体Iγ 鎖細胞内ドメイン	DPKLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETY ETLKHEKPPQ	568
CD28 細胞内ドメイン	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	569
CD28 シグナル伝達ドメイン	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWVR	570
CD8 シグナル伝達ドメイン	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR	571
CD28 及びCD3ζ を含む細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメ	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	572

【表９－８】

イン		
CD28,CD137,及びCD3ζを含む細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	573

【０２１０】

膜貫通ドメイン

いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲは膜貫通ドメインを含み得る。本明細書中で使用する場合、用語「膜貫通ドメイン（ＴＭ）」とは、原形質膜にまたがる長さ約１５残基のアミノ酸配列を広く指す。より好ましくは、膜貫通ドメインは、少なくとも２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、または４５アミノ酸残基を含み、原形質膜にまたがっている。いくつかの実施形態では、本発明の膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来するものであってよい。ＣＡＲの膜貫通ドメインは、いずれかの天然の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来するものであってよい。例えば、膜貫通領域は、Ｔ細胞受容体、ＣＤ３ε、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ８α、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ２８、ＣＤ３７、ＣＤ４５、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５２、またはＣＤ１５４のα、βまたはζ鎖に由来する（すなわち、少なくともその膜貫通領域（複数可）を含む）ものであってもよい。

【０２１１】

あるいは、本発明の膜貫通ドメインは合成によるものであってもよい。いくつかの態様では、合成配列は、ロイシン及びバリンなどの主に疎水性残基を含み得る。

【０２１２】

いくつかの実施形態では、本発明の膜貫通ドメインは、ＣＤ８α膜貫通ドメイン、ＣＤ４膜貫通ドメイン、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、ＣＴＬＡ－４膜貫通ドメイン、ＰＤ－１膜貫通ドメイン、及びヒトIg_{G4}　Ｆｃ領域からなる群から選択され得る。非限定的な例として、膜貫通ドメインは、国際特許公開第ＷＯ２０１４／１００３８５号の配列番号１～５のアミノ酸配列を有するＣＴＬＡ－４膜貫通ドメイン；及び国際特許公開第ＷＯ２０１４１００３８５号の配列番号６～８のアミノ酸配列を有するＰＤ－１膜貫通ドメインであってもよく；その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２１３】

いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲは、任意のヒンジ領域（スペーサーとも呼ばれる）を含み得る。ヒンジ配列は、細胞外ターゲティング領域の可撓性を促進する短いアミノ酸配列であり、標的結合ドメインをエフェクター細胞表面から遠ざけて、適切な細胞／細胞接触、標的結合、及びエフェクター細胞活性化を可能にする（Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ，１９９９；６：４１２－４１９）。ヒンジ配列は、ターゲティング部分と膜貫通ドメインの間に配置してもよい。ヒンジ配列は、任意の適切な分子に由来するかまたはそれから得られる任意の適切な配列であり得る。ヒンジ配列は、免疫グロブリン（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）のヒンジ領域のすべてまたは一部、すなわち、免疫グロブリンのＣＨ１ドメインとＣＨ２ドメインの間にある配列、例えば、ＩｇＧ４　Ｆｃヒンジ、１型膜タンパク質の細胞外領域、例えば、ＣＤ８α　ＣＤ４、ＣＤ２８及びＣＤ７（これは野生型配列または誘導体であってもよい）に由来するものであってもよい。いくつかのヒンジ領域には、免疫グロブリンＣＨ３ドメインか、またはＣＨ３ドメインとＣＨ２ドメインの両方が含まれる。特定の実施形態では

、ヒンジ領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４から改変してもよく、未修飾のヒンジに存在するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基で置換された１残基以上の、例えば１、２、３、４または５残基のアミノ酸残基を含む。表１０に、本明細書に記載のＣＡＲで使用することができる様々な膜貫通領域を示す。

【表１０－１】

表１０：膜貫通ドメイン

膜貫通ドメイン	配列	配列番号
CD8 膜貫通ドメイン	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI	574
4-1BB 膜貫通ドメイン	IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGR	575
4-1BB 膜貫通ドメイン	IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV	576
CD134(OX40) 膜貫通ドメイン	VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL	577
CD148 膜貫通及び細胞内ドメイン	AVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHSKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKCVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEVVTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPDTTDLLINFRYLVRDYMKQSPPESPILVHCSAGVGRTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA	578
CD148 膜貫通ドメイン	AVFGCIFGALVIVTVGGFIFW	579
CD2 膜貫通ドメイン	KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDKKKIAQFRKEKETFKEKDTYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNGTDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSVEPVSCPEKGLD	580
CD28 膜貫通及び細胞内ドメイン	IEVMYPPPYLDNEKSNGTITHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAHIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	581
CD28 膜貫通ドメイン	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	582
CD28 膜貫通ドメイン	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	583
CD28 膜貫通ド	IFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRR	584

【表１０－２】

メイン		
CD28 膜貫通ドメイン	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP YAPPRDFAAYRS	585
CD28 膜貫通ドメイン	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	586
CD28 膜貫通ドメイン	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFHFWV	587
CD28 膜貫通ドメイン	MFWVLVVVGGVLACYSGGVTVAFIIFWV	588
CD28 膜貫通ドメイン	WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	589
CD28 膜貫通ドメイン	PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	590
CD28 膜貫通ドメインならびにCD28 及び CD3ζ 細胞内ドメイン	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	591
CD28 膜貫通ドメインならびにCD28,OX40,及びCD3ζ 細胞内ドメイン	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	592
CD28 膜貫通ドメイン及びCD3ζ 細胞内ドメイン	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	593
CD28 膜貫通-CD3ζ シグナル伝達ドメイン（“28z”）	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	594
CD3ζ 膜貫通ドメイン	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	595
CD3ζ 膜貫通ドメイン	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFL	596
CD3ζ 膜貫通ドメイン	LCYLLDGILFIYGVILTALFL	597
CD4 膜貫通ドメイン	ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC	598
CD4 膜貫通ドメイン	MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF	599
CD45 膜貫通及	ALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNV	600

【表１０－３】

び細胞内ドメイン	EPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQNKNRY VDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDF WRMIWEQKATVIVMVTRCEEGNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRC PDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFS NFFSGPIWHCSAGVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMV QVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQ RLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSD ESSDDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKV KVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEGKQTYGDIEVDLKDTDKSSTYTLRVFELRH SKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQWKQKLPQKNSSEGNKHHKS TPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEWDIFQWKALRKARPGMVSTFEQ YQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEK LPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS	
CD62L 膜貫通ドメイン	PLFIPVAVMVTAFSGLAFIIWLA	601
CD7 膜貫通ドメイン	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA	602
CD8 膜貫通ドメイン	MALPVTALLLPLALLLHAARP	603
CD8 膜貫通ドメイン及び CD28 シグナル伝達ドメイン	AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	604
CD8 膜貫通ドメイン-CD137(4-1BB) シグナル伝達ドメイン及び CD3ζ シグナル伝達ドメイン（“BBz”）	AAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	605
CD8a 膜貫通ドメイン	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN	606
CD8a 膜貫通ドメイン	IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	607
CD8a 膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	608
CD8a 膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCR	609
CD8a 膜貫通ド	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLVCR	610

【表１０－４】

メイン		
CD8a 膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	611
CD8a 膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	612
CD8b 膜貫通ドメイン	LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC	613
EpoR 膜貫通ドメイン	APVGLVARLADESGHVVLRWLPPPETPMTSHIRYEVDVSAGNGAGSVQRVEIL EGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPVSLLTPSD	614
FcER1a-膜貫通ドメイン	MAPAMESPTLLCVALLFFAPDGVLAVPQKPKVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNG NNFFEVSSTKWFHNGSLSEETNSSLNIVNAKFEDSGEYKCQHQQVNESEPVYL EVFSDWLLLQASAEVVMEGQPLFLRCHGWRNWDVYKVIYYKDGEALKYWYENH NISITNATVEDSGTYYCTGKVWQLDYESEPLNITVIKAPREKYWLQFFIPLLV VILFAVDTGLFISTQQQVTFLLKIKRTRKGFRLLNPHPKPNPKNN	615
FceRIa 膜貫通ドメイン	DIFIPLLVVILFAVDTGLFISTQQQVTFLLKIKRTRKGFRLLNPHPKPNPKNN R	616
GITR 膜貫通ドメイン	PLGWLTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQL	617
Her2 膜貫通ドメイン	SIISAVVGILLVVVLGVVFGILII	618
Her2 膜貫通ドメイン	CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWK FPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLG VVFGILI	619
ICOS 膜貫通ドメイン	FWLPIGCAAFVVVCILGCILI	620
IgG1 膜貫通ドメイン	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKKD	621
OX40 膜貫通ドメイン	VAAILGLGLVLGLLGPLAILL	622
膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	623
膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	624
CD28 膜貫通及びシグナル伝達ドメイン	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR S	625
CD28 膜貫通ドメイン	VMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSL LVTVAFIIFWVR	626
CD8 膜貫通ドメイン	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYC	627

【０２１４】

本発明において有用なヒンジ領域配列を表１１に提供する。

【表１１－１】

表１１：ヒンジ領域

ヒンジドメイン	配列	配列番号
ヒンジ	DKTHT	628
ヒンジ	CPPC	629
ヒンジ	CPEPKSCDTPPPCPR	630
ヒンジ	ELKTPLGDTTHT	631
ヒンジ	KSCDKTHTCP	632
ヒンジ	KCCVDCP	633
ヒンジ	KYGPPCP	634
C233P ヒンジ	VEPKSPDKTHTCPPCP	635
C233S ヒンジ	LDPKSSDKTHTCPPCP	636
CD28 ヒンジ	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	637
CD8a ヒンジ	GGAVHTRGLDFA	638
CD8a ヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	639
CD8a ヒンジ	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	640
CD8a ヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT	641
CD8a ヒンジ	PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY	642
CD8a ヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	643
CD8a ヒンジ	TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	644
CD8a ヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY	645
Delta5 ヒンジ	LDKTHTCPPCP	646
EpoR ヒンジ	APVGLVARLADESGHVVLRWLPPPETPMTSHIRYEVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPVSLLTPSD	647
FCRIIα ヒンジ	GLAVSTISSFFPPGYQ	648
ヒンジ	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	649
ヒンジ	YVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK	650
ヒンジ	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA	651
ヒンジ	LEPKSCDKTHTCPPCP	652

【表１１－２】

ヒンジ	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD	653
ヒンジ	ELKTPLGDTHTCPRCP	654
ヒンジ	EPKSCDTPPPCPRCP	655
ヒンジ	ESKYGPPCPSCP	656
ヒンジ	ERKCCVECPPCP	657
ヒンジ(CH2-CH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	658
ヒンジ(CH3)	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	659
IgD ヒンジ	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ EERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLP PQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLE DQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSR TLLNASRSLEVSYVTDH	660
IgD ヒンジ	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ EERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLHPSLPP QRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLED QREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT LLNASRSLEVSYVTDH	661
IgD ヒンジ	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ EERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLP PQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMVVL EDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDS RTLLNASRSLEVSYVTDH	662
IgD ヒンジ	ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEER ETKTP	663
IgD ヒンジ	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ EERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLP PQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLE DQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSR TLLNASRSLEVSYVTDH	664
IgD ヒンジ	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ EERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLP	665

【表１１－３】

	PQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLE DQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSR TLLNASRSLEVSYVTDH	
IgD ヒンジ	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ EERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLP PQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLE DQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT LLNASRSLEVSYVTDH	666
IgD ヒンジ	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ EERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLP PQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLE DQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSR TLLNASRSLEVSYVTDH	667
IgG1(CH2CH3) ヒンジドメイン	AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD	668
IgG1 ヒンジ	AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK	669
IgG1 ヒンジ	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEVKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKKD	670
IgG1 ヒンジ	SVFLFPPKPKDTL	671
IgG1 ヒンジ	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	672
IgG1 ヒンジ	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK	673
IgG1 ヒンジ	VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK	674

【表１１－４】

IgG1 ヒンジ(CH2CH3 ドメイン)	DPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKK	675
IgG3 ヒンジ	ELKTPLGDTTHTCPRCP	676
IgG3 ヒンジ	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	677
IgG4(CH2 及びCH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM	678
IgG4(CH2 及びCH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM	679
IgG4 ヒンジ	SPNMVPHAHHAQ	680
IgG4 ヒンジ	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	681
IgG4 ヒンジ	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	682
IgG4 ヒンジ	ESKYGPPCPSCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHQAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFVPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	683
IgG4 ヒンジ	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHQAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFVPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	684
IgG4 ヒンジ	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT	685
IgG4 ヒンジ	ESKYGPPCPPCP	686
IgG4 ヒンジ	YGPPCPPCP	687
IgG4 ヒンジ	KYGPPCPPCP	688
IgG4 ヒンジ	EVVKYGPPCPPCP	689
IgG4 ヒンジ	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS	690

【表１１－５】

	NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDLSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	
IgG4 ヒンジ及びリンカー	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSG	691
lgG1 ヒンジ	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTIPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	692
lgG1 ヒンジ	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPlEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTIPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	693
CH2CH3 スペーサードメイン	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK	694

【０２１５】

いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲは、ＣＡＲの任意のドメイン間に１つ以上のリンカーを含み得る。リンカーは１～３０アミノ酸長であってもよい。この点で、リンカーは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０アミノ酸長であり得る。他の実施形態では、リンカーは可撓性であってもよい。

【０２１６】

いくつかの実施形態では、ＷＯ２０１６１４９５７８（その内容は参照により本明細書に援用する）に開示されているように、キメラ抗原の構造からＣＨ２ＣＨ３を優先的に除外してより高いＴＮＦａ応答を誘発してもよい。いくつかの構築物には、ＣＨ２ＣＨ３構造ドメインが含まれる。このドメインは、ｓｃＦＶを原形質膜の細胞外表面から遠ざけて延伸させ、抗ＩｇＧ　Ｆｃ特異的抗体による形質導入Ｔ細胞の効率的な検出を可能にする。ＣＨ２ＣＨ３ドメインを含むＣＡＲ構築物は、ＷＯ２０１５０６９９２２Ａ３に開示されている（その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、本発明のターゲティング部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む構成要素を、単一の融合ポリペプチドとして構築してもよい。融合ポリペプチドは、本発明のエフェクターモジュールのペイロードであってもよい。いくつかの実施形態では、２つ以上のＣＡＲ融合ポリペプチドをエフェクターモジュールに含ませてもよく、例えば、単一のＳＲＥ（例えば、ＤＤ）の制御下の２つ、３つまたはそれ以上のＣＡＲをエフェクターモジュールに含ませてもよい。ＣＡＲペイロードを含む代表的なエフェクターモジュールを図２～６に示す。

【０２１８】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲ配列は表１２から選択され得る。

【表１２－１】
表１２：ＣＡＲ配列

分類記載	供給源	標的	配列番号
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 37	ALK	695
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 39	ALK	696
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 41	ALK	697
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 43	ALK	698
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 44	ALK	699
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 45	ALK	700
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 46	ALK	701
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 47	ALK	702
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 48	ALK	703
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 49	ALK	704
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 50	ALK	705
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 51	ALK	706
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 52	ALK	707
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 53	ALK	708
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 54	ALK	709
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 55	ALK	710
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 56	ALK	711
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 57	ALK	712
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 58	ALK	713
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 59	ALK	714
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 60	ALK	715
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 61	ALK	716
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 62	ALK	717
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 63	ALK	718
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 64	ALK	719
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 65	ALK	720
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 66	ALK	721
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 67	ALK	722
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 68	ALK	723
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 69	ALK	724
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 70	ALK	725
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 71	ALK	726
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 72	ALK	727
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 73	ALK	728
ALK CAR	WO2015069922 の配列番号 74	ALK	729

【表１２－２】

ALK CAR	WO2015069922の配列番号75	ALK	730
ALK CAR	WO2015069922の配列番号76	ALK	731
ALK CAR	WO2015069922の配列番号77	ALK	732
ALK CAR	WO2015069922の配列番号78	ALK	733
ALK CAR	WO2015069922の配列番号79	ALK	734
ALK CAR	WO2015069922の配列番号80	ALK	735
ALK CAR	WO2015069922の配列番号81	ALK	736
ALK CAR	WO2015069922の配列番号82	ALK	737
ALK CAR	WO2015069922の配列番号83	ALK	738
ALK CAR	WO2015069922の配列番号84	ALK	739
ALK CAR	WO2015069922の配列番号85	ALK	740
ALK CAR	WO2015069922の配列番号86	ALK	741
ALK CAR	WO2015069922の配列番号87	ALK	742
ALK CAR	WO2015069922の配列番号88	ALK	743
ALK CAR	WO2015069922の配列番号89	ALK	744
ALK CAR	WO2015069922の配列番号90	ALK	745
CD22(m971)第3世代CAR	WO2014065961の配列番号22	CD22	746
CD22(m971)第3世代CAR	WO2014065961の配列番号23	CD22	747
CD22(m971)第3世代CAR	WO2014065961の配列番号24	CD22	748
CD22(CARsHA22 28z) CAR	WO2013059593の配列番号15	CD22	749
CD22(HA22 28BBz) CAR	WO2013059593の配列番号16	CD22	750
CD22(HASH22 28z) CAR	WO2013059593の配列番号17	CD22	751
CD22(HASH22 28BBz) CAR	WO2013059593の配列番号18	CD22	752
CD22(BL22 28z) CAR	WO2013059593の配列番号19	CD22	753
CD22(BL22 28BBz) CAR	WO2013059593の配列番号20	CD22	754
CD22(HA22SH-CAR-第2世代，バージョン2) CAR	WO2013059593の配列番号32	CD22	755
CD276 CAR(CD276.6第2世代)	WO2014160627の配列番号39	CD276	756
CD276 CAR(CD276.1第2世代，バージョン1)	WO2014160627の配列番号42	CD276	757
CD276 CAR(CD276.17 第2世代，バージョン1)	WO2014160627の配列番号45	CD276	758
CD276 CAR(CD276.6 CAR 第2世代，バージョン1)	WO2014160627の配列番号122	CD276	759
CD276 CAR(CD276.6 CAR 第2世代，バージョン2)	WO2014160627の配列番号123	CD276	760
CD276 CAR(CD276.6 CAR 第3世代)	WO2014160627の配列番号124	CD276	761
CD276 CAR(CD276.1 CAR 第2世代，バージョン1)	WO2014160627の配列番号125	CD276	762
CD276 CAR(CD276.1 CAR 第2	WO2014160627の配列番号126	CD276	763

【表１２－３】

世代，バージョン 2)			
CD276 CAR(CD276.1 CAR 第 3 世代)	WO2014160627 の配列番号 127	CD276	764
CD276 CAR(CD276.17 CAR 第 2 世代，バージョン 1)	WO2014160627 の配列番号 128	CD276	765
CD276 CAR(CD276.17 CAR 第 2 世代，バージョン 2)	WO2014160627 の配列番号 129	CD276	766
CD276 CAR(CD276.17 CAR 第 3 世代)	WO2014160627 の配列番号 130	CD276	767
CD 276 CAR	WO2017044699 の配列番号 20	CD276	768
CD276.MG.BB.Z CAR	WO2017044699 の配列番号 12	CD276	769

【０２１９】

本発明の一実施形態では、本発明のペイロードは、ＣＤ３３特異的ＣＡＲである。ＣＤ３３の重鎖及び軽鎖を、本明細書に記載のシグナルペプチド、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、細胞内ドメイン及び不安定化ドメインのいずれかと組み合わせてもよい。

【０２２０】

本発明の一実施形態では、本発明のペイロードは、ＧＤ２特異的ＣＡＲである。ＧＤ２の重鎖及び軽鎖を、本明細書に記載のシグナルペプチド、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、細胞内ドメイン及び不安定化ドメインのいずれかと組み合わせてもよい。

【０２２１】

本発明の一実施形態では、本発明のペイロードは、Ｈｅｒ２特異的ＣＡＲである。Ｈｅｒ２の重鎖及び軽鎖を、本明細書に記載のシグナルペプチド、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、細胞内ドメイン及び不安定化ドメインのいずれかと組み合わせてもよい。例示的なＢＣＭＡ　ＣＡＲ配列及びその構成要素を表１３Ａに記載する。表１３Ａのアミノ酸配列は、終止コドンを含む場合があり、これをアミノ酸配列の最後に「＊」が付けて表に示す。

【表１３Ａ－１】

表１３Ａ：ＤＤ－Ｈｅｒ２構築物の配列

分類記載	アミノ酸配列	アミノ酸配列番号	核酸配列番号/配列
GMCSF リーダー	LLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	778	922
リンカー	ASFE	920	921
リンカー	GS	-	GGTTCC, GGATCC
リンカー	TS	-	ACTAGT
リンカー	HM	-	ATGCAC
4-1BB 細胞内ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL	773	919
4D5 scFV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGSTS GSGKPGSGEGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD	923	924

【表１３Ａ－２】

	SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDVWGQGTLVTVSS		
CD8a ヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACD	925	926
膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	927	928
CD3ζ シグナル伝達ドメイン	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	772	918
hDHFR(野生型のアミノ酸 2～187；Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLV LSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDM VWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFF PEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKN D	861	903～907
OT-Her2-004(Met-GMCSF リーダー-4D5 scFv-リンカー(ASFE)-CD8a ヒンジ-リンカー(GS)-膜貫通ドメイン-リンカー(TS)-4-1BB細胞内シグナル伝達ドメイン-リンカー(HM)-CD3ζ- リンカー(GS)-hDHFR(野生型のアミノ酸2～187;Y122I)-終止)	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QHYTTPPTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSGEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGT LVTVSSASFETTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDGSIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCTSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELHMRVKFSRSADAPAYKQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPRGSVGSLNCIVAVSQNMGIGK NGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKK TWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRS LDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPG HLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND*	906	907

【０２２２】

一実施形態では、本発明のＣＡＲは、ＣＤ２６９とも呼ばれるＢＣＭＡ（Ｂ細胞成熟抗原）ＣＡＲである。ＢＣＭＡの重鎖及び軽鎖を、本明細書に記載のシグナルペプチド、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、細胞内ドメイン及び不安定化ドメインのいずれかと組み合わせてもよい。例示的なＢＣＭＡ　ＣＡＲ配列及びその構成要素を、表１３Ｂに記載する。表１３Ｂのアミノ酸配列は、終止コドンを含む場合があり、これをアミノ酸配列の最後に「＊」を付けて表に示す。

【表１３Ｂ－１】

表１３Ｂ：ＢＣＭＡ　ＣＡＲ

分類記載	野生型のアミノ酸配列	アミノ酸配列番号	核酸配列番号
BCMA scFv(C11D5.3)	DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSVIGAHLIH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFT LTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEIKGST SGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCK ASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYA YDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALD YSYAMDYWGQGTSVTVSS	770	916
CD8α ヒンジ-TM	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	771	917
CD3ζ シグナル伝達ドメイン	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	772	918
4-1BB 細胞内シグナル伝達ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL	773	919
CD8α リーダー	MALPVTALLLPLALLLHAARP	131	132 ～ 136, 915
ecDHFR(野生型のアミノ酸 2～159)(R12Y, Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKP VIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKS VDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHI DAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCF EILERR	9	61, 869 ～874
FKBP(E31G, F36V, R71G, K105E)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGDGKKVDS SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE	12	88, 883 ～889
OT-BCMA-001(CD8a リーダー-BCMA scFv-CD8a ヒンジ-Tm-4-1BB 細胞内ドメイン-CD3ζ-終止)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAMSLGK RATISCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLA SNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCL QSRIFPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQI QLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRA PGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSAST AYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVS STTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*	775	833
OT-BCMA-002(CD8a リーダー	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAMSLGK RATISCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLA	776	834

【表１３Ｂ－２】

-BCMA scFv-CD8a ヒンジ-Tm-4-1BB 細胞内ドメイン-CD3ζ-リンカー (SG)-FKBP(E31G, F36V, R71G, K105E)-終止)	SNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCL QSRIFPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQI QLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRA PGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSAST AYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVS STTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGGV QVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSR DRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-BCMA-003(CD8a リーダー-BCMA scFv-CD8a ヒンジ-Tm-4-1BB 細胞内ドメイン-CD3ζ-リンカー (SG)-ecDHFR(野生型のアミノ酸2～159)(R12Y, Y100I)-終止)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAMSLGK RATISCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLA SNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCL QSRIFPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQI QLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRA PGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSAST AYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVS STTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGIS LIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVI MGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVD EAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDA EVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEI LERR*	777	835

【０２２３】

タンデムＣＡＲ（ＴａｎＣＡＲ）

いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲは、２つ、３つ、４つ、またはそれ以上の腫瘍特異性抗原を標的とすることができるタンデムキメラ抗原受容体（ＴａｎＣＡＲ）であってもよい。いくつかの態様では、ＣＡＲは、腫瘍細胞上の２つの異なるＴＳＡを認識する２つのターゲティングドメインを含む二重特異性ＴａｎＣＡＲである。二重特異性ＣＡＲは、第１の腫瘍抗原に特異的なターゲティングドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）及び第２の腫瘍抗原に特異的なターゲティングドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を含む細胞外領域を有するとさらに定義され得る。他の態様では、ＣＡＲは、タンデム配置で構成された３つ以上のターゲティングドメインを含む多重特異性ＴａｎＣＡＲである。ＴａｎＣＡＲのターゲティングドメイン間のスペースは、長さが約５～約３０アミノ酸の

間、例えば、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０アミノ酸であってもよい。

【０２２４】

スプリットＣＡＲ

いくつかの実施形態では、本発明のターゲティング部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む構成要素を２つ以上の部分に分割し、インタクトな機能的受容体の組み立てを促進する複数の入力に依存するようにしてもよい。一実施形態では、活性化ＣＡＲ受容体の組み立てが、ＳＲＥ（例えば小分子）へのリガンドの結合及びターゲティング部分への特異的抗原の結合に依存する、分割合成ＣＡＲ系を構築することができる。非限定的な例として、スプリットＣＡＲは、小分子依存的な方式で組み立てられる２つの部分からなり、受容体の一方の部分が細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）を特徴とし、もう一方の部分がＣＤ３ζ細胞内ドメインなどの細胞内シグナル伝達ドメインを有する。

【０２２５】

他の態様では、ＣＡＲ系の分割部分をさらに改変して、シグナルを増加させることができる。一実施例では、細胞質断片の第２部分は、膜貫通ドメイン（例えば、ＣＤ８α膜貫通ドメイン）を構築物に組み込むことにより原形質膜に固定してもよい。また、追加の細胞外ドメイン、例えばホモ二量体化を媒介する細胞外ドメインをＣＡＲ系の第２の部分に追加してもよい。これらの改変は、受容体出力活性、すなわちＴ細胞活性化を高め得る。

【０２２６】

いくつかの態様では、スプリットＣＡＲ系の２つの部分は、ヘテロ二量体化小分子の結合時に条件的に相互作用するヘテロ二量体化ドメインを含む。かくして、受容体の構成要素は、小分子の存在下で組み立てられ、インタクトな系を形成し、その後、抗原の関与により活性化される。任意の公知のヘテロ二量体化成分を、スプリットＣＡＲ系に組み込むことができる。ジベレリン誘導二量体化系（ＧＩＤ１－ＧＡＩ）、トリメトプリム－ＳＬＦ誘導ｅｃＤＨＦＲ及びＦＫＢＰ二量体化（Ｃｚｌａｐｉｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．，２００８，１３０（４０）：１３１８６－１３１８７）及びＰＰ２Ｃ及びＰＹＬドメインのＡＢＡ（アブシジン酸）誘導二量体化（Ｃｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｌ．２０１０，６１：６５１－６７９）を含むがこれらに限定されない他の小分子依存性ヘテロ二量体化ドメインもまた使用してよい。スプリットＣＡＲ系の誘導性組み立て（例えば、リガンド依存性二量体化）及び分解（例えば、不安定化ドメイン誘発ＣＡＲ分解）を用いた二重調節により、ＣＡＲ改変Ｔ細胞の活性をより柔軟に制御し得る。

【０２２７】

切り替え可能なＣＡＲ

いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲは、切り替え可能なＣＡＲであってもよい。Ｊｕｉｌｌｅｒａｔら（Ｊｕｉｌｅｒａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ．Ｒｅｐ．，２０１６，６：１８９５０；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）は、刺激（例えば、小分子）に応じて一時的にスイッチオンできる制御可能なＣＡＲを最近報告した。このＣＡＲ設計では、ＣＡＲの細胞膜ドメインからｓｃＦｖドメインを分離するヒンジドメインに系を直接組み込む。そのような系は、ＴＣＲの天然アーキテクチャの複雑さを模倣する受容体複合体の異なる鎖内での活性化や共刺激など、ＣＡＲの異なる重要な機能を分割または結合することができる。この統合系は、刺激の有無によって制御されるオン／オフ状態間でｓｃＦｖと抗原の相互作用を切り替えることができる。

【０２２８】

可逆ＣＡＲ

他の実施形態では、本発明のＣＡＲは可逆ＣＡＲ系であってもよい。このＣＡＲアーキテクチャでは、ＬＩＤドメイン（リガンド誘導分解）をＣＡＲ系に組み込む。ＬＩＤドメインのリガンドを添加することにより、ＣＡＲを一時的に下方制御することができる。Ｌ

ＩＤとＤＤを介した調節の組み合わせにより、継続的に活性化されたＣＡＲ　Ｔ細胞の調整可能な制御が提供され、それによってＣＡＲを介した組織傷害性が低減される。

【０２２９】

活性化条件的ＣＡＲ

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、活性化免疫細胞でのみ発現する活性化条件的キメラ抗原受容体であってもよい。例えばＣＡＲなどの配列の転写及び／または発現をその制御下で誘導する１つ以上の核酸配列を意味する活性化条件的制御領域とＣＡＲの発現を組み合わせてもよい。そのような活性化条件的制御領域は、免疫エフェクター細胞の活性化中に上方制御される遺伝子のプロモーター、例えば、ＩＬ２プロモーターまたはＮＦＡＴ結合部位であってもよい。いくつかの実施形態では、免疫細胞の活性化を、構成的に発現するＣＡＲにより達成してもよい（国際公開第ＷＯ２０１６１２６６０８号；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０２３０】

４．追加的なエフェクターモジュール機能

本発明のエフェクターモジュールは、目的ペイロードの分布を調節するシグナル配列、エフェクターモジュール構築物からのペイロードの切断を促進する切断及び／またはプロセシング機能、エフェクターモジュールの細胞局在化を調節することができるターゲティング及び／または浸透シグナル、タグ、及び／またはエフェクターモジュールの異なる構成要素を連結する１つ以上のリンカー配列を含み得る。

【０２３１】

シグナル配列

ＳＲＥ（例えば、ＤＤ）及びペイロード領域に加えて、本発明のエフェクターモジュールは、１つ以上のシグナル配列をさらに含み得る。シグナル配列（シグナルペプチド、ターゲティングシグナル、標的ペプチド、局在化配列、輸送ペプチド、リーダー配列またはリーダーペプチドと呼ばれることもある）は、タンパク質（例えば、本発明のエフェクターモジュール）を指定の細胞及び／または細胞外位置に向かわせる。タンパク質シグナル配列は、ほぼすべての分泌タンパク質及び多くの膜内在性タンパク質のターゲティング及びトランスロケーションにおいて中心的な役割を果たす。

【０２３２】

シグナル配列は、特定の位置へ仕向けられている新規合成タンパク質の大部分のＮ末端に存在する短い（５～３０アミノ酸長）ペプチドである。シグナル配列は、シグナル認識粒子（ＳＲＰ）によって認識され、Ｉ型及びＩＩ型シグナルペプチドペプチダーゼを用いて切断され得る。ヒトタンパク質に由来するシグナル配列をエフェクターモジュールの調節モジュールとして組み込んで、エフェクターモジュールを特定の細胞及び／または細胞外位置に誘導することができる。これらのシグナル配列は実験的に検証されており、切断することができる（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．２００４，１３：２８１９－２８２４）。

【０２３３】

いくつかの実施形態では、シグナル配列は、必ずしもではないが、エフェクターモジュールのＮ末端またはＣ末端に位置させてもよく、必ずしもではないが、所望のエフェクターモジュールを切断して、「成熟」ペイロード、すなわち、本明細書中で考察する免疫療法薬を取得してもよい。

【０２３４】

いくつかの実施例では、シグナル配列は、天然の分泌タンパク質及びそのバリアントに由来する分泌シグナル配列であってもよい。いくつかの例では、分泌シグナル配列は、サイトカインシグナル配列、例えば、ＩＬ２シグナル配列（配列番号５５～５６及び／または１１７～１１８の核酸配列によりコードされる配列番号４９のアミノ酸）、ｐ４０シグナル配列（配列番号１２０～１２８の核酸配列によってコードされる配列番号１１９のアミノ酸配列）、またはＧＭＣＳＦリーダー配列（配列番号７７８（配列番号９２２によってコードされる）、７７９、７８０）であってもよいが、これらに限定されない。

【０２３５】
いくつかの例では、目的ペイロードを標的細胞の表面膜に向かわせるシグナル配列を使用してもよい。標的細胞の表面でのペイロードの発現は、ペイロードの非標的ｉｎ　ｖｉｖｏ環境への拡散を制限するのに有用であり、それによりペイロードの安全特性を潜在的に向上させる場合がある。さらに、ペイロードの膜提示により、生理学的及び定性的なシグナル伝達、ならびにより長い半減期のためのペイロードの安定化及びリサイクルを可能とし得る。膜配列は、目的ペイロードのＮ末端構成要素の内在性シグナル配列であってもよい。場合により、この配列を異なるシグナル配列と交換することが望ましい場合がある。ペイロードがＴ細胞の表面に提示されるように、目的の細胞型の分泌経路との適合性に基づいてシグナル配列を選択してもよい。いくつかの実施形態では、シグナル配列は、ＩｇＥシグナル配列（配列番号１２９のアミノ酸及び配列番号１３０のヌクレオチド配列）、ＣＤ８ａシグナル配列（ＣＤ８ａリーダーとも呼ばれる）（アミノ酸配列番号１３１及び配列番号１３２～１３６、及び／または９１５の核酸配列）、またはＩＬ１５Ｒａシグナル配列（配列番号７８２によってコードされるアミノ酸配列番号７８１）であってもよい。

【０２３６】
バリアントを含む、シグナル配列の他の実施例は、米国特許第８，１４８，４９４号；第８，２５８，１０２号；第９，１３３，２６５号；第９，２７９，００７号；及び米国特許出願公開第２００７０１４１６６６号；ならびに国際特許出願公開第ＷＯ１９９３０１８１８１号に記載されている改変型シグナル配列であってもよく、その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２３７】
他の実施例では、シグナル配列は、エフェクターモジュールを核などの特定の細胞部位に向かわせることができる、ウイルス、酵母、及び細菌などの他の生物由来の異種シグナル配列であってもよい（例えば、ＥＰ１２０９４５０）。他の実施例として、酵素などの融合タンパク質の分泌を増加させることができるＴｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ由来アスパラギン酸プロテアーゼ（ＮＳＰ２４）シグナル配列（例えば、Ｃｅｒｖｉｎ及びＫｉｍに対する米国特許第８，０９３，０１６号）、細菌リポタンパク質シグナル配列（例えば、Ｌａｕ　ａｎｄ　Ｒｉｏｕｘに対するＰＣＴ出願公開第ＷＯ１９９１０９９５２号）、Ｅ．ｃｏｌｉエンテロトキシンＩＩシグナルペプチド（例えば、Ｋｗｏｎらに対する米国特許第６，６０５，６９７号）、Ｅ．ｃｏｌｉ分泌シグナル配列（例えば、Ｍａｌｌｅｙらに対する米国特許公開第ＵＳ２０１６０９０４０４号）、メチロトローフ酵母由来のリパーゼシグナル配列（例えば、米国特許第８，９７５，０４１号）、及びＣｏｒｙｎｅｆｏｒｍ細菌由来のＤＮａｓｅのシグナルペプチド（例えば、米国特許第４，９６５，１９７号）が挙げられ、その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２３８】
シグナル配列にはまた、核局在化シグナル（ＮＬＳ）、核外移行シグナル（ＮＥＳ）、分極細胞管状小胞構造局在化シグナル（例えば、米国特許第８，９９３，７４２号；Ｃｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２００３，３１（１）：３９３－３９６参照；その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）、細胞外局在化シグナル、細胞内位置へのシグナル（例えば、リソソーム、小胞体、ゴルジ、ミトコンドリア、原形質膜及びペルオキシソームなど）が含まれ得る（例えば、米国特許第７，３９６，８１１号；及びＮｅｇｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄａｔａｂａｓｅ，２０１５，１－７参照；これらの各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０２３９】
いくつかの実施形態では、本発明のシグナル配列には、限定するものではないが、２０１６年４月１１日に出願された同時係属中の共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号の表７、または２０１７年３月３日に出願された米国仮出願第６２／４６６，５９６号及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示される配列のいずれかが含まれ、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２４０】
切断部位
いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは、切断及び／またはプロセシング機能を有する。本発明のエフェクターモジュールは、少なくとも１つのタンパク質切断シグナル／部位を含み得る。タンパク質切断シグナル／部位は、Ｎ末端、Ｃ末端、Ｎ末端とＣ末端の間の任意の空間、例えば、限定されないが、Ｎ末端とＣ末端の中間、Ｎ末端と中間点の間、中間点とＣ末端の間、及びそれらの組み合わせに配置してもよい。
【０２４１】
エフェクターモジュールは、任意のプロテイナーゼの１つ以上の切断シグナル（複数可）／部位（複数可）を含み得る。プロテイナーゼは、セリンプロテイナーゼ、システインプロテイナーゼ、エンドペプチダーゼ、ジペプチダーゼ、メタロプロテイナーゼ、グルタミン酸プロテイナーゼ、スレオニンプロテイナーゼ及びアスパラギン酸プロテイナーゼであってもよい。いくつかの態様では、切断部位は、フューリン、アクチニダイン、カルパイン－１、カルボキシペプチダーゼＡ、カルボキシペプチダーゼＰ、カルボキシペプチダーゼＹ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＧ、カテプシンＨ、カテプシンＫ、カテプシンＬ、カテプシンＳ、カテプシンＶ、クロストリパイン、キマーゼ、キモトリプシン、エラスターゼ、エンドプロテイナーゼ、エンテロキナーゼ、第Ｘａ因子、ギ酸、グランザイムＢ、マトリックスメタロペプチダーゼ－２、マトリックスメタロペプチダーゼ－３、ペプシン、プロテイナーゼＫ、ＳＵＭＯプロテアーゼ、サブチリシン、ＴＥＶプロテアーゼ、サーモリシン、トロンビン、トリプシン及びＴＡＧＺｙｍｅのシグナル配列であってもよい。
【０２４２】
一実施形態では、切断部位は、配列番号１３８のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列ＳＡＲＮＲＱＫＲＳ（配列番号１３７）を有するフューリン切断部位；または配列番号１４０のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列ＡＲＮＲＱＫＲＳ（配列番号１３９）を有する改変型フューリン切断部位；または配列番号１４２～１４４のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列ＥＳＲＲＶＲＲＮＫＲＳＫ（配列番号１４１）を有する改変型フューリン部位；または配列番号７８４のヌクレオチド配列によりコードされるＳＧＥＳＲＲＶＲＲＮＫＲＳＫ（配列番号７８５）である。いくつかの例では、切断部位は、配列番号７８６によりコードされるＰ２Ａ切断部位（ＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号７８３）、または配列番号８６５によりコードされるＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号８６４）であり、ＮＰＧＰ（配列番号８６６）はＰ２Ａ部位である。
【０２４３】
いくつかの実施形態では、本発明の切断部位は、限定されないが、２０１６年４月１１日に出願された同時係属中の共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号の表７、または２０１７年３月３日に出願された米国仮出願第６２／４６６，５９６号及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示されるもののいずれかを含み、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。
【０２４４】
タンパク質タグ
いくつかの実施形態では、本発明のエフェクターモジュールは、タンパク質タグを含み得る。タンパク質タグを用いて、エフェクターモジュールのプロセスを検出し、モニタリングしてもよい。エフェクターモジュールは、エピトープタグ（例えば、ＦＬＡＧまたは赤血球凝集素（ＨＡ）タグ）などの１つ以上のタグを含み得る。多数のタンパク質タグを本エフェクターモジュールに使用してもよい。それらには、自己標識ポリペプチドタグ（例えば、ハロアルカンデハロゲナーゼ（ハロタグ２またはハロタグ７）、ＡＣＰタグ、ｃｌｉｐタグ、ＭＣＰタグ、ｓｎａｐタグ）、エピトープタグ（例えば、ＦＬＡＧ、ＨＡ、

Ｈｉｓ、及びＭｙｃ）、蛍光タグ（例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、及びそのバリアント）、生物発光タグ（例えば、ルシフェラーゼ及びそのバリアント）、親和性タグ（例えば、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）タグ、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグ）、免疫原性親和性タグ（例えば、タンパク質Ａ／Ｇ、ＩＲＳ、ＡＵ１、ＡＵ５、ｇｌｕ－ｇｌｕ、ＫＴ３、Ｓ－タグ、ＨＳＶ、ＶＳＶ－Ｇ、Ｘｐｒｅｓｓ及びＶ５）、ならびにその他のタグ（例えば、ビオチン（小分子）、Ｓｔｒｅｐタグ（ＳｔｒｅｐＩＩ）、ＳＢＰ、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（ＢＣＣＰ）、ｅＸａｃｔ、ＣＢＰ、ＣＹＤ、ＨＰＣ、ＣＢＤインテイン－キチン結合ドメイン、Ｔｒｘ、ＮｏｒｐＡ、及びＮｕｓＡが含まれるがこれらに限定されない。

