

(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2020-505034
(P2020-505034A)

(43) 公表日 令和2年2月20日(2020.2.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/12 (2006.01)	C12N 15/12	4B065
CO7K 19/00 (2006.01)	CO7K 19/00 ZNA	4C076
CO7K 14/47 (2006.01)	CO7K 14/47	4C084
CO7K 14/705 (2006.01)	CO7K 14/705	4C085
CO7K 16/28 (2006.01)	CO7K 16/28	4C087
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 160 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-539186 (P2019-539186)
 (86) (22) 出願日 平成30年1月19日 (2018.1.19)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年9月6日 (2019.9.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2018/000380
 (87) 国際公開番号 W02018/134691
 (87) 国際公開日 平成30年7月26日 (2018.7.26)
 (31) 優先権主張番号 62/448,936
 (32) 優先日 平成29年1月20日 (2017.1.20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 514214106
 ジュノ セラピューティクス ゲーエムベ
 ーハー
 ドイツ連邦共和国 81675 ミュンヘ
 ン グリルパーザーシュトラッセ 10
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞表面コンジュゲートならびに関連する細胞組成物および方法

(57) 【要約】

細胞表面分子と、少なくとも1つの作用物質、例えば少なくとも1つの親和性タグを含む、細胞表面コンジュゲート、ならびにそのような細胞表面コンジュゲートを発現する改変された細胞が、本願で提供される。いくつかの態様において、細胞表面分子は、細胞内シグナル伝達ドメインを含まないまたは細胞内シグナル伝達を媒介することができない。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートを含むよう改変された細胞、例えばT細胞は、抗原に特異的に結合する遺伝的に改変された組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体 (CAR) をさらに含む。例えば改変された細胞の製造方法に関連してまたは養子細胞療法の方法を含むそのような細胞の対象への投与に関連して、細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を検出、同定、選択または標的とする方法も提供される。

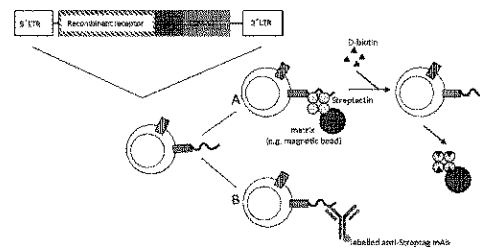


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子；ならびに

(b) ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに結合することができる、細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

【請求項 2】

作用物質が、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインに対して 10^4 M ~ 10^{10} Mまたは約 10^4 M ~ 約 10^{10} Mの平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、請求項1記載の細胞表面コンジュゲート。

10

【請求項 3】

(a) 機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子；ならびに

(b) 該細胞表面分子に連結され、かつ、試薬に可逆的に結合することができるおよび/または競合物質の存在下で競合し得る、少なくとも1つの作用物質であって、50アミノ酸未満の長さのペプチドである、作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

【請求項 4】

作用物質が、試薬に対して 10^4 M ~ 10^{10} Mまたは約 10^4 M ~ 約 10^{10} Mの平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、請求項3記載の細胞表面コンジュゲート。

20

【請求項 5】

試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインである、請求項3または請求項4記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 6】

(a) 機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子；ならびに

(b) 試薬に対して 10^7 M超の平衡解離定数 (K_D) または 10^7 M未満の平衡結合定数 (K_A) の結合親和性を有する、該細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

30

【請求項 7】

試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインである、請求項6記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 8】

細胞表面分子が、膜貫通ドメインを含むおよび/または細胞表面上で発現され得る、請求項1~7のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 9】

細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して修飾されており、任意で、参照細胞表面分子が、細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞表面受容体である、請求項1~8のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

40

【請求項 10】

修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す、請求項9記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 11】

(a) 参照細胞表面分子と比較して修飾された細胞表面分子であって、修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す、細胞表面分子；ならびに

(b) ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに結合することができる、該細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

50

【請求項 1 2】

細胞表面分子が、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない、請求項11記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 1 3】

(a) 前立腺特異的膜抗原 (PSMA) を含む細胞表面分子、またはその修飾された細胞表面分子；および

(b) ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに結合することができる、該細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

10

【請求項 1 4】

修飾された細胞表面分子が、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/もしくは細胞内シグナル伝達を媒介することができず；ならびに/または

修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して修飾されており、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/もしくはリガンド結合を示す、請求項13記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 1 5】

細胞表面分子が、膜貫通ドメインを含むおよび/または細胞表面上で発現され得る、請求項11～14のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 1 6】

作用物質が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに対して 10^4 M～ 10^{10} Mまたは約 10^4 M～約 10^{10} Mの平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、請求項11～15のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

20

【請求項 1 7】

試薬に対する作用物質の結合が、可逆的であるおよび/または競合物質の存在下で競合し得る、請求項1～16のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 1 8】

試薬に対して作用物質が示す結合親和性よりも、試薬に対して競合物質が示す結合親和性の方が高い、請求項17記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 1 9】

試薬に対して競合物質が示す結合親和性が、 10^{10} M～ 10^{14} Mもしくは約 10^{10} M～約 10^{14} Mの平衡解離定数 (K_D) であり；および/または

試薬に対して作用物質が示す結合親和性が、 10^{10} M超の平衡解離定数 (K_D) である、請求項18記載の細胞表面コンジュゲート。

30

【請求項 2 0】

ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに対する作用物質の結合が、可逆的である、および/またはビオチン、ビオチン類似体もしくはその生物学的に活性なフラグメントの存在下で競合し得る、請求項1、2、5、および7～20のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 2 1】

少なくとも1つの作用物質が、細胞表面分子に直接的に連結されている、請求項1～20のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

40

【請求項 2 2】

少なくとも1つの作用物質が、少なくとも1つのリンカーを通じて細胞表面分子に間接的に連結されている、請求項1～20のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 2 3】

少なくとも1つの作用物質が、1～4個もしくは約1～4個または1～2個もしくは約1～2個の作用物質を含む、請求項1～22のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 2 4】

少なくとも1つの作用物質が、1つのみの作用物質を含む、請求項1～23のいずれか1項記

50

載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 25】

作用物質が、細胞表面分子の細胞外部分または領域に連結され、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、請求項1～24のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 26】

作用物質が、細胞表面分子のN末端に連結されている、請求項1～25のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 27】

作用物質が、細胞表面分子のC末端に連結されている、請求項1～26のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

10

【請求項 28】

細胞表面分子の細胞外部分または領域で作用物質に連結された細胞表面分子を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインであるまたはそれを含む試薬に結合することができ、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、細胞表面コンジュゲート。

【請求項 29】

細胞表面分子の細胞外部分または領域で作用物質に連結された細胞表面分子を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、試薬に可逆的に結合することができ、作用物質が、50アミノ酸未満の長さのペプチドであり、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、細胞表面コンジュゲート。

20

【請求項 30】

作用物質が、 10^4 M～ 10^{10} Mまたは約 10^4 M～約 10^{10} Mの平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、請求項28または請求項29記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 31】

細胞表面分子の細胞外部分または領域で作用物質に連結された細胞表面分子を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、試薬に対して 10^7 M超の平衡解離定数 (K_D) または 10^7 M未満の平衡結合定数 (K_A) の結合親和性を示し、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、細胞表面コンジュゲート。

【請求項 32】

作用物質が、細胞表面分子のN末端に連結されている、請求項28～31のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

30

【請求項 33】

作用物質が、細胞表面分子のC末端に連結されている、請求項28～31のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 34】

試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはストレプトアビジンムテインであるまたはそれを含む、請求項28～33のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 35】

試薬に対する作用物質の結合が、可逆的であるおよび/または競合物質の存在下で競合し得る、請求項28～34のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

40

【請求項 36】

試薬に対して作用物質が示す結合親和性よりも、試薬に対して競合物質が示す結合親和性の方が高い、請求項35記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 37】

試薬に対して競合物質が示す結合親和性が、 10^{10} M～ 10^{14} Mもしくは約 10^{10} M～約 10^{14} Mの平衡解離定数 (K_D) であり；および/または

試薬に対して作用物質が示す結合親和性が、 10^{10} M超の平衡解離定数 (K_D) である、請求項36記載の細胞表面コンジュゲート。

50

【請求項 38】

ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに対する作用物質の結合が、可逆的である、および/またはビオチンもしくはビオチン類似体の存在下で競合し得る、請求項28および34～37のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 39】

作用物質が、細胞表面分子に直接的に連結されている、請求項28～38のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 40】

作用物質が、少なくとも1つのリンカーを通じて細胞表面分子に間接的に連結されている、請求項28～38のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

10

【請求項 41】

細胞表面分子が、1つのみの作用物質に連結されている、請求項28～40のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 42】

細胞表面分子が、キメラ抗原受容体 (CAR) でない、請求項1～41のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 43】

細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して修飾されている、請求項28～30のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

20

【請求項 44】

修飾された細胞表面分子が、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/もしくは細胞内シグナル伝達を媒介することができず；ならびに/または修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/もしくはリガンド結合を示す、請求項43記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 45】

参照細胞表面分子が、天然の哺乳動物細胞表面分子である、請求項43または請求項44記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 46】

細胞表面分子が、抗体またはその抗原結合フラグメントによって認識され得るエピトープを含む、請求項1～45のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

30

【請求項 47】

融合タンパク質である、請求項1～33のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 48】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう44位～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列 Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ を含む、請求項1、2、5、7～28 および34～47のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 49】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

40

a) SEQ ID NO:3～6、27および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:3～6、27および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ に対応するアミノ酸配列を含み、

作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) 作用物質に可逆的に結合する、a) もしくはb) の機能的フラグメント

を含む、請求項1、2、5、7～28および34～48のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

50

【請求項50】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう117、120および/または121に対応する位置に1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、請求項48または請求項49記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項51】

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹もしくはPhe¹²¹の中から選択されるか；または

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹の1つもしくは複数から選択されるか；または

複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹から選択される、請求項50記載の細胞表面コンジュゲート。

10

【請求項52】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

a) SEQ ID NO:27または28に示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:27または28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) 作用物質に可逆的に結合する、a)もしくはb)の機能的フラグメントを含む、請求項1、2、5、7~28および34~51のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

20

【請求項53】

競合物質が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはその生物学的に活性なフラグメントであるまたはそれを含む、請求項3~5、17~19および35~37のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項54】

作用物質が、親和性タグである、請求項1~53のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

30

【請求項55】

作用物質が、Strep tag、Hisタグ、Flagタグ、Xpressタグ、Aviタグ、カルモジュリンタグ、ポリグルタメートタグ、HAタグ、Mycタグ、Nusタグ、Sタグ、Xタグ、SBPタグ、Sof tag、V5タグ、CBP、GST、MBP、GFP、チオレドキシントグもしくはそれらの任意の組み合わせであるまたはそれを含む、請求項3、4、6、8~10、17~19、21~27、29~33、35~37、39~47および54のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項56】

作用物質が、任意でStrep tagである1つまたは複数のストレプトアビジン結合ペプチドであるまたはそれを含む、請求項1~55のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

40

【請求項57】

ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8) または Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)

を含む、請求項56記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項58】

作用物質が、配列

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

を含む、請求項56または請求項57記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項59】

参照細胞表面分子が、細胞表面受容体、リガンド、糖タンパク質、細胞接着分子、抗原、インテグリンまたは分化クラスター (CD) である、請求項9~58のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

10

【請求項60】

参照細胞表面分子が、細胞表面受容体である、請求項59記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項61】