【０２４５】

他の実施形態では、タグはまた、米国特許第８，９９９，８９７号；第８，３５７，５１１号；第７，０９４，５６８号；第５，０１１，９１２号；第４，８５１，３４１号；及び第４，７０３，００４号；米国特許出願公開第ＵＳ２０１３１１５６３５号及び第ＵＳ２０１３０１２６８７号；及び国際出願公開第ＷＯ２０１３０９１６６１号に開示されているものから選択してもよく、その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２４６】

いくつかの態様では、同じまたは異なるタグのいずれかである多数のタンパク質タグを使用してもよく、各タグを同じＮ末端またはＣ末端に配置してもよく、一方、他の場合ではこれらのタグを各末端に配置してもよい。

【０２４７】

一実施形態では、タンパク質タグはＨＡタグである。ＨＡタグの非限定的な例は、ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ（配列番号８５３、８６７、及び／または８６８によりコードされる配列番号８５２）である。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、本発明のタンパク質タグには、限定されないが、２０１６年４月１１日に出願された同時係属中の共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号の表８、または２０１７年３月３日に出願された米国仮出願第６２／４６６，５９６号及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示されるタグのいずれかが含まれ、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２４９】

ターゲティングペプチド

いくつかの実施形態では、本発明のエフェクターモジュールは、ターゲティング及び／または透過性ペプチドをさらに含み得る。細胞表面マーカー（例えば、受容体、膜貫通タンパク質、細胞外マトリックス分子）を選択的に認識する低分子ターゲティングペプチド及び／または浸透性ペプチドを使用して、エフェクターモジュールを所望の器官、組織、または細胞に標的化することができる。エフェクターモジュールを所望の器官、組織及び細胞、及び／または細胞内の位置にホーミングするために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで合成した短いペプチド（５～５０アミノ酸残基）及び天然ペプチド、またはその類似体、バリアント、誘導体をエフェクターモジュールに組み込んでもよい。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、ターゲティング配列及び／または透過性ペプチドをエフェクターモジュールに含ませて、エフェクターモジュールを標的器官、または組織、または細胞（例えば、がん細胞）へ駆動してもよい。他の実施形態では、ターゲティングペプチド及び／または透過性ペプチドは、細胞内の特定の細胞内位置にエフェクターモジュールを向かわせ得る。

【０２５１】

ターゲティングペプチドは、約６～約３０の任意の数のアミノ酸を有する。ペプチドは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２

０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０個のアミノ酸を有し得る。一般的に、ターゲティングペプチドは、２５個以下のアミノ酸、例えば２０個以下、例えば１５個以下のアミノ酸を有し得る。

【０２５２】

例示的なターゲティングペプチドには、限定されないが、当技術分野で開示されているもの、例えば、米国特許第９，２０６，２３１号；第９，１１０，０５９号；第８，７０６，２１９号；及び第８，７７２，４４９号；ならびに米国出願公開第２０１６０８９４４７号；第２０１６０６０２９６号；第２０１６０６０３１４号；第２０１６０６０３１２号；第２０１６０６０３１１号；第２０１６００９７７２号；第２０１６００２６１３号；第２０１５３１４０１１号及び第２０１５１６６６２１号；ならびに国際出願公開第ＷＯ２０１５１７９６９１号及び第ＷＯ２０１５１８３０４４号で開示されているものを含み得るが、その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２５３】

いくつかの実施形態では、本発明のターゲティングペプチドには、限定されないが、２０１６年４月１１日に出願された同時係属中の共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号の表９に示されるもののいずれかが含まれ、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２５４】

リンカー

いくつかの実施形態では、本発明のエフェクターモジュールは、リンカー配列をさらに含み得る。リンカー領域は、主にエフェクターモジュール内の２つ以上のポリペプチド間のスペーサーとして機能する。本明細書中で使用する場合、「リンカー」または「スペーサー」とは、２つの分子、または分子の２つの部分、例えば、組換えタンパク質の２つのドメインを接続する分子または分子群を指す。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、本明細書中で使用する「リンカー」（Ｌ）または「リンカードメイン」または「リンカー領域」または「リンカーモジュール」または「ペプチドリンカー」とは、エフェクターモジュールのドメイン／領域のいずれかを連結する約１～１００アミノ酸長のオリゴまたはポリペプチド領域を指す（ペプチドリンカーとも呼ばれる）。ペプチドリンカーは、１～４０アミノ酸長、２～３０アミノ酸長、または２０～８０アミノ酸長、または５０～１００アミノ酸長であってもよい。リンカーの長さは、利用するペイロードの種類とペイロードの結晶構造に基づいて最適化してもよい。いくつかの例では、好ましくはより短いリンカーを選択してもよい。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは、ペプチド結合によって一緒に結合したアミノ酸、好ましくはペプチド結合によって結合した１～２０個のアミノ酸で構成され、アミノ酸は２０種の天然アミノ酸から選択される：グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、バリン（Ｖ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、セリン（Ｓ）、システイン（Ｃ）、トレオニン（Ｔ）、メチオニン（Ｍ）、プロリン（Ｐ）、フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）、ヒスチジン（Ｈ）、リジン（Ｋ）、アルギニン（Ｒ）、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、及びグルタミン（Ｑ）。当業者であれば理解しているように、これらのアミノ酸の１つ以上はグリコシル化されていてもよい。いくつかの態様では、ペプチドリンカーのアミノ酸は、アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）、プロリン（Ｐ）、アスパラギン（Ｒ）、セリン（Ｓ）、グルタミン（Ｑ）及びリジン（Ｋ）から選択してもよい。

【０２５６】

一実施例では、人工的に設計したペプチドリンカーは、好ましくは、隣接するタンパク質ドメインが互いに対して自由に移動できるように、グリシン（Ｇ）及びセリン（Ｓ）のような可撓性の残基のポリマーからなる。２つの隣接するドメインが互いに干渉しないようにすることが望ましい場合は、より長いリンカーを使用してもよい。特定のリンカー配列の選択は、融合コンストラクトの生物学的活性、安定性、フォールディング、ターゲテ

ィング、及び／または薬物動態学的特性に影響を与えるかどうかに関係する場合がある。ペプチドリンカーの例として：ＭＨ、ＳＧ、ＧＧＳＧ（配列番号１４５；配列番号１４６のヌクレオチド配列によってコードされる）、ＧＧＳＧＧ（配列番号１４７；配列番号１４８～１５２のヌクレオチド配列のいずれかによってコードされる）、ＧＧＳＧＧＧ（配列番号１５３；配列番号１５４～１５５のヌクレオチド配列のいずれかによってコードされる）、ＳＧＧＧＳ（配列番号６８；配列番号８５、６９、８６のヌクレオチド配列によってコードされる）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧ（配列番号１５６；配列番号１５７のヌクレオチド配列によってコードされる）、ＧＧＧＧＧ（配列番号１５８）、ＧＧＧＧＳ（配列番号１５９）または（ＧＧＧＧＳ）ｎ（ｎ＝１（配列番号１５９）、２（配列番号１６０）、３（配列番号１６１、配列番号１７４、１７５、１７１、２１９、７７４、８３７のヌクレオチド配列によってコードされる）、４（配列番号１６２）、５（配列番号１６３）、または６（配列番号１６４））、ＳＳＳＳＧ（配列番号１６５）または（ＳＳＳＳＧ）ｎ（ｎ＝１（配列番号１６５）、２（配列番号１６６）、３（配列番号１６７）、４（配列番号１６８）、５（配列番号１６９）、または６（配列番号１７０））、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＳＬＱ（配列番号１７１；配列番号１７２、８３８～８４３のヌクレオチド配列によってコードされる）、ＥＦＳＴＥＦ（配列番号５０；配列番号５７、１７３のヌクレオチド配列によってコードされる）、ＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳ（配列番号１７６）、ＧＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＫＧ（配列番号１７７）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＳＥＧＳＧＳＴＫＧ（配列番号１７８）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＧＥＧＳＴＫＧ（配列番号１７９）、ＶＤＹＰＹＤＶＰＤＹＡＬＤ（配列番号６７；配列番号８４のヌクレオチド配列によってコードされる）、ＥＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＥＦ（配列番号１８０）、ＳＧ３－（ＳＧ４）３－ＳＧ３－ＳＬＱ－ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ（配列番号７８７）、配列番号７８８のヌクレオチド配列によりコードされる；配列番号７９０のヌクレオチド配列によってコードされるＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号７８９）；配列番号７９２によってコードされるＳＧ３－（ＳＧ４）５－ＳＧ３－Ｓ（配列番号７９１）；配列番号７９４によってコードされるＳＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＹＰＹＤＶＰＤＹＡＳＧＧＧＳ（配列番号７９３）；配列番号７９６によってコードされるＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号７９５）；配列番号８４５のヌクレオチド配列によってコードされるＳＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号８４４）、配列番号９０９によってコードされるＱＬＩＧＭＬＱＧＬＭＲＤＬ（配列番号９０８）；配列番号９２１によってコードされるＡＳＦＥ（配列番号９２０）；ＧＳ（ＧＧＴＴＣＣによってコードされる）、ＳＧ（ＡＧＣＧＧＣによってコードされる）、ＥＦ（ＧＡＧＴＴＣによってコードされる）、ＴＳ（ＡＣＴＡＧＴによってコードされる）、ＨＭ（ＣＡＣＡＴＧによってコードされる）、ＭＨ（ＡＴＧＣＡＣによってコードされる）あるいはＧＳＧ（ＧＧＡＴＣＣＧＧＡまたはＧＧＡＴＣＣＧＧＴによってコードされる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５７】

他の例では、ペプチドリンカーは、グリシン（Ｇ）及びアラニン（Ａ）などの立体障害のない大多数のアミノ酸で構成されていてもよい。例示的なリンカーは、ポリグリシン（（Ｇ）４（配列番号９２９）、（Ｇ）５（配列番号９３０）、（Ｇ）８（配列番号９３１）など）、ポリ（ＧＡ）、及びポリアラニンである。本明細書に記載するリンカーは例示であり、これよりはるかに長く、他の残基を含むリンカーが、本発明によって意図される。

【０２５８】

リンカー配列は、マルチドメインタンパク質に由来する天然リンカーであってもよい。天然リンカーは、タンパク質内の２つの異なるドメインまたはモチーフを分離する短いペプチド配列である。

【０２５９】

いくつかの態様では、リンカーは、可撓性であっても剛性であってもよい。他の態様では、リンカーは切断可能であっても非切断可能であってもよい。本明細書中で使用する場

合、用語「切断可能なリンカードメインもしくは領域」または「切断可能なペプチドリンカー」は同じ意味で用いられる。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、酵素的及び／または化学的に切断してもよい。ペプチドリンカーの切断に有用な酵素（例えば、プロテイナーゼ／ペプチダーゼ）の例として、Ａｒｇ－Ｃプロテイナーゼ、Ａｓｐ－Ｎエンドペプチダーゼ、キモトリプシン、クロストリパイン、エンテロキナーゼ、第Ｘａ因子、グルタミルエンドペプチダーゼ、グランザイムＢ、アクロモバクタープロテイナーゼＩ、ペプシン、プロリンエンドペプチダーゼ、プロテイナーゼＫ、ＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃａｌペプチダーゼＩ、サーモリシン、トロンビン、トリプシン、及びタンパク質分解酵素のカスパーゼファミリーのメンバー（例えば、カスパーゼ１～１０）が挙げられるが、これらに限定されない。化学物質感受性切断部位もリンカー配列に含まれ得る。化学的切断試薬の例として、メチオニン残基を切断する臭化シアン；トリプトファン残基を切断するＮ－クロロスクシンイミド、ヨード安息香酸またはＢＮＰＳ－スカトール（２－（２－ニトロフェニルスルフェニル）－３－メチルインドール）；アスパルチル－プロリル結合において切断する希酸；及びアスパラギン酸－プロリン酸切断可能認識部位（すなわち、１つ以上のＤ－Ｐジペプチド部分を含む切断可能ペプチドリンカー）が挙げられるが、これらに限定されない。融合モジュールは、１つ以上の切断可能なペプチドリンカーにより分離された目的ペプチドをコードする複数の領域を含み得る。

【０２６０】

他の実施形態では、切断可能なリンカーは、「自己切断」リンカーペプチド、例えば、２Ａリンカー（例えばＴ２Ａ）、２Ａ様リンカーまたはその機能的等価物及びそれらの組み合わせなどであってもよい。いくつかの実施形態では、リンカーには、ピコルナウイルス２Ａ様リンカー、ブタテスコウイルス（Ｐ２Ａ）、Ｔｈｏｓｅａ ａｓｉｇｎａウイルス（Ｔ２Ａ）のＣＨＹＳＥＬ配列またはそれらの組み合わせ、バリアント及び機能的等価物が含まれる。他のリンカーは当業者には明らかであり、本発明の代替実施形態に関連して使用してもよい。

【０２６１】

いくつかの実施形態では、本発明の生体回路は２Ａペプチドを含み得る。２Ａペプチドは、細胞に内在するプロテアーゼ（２Ａペプチダーゼ）によって認識されるウイルス由来の約２０アミノ酸残基の配列である。２Ａペプチドはピコルナウイルスの間で同定され、その典型例は口蹄疫ウイルスである（Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ ＢＨ，ｅｔ．ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ １９８５，５４：６５１－６６０）。２Ａ様配列は、ウマ鼻炎Ａウイルスのようなピコルナウイルス科、ならびにブタテスコウイルス－１及び昆虫のＴｈｏｓｅａ ａｓｉｇｎａウイルス（ＴａＶ）などの無関係なウイルスにも見出されている。そのようなウイルスでは、複数のタンパク質が、オープンリーディングフレームによってコードされた大きなポリタンパク質に由来する。２Ａペプチドは、ウイルスキャプシドと複製ポリタンパク質ドメイン間の接合部を形成する単一部位において、このポリタンパク質の同時翻訳切断を仲介する。２Ａ配列は、コンセンサスモチーフＤ－Ｖ／Ｉ－Ｅ－Ｘ－Ｎ－Ｐ－Ｇ－Ｐ（配列番号９３２）を含む。これらの配列は同時翻訳的に作用し、グリシンと最後のプロリンとの間の正常なペプチド結合の形成を妨げ、後続コドンのリボソームスキッピングをもたらすと考えられている（Ｄｏｎｎｅｌｌｙ ＭＬ ｅｔ ａｌ．（２００１）．Ｊ Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ，８２：１０１３－１０２５）。切断後、短いペプチドは切断部位の上流のタンパク質のＣ末端に融合したままであり、一方、プロリンは切断部位の下流のタンパク質のＮ末端に付加される。これまでに同定された２Ａペプチドのうち、４つ、すなわちＦＭＤＶ ２Ａ（本明細書中ではＦ２Ａと略す）、ウマ鼻炎ウイルス（ＥＲＡＶ）２Ａ（Ｅ２Ａ）；ブタテスコウイルス－１ ２Ａ（Ｐ２Ａ）及びＴｈｏｓｅａａｓｉｇｎａウイルス２Ａ（Ｔ２Ａ）が広く使用されている。いくつかの実施形態では、本発明において有用な２Ａペプチド配列は、国際特許公開ＷＯ２０１００４２４９０の配列番号８～１１から選択され、その内容はその全体を参照により援用する。

【０２６２】

本発明のリンカーは、非ペプチドリンカーであってもよい。例えば、－ＮＨ－（CH_2

）ａ－Ｃ（Ｏ）－（式中、ａ＝２～２０）などのアルキルリンカーを使用することができる。これらのアルキルリンカーは、低級アルキル（例えば、$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$）、低級アシル、ハロゲン（例えば、Ｃｌ、Ｂｒ）、ＣＮ、$ＮＨ_{2}$、フェニルなどの立体障害のないいずれかの基でさらに置換してもよい。

【０２６３】

いくつかの態様では、リンカーは、米国特許第４，９４６，７７８号；第５，５２５，４９１号；第５，８５６，４５６号；及び国際特許公開第ＷＯ２０１２／０８３４２４号の人工リンカーであってもよく；その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーには、限定されないが、２０１６年４月１１日に出願された同時係属の共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号の表１１、または２０１７年３月３日に出願された米国仮出願第６２／４６６，５９６号及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示されているもののいずれかが含まれ、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、任意のプロテアソームアダプターを含み得る。本明細書中で使用する場合、用語「プロテアソームアダプター」とは、分解するために、付加されたペイロードを標的とする任意のヌクレオチド／アミノ酸配列を指す。いくつかの態様では、アダプターは、分解するためにペイロードを直接標的とし、それによりユビキチン化反応の必要性を回避する。プロテアソームアダプターを不安定化ドメインと組み合わせて使用して、ペイロードの基底発現を低下させてもよい。例示的なプロテアソームアダプターとして、Ｒａｄ２３またはｈＨＲ２３ｂのＵｂＬドメイン、標的タンパク質ＲｂとプロテアソームのＳ４サブユニットの両方に高親和性で結合し、直接的なプロテアソーム標的化を可能にし、ユビキチン化機構をバイパスするＨＰＶ　Ｅ７；Ｒｂ及びプロテアソームサブユニットＳ６に結合するタンパク質ガンキリンが挙げられる。

【０２６６】

一実施形態では、リンカーは、１つ以上のヌクレオチドのスペーサー領域であってもよい。スペーサーの非限定例は、ＴＣＴＡＧＡＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＧＡＧＡＴＣＣ（配列番号８４６）、ＴＡＴＧＧＣＣＡＣＡＡＣＣＡＴＧ（配列番号８４７）、ＡＡＴＣＴＡＧＡＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＧＡＧＡＴＣＣ（配列番号８４８）、ＴＣＧＣＧＡＡＴＧ、ＴＣＧＣＧＡ、ＧＣＴＴＧＣＣＡＣＡＡＣＣＣＡＣＡＡＧＧＡＧＡＣＧＡＣＣＴＴＣＣ（配列番号８４９）、またはＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号８５１によりコードされる配列番号８５０）である。

【０２６７】

一実施形態では、リンカーはＢａｍＨＩ部位であってもよい。非限定的な例として、ＢａｍＨＩ部位はアミノ酸配列ＧＳ及び／またはＤＮＡ配列ＧＧＡＴＣＣを有する。

【０２６８】

埋め込み刺激、シグナル、及びその他の調節特性

いくつかの実施形態では、本発明のエフェクターモジュールは、１つ以上のマイクロＲＮＡ、マイクロＲＮＡ結合部位、プロモーター及び調整可能なエレメントをさらに含み得る。一実施形態では、調整可能な生体回路の作成を支援するためにマイクロＲＮＡを使用してもよい。各態様または調整されたモダリティは、エフェクターモジュールまたは生体回路に差次的に調整された特性をもたらし得る。例えば、不安定化ドメインは、ペイロードの切断部位または二量体化特性または半減期を変化させる場合があり、１つ以上のマイクロＲＮＡまたはマイクロＲＮＡ結合部位を含めることにより、細胞の脱ターゲティングまたは輸送特性が付与され得る。結果として、本発明は、その持続可能性において多因子的である生体回路を包含する。そのような生体回路及びエフェクターモジュールは、１つ、２つ、３つ、４つ、またはそれ以上の調整された特性を含むように設計してもよい。いくつかの実施形態では、本発明のマイクロＲＮＡ配列には、限定されないが、２０１６年

４月１１日に出願された同時係属中の共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号の表１３、または２０１７年3月3日に提出された米国仮出願第６２／４６６，５９６号及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示される配列のいずれかが含まれ、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２６９】

ポリヌクレオチド

用語「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」には、その最も広い意味で、ヌクレオチドのポリマー、例えば連結ヌクレオシドを含む任意の化合物及び／または物質が含まれる。これらのポリマーはしばしばポリヌクレオチドと呼ばれる。本発明の例示的な核酸またはポリヌクレオチドには、リボ核酸（ＲＮＡ）、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、トレオース核酸（ＴＮＡ）、グリコール核酸（ＧＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックド核酸（ＬＮＡ、β－Ｄ－リボ配置を有するＬＮＡ、α－Ｌ－リボ配置を有するα－ＬＮＡ（ＬＮＡのジアステレオマー）、２’－アミノ官能化を有する２’－アミノ－ＬＮＡ、及び２’－アミノ官能化を有する２’－アミノ－α－ＬＮＡ）またはそのハイブリッドが含まれるが、これらに限定されない。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）または任意の核酸分子であってもよく、化学的に修飾されていてもされていなくてもよい。一態様では、核酸分子はｍＲＮＡである。本明細書中で使用する場合、用語「メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）」とは、目的ポリペプチドをコードし、翻訳されてｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｉｎ ｖｉｖｏ、ｉｎ ｓｉｔｕまたはｅｘ ｖｉｖｏでコードされた目的ポリペプチドを産生することができる任意のポリヌクレオチドを指す。

【０２７１】

伝統的に、ｍＲＮＡ分子の基本構成要素には、少なくともコード領域、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、５’キャップ、及びポリＡテールが含まれる。この野生型モジュラー構造に基づいて、本発明は、モジュラー構成を維持するが、ポリヌクレオチドに有用な特性、例えば機能の持続性を付与する１つ以上の構造的及び／または化学的修飾または変更を含むペイロード構築物を提供することにより、従来のｍＲＮＡ分子の機能性の範囲を拡大する。本明細書中で使用する場合、「構造的」特性または改変とは、ヌクレオシド自体への有意な化学修飾を伴わずにポリヌクレオチドに２残基以上の連結ヌクレオシドを挿入、削除、複製、反転またはランダム化する特性または改変である。必然的に化学結合を破壊し、再構成して構造を改変するため、構造的改変は化学的な性質のものであり、したがって化学修飾である。しかしながら、構造的改変により、異なるヌクレオチド配列が得られる。例えば、ポリヌクレオチド「ＡＴＣＧ」は「Ａ Ｔ－５ｍｅＣ－Ｇ」に化学修飾され得る。同じポリヌクレオチドは「ＡＴＣＧ」から「ＡＴＣＣＣＧ」に構造的に改変され得る。この場合、ジヌクレオチド「ＣＣ」が挿入されており、ポリヌクレオチドに構造的改変が生じている。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、翻訳開始に役割を果たす５’ＵＴＲ配列を保有し得る。５’ＵＴＲ配列には、リボソームが遺伝子の翻訳を開始するプロセスに関与することが一般的に知られているコザック配列などの特徴が含まれる場合があり、コザック配列はコンセンサスＸＣＣＲ（Ａ／Ｇ）ＣＣＡＵＧを有し、式中、開始コドン（ＡＵＧ）の３塩基上流のＲはプリン（アデニンまたはグアニン）であり、Ｘは任意のヌクレオチドである。一実施形態では、コザック配列はＡＣＣＧＣＣである。標的細胞または組織の豊富に発現する遺伝子に一般的に認められる特徴を改変することにより、本発明のポリヌクレオチドの安定性及びタンパク質産生を増強することができる。

【０２７３】

さらに、ポリヌクレオチドに５’キャップ構造が存在しない場合にタンパク質合成を開始するのに重要な役割を果たす内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含み得るポリヌクレオチドを提供する。ＩＲＥＳは、唯一のリボソーム結合部位として機能し得るか、また

は複数の結合部位の１つとして機能し得る。２つ以上の機能的リボソーム結合部位を含む本発明のポリヌクレオチドは、リボソームによって独立して翻訳され、２シストロン性及び／またはマルチシストロン性核酸分子を生じるいくつかのペプチドまたはポリペプチドをコードし得る。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、生体回路、エフェクターモジュール、ＳＲＥ、及び目的ペイロード、例えば免疫療法薬をコードするポリヌクレオチドは、約３０～約１００，０００ヌクレオチド（例えば、３０～５０、３０～１００、３０～２５０、３０～５００、３０～１，０００、３０～１，５００、３０～３，０００、３０～５，０００、３０～７，０００、３０～１０，０００、３０～２５，０００、３０～５０，０００、３０～７０，０００、１００～２５０、１００～５００、１００～１，０００、１００～１，５００、１００～３，０００、１００～５，０００、１００～７，０００、１００～１０，０００、１００～２５，０００、１００～５０，０００、１００～７０，０００、１００～１００，０００、５００～１，０００、５００～１，５００、５００～２，０００、５００～３，０００、５００～５，０００、５００～７，０００、５００～１０，０００、５００～２５，０００、５００～５０，０００、５００～７０，０００、５００～１００，０００、１，０００～１，５００、１，０００～２，０００、１，０００～３，０００、１，０００～５，０００、１，０００～７，０００、１，０００～１０，０００、１，０００～２５，０００、１，０００～５０，０００、１，０００～７０，０００、１，０００～１００，０００、１，５００～３，０００、１，５００～５，０００、１，５００～７，０００、１，５００～１０，０００、１，５００～２５，０００、１，５００～５０，０００、１，５００～７０，０００、１，５００～１００，０００、２，０００～３，０００、２，０００～５，０００、２，０００～７，０００、２，０００～１０，０００、２，０００～２５，０００、２，０００～５０，０００、２，０００～７０，０００、及び２，０００～１００，０００ヌクレオチド）を含み得る。いくつかの態様では、本発明のポリヌクレオチドは１０，０００残基を上回るヌクレオチドを含み得る。

【０２７５】

特定の特徴、例えば、切断部位、リンカー、輸送シグナル、タグまたは他の特徴をコードするポリヌクレオチドの領域は、独立して１０～１，０００ヌクレオチド長（例えば、２０、３０、４０、４５、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、及び９００ヌクレオチド超、または少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、及び１，０００ヌクレオチド）の範囲であってもよい。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、核酸分子の３’ＵＴＲ内にマイクロＲＮＡ結合部位などの埋め込み調節部分をさらに含む場合があり、その調節部分は、マイクロＲＮＡ分子への結合時に核酸分子の安定性を低下させることにより、または翻訳を阻害することにより、遺伝子発現を下方制御する。逆に、本発明のポリヌクレオチドの目的のために、マイクロＲＮＡ結合部位を、特定の組織でのタンパク質発現を増加させるために、それらの天然の配列から改変（すなわち除去）することができる。例えば、ｍｉＲ－１４２及びｍｉＲ－１４６結合部位を除去して、免疫細胞でのタンパク質発現を向上させてもよい。いくつかの実施形態では、コードされたペイロードのいずれかをＳＲＥによって調節し、その後、１つ以上の調節配列と組み合わせて、デュアルまたはマルチ調整エフェクターモジュールまたは生体回路系を生成してもよい。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの断片、バリアント、誘導体をコードし得る。いくつかの態様では、バリアントの配列は、同じ

または類似の活性を保持し得る。あるいは、バリアントは、開始配列に対して変化した（例えば、増加または減少した）活性を有し得る。一般的に、本発明の特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのバリアントは、本明細書に記載された、当業者に公知の配列アラインメントプログラム及びパラメーターによって決定したように、特定の参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対して、少なくとも約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、ただし１００％未満の配列同一性を有する。そのようなアラインメント用ツールには、ＢＬＡＳＴスイートのツールが含まれる（Ｓｔｅｐｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ ａｎｄ ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ：ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂａｓｅ ｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｇｒａｍｓ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１９９７，２５：３３８９－３４０２）。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドを改変してもよい。本明細書中で使用する場合、用語「修飾された」、または適切な場合、「修飾」とは、Ａ、Ｇ、Ｕ（ＤＮＡ中のＴ）またはＣヌクレオチドに対する化学修飾を指す。修飾は、ポリヌクレオチドに含まれるヌクレオシド塩基及び／またはヌクレオシドの糖部分上にあってもよい。いくつかの実施形態では、修飾する核酸または１つ以上の個々のヌクレオシドもしくはヌクレオチドに、複数の修飾が含まれる。例えば、ヌクレオシドへの修飾には、核酸塩基及び糖への１つ以上の修飾が含まれ得る。本発明のポリヌクレオチドへの修飾は、例えば、国際公開第ＷＯ２０１３０５２５２３号に示されている修飾のいずれかを含んでもよく、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２７９】

本明細書中に記載する場合の「ヌクレオシド」とは、有機塩基（例えば、プリンまたはピリミジン）またはその誘導体と組み合わせた糖分子（例えば、ペントースまたはリボース）またはその誘導体を含む化合物として定義される（本明細書中では「核酸塩基」とも呼ばれる）。本明細書中に記載する場合、「ヌクレオチド」とは、リン酸基を含むヌクレオシドとして定義される。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、修飾はヌクレオシド間結合上（例えば、リン酸骨格）にあってもよい。本明細書において、ポリヌクレオチド骨格に関して、語句「リン酸」及び「ホスホジエステル」は、同じ意味で使用される。骨格リン酸基は、１つ以上の酸素原子を別の置換基で置き換えることにより修飾することができる。さらに、修飾ヌクレオシド及びヌクレオチドには、別のヌクレオシド間結合による非修飾リン酸部分の大規模な置換が含まれ得る。修飾リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、及びホスホトリエステルが含まれるが、これらに限定されない。ホスホロジチオエートは、両方の非結合酸素が硫黄に置き換わっている。リン酸リンカーは、結合酸素を窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、及び炭素（架橋メチレン－ホスホネート）に置き換えることにより修飾することもできる。使用してもよい他の修飾は、例えば、国際出願第ＷＯ２０１３０５２５２３号に示されており、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０２８１】

本発明において有用な本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチドまたは核酸塩基の化学修飾及び／または置換として、当技術分野で公知の任意の修飾置換、例えば、（±）１－（２－ヒドロキシプロピル）プソイドウリジンＴＰ、（２Ｒ）－１－（２－ヒドロキシプロピル）プソイドウリジンＴＰ、１－（４－メトキシ－フェニル）プソイド－ＵＴＰ、、２’－Ｏ－ジメチルアデノシン、１，２’－Ｏ－ジメチルグアノシン、１，２’－Ｏ－ジメチルイノシン、１－ヘキシル－プソイド－ＵＴＰ、１－ホモアリルプソイドウリジンＴ

Ｐ、１－ヒドロキシメチルプソイドウリジンＴＰ、１－イソ－プロピル－プソイド－ＵＴＰ、１－Ｍｅ－２－チオ－プソイド－ＵＴＰ、１－Ｍｅ－４－チオ－プソイド－ＵＴＰ、１－Ｍｅ－α－チオ－プソイド－ＵＴＰ、１－Ｍｅ－ＧＴＰ、２’－アミノ－２’－デオキシ－ＡＴＰ、２’－アミノ－２’－デオキシ－ＣＴＰ、２’－アミノ－２’－デオキシ－ＧＴＰ、２’－アミノ－２’－デオキシ－ＵＴＰ、２’－アジド－２’－デオキシ－ＡＴＰ、ツベルシジン、不完全修飾型ヒドロキシワイブトシン、ウリジン５－オキシ酢酸、ウリジン５－オキシ酢酸メチルエステル、ワイブトシン、ワイオシン、キサンチン、キサントシン－５’－ＴＰ、キシロアデノシン、ゼブラリン、α－チオ－アデノシン、α－チオ－シチジン、α－チオ－グアノシン、及び／またはα－チオ－ウリジンが挙げられる。

【０２８２】

本発明のポリヌクレオチドは、本明細書中に示される１つ以上の修飾を含み得る。異なる糖修飾、塩基修飾、ヌクレオチド修飾、及び／またはヌクレオシド間結合（例えば、骨格構造）を、本発明のポリヌクレオチドの様々な位置に存在させてもよい。当業者は、ポリヌクレオチドの機能が実質的に低下しないように、ヌクレオチド類似体または他の修飾（複数可）をポリヌクレオチドの任意の位置（複数可）に配置してもよいことを理解するであろう。修飾は、５’または３’末端修飾であってもよい。ポリヌクレオチドは、約１％～約１００％（全体的なヌクレオチド含量に関して、またはヌクレオチドの１つ以上のタイプ、すなわちＡ、Ｇ、ＵまたはＣのいずれか１つ以上に関して）または任意の中間的な割合（例えば、１％～２０％、１％～２５％、１％～５０％、１％～６０％、１％～７０％、１％～８０％、１％～９０％、１％～９５％、１０％～２０％、１０％～２５％、１０％～５０％、１０％～６０％、１０％～７０％、１０％～８０％、１０％～９０％、１０％～９５％、１０％～１００％、２０％～２５％、２０％～５０％、２０％～６０％、２０％～７０％、２０％～８０％、２０％～９０％、２０％～９５％、２０％～１００％、５０％～６０％、５０％～７０％、５０％～８０％、５０％～９０％、５０％～９５％、５０％～１００％、７０％～８０％、７０％～９０％、７０％～９５％、７０％～１００％、８０％～９０％、８０％～９５％、８０％～１００％、９０％～９５％、９０％～１００％、及び９５％～１００％）の修飾ヌクレオチドを含み得る。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドの１つ以上のコドンを、コドン選択と呼ばれるプロセスを通じて、天然アミノ酸配列をコードする他のコドンに置き換えてＳＲＥの発現を調整してもよい。ｍＲＮＡコドン及びｔＲＮＡアンチコドンプールは、生物、細胞型、細胞内位置、及び経時的に異なる傾向があるため、本明細書に記載のコドン選択は時空間的（ＳＴ）コドン選択である。

【０２８４】

本発明のいくつかの実施形態では、特定のポリヌクレオチドの特徴をコドン最適化してもよい。コドン最適化とは、宿主細胞内での発現を強化するために、天然のアミノ酸配列を維持する一方で、天然配列の少なくとも１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０以上のコドンを、その宿主細胞の遺伝子において最も頻繁に使用されるコドンで置き換えることにより、核酸配列を改変するプロセスを指す。コドン使用量は、参照遺伝子セットからのコーディングポリヌクレオチド配列の偏差を測定するコドン適応指数（ＣＡＩ）を使用して測定してもよい。コドン使用表は、Ｃｏｄｏｎ　Ｕｓａｇｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ（http://www.kazusa.or.jp/codon/）で入手でき、ＣＡＩはＥＭＢＯＳＳ　ＣＡＩプログラム（http://emboss.sourceforge.net/）で計算することができる。コドン最適化方法は、当技術分野で公知であり、いくつかの目標のうちの１つ以上を達成する試みにおいて有用であり得る。これらの目標には、標的生物と宿主生物のコドン頻度を一致させて適切なフォールディングを確保し、ヌクレオチド含量にバイアスをかけて安定性を変更するか、または二次構造を低減し、遺伝子構築や遺伝子発現を損なう可能性のあるタンデムリピートコドンや塩基ランを最小化し、転写及び翻訳制御領域をカスタマイズし、タンパク質シグナル配列を挿入または除去し、コードされたタンパク質の翻訳後修飾部位（例えば、グリコシル化部位）を除去／追加し、タンパク質ドメインを追加、除去またはシャッ

フルし、制限酵素部位を挿入または削除し、リボソーム結合部位及び分解部位を改変し、翻訳速度を調整してタンパク質の様々なドメインを適切に折り畳ませるか、またはポリヌクレオチド内の問題のある二次構造を低減または排除することを可能とすることが含まれる。コドン最適化ツール、アルゴリズム、及びサービスは、当技術分野で公知であり、非限定的な例として、ＧｅｎｅＡｒｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ ＣＡ）、ＯｐｔｉｍｕｍＧｅｎｅ（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）、限定されないがＤＮＡＷｏｒｋｓ ｖ３．２．３，Ｍｒ．Ｇｅｎｅ（ＧｍＢＨ，Ｒｅｇｅｎｓｂｕｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）などのアルゴリズム、及び／または特許された方法が挙げられる。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列またはその一部を、最適化アルゴリズムを使用してコドン最適化する。各アミノ酸のコドンの選択肢は、その特定の種での発現を最適化するための様々な種の表と同様に、当技術分野で周知である。

【０２８５】

本発明のいくつかの実施形態では、特定のポリヌクレオチドの特徴をコドン最適化してもよい。例えば、コドン最適化のための好ましい領域は、ポリペプチドをコードする領域の上流（５’）または下流（３’）であってもよい。これらの領域は、ペイロードをコードする領域またはオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）のコドン最適化の前及び／または後に、ポリヌクレオチドに組み込んでもよい。

【０２８６】

最適化（所望の場合）の後、ポリヌクレオチドの構成要素を再構成し、プラスミド、ウイルス、コスミド、及び人工染色体を含むがこれらに限定されないベクターに変換する。

【０２８７】

コドン組成がｍＲＮＡ種の翻訳速度及びその安定性を決定するため、時空間的コドン選択は、本発明のポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼし得る。例えば、最適化したコドンに対するｔＲＮＡアンチコドンは豊富に存在し、したがって翻訳が強化され得る。対照的に、あまり一般的でないコドンに対するｔＲＮＡアンチコドンは少量であり、したがって翻訳はより遅い速度で進行する可能性がある。Ｐｒｅｓｎｙａｋらにより、ｍＲＮＡ種の安定性はコドンの内容に依存し、最適化したコドンを利用することにより、より高い安定性、したがってより高いタンパク質発現を達成し得ることが示されている（Ｐｒｅｓｎｙａｋ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ １６０，１１１１－１１２４；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。したがって、いくつかの実施形態では、ＳＴコドン選択は、最適化されたコドンの選択を含み、本発明のＳＲＥＳ、エフェクターモジュール、及び生体回路の発現を強化し得る。他の実施形態では、時空間的コドン選択は、宿主細胞の遺伝子においてあまり一般的に使用されず、本発明の組成物の発現を低下させるコドンの選択を含み得る。宿主細胞の遺伝子であまり一般的に使用されないコドンに対する最適化コドンの比率も、発現を調整するために変化させてもよい。

【０２８８】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの特定の領域は、コドン選択に好ましい場合がある。例えば、コドン選択のための好ましい領域は、ポリペプチドをコードする領域の上流（５’）または下流（３’）であってもよい。これらの領域は、ペイロードをコードする領域またはオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）のコドン選択の前及び／または後に、ポリヌクレオチドに組み込んでもよい。

【０２８９】

本発明のポリヌクレオチドの終止コドンは、本発明のＳＲＥ、ペイロード及びエフェクターモジュールの発現レベルを変更するための配列及びモチーフを含むように改変してもよい。そのような配列は、終止コドンリードスルーを誘導するために組み込んでもよく、終止コドンはアミノ酸を、例えば、セレノシステインまたはピロリジンに特定する場合がある。他の例では、終止コドンを完全にスキップさせて、代替のオープンリーディングフレームを介して翻訳を再開する場合がある。終止コドンのリードスルーを利用して、特定の比率（例えば、終止コドンの前後関係によって規定されるような）でエフェクターモジ

ュールの構成要素の発現を調整してもよい。好ましい終止コドンモチーフの例として、ＵＧＡＮ、ＵＡＡＮ、及びＵＡＧＮが挙げられ、ＮはＣまたはＵのいずれかである。ポリヌクレオチドの改変及び操作は、限定されないが、部位特異的変異誘発及び組換え技術などの当技術分野で公知の方法によって達成することができる。次いで、得られた改変分子を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏもしくはｉｎ　ｖｉｖｏアッセイ、例えば、本明細書に記載するアッセイまたは当技術分野で公知の任意の他の適切なスクリーニングアッセイを使用して、活性について試験してもよい。

【０２９０】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、１回、２回、または３回超繰り返される、ＡＢＡＢＡＢもしくはＡＡＢＢＡＡＢＢＡＡＢＢもしくはＡＢＣＡＢＣＡＢＣまたはそのバリアントなどのパターンである２つ以上のエフェクターモジュール配列、または２つ以上の目的ペイロード配列を含み得る。これらのパターンでは、Ａ、Ｂ、またはＣの各文字は、異なるエフェクターモジュール構成要素を表す。

【０２９１】

さらに別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、各構成要素が、１つ以上のＳＲＥ配列（ＤＤ配列）、または２つ以上のペイロード配列を有する２つ以上のエフェクターモジュール構成要素の配列を含み得る。非限定的な例として、配列は、各領域で１回、２回、または３回超繰り返される、ＡＢＡＢＡＢもしくはＡＡＢＢＡＡＢＢＡＡＢＢもしくはＡＢＣＡＢＣＡＢＣまたはそのバリアントなどのパターンであってもよい。別の非限定的な例として、配列は、ポリヌクレオチド全体にわたって１回、２回、または３回超繰り返される、ＡＢＡＢＡＢもしくはＡＡＢＢＡＡＢＢＡＡＢＢもしくはＡＢＣＡＢＣＡＢＣまたはそのバリアントなどのパターンであってもよい。これらのパターンでは、Ａ、Ｂ、またはＣの各文字は、異なる配列または構成要素を表す。

【０２９２】

本発明によれば、別個の生体回路、エフェクターモジュール、ＳＲＥ及びペイロード構築物をコードするポリヌクレオチドを、３’末端において修飾されたヌクレオチドを用いて３’末端を介して一緒に連結してもよい。化学結合を用いて、細胞への送達の化学量論を制御してもよい。ポリヌクレオチドを、他のポリヌクレオチド、色素、挿入剤（アクリジンなど）、架橋剤（ソラレン、マイトマイシンＣなど）、ポルフィリン（ＴＰＰＣ４、テキサフィリン、サフィリン）、多環芳香族炭化水素（フェナジン、ジヒドロフェナジンなど）、人工エンドヌクレアーゼ（ＥＤＴＡなど）、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、ＰＥＧ（ＰＥＧ－４０Ｋなど）、ＭＰＥＧ、$(MPEG)_2$、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射標識マーカー、酵素、ハプテン（ビオチンなど）、輸送／吸収促進剤（例えば、アスピリン、ビタミンＥ、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ、タンパク質、例えば糖タンパク質、またはペプチド、例えば、共リガンドに対して特異的な親和性を有する分子、または抗体、例えば、がん細胞、内皮細胞、骨細胞などの特定の細胞タイプに結合する抗体、ホルモン及びホルモン受容体、非ペプチド種、例えば、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、または薬物に結合するように設計することができる。非限定的な例として、それらは他の免疫複合体との複合体であってもよい。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドの組成物を、ギブソンアセンブリ法を使用してエフェクターモジュールの様々な構成要素を組み合わせることにより生成してもよい。ギブソンアセンブリ反応は、３つの等温反応からなり、それぞれが、長いオーバーハングを生成する５’エキソヌクレアーゼ、アニールされた一本鎖領域のギャップを埋めるポリメラーゼ、及びアニールされ、埋められたギャップのニックを塞ぐＤＮＡリガーゼを含む、異なる酵素活性に依存する。ギブソンアセンブリの前にポリメラーゼ連鎖反応を実行し、これを用いて重複配列を有するＰＣＲ産物を生成する。これらの方法を順番に繰り返して、より大きな分子を組み立てることができる。例えば、この方法は、上記の工程を繰り返して２つ以上の目的ＤＮＡ分子の第２のセットを相互に結合させ、次いで再度この方法を繰り返して第１及び第２セットの目的ＤＮＡ分子を結合することなどを含み

得る。これらの複数回の組み立て中の任意の段階で、組み立てたＤＮＡを適切な微生物に形質転換することにより増幅することができ、またはＤＮＡをｉｎ　ｖｉｔｒｏで増幅することができる（例えばＰＣＲを用いて）。

【０２９４】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、不安定化ドメイン（ＤＤ）及び本明細書に示される少なくとも１つの免疫療法薬を含む融合ポリペプチドをコードし得る。ＤＤドメインは、配列番号６０、８７～８８及び／または８７８～８８９のヌクレオチド配列によってコードされるＦＫＢＰ変異体、配列番号６１、８９、９０及び／または８６９～８７７のヌクレオチド配列によってコードされるｅｃＤＨＦＲ変異体、配列番号９１～９３、１８２～１９２、配列番号７９７～８３２、及び／または８９０～９０５のヌクレオチド配列によってコードされるｈＤＨＦＲ変異体であってもよい。

【０２９５】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号６２～６４のヌクレオチド配列を有するペイロードとしてのＩＬ２、または配列番号９４～１０２のヌクレオチド配列を有するペイロードとしてのカスパーゼ９、または配列番号１９３～２０２のヌクレオチド配列を有するペイロードとしてのＦＯＸＰ３、または配列番号２０３～２０８のヌクレオチド配列を有するペイロードとしてのルシフェラーゼ、または配列番号８３３～８３５のヌクレオチド配列を有するペイロードとしてのＢＣＭＡ　ＣＡＲ、または配列番号９０７のヌクレオチド配列を有するペイロードとしてのＨｅｒ２を含む、エフェクターモジュールをコードし得る。

【０２９６】

細胞

本発明によれば、本発明の少なくとも１つの生体回路、ＳＲＥ（例えば、ＤＤ）、エフェクターモジュール及び免疫療法薬を発現するように遺伝子改変した細胞を提供する。本発明の細胞には、免疫細胞、幹細胞及び腫瘍細胞が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞及びＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞などのＴ細胞（例えば、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ１７、Ｆｏｘｐ３＋細胞）、記憶Ｔ細胞、例えば、Ｔ記憶幹細胞、セントラル記憶Ｔ細胞、及びエフェクター記憶Ｔ細胞、最終分化エフェクターＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＮＫ　Ｔ細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、ならびに樹状細胞（ＤＣ）、エフェクター機能を引き出すことができる他の免疫細胞、またはそれらの混合物を含むがこれらに限定されない免疫エフェクター細胞である。Ｔ細胞は、Ｔαβ細胞及びＴγδ細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ヒト胚性幹細胞、間葉系幹細胞、及び神経幹細胞に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は枯渇した内在性Ｔ細胞受容体であってもよい（米国特許第９，２７３，２８３号；第９，１８１，５２７号；及び第９，０２８，８１２号参照；これらの各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０２９７】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞は、特定の個々の対象に関して自己、同種、同系、または異種であってもよい。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞は、哺乳類細胞、特にヒト細胞であってもよい。本発明の細胞は、初代細胞または不死化細胞株であってもよい。

【０２９９】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞を、細胞の増殖及び増大を誘発する増殖因子を用いて増殖させてもよい。例示的な増殖因子として、ＫＲＡＳ、ＮＲＡＳ、ＲＲＡＳ、ＲＡＳ２、ＭＲＡＳ、ＥＲＡＳ、及びＨＲＡＳなどのＲＡＳ、ＤＩＲＡＳ１、ＤＩＲＡＳ２、及びＤＩＲＡＳ３などのＤＩＲＡＳ、ＮＫＩＲＡＳ１、及びＮＫＩＲＡＳ２などのＮＫＩＲＡＳ、ＲＡＬＡ、及びＲＡＬＢなどのＲＡＬ、ＲＡＰ１Ａ、ＲＡＰ１Ｂ、ＲＡＰ２Ａ、ＲＡＰ２Ｂ、及びＲＡＰ２ＣなどのＲＡＰ、ＲＡＳＤ１、ＲＡＳＤ２などのＲＡＳＤ

、ＲＡＳＬ１０Ａ、ＲＡＳＬ１０Ｂ、ＲＡＳＬ１１Ａ、ＲＡＳＬ１１Ｂ、及びＲＡＳＬ１２などのＲＡＳＬ、ＲＥＭ１、及びＲＥＭ２などのＲＥＭ、ＧＥＭ、ＲＥＲＧ、ＲＥＲＧＬ、ならびにＲＲＡＤが挙げられる。

【０３００】

人工免疫細胞は、生体回路のポリペプチド、エフェクターモジュール、ＳＲＥ及び／または目的ペイロード（すなわち免疫療法薬）、もしくは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または前記ポリヌクレオチドを含むベクターを細胞組成物に形質導入することにより達成することができる。ベクターは、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、組換えＡＡＶ、アデノウイルスベクター、及び腫瘍溶解性ウイルスベクターなどのウイルスベクターであってもよい。他の態様では、非ウイルスベクター、例えばナノ粒子及びリポソームも使用してもよい。いくつかの実施形態では、本発明の免疫細胞を、刺激を使用して調整可能な本発明の少なくとも１つの免疫療法薬を発現するように遺伝子改変してもよい。いくつかの実施例では、同じ生体回路及びエフェクターモジュールに構築された２つ、３つまたはそれ以上の免疫療法薬を細胞に導入する。他の実施例では、それぞれが免疫治療薬を含む２つ、３つ、またはそれ以上の生体回路、エフェクターモジュールを細胞に導入してもよい。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体またはＴ細胞受容体を発現するＴ細胞を、別の１つ、２つ、３つまたはそれ以上の本発明の免疫療法薬を発現するようにさらに改変してもよい。免疫療法薬は、ＩＬ２、ＩＬ１２、ＩＬ１５及びＩＬ１８などの別のサイトカイン；調節スイッチ；または、養子細胞移入後に重篤な事象が観察された場合、もしくは移入した免疫細胞が不要になった場合に、活性化Ｔ細胞を殺傷する安全スイッチ遺伝子（例えば、自殺遺伝子）であってもよい。これらの分子は、同じエフェクターモジュールまたは別個のエフェクターモジュールに含ませてもよい。

【０３０２】

いくつかの実施形態では、本発明の免疫細胞は、本発明のペイロードを発現するように改変したＮＫ細胞であってもよい。

【０３０３】

ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、自然リンパ球系細胞ファミリーのメンバーであり、ＣＤ３（Ｔ細胞共受容体）の非存在下で表現型マーカーＣＤ５６（神経細胞接着分子）の発現によりヒトで特徴付けられる。ＮＫ細胞は、事前の抗原プライミングを必要とせずに細胞傷害性攻撃を媒介し、がん悪性腫瘍やウイルス感染などの疾患に対する防御の最前線を形成する自然免疫系の強力なエフェクター細胞である。

【０３０４】

いくつかの前臨床及び臨床試験により、ＮＫ細胞の養子移入は、急性骨髄性白血病などのがんに対する有望な治療アプローチであることが示されている（Ｒｕｇｇｅｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ；２００２，２９５：２０９７－２１００；及びＧｅｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１１，３：１４４５－１４５９）。

【０３０５】

ＮＫ細胞活性化は、活性化機能及び阻害機能を有する一連の受容体を特徴とする。ＮＫ細胞上の重要な活性化受容体には、ＣＤ９４／ＮＫＧ２Ｃ及びＮＫＧ２Ｄ（Ｃ型レクチン様受容体）、及び腫瘍細胞またはウイルス感染細胞のリガンドを認識する自然細胞傷害性受容体（ＮＣＲ）ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４及びＮＫｐ４６が含まれる。ＮＫ細胞の阻害は、ＨＬＡ分子のα－１ヘリックスを介して、多型抑制性キラー細胞免疫グロブリン様受容体（ＫＩＲ）とそれらの同族のヒト－白血球－抗原（ＨＬＡ）リガンドとの相互作用によって本質的に媒介される。活性化受容体と抑制性受容体から生成されるシグナルのバランスにより、主に即時の細胞傷害活性化が決定される。

【０３０６】

ＮＫ細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）から単離するか、またはヒト胚性幹（ＥＳ）細胞及び人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）に由来するものであってもよい。ＰＢＭＣから単離

した初代ＮＫ細胞を、養子免疫療法のためにさらに増殖させてもよい。ＮＫ細胞の増殖に役立つ戦略及びプロトコールには、インターロイキン２（ＩＬ２）刺激及び自己フィーダー細胞の使用、または遺伝子組換え同種フィーダー細胞の使用が含まれ得る。いくつかの態様では、ＮＫ細胞を、ＩＬ１５、ＩＬ２１、ＩＬ２、４１ＢＢＬ、ＩＬ１２、ＩＬ１８、ＭＩＣＡ、２Ｂ４、ＬＦＡ－１、及びＢＣＭ１／ＳＬＡＭＦ２を含む刺激性リガンドの組み合わせで選択的に増殖させることができる（例えば、米国特許公開第ＵＳ２０１５０１９０４７１号）。

【０３０７】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞は、本発明の組成物を発現するように遺伝子改変した樹状細胞であってもよい。

【０３０８】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞はＴｒｅｇ細胞であってもよい。本発明のペイロードを使用して、調節性Ｔ細胞の増殖、生存、活性化及び／または機能を促進してもよい。Ｔｒｅｇは、胸腺の高親和性リガンド上で積極的に選択され、自己抗原に対する寛容性に重要な役割を果たす別個の細胞集団である。さらに、Ｔｒｅｇは、外来抗原に対する末梢性寛容において役割を果たすことも示されている。Ｔｒｅｇの寛容性誘導能力を利用して、本明細書に記載の免疫療法薬に対する免疫応答を調整してもよい。免疫療法のためのＴｒｅｇの増殖方法は、Ｔａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９９：１４５５－６５；Ｂａｔｔａｇｌｉａ ｅｔ ａｌ．，２００５，Ｂｌｏｏｄ １０５：４７４３－４８；Ｅａｒｌｅ ｅｔ ａｌ．，２００５，Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１５：３－９；Ｇｏｄｆｒｅｙ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｂｌｏｏｄ １０４：４５３－６１；Ｈｏｆｆｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｂｌｏｏｄ １０４：８９５－９０３に記載されている。

【０３０９】

ＩＩＩ．医薬組成物及び製剤

本発明はさらに、本発明の１つ以上の生体回路、エフェクターモジュール、ＳＲＥ（例えば、ＤＤ）、刺激及び目的ペイロード（すなわち、免疫療法薬）、ベクター、細胞及び他の構成要素、ならびに場合により、少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤または不活性成分を含む医薬組成物を提供する。

【０３１０】

本明細書中で使用する場合、用語「医薬組成物」とは、本明細書に記載の生体回路、ＳＲＥ、刺激及び目的ペイロード（すなわち、免疫療法薬）、他の構成要素、ベクター、細胞、またはその薬学的に許容される塩、場合により、生理学的に適切な担体や賦形剤などの他の化学成分を含む調製物を指す。本発明の医薬組成物は、有効量の本発明の１つ以上の活性組成物を含む。本発明の少なくとも１つの組成物及び／または追加の有効成分を含む医薬組成物の調製は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄ．Ｍａｃｋ Ｐｒｉｎｔｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０によって例示されるように、本開示に照らして当業者に公知であり、参照により本明細書に援用する。

【０３１１】

用語「賦形剤」または「不活性成分」とは、有効成分の投与をさらに促進するために医薬組成物及び製剤に添加される不活性物質を指す。本開示の目的のために、語句「有効成分」とは、本明細書に記載するように、一般的に、任意の１つ以上の生体回路、エフェクターモジュール、ＳＲＥ、刺激及び目的ペイロード（すなわち免疫療法薬）、他の構成要素、ベクター、ならびに送達される細胞を指す。語句「薬学的に許容される」とは、例えばヒトなどの動物に適切に投与した場合に、有害反応、アレルギー反応、または他の不都合な反応を引き起こさない分子実体及び組成物を指す。

【０３１２】

いくつかの実施形態では、医薬組成物及び製剤を、ヒト、ヒト患者または対象に投与する。本明細書において提供する医薬組成物の記載は、主にヒトへの投与に適した医薬組成

物に向けられたものであるが、当業者であれば、そのような組成物が、一般的にいずれの他の動物、例えば非ヒト動物、例えば非ヒト哺乳類への投与にも適していることを理解するであろう。医薬組成物の投与が企図される対象として、ウシ、ウマ、ニワトリ及びブタなどの農業動物、ネコ、イヌなどの飼育動物、またはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ならびに非ヒト霊長類などの研究動物を含む、非ヒト哺乳類が挙げられるが、これらに限定されない。ヒトへの投与の場合、調製物は、ＦＤＡ　Ｏｆｆｉｃｅ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｓｔａｎｄａｒｄｓが要求する、無菌性、発熱性、一般的な安全性及び純度の基準を満たす必要があることが理解されるであろう。

【０３１３】

本発明による医薬組成物及び製剤は、単一の単位用量として、及び／または複数の単一の単位用量として、大量に調製、包装、及び／または販売してもよい。本明細書中で使用する場合、「単位用量」は、所定量の有効成分を含む医薬組成物の個別の量である。有効成分の量は、一般的に、対象に投与するであろう有効成分の用量及び／またはそのような用量の便利な画分、例えば、そのような用量の半分または３分の１に等しい。

【０３１４】

本発明の組成物は、送達に適した任意の方法で製剤化してもよい。製剤は、ナノ粒子、ポリ（乳酸－グリコール酸共重合体）（ＰＬＧＡ）ミクロスフェア、リピドイド、リポプレックス、リポソーム、ポリマー、炭水化物（単糖を含む）、カチオン性脂質及びそれらの組み合わせであってもよいが、これらに限定されない。

【０３１５】

一実施形態では、製剤は、少なくとも１つの脂質を含み得るナノ粒子である。脂質は、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ、ＰＬＧＡ、ＰＥＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ及びＰＥＧ化脂質から選択してもよいが、これらに限定されない。別の態様では、脂質は、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｄ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ及びＤＯＤＭＡなどのカチオン性脂質であってもよいが、これらに限定されない。

【０３１６】

本発明のポリヌクレオチドについて、製剤は、例えば国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／０６９６１０に示されている製剤のいずれかから選択してもよく、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０３１７】

本発明による医薬組成物中の有効成分、薬学的に許容される賦形剤または不活性成分、及び／または任意の追加成分の相対量は、治療を受ける対象の同一性、サイズ、及び／または病態に応じて、さらには組成物を投与する経路に応じて変化させる。一例として、組成物には、０．１～１００、例えば０．５～５０、１～３０、５～８０、少なくとも８０（ｗ／ｗ）の有効成分を含ませてもよい。

【０３１８】

治療の有効性または疾患の改善は、例えば、疾患の進行、疾患の寛解、症状の重症度、疼痛の軽減、生活の質、治療効果を維持するために必要な薬物の用量、疾患マーカーのレベル、または治療対象または予防対象の疾患に適した任意の他の測定可能なパラメーターを測定することにより評価することができる。そのようなパラメーターのいずれか、またはパラメーターの任意の組み合わせを測定することにより、治療または予防の有効性をモニタリングすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。本発明の組成物の投与に関して、例えばがんに対する「有効」とは、臨床的に適切な方法での投与により、少なくとも統計的に有意な割合の患者に対して有益な効果、例えば、症状の改善、治癒、疾患負荷の減少、腫瘍量または細胞数の減少、寿命の延長、生活の質の改善、または特定の種類のがんの治療に精通した医師によって一般的に肯定的と認められる他の効果がもたらされることを意味する。

【０３１９】

治療効果または予防効果は、疾患状態の１つ以上のパラメーターに統計的に有意な改善がある場合、またはそうでなければ予想される症状の悪化または発症により、明らかである。一例として、疾患の測定可能なパラメーターにおける少なくとも１０、好ましくは少なくとも２０、３０、４０、５０以上の好ましい変化は、効果的な治療の指標となり得る。本発明の所与の組成物または製剤の有効性は、当技術分野で公知の所与の疾患の実験動物モデルを使用して判断することもできる。実験動物モデルを使用する場合、統計的に有意な変化が観察される場合、治療の有効性が証明される。

【０３２０】

好ましくは、本発明の組成物を、注射により、例えば静脈内に投与する。本発明のＣＡＲ物質が本発明のＣＡＲを発現する宿主細胞（またはその集団）である場合、注射用細胞のための薬学的に許容される担体として、任意の等張性の担体、例えば、生理食塩水（水中の約０．９０％ｗ／ｖのＮａＣｌ、水中の約３００ｍＯｓｍ／ＬのＮａＣｌ、または水１リットルあたり約９．０　ｇのＮａＣｌ）、ＮＯＲＭＯＳＯＬ　Ｒ電解質溶液（Ａｂｂｏｔｔ，Ｃｈｉｃａｇｏ，ＩＬ）、ＰＬＡＳＭＡ－ＬＹＴＥ　Ａ（Ｂａｘｔｅｒ，Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ）、水中の約５％のデキストロース、または乳酸リンゲル液が挙げられ得る。一実施形態では、薬学的に許容される担体に、ヒト血清アルブミンを補充してもよい。ＷＯ２０１６１４９５７８Ａ１で示されている担体のいずれも、本発明において有用であり得る。

【０３２１】

ＩＶ．応用

本発明の一態様では、腫瘍体積または腫瘍量の軽減方法を提供する。この方法は、少なくとも１つの生体回路系、エフェクターモジュール、ＤＤ、及び／または目的ペイロード（すなわち、免疫療法薬）、少なくとも１つのベクター、または細胞を含む薬学的有効量の医薬組成物を、腫瘍を有する対象に投与することを含む。本明細書に記載の任意の免疫療法薬を有する生体回路系及びエフェクターモジュールは、ポリペプチド、またはｍＲＮＡなどのポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチドを含むウイルスベクター、または生体回路、エフェクターモジュール、ＤＤ、及び目的ペイロード（すなわち、免疫療法薬）を発現するように改変した細胞の形態であってもよい。

【０３２２】

本発明の別の態様では、対象における抗腫瘍免疫応答の誘導方法を提供する。この方法は、少なくとも１つの生体回路系、エフェクターモジュール、ＤＤ、及び／または目的ペイロード（すなわち、免疫療法薬）、少なくとも１つのベクター、または細胞を含む薬学的有効量の医薬組成物を、腫瘍を有する対象に投与することを含む。本明細書に記載のいずれかの免疫療法薬を有する生体回路及びエフェクターモジュールは、ポリペプチド、またはｍＲＮＡなどのポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチドを含むウイルスベクター、または生体回路、エフェクターモジュール、ＤＤ、及び目的ペイロード（免疫療法薬など）を発現するように改変した細胞の形態であってもよい。

【０３２３】

本発明による方法は、本発明の免疫エフェクター細胞などの遺伝子改変細胞、生体回路系を含むがんワクチン、エフェクターモジュール、ＤＤ、本発明の目的ペイロード（すなわち、免疫療法薬）、もしくは腫瘍免疫抑制性微小環境を操作する組成物、またはそれらの組み合わせを使用する、養子細胞移入（ＡＣＴ）であってもよい。これらの治療は、さらに化学療法や放射線療法などの他のがん治療とともに使用してもよい。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の安全スイッチは、タンパク質増殖及び／またはタンパク質凝集、例えば、腎疾患、及び／またはアルツハイマー病などの神経疾患、前疾患などの治療に有用であり得る。一実施形態では、本発明の安全スイッチを、アミロイドタンパク質などの凝集タンパク質を標的とするように設計した食細胞において発現させてもよく、本明細書に記載の安全スイッチを利用して、凝集タンパク質のクリアランス後に食細胞を除去してもよい。

【０３２５】
１．養子細胞移入（養子免疫療法）
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの生体回路系、エフェクターモジュール、ＤＤ、及び／または目的ペイロード（免疫療法薬）を発現するように遺伝子改変した細胞を養子細胞療法（ＡＣＴ）に使用してもよい。本明細書中で使用する場合、養子細胞移入とは、直接的な抗がん活性を有する免疫細胞（自己、同種または遺伝子改変宿主由来）の投与を指す。ＡＣＴは、悪性疾患及び感染症に対する臨床応用において有望である。例えば、ＣＤ１９を認識するように遺伝子改変したＴ細胞は、濾胞性Ｂ細胞リンパ腫の治療に使用されており（Ｋｏｃｈｅｎｄｅｒｆｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２０１０，１１６：４０９９－４１０２；及びＫｏｃｈｅｎｄｅｒｆｅｒ ａｎｄ Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．，２０１３，１０（５）：２６７－２７６）、抗腫瘍Ｔ細胞受容体を発現するように遺伝子改変した自己リンパ球を使用するＡＣＴは、転移性黒色腫の治療に使用されている（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｄｕｄｌｅｙ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００９，２１：２３３－２４０）。
【０３２６】
本発明によれば、生体回路及び系を、養子細胞療法などの細胞療法の開発及び実施に使用してもよい。細胞療法に有用な特定のエフェクターモジュールを図７～１２に示す。生体回路、その構成要素、エフェクターモジュール及びそのＳＲＥ、ならびにペイロードを、エピトープ標識受容体を調節するための細胞療法において、Ｔ細胞を刺激するためのＡＰＣプラットフォームにおいて、ｅｘ ｖｉｖｏでのＡＰＣ刺激を強化するツールとして、Ｔ細胞増殖の方法を改善するために、抗原によるｅｘ ｖｉｖｏ刺激において、ＴＣＲ／ＣＡＲの併用において、ＴＩＬの操作または調節において、同種細胞療法において、他の治療ライン（例えば、放射線、サイトカイン）との併用Ｔ細胞療法において、使用してもよい。
【０３２７】
本明細書において、養子細胞療法における使用方法を提供する。方法は、それを必要とする対象を事前調整し、本発明のＳＲＥ、生体回路及び組成物を用いて免疫細胞を調節し、本発明の組成物を発現する改変型免疫細胞を対象に投与し、対象内で改変型細胞を首尾よく生着させることを含む。
【０３２８】
いくつかの実施形態では、本発明のＳＲＥ、生体回路及び組成物を使用して、養子細胞療法に関連する事前調整レジメンを最小化してもよい。本明細書中で使用する場合、「事前調整」とは、養子細胞療法の結果を向上させるために対象に投与する任意の治療レジメンを指す。事前調整戦略には、全身照射及び／またはリンパ球減少化学療法が含まれるが、これらに限定されない。事前調整なしの養子療法の臨床試験では臨床的有用性を示すことができなかったことから、ＡＣＴにおける事前調整の重要性が示されている。ただし、事前調整には重大な毒性が伴い、ＡＣＴに適した対象コホートは限定される。いくつかの例では、ＡＣＴの免疫細胞を改変して、本発明のＳＲＥを使用してＩＬ２などのサイトカインをペイロードとして発現させ、事前調整の必要性を低減してもよい。
【０３２９】
いくつかの実施形態では、ＡＣＴの免疫細胞は、樹状細胞、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞及びＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞などのＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＮＫ Ｔ細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、リンホカイン活性化キラー（ＬＡＫ）細胞、メモリーＴ細胞、調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、ヘルパーＴ細胞、サイトカイン誘導性キラー（ＣＩＫ）細胞、及びそれらの任意の組み合わせであってもよい。他の実施形態では、ＡＣＴの免疫刺激細胞は、胚性幹細胞（ＥＳＣ）及び人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）から生成してもよい。いくつかの実施形態では、自己または同種免疫細胞をＡＣＴに使用する。
【０３３０】
いくつかの実施形態では、本組成物を発現するように改変したＮＫ細胞をＡＣＴに使用

してもよい。ＮＫ細胞の活性化は、標的細胞でパーフォリン／グランザイム依存性アポトーシスを誘導する。ＮＫ細胞の活性化はまた、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α及びＧＭ－ＣＳＦなどのサイトカイン分泌も誘導する。これらのサイトカインは、マクロファージの食作用機能とその抗菌活性を高め、樹状細胞（ＤＣ）などの抗原提示細胞による抗原提示の上方制御を介して適応免疫応答を増強する（Ｖｉｖｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２００８，９（５）：５０３－５１０に概説）。

【０３３１】

ＮＫ細胞はまた、腫瘍細胞との相互作用の際にＮＫ細胞阻害シグナルを回避するように遺伝的に再プログラムしてもよい。例えば、ＣＲＩＳＰＲ、ＺＦＮ、またはＴＡＬＥＮを使用してＮＫ細胞を遺伝的に改変し、阻害性受容体をサイレンシングすることにより、ＮＫ細胞の抗腫瘍能力を強化してもよい。

【０３３２】

当技術分野で公知の様々な方法を使用して、免疫細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで単離及び増殖させることができる。例えば、細胞傷害性Ｔ細胞の単離及び増殖方法は、米国特許第６，８０５，８６１号及び第６，５３１，４５１号；米国特許公開第ＵＳ２０１６０３４８０７２Ａ１号及び国際特許公開第ＷＯ２０１６１６８５９５Ａ１号に記載されており；その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。ＮＫ細胞の単離及び増殖は、米国特許公開第ＵＳ２０１５０１５２３８７Ａ１号、米国特許第７，４３５，５９６号；及びＯｙｅｒ，Ｊ．Ｌ．（２０１６）．Ｃｙｔｏｔｈｅｒａｐｙ．１８（５）：６５３－６３に記載されており；その各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する。具体的には、ヒト初代ＮＫ細胞を、フィーダー細胞、例えば、膜結合ＩＬ１５、ＩＬ２１、ＩＬ１２及び４－１ＢＢＬを発現するように遺伝子改変した骨髄細胞株の存在下で増殖させてもよい。

【０３３３】

いくつかの例では、ＡＣＴのために免疫細胞の部分集団を濃縮してもよい。免疫細胞の濃縮方法は、国際特許公開第ＷＯ２０１５０３９１００Ａ１号に示されている。別の例では、Ｂ及びＴリンパ球アテニュエーターマーカー（ＢＴＬＡ）陽性のＴ細胞を使用して、米国特許第９，５１２，４０１号に記載されているように抗がん反応性のＴ細胞を濃縮してもよい（各々の内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０３３４】

いくつかの実施形態では、ＡＣＴ用の免疫細胞から選択部分集団を枯渇させて、Ｔ細胞の増殖を増強してもよい。例えば、米国特許公開第ＵＳ２０１６０２９８０８１Ａ１号に示されている方法を使用して、免疫細胞からＦｏｘｐ３＋Ｔリンパ球を枯渇させて抗腫瘍免疫応答を最小化してもよく；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０３３５】

いくつかの実施形態では、免疫寛容に重要なＴ細胞を濃縮するために、ＦＯＸＰ３＋細胞について免疫細胞を濃縮し、移植片対宿主病を低減してもよい。

【０３３６】

いくつかの実施形態では、ＡＣＴ用のＴ細胞の活性化及び増殖を、細胞表面上で一時的に発現させるキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の抗原刺激により達成する。そのような活性化方法は、国際特許第ＷＯ２０１７０１５４２７号に示されており、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０３３７】

いくつかの実施形態では、免疫細胞を、抗原提示細胞（ＡＰＣ）に関連する抗原によって活性化してもよい。いくつかの実施形態では、ＡＰＣは、抗原特異的または非特異的である樹状細胞、マクロファージまたはＢ細胞であってもよい。ＡＰＣは器官において自己または同種であってもよい。いくつかの実施形態では、ＡＰＣは、細胞ベースのａＡＰＣまたは無細胞ａＡＰＣなどの人工抗原提示細胞（ａＡＰＣ）であってもよい。細胞ベースのａＡＰＣは、ヒト赤白血病細胞などの遺伝子改変同種細胞、またはマウス線維芽細胞及びショウジョウバエ細胞などの異種細胞のいずれかから選択してもよい。あるいは、ＡＰ

Ｃは無細胞であってもよく、その場合、抗原または共刺激ドメインを、ラテックスビーズ、ポリスチレンビーズ、脂質小胞またはエキソソームなどの合成表面上に提示する。

【０３３８】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞、特にＴ細胞を、人工細胞プラットフォームを使用して増殖させてもよい。一実施形態では、成熟Ｔ細胞を、Ｓｅｅｔ　ＣＳ　ｅｔ　ａｌ．２０１７．Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．１４，５２１－５３０によって記載される人工胸腺オルガノイド（ＡＴＯ）を使用して生成してもよい（その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。ＡＴＯは、デルタ様カノニカルｎｏｔｃｈリガンド（ＤＬＬ１）を発現する間質細胞株に基づいている。この方法では、遠心分離により間質細胞と造血幹細胞及び前駆細胞とを凝集させ、気液界面の細胞培養インサートに配置してオルガノイド培養を生成する。ＡＴＯ由来のＴ細胞は、ナイーブ表現型、多様なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）レパートリー、及びＴＣＲ依存性の機能を示す。

【０３３９】

いくつかの実施形態では、血漿、血小板及びＲＢＣ、ならびに顆粒球からリンパ球を分離するアフェレーシスとして知られるプロセスによって、末梢血から本発明のＴ細胞を分離してもよい。半自動エルトリエーション装置を使用して、末梢血細胞のリンパ球を単球からさらに分離してもよい。また、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを用いた磁気選択によってＴ細胞を濃縮してもよい。一実施形態では、ＰＢＭＣから単球を枯渇させるためにプラスチック接着表面を使用する追加の工程を利用してもよい。Ｔ細胞濃縮の方法は、Ｓｔｒｏｎｃｅｋ　ＤＦ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．１５：５９に開示されており；その内容はその全体を参照により援用する。

【０３４０】

いくつかの実施形態では、養子細胞療法を自己移植により行い、その場合、細胞は治療を必要とする対象に由来し、単離及びプロセシング後に同じ対象に細胞を投与する。他の例では、ＡＣＴは、同種移植を含む場合があり、その場合、細胞療法を最終的に受けるレシピエント対象以外のドナー対象から細胞を単離及び／または調製する。ドナー及びレシピエント対象は、遺伝的に同一もしくは類似であるか、または同じＨＬＡクラスもしくはサブタイプを発現するものであってもよい。

【０３４１】

いくつかの実施形態では、ＡＣＴ用の免疫細胞（例えば、Ｔ細胞及びＮＫ細胞）に導入する複数の免疫療法薬を、同じ生体回路系によって制御してもよい。一実施例では、ＩＬ２などのサイトカイン及びカスパーゼ９を、同じｈＤＨＦＲ不安定化ドメインに連結する。ＩＬ２及びカスパーゼ９の発現を、ＴＭＰを同時に使用して調整する。他の実施形態では、ＡＣＴ用の免疫細胞（例えば、Ｔ細胞及びＮＫ細胞）に導入する複数の免疫療法薬を、異なる生体回路系によって制御してもよい。一実施例では、ＩＬ２などのサイトカイン及びカスパーゼ９構築物を、２つの別個のエフェクターモジュールの異なるＤＤに連結し、異なる刺激を使用して別々に調整することができる。別の実施例では、自殺遺伝子及びＣＡＲ構築物を、２つの別個のエフェクターモジュールに連結してもよい。

【０３４２】

本発明のＳＲＥ、生体回路及び組成物を使用する遺伝子調節に続いて、細胞を、それを必要とする対象に投与する。養子細胞療法用の細胞の投与方法は公知であり、提供する方法及び組成物に関して使用してもよい。例えば、養子Ｔ細胞療法の方法は、例えば、Ｇｒｕｅｎｂｅｒｇらの米国特許出願公開第２００３／０１７０２３８号；Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇの米国特許第４，６９０，９１５号；Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ（２０１１）Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｃｌｉｎ　Ｏｎｃｏｌ．８（１０）：５７７－８５）に記載されている。例えば、Ｔｈｅｍｅｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１（１０）：９２８－９３３；Ｔｓｕｋａｈａｒａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ　４３８（１）：８４－９；Ｄａｖｉｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）ＰＬｏＳ　ＯＮＥ　８（４）：ｅ６１３３８参照；その各々の内容はそ

の全体を参照により本明細書に援用する。

【０３４３】

いくつかの実施形態では、ＡＣＴ用の免疫細胞を、免疫細胞の活性化、浸潤、増殖、生存、及び抗腫瘍機能を促進する１つ以上の免疫療法薬を発現するように改変してもよい。

【０３４４】

いくつかの実施形態では、がん患者の腫瘍を殺傷するための能力をさらに向上させるという全体的な目的に関して、養子細胞移入に使用する免疫細胞を遺伝的に操作して、ｉｎｖｉｖｏでのそれらの持続性、細胞傷害性、腫瘍標的化能力、及び疾患部位へのホーミング能力を向上させることができる。一実施例は、γサイトカイン（ＩＬ２）などのサイトカインを含む本発明のエフェクターモジュールを免疫細胞に導入して、免疫細胞の増殖及び生存を促進することである。サイトカイン遺伝子（例えば、γサイトカインＩＬ２）の細胞への形質導入は、外来性サイトカインを追加せずに免疫細胞を増殖させることができ、サイトカインを発現するＮＫ細胞は腫瘍細胞傷害性を強化した。

【０３４５】

いくつかの実施形態では、生体回路、それらの構成要素、ＳＲＥ、またはエフェクターモジュールを利用して、Ｔ細胞の枯渇を防止することができる。本明細書中で使用する場合、「Ｔ細胞枯渇」とは、慢性的なＴ細胞活性化によって引き起こされるＴ細胞機能の段階的かつ進行性の喪失を指す。Ｔ細胞の枯渇は、抗ウイルス及び抗腫瘍免疫療法の効力を制限する主要な要因である。枯渇したＴ細胞は、増殖率とサイトカイン産生能が低く、同時にアポトーシスの割合が高く、複数の抑制性受容体の表面発現が高い。枯渇につながるＴ細胞の活性化は、抗原の存在下または非存在下で起こり得る。

【０３４６】

いくつかの実施形態では、免疫療法に有用な本発明のエフェクターモジュールを、Ｔ細胞のＴ細胞受容体α遺伝子座定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座の転写制御下に置いてもよい。Ｅｙｑｕｅｍらは、ＴＲＡＣ遺伝子座からのＣＡＲの発現が、Ｔ細胞の過剰な活性化によって引き起こされるＴ細胞の枯渇及びＴ細胞の分化の加速を防止することを示した（Ｅｙｑｕｅｍ　Ｊ．ｅｔ　ａｌ（２０１７）Ｎａｔｕｒｅ．５４３（７６４３）：１１３－１１７；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０３４７】

いくつかの実施形態では、本発明のペイロードを、Ｔ細胞枯渇に関連するＴ細胞表面マーカーを標的とする抗体または断片とともに使用してもよい。使用してもよいＴ細胞枯渇に関連するＴ細胞表面マーカーには、ＣＴＬＡ－１、ＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＬＡＧ－３、２Ｂ４、ＢＴＬＡ、ＴＩＭ３、ＶＩＳＴＡ、及びＣＤ９６が含まれるが、これらに限定されない。

【０３４８】

特定の腫瘍抗原に特異的なＴ細胞を、慢性的な抗原曝露に供してもよい。持続的な抗原発現は免疫チェックポイントの発現につながり、その結果、同種の抗原特異的Ｔ細胞の枯渇状態を誘発する。本発明のキメラ抗原受容体の定常的な発現は、抗原との慢性的な相互作用をもたらす可能性があり、それにより枯渇が生じる。本明細書に開示する組成物を使用して、本発明に特異的な刺激を用いて表面ＣＡＲ発現を調節することにより、Ｔ細胞枯渇を予防してもよい。一実施形態では、本発明のＳＲＥを使用して、本発明の組成物の拍動性の発現を達成してもよい。本明細書中で使用する場合、「拍動性」とは、間隔を空けた時間間隔での複数のペイロード発現を指す。一般的に、刺激を投与すると、ペイロードの発現が増加し、第１のパルスが発生し；刺激の退潮に続いて、ペイロードの発現が減少し、これは刺激への第１の曝露とその次の曝露の間のインターバル時間を表しており、その後、刺激への第２の曝露が開始する。

【０３４９】

本明細書においてはまた、少なくとも１つのエフェクターモジュールを含む治療有効量の組成物を対象に投与することを含む、Ｔ細胞枯渇の予防または逆転をそれを必要とする対象において行う方法を提供する。いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは

、少なくとも１つの免疫療法薬に作動可能に連結した刺激応答エレメント（ＳＲＥ）を含み、その結果、ＳＲＥは、刺激に応答し、免疫療法薬の発現及び／または機能を調整し、それによりＴ細胞枯渇を予防または逆転させる。いくつかの実施形態では、免疫療法薬はキメラ抗原受容体であってもよい。キメラ抗原受容体の例として、ＧＤ２　ＣＡＲ、ＢＣＭＡ　ＣＡＲ、ＣＤ３３　ＣＡＲ、Ｈｅｒ２　ＣＡＲ、ＡＬＫ　ＣＡＲ、ＣＤ２２　ＣＡＲ、またはＣＤ２７６　ＣＡＲが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、ＧＤ２、ＢＣＭＡ、ＣＤ３３、Ｈｅｒ２、ＡＬＫ、ＣＤ２２またはＣＤ２７６などの、少なくとも１つの抗原を認識する細胞外ドメインを含む二重特異性ＣＡＲであってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｔ細胞枯渇を予防するための本発明の組成物の拍動性の発現を含み得る。いくつかの例では、刺激の追加によってＴ細胞の枯渇が逆転し得る。他の例では、刺激の退潮によってＴ細胞の枯渇が逆転し得る。

【０３５０】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物を利用して、対象のＴＩＬ（腫瘍浸潤リンパ球）集団を変化させてもよい。一実施形態では、本明細書に記載のペイロードのいずれかを利用して、ＣＤ８陽性集団に対するＣＤ４陽性細胞の比率を変化させてもよい。いくつかの実施形態では、ＴＩＬをｅｘ　ｖｉｖｏでソーティングし、本明細書に記載のサイトカインのいずれかを発現するように改変してもよい。本発明のペイロードを使用して、ＴＩＬのＣＤ４及び／またはＣＤ８集団を増殖させ、ＴＩＬ媒介免疫応答を増強してもよい。

【０３５１】

２．がんワクチン

いくつかの実施形態では、本発明の生体回路、エフェクターモジュール、目的ペイロード（免疫療法薬）、ベクター、細胞及び組成物を、がんワクチンと併用してもよい。一態様では、樹状細胞を、本発明の組成物を発現するように改変し、がんワクチンとして使用する。

【０３５２】

いくつかの実施形態では、がんワクチンは、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）に由来するペプチド及び／またはタンパク質を含み得る。そのような戦略を利用して、対象の免疫応答を誘導してもよく、その免疫応答は、いくつかの例では、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答であってもよい。また、がんワクチンに使用するペプチドを、対象の変異特性に一致するように改変してもよい。例えば、治療を必要とする対象で見出された変異に一致する変異を有するＥＧＦＲ由来ペプチドが、肺癌の患者で成功裏に使用されている（Ｌｉ　Ｆｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ．Ｏｃｔ　７；５（１２）：ｅ１２３８５３９；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０３５３】

一実施形態では、本発明のがんワクチンは、スーパーアゴニストであるＴＡＡ由来改変ペプチドリガンド（ＡＰＬ）であってもよい。これらは、天然ペプチド配列から１つ以上のアミノ酸が逸脱している変異ペプチドリガンドであり、特定のＣＴＬクローンを天然エピトープよりも効果的に活性化する。これらの変化により、ペプチドが制限クラスＩ　ＭＨＣ分子により良好に結合するか、または所与の腫瘍特異性ＣＴＬサブセットのＴＣＲとより良好に相互作用し得る。ＡＰＬは、米国特許公開第ＵＳ２０１６０３１７６３３Ａ１号に示されている方法を使用して選択してもよく、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０３５４】

血液悪性腫瘍の再発は、同種造血幹細胞移植（ＨＣＴ）後の治療の失敗の主要な原因である。ウィルムス腫瘍（ＷＴ１）遺伝子産物は、急性白血病及びその他の血液悪性腫瘍で発現する腫瘍関連抗原であり、正常組織での発現は制限されている。本発明の組成物を、ドナー由来ＷＴ１ペプチドを負荷した樹状細胞ワクチンと共投与して、免疫療法後の疾患の再発を予防してもよい（Ｓｈａｈ　ＮＮ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｂｉｏｌ　Ｂｌｏ

ｏｄ Ｍａｒｒｏｗ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．２２（１２）：２１４９－２１５；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０３５５】

３．併用治療

いくつかの実施形態では、対象への投与のために、本発明の組成物、ベクター及び細胞を併用することが望ましい。免疫療法を強化するために、異なる免疫療法薬を含む本発明の組成物を、公知の免疫療法薬と併用または組み合わせてもよい。