参照細胞表面分子が、EpCAM、VEGFR、インテグリン、任意でインテグリン v 3、4、IIb 3、4 7、5 1、v 3または v、TNF受容体スーパーファミリーのメンバー、任意でTRAIL R1またはTRAIL R2、上皮成長因子受容体ファミリーのメンバー、PDGF受容体、インターフェロン受容体、葉酸受容体、GPNMB、ICAM 1、HLA DR、CEA、CA 125、MU C1、TAG 72、IL 6受容体、5T4、GD2、GD3、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) または分化細胞表面分子クラスター、任意でCD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA 1、CD15、CD18/ITGB 2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/バシジン、CD152/CTLA 4、CD154/CD40L、CD195/CCR5およびCD319/SLAMF7から選択される、請求項9~60のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

20

【請求項62】

参照細胞表面分子が、上皮成長因子受容体ファミリーのメンバーである、請求項9~61のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項63】

参照細胞表面分子が、上皮成長因子受容体 (EGFR)、erbB 2受容体チロシンタンパク質キナーゼ (errb2、HER2)、erbB 3受容体チロシンタンパク質キナーゼ、erbB 4受容体チロシンタンパク質キナーゼ、肝細胞成長因子受容体 (HGFR/c MET) またはインスリン様成長因子受容体 1 (IGF 1 R) である、請求項9~62のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

30

【請求項64】

参照細胞表面分子が、ヒトである、請求項9~63のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項65】

修飾された細胞表面分子が、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない、請求項9~64のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

40

【請求項66】

修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して細胞内シグナル伝達ドメインまたはトラフィックドメインのすべてまたは一部を欠如するよう短縮されている、請求項9~65のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項67】

修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す、請求項9~66のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項68】

50

修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子の1つまたは複数の細胞外ドメインを含む、請求項9～67のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項69】

修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子の天然リガンドおよび/または基質に結合することができる、請求項9～68のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項70】

修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子の天然リガンドおよび/または基質に対して減弱化されているまたはそれらに結合しない、請求項9～68のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項71】

修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子の少なくとも1つの細胞外ドメインを含むが、参照細胞表面分子の天然リガンドおよび/または基質によって認識される1つまたは複数の他の細胞外ドメインを欠如している、請求項70記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項72】

少なくとも1つの細胞外ドメインが、参照細胞表面分子に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントによって認識されるエピトープを含む、請求項71記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項73】

抗体またはその抗原結合フラグメントが、AMG 102、AMG 479、BIIB0220A 5D5、CP 751、871、IMC A12、R1507、3F8、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アデカツムマブ、アフツズマブ、アレムツズマブ、アルツモマブペンテタート、アナツモマブマフェナトックス、アポリズマブ、アルシツモマブ、アセリズマブ、アトリズマブ(=トシリズマブ)、バシリキシマブ、ベクツモマブ、ベンラリズマブ、ベシレソマブ、ビバツズマブメルタンシン、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、カンツズマブメルタンシン、カプロマブペンデチド、カツマキソマブ、CC49、セデリズマブ、セルモロイキン、セツキシマブ、シクストムマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CNT0 95、コナツムマブ、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デツモマブ、エクロメキシマブ、エルツマキソマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エロツズマブ、エンリモマブペゴル、エピツモマブシツキセタン、エプラツズマブ、エルリズマブ、エタラシズマブ、ファノレソマブ、ファラリモマブ、ファルレツズマブ、フィギツムマブ、ガリキシマブ、ガビリモマブ、ゲムツズマブオゾガミシン、グレムバツムマブベドチン、ゴミリキシマブ、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ、インテツムマブ、イラツムマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガミシン、イピリムマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ、リンツズマブ、レキサツムマブ、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マバツムマブ、マスリモマブ、マツズマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミツモマブ、ムロモナブ CD3、ナプツモマブエスタフェナトックス、ナタリズマブ、ネシツムマブ、オクレリズマブ、オツリモマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オボルツズマブモナトックス、オレゴボマブ、オテリキシズマブ、パニツムマブ、ベルツズマブ、ペムツモマブ、プリリキシマブ、PR 0 140、ニモツズマブ、ロバツムマブ、リツキシマブ、ロベリズマブ、ルブリズマブ、サツモマブペンデチド、シプリズマブ、ソソツズマブ、タドシズマブ、タブリツモマブパプトックス、テネリキシマブ、テプリズマブ、TGN1412、チシリムマブ(=トレメリムマブ)、チガツズマブ、トシリズマブ(=アトリズマブ)、トラリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブ、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ビシリズマブ、ピタキシマブ、ボロキシマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ジラリムマブ、ゾリモマブアリトックス、アテゾリズマブ、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、デノスマブ、ジヌツキシマブ、ニボルマブ、オビヌツズマブ、ペムプロリズマブ、ピジリズマブ(CT 011)、ラムシルマブ、シルツキシマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、CEA scan Fabフラグメント、OC125モノクローナル抗体、ab75705、B72.3、MPD L3280A、MSB001078C、MEDI4736またはそれらの抗原結合フラグメントから選択される、請求項46～72のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

10

20

30

40

50

【請求項 7 4】

参照細胞表面分子が参照EGFRであり、修飾された細胞表面分子が、修飾されたEGFRである、請求項9～73のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 7 5】

修飾されたEGFRが、セツキシマブまたはその抗原結合フラグメントによって特異的に認識されるエピトープを含む、請求項74記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 7 6】

修飾されたEGFRが、参照EGFRのEGFRドメインI、EGFRドメインII、EGFR膜近傍ドメインおよびEGFRチロシンキナーゼドメインの1つまたは複数を欠如している、請求項74または請求項75記載の細胞表面コンジュゲート。

10

【請求項 7 7】

修飾されたEGFRが、参照EGFRのEGFRドメインI、EGFRドメインII、EGFR膜近傍ドメインおよびEGFRチロシンキナーゼドメインのドメインのすべてを欠如している、請求項74～76のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 7 8】

修飾されたEGFRが、参照EGFRのサブドメインIIIおよびサブドメインIVからなるまたはそれらから本質的になる細胞外ドメインを含む、請求項74～77のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 7 9】

修飾されたEGFRが、SEQ ID NO:44もしくは46に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:44もしくは46に対して少なくとも85%、90%もしくは95%もしくは約85%、約90%もしくは約95%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、請求項74～78のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

20

【請求項 8 0】

参照細胞表面分子が参照HER2であり、修飾された細胞表面分子が、修飾されたHER2である、請求項973のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 8 1】

修飾されたHER2が、トラスツズマブまたはその抗原結合フラグメントによって特異的に認識されるエピトープを含む、請求項80記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 8 2】

修飾されたHER2が、参照HER2のHER2ドメインI、HER2ドメインII、HER2ドメインIIIの1つまたは複数を欠如している、請求項80または請求項81記載の細胞表面コンジュゲート。

30

【請求項 8 3】

修飾されたHER2が、参照HER2のHER2ドメインI、HER2ドメインIIおよびHER2ドメインIIIのドメインのすべてを欠如している、請求項80～82のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 8 4】

修飾されたHER2が、参照HER2のドメインIVからなるまたはそれから本質的になる細胞外ドメインを含む、請求項80～83のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 8 5】

修飾されたHER2が、SEQ ID NO:92に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:92に対して少なくとも85%、90%もしくは95%もしくは約85%、約90%もしくは約95%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、請求項80～84のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

40

【請求項 8 6】

参照細胞表面分子が参照PSMAであり、修飾された細胞表面分子が、修飾されたPSMAである、請求項9～72のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 8 7】

参照PSMAが、野生型PSMA、任意で野生型ヒトPSMAである、請求項86記載の細胞表面コンジュゲート。

50

【請求項 88】

参照PSMAが、ヒトPSMAである、および/またはSEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列もしくはSEQ ID NO:96もしくは97に示されるヌクレオチドの配列によりコードされるアミノ酸の配列を含む、請求項87記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 89】

修飾されたPSMAが、参照PSMAの細胞外部分および膜貫通ドメインを含む、請求項86～88のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 90】

修飾されたPSMAが、参照PSMAと比較して、細胞内領域に1つまたは複数のアミノ酸修飾を含む、請求項86～89のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

10

【請求項 91】

1つまたは複数のアミノ酸修飾が、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失および/または挿入を含む、請求項86～90のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 92】

修飾されたPSMAが、参照PSMAと比較して変化した細胞内在化を示す、請求項86～91のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 93】

修飾されたPSMAが、SEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列における位置でいうW2Gに対応するアミノ酸置換を含む、またはW2を含まない、または2位にいかなる残基も含まない、請求項86～92のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

20

【請求項 94】

修飾されたPSMAが、参照PSMAと比較して、11個のN末端アミノ酸の欠失または短縮を含む、請求項86～93のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 95】

修飾されたPSMAが、抗体またはその抗原結合フラグメントが認識することができるエピトープを含む、請求項86～94のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 96】

抗体またはその抗原結合フラグメントが、J591、DF0 J591、CYT 356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107 1A4、YPSMA 1、YPSMA 2、3E6、2G7、24.4E6、GCP 02、GCP 04、GCP 05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7 Fc、D7 CH3、4D4、A5およびそれらの抗原結合フラグメントの中から選択される、請求項95記載の細胞表面コンジュゲート。

30

【請求項 97】

免疫原性でない、および/またはそれを投与した対象において免疫応答を誘導しない、請求項1～96のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲート。

【請求項 98】

請求項1～97のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲートをコードする核酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 99】

核酸配列が、シグナル配列をさらに含む、請求項98記載のポリヌクレオチド。

【請求項 100】

シグナル配列が、GMCSFRアルファ鎖由来のシグナルペプチドをコードする、請求項99記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 101】

核酸配列が第1の核酸配列であり、ポリヌクレオチドが、組換え受容体をコードする第2の核酸配列をさらに含む、請求項98～100のいずれか1項記載のポリヌクレオチド。

【請求項 102】

組換え受容体が、キメラ抗原受容体(CAR)であるまたはそれを含む、請求項101記載のポリヌクレオチド。

【請求項 103】

第1および第2の核酸配列が、内部リボソーム侵入部位(IRES)、または自己切断性ペプ

50

チドもしくは任意でT2A、P2A、E2AもしくはF2Aであるリボソームスキップを引き起こすペプチドをコードするヌクレオチド配列によって隔てられている、請求項101または請求項102記載のポリヌクレオチド。

【請求項104】

第1の核酸配列が、第2の核酸配列の上流にある、請求項101～103のいずれか1項記載のポリヌクレオチド。

【請求項105】

第1の核酸配列が、第2の核酸配列の下流にある、請求項101～103のいずれか1項記載のポリヌクレオチド。

【請求項106】

請求項98～105のいずれか1項記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項107】

ウイルスベクターである、請求項106記載のベクター。

【請求項108】

レトロウイルスベクターである、請求項106または請求項107記載のベクター。

【請求項109】

レンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターである、請求項106～108のいずれか1項記載のベクター。

【請求項110】

請求項96～105のいずれか1項記載のポリヌクレオチドまたは請求項106～109のいずれか1項記載のベクターを細胞に導入する工程を含む、改変された細胞を製造する方法。