【０３５６】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物をアジュバントと組み合わせて、抗原特異的免疫応答の効力及び寿命を高めることができることが望ましい。併用療法において免疫刺激剤として使用するアジュバントには、抗原を送達する生体分子または送達担体が含まれる。非限定的な例として、本発明の組成物を、サイトカイン、トール様受容体、細菌毒素、及び／またはサポニンなどの生物学的アジュバントと併用してもよい。他の実施形態では、本発明の組成物を送達担体と組み合わせてもよい。例示的な送達担体として、ポリマーミクロスフェア、免疫刺激複合体、エマルジョン（水中油または油中水）、アルミニウム塩、リポソーム及びビロソームが挙げられる。

【０３５７】

いくつかの実施形態では、本発明の生体回路、エフェクターモジュール、ＤＤ及びペイロードを発現するように改変した免疫エフェクター細胞を、本明細書に記載の生物学的アジュバントと併用してもよい。

【０３５８】

いくつかの実施形態では、本発明の生体回路、エフェクターモジュール、ＤＤ及びペイロードを発現するように改変した免疫エフェクター細胞を、がんワクチンと併用してもよい。

【０３５９】

いくつかの実施形態では、サイトカインを含むエフェクターモジュールを、安全スイッチまたは調節スイッチをコードするエフェクターモジュールと組み合わせて使用してもよい。

【０３６０】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、本発明の組成物と、がん、感染症、及び他の免疫不全障害の治療に有効な他の薬剤、例えば抗がん剤との併用を含み得る。本明細書中で使用する場合、用語「抗がん剤」とは、例えば、がん細胞を殺傷するか、がん細胞のアポトーシスを誘発するか、がん細胞の増殖速度を低下させるか、転移の発生率または数を低下させるか、腫瘍サイズを縮小するか、腫瘍成長を阻害するか、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給を減少させるか、がん細胞または腫瘍に対する免疫応答を促進するか、がんの進行を予防もしくは阻害するか、またはがんを有する対象の寿命を延長することにより、対象のがんに負の影響を与えることができる任意の薬剤を指す。

【０３６１】

いくつかの実施形態では、抗がん剤または抗がん療法は、化学療法薬、もしくは放射線療法、免疫療法薬、手術、または本発明と併用して治療の治療効果を向上させる任意の他の治療薬であってもよい。

【０３６２】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物を、本明細書に記載の本発明の療法以外の免疫療法薬、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかの標的分子に特異的な抗体と併用してもよい。

【０３６３】

例示的な化学療法薬として、アシビシン；アクラルビシン；塩酸アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン；酢酸アメタントロン；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリン、スリンダク、クルクミン、以下を含むアルキル化剤：メクロルエタミン、シ

クロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、及びクロラムブシルなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、及びセムスチン（メチルＣＣＮＵ）などのニトロソ尿素；トリエチレンメラミン（ＴＥＭ）、トリエチレン、チオホスホルアミド（チオテパ）、ヘキサメチルメラミン（ＨＭＭ、アルトレタミン）などのチレニミン／メチルメラミン；ブスルファンなどのアルキルスルホン酸塩；ダカルバジン（ＤＴＩＣ）などのトリアジン；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサートやトリメトレキサートなどの葉酸類似体、５－フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタビン、シトシンアラビノシド（ＡｒａＣ、シタラビン）、５－アザシチジン、２，２’－ジフルオロデオキシシチジンなどのピロリジン類似体、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、アザチオプリン、２’－デオキシコホルマイシン（ペントスタチン）、エリスロヒドロキシノニルアデニン（ＥＨＮＡ）、リン酸フルダラビン、及び２－クロロデオキシアデノシン（クラドリビン、２－ＣｄＡ）などのプリン類似体；パクリタキセル、ビンカアルカロイド、例えば、ビンブラスチン（ＶＬＢ）、ビンクリスチン、及びビノレルビンなど、タキソテール、エストラムスチン、及びリン酸エストラムスチンなどの抗有糸分裂薬を含む、天然産物；エトポシド及びテニポシドなどのエピポドフィロトキシン；アクチモマイシンＤ、ダウノマイシン（ルビドマイシン）、ドキソルビシン、ミトキサントロン、イダルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、マイトマイシンＣ、及びアクチノマイシンなどの抗生物質；Ｌ－アスパラギナーゼなどの酵素、インターフェロン（ＩＦＮ）－γなどのサイトカイン、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、ＴＮＦ－β及びＧＭ－ＣＳＦ、アンジオスタチンやエンドスタチンなどの抗血管新生因子、ＦＧＦまたはＶＥＧＦの阻害剤、例えば、可溶性ＶＧＦ／ＶＥＧＦ受容体を含む、血管新生因子受容体の可溶性形態、シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金配位錯体、ミトキサントロンなどのアントラセンジオン、ヒドロキシ尿素などの置換尿素、Ｎ－メチルヒドラジン（ＭＩＦｆ）及びプロカルバジンなどのメチルヒドラジン誘導体、ミトタン（ｏ，ｐ’－ＤＤＤ）及びアミノグルテチミドなどの副腎皮質抑制剤；プレドニゾン及び等価物、デキサメタゾン及びアミノグルテチミドなどの副腎皮質ステロイド拮抗薬を含むホルモン及び拮抗薬；カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、及び酢酸メゲストロールなどのプロゲスチン；ジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール等価物などのエストロゲン；タモキシフェンなどの抗エストロゲン剤；プロピオン酸テストステロン及びフルオキシメステロン／等価物を含むアンドロゲン；フルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモン類似体、及びロイプロリドなどの抗アンドロゲン剤；フルタミドなどの非ステロイド系抗アンドロゲン剤；キナーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、メチル化阻害剤、プロテアソーム阻害剤、モノクローナル抗体、酸化剤、抗酸化剤、テロメラーゼ阻害剤、ＢＨ３ミメティック、ユビキチンリガーゼ阻害剤、ｓｔａｔ阻害剤、及びメシル酸イマチニブ（ＧｌｅｅｖａｃまたはＧｌｉｖａｃとして販売）及び現在Ｔａｒｖｅｃａとして販売されているエルロチニブ（ＥＧＦ受容体阻害剤）などの受容体チロシンキナーゼ阻害剤；リン酸オセルタミビル、アンホテリシンＢ、及びパリビズマブなどの抗ウイルス薬；Ｓｄｉ１ミメティック；セムスチン；老化由来阻害剤１；スパルフォス酸；スピカマイシンＤ；スピロムスチン；スプレノペンチン；スポンギスタチン１；スクアラミン；スティピアミド；ストロメリシン阻害剤；スルフィノシン；超活性血管作動性腸管ペプチド拮抗薬；ベラレソル；ベラミン；ベルジン類；ベルテポルフィン；ビノレルビン；ビンキサルチン；ビタキシン；ボロゾール；ザノテロン；ゼニプラチン；ジラスコルブ；及びジノスタチンスチマラマー；ＰＩ３Ｋβ小分子阻害剤、ＧＳＫ２６３６７７１；汎ＰＩ３Ｋ阻害剤（ＢＫＭ１２０）；ＢＲＡＦ阻害剤、ベムラフェニブ（Ｚｅｌｂｏｒａｆ）及びダブラフェニブ（Ｔａｆｉｎｌａｒ）；または前述の任意の類似体もしくは誘導体及びバリアントが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３６４】

放射線治療薬及び因子には、例えば、γ線照射、Ｘ線、ＵＶ照射、マイクロ波、電子放出、放射性同位元素などのＤＮＡ損傷を誘発する放射線及び波が含まれる。療法は、局所化した腫瘍部位に上記の形態の放射線を照射することにより達成してもよい。これらの因

子はすべて、ＤＮＡの前駆体、ＤＮＡの複製及び修復、ならびに染色体の集合及び維持において、広範囲の損傷ＤＮＡをもたらす可能性が最も高い。Ｘ線の線量範囲は、長期間（３～４週間）の場合の５０～２００レントゲンの１日線量から、２０００～６０００レントゲンの単回線量の範囲である。放射性同位体の線量範囲は大きく異なり、同位体の半減期、放出される放射線の強度及び種類、腫瘍細胞による取り込みに依存する。

【０３６５】

いくつかの実施形態では、化学療法薬は、レナリドマイド（ＬＥＮ）などの免疫調節薬であってもよい。最近の研究は、レナリドマイドがＣＡＲ改変Ｔ細胞の抗腫瘍機能を増強することができることを示している（Ｏｔａｈａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２０１５，５（４）：ｅ１１１５９４０）。抗腫瘍抗体のいくつかの実施例には、トシリズマブ、シルツキシマブが含まれる。

【０３６６】

本発明の組成物と併用してもよい他の薬剤としてはまた、細胞表面受容体及びそのリガンド（例えばＦａｓ／Ｆａｓリガンド、ＤＲ４またはＤＲ５／ＴＲＡＩＬ）及びＧＡＰ接合部の上方制御に影響を及ぼす薬剤、細胞増殖抑制剤及び分化剤、接着斑キナーゼ（ＦＡＫ）阻害剤及びロバスタチンなどの細胞接着阻害剤、または抗体Ｃ２２５などのアポトーシス誘導物質に対する過剰増殖性細胞の感受性を高める薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３６７】

併用には、本発明の組成物及び他の薬剤を同時にまたは別々に投与することが含まれてもよい。あるいは、本免疫療法は、数分、数日、数週間から数ヶ月の範囲の間隔で他の薬剤／療法の前または後に行ってもよい。

【０３６８】

いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲ－Ｔ細胞を、レチノイドと同時投与して骨髄由来サプレッサー細胞を根絶させてもよい。骨髄由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）は、分化の異なる段階にある初期骨髄前駆細胞、未成熟顆粒球、マクロファージ、及び樹状細胞の不均一な集団である。ＭＤＳＣは、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及びＮＫＴ細胞の細胞傷害活性と、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞を介した適応免疫応答の両方を抑制する能力を有する。Ｌｏｎｇ　ＡＨ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｒｅｓ．；４（１０）：８６９－８８０は、固形腫瘍の治療を成功させるために、ＣＡＲとすべてのトランスレチノイン酸（ＡＴＲＡ）による共治療を記載している（その内容はその全体を参照として援用する）。

【０３６９】

本明細書中で使用する補助療法とは、標準的な実験室検査でがんを検出できない場合であってもがん細胞を殺傷するために、一次療法に加えて行う治療を指す。実験データにより、がんの治療のための細胞傷害性レジメンによって誘発されるリンパ球の枯渇が再発に寄与し得ることが示されている。補助免疫療法により、がん免疫療法に対する再発が最小化され得る。いくつかの実施形態では、補助療法は、組換えヒトインターロイキン２と、腫瘍細胞由来のペプチドでパルスした樹状細胞を組み合わせた同時投与を含み得る。いくつかの実施形態では、樹状細胞を、自己腫瘍細胞溶解物及びキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）でパルスする。免疫細胞では、ＣＤ２５陽性Ｔ細胞がさらに枯渇する場合がある。インターロイキン７を、免疫療法として共投与してもよい。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞表面抗原と相互作用するモノクローナル抗体８Ｈ９を用いて、ドナー由来の腫瘍細胞を再注入するリスクを取り除いてもよい。Ｍｅｒｃｈａｎｔ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６），Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１；２２（１３）：３１８２－９１に示されている補助療法のいずれかを利用してもよい（その内容はその全体を参照により援用する）。

【０３７０】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物を、ＣＸＣＲ２阻害剤または抗ＣＸＣＲ２抗体と併用することができる。Ｈｉｇｈｆｉｌｌ　ＳＬ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）は、Ｃ

ＸＣＲ２陽性ＭＤＳＣ細胞が局所免疫抑制を介して免疫療法の効力を制限することを見出した（Ｈｉｇｈｆｉｌｌ　ＳＬ，ｅｔ　ａｌ．　Ｓｃｉ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．２０１４　Ｍａｙ　２１；６（２３７）：２３７ｒａ６７；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０３７１】

４．疾患

本発明において、必要とする対象の腫瘍体積または腫瘍量の低減方法を提供し、この方法は、本発明の組成物を対象に導入することを含む。

【０３７２】

本発明はまた、本発明の少なくとも１つのエフェクターモジュールを発現するように遺伝子改変した有効量の免疫エフェクター細胞を対象に投与することを含む、対象のがんの治療方法を提供する。

【０３７３】

がん

本発明の医薬組成物、生体回路、生体回路の構成要素、ＳＲＥまたはペイロードを含むエフェクターモジュールを用いて、様々ながんを治療し得る。本明細書中で使用する場合、用語「がん」とは、周囲の組織に侵入し、新しい身体部位に転移する傾向がある未分化細胞の増殖を特徴とする様々な悪性新生物のいずれかを指し、また、そのような悪性新生物の成長を特徴とする病的状態も指す。がんは、腫瘍または血液悪性腫瘍であってもよく、これには、すべての種類のリンパ腫／白血病、癌腫及び肉腫、例えば、肛門、膀胱、胆管、骨、脳、乳房、子宮頸部、結腸／直腸、子宮内膜、食道、目、胆嚢、頭頸部、肝臓、腎臓、喉頭、肺、縦隔（胸部）、口、卵巣、膵臓、陰茎、前立腺、皮膚、小腸、胃、脊髄、尾骨、睾丸、甲状腺及び子宮に見出されるがんまたは腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

【０３７４】

本発明の組成物で治療し得る癌腫のタイプには、乳頭腫／癌腫、絨毛癌、卵黄嚢腫瘍、奇形腫、腺腫／腺癌、黒色腫、線維腫、脂肪腫、平滑筋腫、横紋筋腫、中皮腫、血管腫、骨腫、軟骨腫、神経膠腫、リンパ腫／白血病、扁平上皮癌、小細胞癌、未分化大細胞癌、基底細胞癌、未分化副鼻腔癌が含まれるが、これらに限定されない。

【０３７５】

本発明の組成物で治療し得る癌腫のタイプには、軟部組織肉腫、例えば、胞状軟部肉腫、血管肉腫、皮膚線維肉腫、類腱腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、骨外性軟骨肉腫、骨外性骨肉腫、線維肉腫、血管外皮細胞腫、血管肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、リンパ肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫、ならびにアスキン腫瘍、ユーイング肉腫（原始神経外胚葉性腫瘍）、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、骨肉腫、及び軟骨肉腫が含まれるが、これらに限定されない。

【０３７６】

非限定的な例として、治療し得る癌腫は、急性顆粒球白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、腺癌、腺肉腫、副腎癌、副腎皮質癌、肛門癌、未分化星状細胞腫、血管肉腫、虫垂癌、星状細胞腫、基底細胞癌、Ｂ細胞リンパ腫）、胆管癌、膀胱癌、骨癌、腸癌、脳癌、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、乳癌、カルチノイド腫瘍、子宮頸癌、胆管細胞癌、軟骨肉腫、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚リンパ腫、皮膚黒色腫、びまん性星状細胞腫、乳管上皮内癌、子宮内膜癌、上衣腫、類上皮肉腫、食道癌、ユーイング肉腫、肝外胆管癌、眼癌、卵管癌、線維肉腫、胆嚢癌、胃癌、胃腸癌、消化管カルチノイド癌、一般型消化管間質腫瘍、胚細胞性腫瘍、多形神経膠芽腫、神経膠腫、有毛細胞白血病、頭頸部癌、血管内皮腫、ホジキンリンパ腫、ホジキン病、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、浸潤性乳管癌、浸潤性小葉腺癌、炎症性乳癌、腸癌、肝内胆管癌、浸潤乳癌／浸潤性乳癌、膵島細胞癌、顎癌、カポジ肉腫、腎臓癌、喉頭癌、平滑筋肉腫、軟膜髄膜転移、白血病、口唇癌、脂肪肉腫、肝臓癌、非浸潤性小葉癌、低悪性度星状細胞腫、肺癌、リンパ節癌、リンパ腫、男性乳癌、髄様癌、髄芽腫、黒色腫、

髄膜腫、メルケル細胞癌、間葉性軟骨肉腫、間葉腫（Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍｏｕｓ）、中皮腫、転移性乳癌、転移性黒色腫、転移性扁平上皮頸部癌、混合膠腫、口腔癌、粘液性癌、粘膜悪性黒色腫、多発性骨髄腫、鼻腔癌、上咽頭癌、頸部癌、神経芽細胞腫、神経内分泌腫瘍、非ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、眼癌、眼内黒色腫、乏突起神経膠腫、口腔癌（Ｏｒａｌ　ｃａｎｃｅｒ）、口腔癌（Ｏｒａｌ　ｃａｖｉｔｙ　ｃａｎｃｅｒ）、中咽頭癌、骨原性肉腫、骨肉腫、卵巣癌、卵巣上皮癌、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣原発性腹膜癌、卵巣性索間質性腫瘍、パジェット病、膵臓癌、乳頭癌、副鼻腔癌、副甲状腺癌、骨盤癌、陰茎癌、末梢神経癌、腹膜癌、咽頭癌、褐色細胞腫、毛様細胞性星状細胞腫、松果体部腫瘍、松果体芽腫、下垂体癌、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎盂癌、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、子宮肉腫、副鼻腔癌、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟部肉腫、脊椎癌、脊柱癌、脊髄癌、脊椎腫瘍、扁平上皮癌、胃癌、滑膜肉腫、Ｔ細胞リンパ腫）、精巣癌、咽頭癌、胸腺腫／胸腺癌、甲状腺癌、舌癌、扁桃癌、移行上皮癌、移行上皮癌、移行上皮癌、三種陰性乳癌、卵管癌、管状癌、尿管癌、尿管癌、尿道癌、子宮腺癌、子宮癌、子宮肉腫、膣癌、及び外陰癌であってもよい。

【０３７７】

いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲは、ＣＳ１　ＣＡＲ、ＣＤ３８　ＣＡＲ、ＣＤ１３８　ＣＡＲ、及びＢＣＭＡ　ＣＡＲなどの、多発性骨髄腫の治療に有用なＣＡＲであってもよい。いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲは、ＣＤ３３　ＣＡＲ、ＣＤ１２３　ＣＡＲ、及びＣＬＬ１　ＣＡＲなどの、急性骨髄性白血病の治療に有用なＣＡＲであってもよい。いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲは、ＣＤ５　ＣＡＲ及びＣＤ７　ＣＡＲなどの、Ｔ細胞白血病の治療に有用なＣＡＲであってもよい。いくつかの実施形態では、本発明のＣＡＲは、メソテリンＣＡＲ、ＧＤ２　ＣＡＲ、ＧＰＣ３　ＣＡＲ、Ｈｅｒ２　ＣＡＲ、ＥＧＦＲ　ＣＡＲ、Ｍｕｃ１　ＣＡＲ、ＥｐＣＡＭ　ＣＡＲ、ＰＤ－Ｌ１　ＣＡＲ、ＣＥＡ　ＣＡＲ、Ｍｕｃ１６　ＣＡＲ、ＣＤ１３３　ＣＡＲ、ＣＤ１７１　ＣＡＲ、ＣＤ７０　ＣＡＲ、ＣＬＤ１８　ＣＡＲ、ｃＭＥＴ　ＣＡＲ、ＥｐｈＡ２　ＣＡＲ、ＦＡＰ　ＣＡＲ、葉酸受容体ＣＡＲ、ＩＬ１３Ｒａ２　ＣＡＲ、ＭＧ７　ＣＡＲ、ＰＳＭＡ　ＣＡＲ、ＲＯＲ１　ＣＡＲ、及びＶＥＧＦＲ２　ＣＡＲなどの、固形腫瘍の治療に有用なＣＡＲであってもよい。

【０３７８】

感染症

いくつかの実施形態では、本発明の生体回路を、感染症の治療に使用してもよい。本発明の生体回路を、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、及び／またはＴ細胞などの養子細胞移入に適した細胞に導入してもよい。本発明の生体回路によって治療される感染性疾患は、ウイルス、細菌、真菌、及び／または寄生虫によって引き起こされる疾患であってもよい。本発明のＩＬ１５－ＩＬ１５Ｒａペイロードを使用して、感染症の治療に有用な免疫細胞の増殖及び／または免疫細胞の持続性を高めてもよい。

【０３７９】

本明細書の「感染症」とは、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞に感染し、疾患状態を引き起こす任意の病原体または物質によって引き起こされる疾患を指す。その例には、細菌、酵母、真菌、原生動物、マイコプラズマ、ウイルス、プリオン、及び寄生虫が含まれる。一例として、（ａ）ウイルス性疾患、例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、ＨＳＶ－Ｉ、ＨＳＶ－ＩＩ、ＣＭＶ、またはＶＺＶ）、ポックスウイルス（例えば、痘瘡もしくはワクシニア、または伝染性軟属腫などのオルソポックスウイルス）、ピコルナウイルス（例えば、ライノウイルスまたはエンテロウイルス）、オルトミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、パラミクソウイルス（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、及びＲＳウイルス（ＲＳＶ））、コロナウイルス（例えば、ＳＡＲＳ）、パポバウイルス（例えば、性器疣贅、尋常性疣贅、または足底疣贅を引き起こすパピローマウイルス）、ヘパドナウイルス（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス）、フラビウイルス（例えば、Ｃ型肝炎ウイルスまたはデング熱ウイルス）、ま

たはレトロウイルス（例えば、ＨＩＶなどのレンチウイルス）による感染に起因する疾患；（ｂ）細菌性疾患、例えばＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ属、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ属、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｓｈｉｇｅｌｌａ属、Ｌｉｓｔｅｒｉａ属、Ａｅｒｏｂａｃｔｅｒ属、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ属、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ属、Ｐｒｏｔｅｕｓ属、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｃｈｌａｍｙｄｉａ属、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ属、Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ属、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ属、Ｂａｃｉｌｌｕｓ属、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ属、Ｖｉｂｒｉｏ属、Ｓｅｒｒａｔｉａ属、Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ属、Ｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｂｒｕｃｅｌｌａ属、Ｙｅｒｓｉｎｉａ属、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ属、またはＢｏｒｄｅｔｅｌｌａ属の細菌による感染に起因する疾患；（ｃ）クラミジアなどの他の感染性の疾患、カンジダ症、アスペルギルス症、ヒストプラスマ症、クリプトコッカス髄膜炎を含むがこれらに限定されない真菌症、マラリア、Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ　ｃａｒｎｉｉ肺炎、リーシュマニア症、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症を含むがこれらに限定されない寄生虫症、ならびにクロイツフェルト－ヤコブ病（ＣＪＤ）、異型クロイツフェルト－ヤコブ病（ｖＣＪＤ）、ゲルストマン－シュトロイスラー－シャインカー症候群、致死性家族性不眠症、及びクールー病などのヒト疾患を引き起こすトリパノソーマ感染及びプリオンに関与する感染症が挙げられる。

【０３８０】

５．マイクロバイオーム

マイクロバイオームの組成の変化は、抗がん療法の作用に影響を及ぼし得る。相利共生微生物、片利共生微生物及び病原性微生物の多様なコミュニティは、体内のすべての環境曝露部位に存在し、本明細書では「マイクロバイオーム」と呼ばれる。マイクロバイオームが生息し得る体の環境曝露部位には、皮膚、上咽頭、口腔、気道、胃腸管、及び生殖器系が含まれる。

【０３８１】

いくつかの実施形態では、天然のまたは免疫療法薬で改変したマイクロバイオームを使用して、抗がん免疫療法の効力を向上させてもよい。マイクロバイオームを用いて免疫療法薬への応答性を向上させる方法は、Ｓｉｖａｎらによって記載されている（Ｓｉｖａｎ　Ａ．，ｅｔ　ａｌ．２０１５．Ｓｃｉｅｎｃｅ；３５０：１０８４－９；その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。他の実施形態では、微生物を本発明の免疫療法組成物と共に送達し、免疫療法の効力を向上させてもよい。

【０３８２】

６．治療薬を作るためのツール及び薬剤

本発明において、必要とする対象の腫瘍体積または腫瘍量を軽減するための免疫療法薬を生成する際に使用し得るツール及び薬剤を提供する。ペイロードの構造、細胞型、遺伝子導入の方法、ｅｘ　ｖｉｖｏでの増殖の方法及び時間、事前調整、ならびに対象の腫瘍の量及びタイプなどの、相当数の変数が治療薬の製造に関係している。そのようなパラメーターを、本明細書に記載するツール及び薬剤を使用して最適化してもよい。

【０３８３】

細胞株

本開示は、本発明の組成物で遺伝子改変した哺乳類細胞を提供する。適切な哺乳類細胞には、初代細胞及び不死化細胞株が含まれる。適切な哺乳類細胞株には、ヒト胎児腎細胞株２９３、線維芽細胞株ＮＩＨ　３Ｔ３、ヒト結腸直腸がん細胞株ＨＣＴ１１６、卵巣がん細胞株ＳＫＯＶ－３、不死化Ｔ細胞株Ｊｕｒｋａｔ細胞及びＳｕｐＴ１細胞、リンパ腫細胞株Ｒａｊｉ細胞、ＮＡＬＭ－６細胞、Ｋ５６２細胞、ＨｅＬａ細胞、ＰＣ１２細胞、ＨＬ－６０細胞、ＮＫ細胞株（例えば、ＮＫＬ、ＮＫ９２、ＮＫ９６２、及びＹＴＳ）、ＲＥＨ、ＳＥＭ、ＫＯＰＮ８、Ｄａｕｄｉ、Ｒａｊｉなどが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの例では、細胞は、不死化細胞株ではなく、個体から取得した細胞であり、本明細書中では初代細胞と呼ばれる。例えば、細胞は、個体から取得したＴリンパ球

である。他の例として、個体から取得した細胞傷害性細胞、幹細胞、末梢血単核球または前駆細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【０３８４】

ＳＲＥ、生体回路、細胞株の追跡

いくつかの実施形態では、本発明の組成物または本発明の組成物によって改変した細胞を追跡することが望ましい場合がある。追跡は、レポーター部分などのペイロードを使用することにより達成してもよく、それは、本明細書中で使用する場合、入力に応答して、検出可能なシグナルを生成することができる任意のタンパク質を指す。一例として、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、β－グルクロニダーゼ、ペルオキシダーゼ、β－ラクタマーゼ、触媒抗体、生物発光タンパク質、例えばルシフェラーゼ、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）などの蛍光タンパク質が挙げられる。

【０３８５】

レポーター部分を使用して、ＤＤに対応するリガンドの添加時にＤＤの応答をモニタリングしてもよい。他の例では、レポーター部分を使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｉｎ　ｖｉｖｏ、またはｅｘ　ｖｉｖｏで、細胞の生存、持続性、細胞増殖、及び／または局在化を追跡してもよい。

【０３８６】

いくつかの実施形態では、好ましいレポーター部分はルシフェラーゼタンパク質であってもよい。一実施形態では、レポーター部分は、ウミシイタケルシフェラーゼまたはホタルルシフェラーゼである。表１４にレポーター部分の配列を示す。表１４のアミノ酸配列は、終止コドンを含む場合があり、これをアミノ酸配列の最後に「＊」を付けて表に示す。

【表１４－１】

表１４：ＤＤ－ルシフェラーゼ構築物

分類記載	アミノ酸配列	アミノ酸配列番号	核酸配列

【表１４－２】

リンカー	EF	-	GAGTTC
リンカー	SG	-	AGCGGC
ウミシイタケルシフェラーゼ	MTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDS EKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVPHIEPVARCIIPDL IGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFV GHDWGACLAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEW PDIEEDIALIKSEEGEKMVLENNFFVETMLPSKIMRKLE PEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVV QIVRNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKF PNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLKNEQ	209	217
ホタルルシフェラーゼ	MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGT IAFTDAHIEVDITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRI VVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLNS MGISQPTVVFVSKKGLQKILNVQKKLPIIQKIIIMDSKT DYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALI MNSSGSTGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPD TAILSVVPFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEEELF LRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEI ASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILI TPEGDDKPGAVGKVVPFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGEL CVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDED EHFFIVDRLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAG VAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVT TAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGG KSKL	210	218
FKBP(F36V,L106P)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSS RDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPE	11	60, 878～882
FKBP(E31G,F36V, R71G,K105E)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGDGKKVDSS RDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE	12	88, 883～889
ecDHFR(R12Y,Y100I)	MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKP VIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSV DEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDA EVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEIL ERR	8	89
OT-Rluc-001(ウミシイタケLuc-終止)	MTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDS EKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVPHIEPVARCIIPDL IGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFV GHDWGACLAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEW PDIEEDIALIKSEEGEKMVLENNFFVETMLPSKIMRKLE PEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVV	211	203

【表１４－３】

	QIVRNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKF PNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLKNEQ*		
OT-Fluc-002(Met-FKBP(F36V,L106P)-リンカー(EF)-ホタルLuc-終止)	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDS SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTIS PDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPEEFMEDAKNI KKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAH IEVDITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENS LQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLNSMGISQPT VVFVSKKGLQKILNVQKKLPIIQKIIIMDSKTDYQGFQS MYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSGST GLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVV PFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDY KIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPL SKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEGDDK PGAVGKVVPFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMI MSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVD RLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDD DAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLRG GVVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL*	212	204
OT-Rluc-003(Met-FKBP(F36V,L106P)-リンカー(SG)-ウミシイタケルシフェラーゼのアミノ酸 2～311-終止)	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDS SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTIS PDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPESGTSKVYDP EQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAV IFLHGNAASSYLWRHVVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGK SGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFVGHDWGACL AFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEEDIA LIKSEEGEKMVLENNFFVETMLPSKIMRKLEPEEFAAYL EPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVVQIVRNYNA YLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKV KGLHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLKNEQ*	213	205
OT-Rluc-004(ecDHFR(R12Y,Y100I)-リンカー(SG)-ウミシイタケルシフェラーゼのアミノ酸 2～311-終止)	MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKP VIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSV DEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDA EVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEIL ERRSGTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFIN YYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVPHIEPVARCI IPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKK IIFVGHDWGACLAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIES WDEWPDIEEDIALIKSEEGEKMVLENNFFVETMLPSKIM RKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGK PDVVQIVRNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEG AKKFPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLK	214	206

【表１４－４】

	NEQ*		
OT-Rluc-005(ウミシイタケLuc-リンカー(SG)-FKBP(E31G, F36V, R71G, K105E)-終止)	MTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDS EKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVPHIEPVARCIIPDL IGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFV GHDWGACLAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEW PDIEEDIALIKSEEGEKMVLENNFFVETMLPSKIMRKLE PEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVV QIVRNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKF PNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLKNEQS GGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGDGKKVDS SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTIS PDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	215	207
OT-Rluc-006(ウミシイタケLuc-リンカー(SG)-ecDHFR(野生型のアミノ酸２～159)(R12Y, Y100I)-終止)	MTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDS EKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVPHIEPVARCIIPDL IGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFV GHDWGACLAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEW PDIEEDIALIKSEEGEKMVLENNFFVETMLPSKIMRKLE PEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVV QIVRNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKF PNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLKNEQS GISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKP VIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSV DEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDA EVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEIL ERR*	216	208

【０３８７】

動物モデル

本発明の組成物の有用性及び効力を、ｉｎ　ｖｉｖｏ動物モデル、好ましくはマウスモデルで試験してもよい。使用するマウスモデルは、マウス細胞を本発明の組成物で改変し、同じ遺伝的バックグラウンドのマウスで試験する同系マウスモデルであってもよい。一例として、ｐＭＥＬ－１及び４Ｔ１マウスモデルが挙げられる。あるいは、腫瘍細胞や免疫細胞などのヒト細胞を免疫不全マウスに導入する異種移植モデルも、そのような研究において利用してもよい。使用する免疫不全マウスは、ＣＢｙＪ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１^{ｎｕ}／Ｊ、Ｂ６；１２９Ｓ７－Ｒａｇ１^{ｔｍ１Ｍｏｍ}／Ｊ、Ｂ６．１２９Ｓ７－Ｒａｇ１^{ｔｍ１Ｍｏｍ}／Ｊ、Ｂ６．ＣＢ１７－Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}／ＳｚＪ、ＮＯＤ．１２９Ｓ７（Ｂ６）－Ｒａｇ１^{ｔｍ１Ｍｏｍ}／Ｊ、ＮＯＤ．Ｃｇ－Ｒａｇ１^{ｔｍ１Ｍｏｍ}Ｐｒｆ１^{ｔｍ１Ｓｄｚ}／Ｓｚ、ＮＯＤ．ＣＢ１７－Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}／ＳｚＪ、ＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}Ｂ２ｍ^{ｔｍ１Ｕｎｃ}／Ｊ、ＮＯＤ－ｓｃｉｄ　ＩＬ２Ｒｇ^{ｎｕｌｌ}、ヌード（ｎｕ）マウス、ＳＣＩＤマウス、ＮＯＤマウス、ＲＡＧ１／ＲＡＧ２マウス、ＮＯＤ－Ｓｃｉｄマウス、ＩＬ２ｒｇｎｕｌｌマウス、ｂ２ｍｎｕｌｌマウス、ＮＯＤ－ｓｃｉｄ　ＩＬ２ｒγｎｕｌｌマウス、ＮＯＤ－ｓｃｉｄ－Ｂ２ｍｎｕｌｌマウス、及びＨＬＡトランスジェニックマウスであってもよい。

【０３８８】

細胞アッセイ

いくつかの実施形態では、免疫療法薬としての本発明の組成物の有効性を、細胞アッセイを使用して評価してもよい。本発明の組成物の発現レベル及び／または同一性は、タンパク質を同定するための、及び／またはタンパク質レベルを定量化するための当技術分野で公知の任意の方法に従って判定してもよい。いくつかの実施形態では、そのような方法には、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー、及び免疫アッセイが含まれ得る。

【０３８９】

本明細書において、本発明のＳＲＥ、生体回路及び組成物を発現する細胞を機能的に特徴付ける方法を提供する。いくつかの実施形態では、機能的特徴付けを、初代免疫細胞または不死化免疫細胞株で実施し、細胞表面マーカーの発現により決定してもよい。Ｔ細胞の細胞表面マーカーの例として、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１４、ＣＤ２０、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１６、ＣＤ４５及びＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ６９、ＣＤ２８、ＣＤ４４、ＩＦＮγ、ＰＤ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３が挙げられるが、これらに限定されない。抗原提示細胞の細胞表面マーカーの例として、ＭＨＣクラスＩ、ＭＨＣクラスＩＩ、ＣＤ４０、ＣＤ４５、Ｂ７－１、Ｂ７－２、ＩＦＮ－γ受容体及びＩＬ２受容体、ＩＣＡＭ－１及び／またはＦｃγ受容体が挙げられるが、これらに限定されない。樹状細胞の細胞表面マーカーの例として、ＭＨＣクラスＩ、ＭＨＣクラスＩＩ、Ｂ７－２、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ３１、ＣＤ４３、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ５４、ＣＤ５８、ＣＤ８３、ＣＤ８６、ＣＭＲＦ－４４、ＣＭＲＦ－５６、ＤＣＩＲ及び／またはデクチン－１などが挙げられるが、これらに限定されず；一方、いくつかの場合では、同時に、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ５６、及び／またはＣＤ５７が存在しない。ＮＫ細胞の細胞表面マーカーの例として、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＣＬ５、ＣＣＲ４、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ３、ＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ７１、ＣＤ６９、ＣＣＲ５、ホスホＪＡＫ／ＳＴＡＴ、ホスホＥＲＫ、ホスホｐ３８／ＭＡＰＫ、ホスホＡＫＴ、ホスホＳＴＡＴ３、グラヌリシン、グランザイムＢ、グランザイムＫ、ＩＬ１０、ＩＬ２２、ＩＦＮｇ、ＬＡＰ、パーフォリン、及びＴＮＦａが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３９０】

Ｖ．送達方法及び／またはベクター

ベクター

本発明はまた、生体回路、エフェクターモジュール、ＳＲＥ（ＤＤ）及びペイロード構築物、ならびにそれらの組み合わせをコードする本発明のポリヌクレオチドをパッケージングするベクターを提供する。本発明のベクターはまた、パッケージ化したポリヌクレオチドを細胞、局所的組織部位または対象に送達するために使用してもよい。これらのベクターは、ＤＮＡベクター、ＲＮＡベクター、プラスミド、ウイルスベクター及び粒子を含む任意の種類のものであってよい。ウイルスベクター技術は周知であり、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（２００１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）に記載されている。ベクターとして有用なウイルスとして、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、腫瘍溶解性ウイルスなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３９１】

一般的に、ベクターは、少なくとも１つの生物において機能的な複製起点、プロモーター配列及び簡便な制限エンドヌクレアーゼ部位、ならびに１つ以上の選択可能なマーカー、例えば薬剤耐性遺伝子を含む。

【０３９２】

本明細書中で使用する場合、プロモーターとは、本発明のポリヌクレオチド配列の特異的な転写を開始するために必要な、細胞の転写機構により認識されるＤＮＡ配列として定義される。ベクターには、本発明のポリヌクレオチドに作動可能に連結した天然または非天然のプロモーターを含ませることができる。選択したプロモーターは、強い、弱い、構

成的、誘導的、組織特異的、発育段階特異的、及び／または生物特異的であってもよい。適切なプロモーターの一例は、前初期サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに作動的に連結したポリヌクレオチド配列の発現を高レベルで駆動できる強力な構成的プロモーター配列である。好ましいプロモーターの別の例は、伸長成長因子－１．α（ＥＦ－１．α）プロモーターである。シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）プロモーター、マウス乳癌ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）プロモーター、末端反復配列（ＬＴＲ）、プロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターを含むがこれらに限定されない他の構成的プロモーター、ならびにホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、ユビキチンＣ（Ｕｂｃ）プロモーター、ヒトＵ６小核タンパク質プロモーター及びクレアチンキナーゼプロモーターを含むがこれらに限定されないヒト遺伝子プロモーターもまた、使用してよい。いくつかの例では、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリンプロモーターなどの誘導性プロモーターを使用してもよいが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号２２０～２２２、配列番号８３６から選択してもよい。

【０３９３】

いくつかの実施形態では、最適なプロモーターを、リガンドの非存在下では本発明のＳＲＥ及びペイロードの最小の発現を、及びリガンドの存在下では検出可能な発現を達成する能力に基づいて選択してもよい。

【０３９４】

追加のプロモーターエレメント、例えばエンハンサーを使用して、転写開始の頻度を調節してもよい。そのような領域を、開始部位の１０～１００塩基対上流または下流に配置してもよい。いくつかの例では、２つ以上のプロモーターエレメントを使用して、転写を協調的に、または独立して活性化してもよい。

【０３９５】

適切なベクターには、プラスミド及びウイルスなどの、増殖及び増大もしくは発現または両方のために設計されたベクターが含まれる。ベクターは、ｐＵＣシリーズ（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｇｌｅｎ Ｂｕｒｎｉｅ，ＭＤ）、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔシリーズ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）、ｐＥＴシリーズ（Ｎｏｖａｇｅｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）、ｐＧＥＸシリーズ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）、及びｐＥＸシリーズ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）からなる群から選択することができる。λＧＴ１０、λＧＴ１１、λＺａｐＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、λＥＭＢＬ４、及びλＮＭ１１４９などのバクテリオファージベクターも使用することができる。植物発現ベクターの例として、ｐＢＩ０１、ｐＢＩ１０１．２、ｐＢＩ１０１．３、ｐＢＩ１２１及びｐＢＩＮ１９（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）が挙げられる。動物発現ベクターの例として、ｐＥＵＫ－Ｃｌ、ｐＭＡＭ、及びｐＭＡＭｎｅｏ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）が挙げられる。組換え発現ベクターは、ウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターであってもよい。いくつかの実施形態では、ベクターはトランスポゾンであり得る。国際特許公開ＷＯ２０１４０６５９６１に開示されているベクターはいずれも、本発明において有用であり得る（その内容はその全体を参照により本明細書に援用する）。

【０３９６】

いくつかの実施形態では、組換え発現ベクターは、ベクターを導入する宿主細胞の種類に特異的な、転写ならびに翻訳開始及び終止コドンなどの調節配列を含み得る。

【０３９７】

１．レンチウイルスベクター

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクター／粒子を、ビヒクル及び送達様式として使用してもよい。レンチウイルスは、レトロウイルス科のウイルスのサブグループで

あり、これは、宿主ゲノムへの組み込みの前に、ウイルスＲＮＡゲノムからＤＮＡへの逆転写が必要であることから命名された。そのため、レンチウイルスのビヒクル／粒子の最も重要な特徴は、標的／宿主細胞のゲノムへの遺伝物質の組み込みである。レンチウイルスのいくつかの例として、ヒト免疫不全ウイルス：ＨＩＶ－１及びＨＩＶ－２、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ネコ免疫不全ウイルス（ＦＩＶ）、ウシ免疫不全ウイルス（ＢＩＶ）、ジェンブラナ病ウイルス（ＪＤＶ）、ウマ伝染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）、ウマ伝染性貧血ウイルス、ビスナ－マエディウイルス及びヤギ関節炎脳炎ウイルス（ＣＡＥＶ）が挙げられる。

【０３９８】

一般的には、遺伝子送達ビヒクルを構成するレンチウイルス粒子自体は、複製能を欠損している（「自己不活性化」とも呼ばれる）。レンチウイルスは、インタクトな宿主核エンベロープを介した進入機構により、分裂細胞と非分裂細胞の両方に感染することができる（Ｎａｌｄｉｎｉ Ｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，１９９８，９：４５７－４６３）。組換えレンチウイルスビヒクル／粒子は、ＨＩＶ病原性遺伝子を多重に減弱させることにより生成されており、例えば、Ｅｎｖ、Ｖｉｆ、Ｖｐｒ、Ｖｐｕ、Ｎｅｆ、及びＴａｔの遺伝子を削除してベクターを生物学的に安全なものとしている。同様に、例えばＨＩＶ－１／ＨＩＶ－２由来のレンチウイルスビヒクルは、非分裂細胞への導入遺伝子の効率的な送達、組み込み、及び長期発現を媒介することができる。本明細書中で使用する場合、用語「組換え」とは、レンチウイルス配列及び非レンチウイルス型レトロウイルス配列の両方を含むベクターまたは他の核酸を指す。

【０３９９】

レンチウイルス粒子は、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞などのプロデューサー細胞内でウイルスパッケージングエレメントとベクターゲノム自体を共発現させることにより生成してもよい。これらのエレメントは通常、３つ（第２世代のレンチウイルス系）または４つの別々のプラスミド（第３世代のレンチウイルス系）で提供される。ウイルスのコア（すなわち構造タンパク質）及び酵素成分、ならびにエンベロープタンパク質（複数可）を含むレンチウイルス成分をコードするプラスミド（パッケージング系と呼ばれる）、ならびに標的細胞に導入する外来導入遺伝子を含むゲノムをコードするプラスミド、すなわちビヒクル自体（導入ベクターとも呼ばれる）を、プロデューサー細胞に同時形質移入する。一般的に、プラスミドまたはベクターは、プロデューサー細胞株に含まれている。形質移入、形質導入、または感染を介してプラスミド／ベクターをプロデューサー細胞株に導入する。形質移入、形質導入または感染の方法は、当業者には周知である。非限定的な例として、リン酸カルシウム形質移入法、リポフェクションまたは電気穿孔法により、パッケージング及び導入用構築物をプロデューサー細胞株に導入した後に、通常、ｎｅｏ、ＤＨＦＲ、ＧｌｎシンテターゼまたはＡＤＡなどの優性選択マーカーを用いて、適切な薬物の存在下で選択し、クローンを分離することができる。

【０４００】

プロデューサー細胞は、外来遺伝子、例えば本発明のエフェクターモジュールを含む組換えウイルス粒子を産生する。培地から組換えウイルス粒子を回収し、当業者が用いる標準的な方法によって力価を測定する。組換えレンチウイルスビヒクルを用いて、標的細胞に感染させることができる。

【０４０１】

高力価レンチウイルス粒子を産生するために使用する細胞として、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、２９３Ｇ細胞、ＳＴＡＲ細胞（Ｒｅｌａｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２００５，１１：４５２－４５９）、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）２９３ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、及び他のＨＥＫ２９３Ｔベースのプロデューサー細胞株（例えば、Ｓｔｅｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１１，２２（３）：３５７－３６９；Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ，２０１２，１０９９６）：１５５１－１５６０；Ｔｈｒｏｍ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２００９，１１３（２１）：５

１０４－５１１０；各々の内容は、その全体を参照により本明細書に援用する）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４０２】

いくつかの態様では、エンベロープタンパク質は、水疱性口内炎ウイルスのＧタンパク質（ＶＳＶ　Ｇ）またはバキュロウイルスｇｐ６４エンベロープタンパク質などの、他のウイルス由来の異種エンベロープタンパク質であってもよい。ＶＳＶ－Ｇ糖タンパク質は、特にベシクロウイルス属に分類される種：カラジャスウイルス（ＣＪＳＶ）、チャンディプラウイルス（ＣＨＰＶ）、球菌ウイルス（ＣＯＣＶ）、イスファハンウイルス（ＩＳＦＶ）、マラバウイルス（ＭＡＲＡＶ）、ピリウイルス（ＰＩＲＹＶ）、水疱性口内炎アラゴアスウイルス（ＶＳＡＶ）、水疱性口内炎インディアナウイルス（ＶＳＩＶ）及び水胞性口内炎ニュージャージウイルス（ＶＳＮＪＶ）、及び／またはソウギョラブドウイルス、ＢｅＡｎ１５７５７５ウイルス（ＢｅＡｎ１５７５７５）、ボテクウイルス（ＢＴＫＶ）、カルチャキウイルス（ＣＱＩＶ）、エルウイルスアメリカン（ＥＶＡ）、グレーロッジウイルス（ＧＬＯＶ）、ユロナウイルス（ＪＵＲＹ）、クラマスウイルス（ＫＬＡＶ）、クワッタウイルス（ＫＷＡＶ）、ラホヤウイルス（ＬＪＶ）、マルペススプリングウイルス（ＭＳＰＶ）、エルゴン山コウモリウイルス（ＭＥＢＶ）、ペリネトウイルス（ＰＥＲＶ）、パイクフライラブドウイルス（ＰＦＲＶ）、ポートンウイルス（ＰＯＲＶ）、Ｒａｄｉウイルス（ＲＡＤＩＶ）、コイ春季ウイルス血症ウイルス（ＳＶＣＶ）、ツパイウイルス（ＴＵＰＶ）、潰瘍性疾患ラブドウイルス（ＵＤＲＶ）及びヤグボグダノバクウイルス（ＹＢＶ）としてベシクロウイルス属に仮分類される株から選択してもよい。ｇｐ６４または他のバキュロウイルスｅｎｖタンパク質は、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）、Ａｎａｇｒａｐｈａ　ｆａｌｃｉｆｅｒａ核多角体病ウイルス、Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ核多角体病ウイルス、Ｃｈｏｒｉｓｔｏｎｅｕｒａ　ｆｕｍｉｆｅｒａｎａ核多角体病ウイルス、Ｏｒｇｙｉａ　ｐｓｅｕｄｏｔｓｕｇａｔａ単一キャプシド核多角体病ウイルス、Ｅｐｉｐｈｙａｓ　ｐｏｓｔｖｉｔｔａｎａ核多角体病ウイルス、Ｈｙｐｈａｎｔｒｉａ　ｃｕｎｅａ核多角体病ウイルス、Ｇａｌｌｅｒｉａ　ｍｅｌｌｏｎｅｌｌａ核多角体病ウイルス、ドーリウイルス、トゴトウイルス、Ａｎｔｈｅｒａｅａ　ｐｅｍｙｉ核多角体病ウイルスまたはバトケンウイルス由来のものとすることができる。

【０４０３】

レンチウイルス粒子において提供する追加のエレメントには、５’または３’末端のいずれかにおけるレトロウイルスＬＴＲ（末端反復配列）、レトロウイルス輸送エレメント、場合によりレンチウイルス逆応答エレメント（ＲＲＥ）、そのプロモーターまたは活性部分、及び遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）またはその活性部分を含めてもよい。他のエレメントとして、非分裂細胞の形質導入効率を向上させるセントラルポリプリントラクト配列（ｃＰＰＴ）配列、導入遺伝子の発現を高め、力価を高めるウッドチャック肝炎ウイルス（ＷＨＰ）転写後調節因子（ＷＰＲＥ）が挙げられる。エフェクターモジュールはベクターに連結させる。

【０４０４】

組換えレンチウイルス粒子の生成方法は、当技術分野において、例えば、米国特許第８，８４６，３８５号；第７，７４５，１７９号；第７，６２９，１５３号；第７，５７５，９２４号；第７，１７９，９０３号；及び６，８０８，９０５号で論じられており；その各々の内容は、その全体を参照により本明細書に援用する。

【０４０５】

使用するレンチウイルスベクターは、ｐＬＶＸ、ｐＬｅｎｔｉ、ｐＬｅｎｔｉ６、ｐＬＪＭ１、ＦＵＧＷ、ｐＷＰＸＬ、ｐＷＰＩ、ｐＬｅｎｔｉ　ＣＭＶ　ｐｕｒｏ　ＤＥＳＴ、ｐＬＪＭ１－ＥＧＦＰ、ｐＵＬＴＲＡ、ｐＩｎｄｕｃｅｒ２０、ｐＨＩＶ－ＥＧＦＰ、ｐＣＷ５７．１、ｐＴＲＰＥ、ｐＥＬＰＳ、ｐＲＲＬ、及びｐＬｉｏｎＩＩから選択され得るが、これらに限定されない。

【０４０６】

また、当技術分野で公知のレンチウイルスビヒクルを使用してもよい（米国特許第９，２６０，７２５号；第９，０６８，１９９号；第９，０２３，６４６号；第８，９００，８５８号；第８，７４８，１６９号；第８，７０９，７９９号；第８，４２０，１０４号；第８，３２９，４６２号；第８，０７６，１０６号；第６，０１３，５１６号；及び第５，９９４，１３６号；国際特許公開第ＷＯ２０１２０７９０００号参照；その各々の内容は、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４０７】

２．レトロウイルスベクター（γ－レトロウイルスベクター）

いくつかの実施形態では、レトロウイルスベクターを使用して、本発明の生体回路、生体回路の構成要素、エフェクターモジュール、ＳＲＥまたはペイロード構築物をパッケージングし、送達してもよい。レトロウイルスベクター（ＲＶ）により、導入遺伝子を標的細胞へ永久的に組み込むことができる。複雑なＨＩＶ－１／２に基づくレンチウイルスベクターに加えて、単純なγレトロウイルスに基づくレトロウイルスベクターは、治療遺伝子を送達するために広く使用されており、広い範囲の細胞型に形質導入することができる最も効率的かつ強力な遺伝子送達系の１つとして臨床的に実証されている。γレトロウイルスの例示的な種として、マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）及びネコ白血病ウイルス（ＦｅＬＶ）が挙げられる。

【０４０８】

いくつかの実施形態では、マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）などの哺乳類γレトロウイルス由来のγレトロウイルスベクターは、組換え体である。γレトロウイルスのＭＬＶファミリーは、同種指向性、両種指向性、異種指向性及び多指向性のサブファミリーを含む。同種指向性ウイルスは、ｍＣＡＴ－１受容体を使用するマウス細胞にのみ感染可能である。同種指向性ウイルスの例は、Ｍｏｌｏｎｅｙ　ＭＬＶ及びＡＫＶである。両種指向性ウイルスは、Ｐｉｔ－２受容体を介して、マウス、ヒト及び他の種に感染する。両種指向性ウイルスの一例は、４０７０Ａウイルスである。異種指向性及び多指向性ウイルスは、同じ（Ｘｐｒ１）受容体を利用するが、それらの種の指向性の点で異なる。ＮＺＢ－９－１などの異種指向性ウイルスは、ヒト及び他の種に感染するが、マウス種には感染せず、一方、フォーカス形成ウイルス（ＭＣＦ）などの多指向性ウイルスは、マウス、ヒト及び他の種に感染する。

【０４０９】

レトロウイルスの構造的及び酵素的（ｇａｇ－ｐｏｌ）ポリプロテインをコードするプラスミド、エンベロープ（ｅｎｖ）タンパク質をコードするプラスミド、及び本発明の組成物をコードするポリヌクレオチドを含むベクターｍＲＮＡをコードするプラスミドを含む、いくつかのプラスミドを細胞に同時形質移入することにより、パッケージング細胞内でγレトロウイルスベクターを産生してもよく、これらはパッケージングされて新規に形成されるウイルス粒子となる。

【０４１０】

いくつかの態様では、組換えγレトロウイルスベクターは、他のウイルス由来のエンベロープタンパク質を有するシュードタイプである。エンベロープ糖タンパク質は、ウイルス粒子の外部脂質層に組み込まれ、細胞の指向性を高める／変化させることができる。例示的なエンベロープタンパク質として、テナガザル白血病ウイルスエンベロープタンパク質（ＧＡＬＶ）もしくは水疱性口内炎ウイルスＧタンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）、またはサル内在性レトロウイルスエンベロープタンパク質、または麻疹ウイルスＨ及びＦタンパク質、またはヒト免疫不全ウイルスｇｐ１２０エンベロープタンパク質、または球菌ベシクロウイルスエンベロープタンパク質（例えば、米国出願公開第２０１２／１６４１１８号参照；その内容は、その全体を参照により本明細書に援用する）が挙げられる。他の態様では、ターゲティング／結合リガンドをγレトロウイルスベクターに組み込むように、エンベロープ糖タンパク質を遺伝子改変してもよく、結合リガンドには、ペプチドリガンド、単鎖抗体及び増殖因子が含まれるが、これらに限定されない（Ｗａｅｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２００７，８（８）：５７３－５８７：５７３－５

８７；その内容は、その全体を参照により本明細書に援用する）。これらの改変糖タンパク質は、対応する標的部分を発現する細胞にベクターを再標的化することができる。他の態様では、「分子架橋」を導入して、ベクターを特定の細胞に向かわせてもよい。分子架橋は二重の特異性を有し：一方の端はウイルスの糖タンパク質を認識することができ、もう一方の端は標的細胞の分子決定基に結合することができる。そのような分子架橋、例えば、リガンド受容体、アビジン－ビオチン、及び化学的コンジュゲーション、モノクローナル抗体及び改変型膜融合タンパク質は、形質導入用の標的細胞へウイルスベクターを付着させることができる（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，２００８，１０１（２）：３５７－３６８；及びＭａｅｔｚｉｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｉｒｕｓｅｓ，２０１１，３，６７７－７１３；これらの各々の内容は、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４１１】

いくつかの実施形態では、組換えγレトロウイルスベクターは自己不活性化（ＳＩＮ）γレトロウイルスベクターである。ベクターは複製不能である。ＳＩＮベクターは、エンハンサー／プロモーター活性を初期に有する３’Ｕ３領域内に欠失を含む場合がある。さらに、５’Ｕ３領域は、サイトメガロウイルスまたはＲＳＶ由来の強力なプロモーター（パッケージング細胞株に必要）、または選択した内部プロモーター、及び／またはエンハンサーエレメントで置き換えてもよい。本発明の特定の目的に必要な遺伝子発現の特定の要件に従って、内部プロモーターの選択を行ってもよい。

【０４１２】

いくつかの実施形態では、生体回路、生体回路の構成要素、エフェクターモジュール、及びＳＲＥをコードするポリヌクレオチドを、組換えウイルスゲノム内に挿入する。組換えγレトロウイルスベクターのウイルスｍＲＮＡの他の構成要素を、天然配列の挿入または除去（例えば、ＩＲＥＳの挿入、目的のポリペプチドまたは阻害核酸をコードする異種ポリヌクレオチドの挿入、野生型プロモーターの代わりに異なるレトロウイルスまたはウイルス由来のより効果的なプロモーターのシャッフリングなど）により改変してもよい。いくつかの実施例では、組換えγレトロウイルスベクターは、５’－末端反復配列（ＬＴＲ）のＵ３領域に、改変されたパッケージングシグナル、及び／またはプライマー結合部位（ＰＢＳ）、及び／または５’－エンハンサー／プロモーターエレメントを、及び／または３’－ＬＴＲのＵ３領域において改変された３’－ＳＩＮエレメントを含み得る。これらの改変は、力価と感染能力を高め得る。

【０４１３】

本発明の生体回路の構成要素、エフェクターモジュール、ＳＲＥまたはペイロード構築物を送達するのに適したγレトロウイルスベクターは、米国特許第８，８２８，７１８号；第７，５８５，６７６号；第７，３５１，５８５号；米国出願公開第２００７／０４８２８５号；ＰＣＴ出願公開第ＷＯ２０１０／１１３０３７号；第ＷＯ２０１４／１２１００５号；第ＷＯ２０１５／０５６０１４号；及びＥＰ特許第ＥＰ１７５７７０２号；第ＥＰ１７５７７０３号に開示されているベクターから選択してもよい（各々の内容は、その全体を参照により本明細書に援用する）。

【０４１４】

３．アデノ随伴ウイルスベクター（ＡＡＶ）

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドを、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターにパッケージングしてもよい。そのようなベクターまたはウイルス粒子を、公知の血清型キャプシドのいずれかまたは血清型キャプシドの組み合わせを利用するように設計してもよい。血清型キャプシドには、任意の同定されたＡＡＶ血清型及びそのバリアント、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ２Ｇ９、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ４－４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２及びＡＡＶｒｈ１０由来のキャプシドが含まれ得る。

【０４１５】

一実施形態では、ＡＡＶ血清型は、その全体を参照により本明細書に援用する米国公開

第ＵＳ２００３０１３８７７２号に記載の配列、例えば、限定するものではないが、ＡＡＶ１（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号６及び６４）、ＡＡＶ２（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号７及び７０）、ＡＡＶ３（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号８及び７１）、ＡＡＶ４（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号６３）、ＡＡＶ５（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号１１４）、ＡＡＶ６（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号６５）、ＡＡＶ７（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号１～３）、ＡＡＶ８（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号４及び９５）、ＡＡＶ９（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号５及び１００）、ＡＡＶ１０（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号１１７）、ＡＡＶ１１（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号１１８）、ＡＡＶ１２（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号１１９）、ＡＡＶｒｈ１０（ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号８１のアミノ酸１～７３８）またはそのバリアントであるか、またはその配列を有し得る。バリアントの非限定的な例として、ＵＳ２００３０１３８７７２の配列番号９、２７～４５、４７～６２、６６～６９、７３～８１、８４～９４、９６、９７、９９、１０１～１１３が挙げられ、その内容は、その全体を参照により本明細書に援用する。

【０４１６】

一実施形態では、ＡＡＶ血清型は、Ｐｕｌｉｃｈｅｒｌａ ｅｔ ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１１，１９（６）：１０７０－１０７８）、米国特許第６，１５６，３０３号；第７，１９８，９５１号；米国特許公開第ＵＳ２０１５／０１５９１７３号及び第ＵＳ２０１４／０３５９７９９号；ならびに国際特許公開第ＷＯ１９９８／０１１２４４号、第ＷＯ２００５／０３３３２１号及び第ＷＯ２０１４／１４４２２号に記載の配列を有していてもよく；その各々の内容は、その全体を参照により本明細書に援用する。

【０４１７】

ＡＡＶベクターには、一本鎖ベクターだけでなく、自己相補的ＡＡＶベクター（ｓｃＡＡＶ）が含まれる。ｓｃＡＡＶベクターは、一緒にアニールして二本鎖ベクターゲノムを形成するＤＮＡを含む。第二の鎖合成をスキップすることにより、ｓｃＡＡＶは細胞内で迅速に発現可能である。

【０４１８】

ｒＡＡＶベクターは、ｓｆ９昆虫細胞内、またはＨＥＫ２９３細胞などのヒト細胞の懸濁細胞培養液中で、三重形質移入などの当技術分野の標準的な方法によって製造してもよい。

【０４１９】

本明細書において示すＡＡＶキャプシドにパッケージングされる１つ以上のウイルスゲノムに、生体回路、生体回路の構成要素、エフェクターモジュール、ＳＲＥ、またはペイロード構築物をコードしてもよい。

【０４２０】

そのようなベクターまたはウイルスゲノムは、少なくとも１つまたは２つのＩＴＲ（末端逆位配列）に加えて、ベクターまたはウイルスゲノムからの発現に必要な特定の調節エレメントも含み得る。そのような調節エレメントは当技術分野で周知であり、例えば、プロモーター、イントロン、スペーサー、スタッファー配列などが挙げられる。

【０４２１】

いくつかの実施形態では、１つより多くのエフェクターモジュールまたはＳＲＥ（例えば、ＤＤ）をウイルスゲノムにコードしてもよい。

【０４２２】

４．腫瘍溶解性ウイルスベクター

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドを、ワクチンウイルスなどの腫瘍溶解性ウイルスにパッケージングしてもよい。腫瘍溶解性ワクチンウイルスとして、腫瘍細胞の腫瘍溶解を誘導するのに十分な、チミジンキナーゼ（ＴＫ）欠損型顆粒球マクロファージ（ＧＭ）コロニー刺激因子（ＣＳＦ）発現性複製可能型ワクシニアウイルスベクタ

ーのウイルス粒子が挙げられる（例えば、米国特許第９，２２６，９７７号；その内容はその全体を参照により援用する）。

【０４２３】

５．メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）

いくつかの実施形態では、本発明のエフェクターモジュールを、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）として設計してもよい。本明細書中で使用する場合、用語「メッセンジャーＲＮＡ」（ｍＲＮＡ）とは、目的のポリペプチドをコードし、ｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｉｎ ｖｉｖｏ、ｉｎ ｓｉｔｕまたはｅｘ ｖｉｖｏで翻訳され、コードされた目的ポリペプチドを産生することができる任意のポリヌクレオチドを指す。そのようなｍＲＮＡ分子は、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０３００６２に示されているもののいずれかの構造成分または特徴を有していてもよく、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。

【０４２４】

本発明のポリヌクレオチドを、例えば、その全体を参照により本明細書に援用する、Ｒｉｂｏｓｔｅｍ Ｌｉｍｉｔｅｄの、２００３年７月９日に出願され、現在は放棄されている英国特許出願第０３１６０８９．２号、２００４年７月９日に出願され、ＷＯ２００５００５６２２として公開されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＧＢ２００４／００２９８１号、２００６年６月８日に出願され、ＵＳ２００６０２４７１９５として公開され、現在は放棄されている米国特許出願国内段階登録第１０／５６３，８９７号、及び２００４年７月９日に出願され、ＥＰ１６４６７１４として公開され、現在は撤回されている欧州特許出願国内段階登録第ＥＰ２００４７４３３２２号；Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ，Ｉｎｃ．の、２００７年１２月１９日に出願され、ＷＯ２００８１４０６１５として公開されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００７／８８０６０号、２００９年７月２日に出願され、ＵＳ２０１０００２８９４３として公開された米国特許出願国内段階登録第１２／５２０，０７２号及び２００９年７月７日に出願され、ＥＰ２１０４７３９として公開された欧州特許出願国内段階第ＥＰ２００７８７４３７６号；ロチェスター大学の、２００６年１２月４日に出願され、ＷＯ２００７０６４９５２として公開されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００６／４６１２０号及び２００６年１２月１日に出願され、ＵＳ２００７０１４１０３０として公開された米国特許出願第１１／６０６，９９５号、ＢｉｏＮＴｅｃｈ ＡＧの、２００７年１２月１４日に出願され、現在は放棄されている欧州特許出願第ＥＰ２００７０２４３１２号、２００８年１２月１２日に出願され、ＷＯ２００９０７７１３４として公開されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＥＰ２００８／０１０５９号、２０１０年６月２日に出願され、ＥＰ２２４０５７２として公開された欧州特許出願国内段階登録第ＥＰ２００８８６１４２３号、２０１０年１１月２４日に出願され、ＵＳ２０１１００６５１０３として公開された米国特許出願国内段階登録第１２／，７３５，０６０号、２００５年９月２８日に出願されたドイツ特許出願第ＤＥ１０２００５０４６４９０号、２００６年９月２８日に出願され、ＷＯ２００７０３６３６６として公開されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＥＰ２００６／０４４８、２０１２年３月２１日に公開された欧州特許国内段階ＥＰ１９３４３４５及び２００９年８月１４日に出願され、２０１００１２９８７７として公開された米国特許出願国内段階第１１／９９２，６３８号；Ｉｍｍｕｎｅ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｉｎｃ．の、２０１１年４月１５日に出願され、ＵＳ２０１２００４６３４６として公開された米国特許出願第１３／０８８，００９号、２０１１年４月１５日に出願され、ＷＯ２０１１０１３０６２４として公開されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／３２６７９；Ｓｈｉｒｅ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓの、２０１０年１１月２０日に出願され、ＵＳ２０１１０２４４０２６として公開された米国特許出願第１２／９５７，３４０号；Ｓｅｑｕｉｔｕｒ Ｉｎｃ．の、１９９８年９月１８日に出願され、ＷＯ１９９９０１４３４６として公開されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ１９９８／０１９４９２；Ｓｃｒｉｐｐｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅの、２０１０年２月２４日に出願され、ＷＯ２０１００９８８６１として公開されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１０／００５６７号、及び２０１１年１１月３日に出願され、ＵＳ２

０１２００５３３３３として公開された米国特許出願国内段階登録第１３／２０３，２２９号；Ｌｕｄｗｉｇ－Ｍａｘｉｍｉｌｌｉａｎｓ大学の、２０１０年７月３０日に出願され、ＷＯ２０１１０１２３１６として公開されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＥＰ２０１０／００４６８１号；Ｃｅｌｌｓｃｒｉｐｔ　Ｉｎｃ．の、２００８年６月３０日に出願され、２０１１年１０月１８日に特許された米国特許第８，０３９，２１４号、２０１０年１２月７日に出願され、ＵＳ２０１１０１４３４３６として公開された米国特許出願第１２／９６２，４９８号、２０１０年１２月７日に出願され、ＵＳ２０１１０１４３３９７として公開された第１２／９６２，４６８号、２０１１年９月２０日に出願され、ＵＳ２０１２０００９６４９として公開された第１３／２３７，４５１号、及び２０１０年１２月７日に出願され、ＷＯ２０１１０７１９３１として公開されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１０／５９３０５及び２０１０年１２月７日に出願され、ＷＯ２０１１０７１９３６として公開されたＰＣＴ／ＵＳ２０１０／５９３１７；ペンシルベニア大学受託者の、２００６年８月２１日に出願され、ＷＯ２００７０２４７０８として公開されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００６／３２３７２号、及び２００９年３月２７日に出願され、ＵＳ２００９０２８６８５２として公開された米国特許出願国内段階登録第１１／９９０，６４６号；Ｃｕｒｅｖａｃ　ＧＭＢＨの、いずれも放棄された、２００１年６月５日に出願されたドイツ特許出願第ＤＥ１０２００１０２７２８３．９号、２００１年１２月１９日に出願された第ＤＥ１０２００１０６２４８０．８号、及び２００６年１０月３１日に出願された第ＤＥ２０２００６０５１５１６号、２００５年３月３０日に特許された欧州特許第ＥＰ１３９２３４１号及び２００８年１月２日に特許された第ＥＰ１４５８４１０号、２００２年６月５日に出願され、ＷＯ２００２０９８４４３として公開されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＥＰ２００２／０６１８０号、２００２年１２月１９日に出願され、ＷＯ２００３０５１４０１として公開された第ＰＣＴ／ＥＰ２００２／１４５７７号、２００７年１２月３１日に出願され、ＷＯ２００８０５２７７０として公開された第ＰＣＴ／ＥＰ２００７／０９４６９号、２００８年４月１６日に出願され、ＷＯ２００９１２７２３０として公開された第ＰＣＴ／ＥＰ２００８／０３０３３号、２００５年５月１９日に出願され、ＷＯ２００６１２２８２８として公開されたＰＣＴ／ＥＰ２００６／００４７８４、２００７年１月９日に出願され、ＷＯ２００８０８３９４９として公開された第ＰＣＴ／ＥＰ２００８／０００８１号、２００３年１２月５日に出願され、ＵＳ２００５００３２７３０として公開された米国特許出願第１０／７２９，８３０号、２００４年６月１８日に出願され、ＵＳ２００５００５９６２４として公開された第１０／８７０，１１０号、２００８年７月７日に出願され、ＵＳ２００８０２６７８７３として公開された第１１／９１４，９４５号、２００９年１０月２７日に出願され、ＵＳ２０１００４７２６１として公開され、現在は放棄されている第１２／４４６，９１２号、２０１０年１月４日に出願され、ＵＳ２０１００１８９７２９として公開された第１２／５２２，２１４号、２０１０年５月２６日に出願され、ＵＳ２０１１００７７２８７として公開された第１２／７８７，５６６号、２０１０年５月２６日に出願され、ＵＳ２０１００２３９６０８として公開された第１２／７８７，７５５号、２０１１年７月１８日に出願され、ＵＳ２０１１０２６９９５０として公開された第１３／１８５，１１９号、及び２０１１年５月１２日に出願され、ＵＳ２０１１０３１１４７２として公開された第１３／１０６，５４８号に示されているように設計してもよい。

【０４２５】

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールを自己増幅ＲＮＡとして設計してもよい。本明細書中で使用する「自己増幅ＲＮＡ」とは、宿主内で複製することができ、ＲＮＡ及びＲＮＡによってコードされるタンパク質の量を増加させることができるＲＮＡ分子を指す。そのような自己増幅ＲＮＡは、国際特許出願公開第ＷＯ２０１１００５７９９号（その内容は、その全体を参照により本明細書に援用する）に示されているもののいずれかの構造的特徴または成分を有し得る。

【０４２６】

ＶＩ．投薬、送達及び投与

本発明の組成物を、１つ以上の経路及び様式を介して細胞または対象に送達してもよい。本明細書に記載の１つ以上のエフェクターモジュール、ＳＲＥ、免疫療法薬、及び他の構成要素を含むウイルスベクターを使用して、それらを細胞及び／または対象に送達してもよい。ｍＲＮＡ、プラスミド、及び組換えタンパク質などの他の様式も使用してよい。

【０４２７】

１．細胞への送達

本発明の別の態様では、本発明の生体回路、エフェクターモジュール、ＳＲＥ（例えば、ＤＤ）、目的ペイロード（免疫療法薬）及び組成物をコードするポリヌクレオチドならびに前記ポリヌクレオチドを含むベクターを免疫エフェクター細胞などの細胞に導入してもよい。

【０４２８】

本発明の一態様では、本発明の生体回路、エフェクターモジュール、ＳＲＥ（例えば、ＤＤ）、目的ペイロード（免疫療法薬）及び組成物をコードするポリヌクレオチドを、ウイルスベクターにパッケージングするか、またはウイルスゲノムに組み込んで、ポリヌクレオチドの一過性または安定した発現を可能にしてもよい。好ましいウイルスベクターは、レンチウイルスベクターを含むレトロウイルスベクターである。レトロウイルスベクターを構築するために、生体回路、エフェクターモジュール、ＤＤまたは目的ペイロード（すなわち免疫療法薬）をコードするポリヌクレオチド分子を、ウイルスゲノムの特定のウイルス配列の位置に挿入し、複製能を欠損させたウイルスを産生させる。次いで、組換えウイルスベクターを、ｇａｇ、ｐｏｌ、及びｅｎｖ遺伝子を含むが、ＬＴＲ及びパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株に導入する。組換えレトロウイルス粒子を培地に分泌させ、収集し、必要に応じて濃縮し、遺伝子導入に使用する。レンチウイルスベクターは、分裂細胞と非分裂細胞の両方に感染することができるため、特に好ましい。

【０４２９】

また、ベクターを、針、電気穿孔法、ソノポレーション、ハイドロポレーションなどの物理的方法；無機粒子（例えば、リン酸カルシウム、シリカ、金）などの化学的担体及び／または化学的方法によって、非ウイルス法で細胞に移入してもよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質、脂質ナノエマルジョン、ナノ粒子、ペプチドベースのベクター、またはポリマーベースのベクターなどの合成または天然の生分解性薬剤を送達に使用してもよい。

【０４３０】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドを細胞に直接送達してもよい。一実施形態では、本発明のポリペプチドを、細胞透過性ドメイン（ＣＬＤ）に融合させたエンドソーム漏出ドメイン（ＥＬＤ）を含む合成ペプチドを使用して送達してもよい。本発明のポリペプチドを、ＥＬＤ－ＣＬＤ－合成ペプチドと共に細胞に同時導入する。ＥＬＤは、エンドソーム内に捕捉されたタンパク質のサイトゾルへのエスケープを促進する。そのようなドメインは、微生物及びウイルス起源由来のタンパク質であり、当技術分野において記載されている。ＣＰＤは、原形質膜を通過するタンパク質の輸送を可能にし、これもまた、当技術分野において記載されている。ＥＬＤ－ＣＬＤ融合タンパク質は、いずれかのドメインのみとの同時形質導入と比較した場合、相乗的に形質導入効率を高める。いくつかの実施形態では、エンドソームからサイトゾルへのカーゴのエスケープを可能にする追加の方法として、ヒスチジンリッチドメインを必要に応じてシャトル構築物に追加してもよい。また、シャトルには、融合ペプチドの多量体を生成するために、ＮまたはＣ末端にシステイン残基を含ませてもよい。システイン残基をペプチドの末端に付加することにより生成されるＥＬＤ－ＣＬＤ融合ペプチドの多量体は、単一の融合ペプチド構築物と比較した場合、さらに高い形質導入効率を示す。また、本発明のポリペプチドを適切な局在化シグナルに付加して、カーゴを適切な細胞内位置、例えば核に向かわせてもよい。いくつかの実施形態では、国際特許公開ＷＯ２０１６１６１５１６及びＷＯ２０１７１７５０７２に示されているＥＬＤ、ＣＬＤまたは融合ＥＬＤ－ＣＬＤ合成ペプチドのいずれかが、本発明において有用である可能性がある（各々の内容はその全体を参照により本明細書に

援用する）。
【０４３１】
２．投薬
本発明は、免疫療法のための任意の１つ以上の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。これらを、がん、感染症及び他の免疫不全疾患などの臨床状態を予防または治療するのに有効な任意の量及び任意の投与経路を使用して対象に投与してもよい。
【０４３２】
本発明による組成物は、通常、投与の容易さ及び投薬量の均一性のために単位剤形で製剤化する。しかしながら、本発明の組成物の総１日使用量は、健全な医学的判断の範囲内で担当医が決定してもよいことが理解されるであろう。任意の特定の患者に対する特定の治療上有効な、または予防上有効な用量レベルは、治療中の障害及び障害の重症度を含む様々な要因に依存する。使用する特定の化合物の活性；使用する特定の組成物；患者の年齢、体重、健康全般、性別及び食事；投与時間、投与経路、以前または同時期の治療的介入、及び使用する特定の化合物の排出率；治療期間；使用する特定の化合物と併用または同時使用する薬物；ならびに医学分野で周知の同様の要因を含む、様々な要因に依存するであろう。
【０４３３】
本発明の組成物は、Ｔ細胞エネルギーを回避し、サイトカイン放出症候群を予防し、免疫療法に関連する毒性を最小化するために、様々な用量で使用してもよい。例えば、本発明の組成物を、高い腫瘍量を有する患者を初期に治療するために低用量で使用し、一方、低い腫瘍量を有する患者を、高用量及び反復用量の本発明の組成物を用いて治療し、確実に腫瘍抗原負荷の認識を最小化させる。別の例では、本発明の組成物を、パルス状の様式で送達して、持続性のＴ細胞シグナル伝達を低下させ、ｉｎ　ｖｉｖｏでの持続性を増強してもよい。いくつかの態様では、高用量を投与する前に、低用量の本発明の組成物を初期に使用することにより、毒性を最小化してもよい。フェリチン、血清Ｃ反応性タンパク質、ＩＬ６、ＩＦＮ－γ、及びＴＮＦ－αなどの血清マーカーが上昇している場合、投薬量を変更してもよい。
【０４３４】
３．投与
いくつかの実施形態では、免疫療法用の組成物を、ｅｘ　ｖｉｖｏで細胞に投与し、続いて対象に投与してもよい。免疫細胞は、当技術分野で公知の様々な方法を使用して、ｅｘ　ｖｉｖｏで単離及び増殖させてもよい。例えば、細胞傷害性Ｔ細胞の単離方法は、米国特許第６，８０５，８６１号及び第６，５３１，４５１号に記載されており；その各々の内容は、その全体を参照により本明細書に援用する。ＮＫ細胞の単離については、米国特許第７，４３５，５９６号に記載されており；その内容は、その全体を参照により本明細書に援用する。
【０４３５】
いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、２０１６年４月１１日に出願された同時係属中の共有米国仮特許出願第６２／３２０，８６４号、または２０１７年３月３日に出願された米国仮特許出願第６２／４６６，５９６号、及び国際公開ＷＯ２０１７／１８０５８７に示される投与方法のいずれかによって投与してもよく、その内容はその全体を参照により本明細書に援用する。
【０４３６】
いくつかの実施形態では、細胞の性質に応じて、細胞を宿主生物、例えば哺乳類に、注射、輸血、注入、局所滴下または移植を含む様々な方法で導入してもよい。いくつかの態様では、本発明の細胞を腫瘍部位に導入してもよい。使用する細胞の数は、多くの状況、導入の目的、細胞の寿命、使用するプロトコール、例えば投与回数、細胞の増殖能力などに依存するであろう。細胞は、生理学的に許容される培地中に存在させてもよい。
【０４３７】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞を、疾患または病態を有する対象に複数用量で投与してもよい。投与は、一般的に、がんまたは臨床状態の１つ以上の症状の改善をもたらし、及び／またはがんもしくは臨床状態またはその症状を治療または予防する。

【０４３８】

いくつかの実施形態では、免疫療法用の組成物を、ｉｎ　ｖｉｖｏで投与してもよい。いくつかの実施形態では、本発明の生体回路、エフェクター分子、ＳＲＥ、目的ペイロード（免疫療法薬）及び組成物を含む本発明のポリペプチドを、対象にｉｎ　ｖｉｖｏで送達してもよい。免疫療法薬のｉｎ　ｖｉｖｏ送達は、当技術分野で十分に説明されている。例えば、サイトカインの送達方法は、欧州特許第ＥＰ０９３０８９２Ａ１号に記載されており、その内容は参照により本明細書に援用する。

【０４３９】

一実施形態では、本発明のペイロードを、ＳＨＰ－１及び／またはＳＨＰ－２の阻害剤とともに投与してもよい。チロシンタンパク質ホスファターゼＳＨＰ１（ＰＴＰＮ６としても知られる）及びＳＨＰ２（ＰＴＰＮ１１としても知られる）は、プログラム細胞死（ＰＤ１）抑制シグナル伝達経路に関与している。ＰＤ１の細胞内ドメインは、免疫受容抑制性チロシンモチーフ（ＩＴＩＭ）及び免疫受容体チロシン系スイッチモチーフ（ＩＴＳＭ）を含む。ＩＴＳＭは、ＳＨＰ－１及びＳＨＰ－２をリクルートすることが示されている。これにより、近位ＴＣＲシグナル伝達分子の脱リン酸化を誘発する負の共刺激マイクロクラスターが生成され、これにより、Ｔ細胞活性化の抑制がもたらされ、Ｔ細胞の枯渇を招き得る。一実施形態では、ＳＨＰ－１及びＳＨＰ－２の阻害剤は、枯渇を軽減するために、Ｔ細胞、ＴＩＬまたは他の細胞型において、タンパク質のドミナントネガティブバージョンを発現することを含み得る。そのような変異体は、内在性の触媒的に活性なタンパク質に結合し、その機能を阻害し得る。一実施形態では、ＳＨＰ－１及び／またはＳＨＰ－２のドミナントネガティブ変異体は、触媒活性に必要なホスファターゼドメインを欠失している。いくつかの実施形態では、Ｂｅｒｇｅｒｏｎ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ．２０１１　Ｄｅｃ；１５２（１２）：４５８１－８．；Ｄｕｓｔｉｎ　ＪＢ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍａｒ　１；１６２（５）：２７１７－２４．；Ｂｅｒｃｈｔｏｌｄ　Ｓ（１９９８）Ｍｏｌ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ａｐｒ；１２（４）：５５６－６７及びＳｃｈｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ａｍ　Ｊ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　Ｈｅａｒｔ　Ｃｉｒｃ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．１；３０２（１）：Ｈ２３１－４３に示されるドミナントネガティブＳＨＰ－１変異体のいずれかは、本発明において有用であり得る（各々の内容は、その全体を参照により援用する）。

【０４４０】

送達経路

本発明の医薬組成物、生体回路、生体回路の構成要素、ＳＲＥ（例えば、ＤＤ）を含むエフェクターモジュール、ペイロード（すなわち、免疫療法薬）、ベクター及び細胞を、任意の経路で投与して、治療的に有効な結果を達成してもよい。

【０４４１】

これらには、経腸（腸内）、胃腸、硬膜外（硬膜内）、経口（口経由）、経皮、硬膜外、脳内（大脳内）、側脳室内（脳室内）、皮膚上（皮膚への塗布）、皮内（皮膚自体へ）、皮下（皮膚下）、鼻腔内投与（経鼻）、静脈内（静脈内）、静脈内ボーラス、点滴静注、動脈内（動脈内）、筋肉内（筋肉内）、頭蓋内（心臓内）、骨内注入（骨髄内）、髄腔内（脊柱管内）、腹腔内、（腹腔内への注入または注射）、洞内注入、硝子体内、（経眼）、静脈内注入（病的腔内）、腔内（陰茎基部内）、膣内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮（全身分布用のインタクトな皮膚を介した拡散）、経粘膜（粘膜を介した拡散）、経膣、吹送法（吸引）、舌下、唇下、浣腸、点眼（結膜上）、点耳、耳介（耳内または経耳）、頬側（頬に向けて）、結膜、皮膚、歯（歯または歯牙）、電気浸透、子宮頸管内、洞内、気管内、体外、血液透析、浸透、間質内、腹腔内、羊水内、関節内、胆管内、気管支内、嚢内、軟骨内（軟骨内）、尾内（馬尾内）、大槽内（小脳延髄大槽内）、角膜内（角膜内）、歯冠内（ｄｅｎｔａｌ　ｉｎｔｒａｃｏｒｎａｌ）、冠内（冠動脈内）、海綿体内

（陰茎の陰核海綿体の拡張可能な空間内）、椎間板内（椎間板内）、管内（腺管内）、十二指腸内（十二指腸内）、硬膜内（硬膜内または硬膜下）、表皮内（表皮内）、食道内（食道内）、胃内（胃内）、歯肉内（歯肉内）、回腸内（小腸の遠位部分内）、病巣内（限局性病巣内または限局性病巣への直接導入）、管腔内（管の内腔内）、リンパ内（リンパ内）、髄内（骨の骨髄腔内）、髄膜内（髄膜内）、心筋内（心筋内）、眼内（眼内）、卵巣内（卵巣内）、心膜内（心膜内）、胸膜内（胸膜内）、前立腺内（前立腺内）、肺内（肺またはその気管支内）、洞内（鼻内または眼窩周囲の洞内）、脊髄内（脊柱内）、関節滑液嚢内（関節の滑膜腔内）、腱内（腱内）、精巣内（睾丸内）、くも膜下腔内（任意レベルの脳脊髄軸の脳脊髄液内）、胸腔内（胸部内）、管内（器官の細管内）、腫瘍内（腫瘍内）、鼓室内（中耳内）、血管内（血管内）、脳室内（心室内）、イオン導入（可溶性塩のイオンを身体組織に移動させる電流による）、洗浄（傷口または体腔を浸すか、または洗い流す）、喉頭（喉頭に直接）、経鼻胃（鼻から胃内へ）、密封包帯療法（局所経路での投与後、領域を密封する包帯で覆う）、眼（外眼部へ）、中咽頭（口腔と咽頭に直接）、非経口、経皮、関節周囲、硬膜周囲、神経周囲、歯周、直腸、呼吸器（局所的または全身的効果のための経口または経鼻吸入による気道内）、眼球後（脳橋の背後または眼球の背後）、心筋内（心筋内へ進入）、軟部組織、くも膜下、結膜下、粘膜下、局所、経胎盤（胎盤を介して、または胎盤を通過して）、経気管（気管の壁を介して）、経鼓膜（鼓室を通過して、または鼓室を介して）、尿管（尿管へ）、尿道（尿道へ）、膣、仙骨麻酔、診断、神経麻酔、胆汁灌流、心臓灌流、フォトフェレーシスまたは脊髄が含まれるが、これらに限定されない。