【請求項111】

請求項110記載の方法によって製造された、改変された細胞。

【請求項112】

請求項98～105のいずれか1項記載のポリヌクレオチドまたは請求項106～109のいずれか1項記載のベクターを含む、改変された細胞。

【請求項113】

請求項1～97のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲートを含む、改変された細胞。

【請求項114】

組換え受容体をさらに含む、請求項113記載の改変された細胞。

【請求項115】

組換え受容体が、疾患もしくは障害の細胞もしくは組織に関連する、疾患もしくは障害の細胞もしくは組織に特異的である、および/または疾患もしくは障害の細胞もしくは組織において発現される標的抗原に結合することができる、請求項114記載の改変された細胞。

【請求項116】

疾患または障害が、感染疾患もしくは障害、自己免疫疾患、炎症疾患、または腫瘍もしくはがんである、請求項115記載の改変された細胞。

【請求項117】

標的抗原が、腫瘍抗原である、請求項115または請求項116記載の改変された細胞。

【請求項118】

標的抗原が、 α 6インテグリン(α v β 6インテグリン)、B細胞成熟抗原(BCMA)、B7H3、B7H6、炭酸脱水酵素9(CA9; CAIXまたはG250としても公知)、がん精巣抗原、がん/精巣抗原1B(CTAG; NY ESO 1およびLAGE 2としても公知)、がん胎児性抗原(CEA)、サイクリン、サイクリンA2、CCモチーフケモカインリガンド1(CCL1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、上皮成長因子タンパク質(EGFR)、短縮化された上皮成長因子タンパク質(tEGFR)、III型上皮成長因子受容体変異(EGFRvIII)、上皮糖タンパク質2(EPG2)、上皮糖タンパク質40(EPG40)、エフリンB2、エフリン受容体A2(EPha2)、エストロゲン受容体、Fc受容体様5(FCRL5; Fc受容体ホモログ5またはFCRH5としても公知)、胎児型アセチルコリ

10

20

30

40

50

ン受容体（胎児型AChR）、葉酸結合タンパク質（FBP）、葉酸受容体アルファ、ガングリオシドGD2、Oアセチル化GD2（OGD2）、ガングリオシドGD3、糖タンパク質100（gp100）、Gタンパク質共役受容体5D（GPCR5D）、Her2/neu（受容体チロシンキナーゼerb B2）、Her3（erb B3）、Her4（erb B4）、erbB二量体、ヒト高分子量黒色腫関連抗原（HMW MAA）、B型肝炎表面抗原、ヒト白血球抗原A1（HLA A1）、ヒト白血球抗原A2（HLA A2）、IL 22受容体アルファ（IL 22R）、IL 13受容体アルファ2（IL 13Ra2）、キナーゼインサートドメイン受容体（kdr）、カップ軽鎖、L1細胞接着分子（L1 CAM）、L1 CAMのCE7エピトープ、ロイシンリッチリピート含有8ファミリーメンバーA（LRRC8A）、ルイスY、黒色腫関連抗原（MAGE）A1、MAGE A3、MAGE A6、メソテリン、c Met、マウスサイトメガロウイルス（CMV）、ムチン1（MUC1）、MUC16、ナチュラルキラーグループ2メンバーD（NKG2D）リガンド、メラニンA（MART 1）、神経細胞接着分子（NCAM）、腫瘍胎児抗原、黒色腫優先発現抗原（PRAME）、プロゲステロン受容体、前立腺特異的抗原、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）、サバイピン、トロホブラスト糖タンパク質（TPBG；5T4としても公知）、腫瘍関連糖タンパク質72（TAG72）、血管内皮成長因子受容体（VEGFR）、血管内皮成長因子受容体2（VEGFR2）、ウィルムス腫瘍1（WT 1）からなる群より選択される、請求項115～117のいずれか1項記載の改変された細胞。

10

【請求項 1 1 9】

標的抗原が、ROR1、HER2、L1 CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、B型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP 2、EGP 4、EPHa 2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW MAA、IL 22R アルファ、IL 13R アルファ2、kdr、カップ軽鎖、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY ESO 1、MART 1、gp100、腫瘍胎児抗原、TAG72、VEGF R2、がん胎児性抗原（CEA）、前立腺特異的抗原、PSMA、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS 1、c Met、GD 2、MAGE A 3、CE7、ウィルムス腫瘍1（WT 1）およびサイクリンA1（CCNA1）からなる群より選択される、請求項115～118のいずれか1項記載の改変された細胞。

20

【請求項 1 2 0】

組換え受容体が、機能的な非TCR抗原受容体またはトランスジェニックTCRである、請求項114～119のいずれか1項記載の改変された細胞。

30

【請求項 1 2 1】

組換え受容体が、キメラ抗原受容体（CAR）である、請求項114～120のいずれか1項記載の改変された細胞。

【請求項 1 2 2】

組換え受容体が、抗原結合ドメインを含む細胞外部分を含む、請求項114～121のいずれか1項記載の改変された細胞。

【請求項 1 2 3】

抗原結合ドメインが、抗体または抗体フラグメントであるまたはそれを含む、請求項122記載の改変された細胞。

【請求項 1 2 4】

抗体フラグメントが、単鎖フラグメントである、請求項123記載の改変された細胞。

40

【請求項 1 2 5】

フラグメントが、フレキシブルリンカーによって接続された抗体可変領域を含む、請求項123または請求項124記載の改変された細胞。

【請求項 1 2 6】

フラグメントが、scFvを含む、請求項123～125のいずれか1項記載の改変された細胞。

【請求項 1 2 7】

組換え受容体が、細胞内シグナル伝達領域を含む、請求項114～126のいずれか1項記載の改変された細胞。

【請求項 1 2 8】

50

細胞内シグナル伝達領域が、細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項127記載の改変された細胞。

【請求項129】

細胞内シグナル伝達ドメインが、一次シグナル伝達ドメイン、T細胞において一次活性化シグナルを誘導することができるシグナル伝達ドメイン、T細胞受容体(TCR)構成要素のシグナル伝達ドメイン、および/または免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含むシグナル伝達ドメインであるまたはそれを含む、請求項128記載の改変された細胞。

【請求項130】

細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3鎖、任意でCD3ゼータ(CD3)鎖の細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分であるまたはそれを含む、請求項128または請求項129記載の改変された細胞。

10

【請求項131】

細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達領域との間に配置された膜貫通ドメインをさらに含む、請求項127~130のいずれか1項記載の改変された細胞。

【請求項132】

細胞内シグナル伝達領域が、共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、請求項127~131のいずれか1項記載の改変された細胞。

【請求項133】

共刺激シグナル伝達ドメインが、T細胞共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分を含む、請求項132記載の改変された細胞。

20

【請求項134】

共刺激シグナル伝達ドメインが、CD28、4 1BBもしくはICOSの細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分を含む、請求項132または請求項133記載の改変された細胞。

【請求項135】

共刺激シグナル伝達ドメインが、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間にある、請求項132~134のいずれか1項記載の改変された細胞。

【請求項136】

免疫細胞である、請求項111~135のいずれか1項記載の改変された細胞。

【請求項137】

リンパ球である、請求項136記載の改変された細胞。

30

【請求項138】

T細胞またはNK細胞である、請求項111~137のいずれか1項記載の改変された細胞。

【請求項139】

CD8+ T細胞またはCD4+ T細胞であるT細胞である、請求項138記載の改変された細胞。

【請求項140】

請求項111~139のいずれか1項記載の改変された細胞を含む、組成物。

【請求項141】

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項140記載の組成物。

【請求項142】

請求項111~139のいずれか1項記載の改変された細胞または請求項140もしくは請求項141記載の組成物を、疾患または障害を有する対象に投与する工程を含む、処置方法。

40

【請求項143】

疾患または障害が、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは障害、または感染疾患である、請求項142記載の方法。

【請求項144】

改変された細胞上で発現された細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子を対象に投与する工程、および該細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を検出する工程をさらに含む、請求項142または請求項143記載の方法。

【請求項145】

50

検出が、インビボ画像化を含む、請求項144記載の方法。

【請求項146】

細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を同定する方法であって、請求項1～97のいずれか1項記載の細胞表面コンジュゲートを発現するもしくは発現する可能性のある細胞または請求項111～139のいずれか1項記載の改変された細胞を含む組成物、あるいは請求項140もしくは請求項141記載の組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程を含む、方法。

【請求項147】

インビトロ、エクスピボまたはインビボで実施される、請求項146記載の方法。

【請求項148】

細胞表面分子を発現する細胞が、インビボ画像化を通じて検出される、請求項146または請求項147のいずれか1項記載の方法。

【請求項149】

インビボ画像化法が、磁気共鳴画像化(MRI)、単光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)、コンピュータ断層撮影(CT)、コンピュータ体軸断層撮影(CAT)、電子ビームコンピュータ断層撮影(EBCT)、高分解能コンピュータ断層撮影(HRCT)、下環状断層撮影、ポジトロン放出断層撮影(PET)、シンチグラフィ、ガンマ線カメラ、+検出装置、検出装置、蛍光画像化、微光画像化、X線および生物発光画像化の中から選択される、請求項145または請求項148記載の方法。

【請求項150】

結合分子が、インビボで検出可能なシグナルを提供するまたは誘導する部分にコンジュゲートされている、請求項145、請求項148または請求項149記載の方法。

【請求項151】

前記部分が、放射性同位体、生物発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレートまたは酵素である、請求項150記載の方法。

【請求項152】

細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を同定する方法であって、

(a) 細胞表面コンジュゲートをコードする請求項98～105のいずれか1項記載のポリヌクレオチドもしくは請求項106～109のいずれか1項記載のベクターを形質導入された組成物または請求項111～139のいずれか1項記載の改変された細胞または請求項140もしくは請求項141記載の組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程；および

(b) 該結合分子に結合した細胞を同定する工程を含む、方法。

【請求項153】

細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を同定する方法であって、

(a) 細胞表面コンジュゲートをコードする請求項98～105のいずれか1項記載のポリヌクレオチドもしくは請求項106～109のいずれか1項記載のベクターを細胞に導入する工程；

(b) (a)の細胞を含む組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程；および

(c) 該結合分子に結合した組成物の細胞を同定する工程を含む、方法。

【請求項154】

細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を選択する方法であって、

(a) 細胞表面コンジュゲートをコードする請求項98～105のいずれか1項記載のポリヌクレオチドもしくは請求項106～109のいずれか1項記載のベクターを形質導入された組成物または請求項111～139のいずれか1項記載の改変された細胞または請求項140もしくは請求項141記載の組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程；および

(b) 該結合分子に結合した細胞を単離する工程を含む、方法。

【請求項 155】

細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を選択する方法であって、

(a) 細胞表面コンジュゲートをコードする請求項98～105のいずれか1項記載のポリヌクレオチドまたは請求項106～109のいずれか1項記載のベクターを細胞に導入する工程；

(b) (a)の細胞を含む組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程；および

(c) 該結合分子に結合した組成物の細胞を単離する工程を含む、方法。

10

【請求項 156】

結合分子が、検出可能な部分にコンジュゲートされているまたは検出可能なシグナルを生成することができる、請求項154または請求項155記載の方法。

【請求項 157】

検出可能な部分が、蛍光タンパク質を含む、請求項156記載の方法。

【請求項 158】

作用物質が、ストレプトアビジン結合ペプチドである、請求項144～157のいずれか1項記載の方法。

【請求項 159】

ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)もしくは Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)

20

であるまたはそれを含む、請求項158記載の方法。

【請求項 160】

ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

であるまたはそれを含む、請求項159記載の方法。

【請求項 161】

結合分子が、作用物質に可逆的に結合することができるおよび/または競合物質の存在下で競合し得る試薬である、請求項144～160のいずれか1項記載の方法。

【請求項 162】

試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはムテインである、請求項161記載の方法。

【請求項 163】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう44位～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列 Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷を含む、請求項162記載の方法