【０４４２】

ＶＩＩ．定義

本明細書中の様々な箇所で、本開示の組成物の特徴または機能を、群または範囲で開示する。本開示は、そのような群及び範囲のメンバーのあらゆる個々の部分的組み合わせを含むことが特に意図されている。以下は、用語定義の非限定的なリストである。

【０４４３】

活性：本明細書中で使用する場合、用語「活性」とは、物事が起こっているまたは行われている状態を指す。本発明の組成物は活性を有していてもよく、この活性は１つ以上の生物学的事象を含み得る。いくつかの実施形態では、生物学的事象は細胞シグナル伝達事象を含み得る。いくつかの実施形態では、生物学的事象は、１つ以上の対応するタンパク質、受容体、小分子または本明細書に記載の生体回路の構成要素のいずれかとのタンパク質相互作用に関連する細胞シグナル伝達事象を含み得る。

【０４４４】

養子細胞療法（ＡＣＴ）：本明細書中で使用する場合、用語「養子細胞療法」または「養子細胞移植」とは、患者への細胞の移植を伴う細胞療法を指し、その場合、細胞は患者または別の個体に由来するものであってよく、患者に戻す前に細胞を改変（変更）する。治療細胞は、免疫エフェクター細胞：ＣＤ４＋Ｔ細胞；ＣＤ８＋Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）；ならびにＢ細胞及び切除した腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）などの免疫系に由来するものであってよい。最も一般的に移植される細胞は、ｅｘｖｉｖｏでの増殖または操作後の自己抗腫瘍Ｔ細胞である。例えば、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）またはキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現させることにより、特定の腫瘍抗原を認識するように、自己末梢血リンパ球を遺伝子改変することができる。

【０４４５】

薬剤：本明細書中で使用する場合、用語「薬剤」とは、生物学的、薬学的、または化学的化合物を指す。非限定的な例として、単純または複雑な有機または無機分子、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体、抗体誘導体、抗体断片、受容体、及び可溶性因子が挙げられる。

【０４４６】

アゴニスト：本明細書中で使用する用語「アゴニスト」とは、受容体と併用して細胞応答を生じさせることができる化合物を指す。アゴニストは、受容体に直接結合するリガン

ドであってもよい。あるいは、アゴニストは、例えば、（ａ）受容体に直接結合する別の分子と複合体を形成するか、または（ｂ）その他の方法で、他の化合物が受容体に直接結合するように別の化合物を修飾することにより、間接的に受容体と結合してもよい。アゴニストは、特定の受容体または受容体のファミリーのアゴニスト、例えば、共刺激受容体のアゴニストと呼ばれる場合がある。

【０４４７】

アンタゴニスト：本明細書中で使用する用語「アンタゴニスト」とは、結合する標的（複数可）の生物学的活性を阻害または低下させる任意の薬剤を指す。

【０４４８】

抗原：本明細書中で使用する用語「抗原」とは、対象に導入した場合に、またはがんの発症自体によって生じる腫瘍抗原など、対象によって産生された場合に、免疫応答を引き起こす分子として定義される。この免疫応答には、抗体の産生、または細胞傷害性Ｔリンパ球やＴヘルパー細胞などの特定の免疫学的に適格な細胞の活性化、またはその両方が含まれる。抗原は、生物、タンパク質／抗原のサブユニット、死滅させるか、または不活性化した細胞全体または溶解物に由来し得る。本発明に関して、用語「目的抗原」または「所望の抗原」とは、本明細書に記載する本発明の抗体及び／またはその断片、変異体、バリアント及び／または改変体と免疫特異的に結合または相互作用する、本明細書において提供するタンパク質及び／または他の生体分子を指す。いくつかの実施形態では、目的抗原は、本明細書に記載のポリペプチドもしくはペイロードもしくはタンパク質、またはその断片もしくは部分のいずれかを含み得る。

【０４４９】

およそ：本明細書中で使用する場合、用語「およそ」または「約」とは、目的の１つ以上の値に適用する場合、言及する参照値に類似する値を指す。特定の実施形態では、用語「およそ」または「約」とは、特に明記しない限り、または文脈から明らかでない限り、言及される参照値のいずれかの方向（より大きいか、またはより小さい）で、２５、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１、またはそれ未満の範囲内に入る値の範囲を指す（そのような数が可能な値の１００を超える場合を除く）。

【０４５０】

会合する：本明細書中で使用する場合、用語「会合する」、「結合する（ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ）」、「連結する」、「付着する」、及び「つながる」とは、２つ以上の部分に関して使用する場合、それらの部分が、直接的に、または連結剤として機能する１つ以上の追加部分を介して、互いに物理的に会合または接続して十分に安定な構造を形成し、それにより、その構造を使用する条件下、例えば生理学的条件下で、それらの部分が物理的に会合したままになることを意味する。「会合」は厳密に直接的な共有化学結合によるものである必要はない。本用語はまた、「会合」実体が物理的に会合したままになるような、イオン結合もしくは水素結合、または十分に安定したハイブリダイゼーションに基づく接続性を示唆する場合もある。

【０４５１】

自己：本明細書中で使用する用語「自己」とは、後で個体に再導入する場合の、その同じ個体に由来する任意の物質を指すことを意味する。

【０４５２】

バーコード：本明細書中で使用する用語「バーコード」とは、あるポリヌクレオチドまたはアミノ酸を別のポリヌクレオチドまたはアミノ酸と区別するポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列を指す。

【０４５３】

がん：本明細書中で使用する用語「がん」とは、体内の異常な細胞の制御不能な増殖を特徴とする様々な疾患の幅広い群を指す。無秩序な細胞分裂と増殖は、隣接する組織に侵入する悪性腫瘍の形成をもたらし、最終的にリンパ系または血流を介して身体の遠位部分に転移する。

【０４５４】
共刺激分子：本明細書中で使用する場合、免疫Ｔ細胞活性化におけるその意味に従って、Ｔ細胞とＡＰＣとの間に関与し、Ｔ細胞の刺激シグナルを生成する免疫細胞表面受容体／リガンドの群を指し、この刺激シグナルは、ＡＰＣ上の抗原／ＭＨＣ複合体（ｐＭＨＣ）のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）認識から生じるＴ細胞の刺激シグナルと合わさる。
【０４５５】
サイトカイン：本明細書中で使用する場合、用語「サイトカイン」とは、免疫系の機能に影響を及ぼし、調節することができる多くの細胞型によって産生される多面発現機能を有する低分子可溶性因子のファミリーを指す。
【０４５６】
送達：本明細書中で使用する用語「送達」とは、化合物、物質、実体、部分、カーゴまたはペイロードを送達する行為または様式を指す。「送達剤」とは、細胞、対象または他の生体系細胞への１つ以上の物質（本発明の化合物及び／または組成物を含むがこれらに限定されない）のｉｎ　ｖｉｖｏ送達を少なくとも部分的に促進する任意の薬剤を指す。
【０４５７】
不安定化：本明細書中で使用する場合、用語「不安定な（ｄｅｓｔａｂｌｅ）」、「不安定化」、「不安定化領域」または「不安定化ドメイン」とは、開始、参照、野生型、または天然型形態の同じ領域または分子よりも安定性が低い領域または分子を意味する。
【０４５８】
改変：本明細書中で使用する場合、本発明の実施形態は、それらを、構造的であるかまたは化学的であるかに関わらず、出発点、野生型または天然型の分子から変化した特徴または特性を有するように設計する場合、「改変」される。
【０４５９】
発現：本明細書中で使用する場合、核酸配列の「発現」とは、以下の事象の１つ以上を指す：（１）ＤＮＡ配列からのＲＮＡ鋳型の産生（例えば、転写による）；（２）ＲＮＡ転写産物のプロセシング（例えば、スプライシング、編集、５’キャップ形成、及び／または３’末端プロセシングによる）；（３）ＲＮＡのポリペプチドまたはタンパク質への翻訳；（４）ポリペプチドまたはタンパク質の折り畳み；及び（５）ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾。
【０４６０】
特徴：本明細書中で使用する場合、「特徴」とは、特徴、特性、または特有の要素を指す。
【０４６１】
製剤：本明細書中で使用する場合、「製剤」は、少なくとも本発明の化合物及び／または組成物、ならびに送達剤を含む。
【０４６２】
断片：本明細書中で使用する「断片」とは、部分を指す。例えば、タンパク質の断片は、完全長のタンパク質を消化することにより得られるポリペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質の断片は、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０以上のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、抗体の断片には抗体の部分が含まれる。
【０４６３】
機能的：本明細書中で使用する場合、「機能的」生体分子は、その分子を特徴付ける特性及び／または活性を示す構造及び形態を有する生物学的実体である。
【０４６４】
免疫細胞：本明細書中で使用する場合、用語「免疫細胞」とは、骨髄中の造血幹細胞に由来する免疫系の任意の細胞を指し、２つの主要な系統、すなわち、骨髄系前駆細胞（単球、マクロファージ、樹状細胞、巨核球、及び顆粒球などの骨髄系細胞を生じさせる）及

びリンパ系前駆細胞（Ｔ細胞、Ｂ細胞、及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞などのリンパ系細胞を生じさせる）を生じさせる。例示的な免疫系細胞として、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４－ＣＤ８－二重陰性Ｔ細胞、Ｔγδ細胞、Ｔαβ細胞、調節性Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、及び樹状細胞が挙げられる。マクロファージ及び樹状細胞は、「抗原提示細胞」または「ＡＰＣ」と呼ばれる場合があり、これらは、ペプチドと複合体を形成したＡＰＣ表面の主要組織適合複合体（ＭＨＣ）受容体がＴ細胞表面のＴＣＲと相互作用する場合に、Ｔ細胞を活性化することができる特殊な細胞である。

【０４６５】

免疫療法：本明細書中で使用する用語「免疫療法」とは、疾患に対する免疫系の反応性の誘導または回復による疾患の治療のタイプを指す。

【０４６６】

免疫療法薬：本明細書中で使用する用語「免疫療法薬」とは、生物学的、薬学的、または化学的化合物による、疾患に対する免疫系の反応性の誘導または回復による疾患の治療を指す。

【０４６７】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ：本明細書中で使用する場合、用語「ｉｎ　ｖｉｔｒｏ」とは、生物（例えば、動物、植物、または微生物）内ではなく、人工環境、例えば、試験管または反応容器、細胞培養物、ペトリ皿などで発生する事象を指す。

【０４６８】

ｉｎ　ｖｉｖｏ：本明細書中で使用する場合、用語「ｉｎ　ｖｉｖｏ」とは、生物（例えば、動物、植物、もしくは微生物またはその細胞もしくは組織）内で発生する事象を指す。

【０４６９】

リンカー：本明細書中で使用する場合、リンカーとは、２つ以上のドメイン、部分または実体を接続する部分を指す。一実施形態では、リンカーは、１０個以上の原子を含み得る。さらなる実施形態では、リンカーは、原子の群、例えば、１０～１，０００原子を含む場合があり、炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、硫黄、スルホキシド、スルホニル、カルボニル、及びイミンなどの原子または群からなり得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、リンカーは、１つ以上のヌクレオチドを含む１つ以上の核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーによって結合される部分には、原子、化学基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸塩基、糖、核酸、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、ペイロード（例えば、治療薬）、またはマーカー（化学マーカー、蛍光マーカー、放射性マーカー、生物発光マーカーが含まれるが、これらに限定されない）が含まれ得るが、これらに限定されない。本明細書に記載するように、リンカーは、多量体または複合体の形成、及びペイロードの投与など、あらゆる有用な目的に使用することができる。リンカーに組み込むことができる化学基の例として、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキレン、ヘテロアルキレン、アリール、またはヘテロシクリルが挙げられるが、これらに限定されず、これらの各々は、必要に応じて本明細書に記載するように置換することができる。リンカーの例として、不飽和アルカン、ポリエチレングリコール（例えば、エチレンまたはプロピレングリコールモノマーユニット、例えば、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコール、またはテトラエチレングリコール）、及びデキストランポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。他の例として、例えば、還元剤または光分解を用いて切断可能なジスルフィド結合（－Ｓ－Ｓ－）またはアゾ結合（－Ｎ＝Ｎ－）などのリンカー内の切断可能な部分が挙げられるが、これらに限定されない。選択的に切断可能な結合の非限定的な例として、例えば、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、もしくは他の還元剤、及び／または光分解の使用によって切断され得るアミド結合、ならびに、例えば、酸性または塩基性加水分解により切断され得る

エステル結合が挙げられる。

【０４７０】

チェックポイント／因子：本明細書中で使用する場合、チェックポイント因子は、その機能がプロセスの接合部で作用する任意の部分または分子である。例えば、チェックポイントタンパク質、リガンドまたは受容体は、細胞周期を失速または加速するように機能し得る。

【０４７１】

代謝産物：代謝産物は、細胞内で自然に発生する酵素によって触媒される代謝反応の中間生成物である。この用語は通常、低分子、大きな生体分子の断片、またはプロセシングされた産物を表すために使用される。

【０４７２】

修飾：本明細書中で使用する場合、用語「修飾」とは、親または参照分子または実体と比較した分子または実体の変化した状態または構造を指す。分子は、化学的に、構造的に、及び機能的に、などの多くの方法で修飾してもよい。いくつかの実施形態では、本発明の化合物及び／または組成物を、非天然アミノ酸の導入により修飾する。

【０４７３】

変異：本明細書中で使用する場合、用語「変異」とは、変化及び／または変更を指す。いくつかの実施形態では、変異は、タンパク質（ペプチド及びポリペプチドを含む）及び／または核酸（ポリ核酸を含む）に対する変化及び／または変更であり得る。いくつかの実施形態では、変異は、タンパク質及び／または核酸配列に対する変化及び／または変更を含む。そのような変化及び／または変更は、１つ以上のアミノ酸（タンパク質及び／またはペプチドの場合）及び／またはヌクレオチド（核酸及び／またはポリ核酸、例えばポリヌクレオチドの場合）の追加、置換及び／または削除を含み得る。変異がアミノ酸及び／またはヌクレオチドの付加及び／または置換を含むいくつかの実施形態では、そのような付加及び／または置換は１つ以上のアミノ酸及び／またはヌクレオチド残基を含む場合があり、修飾アミノ酸及び／またはヌクレオチドを含み得る。結果として生じる変異、変化または変更の構築物、分子または配列は、本明細書では変異体と呼ばれる場合がある。

【０４７４】

ネオ抗原：本明細書中で使用する場合、用語「ネオ抗原」とは、正常細胞ではなく腫瘍細胞に存在し、胸腺における同族の抗原特異的Ｔ細胞の欠失を誘発しない（すなわち、中枢性免疫寛容）腫瘍抗原を指す。これらの腫瘍ネオ抗原は、病原体のような「外来」シグナルを提供し、がん免疫療法に必要な効果的な免疫応答を誘導する。ネオ抗原は、特定の腫瘍に限定される場合がある。ネオ抗原は、ミスセンス変異を有するペプチド／タンパク質（ミスセンスネオ抗原）、または新規オープンリーディングフレーム（ｎｅｏＯＲＦ）からの長鎖完全新規アミノ酸ストレッチを有する新規ペプチドである。ｎｅｏＯＲＦは、いくつかの腫瘍でフレーム外の挿入または削除（マイクロサテライトの不安定性を引き起こすＤＮＡミスマッチ修復の欠陥による）、遺伝子融合、終止コドンのリードスルー変異、または不適切にスプライシングされたＲＮＡの翻訳によって生成され得る（例えば、Ｓａｅｔｅｒｄａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，２００１，９８：１３２５５－１３２６０）。

【０４７５】

オフターゲット：本明細書中で使用する場合、「オフターゲット」とは、任意の１つ以上の標的、遺伝子、細胞転写産物、細胞、及び／または組織に対する意図しない効果を指す。

【０４７６】

作動可能に連結した：本明細書中で使用する場合、語句「作動可能に連結した」とは、２つ以上の分子、構築物、転写産物、実体、部分などの間の機能的接続を指す。

【０４７７】

ペイロードまたは目的ペイロード（ＰＯＩ）：本明細書中で使用する場合、用語「ペイロード」及び「目的ペイロード（ＰＯＩ）」は、同じ意味で使用される。目的ペイロード

（ＰＯＩ）とは、機能が変更されることとなる任意のタンパク質または化合物を指す。本発明に関して、ＰＯＩは、自然免疫系及び適応免疫系の両方を含む免疫系の成分である。目的ペイロードは、タンパク質、融合タンパク質をコードする融合構築物、もしくは非コード遺伝子、またはそれらのバリアント及び断片であってもよい。目的ペイロードは、アミノ酸ベースの場合、目的タンパク質と呼ばれる場合がある。

【０４７８】

薬学的に許容される賦形剤：本明細書中で使用する用語「薬学的に許容される賦形剤」とは、医薬組成物中に存在し、対象内において実質的に非毒性及び非炎症性の特性を有する活性薬剤（例えば、本明細書に記載するような）以外の任意の成分を指す。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、活性薬剤を懸濁及び／または溶解することができるビヒクルである。賦形剤として、例えば：付着防止剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング剤、圧縮助剤、崩壊剤、染料（着色剤）、皮膚軟化剤、乳化剤、充填剤（希釈剤）、皮膜形成剤またはコーティング剤、香料、芳香剤、滑剤（流動促進剤）、滑沢剤、防腐剤、印刷インク、吸着剤、懸濁剤または分散剤、甘味料、及び水和水が挙げられる。例示的な賦形剤として：ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（二塩基性）、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスポビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微結晶セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、アルファ化デンプン、プロピルパラベン、パルミチン酸レチニル、シェラック、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、ナトリウムデンプングリコール酸、ソルビトール、デンプン（トウモロコシ）、ステアリン酸、スクロース、タルク、二酸化チタン、ビタミンＡ、ビタミンＥ、ビタミンＣ、及びキシリトールが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４７９】

薬学的に許容される塩：本明細書に記載の化合物の薬学的に許容される塩は、酸または塩基部分がその塩形態（例えば、遊離塩基と適切な有機酸との反応により生成される）にある開示化合物の形態である。薬学的に許容される塩の例として、アミンなどの塩基性残基の無機または有機酸塩；カルボン酸などの酸性残基のアルカリまたは有機塩；などが挙げられるが、これらに限定されない。代表的な酸付加塩として、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、２－ヒドロキシ－エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、２－ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、３－フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩として、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなど、ならびに、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどを含むがこれらに限定されない、無毒性アンモニウム、第四級アンモニウム、及びアミンカチオンが挙げられる。薬学的に許容される塩には、例えば、無毒性の無機酸または有機酸由来の従来の無毒性塩が含まれる。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩を、従来の化学的方法により塩基性または酸性部分を含む親化合物から調製する。一般的に、そのような塩は、これらの化合物の遊離酸または遊離塩基形態を、水または有機溶媒中

で、または２つの混合物中で、化学量論量の適切な塩基または酸と反応させることにより調製することができ；一般的に、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、またはアセトニトリルのような非水性媒体が好ましい。適切な塩のリストは、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８５，ｐ．１４１８，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓａｌｔｓ：Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅ，Ｐ．Ｈ．Ｓｔａｈｌ ａｎｄ Ｃ．Ｇ．Ｗｅｒｍｕｔｈ（ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ，２００８，ａｎｄ Ｂｅｒｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，６６，１－１９（１９７７）に見出され、これらの各々は、その全体を参照により本明細書に援用する。薬学的に許容される溶媒和物：本明細書中で使用する用語「薬学的に許容される溶媒和物」とは、適切な溶媒の分子が結晶格子に組み込まれている化合物の結晶形を指す。例えば、溶媒和物は、有機溶媒、水、またはそれらの混合物を含む溶液からの結晶化、再結晶化、または沈殿により調製してもよい。適切な溶媒の例は、エタノール、水（例えば、一水和物、二水和物、及び三水和物）、Ｎ－メチルピロリジノン（ＮＭＰ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡＣ）、１，３－ジメチル－２－イミダゾリジノン（ＤＭＥＵ）、１，３－ジメチル－３，４，５，６－テトラヒドロ－２－（１Ｈ）－ピリミジノン（ＤＭＰＵ）、アセトニトリル（ＡＣＮ）、プロピレングリコール、酢酸エチル、ベンジルアルコール、２－ピロリドン、安息香酸ベンジルなどである。水が溶媒である場合、溶媒和物は「水和物」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、溶媒和物に組み込まれる溶媒は、溶媒和物を投与する（例えば、医薬組成物の単位剤形で）生物に対して生理学的に許容されるタイプまたはレベルのものである。

【０４８０】

安定：本明細書中で使用する「安定」とは、反応混合物から有用な純度への単離に耐えるのに十分頑強であり、好ましくは有効な治療薬への製剤化が可能な化合物または実体を指す。

【０４８１】

安定化された：本明細書中で使用する場合、用語「安定化する」、「安定化された」、「安定化された領域」とは、安定にするか、または安定になることを意味する。いくつかの実施形態では、安定性を、絶対値に対して測定する。いくつかの実施形態では、安定性を、二次的なステータスもしくは状態、または参照化合物もしくは実態に対して測定する。

【０４８２】

標準ＣＡＲ：本明細書中で使用する場合、用語「標準ＣＡＲ」とは、標準設計のキメラ抗原受容体を指す。細胞外ｓｃＦｖフラグメント、膜貫通ドメイン及び１つ以上の細胞内ドメインを含むＣＡＲ融合タンパク質の構成要素を、単一の融合タンパク質として直線的に構築する。

【０４８３】

刺激応答エレメント（ＳＲＥ）：用語「刺激応答エレメント（ＳＲＥ）」とは、本明細書中で使用する場合、エフェクターモジュールの１つ以上のペイロードに接合、付着、連結、または会合させるエフェクターモジュールの構成要素であり、いくつかの例では、１つ以上の刺激に対するエフェクターモジュールの応答性を担う。本明細書中で使用する場合、刺激に対するＳＲＥの「応答性」の性質は、刺激に対する共有または非共有相互作用、直接的もしくは間接的な会合、または構造的もしくは化学的反応を特徴とし得る。さらに、刺激に対する任意のＳＲＥの反応は、程度または種類の問題であり得る。応答は部分的応答であってもよい。応答は、可逆応答であってもよい。応答は、最終的に調節されたシグナルまたは出力を導き得る。そのような出力シグナルは、刺激に対して相対的な性質のもの、例えば、１～１００の調節効果、または２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍もしくはそれ以上の倍率での増加もしくは減少を生じるものであってもよい。ＳＲＥの１つの非

限定的な例は、不安定化ドメイン（ＤＤ）である。

【０４８４】

対象：本明細書中で使用する場合、用語「対象」または「患者」とは、例えば、実験、診断、予防、及び／または治療目的で本発明の組成物を投与し得る任意の生物を指す。一般的な対象として、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及びヒトなどの哺乳類）及び／または植物が挙げられる。

【０４８５】

Ｔ細胞：Ｔ細胞は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を産生する免疫細胞である。Ｔ細胞は、ナイーブ（抗原にさらされていない；T_{CM}に比べて、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ３、ＣＤ１２７、及びＣＤ４５ＲＡの発現が増加し、ＣＤ４５ＲＯの発現が減少している）、メモリーＴ細胞（T_M）（抗原経験及び長期生存）、及びエフェクター細胞（抗原経験、細胞毒性）であり得る。T_Mは、セントラル記憶Ｔ細胞のサブセット（T_{CM}、ナイーブＴ細胞に比べて、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ１２７、ＣＤ４５ＲＯ、及びＣＤ９５の発現が増加し、ＣＤ５４ＲＡの発現が減少している）ならびにエフェクター記憶Ｔ細胞（T_{EM}、ナイーブＴ細胞またはT_{CM}に比べて、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ４５ＲＡの発現が減少し、ＣＤ１２７の発現が増加している）にさらに分類することができる。エフェクターＴ細胞（T_E）とは、T_{CM}に比べて、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８の発現が低下し、グランザイム及びパーフォリン陽性である、抗原経験のあるＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球を指す。他の例示的なＴ細胞として、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋（Ｆｏｘｐ３＋）調節性Ｔ細胞及びＴｒｅｇ１７細胞などの調節性Ｔ細胞、ならびにＴｒ１、Ｔｈ３、ＣＤ８＋ＣＤ２８－、及びＱａ－１制限Ｔ細胞が挙げられる。

【０４８６】

Ｔ細胞受容体：Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）とは、可変抗原結合ドメイン、定常ドメイン、膜貫通領域、及びＭＨＣ受容体に結合した抗原ペプチドに特異的に結合することができる短い細胞質尾部を有する免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーを指す。ＴＣＲは、細胞の表面または可溶性の形で見出すことができ、一般的に、α及びβ鎖（それぞれ、ＴＣＲα及びＴＣＲβとしても知られる）、またはγ及びδ鎖（それぞれ、ＴＣＲγ及びＴＣＲδとしても知られる）を有するヘテロダイマーからなる。ＴＣＲ鎖の細胞外部分（例えば、α鎖、β鎖）は、２つの免疫グロブリンドメイン、すなわち、Ｎ末端に可変ドメイン（α鎖可変ドメインまたはV_α、β鎖可変ドメインまたはV_β）、及び細胞膜の近傍に１つの定常ドメイン（例えば、α鎖定常ドメインすなわちC_α及びβ鎖定常ドメインすなわちC_β）を含む。免疫グロブリンと同様に、可変ドメインは、フレームワーク領域（ＦＲ）で区切られた相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。ＴＣＲは通常、ＣＤ３複合体と会合してＴＣＲ複合体を形成する。本明細書中で使用する場合、用語「ＴＣＲ複合体」とは、ＣＤ３とＴＣＲとの会合により形成される複合体を指す。例えば、ＴＣＲ複合体は、ＣＤ３γ鎖、ＣＤ３δ鎖、２つのＣＤ３ε鎖、ＣＤ３ζ鎖のホモ二量体、ＴＣＲα鎖、及びＴＣＲβ鎖からなり得る。あるいは、ＴＣＲ複合体は、ＣＤ３γ鎖、ＣＤ３δ鎖、２つのＣＤ３ε鎖、ＣＤ３ζ鎖のホモ二量体、ＴＣＲγ鎖、及びＴＣＲδ鎖からなり得る。本明細書中で使用する「ＴＣＲ複合体の構成要素」とは、ＴＣＲ鎖（すなわち、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγまたはＴＣＲδ）、ＣＤ３鎖（すなわち、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３εまたはＣＤ３ζ）、または２つ以上のＴＣＲ鎖もしくはＣＤ３鎖によって形成される複合体（例えば、ＴＣＲαとＴＣＲβの複合体、ＴＣＲγとＴＣＲδの複合体、ＣＤ３εとＣＤ３δの複合体、ＣＤ３γとＣＤ３εの複合体、またはＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、及び２つのＣＤ３ε鎖のサブＴＣＲ複合体）を指す。

【０４８７】

治療有効量：本明細書中で使用する場合、用語「治療有効量」とは、感染、疾患、障害、及び／または病態に罹患しているか、または感染しやすい対象に投与した場合に、感染、疾患、障害、及び／または病態の発症を治療、症状改善、診断、予防、及び／または遅延させるのに十分な、送達する薬剤（例えば、核酸、薬物、治療薬、診断薬、予防薬など）の量を意味する。いくつかの実施形態では、治療有効量を単回用量で提供する。いくつ

かの実施形態では、治療有効量を、複数の用量を含む投与レジメンで投与する。当業者であれば、いくつかの実施形態において、そのような投与レジメンの一部として単位剤形を投与する場合に、それが有効な量を含む場合、特定の薬剤または実体の治療有効量を含むと見なされ得ることを理解するであろう。

【０４８８】

治療または治療すること：本明細書中で使用する場合、用語「治療」または「治療すること」とは、好ましくは有益または望ましい臨床結果を含む、有益または望ましい結果を得るためのアプローチを示す。そのような有益または望ましい臨床結果には、以下の１つ以上が含まれるが、これらに限定されない：がん細胞または他の疾患細胞の増殖の低下（または破壊）、がんにおいて見出されるがん細胞の転移の低減、腫瘍のサイズの縮小、疾患に起因する症状の軽減、疾患に罹患している人々の生活の質の向上、疾患の治療に必要な他の薬剤の用量の低減、疾患の進行の遅延、及び／または個体の生存期間の延長。

【０４８９】

調整：本明細書中で使用する場合、用語「調整」とは、刺激に応じて、または特定の結果に向かって１つのものを調整、均衡化、または適合させることを意味する。非限定的な一実施例では、本発明のＳＲＥ及び／またはＤＤは、特定の刺激及び／または環境に応じて、それらが付加、付着または会合する組成物の機能または構造を調整、均衡化または適合させる。

【０４９０】

均等物と範囲

当業者であれば、本明細書に記載する本発明による特定の実施形態に対する多くの均等物を認識し、または日常的な実験のみを使用して確認することができるであろう。本発明の範囲は、上記の記載に限定されるものではなく、添付の特許請求の範囲に記載されている。

【０４９１】

請求項において、「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」などの冠詞は、相反する指示がない限り、または文脈から明らかでない限り、１つ以上を意味し得る。グループの１つ以上のメンバー間の「または」を含む請求項または記載は、所与の製品またはプロセスに、１つ、複数、またはすべてのグループメンバーが存在するか、使用されるか、そうでなければ関連している場合、相反する指示が示されていない限り、または文脈から明らかでない限り、満たしているものと見なされる。本発明は、グループの正確に１つのメンバーが、所与の製品またはプロセスに存在するか、使用されるか、そうでなければ関連している実施形態を含む。本発明は、所与の製品またはプロセスに、複数、またはグループメンバー全体が存在するか、使用されるか、そうでなければ関連している実施形態を含む。

【０４９２】

用語「含む」は、オープンであることを意図しており、追加の要素または工程を許容するが、必ずしも含める必要はないことにも留意されたい。したがって、用語「含む」を本明細書中で使用する場合、用語「からなる」も包含され、開示されるものとする。

【０４９３】

範囲が与えられる場合、端点が含まれる。さらに、文脈及び当業者の理解から別段の指示がない限り、またはそうでないことが明らかでない限り、範囲として表される値は、文脈から明確に他のことが指示されない限り、範囲の下限値の単位の１０分の１まで、本発明の異なる実施形態において述べられた範囲内の任意の特定の値または部分範囲をとることができることを理解されたい。

【０４９４】

さらに、先行技術に含まれる本発明の特定の実施形態は、請求項のいずれか１つ以上から明示的に除外され得ることを理解されたい。そのような実施形態は、当業者に公知であると見なされるため、除外することが本明細書で明示的に示されていなくても、除外され得る。いずれの本発明の組成物の特定の実施形態（例えば、任意の抗生物質、治療成分または有効成分；任意の製造方法；任意の使用方法；など）も、先行技術の存在に関連して

いるかどうかに関わらず、理由の如何を問わず、いずれか１つ以上の請求項から除外することができる。

【０４９５】

使用する単語は、限定するものではなく、説明するための単語であり、そのより広い態様において、本発明の真の範囲及び精神から逸脱することなく、添付の特許請求の範囲内で変更してもよいことを理解されたい。

【実施例】

【０４９６】

実施例１．突然変異誘発スクリーニングによる新規リガンド応答性ＳＲＥまたはＤＤの生成

研究の設計

リガンド依存的な安定性を示す構築物を設計するために、候補リガンド結合ドメイン（ＬＢＤ）を選択し、タンパク質安定性のレポーターとして黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）を使用する細胞ベースのスクリーニングを設計して、望ましい特性：ＬＢＤのリガンドの非存在下での低いタンパク質レベル（すなわち、低い基底安定性）、大きなダイナミックレンジ、ロバストで予測可能な用量反応挙動、及び迅速な分解速度（Ｂａｎａｓｚｙｎｓｋｉ，ｅｔ　ａｌ．，（２００６）Ｃｅｌｌ；１２６（５）：９９５－１００４）の不安定化ドメインを保有する候補ＬＢＤの変異体を同定する。候補ＬＢＤは、内在性シグナル伝達分子ではなく、目的リガンドに結合する。

【０４９７】

候補ＬＢＤ配列（鋳型として）を、ヌクレオチド類似体変異誘発及びエラープローンＰＣＲの組み合わせを使用して最初に変異させ、鋳型候補ドメイン配列に基づいて変異体のライブラリを生成する。生成されたライブラリを、ＹＦＰ遺伝子の５’または３’末端にインフレームでクローニングし、レトロウイルス発現系を使用して、ＹＦＰ融合体のライブラリをＮＩＨ３Ｔ３線維芽細胞に安定的に形質導入する。

【０４９８】

形質導入したＮＩＨ３Ｔ３細胞を、蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）を使用して３～４回の選別にかけ、候補ＤＤのライブラリをスクリーニングする。形質導入したＮＩＨ３Ｔ３細胞を、リガンド結合ドメイン（ＬＢＤ）の高親和性リガンドの非存在下で培養し、低レベルのＹＦＰ発現を示す細胞をＦＡＣＳにより選択する。

【０４９９】

スクリーニング戦略Ｉ

選択した細胞集団を、リガンド結合ドメインの高親和性リガンドの存在下で、一定期間（例えば、２４時間）培養し、その時点で細胞をＦＡＣＳによって再選別する。高レベルのＹＦＰ発現を示す細胞をＦＡＣＳで選択し、選択した細胞集団を２つの群に分け、異なる濃度のリガンド結合ドメインの高親和性リガンドで再度処置する。１つの群を低濃度のリガンドで処置し、もう１つの群を高濃度のリガンドで一定期間（例えば、２４時間）処置し、この時点で、細胞をＦＡＣＳによって再選別する。低濃度のリガンドに反応する変異体を発現している細胞を分離する。

【０５００】

より低い濃度のリガンドに応答する単離された細胞を再度リガンドで処置し、培地からのリガンドの除去の４時間後に、低蛍光レベルを示す細胞を収集する。この第４の選別は、分解の速度が速い細胞を濃縮するように設計する（Ｉｗａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ　Ｂｉｏｌ．２０１０　Ｓｅｐ　２４；１７（９）：９８１－９８８）。

【０５０１】

スクリーニング戦略ＩＩ

選択した細胞集団を、ＬＢＤの高親和性リガンドの非存在下でＦＡＣＳによる追加の１つ以上の選別に供し、低レベルのＹＦＰ発現を示す細胞をさらなる分析のために選択する。リガンド結合ドメインの高親和性リガンドで一定期間（例えば、２４時間）細胞を処置し、ＦＡＣＳで再度選別する。高レベルのＹＦＰを発現する細胞を、ＦＡＣＳを通じて選

択する。ＹＦＰの高発現細胞を再度リガンドで処置し、培地からリガンドを除去してから４時間後に、低蛍光レベルを示す細胞を収集し、速い分解速度を示す細胞を濃縮する。選別工程のいずれかを繰り返して、リガンド依存的な安定性を有するＤＤを同定してもよい。

【０５０２】

選別後、細胞を回収する。同定した候補細胞を収集し、ゲノムＤＮＡを抽出する。候補ＤＤをＰＣＲによって増幅し、分離する。候補ＤＤを配列決定し、ＬＢＤ鋳型と比較して、候補ＤＤの変異を同定する。

【０５０３】

実施例２．ＤＤ調節型組換えＩＬ２の発現

ＦＫＢＰ（Ｌ１０６Ｐ）及びｅｃＤＨＦＲ（Ｒ１２Ｙ、Ｙ１００Ｉ）は、融合パートナー（ＰＯＩなど）に不安定性を与え得る、十分に特徴付けられた不安定化ドメインである。不安定性は、ＦＫＢＰ　ＤＤに結合するＳｈｉｅｌｄ－１という名前の合成リガンドと、ＤＨＦＲ　ＤＤに結合するＴＭＰまたはＭＴＸによって逆転する。ＩＬ２ポリペプチドを、ＦＫＢＰ（Ｆ３６Ｖ；Ｌ１０６Ｐ）またはｅｃＤＨＦＲ（Ｒ１２Ｙ、Ｙ１００Ｉ）のいずれかに連結させた。ＩＬ２構築物を、ｐＬＶＸ－ＩＲＥＳ－Ｐｕｒｏレンチウイルスベクターにパッケージングした。ＩＬ２シグナル配列を構築物のＮ末端に挿入し、リンカーをシグナル配列、ＤＤ及びＩＬ２の間に配置した。

【０５０４】

ＯＴ－ＩＬ２－００１（ＦＫＢＰ）は、ヒト結腸直腸癌株ＨＣＴ－１１６に形質導入した。Ｓｈｉｅｌｄ－１用量に対するＩＬ２レベルの依存性を測定するために、細胞を９６ウェルプレートに播種し、様々な濃度のＳｈｉｅｌｄ－１で処理した。次いで、細胞から培地を回収し、ＩＬ２　ＥＬＩＳＡを使用してＩＬ２レベルを定量した（図１３）。ＩＬ２はＳｈｉｅｌｄ－１濃度の増加とともに増加し、より高いＳｈｉｅｌｄ－１用量レベルでプラトーに達した。Ｓｈｉｅｌｄ－１の半数最大効果濃度すなわちEC_{50}は、５０ｎＭと測定された。

【０５０５】

実施例３．ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　Ｔ細胞アッセイ開発

本研究の目標は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＴ細胞持続性及びＴ細胞分化を最大化するために必要なＴ細胞刺激レジメン及びＩＬ１２の用量を決定することであった。本研究は養子細胞療法レジメンの設計を要約したもので、Ｔ細胞を最初にｉｎ　ｖｉｔｒｏで抗原に曝露し、その結果、活性化とその後の休止期、最後にＴ細胞を再び抗原に遭遇させるｉｎ　ｖｉｖｏ転移をもたらす。Ｔ細胞を、０日目にＣＤ３／ＣＤ２８ビーズまたは可溶性ＣＤ３／ＣＤ２８で刺激し、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激物を４８時間の終わりに洗い流した。細胞を０．０１～１０００ｎｇ／ｍＬの範囲の用量のＩＬ１２で処理した。９日目に、細胞のＴｈ１表現型を、ＩＦＮγ陽性ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞の出現頻度を調べることにより評価した。１４日目に、細胞を２つの群に分け、１つの群には２回目のＣＤ３／ＣＤ２８刺激を与え、第２の群には刺激を与えなかった。１６日目に、ＦＡＣＳを使用してＴｈ１表現型を両方の群で評価した。１６日目の結果を図１４に示す。ＩＦＮγ発現は、第２の刺激を受けなかった細胞に比べて、１４日目にＣＤ３／ＣＤ２８再刺激を受けた細胞において高かった。このことは、Ｔｈ１表現型には抗原再刺激とＩＬ１２曝露の両方が必要であることを示している。さらに、わずか０．１ｎｇ／ｍＬのＩＬ１２がｉｎ　ｖｉｔｒｏでＴ細胞からのＴｈ１スキューイング及びＩＦＮγ生成を引き起こし、より高用量のＩＬ１２はこの効果をさらに向上させた。

【０５０６】

実施例４．ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏでのヒトＴ細胞応答の測定

ＩＬ１２は、ナイーブＴ細胞からＴｈ１細胞への分化を促進し、Ｔ細胞からのＩＦＮγの分泌をもたらす。ヒトＴ細胞をＩＬ１２で処理するか、または未処理のままとして、ＩＦＮγ及びＴ細胞マーカーＣＤ３の発現についてフローサイトメトリーで分析した。ＩＬ１２での処理により、ＩＦＮγ陽性Ｔ細胞の割合（パーセンテージ）が０．２１から２２

．３に増加したことにより測定されるように、Ｔ細胞の分化が生じた（図１５Ａの挿入図参照）。

【０５０７】

膜結合ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒａ融合タンパク質（ＯＴ－ＩＬ１５－００８）がヒトＴ細胞増殖を誘導することができるかどうかを試験するために、ヒトＴ細胞に構築物を形質導入した。Ｔ細胞増殖は、フローサイトメトリーを使用してＴ細胞集団の前方及び側方散乱を評価することにより測定した。膜結合ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒａ融合構築物による形質導入により、非形質移入細胞の対照（３７．８）に比べて、ヒトＴ細胞（５８．９）が増大した（図１５Ｂ）。

【０５０８】

養子移入後のＴ細胞の追跡は、宿主の異なる部位での分布、それらの同一性及び経時的な持続性を決定するために重要である。ヒトＴ細胞をＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで刺激し、５０Ｕ／ｍｌのＩＬ２の存在下でインキュベートした。細胞を、３日目と５日目にＩＬ２を補充して７日間ｉｎ　ｖｉｔｒｏで増殖させた。５日目にＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを取り除き、細胞を２日間培養した。７日目に、細胞を洗浄してＩＬ２を除去し、５００万個のヒトＴ細胞を免疫不全ＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}　Ｉｌ２ｒｇ^{ｔｍ１Ｗｊｌ}／ＳｚＪマウスに静脈内注射した。細胞移植の４、２４、１２０及び１６８時間後に血液試料を採取した。細胞移植の１６８時間後にマウスを安楽死させ、骨髄及び脾臓を採取した。すべての試料から免疫細胞を分離し、ＣＤ３及びＣＤ４５細胞表面マーカーを使用して、ヒトＴ細胞の存在を分析した。図１５Ｃに示すように、ヒトＴ細胞を注射した動物において、血中のＣＤ３陽性、ＣＤ４５陽性ヒトＴ細胞の割合は、特に１２０及び１６８時間で高かった。ＣＤ３陽性、ＣＤ４５陽性のヒトＴ細胞は、ヒトＴ細胞を注射した動物の脾臓及び骨髄でも検出された。予想通り、ＣＤ３陽性、ＣＤ４５陽性のヒトＴ細胞は、ヒトＴ細胞を注射しなかった対照動物では検出されなかった。