40

【請求項 164】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

a) SEQ ID NO:3～6、27および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:3～6、27および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%

50

、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷またはIle⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含

み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) 作用物質に可逆的に結合する、a) もしくはb) の機能的フラグメントを含む、請求項162および請求項163記載の方法。

【請求項165】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう117、120および/または121に対応する位置に1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、請求項163または請求項164記載の方法。

【請求項166】

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹もしくはPhe¹²¹の中から選択されるか；または

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹の1つもしくは複数から選択されるか；または

複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹から選択される、請求項165記載の方法。

【請求項167】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

a) SEQ ID NO:27または28に示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:27または28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) 作用物質に可逆的に結合する、a) もしくはb) の機能的フラグメントを含む、請求項162～166のいずれか1項記載の方法。

【請求項168】

作用物質に対する結合分子の可逆的結合を妨害する工程をさらに含む、請求項161～167のいずれか1項記載の方法。

【請求項169】

妨害する工程が、結合分子と作用物質との間の結合を解消することができる競合物質を含む組成物を細胞と接触させる工程を含む、請求項168記載の方法。

【請求項170】

競合物質が、遊離結合パートナーであるおよび/または競合作用物質である、請求項169記載の方法。

【請求項171】

競合物質が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはその生物学的に活性なフラグメントであるまたはそれを含む、請求項169または請求項170記載の方法。

【請求項172】

結合分子が、作用物質に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントである、請求項144～171のいずれか1項記載の方法。

【請求項173】

結合分子が、抗StrepTag抗体である、請求項172記載の方法。

【請求項174】

細胞傷害性作用物質にコンジュゲートされたストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインを含む、分子。

【請求項175】

ストレプトアビジン類似体またはムテインを含む、請求項174記載の分子。

【請求項176】

10

20

30

40

50

ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインが、ストレプトアビジン結合ペプチドに結合する、請求項174または請求項175記載の分子。

【請求項177】

ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)もしくはTrp-Arg-His-
Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)

であるまたはそれを含む、請求項176記載の分子。

【請求項178】

ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-
Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-
(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

であるまたはそれを含む、請求項176または請求項177記載の分子。

【請求項179】

ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインが、ストレプトアビジン結合ペプチドに対して 10^4 M ~ 10^{10} Mまたは約 10^4 M ~ 約 10^{10} Mの平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、請求項176 ~ 178のいずれか1項記載の分子。

20

【請求項180】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう44位 ~ 47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列 Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷またはIle⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷を含む、請求項174 ~ 179のいずれか1項記載の分子。

【請求項181】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

- a) SEQ ID NO:3 ~ 6、27および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；
 - b) SEQ ID NO:3 ~ 6、27および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷またはIle⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または
 - c) ストレプトアビジン結合ペプチドに結合する、a) もしくはb) の機能的フラグメント
- を含む、請求項174 ~ 180のいずれか1項記載の分子。

30

【請求項182】

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう117、120および/または121に対応する位置に1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、請求項180または請求項181記載の分子。

40

【請求項183】

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹もしくはPhe¹²¹の中から選択されるか；または

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹の1つもしくは複数から選択されるか；または

複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹から選択される、請求項182記載の分子。

【請求項184】

50

ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

a) SEQ ID NO:27または28に示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:27または28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、a) もしくはb) の機能的フラグメント

を含む、請求項174～183のいずれか1項記載の分子。

【請求項185】

細胞傷害性作用物質が、毒素である、請求項174～184のいずれか1項記載の分子。

【請求項186】

毒素が、ペプチド毒素、リシンA鎖毒素、アプリンA鎖、ジフテリア毒素(DT)A鎖、緑膿菌外毒素、志賀毒素A鎖、ゲロニン、モモルジン、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サポリン、トリコサンチンまたは大麦毒素である、請求項185記載の分子。

【請求項187】

毒素が、光毒素である、請求項185記載の分子。

【請求項188】

請求項111～139のいずれか1項記載の細胞または請求項140もしくは請求項141記載の組成物を以前に投与された対象に、請求項174～187のいずれか1項記載の分子を投与する工程を含む、細胞を死滅させる方法。

【請求項189】

投与された細胞に関連する毒性症状を対象が示したときに、または投与された細胞に対する検出可能なおよび/もしくは細胞性の免疫応答を対象が示したときに、前記分子が投与される、請求項188記載の方法。

【請求項190】

毒性症状が、神経毒性またはサイトカイン放出症候群(CRS)に関連する、請求項189記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、「CELL SURFACE CONJUGATES AND RELATED CELL COMPOSITIONS AND METHODS」を表題とする2017年1月20日に出願された米国仮出願番号62/448,936からの優先権を主張し、その内容の全体を参照により組み入れる。

【0002】

配列表の参照による組み入れ

本願は、電子形式の配列表とともに出願される。配列表は、2018年1月19日に作成された735042002640SeqList.TXTという名称のファイルとして提供され、209,044バイトのサイズである。電子形式の配列表内の情報は、その全体が参照により組み入れられる。

【0003】

分野

本開示は、いくつかの局面において、細胞表面分子と、少なくとも1つの作用物質、例えば少なくとも1つの親和性タグとを含む、細胞表面コンジュゲート、ならびにそのような細胞表面コンジュゲートを発現する改変された細胞に関する。いくつかの態様において、細胞表面分子は、細胞内シグナル伝達ドメインを含まないまたは細胞内シグナル伝達を媒介することができない。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートを含むよう改変された細胞、例えばT細胞は、抗原に特異的に結合する遺伝的に改変された組換え受

10

20

30

40

50

容体、例えばキメラ抗原受容体をさらに含む。本開示はまた、例えば改変された細胞の製造方法に関連してまたは養子細胞療法の方法を含むそのような細胞の対象への投与に関連して、細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を検出、同定、選択または標的とする方法を提供する。

【背景技術】

【0004】

背景

疾患または状態、例えばがんまたは腫瘍の処置に関して、細胞療法の実施を含む様々な戦略が利用可能である。さらに、遺伝的に改変された組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するよう免疫細胞を改変する、およびそのような細胞を含む組成物を対象に投与する戦略が利用可能である。例えばそのような治療に関連して対象に投与された際に改変された組成物を改善するおよび/または改変された組成物を観察もしくは調整する能力を改善することによって、処置の効果を向上させる改善された戦略が必要とされている。そのような要望に応える組成物、細胞および方法が提供される。

10

【発明の概要】

【0005】

要旨

機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子と、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインに結合することができる、細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質と、を含む細胞表面コンジュゲートが、本明細書に提供される。いくつかの態様において、作用物質は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテインに対して、 10^4 M ~ 10^{10} M または約 10^4 M ~ 約 10^{10} M の平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す。

20

【0006】

機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子と、細胞表面分子に連結され、かつ、試薬に可逆的に結合することができる、および/または競合物質の存在下で試薬の結合に関して競合し得る、少なくとも1つの作用物質であって、50アミノ酸未満の長さのペプチドである、作用物質と、を含む細胞表面コンジュゲートも提供される。いくつかの態様において、作用物質は、試薬に対して、 10^4 M ~ 10^{10} M または約 10^4 M ~ 約 10^{10} M の平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す。任意のそのような態様のいくつかにおいて、試薬は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテインである。

30

【0007】

いくつかの態様において、細胞表面分子は、膜貫通ドメインを含むおよび/または細胞表面上で発現され得る。いくつかの態様において、細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して修飾されており、任意で、参照細胞表面分子は、細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞表面受容体である。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す。

40

【0008】

(a) 参照細胞表面分子と比較して修飾された細胞表面分子であって、修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す、細胞表面分子; ならびに (b) ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに結合することができる、細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質、を含む細胞表面コンジュゲートも提供される。

【0009】

いくつかの態様において、細胞表面分子は、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない。(a) 前立腺

50

特異的膜抗原（PSMA）を含む細胞表面分子またはその修飾された細胞表面分子；および（b）ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに結合することができる、細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質、を含む細胞表面コンジュゲートも提供される。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/もしくは細胞内シグナル伝達を媒介することができず；ならびに/または修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して修飾されており、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/もしくはリガンド結合を示す。いくつかの態様において、細胞表面分子は、膜貫通ドメインを含むおよび/または細胞表面上で発現され得る。いくつかの態様において、作用物質は、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに対して、 $10^4 \text{ M} \sim 10^{10} \text{ M}$ または約 $10^4 \text{ M} \sim$ 約 10^{10} M の平衡解離定数（ K_D ）の結合親和性を示す。

10

【0010】

機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子と、試薬に対して 10^7 M 超の平衡解離定数（ K_D ）または 10^7 M 未満の平衡結合定数（ K_A ）の結合親和性を有する、細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質と、を含む細胞表面コンジュゲートが、本明細書に提供される。いくつかの例において、試薬は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインである。

【0011】

提供される任意の態様において、細胞表面分子は、細胞表面タンパク質である。

20

【0012】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、試薬に対する作用物質の結合は、可逆的であるおよび/または競合物質の存在下で試薬への結合に関して競合し得る。いくつかの局面において、試薬に対して競合物質が示す結合親和性は、試薬に対して作用物質が示す結合親和性よりも高い。いくつかの態様において、試薬に対して競合物質が示す結合親和性は、 $10^{10} \text{ M} \sim 10^{14} \text{ M}$ もしくは約 $10^{10} \text{ M} \sim$ 約 10^{14} M の平衡解離定数（ K_D ）であり；および/または試薬に対して作用物質が示す結合親和性は、 10^{10} M 超の平衡解離定数（ K_D ）である。

【0013】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテインに対する作用物質の結合は、可逆的であるおよび/またはビオチン、ビオチン類似体もしくはその生物学的に活性なフラグメントの存在下で試薬への結合に関して競合し得る。

30

【0014】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、少なくとも1つの作用物質は、細胞表面分子に直接的に連結される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、少なくとも1つの作用物質は、少なくとも1つのリンカーを通じて細胞表面分子に間接的に連結される。

【0015】

いくつかの局面において、細胞表面分子と少なくとも1つの作用物質（例えば、ペプチド、例えば、ストレプトアビジン結合ペプチド）とを含む細胞表面コンジュゲートは、融合タンパク質である。

40

【0016】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、少なくとも1つの作用物質は、1~4個もしくは約1~4個または1~2個もしくは約1~2個の作用物質を含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、少なくとも1つの作用物質は、1つのみの作用物質である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、細胞表面分子の細胞外部分または領域に連結され、任意で、細胞外部分または領域は、細胞表面分子のN末端またはC末端にある。任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、細胞表面分子のN末端に連結される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、細胞表面分子のC末端に連

50

結される。

【0017】

作用物質にN末端で連結された細胞表面分子、例えば細胞表面タンパク質を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインであるまたはそれを含む試薬に結合することができる、細胞表面コンジュゲートも提供される。

【0018】

試薬に可逆的に結合することができる作用物質にN末端で連結された細胞表面分子、例えば細胞表面タンパク質を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、50アミノ酸未満の長さのペプチドである、細胞表面コンジュゲートも提供される。

10

【0019】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、試薬、例えばストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインであるまたはそれを含む試薬に対して、 10^4 M ~ 10^{10} M または約 10^4 M ~ 約 10^{10} M の平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す。