【０５０９】

養子移入後のＴ細胞の同一性を判定するために、注射の４８時間後にマウスから血液試料を採取した。ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ６２Ｌの表面発現についてＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞を分析した。両方のマーカーはナイーブＴ細胞で高度に発現するが、Ｔ細胞を抗原にさらすと失われる。図１５Ｄに示すように、ヒトＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞は、マウスに注射する前に両方のマーカーの高い表面発現を示したが、ｉｎ　ｖｉｖｏでの細胞移植の４８時間後に失われ、ヒトＴ細胞がｉｎ　ｖｉｖｏで抗原に曝露されることが示された。

【０５１０】

実施例５．ＤＤ調節型ルシフェラーゼ

ルシフェラーゼポリペプチドを、ＦＫＢＰ（Ｆ３６Ｖ、Ｌ１０６ＰもしくはＦ３６Ｖ、Ｅ３１Ｇ、Ｒ７１Ｇ、Ｋ１０５Ｅ）またはｅｃＤＨＦＲ（Ｒ１２Ｙ、Ｙ１００Ｉ）のいずれかに連結し、ｐＬＶＸ．ＩＲＥＳ．Ｐｕｒｏベクターにクローニングした。

【０５１１】

ＤＤ調節型ルシフェラーゼを使用して、ｉｎ　ｖｉｖｏで細胞、例えばＴ細胞を追跡することができる。ペイロードとして、ホタルルシフェラーゼまたはウミシイタケルシフェラーゼを利用してもよい。ＨＣＴ－１１６細胞を、構成的（ＯＴ－ＲＬｕｃ－００１）またはＤＤ調節型構築物（ＯＴ－ＲＬｕｃ－００２、ＯＴ－ＲＬｕｃ－００３、ＯＴ－ＲＬｕｃ－００４、ＯＴ－ＲＬｕｃ－００５及びＯＴ－ＲＬｕｃ－００６）で安定的に形質導入した。細胞を１μＭのＳｈｉｅｌｄ－１、１０μＭのトリメトプリムまたはビヒクル対照で２４時間処理し、抗ウミシイタケルシフェラーゼ及び抗ホタルルシフェラーゼ抗体（Ａｂｃａｍ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ）を使用したウエスタンブロッティングによりルシフェラーゼ発現を測定した。ブロットを抗ＧＡＰＤＨ抗体でもプローブし、すべての試料において均一なタンパク質のローディングを確保した。図１６Ａに示すように、ＯＴ－ＲＬｕｃ－００３はウミシイタケルシフェラーゼの強力なＳｈｉｅｌｄ－１依存安定化を示した。ＯＴ－ＲＬｕｃ－００４、００５及び００６は、対応するリガンドの存在下でのウミシイタケルシフェラーゼの中程度の安定化を示し、一方、ＯＴ－ＦＬｕｃ－００２は

、Ｓｈｉｅｌｄ－１の添加を伴う場合にホタルルシフェラーゼの中程度の安定化を示した。予想通り、構成的ルシフェラーゼ構築物（ＯＴ－ＲＬｕｃ－００１）は、リガンドの存在下及び非存在下の両方でウミシイタケルシフェラーゼの発現を示した（図１６Ａ）。

【０５１２】

ウミシイタケ及びホタルルシフェラーゼ構築物のリガンド依存性の活性を、それぞれセレンテラジン及びルシフェリン基質を使用して測定した。細胞を１μＭのＳｈｉｅｌｄ－１、１０μＭのトリメトプリム、またはビヒクル対照で２４時間処理し、アッセイ溶解バッファーで溶解し、ルシフェラーゼ基質の存在下でインキュベートした。ルミノメーターを使用してルシフェラーゼ活性を発光測定値として測定し、その値を溶解バッファーと基質からなる対照試料と比較した。すべての調節型ＤＤは、対照と比較してルシフェラーゼ活性のリガンド依存性の増加を示した。予想通り、構成的構築物ＯＴ－ＲＬｕｃ－００１は、リガンドの存在下及び非存在下の両方で高いルシフェラーゼ活性を示した（図１６Ｂ）。

【０５１３】

実施例６．ＤＤ調節型ＩＬ２及びＩＬ２を介した機能

腫瘍を確立し、対応する合成リガンド、例えば、Ｓｈｉｅｌｄ－１、トリメトプリムまたはメトトレキサートの処置の下で増殖するための、これらの構築物を発現する腫瘍細胞の能力を評価することにより、ＤＤ－ＩＬ２の機能をｉｎ　ｖｉｖｏで特徴付ける。構築物で安定的に形質導入した２００万～１０００万個のＨＣＴ－１１６細胞を、機能的Ｂ細胞及びＮＫ細胞を産生可能なマウスにマトリゲルで皮下異種移植する。注射のおよそ２週間後、腫瘍がおよそ３００立方ｍｍのサイズに達すると、対応する安定化リガンド、例えば、Ｓｈｉｅｌｄ－１、トリメトプリムまたはメトトレキサートを２日毎に様々な濃度でマウスに投与する。Ｓｈｉｅｌｄ－１を、１０％のジメチルアセトアミド、１０％のＳｏｌｕｔｏｌ　ＨＳ１５、及び８０％の生理食塩水からなる担体とともに注入する。腫瘍の体積と体重を週に２回モニタリングし、腫瘍のサイズが１０００立方ｍｍに達したら実験を終了する。リガンド及びＩＬ２の最後の投与の８時間後に血漿及び腫瘍試料を採取し、リガンドレベルを測定する。

【０５１４】

ＩＬ２発現細胞の腫瘍形成能力を評価するために、ＤＤ－ＩＬ２構築物で安定的に形質導入したＨＣＴ－１１６細胞を、対応する安定化リガンド、Ｓｈｉｅｌｄ－１、トリメトプリムまたはメトトレキサートで前処理し、その後マウスに異種移植する。未処理の対照と比較したリガンド処理マウスの腫瘍増殖の減少及びＩＬ２レベルの付随的な増加から、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＩＬ２の条件付き調節が示される。

【０５１５】

実施例７．ＤＤ調節型カスパーゼ９

カスパーゼ９ポリペプチドを、ＦＫＢＰ、ｅｃＤＨＦＲ及びｈＤＨＦＲ　ＤＤのＮ末端またはＣ末端に連結し、ｐＬＶＸ．ＩＲＥＳ．Ｐｕｒｏベクターにクローニングした。

【０５１６】

リガンド依存性カスパーゼ９産生を試験するために、１００万個のＨＥＫ－２９３Ｔ細胞を、ＤＭＥＭ及び１０ＦＢＳを含む増殖培地中の６ウェルプレートに播種し、３７℃、５％ＣＯ２で一晩インキュベートする。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００を使用して、細胞に１００ｎｇのＤＤ－カスパーゼ９構築物を一時的に形質移入し、４８時間インキュベートする。インキュベーション後、増殖培地を、リガンド（使用する構築物に応じて、トリメトプリム、メトトレキサート、またはＳｈｉｅｌｄ－１）を含む培地と交換する。リガンド存在下で２４時間インキュベーションした後、細胞を溶解し、カスパーゼ９についてイムノブロットする。リガンド濃度の増加に伴うカスパーゼ９レベルの増加は、ＤＤを介したカスパーゼ９の調節を示す。

【０５１７】

実施例８．同系マウスモデルにおけるＤＤ調節型ペイロードの抗腫瘍応答の評価

インタクトな免疫細胞を有する生物におけるがん免疫療法の効力を、同系マウスモデル

、例えば、ｐＭＥＬ－１及び４Ｔ１マウスモデルを使用して評価する。Ｔ細胞やＮＫ細胞などの免疫細胞を同系マウスから分離し、ＤＤ－ＩＬ２、及びＤＤカスパーゼ９などのＤＤ調節型ペイロードで形質導入する。次いで、細胞を、皮下同系腫瘍を有するマウスに注射し、使用するＤＤに応じて、様々な濃度のリガンド、Ｓｈｉｅｌｄ－１、トリメトプリムまたはメトトレキサートで処理する。ＤＤ調節型ペイロードを形質導入した免疫細胞で処理したマウスは、対照動物と比較した場合、腫瘍量が軽減されると予想される。

【０５１８】

実施例９．ＤＤ調節型ペイロードの共発現

ＤＤ－インターロイキン、例えばＤＤ－ＩＬ２と、ＤＤ－カスパーゼ９またはＤＤ　ＦＯＸＰ３構築物を、細胞に同時形質移入する。形質移入した細胞を、利用するＤＤに応じた安定化リガンドで処理する。培地中のＤＤ－ＩＬ２の発現を、ＥＬＩＳＡにより測定する。ＦＯＸＰ３及びカスパーゼ９について、それぞれ、イムノブロッティングによりＦＯＸＰ３及びカスパーゼ９発現を評価する。

【０５１９】

実施例１０．ＤＤルシフェラーゼ細胞のｉｎ　ｖｉｖｏ追跡

ＤＤルシフェラーゼ構築物を光学レポーターとして利用して、ＤＤ構築物を発現するリガンド及び／または細胞が標的組織に到達したかどうかを評価することができる。また、ＤＤに関する薬物動態及び薬力学（ＰＫ／ＰＤ）の関係性の研究にも利用することができる。ＰＫ／ＰＤは、（ｉ）安定化リガンドのＰＫ（ｉｉ）特定の細胞型におけるＤＤの挙動（ｉｉｉ）カーゴタンパク質の挙動に依存し；その一部は、ＤＤ調節型ルシフェラーゼ構築物を利用して研究し得る。ＤＤルシフェラーゼ構築物を、初代Ｔ細胞、または細胞株、例えばＨＣＴ－１１６、ＳＫＯＶ－３細胞などの目的の細胞内で発現または共発現させ、免疫不全マウスへ、例えば、尾静脈、腹腔内、または皮下注射により注射する。マウスを、対応するリガンドまたはビヒクル対照で処理する。リガンド注射の８～２４時間後、ペイロードがホタルルシフェラーゼの場合はＤ－ルシフェリンを、ペイロードがウミシイタケルシフェラーゼの場合はセレンテラジンをマウスに注射する。動物を麻酔し、生物発光イメージャー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）を使用して画像化する。リガンドを注射したマウスのルシフェラーゼ出力を対照マウスと比較し、画像解析ソフトウェア（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）を使用してシグナルを定量する。ルシフェラーゼシグナルは、ビヒクル対照で処理したマウスに比べて、リガンドで処理したマウスにおいて、バックグラウンドよりもはるかに高いと予想される。

【０５２０】

実施例１１．免疫細胞の増殖及び活性化に対するサイトカインの効果

ナチュラルキラー細胞などの免疫細胞は、増殖及び生存のためにＩＬ２などのサイトカインに依存している。サイトカインへのこの依存性を使用して、ＤＤ調節型または構成的発現型のサイトカイン及びサイトカイン融合タンパク質の機能を試験することができる。

【０５２１】

活性化のためのサイトカインに対するＮＫ－９２細胞の依存性を試験した。細胞を最初にＩＬ２とともに3日間培養した後、細胞を２回洗浄し、ＩＬ２を含まない培地で７時間培養した。細胞をＩＬ２（１００μｇ／ｍｌ）の存在下で１８時間培養した。マーカーの発現の増加がＮＫ活性化に関連する、そのようなマーカーのパネルのＦＡＣＳ分析によって、サイトカイン処理に応答したＮＫ－９２細胞の活性化を評価した。これらには、ＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ７１、ＣＤ６９；ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ４、及びＣＸＣＲ３などのケモカイン受容体、パーフォリン、グランザイムＢ、ならびにインターフェロンγ（ＩＦＮｇ）が含まれる。ＩＦＮｇのＦＡＣＳの前に、ブレフェルジンＡの存在下で細胞を４時間培養した。また、ＩＦＮｇレベルを培地中で測定した。ＮＫ細胞は、細胞の活性化、シグナル伝達及び分化経路にとって重要なタンパク質であるＪＡＫ／ＳＴＡＴ、ＥＲＫ、及びｐ３８／ＭＡＰＫ経路のリン酸化を通じて、環境内のサイトカインなどの外部刺激に応答する。サイトカインの添加に応じたＡＫＴ、ＳＴＡＴ３及びＳＴＡＴ５のリン酸化をＦＡＣＳで測

定した。リン酸化事象は一過性であるため、分析の前に、ＮＫ－９２細胞を１５または６０分間サイトカインで処理した。選択マーカーについて、未処理と比較したＩＬ２処理の平均蛍光強度の変化倍率を表１５に示す。

【表１５】

表１５：ＩＬ２誘導マーカー

マーカー	倍率変化
CD69	1.60
CXCR4	3.56
パーフォリン	1.72
グランザイム	1.62
IFNg（細胞内）	1.15
IFNg（上清）	7.43
pAKT（15 分）	1.23
pAKT（60 分）	1.34
pSTAT3（15 分）	1.19
pSTAT3（60 分）	1.38
pSTAT5（15 分）	1.90

【０５２２】

ＩＬ２での処置は、ＣＤ６９、ＣＸＣＲ４、パーフォリン、グランザイムＢ、及びＩＦＮｇの発現の増加をもたらした。さらに、ＩＬ２で処理すると、ＮＫ－９２細胞から培地に分泌されるＩＦＮｇレベルは、未処理の対照よりも高くなった。ＳＴＡＴ５のリン酸化は、ＩＬ２の添加後１５分及び６０分で増加した。ホスホＡＫＴ及びＳＴＡＴ３の中程度の増加が観察された。まとめると、これらの結果は、サイトカインがＮＫ細胞を活性化できることを示している。

【０５２３】

ＮＫ－９２細胞（ナチュラルキラー細胞株）及びＴ細胞株Ｊｕｒｋａｔ細胞及びＳｕｐＴ１細胞において、増殖に関するサイトカインへの免疫細胞の依存性を試験した。細胞をウェルあたり４０，０００個で播種し、ＩＬ２またはＩＬ１５の存在下で３日間培養した。未処理の細胞では、ＮＫ－９２細胞の数は、時間とともに減少した。しかしながら、ＩＬ２による処置により、細胞数が増加した。対照的に、ＳｕｐＴ１及びＪｕｒｋａｔ細胞において、サイトカイン処理で得られた細胞数は、未処理の対照と同等であった。したがって、ＮＫ－９２細胞は、生存に関してサイトカインに依存する。

【０５２４】

実施例１２．ＤＤ調節型ＦＯＸＰ３発現

完全長またはトランケート型（ＦＯＸＰ３Δ２）と、ｅｃＤＨＦＲ（ＤＤ）またはＦＫＢＰ（ＤＤ）などのＤＤを融合することにより、融合分子を生成する。これらの融合分子をｐＬＶＸ－ＩＲＥＳ－Ｐｕｒｏベクターにクローニングした。

【０５２５】

リガンド依存性ＦＯＸＰ３産生を試験するために、１００万個のＨＥＫ－２９３Ｔ細胞を、ＤＭＥＭ及び１０％ＦＢＳを含む増殖培地中の６ウェルプレートに播種し、３７℃、５％ＣＯ２で一晩インキュベートした。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００を使用して細胞に構築物を形質移入し、２４時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を１０μＭのトリメトプリムまたは１μＭのＳｈｉｅｌｄ－１の存在下または非存在下で増殖培地に交換し、さらに２４時間インキュベートした。細胞を回収し、抗ＦＯＸＰ３抗体（Ａｂｃａｍ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ）を使用したウエスタンブロッティングによりＦＯＸＰ３レベルを分析した。ＯＴ－ＦＯＸＰ３－００３、及びＯＴ－ＦＯＸＰ３－００７は、最も強力なＳｈｉｅｌｄ－１依存性ＦＯＸＰ３安定化を示し、ＯＴ－ＦＯＸＰ３

－００８は、最も強力なトリメトプリム依存性ＦＯＸＰ３安定化を示した（図１７Ａ及び図１７Ｂ）。構築物ＯＴ－ＦＯＸＰ３－００４及びＯＴ－ＦＯＸＰ３－００９は、中程度のＴＭＰ及びｓｈｉｅｌｄ－１依存性の安定化を示した。

【０５２６】

実施例１３．Ｔ細胞増殖に対するリガンドの効果

免疫細胞増殖に対する本発明のＳＲＥに特異的なリガンドの効果を測定して、Ｔ細胞の増殖または生存を阻害しなかったリガンドの濃度を特定した。２人の異なるドナーに由来するＴ細胞をＣＤ３／ＣＤ２８で刺激し、０．０４μＭ～１６０μＭの範囲の用量のリガンドＴＭＰまたは対照ビヒクル（ＤＭＳＯ）で処理した。Ｔ細胞のＣＤ４及びＣＤ８集団内の分裂細胞の割合を、ＦＡＣＳを使用して測定した。０．０４μＭ～４０μＭの範囲のＴＭＰ濃度は、ＣＤ８及びＣＤ４集団内の分裂細胞の割合に影響を与えなかったが、濃度１６０μＭのＴＭＰは分裂細胞の割合を７０～９０％減少させた。したがって、Ｔ細胞ベースの実験のためのＴＭＰの最適濃度は１６０μＭ未満であると決定された。

【０５２７】

実施例１４．Ｔ細胞におけるＳＲＥ発現用のプロモーター選択

ベクターにおけるＳＲＥの発現は、レトロウイルスの末端反復配列（ＬＴＲ）によって、またはＳＲＥの上流に位置する細胞プロモーターもしくはウイルスプロモーターによって駆動され得る。プロモーターの活性は細胞の種類によって異なる場合があるため、プロモーターの選択は各細胞の種類に対して最適化する必要がある。最適なプロモーターを特定するために、ＡｃＧＦＰ（配列番号２２３）をＣＭＶまたはＥＦ１ａプロモーターを有するｐＬＶＸ．ＩＲＥＳ　Ｐｕｒｏ構築物にクローニングした。患者由来のＴ細胞及びＳｕｐ　Ｔ１細胞に構築物を形質導入し、形質導入後３日目及び５日目にＦＡＣＳを使用してＧＦＰ発現を測定した。図１８に示すように、ＣＭＶプロモーターとＥＦ１ａプロモーターの両方がＳｕｐＴ１細胞とＴ細胞でＧＦＰの発現を駆動することができる。ＧＦＰ陽性Ｔ細胞の割合は、形質導入後３日目と６日目の両方で、ＥＦ１ａプロモーターに比べてＣＭＶプロモーターでＧＦＰ発現を駆動した場合に高かった。対照的に、ＧＦＰ陽性細胞の割合は、ＣＭＶプロモーターに比べてＥＦ１ａプロモーターでＧＦＰ発現を駆動した場合にはるかに高かった。したがって、発現に適した最適なプロモーターは、細胞の種類によって異なる。

【０５２８】

実施例１５．ＥＢＶ腫瘍抗原を介したｉｎ　ｖｉｖｏでのＴＣＲ再刺激

ＤＤ調節型サイトカインを発現するように設計したヒトＴ細胞は、抗原特異的ではない。しかしながら、ｉｎ　ｖｉｖｏでＴ細胞が機能するには、抗原との結合時に生じる再刺激が必要である。この抗原を介した再刺激要求性は、マウスでｉｎ　ｖｉｖｏにおいて模倣することができ、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）抗原を利用してもよい。およそ９０％の成人が現在または以前にＥＢＶに感染している。さらに、主要組織適合性グループＨＬＡ－Ａ０２は、ＥＢＶ陽性ホジキンリンパ腫を発症するリスクの低下に関連しており、ウイルスクリアランスを促進するＣＴＬペプチドエピトープがＨＬＡ－Ａ０２によって提示されることを示唆している。ＨＬＡ－Ａ０２陽性のいくつかの腫瘍細胞株、例えばＲａｊｉ細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏ研究に使用される。様々なドナーから取得した初代ヒトＴ細胞をＣＤ３／ＣＤ２８ダイナビーズの存在下で増殖させる。Ｔ細胞の反応性を試験するために、ＥＢＶ抗原、ＥＢＶ陽性Ｒａｊｉ細胞、及びＥＢＶ陰性Ｒａｍｏｓ細胞を使用する。抗ＨＬＡ抗体を使用して抗原認識におけるＨＬＡ－Ａ０２の関与を試験し、アッセイの特異性を試験する。Ｔ細胞を、蛍光標識したＲａｊｉ細胞またはＲａｍｏｓ細胞とともにインキュベートすることにより細胞死滅アッセイを行い、ドナーＴ細胞がＲａｊｉ細胞を優先的に死滅させる能力を評価する。ＥＢＶ抗原との相互作用に応じたＴ細胞の活性化は、マイトマイシン処理したＲａｊｉ細胞またはＲａｍｏｓ細胞を蛍光標識Ｔ細胞とともに培養することにより測定する。Ｔ細胞の活性化及び増殖状態を、ＩＦＮｇ、ＣＤ１０７ａ、グランザイム、及びパーフォリンの発現を測定することにより調べる。多くのヒトがＥＢＶに曝露されているため、多くの例では、ドナーＴ細胞はＲａｍｏｓ細胞ではなく

Ｒａｊｉ細胞に免疫反応性があると予想される。Ｒａｊｉ細胞に反応するＴ細胞は、グランザイムやパーフォリンなどのＴ細胞活性化マーカーに対して陽性になる可能性がある。

【０５２９】

実施例１６．ｉｎ　ｖｉｖｏでのリガンド依存性ＩＬ２安定化

ＩＬ２ポリペプチドを、ＦＫＢＰ（Ｆ３６Ｖ；Ｌ１０６Ｐ）またはｅｃＤＨＦＲ（Ｒ１２Ｙ、Ｙ１００Ｉ）のいずれかに連結した。ＩＬ２構築物をｐＬＶＸ－ＩＲＥＳ－Ｐｕｒｏレンチウイルスベクターにパッケージングした。ＩＬ２シグナル配列を構築物のＮ末端に挿入し、リンカーを、シグナル配列、ＤＤ及びＩＬ２の間に配置した。

【０５３０】

ＯＴ－ＩＬ２－００１（ＦＫＢＰ）を、ヒト結腸直腸癌株ＨＣＴ－１１６に形質導入した。ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＩＬ２発現をＥＬＩＳＡにより確認した。ｉｎ　ｖｉｖｏでのリガンドを介した調節を試験するために、ＩＬ２構築物を形質導入した５００万個のＨＣＴ１１６細胞を免疫不全マウスの側腹部に皮下注射した。注射のおよそ２週間後、腫瘍がおよそ３００立方ｍｍのサイズに達する際に、マウスに、対応する安定化リガンドまたは対応するビヒクル対照を投与する。１０％ジメチルアセトアミド、１０％Ｓｏｌｕｔｏｌ　ＨＳ１５、及び８０％生理食塩水からなる担体とともに、Ｓｈｉｅｌｄ－１を１０ｍｇ／ｋｇ体重の濃度で注射する。マウスを腫瘍で安楽死させ、血漿試料を採取してＩＬ２レベルを分析した。腫瘍ＩＬ２レベルは、タンパク質ｍｇあたりのピコグラムとしてＥＬＩＳＡで測定した。図１９に示すように、Ｓｈｉｅｌｄ－１処置で検出された腫瘍ＩＬ２レベルは、ビヒクル対照で検出されたレベルよりも高かった。これらのデータは、ｉｎ　ｖｉｖｏでＦＫＰ－ＩＬ２を安定的に発現するＨＣＴ１１６細胞からの用量依存的なＩＬ２分泌を示している。

【０５３１】

実施例１７．Ｔ細胞の形質導入及び増殖の最適化

Ｔ細胞増殖及び形質導入プロトコールは、Ｔ細胞増殖を促進するために、αＣＤ３／αＣＤ２８ビーズ刺激で０日目にドナー由来ヒトＴ細胞を刺激することからなる。１日目に、選択した構築物をＴ細胞に形質導入し、時折培地を交換して最大１１日間増殖させた。１１日目に、ビーズを洗い流し、細胞を様々な機能アッセイで使用するためにアリコートで凍結させた。Ｔ細胞の増殖と形質導入のプロセスには、ウイルス形質導入によって引き起こされるＴ細胞の増殖における最初の４日間の遅れに続いて、Ｔ細胞の指数関数的増殖を保証する最適化が必要である。最適化されていない増殖プロトコールでは、同様の予想Ｔ細胞数を達成するために２１日間を要する最大１０日間の静的増殖、ならびに生存率の異常な低下及び異常なＣＤ４対ＣＤ８　Ｔ細胞比が生じ得る。Ｔ細胞刺激に使用するαＣＤ３／αＣＤ２８の供給源及びビーズの比率を試験して、最適な条件を特定した。様々な供給源に由来するαＣＤ３／αＣＤ２８ビーズを使用した。これらには、ダイナビーズ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、ＣＤ３／ＣＤ２８＋／－ＣＤ２を有する抗ビオチンＭＡＣＳｉＢｅａｄ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、マクロビーズ、すなわちαＣＤ３／αＣＤ２８の可溶性四量体抗体の複合体であるαＣＤ３／αＣＤ２８抗体をコーティングした３μｍ磁性ポリマービーズ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ，Ｃａｎａｄａ）が含まれる。ビーズとＴ細胞を３：１、１：１、１：３、及び１：９の比率で混合して、共培養に最適な比率を特定した。また、ドナー関連の変動性を説明するために、２つの別々のドナーを使用してアッセイを実施した。細胞生存率を０、４、７日目に測定した。図２０に示すように、両方のドナーは、他のすべての条件、特に４日目と比較して、ビーズ対細胞比１：３で細胞生存率の向上を示した。細胞数のカウントは、セロメーターとフローサイトメトリー分析の両方を使用して実行した。この分析では、ＭＯＩ　１０でウイルスに細胞を感染させ、偽（Ｌｅｎｔｉｂｏｏｓｔ（ＬＢ）形質導入細胞と比較して、Ｔ細胞数に対するウイルス形質導入の影響を調べた。０日目の増殖と比較した４日目及び７日目の細胞増殖の倍数変化を分析し、セロメーターカウントの結果を表１６に示す。

【表１６】

表１６．Ｔ細胞の増殖

実験条件	ドナー1		ドナー2	
	４日目	７日目	４日目	７日目
MOI 3:1	1.70	5.00	1.94	3.90
MOI 1:1	2.15	3.95	2.55	4.30
MOI 1:3	1.69	4.25	2.75	8.80
MOI 1:9	1.65	3.70	3.91	6.35
MOI 免疫培養	0.98	2.30	0.95	3.05
LB 3:1	2.10	4.25	1.45	5.00
LB 1:1	2.20	6.35	2.35	6.65
LB 1:3	2.05	9.45	2.97	10.50
LB 1:9	1.55	5.60	2.77	3.75
LB 免疫培養	1.05	3.10	0.86	2.30

【０５３２】

表１６に示すように、両方のドナーの全体的な増殖は４日目よりも７日目で大きかった。ドナー１では、ウイルス形質導入細胞の４日目の増殖は、３：１のビーズ対細胞比とＭＯＩ　１０を組み合わせて使用した場合に最も高かったが、一方、ドナー２のＴ細胞は１：９の比で最も増殖した。７日目に、ドナー１では１：１の比、及びドナー２では１：３の比が最も高い細胞増殖を示した。これらの結果に基づいて、Ｔ細胞増殖の促進に最適なビーズと細胞の比は１：３であると特定された。

【０５３３】

また、様々な感染多重度（ＭＯＩ）で形質導入したＴ細胞を、フローサイトメトリーを使用して試験した。ドナー１についての結果を表１７に示す。

【表１７】

表１７．ウイルス力価及びビーズと細胞の比の影響

MOI	ビーズと細胞の比				免　疫
	3:1	1:1	1:3	1:9	培養
10 MOI	0.81	0.93	0.85	1.28	1.42
2 MOI	0.37	0.50	0.51	1.00	0.65
0.4 MOI	0.33	0.46	0.50	0.72	0.86

【０５３４】

表１７に示すように、１：９のビーズ比は、ドナー１について試験したすべての条件の中で最高の細胞生存率を示した。ドナー２についても同様の結果が得られた。

【０５３５】

増殖中のＴ細胞集団内のＣＤ４対ＣＤ８の比。実験の開始時に、ＣＤ８に対するＣＤ４の比率は３であり、母集団の歪みと判定された。結果を表１８に示す。

【表１８－１】

表１８．ＣＤ４とＣＤ８の細胞比

MOI	ドナー1	ドナー2

【表１８－２】

	3:1	1:1	1:3	1:9	免疫培養	3:1	1:1	1:3	1:9	免疫培養
10	8.63	8.73	5.84	3.7	7.44	4.53	3.25	2.56	1.65	2.75
2	9.6	9.91	7.18	4.11	6.45	5.25	3.16	2.04	1.56	3.23
0.4	10.85	11.33	7.51	4.23	5	6.22	4.71	2.59	1.43	3.55
LB	6.95	7.24	5.24	3.21	4.96	3.86	3.27	2.18	1.23	2.78

【０５３６】

ドナー１は、１：９のビーズ対細胞比を使用した場合に、３に近いＣＤ４対ＣＤ８比を示した。ドナー２でも、ビーズと細胞の比が１：３の場合に、同様の結果が得られた。

【０５３７】

まとめると、これらの実験は、Ｔ細胞をビーズによって過剰刺激した場合に活性化誘導による細胞死が生じ得ることを示しており、したがって最適なビーズ対Ｔ細胞比が必要である。実験結果は、様々なＭＯＩにおける最適なビーズと細胞の比が１：３であったことを示唆している。

【０５３８】

実施例１８．ＢＣＭＡ　ＣＡＲ発現の分析

ＢＣＭＡ　ＣＡＲ融合ポリペプチドを、ＦＫＢＰ－ＤＤ、ｅｃＤＨＦＲ－ＤＤまたはヒトＤＨＦＲ－ＤＤのＮ末端のいずれかに連結し、構築物を、ＥＦ１ａプロモーターの転写制御下でｐＬＶＸ－ＩＲＥＳ－Ｐｕｒｏベクターにクローニングした。

【０５３９】

ＤＤ－ＢＣＭＡ　ＣＡＲ構築物のリガンド依存性発現を試験するために、１００万個のＨＥＫ　ＨＣＴ１１６細胞を、ＤＭＥＭ及び１０％ＦＢＳを含む増殖培地で培養し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００またはＬｅｎｔｉＢｏｏｓｔを使用してＣＡＲ構築物を形質移入した。形質移入の４８時間後、細胞を１μＭもしくは１０μＭのＳｈｉｅｌｄ－１、１０μＭのトリメトプリム、１μＭのメトトレキサート、またはビヒクル対照で処理し、２４時間インキュベートした。ＨＣＴ１１６細胞におけるＤＤ－ＢＣＭＡ　ＣＡＲ構築物の表面発現を、ＣＡＲのκ軽鎖に結合するプロテインＬ－ビオチン－ストレプトアビジン－アロフィコシアニン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用する蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）を用いて測定した。図２１に示すように、ＦＫＢＰ－ＤＤを使用したＯＴ－ＢＣＭＡ－００２の表面発現はＳｈｉｅｌｄ－１の存在下で上昇し、一方、ｅｃＤＨＦＲ－ＤＤを使用したＯＴ－ＢＣＭＡ－００３はトリメトプリムの存在下で表面発現の上昇を示した。予想通り、構成的に発現した構築物ＯＴ－ＢＣＭＡ－００１は、リガンドの非存在下でも高い発現を示した。

【０５４０】

実施例１９．ＣＡＲの発現及び機能の分析

本明細書に記載のキメラ抗原受容体、例えば、限定されないが、ＣＤ２２　ＣＡＲ、ＡＬＫ　ＣＡＲ、ＣＤ３３　ＣＡＲ、ＨＥＲ２　ＣＡＲ及びＧＤ２　ＣＡＲ構築物の発現を、ｅｃＤＨＦＲ　ＤＤ、ＦＫＢＰ　ＤＤ及びｈＤＨＦＲ　ＤＤなどの不安定化ドメインに融合する。構築物のリガンド依存性発現を試験するために、免疫細胞をＤＭＥＭ及び１０％を含む増殖培地で培養し、ＣＡＲ構築物を形質導入する。形質導入の４８時間後、細胞を、ＤＤに対応するリガンド、例えば、１μＭもしくは１０μＭのＳｈｉｅｌｄ－１、１０μＭのトリメトプリム、１μＭのメトトレキサート、またはビヒクル対照で処理し、２４時間インキュベートする。次いで、ＣＡＲの構成要素であるＣＤ３ζを使用したウエス

タンブロットにより細胞を分析する。ＣＡＲの表面発現を、プロテインＬを使用してＦＡＣＳにより分析する。ＣＡＲの細胞内発現及び表面発現は、リガンドの非存在下では検出できないが、リガンドの存在により強く誘導されると予想される。

【０５４１】

ＤＤ調節型ＣＡＲ構築物を発現するＴ細胞の、標的細胞との機能的な相互作用における効力を評価する。ＣＡＲ　Ｔ細胞と相互作用するために、選択した標的細胞は、ＣＡＲに関連する抗原を、天然または異所的のいずれかで発現する。例えば、ＢＣＭＡの高い内在性発現を有する標的細胞として、ＫＭＳ１１、ＭＭ－１Ｓ、ＲＰＭＩ－８２２６細胞が挙げられ；ＣＤ３３を発現する標的細胞として、ＨＬ－６０、ＭＯＬＭ１３、ＭＯＬＭ１４細胞が挙げられる。あるいは、抗原の内在性発現が低い細胞株において抗原を異所的に発現するように標的細胞株を改変してもよい。

【０５４２】

複数のアッセイを使用して機能性を測定する。共培養の前に、必要に応じてマイトマイシンＣの存在下で標的細胞を培養し、標的細胞の増殖を防止する。これにより、標的細胞の増殖がＴ細胞の増殖を上回らないことが保証される。細胞傷害性アッセイを用いて、標的細胞死を誘導するＴ細胞の能力を測定する。ウミシイタケまたはホタルのルシフェラーゼを発現するように標的細胞を改変し、ＤＤまたはビヒクル対照に関連するリガンドの存在下で１８～２４時間、ＤＤ調節型ＣＡＲ構築物を発現するＴ細胞とともに共培養する。共培養の終わりに、細胞を溶解し、適切な基質を使用してルシフェラーゼ活性を測定する。ＤＤ調節型ＣＡＲ発現Ｔ細胞を、リガンドの存在下で抗原発現標的細胞とともに共培養する場合、ルシフェラーゼ活性が増加すると予想される。ビヒクル対照細胞か、または抗原を発現しない標的細胞を利用する場合、細胞傷害性はないものと予想される。

【０５４３】

ＤＤ　ＣＡＲ発現細胞の細胞溶解能を、クロム－５１放出アッセイを使用して、初代ヒトＴ細胞またはヒト細胞株（例えば、ＮＡＬＭ６、Ｋ５６２及びＲａｊｉ）において評価する。標的細胞に$Na_2{}^{51}CrO_4$をロードし、２回洗浄し、フェノールレッドを含まない増殖培地に再懸濁する。未処理またはリガンド処理ＤＤ　ＣＡＲ及び偽形質導入細胞を、様々なエフェクター：標的細胞比で、同族の抗原発現標的細胞とともに共インキュベートし、液体シンチレーションカウンターを使用して上清へのクロム放出を測定する。ＤＤ　ＣＡＲを有する細胞は、リガンドの存在下でのみ特定の細胞溶解を示すことが予想される。リガンドの非存在下でのＤＤＣＡＲを有する細胞または偽形質移入細胞は、最小の細胞溶解活性を示すことが予想される。

【０５４４】

Ｔ細胞の活性化は、細胞傷害性Ｔ細胞が標的細胞の殺傷を可能にするパーフォリン及びグランザイムなどの分子を放出するエキソサイトーシスプロセスである脱顆粒をもたらす。脱顆粒は、エキソサイトーシスの兆候、例えばＣＤ１０７に関してＦＡＣＳによって、及びイムノアッセイを使用してパーフォリン及びグランザイムなどの脱顆粒のマーカーによって、培地を分析することにより測定する。

【０５４５】

ＣＡＲとその同族の抗原との係合は、Ｔ細胞の活性化をもたらし、これは、ＣＡＲ発現Ｔ細胞と標的細胞の共培養の２４時間後に測定される。Ｔ細胞の活性化は、ＩＦＮｇ、ＩＬ２、及びＣＤ６９のレベルを測定することにより評価する。抗原を介したＴ細胞活性化に応答するＴ細胞増殖を、Ｔ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で標識することにより測定し、これを、複数世代にわたって細胞を追跡するために使用する。標識したＴ細胞をマイトマイシン処理した標的細胞とともに培養し、細胞増殖を３～５日間追跡する。Ｔ細胞の増殖と活性化は、ＤＤ調節型ＣＡＲ発現Ｔ細胞をリガンドの存在下で同族の抗原を発現する標的細胞と共培養する場合に増加すると予想される。ビヒクル対照細胞か、または抗原を発現しない標的細胞を使用する場合、両パラメーターは変化しないものと予想される。

【０５４６】

ＤＤ調節型ＣＡＲの腫瘍フリーの生存を促進する能力を測定するために、マウスに抗原陽性標的細胞を静脈内注射する。注射後、マウスを非形質導入偽Ｔ細胞または抗原特異的キメラ抗原受容体で形質導入したＴ細胞で処理する。その後、マウスを２つのコホートに分割し；１つ目のコホートをＳＲＥに特異的なリガンドで処理し、２つ目のコホートをビヒクル対照で処理する。マウスの生存を、標的細胞の投与後最大８０日間モニタリングする。ＣＡＲ形質導入Ｔ細胞及びリガンドで処理した腫瘍を有するマウスは、非形質導入細胞；ベクター対照形質導入Ｔ細胞またはビヒクル対照で処理したマウスよりも長く生存することが予想される。

【０５４７】

リガンド誘導性の腫瘍成長低下を測定するために、０日目にマウスに抗原陽性標的細胞を同所的に注射する。次いで３日目に、マウスを腹腔内でシクロホスファミド処理する。細胞を抗原特異的ＣＡＲ構築物で処理する。マウスを、組換えインターロイキン７、またはＩＬ７抗体と複合体化したインターロイキン７で、週に２～３回、３週間処置して、Ｔ細胞の持続性を促進する。その後、マウスを２つのコホートに分割し；１つ目のコホートをＳＲＥに特異的なリガンドで処理し、２つ目のコホートをビヒクル対照で処理する。腫瘍の大きさを、接種後の様々な時点で測定する。抗原特異的ＣＡＲ及びリガンドで処理したマウスは腫瘍を含まないと予想される一方、偽形質導入細胞またはビヒクル対照細胞で処理したマウスは腫瘍により死亡すると予測される。

【０５４８】

ＤＤ調節型ＣＡＲがリガンド依存的様式で確立された腫瘍の退縮を引き起こし得るかどうかを試験するために、ルシフェラーゼを発現する抗原陽性Ｔ細胞をマウスに同所的に接種する。腫瘍を８日間成長させ、生物発光イメージングを使用して成長をモニタリングする。腫瘍接種後８日目に、サイトカイン及び細胞傷害性療法の増強の存在下または非存在下でＣＡＲ形質導入細胞を静脈内注射する。リガンドまたはビヒクル対照の同時処置も開始する。ＣＡＲ　Ｔ細胞で処理したマウスは、リガンドの存在下で腫瘍退縮及び長期的な疾患制御を示すことが予想されるが、一方、偽形質導入細胞で処理したすべてのマウスは進行性の腫瘍成長により死亡すると予想される。

【０５４９】

実施例２０．Ｔ細胞枯渇表現型及びその反転の測定

初代Ｔ細胞を、可溶性ＣＤ３／ＣＤ２８またはＣＤ３／ＣＤ２８ダイナビーズを使用して活性化する。２４時間後、ＤＤ調節型ＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を細胞に形質導入し、２４時間休ませる。次いで、細胞をＳＲＥに特異的なリガンドまたはビヒクル対照で処理する。４日目に、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを取り除き、細胞をさらに３日間培養する。７日目に、細胞を徹底的に洗浄してリガンドを除去し、リガンドの非存在下で再播種し、３日間培養する。１０日目に、細胞を洗浄し、リガンドの非存在下で再播種した。細胞試料を１０日目に、枯渇に関連する表現型及び機能マーカーについて分析する。残りの細胞を、リガンドの非存在下で３日間培養し、１４日目に表現型及び機能的枯渇マーカーについて分析する。リガンドの存在下または非存在下で実験中に培養したＴ細胞を、対照として含める。ＰＤ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、２Ｂ４、及びＣＤ３９ａなどの枯渇の表現型マーカーを、ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞集団の両方で測定する。慢性的なＴ細胞活性化がＴ細胞の枯渇を引き起こすことが示されているため、実験を通してリガンドの連続的な存在下で培養したＴ細胞は、枯渇の複数のマーカーに対して陽性であると予想される。ＣＡＲの発現はリガンドの非存在下では検出できない／低いため、実験全体を通してリガンドの非存在下で培養したＴ細胞は枯渇の複数のマーカーに対して陰性であると予想される。７日目にリガンドを除去した細胞は、１０日目において、実験期間中にリガンドで処理した細胞に比べて、複数の枯渇マーカーに対して陽性である細胞の割合が低いと予想される。この結果は、Ｔ細胞のＣＤ８及びＣＤ４集団の両方で予想される。