【0020】

細胞表面分子の細胞外部分または領域で作用物質に連結された細胞表面分子を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインであるまたはそれを含む試薬に結合することができ、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、細胞表面コンジュゲートも提供される。

20

【0021】

細胞表面分子の細胞外部分または領域で作用物質に連結された細胞表面分子を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、試薬に可逆的に結合することができ、作用物質が、50アミノ酸未満の長さのペプチドであり、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、細胞表面コンジュゲートも提供される。いくつかの態様において、作用物質は、 10^4 M ~ 10^{10} M または約 10^4 M ~ 約 10^{10} M の平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す。

【0022】

細胞表面分子の細胞外部分または領域で作用物質に連結された細胞表面分子を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、試薬に対して、 10^7 M 超の平衡解離定数 (K_D) または 10^7 M 未満の平衡結合定数 (K_A) の結合親和性を示し、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、細胞表面コンジュゲートも提供される。いくつかの態様において、作用物質は、細胞表面分子のN末端に連結される。いくつかの態様において、作用物質は、細胞表面分子のC末端に連結される。

30

【0023】

そのN末端で作用物質に連結された、細胞表面分子、例えば細胞表面タンパク質を含む細胞表面コンジュゲートであって、試薬に対して作用物質が 10^7 M 超の平衡解離定数 (K_D) または 10^7 M 未満の平衡結合定数 (K_A) の結合親和性を示す、細胞表面コンジュゲートも提供される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、試薬は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインであるまたはそれを含む。

40

【0024】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、試薬、例えばストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインであるまたはそれを含む試薬に対する作用物質の結合は、可逆的であるおよび/または競合物質の存在下で試薬に対する結合に関して競合し得る。いくつかの例において、試薬に対して競合物質が示す結合親和性は、試薬に対して作用物質が示す結合親和性よりも高い。いくつかの例において、試薬に対して競合物質が示す結合親和性は、 10^{10} M ~ 10^{14} M もしくは約 10^{10} M ~ 約 10^{14} M であり; および/または、試薬に対して作用物質が示す結合親和性は、 10^{10} M 未満である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、試薬は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン

50

類似体もしくはムテインであり、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインに対する作用物質の結合は、可逆的であるおよび/またはビオチンもしくはビオチン類似体の存在下で試薬に対する結合に関して競合し得る。

【0025】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、記載されるような修飾された細胞表面分子を含む、細胞表面分子に、例えば細胞表面タンパク質に直接的に連結される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、少なくとも1つのリンカーを通じて細胞表面分子に間接的に連結される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、細胞表面分子、例えば細胞表面タンパク質は、1つのみの作用物質に連結される。

【0026】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、細胞表面分子は、キメラ抗原受容体 (CAR) でない。

【0027】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、細胞表面分子、例えば細胞表面タンパク質は、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/もしくは細胞内シグナル伝達を媒介することができない。任意のそのような態様のいくつかにおいて、細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して修飾されている。任意のそのような態様のいくつかにおいて、参照細胞表面分子は、天然の哺乳動物細胞表面分子である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾された細胞表面分子は、抗体またはその抗原結合フラグメントが認識することができる参照細胞表面分子のエピトープを含むまたは保持する。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/もしくは細胞内シグナル伝達を媒介することができず；ならびに/または修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/もしくはリガンド結合を示す。

【0028】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、細胞表面コンジュゲートは、融合タンパク質である。

【0029】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう44位~47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列 Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ を含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン類似体またはムテインは：a) SEQ ID NO:3~6、27および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；b) SEQ ID NO:3~6、27および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99% またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；またはc) 作用物質に可逆的に結合するおよび/または作用物質に対する結合が競合物質の存在下で競合する、a) またはb) の機能的フラグメント、を含む。

【0030】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン類似体またはムテインはさらに、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう117、120および/または121に対応する位置に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。いくつかの局面において、1つもしくは複数のアミノ酸置換は、Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹ もしくはPhe¹²¹ の中から選択されるか；または1つもしくは複数のアミノ酸置換は、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰ もしくはTyr¹²¹ の1つもしくは複数から選択されるか；または複数のアミノ酸置換は、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰ もしくはTyr¹²¹ から選択される。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、a) SEQ ID NO:27または28に示されるアミノ酸の配列；b) SEQ ID NO:27または28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合するおよび/または作用物質に対する結合が競合物質の存在下で競合する、アミノ酸の配列；またはc)作用物質に可逆的に結合するおよび/または作用物質に対する結合が競合物質の存在下で競合する、a)またはb)の機能的フラグメント、を含む。

10

【 0 0 3 2 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、親和性タグである。任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、Strep tag、Hisタグ、Flagタグ、Xpressタグ、Aviタグ、カルモジュリンタグ、ポリグルタメートタグ、HAタグ、Mycタグ、Nusタグ、Sタグ、Xタグ、SBPタグ、Softag、V5タグ、CBP、GST、MBP、GFP、チオレドキシントグもしくはそれらの任意の組み合わせであるまたはそれを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、任意でStrep tagである1つまたは複数のストレプトアビジン結合ペプチドであるまたはそれを含む。

20

【 0 0 3 3 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン結合ペプチドは、配列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)またはTrp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)

を含む。

【 0 0 3 4 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、作用物質は、配列Trp-Ser-His-Pro-

Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18)およびTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

を含む。

【 0 0 3 5 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、競合物質は、ビオチン、ビオチン類似体もしくはその生物学的に活性なフラグメントであるまたはそれを含む。記載される任意のものを含む、作用物質がストレプトアビジン結合ペプチドであり、試薬がストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインもしくは類似体であるものが、そのような態様に含まれる。

40

【 0 0 3 6 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、参照細胞表面分子は、細胞表面受容体、リガンド、糖タンパク質、細胞接着分子、抗原、インテグリンまたは分化クラスター (CD) である細胞表面タンパク質である。いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、細胞表面受容体である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、参照細胞表面分子は、EpCAM、VEGFR、インテグリン (例えば、インテグリン α 3、 α 4、 α IIb 3、 α 4 7、 α 5 1、 α v 3、 α v)、TNF受容体スーパーファミリーのメンバー (例えば、TRAIL R1、TRAIL R2)、上皮成長因子受容体ファミリーのメンバー、PDGF受容体、インターフェロン受容体、葉酸受容体、GPNMB、ICAM 1、HLA DR、CEA、CA 125、MUC1、TAG 72、IL 6受容体、

50

5T4、GD2、GD3、前立腺特異的膜抗原（PSMA）または分化クラスター（例えば、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA 1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/バシジン、CD152/CTLA 4、CD154/CD40L、CD195/CCR5およびCD319/SLAMF7から選択される。

【0037】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、参照細胞表面分子、例えば参照細胞表面タンパク質は、上皮成長因子受容体ファミリーのメンバーである。任意のそのような態様のいくつかにおいて、参照細胞表面分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）、erbB 2受容体チロシンタンパク質キナーゼ（errb2、HER2）、erbB 3受容体チロシンタンパク質キナーゼ、erbB 4受容体チロシンタンパク質キナーゼ、肝細胞成長因子受容体（HGFR/c MET）またはインスリン様成長因子受容体 1（IGF 1 R）である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、参照細胞表面分子は、前立腺特異的膜抗原（PSMA）である。

10

【0038】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、参照細胞表面分子、例えば参照細胞表面タンパク質は、ヒトである。

【0039】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾された細胞表面分子は、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して、参照細胞表面分子の、細胞内領域のすべてまたは一部、すなわち細胞内部に含まれる分子の一部分を除去または欠如するよう短縮化されている。いくつかの例において、細胞内領域は、細胞内シグナル伝達ドメインまたはトラフィックドメインを含む領域である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して細胞内シグナル伝達ドメインまたはトラフィックドメインのすべてまたは一部を欠如するよう短縮化されている。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子の1つまたは複数の細胞外ドメインを含む。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す。

20

【0040】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子の天然リガンドまたは基質に結合することができる。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子の天然リガンドまたは基質に対して減弱化されているまたはそれらに結合しない。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子の少なくとも1つの細胞外ドメインを含むが、参照細胞表面分子の天然リガンドまたは基質によって認識される1つまたは複数の他の細胞外ドメインを欠如している。いくつかの局面において、少なくとも1つの細胞外ドメインは、参照細胞表面分子に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントによって認識されるエピトープを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、抗体またはその抗原結合フラグメントは、AMG 102、AMG 479、BIIB0220A 5D5、CP 751、871、IMC A12、R1507、3F8、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アデカツムマブ、アフツズマブ、アレムツズマブ、アルツモマブペンテタート、アナツモマブマフェナトックス、アポリズマブ、アルシツモマブ、アセリズマブ、アトリズマブ（=トシリズマブ）、バシリキシマブ、ベクツモマブ、ベンラリズマブ、ベシレソマブ、ピバツズマブメルタンシン、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、カンツズマブメルタンシン、カプロマブペンデチド、カツマキソマブ、CC49、セデリズマブ、セルモロイキン、セツキシマブ、シクストムマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CNT0 95、コナツムマブ、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デツモマブ、エクロメキシマブ、エルツマキソマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エロツズマブ、エンリモマブペゴル、エピツモマブシツキセタン、エプラツズマブ、エルリズマブ、エタラシズマブ、ファノレ

30

40

50

ソマブ、ファラリモマブ、ファルレツズマブ、フィギツムマブ、ガリキシマブ、ガピリモマブ、ゲムツズマブオゾガミシン、グレムバツムマブベドチン、ゴミリキシマブ、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ、インテツムマブ、イラツムマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガミシン、イピリムマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ、リンツズマブ、レキサツムマブ、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マパツムマブ、マスリモマブ、マツズマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミツモマブ、ムロモナブ CD3、ナブツモマブエスタフェナトックス、ナタリズマブ、ネシツムマブ、オクレリズマブ、オツリモマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オボルツズマブモナトックス、オレゴボマブ、オテリキシズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ペムツモマブ、プリリキシマブ、PR 0 140、ニモツズマブ、ロバツムマブ、リツキシマブ、ロベリズマブ、ルプリズマブ、サツモマブペンデチド、シプリズマブ、ソソツズマブ、タドシズマブ、タブリツモマブパブトックス、テネリキシマブ、テプリズマブ、TGN1412、チシリムマブ(=トレメリムマブ)、チガツズマブ、トシリズマブ(=アトリズマブ)、トラリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブ、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ビシリズマブ、ビタキシマブ、ボロシキシマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ジラリムマブ、ゾリモマブアリトックス、アテゾリズマブ、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、デノスマブ、ジヌツキシマブ、ニボルマブ、オピヌツズマブ、ペムプロリズマブ、ピジリズマブ(CT 011)、ラムシルマブ、シルツキシマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、CEA scan Fabフラグメント、OC125モノクローナル抗体、ab75705、B72.3、MPD L3280A、MSB001078C、MEDI4736またはそれらの抗原結合フラグメントから選択される。

10

20

【0041】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、参照細胞表面受容体はEGFRであり、修飾された細胞表面受容体は修飾されたEGFRである。いくつかの局面において、修飾されたEGFRは、セツキシマブまたはその抗原結合フラグメントによって特異的に認識されるエピトープを含む。いくつかの例において、修飾されたEGFRは、参照EGFRのEGFRドメインI、EGFRドメインII、EGFR膜近傍ドメインおよびEGFRチロシンキナーゼドメインの1つまたは複数に欠如している。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾されたEGFRは、参照EGFRのEGFRドメインI、EGFRドメインII、EGFR膜近傍ドメインおよびEGFRチロシンキナーゼドメインのドメインのすべてに欠如している。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾されたEGFRは、参照EGFRのサブドメインIIIおよびサブドメインIVからなるまたはそれらから本質的になる細胞外ドメインを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾されたEGFRは、SEQ ID NO:44もしくは46に示されるアミノ酸の配列またはSEQ ID NO:44もしくは46に対して少なくとも85%、90%もしくは95%もしくは約85%、約90%もしくは約95%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