【０５５０】

実施例２１．二重特異性キメラ抗原受容体

ヒトＴ細胞に、二重特異性キメラ抗原受容体をコードするレンチウイルスベクターを形

質導入する。二重特異性ＣＡＲの標的として、ＧＤ２、ＣＤ３３、ＢＣＭＡ、Ｈｅｒ２、ＡＬＫ、ＣＤ２２、及びＣＤ２７６が挙げられるが、これらに限定されない。細胞を、リガンドまたはビヒクル対照の存在下で２４～４８時間培養する。偽形質導入した、または１つの抗原のみに対して敗血性をコードするベクターで形質導入したヒトＴ細胞などの追加の対照を含める。抗イディオタイプＣＡＲ抗体を使用したフローサイトメトリーによりＣＡＲの発現を評価する。二重特異性ＣＡＲの発現は、二重特異性ＣＡＲ構築物を形質導入した細胞でのみリガンドの存在下で予想されるが、一方、単一特異性を示すＣＡＲ構築物を形質導入した対照は、単一のＣＡＲ構築物の発現をリガンドの存在下で示すと予想される。

【０５５１】

また、Ｔ細胞を、増殖、アポトーシスのマーカー及び記憶表現型について分析する。上記の方法で細胞を培養する。７日目または１０日目のいずれかにリガンドを除去し、１４日目に、アポトーシスについてはアネキシンＶ染色を使用して、記憶表現型についてはＣＤ６２Ｌをマーカーとして使用して、細胞を分析する。未処理細胞と比較した場合、リガンドで連続処理した細胞は、アポトーシス細胞の増加、増殖の減少、及びＣＤ６２Ｌ発現の減少を示すと予想され、これらはＴ細胞の枯渇を示す。７日目または１０日目におけるリガンド除去は、低いアネキシンＶ及び高いＣＤ６２Ｌ発現、ならびに未処理細胞と同様の増殖の増加を示すと予想される。

【０５５２】

実施例２２．Ｔ細胞枯渇表現型及びその反転の測定

初代Ｔ細胞を、可溶性ＣＤ３／ＣＤ２８またはＣＤ３／ＣＤ２８ダイナビーズを使用して活性化する。２４時間後、ＤＤ調節型ＣＤ１９　ＣＡＲ構築物を細胞に形質導入し、２４時間休ませる。次いで、細胞をＳＲＥに特異的なリガンドまたはビヒクル対照で処理する。４日目に、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを取り除き、細胞をさらに３日間培養する。７日目に、細胞を徹底的に洗浄してリガンドを除去し、リガンドの非存在下で再播種し、３日間培養する。１０日目に、細胞を洗浄し、リガンドの非存在下で再播種した。細胞試料を１０日目に、枯渇に関連する表現型及び機能マーカーについて分析する。残りの細胞を、リガンドの非存在下で３日間培養し、１４日目に表現型及び機能的枯渇マーカーについて分析する。リガンドの存在下または非存在下で実験中に培養したＴ細胞を、対照として含める。ＰＤ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、２Ｂ４、及びＣＤ３９ａなどの枯渇の表現型マーカーを、ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞集団の両方で測定する。慢性的なＴ細胞活性化がＴ細胞の枯渇を引き起こすことが示されているため、実験を通してリガンドの連続的な存在下で培養したＴ細胞は、枯渇の複数のマーカーに対して陽性であると予想される。ＣＡＲの発現はリガンドの非存在下では検出できない／低いため、実験全体を通してリガンドの非存在下で培養したＴ細胞は枯渇の複数のマーカーに対して陰性であると予想される。７日目にリガンドを除去した細胞は、１０日目において、実験期間中にリガンドで処理した細胞に比べて、複数の枯渇マーカーに対して陽性である細胞の割合が低いと予想される。この結果は、Ｔ細胞のＣＤ８及びＣＤ４集団の両方で予想される。

【０５５３】

また、Ｔ細胞を、増殖、アポトーシスのマーカー及び記憶表現型について分析する。上記の方法で細胞を培養する。７日目または１０日目のいずれかにリガンドを除去し、１４日目に、アポトーシスについてはアネキシンＶ染色を使用して、記憶表現型についてはＣＤ６２Ｌをマーカーとして使用して、細胞を分析する。未処理細胞と比較した場合、リガンドで連続処理した細胞は、アポトーシス細胞の増加、増殖の減少、及びＣＤ６２Ｌ発現の減少を示すと予想され、これらはＴ細胞の枯渇を示す。７日目または１０日目におけるリガンド除去は、低いアネキシンＶ及び高いＣＤ６２Ｌ発現、ならびに未処理細胞と同様の増殖の増加を示すと予想される。

【０５５４】

実施例２３．Ｔ細胞枯渇の反転の機能分析

ＤＤ調節型ＣＡＲ構築物を発現するＴ細胞の機能性を、サイトカイン放出を測定するこ

とにより評価する。ＤＤ　ＣＡＲ構築物を発現するＴ細胞を、抗原を（内在性または異所性に）発現する標的細胞と共培養する。Ｔ細胞を、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを使用して０日目に活性化する。２４時間後、ＤＤ調節型ＣＡＲ構築物を細胞に形質導入し、２４時間休ませる。次いで、細胞をＳＲＥまたはビヒクル対照に特異的なリガンドで処理する。４日目に、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを除去し、細胞をさらに３日間培養する。７日目に、細胞を徹底的に洗浄してリガンドを除去し、リガンドの非存在下で再播種し、３日間培養する。追加の実験条件では、細胞を７日目ではなく１０日目までリガンドで処理する。リガンドの存在下または非存在下で実験期間中培養したＴ細胞を対照として含める。２４時間後に細胞から上清を回収し、Ｔ細胞機能の読み取り値としてＩＬ２及びＩＦＮｇレベルを測定した。未処理の細胞と比較すると、リガンドで継続的に処理した細胞は、１４日目に、機能性Ｔ細胞の指標であるＩＬ２及びＩＦＮｇ発現の増加を示すと予想される。７日目または１０日目のリガンド除去は、ＩＦＮｇ及びＩＬ２レベルに最小限の影響を与えると予想される。

【０５５５】

枯渇したＴ細胞を機能的にレスキューする本発明の生体回路の能力も評価する。１０日目までリガンドで処理したＴ細胞を、キメラ抗原受容体及び複数の枯渇マーカー（ＰＤ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３など）に陽性の細胞に対して選別及び選択する。細胞を２つの群に分割し、１つ目の群をリガンドで処理し、２つ目の群をビヒクル対照で処理する。Ｔ細胞の機能性は、代用としてＩＬ２レベルを使用して測定する。リガンド除去は、Ｔ細胞の枯渇を逆転させると予測され、したがって、１０日目にリガンド除去に供する細胞は、リガンド処理細胞に比べてより高いＩＬ２レベルを有すると予想される。

【０５５６】

実施例２４．生体回路の挙動の最適化

本発明の生体回路は、最適化することができる複数のモジュールを含む。各構成要素のライブラリを生成し、所望の動作を備えた新規構築物を迅速に生成することができる。リガンドの薬物動態は、ｉｎ　ｖｉｖｏでのペイロード特異的調整のための強力なツールであり、これを使用して、調節因子に応じてエフェクターモジュールのリガンド応答曲線を左右にシフトさせることができる。リガンドの用量、濃度、大きさ、持続時間、投与経路を含むがこれらに限定されないいくつかの調節因子を試験する。不安定化ドメインを改変して、生体回路の挙動を向上させることもできる。不安定化ドメインは、生体回路のダイナミックレンジの中心的な決定因子である。選択したＤＤに応じて、エフェクターモジュールのリガンド応答曲線を上下にシフトさせることができる。エフェクターモジュール内のＤＤの性質、位置、及びエフェクターモジュール内のＤＤの数を改変する。ＤＤの選択も、所望の分解速度に応じて変更する。ＳＲＥの発現を転写において制御するプロモーターを最適化する。プロモーターの選択は、基底オフ状態に影響を与え、安定化のダイナミックレンジに影響する。さらに、プロモーターの選択は、生成される安定化されたペイロードの範囲に寄与する。生体回路の他の最適化可能な因子として、ベクター、翻訳エレメント、リーダー配列、ＳＲＥ内の構成要素の配置、コドン選択、プロテアーゼ部位、リンカー、及びｍＲＮＡ安定性が挙げられる。

【０５５７】

本発明を、いくつかの記載した実施形態に関して、ある程度の長さである程度詳細に説明してきたが、これは、本発明がいずれかのそのような詳細もしくは実施形態またはいずれかの特定の実施形態に限定されるべきであることを意図するものではなく、ただし、特許請求の範囲を参照して解釈すべきであり、それにより、先行技術を考慮してかかる請求項の可能な限り広い解釈を提供し、したがって、本発明の意図する範囲を効果的に包含する。

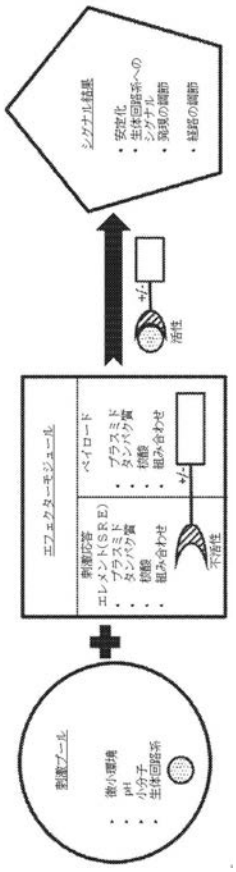
【０５５８】

本明細書中で言及するすべての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、その全体を参照により援用する。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先される。さらに、節の見出し、材料、方法、及び実施例は説明のみを目的としており、限定することを意図す

るものではない。

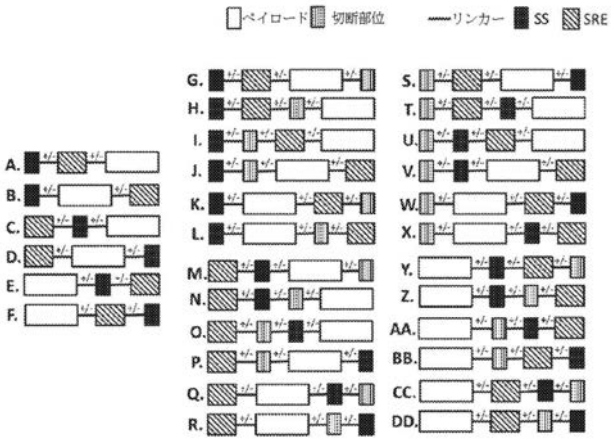
【図１】

【図１】



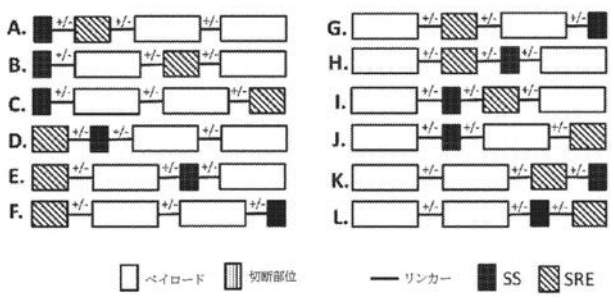
【図２】

【図２】

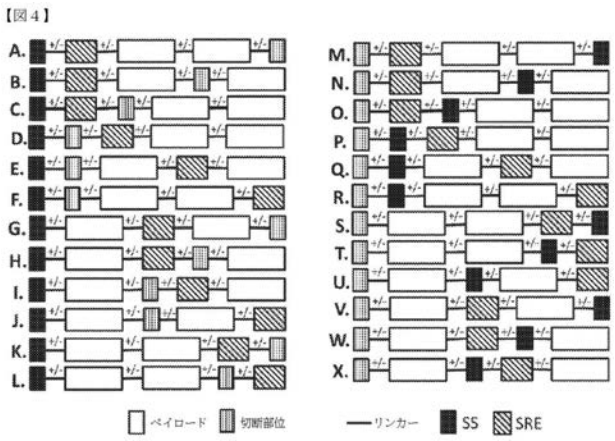


【図３】

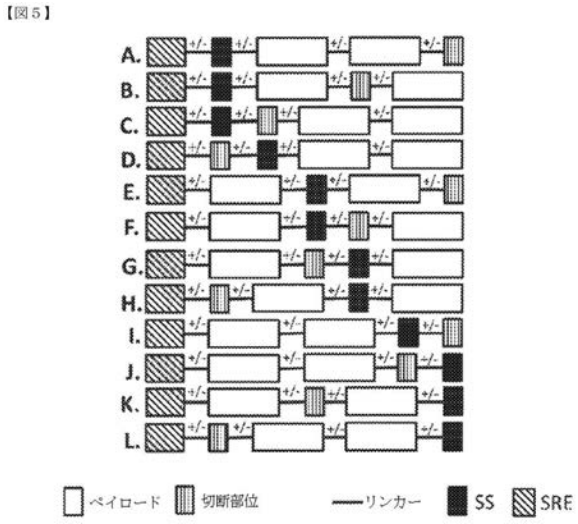
【図３】



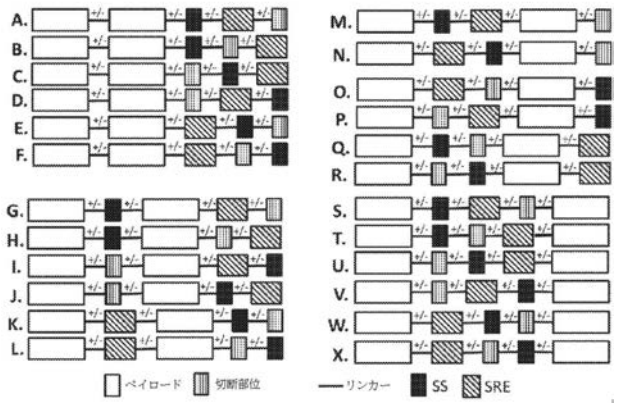
【図４】


【図４】
A.
B.
C.
D.
E.
F.
G.
H.
I.
J.
K.
L.
M.
N.
O.
P.
Q.
R.
S.
T.
U.
V.
W.
X.
ペイロード
切断部位
リンカー
SS
SRE

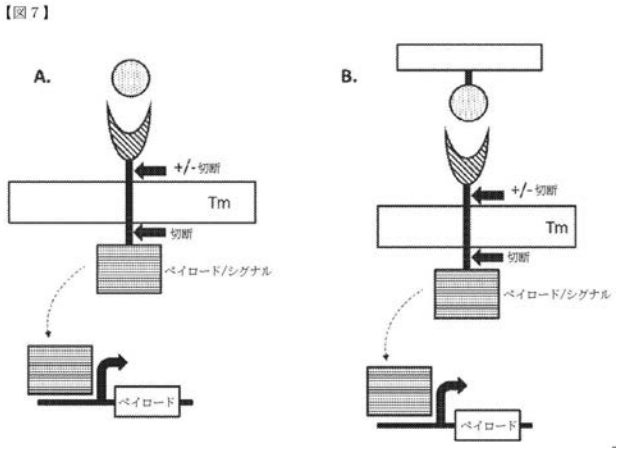
【図５】


【図５】
A.
B.
C.
D.
E.
F.
G.
H.
I.
J.
K.
L.
ペイロード
切断部位
リンカー
SS
SRE

【図６】

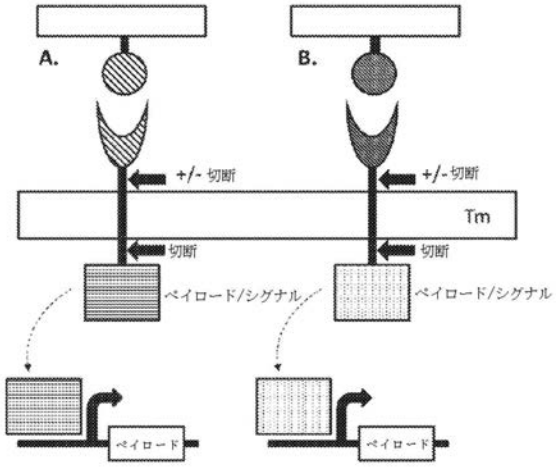

【図６】
A.
B.
C.
D.
E.
F.
G.
H.
I.
J.
K.
L.
M.
N.
O.
P.
Q.
R.
S.
T.
U.
V.
W.
X.
ペイロード
切断部位
リンカー
SS
SRE

【図７】


【図７】
A.
+/-切断
Tm
切断
ペイロード/シグナル
ペイロード
B.
+/-切断
Tm
切断
ペイロード/シグナル
ペイロード

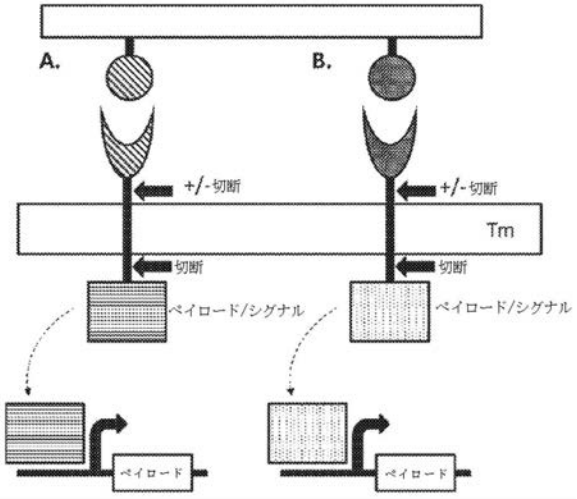
【図８】

【図８】



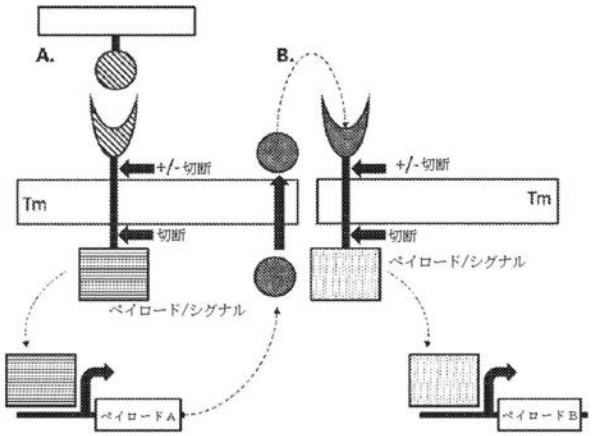
【図９】

【図９】



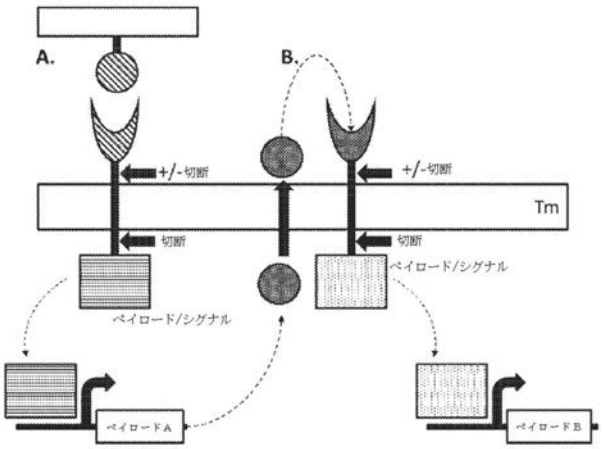
【図１０】

【図１０】



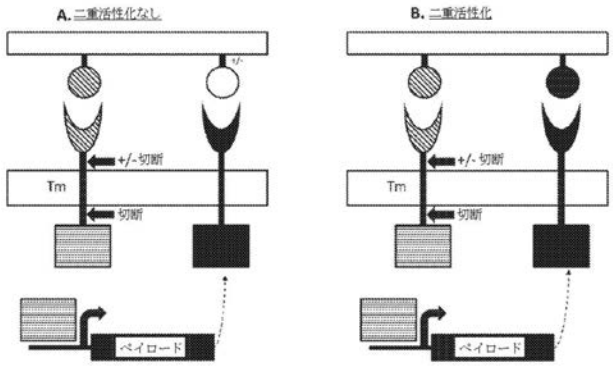
【図１１】

【図１１】



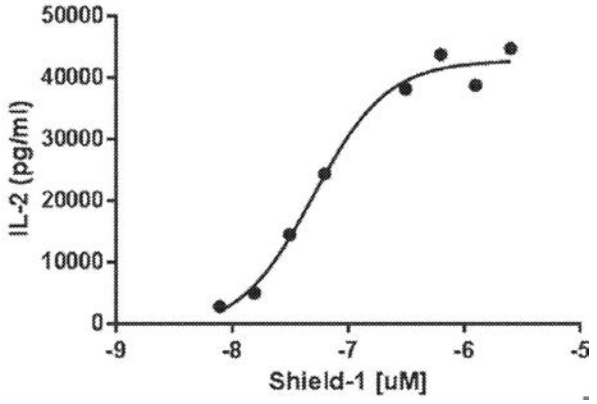
【図１２】

【図１２】



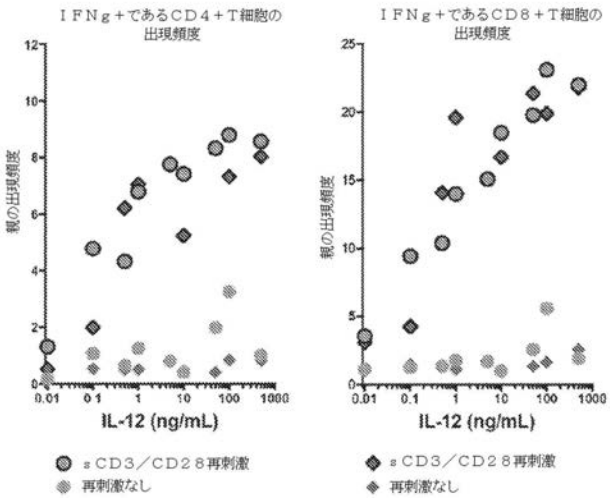
【図１３】

【図１３】



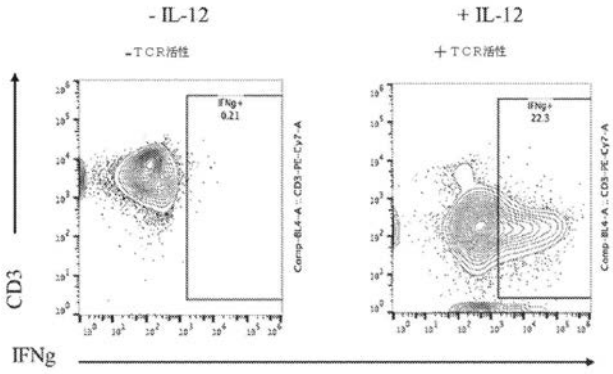
【図１４】

【図１４】



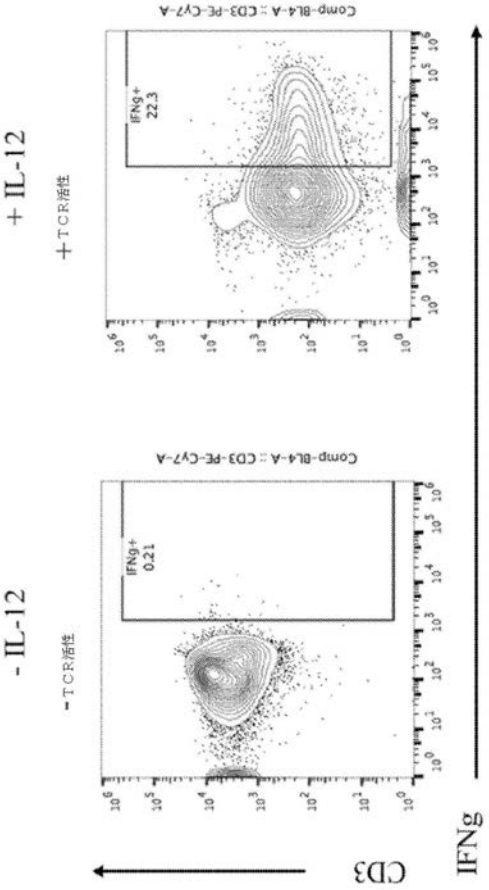
【図１５Ａ－１】

【図１５Ａ】

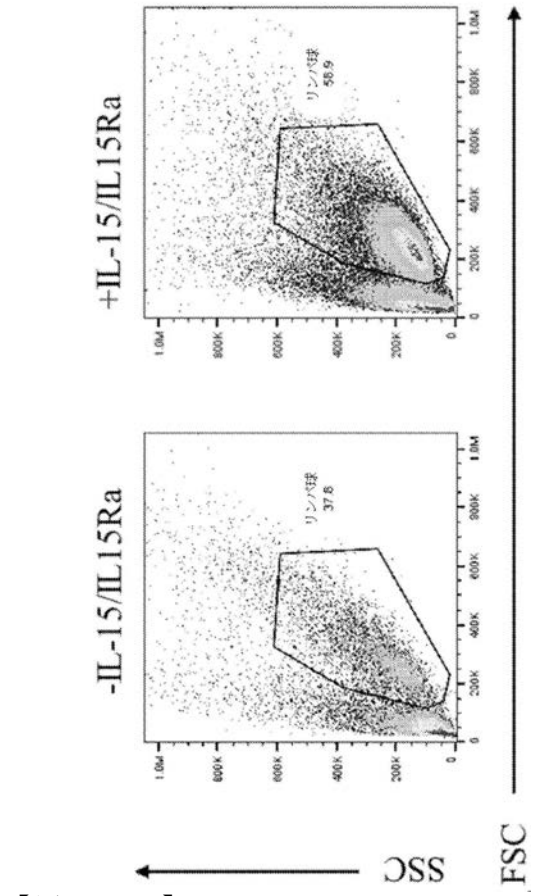


【図１５Ａ－２】

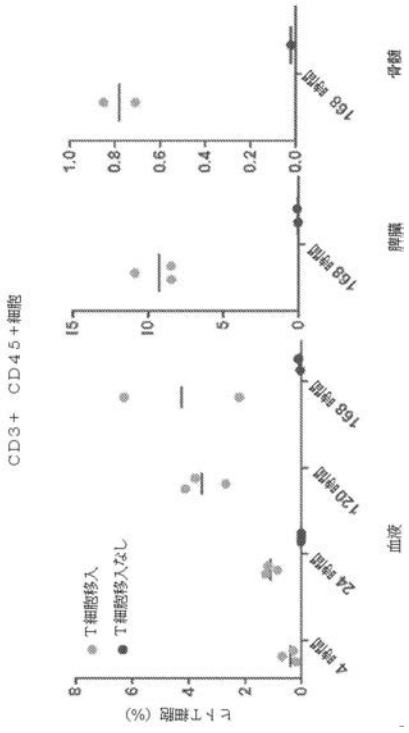
【図１５Ａ】



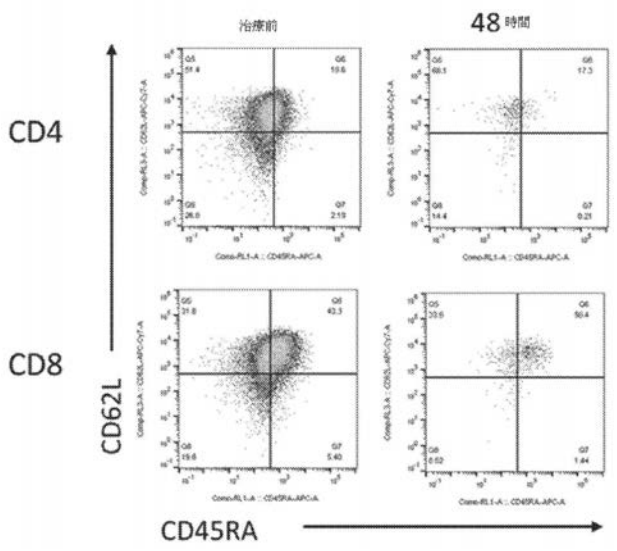
【図１５Ｂ】



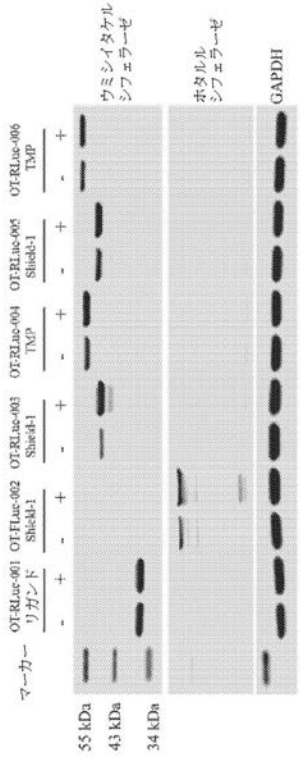
【図１５Ｃ】



【図１５Ｄ】

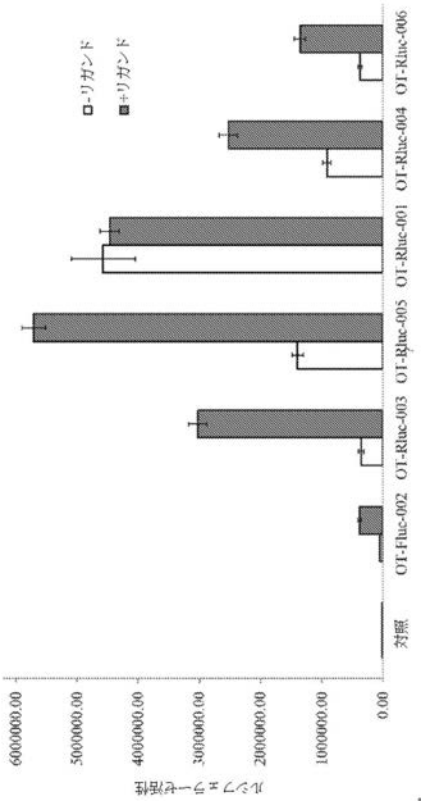


【図１６Ａ】



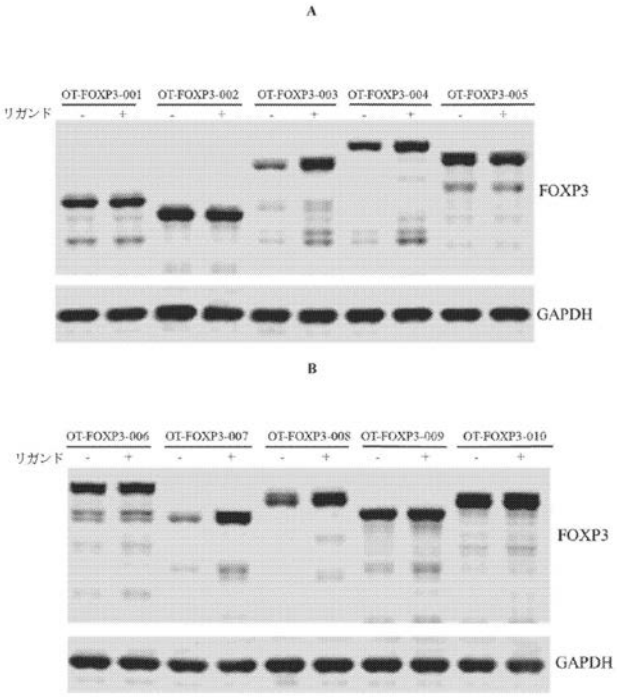
【図１６Ｂ】

【図１６Ｂ】



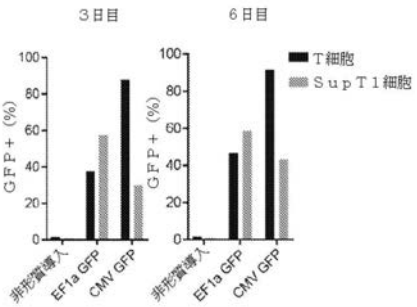
【図１７】

【図１７】



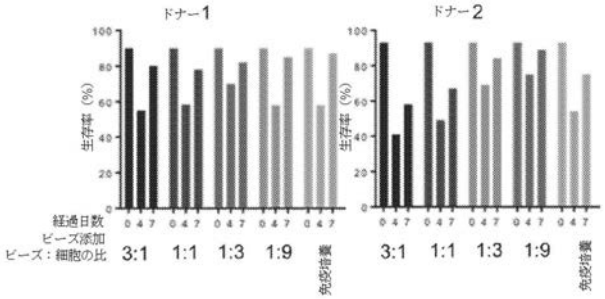
【図１８】

【図１８】



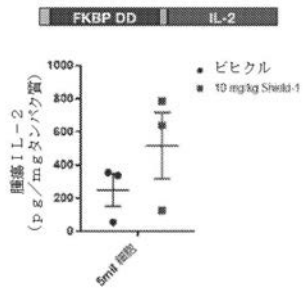
【図２０】

【図２０】



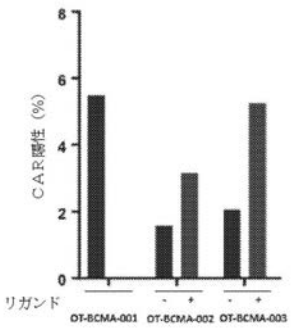
【図１９】

【図１９】



【図２１】

【図２１】



【配列表】
2020511528000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/20704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61P 37/02; C07K 14/54, 14/55; A61K 39/39 (2018.01)
CPC - A61P 37/02; C07K 14/54, 14/55; A61K 39/39

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2014/0010791 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 09 January 2014; paragraphs [0174]-[0176], [0214], [0217]; figure 28	1-3, 7-8 --- 4, 9
Y	(NIH) FKBP1A protein [Homo sapiens]. National Center for Biotechnology Information. Sequence Accession AAI19733. 04 October 2006 [retrieved on 18 April 2018]. Retrieved from the Internet: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAI19733>Genbank Supplement pages 1-2	4
Y	WO 2015/007542 A1 (VIB VZW et al.) 22 January 2015; page 5, paragraph 4	9
P, X	WO 2017/180587 A2 (OBSIDIAN THERAPEUTICS, INC.) 19 October 2017; whole document	1-4, 7-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 May 2018 (29.05.2018)	13 JUN 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/20704

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 25-47
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***- Please See Within the Next Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group 1+ Claims 1-4, 7-9

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US18/20704

-***-Continued from Box III Observations where unity of invention is lacking -***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-36, an IL-1 cytokine (immunotherapeutic agent) and a destabilizing domain encompassing human FKBP (SEQ ID NO: 3) (SRE) are directed toward a composition for inducing an immune response in a cell or a subject comprising a first effector module, said effector module comprising a first stimulus response element (SRE) operably linked to at least one immunotherapeutic agent.

The composition and polynucleotide will be searched to the extent they encompass an IL-1 cytokine (immunotherapeutic agent), and a destabilizing domain encompassing human FKBP (SEQ ID NO: 3) (SRE). Applicant is invited to elect additional immunotherapeutic agent(s), and/or SRE(s), with, where applicable, specified SEQ ID NO: for each, and/or, where applicable, specified SEQ ID NO: for the construct, to be searched. Additional cytokine(s) and/or SRE(s), and sequence(s) associated therewith will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 7 (in-part), 8 (in-part), and 9 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass an IL-1 cytokine (immunotherapeutic agent) and human FKBP (SEQ ID NO: 3) (SRE). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected immunotherapeutic agent(s) and/or SRE(s) and/or their associated sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be an immunotherapeutic agent encompassing an IL-1alpha cytokine (immunotherapeutic agent).

No technical features are shared between the effector modules of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a composition for inducing an immune response in a cell or a subject comprising a first effector module, said effector module comprising a first stimulus response element (SRE) operably linked to at least one immunotherapeutic agent, wherein said at least one immunotherapeutic agent is selected from a cytokine, a safety switch, a regulatory switch, a chimeric antigen receptor and combinations thereof; these shared technical features are previously disclosed by US 2014/0010791 A1 to The Board of Trustees of The Leland Stanford Junior University (hereinafter 'Stanford').

Stanford discloses a composition (a composition; abstract, paragraph [0127]) for inducing an immune response in a cell or a subject (for inducing an immune response in a cell or a subject; paragraph [0158]) comprising a first effector module (comprising a ligand-responsive stability-affecting protein (comprising a first effector module); paragraph [0012]), said effector module comprising a first stimulus response element (SRE) (said stability-affecting protein comprising a ligand-dependent stability affecting protein (said effector module comprising a first stimulus response element (SRE); paragraphs [0012], [0013]) operably linked to at least one immunotherapeutic agent (fused to a protein of interest, including TNF-a or IL-2 (operably linked to at least one immunotherapeutic agent); paragraphs [0012], [0013], [0016]), wherein said at least one immunotherapeutic agent is a cytokine (wherein said protein of interest is TNF-a or IL-2 (at least one immunotherapeutic agent is a cytokine); paragraph [0016]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Stanford reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８６
C12N	***15/62***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｃ０８７
C12N	***15/19***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/19		４Ｈ０４５
C12N	***15/12***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/12		
C12N	***15/13***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/13		
C12N	***15/57***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/57		
C12N	***15/31***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/31		
C12N	***15/63***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/10		
C12Q	***1/04***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｑ	1/04		
C12Q	***1/68***	***(2018.01)***	Ｃ１２Ｑ	1/68		
C12N	***15/55***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/55		
C12N	***15/53***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/53		
C12N	***15/60***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/60		
G01N	***33/574***	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/574	Ｄ	
G01N	***33/53***	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｍ	
A61K	*31/505*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
A61K	*31/519*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/505		
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/519		
C07K	*16/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
C07K	*14/725*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/00		
C07K	*14/52*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/725		
C07K	*14/47*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/52		
C12N	*9/50*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/47		
C12N	*9/02*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/50		
C12N	*9/16*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/02		
C12N	*9/88*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/16	Ｃ	
C07K	*14/475*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/88		
			Ｃ０７Ｋ	14/475		

(31)優先権主張番号　62/542,402
(32)優先日　平成29年8月8日(2017.8.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策
(72)発明者　スリ，　ヴィピン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４７８，　ベルモント，　クーリッジ　ロード　３

(72)発明者 エルペク, クトゥル ゴクス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７６, アーリントン, フローレンス テラス ５
(72)発明者 オルス, ミッシェル リン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１５３２, ノースバラ, オーク アベニュー ６５
(72)発明者 ドリンスキ, ブライアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー １０３０, フォース フロア
(72)発明者 コスミダー, ニコル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー １０３０, フォース フロア
(72)発明者 ヘラー, スコット フランシス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２０７２, ストートン, プレイン ストリート ５５９
(72)発明者 クルカルニ, アビシェク
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４４５, ブルックライン, タッパン ストリート ３６０ ナンバー３
(72)発明者 イニス, マラ クリスティーン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１９１５, ビバリー, ハイランド アベニュー １１ ユニット ２
(72)発明者 リー, ダン ジュン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー １０３０, フォース フロア

Ｆターム(参考) 4B050 CC05 DD02 DD11 LL01 LL03
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QR32 QR59 QS05 QS10 QS14 QS34
4B065 AA26Y AA90X AA90Y AA93Y AB01 AC14 BA02 BA05 BB19 BB25 BB34 CA24 CA25 CA27 CA28 CA33 CA44 CA46
4C076 AA95 CC07 CC27 CC41 EE59 FF70
4C084 AA13
4C086 AA01 AA02 BC42 CB09 NA20 ZB07 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 ZB07
4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 BA72 CA11 CA40 DA01 DA50 DA76 DA89 EA20 EA51 FA74

专利名称(译)	免疫疗法的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2020511528A	公开(公告)日	2020-04-16
申请号	JP2019568591	申请日	2018-03-02
发明人	スリ, ヴィピン エルペク, クトゥル ゴクス オルス, ミッシェル リン ドリンスキ, ブライアン コスミダー, ニコル ヘラー, スコット フランシス クルカルニ, アビシェク イニス, マラ クリスティーン リー, ダン ジュン		
IPC分类号	A61K47/64 A61P37/02 A61K48/00 A61K35/76 A61K35/761 A61P35/00 C12N15/62 C12N15/19 C12N15/12 C12N15/13 C12N15/57 C12N15/31 C12N15/63 C12N5/10 C12Q1/04 C12Q1/68 C12N15/55 C12N15/53 C12N15/60 G01N33/574 G01N33/53 A61K31/505 A61K31/519 C07K19/00 C07K16/00 C07K14/725 C07K14/52 C07K14/47 C12N9/50 C12N9/02 C12N9/16 C12N9/88 C07K14/475		
CPC分类号	A61K39/0011 A61K39/39 A61K2039/5156 A61K2039/5158 A61K2039/55533 A61K2039/585 A61K2039/82 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K14/4702 C07K14/54 C07K14/55 C07K14/705 C07K2319/00 C07K2319/01 C12N9/003 C12N9/0055 C12N9/16 C12N9/485 C12N9/6472 C12N9/88 C12N9/90 C12N15/62 C12N2710/16234 C12Y105/01003 C12Y301/04053 C12Y304/14005 C12Y402/01001 C12Y502/01008		
FI分类号	A61K47/64 A61P37/02.ZNA A61K48/00 A61K35/76 A61K35/761 A61P35/00 C12N15/62.Z C12N15/19 C12N15/12 C12N15/13 C12N15/57 C12N15/31 C12N15/63.Z C12N5/10 C12Q1/04 C12Q1/68 C12N15/55 C12N15/53 C12N15/60 G01N33/574.D G01N33/53.M G01N33/53.D A61K31/505 A61K31/519 C07K19/00 C07K16/00 C07K14/725 C07K14/52 C07K14/47 C12N9/50 C12N9/02 C12N9/16.C C12N9/88 C07K14/475		
F-TERM分类号	4B050/CC05 4B050/DD02 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR59 4B063/QS05 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063/QS34 4B065/AA26Y 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BB19 4B065/BB25 4B065/BB34 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA27 4B065/CA28 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/CC07 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE59 4C076/FF70 4C084/AA13 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC42 4C086/CB09 4C086/NA20 4C086/ZB07 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/ZB07 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/BA72 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/466601 2017-03-03 US 62/484063 2017-04-11 US 62/542402 2017-08-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于癌症免疫疗法的生物回路系统，效应器模块和组合物。 还提供了在受试者中诱导抗癌免疫应答的方法。

Figure 19