30

【0042】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、参照細胞表面受容体はHER2であり、修飾された細胞表面受容体は修飾されたHER2である。いくつかの局面において、修飾されたHER2は、トラスツズマブまたはその抗原結合フラグメントによって特異的に認識されるエピトープを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾されたHER2は、参照HER2のHER2ドメインI、HER2ドメインII、HER2ドメインIIIの1つまたは複数に欠如している。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾されたHER2は、参照HER2の参照EGFRのHER2ドメインI、HER2ドメインIIおよびHER2ドメインIIIのドメインのすべてに欠如している。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾されたHER2は、参照HER2のドメインIVからなるまたはそれらから本質的になる細胞外ドメインを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、修飾されたHER2は、SEQ ID NO:92に示されるアミノ酸の配列またはSEQ ID NO:92に対して少なくとも85%、90%もしくは95%もしくは約85%、約90%もしくは約95%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

40

【0043】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子は参照PSMAであり、修飾された細胞表面分子は修飾されたPSMAである。いくつかの態様において、参照PSMAは、野生型PSMA、任意で

50

野生型ヒトPSMAである。いくつかの態様において、参照PSMAは、ヒトPSMAである、および/またはSEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列もしくはSEQ ID NO:96もしくは97に示されるヌクレオチドの配列によってコードされるアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、参照PSMAの細胞外部分および膜貫通ドメインを含む。

【0044】

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、参照PSMAと比較して、細胞内領域に1つまたは複数のアミノ酸修飾を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸修飾は、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失および/または挿入を含む。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、参照PSMAと比較して変化した細胞内在化を示す。

【0045】

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、SEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列における位置でいうW2Gに対応するアミノ酸置換を含む、またはW2を含まない、または2位にいかなる残基も含まない。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、参照PSMAと比較して、11個のN末端アミノ酸の欠失または短縮を含む。

【0046】

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、抗体またはその抗原結合フラグメントによって認識され得るエピトープを含む。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、J591、DF0 J591、CYT 356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107 1A 4、YPSMA 1、YPSMA 2、3E6、2G7、24.4E6、GCP 02、GCP 04、GCP 05、J533、E99、1G9、3 C6、4.40、026、D7 Fc、D7 CH3、4D4、A5およびそれらの抗原結合フラグメントの中から選択される。

【0047】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、細胞表面コンジュゲートは、免疫原性でない、および/またはそれを投与した対象において免疫応答を誘導しない。

【0048】

本明細書に記載される任意の態様の細胞表面コンジュゲートをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドも提供される。いくつかの態様において、核酸配列はさらに、シグナル配列を含む。いくつかの例において、シグナル配列は、GMCSFRアルファ鎖由来のシグナルペプチドをコードする。

【0049】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、前記核酸配列は第1の核酸配列であり、ポリヌクレオチドはさらに、組換え受容体をコードする第2の核酸配列を含む。いくつかの例において、組換え受容体は、キメラ抗原受容体(CAR)であるまたはそれを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1および第2の核酸配列は、内部リボソーム侵入部位(IRES)、または自己切断性ペプチドもしくは任意でT2AもしくはP2Aであるリボソームスキップを引き起こすペプチドをコードするヌクレオチド配列によって隔てられている。いくつかの態様において、第1の核酸配列は、第2の核酸配列の上流にある。いくつかの態様において、第1の核酸配列は、第2の核酸配列の下流にある。

【0050】

本明細書に記載される任意の態様のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。いくつかの態様において、ベクターは、ウイルスベクターである。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ベクターは、レトロウイルスベクターである。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ベクターは、レンチウイルスベクターまたはガンマウイルスベクターである。

【0051】

上記の任意の態様のポリヌクレオチドまたは上記の任意の態様のベクターを細胞に導入する工程を含む改変された細胞を製造する方法も提供される。本明細書に記載される方法によって製造される改変された細胞も提供される。いくつかの態様において、改変された細胞は、本明細書に記載される任意の態様のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載される任意の態様のベクターを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、改変された細胞は、上記の任意の態様の細胞表面コンジュゲートを含む。いくつかの例において、改変された細胞はさらに、組換え受容体を含む。いくつかの局面において、組換え受容体は、疾患もしくは障害に関連する標的抗原に結合する。いくつかの例において、疾患または障害は、感染疾患もしくは障害、自己免疫疾患、炎症疾患、または腫瘍もしくはがんである。

【 0 0 5 3 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的抗原は、腫瘍抗原である。いくつかの態様において、標的抗原は、標的抗原は、 α v β 6インテグリン (α v β 6インテグリン)、B細胞成熟抗原 (BCMA)、B7 H3、B7 H6、炭酸脱水酵素9 (CA9、CAIXまたはG250としても公知)、がん精巣抗原、がん/精巣抗原1B (CTAG、NY ESO 1およびLAGE 2としても公知)、がん胎児性抗原 (CEA)、サイクリン、サイクリンA2、C Cモチーフケモカインリガンド1 (CCL 1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、上皮成長因子タンパク質 (EGFR)、短縮化された上皮成長因子タンパク質 (tEGFR)、III型上皮成長因子受容体変異 (EGFR vIII)、上皮糖タンパク質2 (EPG 2)、上皮糖タンパク質40 (EPG 40)、エフリンB2、エフリン受容体A2 (EPHa2)、エストロゲン受容体、Fc受容体様5 (FCRL5; Fc受容体ホモログ5またはFCRH5としても公知)、胎児型アセチルコリン受容体 (胎児型AChR)、葉酸結合タンパク質 (FBP)、葉酸受容体アルファ、ガングリオシドGD2、Oアセチル化GD2 (OGD2)、ガングリオシドGD3、糖タンパク質100 (gp100)、Gタンパク質共役受容体5D (GPCR5D)、Her2/neu (受容体チロシンキナーゼerb B2)、Her3 (erb B3)、Her4 (erb B4)、erbB二量体、ヒト高分子量黒色腫瘍関連抗原 (HMW MAA)、B型肝炎表面抗原、ヒト白血球抗原A1 (HLA A1)、ヒト白血球抗原A2 (HLA A2)、IL 22受容体アルファ (IL 22R)、IL 13受容体アルファ2 (IL 13Ra 2)、キナーゼインサートドメイン受容体 (kdr)、カップパ軽鎖、L1細胞接着分子 (L1 CAM)、L1 CAMのCE7エピトープ、ロイシンリッチリピート含有8ファミリーメンバーA (LRRCA A)、ルイスY、黒色腫瘍関連抗原 (MAGE) A1、MAGE A3、MAGE A6、メソテリン、c Met、マウスサイトメガロウイルス (CMV)、ムチン1 (MUC1)、MUC16、ナチュラルキラーグループ2メンバーD (NKG2D)リガンド、メラニンA (MART 1)、神経細胞接着分子 (NCAM)、腫瘍胎児抗原、黒色腫瘍優先発現抗原 (PRAME)、プロゲステロン受容体、前立腺特異的抗原、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (ROR1)、サバイピン、トロホブラスト糖タンパク質 (TPBG、5T4としても公知)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG72)、血管内皮成長因子受容体 (VEGFR)、血管内皮成長因子受容体2 (VEGFR2)、ウィルムス腫瘍1 (WT 1) からなる群より選択される。

【 0 0 5 4 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的抗原は、ROR1、HER2、L1 CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、B型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EPG 2、EPG 4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW MAA、IL 22R アルファ、IL 13R アルファ2、kdr、カップパ軽鎖、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY ESO 1、MART 1、gp100、腫瘍胎児抗原、TAG72、VEGF R2、がん胎児性抗原 (CEA)、前立腺特異的抗原、PSMA、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS 1、c Met、GD 2、MAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1 (WT 1) およびサイクリンA1 (CCNA1) からなる群より選択される。

【 0 0 5 5 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、組換え受容体は、機能的な非TCR抗原受容体またはトランスジェニックTCRである。任意のそのような態様のいくつかにおいて、組換え受容体は、キメラ抗原受容体 (CAR) である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、組換え受容体は、抗原結合ドメインを含む細胞外部分を含む。いくつかの例において、抗原結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントであるまたはそれを含む。

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、抗体フラグメントは、単鎖フラグメントである。いくつかの態様において、フラグメントは、フレキシブル免疫グロブリンリンカーによって接続された抗体可変領域を含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、フラグメントは、sc Fvを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、組換え受容体は、活性化細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【 0 0 5 7 】

改変された細胞のいくつかの態様において、活性化細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞において一次活性化シグナルを誘導することができる、T細胞受容体(TCR)構成要素である、および/または免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、活性化細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ(CD3)

10

【 0 0 5 8 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、改変された細胞はさらに、細胞外部分と活性化細胞内シグナル伝達ドメインを連結する膜貫通ドメインを含む。

【 0 0 5 9 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、組換え受容体は、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの例において、共刺激シグナル伝達ドメインは、T細胞共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分を含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、4 1BBもしくはICOSの細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分を含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、共刺激シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメインと活性化細胞内シグナル伝達ドメインとの間にある。

20

【 0 0 6 0 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、細胞は免疫細胞である。いくつかの例において、細胞はリンパ球である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、細胞は、T細胞またはNK細胞である。いくつかの例において、細胞は、CD8+ T細胞またはCD4+ T細胞であるT細胞である。

【 0 0 6 1 】

上記の任意の態様の改変された細胞を含む組成物も提供される。いくつかの例において、組成物はさらに、薬学的に許容される賦形剤を含む。

30

【 0 0 6 2 】

上記の任意の態様の改変された細胞または上記の任意の態様の組成物を、疾患または障害を有する対象に投与する工程を含む、処置方法も提供される。いくつかの態様において、疾患または障害は、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは障害、または感染疾患である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、この方法はさらに、改変された細胞上で発現された細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子を対象に投与する工程、および細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を検出する工程を含む。いくつかの局面において、検出は、インビボ画像化を含む。

【 0 0 6 3 】

細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を同定する方法であって、本明細書に記載される任意の態様の細胞表面コンジュゲートを発現するもしくは発現する可能性のある細胞を含む組成物を、細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程を含む方法も提供される。いくつかの局面において、この方法は、インビトロ、エクスピボまたはインビボで実施される。いくつかの態様において、細胞表面分子を発現する細胞は、インビボ画像化を通じて検出される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、インビボ画像化法は、磁気共鳴画像化(MRI)、単光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)、コンピュータ断層撮影(CT)、コンピュータ体軸断層撮影(CAT)、電子ビームコンピュータ断層撮影(EBCT)、高分解能コンピュータ断層撮影(HRCT)、下環状断層撮影、ポジトロン放出断層撮影(PET)、シンチグラフィ、ガンマ線カメラ、+検

40

50

出装置、 検出装置、 蛍光画像化、 微光画像化、 X線および生物発光画像化の中から選択される。

【 0 0 6 4 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、 結合分子は、 インビボで検出可能なシグナルを提供するまたはシグナルを誘導する部分に結合される。 いくつかの例において、 この部分は、 放射性同位体、 生物発光化合物、 化学発光化合物、 蛍光化合物、 金属キレートまたは酵素である。

【 0 0 6 5 】

細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を同定する方法であって、 細胞表面コンジュゲートをコードする本明細書に記載される任意の態様のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載される任意の態様のベクターを形質導入された組成物を、 細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程； および結合分子に結合した細胞を同定する工程を含む方法も提供される。 細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を同定する方法であって、 細胞表面コンジュゲートをコードする本明細書に記載される任意の態様のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載される任意の態様のベクターを細胞に導入する工程； 前記細胞を含む組成物を、 細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程； および結合分子に結合した細胞を同定する工程を含む方法も提供される。

10

【 0 0 6 6 】

細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を選択する方法であって、 細胞表面コンジュゲートをコードする本明細書に記載される任意の態様のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載される任意の態様のベクターを形質導入された組成物を、 細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程； および結合分子に結合した細胞を単離する工程を含む方法も提供される。 さらに、 細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を選択する方法であって、 細胞表面コンジュゲートをコードする本明細書に記載される任意の態様のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載される任意の態様のベクターを細胞に導入する工程； 前記細胞を含む組成物を、 細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程； および結合分子に結合した組成物を単離する工程を含む方法がさらに提供される。

20

【 0 0 6 7 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、 結合分子は、 検出可能な部分に結合されるまたは検出可能なシグナルを生成することができる。 いくつかの例において、 検出可能な部分は、 蛍光タンパク質を含む。

30

【 0 0 6 8 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、 作用物質は、 ストレプトアビジン結合ペプチドである。 いくつかの例において、 ストレプトアビジン結合ペプチドは、 配列
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(SEQ ID NO: 8) もしくは Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)

であるまたはそれを含む。 いくつかの局面において、 ストレプトアビジン結合ペプチドは、 配列
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-

40

Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18)

および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

であるまたはそれを含む。

【 0 0 6 9 】

50

いくつかの態様において、結合分子は、作用物質に可逆的に結合することができる試薬である。いくつかの局面において、試薬は、ストレプトアビジン類似体またはムテインである。いくつかの例において、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう44位～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷またはIle⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷を含む。

【0070】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、a) SEQ ID NO:3～6、27および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；b) SEQ ID NO:3～6、27および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷またはIle⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；またはc) 作用物質に可逆的に結合する、a) またはb) の機能的フラグメント、を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジン類似体またはムテインはさらに、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう117、120および/または121に対応する位置に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。

【0071】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、1つもしくは複数のアミノ酸置換は、Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹もしくはPhe¹²¹の中から選択されるか；または1つもしくは複数のアミノ酸置換は、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹の1つもしくは複数から選択されるか；または複数のアミノ酸置換は、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹から選択される。

【0072】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、a) SEQ ID NO:27または28に示されるアミノ酸の配列；b) SEQ ID NO:27または28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；またはc) 作用物質に可逆的に結合する、a) またはb) の機能的フラグメント、を含む。

【0073】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、この方法はさらに、作用物質に対する結合分子の可逆的結合を妨害する工程を含む。いくつかの局面において、妨害する工程は、結合分子と作用物質との間の結合を解消することができる競合物質を含む組成物を細胞と接触させる工程を含む。いくつかの例において、競合物質は、遊離結合パートナーであるおよび/または競合作用物質である。いくつかの態様において、この物質は、ピオチン、ピオチン類似体もしくはその生物学的に活性なフラグメントであるまたはそれを含む。

【0074】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、結合分子は、作用物質に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントである。いくつかの例において、結合分子は、抗StrepTag抗体である。

【0075】

細胞傷害性作用物質に結合されたストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインを含む分子も、本明細書に提供される。いくつかの局面において、この分子は、ストレプトアビジン類似体またはムテインを含む。いくつかの態様において、ス

トレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体は、ストレプトアビジン結合ペプチドに結合する。

【 0 0 7 6 】

いくつかの例において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、配列 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(SEQ ID NO: 8) もしくは Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)

であるまたはそれを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン結合ペプチドは、配列

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-

Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-

Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-

(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

であるまたはそれを含む。

【 0 0 7 7 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、ストレプトアビジン結合ペプチドに対して、 10^4 M ~ 10^{10} M または約 10^4 M ~ 約 10^{10} M の平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、SEQ ID NO:1 に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう44位 ~ 47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列 Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ を含む。

20

【 0 0 7 8 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、a) SEQ ID NO:3 ~ 6、27および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；b) SEQ ID NO:3 ~ 6、27および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99% またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷ に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；またはc) ストレプトアビジン結合ペプチドに結合する、a) またはb) の機能的フラグメント、を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジン類似体またはムテインはさらに、SEQ ID NO:1 に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう117、120および/または121に対応する位置に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。

30

【 0 0 7 9 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、1つもしくは複数のアミノ酸置換は、Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹ もしくは Phe¹²¹ の中から選択されるか；または1つもしくは複数のアミノ酸置換は、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰ もしくは Tyr¹²¹ の1つもしくは複数から選択されるか；または複数のアミノ酸置換は、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰ もしくは Tyr¹²¹ から選択される。

40

【 0 0 8 0 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、a) SEQ ID NO:27 または 28 に示されるアミノ酸の配列；b) SEQ ID NO:27 または 28 に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99% またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰ および Tyr¹²¹ に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配

50

列；またはc) ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、a) またはb) の機能的フラグメント、を含む。

【0081】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、細胞傷害性作用物質は、毒素である。いくつかの例において、毒素は、ペプチド毒素、リシンA鎖毒素、アプリンA鎖、ジフテリア毒素(DT)A鎖、緑膿菌外毒素、志賀毒素A鎖、ゲロニン、モモルジン、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サポリン、トリコサンチンまたは大麦毒素である。いくつかの例において、細胞毒素は、光毒素である。

【0082】

本明細書に記載される任意の態様の細胞または本明細書に記載される任意の態様の組成物を以前に投与された対象に、本明細書に記載される任意の態様の分子を投与する工程を含む、細胞を死滅させる方法も提供される。いくつかの局面において、前記分子は、投与された細胞に関連する毒性症状を対象が示したときにまたは投与された細胞に対する検出可能なおよび/もしくは細胞性の免疫応答を対象が示したときに投与される。いくつかの例において、毒性症状は、神経毒性またはサイトカイン放出症候群(CRS)に関連する。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】細胞内の2つのタンパク質を同一構築物から発現するための、2Aリボソームスキップエレメントによって隔てられた、組換え受容体(例えば、CAR)および提供される例示的な細胞表面コンジュゲート(例えば、Strep tag(ST)に連結された細胞表面分子(CSM)(CSM ST))をコードする核酸分子の概要を示す。発現された組換え受容体に非依存的な遺伝子修飾細胞の選択のために、そのような細胞を(A)固体表面に結合された非抗体試薬(例えば、Strep Tactin)または(B)細胞表面コンジュゲートの作用物質に特異的な抗Strep tag抗体と接触させることにより、発現された細胞表面コンジュゲートの作用物質を標的とする例示的な方法も示されている。

【図2】細胞内の2つのタンパク質を同一構築物から発現するための、T2Aリボソームスイッチによって隔てられた、組換え受容体(例えば、Tg受容体)および提供される例示的な細胞表面コンジュゲート(例えば、Strep tag(ST)に連結された短縮化された上皮成長因子受容体(tEGFR)(tEGFR ST))をコードする核酸分子の概要を示す。発現された組換え受容体に非依存的な遺伝子修飾細胞の選択のために、そのような細胞を(A)固体表面に結合された非抗体試薬(例えば、Strep Tactin)または(B)細胞表面コンジュゲートの作用物質に特異的な抗Strep tag抗体と接触させることにより、発現された細胞表面コンジュゲートの作用物質を標的とする例示的な方法も示されている。

【発明を実施するための形態】

【0084】

詳細な説明

1. 遺伝子修飾細胞のプロセッシングのための細胞表面コンジュゲート

細胞表面分子、例えば細胞表面タンパク質と、少なくとも1つの作用物質、例えば親和性タグ、例えばペプチド作用物質とを含む、細胞表面コンジュゲートが、本明細書に提供される。いくつかの態様において、提供される細胞表面コンジュゲートは、例えば、そのコンジュゲートの細胞表面分子に結合しないまたは細胞表面分子を認識しない、そのコンジュゲートの作用物質に特異的な結合分子を通じた、細胞の特異的標的化、細胞の単離もしくは選択または細胞の検出の1つまたは複数を実現できるように改変されているまたは細胞内発現される。いくつかの態様において、細胞表面分子は、組換え受容体ではない、例えば抗原受容体ではない、例えば、キメラ抗原受容体(CAR)ではない。いくつかの態様において、提供される細胞表面コンジュゲートは、組換え受容体(例えば、CAR)を発現する細胞に同時導入され、それによって、例えば、改変された細胞の検出、選択、単離または自殺に基づく検出の方法に関連して、細胞表面コンジュゲートが、組換え受容体を発現する細胞のプロセッシングのために利用できるようになる。

【0085】

養子療法用に改変された細胞を作製および投与する上で、様々な戦略が利用可能となっている。細胞は、一般に、1つまたは複数の遺伝的に改変された核酸またはその生産物を導入することによって改変される。特にそのような生産物は、改変されたT細胞受容体（TCR）および機能的な非TCR抗原受容体、例えば活性化、刺激性および共刺激性CARを含むキメラ抗原受容体（CAR）およびそれらの組み合わせを含む、遺伝的に改変された抗原受容体である。例えば、キメラ受容体、例えばCARを発現する細胞、例えばT細胞を改変し、そのように改変された細胞を含む組成物を対象に投与するための戦略が利用可能となっている。改変された細胞を作製するプロセスを通じて、形質導入された細胞を同定、検出、局在化および/または選択することができることが有益である。養子療法のための改変された細胞の投与の後に、形質導入された細胞を観察し、対象において形質導入された細胞を枯渇させるまたはその数を減少させるメカニズムを提供することも必要である。

10

【0086】

細胞を選択および単離する公知の方法は、関心対象の細胞に結合するCAR特異的抗体の使用を含むものである。例えば、CAR修飾T細胞の検出のためのピオチニル化ヤギ抗マウスIgG(Fab')₂（Jackson ImmunoResearch）の使用が、当技術分野で公知となっている（Bren tjens et al., *Sci. Transl. Med.* 2013 Mar; 5(177): 177ra38）。このポリクローナル抗体の感度は低いため、患者サンプル中のリンパ球数が少ない状況下では、CAR修飾T細胞の検出は、Dynabeadsを用いたT細胞の非特異的拡張後にのみ達成された。これは、輸注後のインビボでの循環中CAR修飾T細胞の直接的評価を妨げるものである。フローサイトメトリーによるCAR修飾T細胞の検出のためのプロテインLの使用も報告されている（Zheng et al., *J. Transl. Med.* 2012 Feb; 10:29）。この試薬は、多パラメータフローサイトメトリーアッセイにおける検出および感度の観点から、限定的にしか使用されない。他のアッセイ形式におけるその使用は示されていない。別のアプローチは、CAR内の特定部位に直接導入されたStrep tagII配列を利用し、それによってStrep Tagに対する結合試薬を用いてそのCARを直接評価する（Liu et al. (2016) *Nature Biotechnology*, 34:430; 国際特許出願公開番号W02015095895）。さらに、CARポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体も公知である（国際特許出願公開番号W02014190273を参照のこと）。一部の状況下では有用であるものの、CARに直接的または間接的に結合する試薬は、エクスピボ生産および製造の間の細胞の単離または選択に関して必ずしも望ましくない細胞シグナルおよび改変された細胞の活性化を誘導するようCARを活性化させる危険を有し得る。

20

30

【0087】

いくつかの局面において、細胞の検出または選択を可能にし、いくつかの例においては、ADCCによる細胞の自殺も促進する外因的マーカー遺伝子が、改変細胞療法に関連して利用される。そのようなマーカー遺伝子の例は、形質導入細胞において関心対象の導入遺伝子（CARまたはTCR）と共発現され得る、短縮化された上皮成長因子受容体（EGFRt）である（例えば、米国特許第8,802,374号を参照のこと）。EGFRtは、抗体セツキシマブ（Erbix (登録商標)）によって認識されるエピトープを含む。この理由から、Erbix (登録商標)は、別の組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）も用いて同時改変された細胞を含む、EGFRt構築物を用いて改変された細胞を同定または選択するために使用され得る。加えて、EGFRtは、細胞療法に関連して、自殺メカニズムとして広く使用されている。いくつかの局面において、EGFRtが関心対象の導入遺伝子（例えば、CARまたはTCR）と共に細胞内で共発現される場合、それは、セツキシマブモノクローナル抗体によって標的とされ、ADCCを通じて移入された遺伝子修飾細胞を減少または枯渇させ得る（米国特許第8,802,374号およびLiu et al., *Nature Biotech.* 2016 April; 34(4): 430-434を参照のこと）。重要なことは、tEGFRを用いた自殺殺傷アプローチは、抗体エピトープの利用を必要とすることである。

40

【0088】

当技術分野で公知の上記アプローチは、細胞のプロセッシング、生産および/または機能と干渉する潜在的問題を有し得る。形質導入された細胞生産物に関連する生産、観察および投与後段階を補助する細胞表面マーカーが必要となる。例えば、導入遺伝子について陽

50

性である細胞の効率的選択および単離のためならびにインビボおよびエクスピボで導入遺伝子を発現する細胞を観察するための方法が、望まれている。提供される細胞表面コンジュゲートおよび方法は、そのような要望に応え、ならびに/または既存の方法および試薬に付随する1つもしくは複数の問題に対処する。いくつかの態様において、提供されるコンジュゲートは、改変された細胞に関連して使用される既存のマーカーまたは選択戦略と比較して1つまたは複数の利点を提供する。

【0089】

いくつかの態様において、提供されるコンジュゲートは、作用物質、例えば親和性タグ（例えば、ペプチド）に連結または結合された、細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子を含む、コンジュゲートである。いくつかの態様において、作用物質は、結合分子によって認識されるものである。いくつかの態様において、提供される細胞表面コンジュゲートの作用物質は、それに対する周知の結合分子が入手可能であるストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag（登録商標））である。いくつかの局面において、細胞表面コンジュゲートは、細胞表面分子またはその修飾型と、作用物質、例えば親和性タグとを含む、融合タンパク質である。

10

【0090】

いくつかの態様において、細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して変化した修飾された細胞表面分子である。いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、天然の哺乳動物細胞表面分子である。いくつかの例において、細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して修飾されている、例えば短縮化されている、または1つもしくは複数のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を含む。いくつかの態様において、細胞表面分子は、短縮、例えば細胞内シグナル伝達ドメインおよび/もしくは他の細胞内ドメインまたは1つもしくは複数の細胞外ドメインのすべてまたは一部を除去する短縮を含む。いくつかの態様において、細胞表面分子は、いくつかの例において、例えば安全スイッチ機構としての改変された細胞の選択的除去または自殺のための抗体依存細胞傷害（ADCC）を媒介するよう、作用物質に非依存的にコンジュゲートの細胞表面分子を標的とすることを可能にする抗体または抗原結合フラグメントによって認識される少なくとも1つのエピトープを、さらに含むまたは保持している。いくつかの態様において、コンジュゲートの細胞表面分子は、修飾された上皮成長因子受容体（EGFR）、例えば短縮化されたEGFRを含む（例えば、米国特許第8,802,374号を参照のこと）。いくつかの態様において、コンジュゲートの細胞表面分子は、修飾された前立腺特異的膜抗原（PSMA）、例えば修飾されたPSMA、例えば短縮化されたPSMA（tPSMA）を含む。

20

30

【0091】

いくつかの態様において、作用物質は、それに対する結合が可逆的であるおよび/または結合分子に対する結合が競合物質の存在下で競合し得るもしくは妨げられ得る結合分子によって認識されるものである。いくつかの態様において、結合分子は、競合物質に対して作用物質に対するよりも高い結合親和性を示す試薬であるまたはそのような試薬を含む。いくつかの態様において、結合分子は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインであるまたはそれを含む試薬であり、作用物質は、ストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep tag（登録商標）である。

40

【0092】

いくつかの態様において、特定のストレプトアビジンムテイン分子（例えば、Strep Tactin）は、ストレプトアビジンムテインに対して、ストレプトアビジンムテインがストレプトアビジン結合ペプチドに対して示すよりも高い結合親和性を示す、ビオチンまたはビオチン類似体もしくは模倣体の存在下で特定のストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag（登録商標））に可逆的に結合することができる。したがって、特定の局面において、細胞表面コンジュゲートの作用物質（例えば、ストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep tag（登録商標））と結合分子（例えば、ストレプトアビジンムテイン、例えばStrep Tactin）との間の結合は、競合物質（例えば、ビオチンまたはビオチン模

50

倣体)の添加によって妨げられ得る。いくつかの態様において、そのような結合試薬、例えばストレプトアビジンムテイン結合試薬は、ADCCによる自殺に基づく死滅を誘導しない。さらに、ストレプトアビジンムテインは、可溶性試薬として調製され得るまたは細胞の選択もしくは単離を容易にするよう、固相に、例えば定常相に固定され得る、例えばカラム、例えばカラムクロマトグラフィーもしくは平面クロマトグラフィー内に存在する。

【0093】

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートは、(1)修飾された細胞表面分子、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインおよび/または同族リガンドへの結合のための1つもしくは複数の細胞外ドメインを欠如している修飾された細胞表面受容体ならびに(2)少なくとも1つのストレプトアビジン結合ペプチド作用物質(Strep tag(登録商標))を含む。例示的な細胞表面分子は、報告されており、例えば、修飾された上皮成長因子受容体を含む。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートは、ストレプトアビジンムテインであるまたはそれを含ま結合分子試薬を通じて検出され得る。代替の例において、ストレプトアビジンまたは結合ペプチド(例えば、Strep tag(登録商標))の個々の検出は、高親和性モノクローナル抗Strep tag抗体によって達成され得る。

10

【0094】

いくつかの態様において、作用物質は、細胞表面分子、例えば修飾された細胞表面分子の細胞外(N末端またはC末端)部分に融合される。いくつかの態様において、細胞表面分子の露出しているN末端またはC末端のみでの作用物質の連結は、それが容易に検出可能となるようおよび/またはその検出が立体構造的に妨害されないように作用物質を露出させる。いくつかの態様において、細胞表面分子は、例えば安全性スイッチ法に関連する我々の自殺除去を誘導または実施するために、結合分子、例えば抗体もしくは抗原結合フラグメントまたはリガンドが認識または結合することができるエピトープを含む。したがって、細胞表面分子のN末端配列またはC末端配列における作用物質の連結は、特異的な抗体または抗原結合フラグメントによる認識のために細胞表面分子のエピトープのアクセシビリティを維持し得る。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートは、例えば改変された細胞上のEGFR^tへのセツキシマブの結合を通じて発揮される、細胞表面分子の安全性スイッチ機能を保持する。

20

【0095】

いくつかの態様において、提供される細胞表面コンジュゲートは、細胞の選択または同定が細胞の活性化または自殺から切り離され得るものを含む。いくつかの例において、特定の抗原受容体、例えばCARに対する抗体を使用する選択プロセスは、受容体、例えばCARの偶発的活性化および受容体、例えばCARを通じた意図しないシグナル伝達をもたらし得る。この問題は、抗原受容体に非依存的に細胞表面上に発現される提供される細胞表面コンジュゲートによって回避される。いくつかの態様において、提供される細胞表面コンジュゲートは、組換え受容体(例えば、CAR)の機能を分離した状態で維持し、細胞表面コンジュゲートに関連する活性によって影響されないようにする。いくつかの例において、形質導入の確認のためのコンジュゲートの検出は、CARの偶発的活性化およびCARを通じた意図しないシグナル伝達をもたらさないであろう。したがって、いくつかの態様において、標的外効果の可能性は、軽減され得る。

30

40

【0096】

同様に、コンジュゲートの細胞表面分子は、抗原受容体、例えばCARではなく、抗原受容体に非依存的に改変された細胞において共発現されるので、改変された細胞の認識は、細胞表面コンジュゲートの発現に基づき得、シグナル分子に基づくものではない。いくつかの局面において、提供される細胞表面コンジュゲートは、提供されるコンジュゲートの作用物質を通じた改変された細胞の検出または選択が抗原受容体、例えばCARの発現に、および/またはどのくらい多くの抗原受容体、例えばCARが発現されるかに非依存的であるという利点を有する。

【0097】

提供される細胞表面コンジュゲートはまた、改変された細胞についての汎用またはユニ

50

バーサルマーカーを提供し、各細胞療法のために再構成または構築される必要がない。したがって、特定の先行技術の方法と異なり、提供されるコンジュゲートおよび方法は、各導入遺伝子のための個別のマーカー試薬を作製する必要性を回避する、および/または受容体（例えば、CARもしくはTCR）の特定のドメインを特異的に標的とする個別の選択試薬の作製を回避する。したがって、提供される方法は、先行技術の方法よりも所要時間が短く、試薬リソースを節約する。

【0098】

利用可能な先行技術のアプローチにおいて、選択プロセスは、いくつかの例において、細胞の損失または損傷を引き起こし得る。いくつかの局面において、同じ結合分子（例えば、EGFRtの場合はセツキシマブ）を用いて細胞を選択しかつ細胞を自殺のために選択的に標的とする方法は、理想的ではない。いくつかの例において、特異的な抗体（例えば、セツキシマブ）を用いてタンパク質マーカー（例えば、EGFRt）を通じて形質導入された細胞を選択または単離する方法は、ADCC自殺に基づく機構により細胞の損失をもたらし得る。しかし、改変された細胞のエクスピボ生成およびさらなるプロセッシングの間、細胞の自殺および損失は望ましくない。提供される細胞表面コンジュゲートは、非抗体試薬（例えば、ストレプトアビジンムテイン試薬）によって認識され得るので、細胞の製造に関連する選択プロセスの間の細胞の損失を伴うそのような問題は、回避され得る。さらに、組換え受容体、例えばCARに直接的または間接的に結合し、細胞シグナルを誘導するようCARを刺激する危険を有し得るおよび改変された細胞において刺激をもたらし得る試薬と異なり、提供される態様は、CARを通じたシグナルを刺激せずに、細胞を改変、選択、単離、生産、プロセッシングまたは製造できるようにする。

10

20

【0099】

さらに、いくつかの例において、細胞選択のために抗体分子を用いる先行技術の方法は、特異的な標的に対する抗体の結合が可逆的でないまたは効率的もしくは迅速でなく可逆的である様式で行われる。いくつかの例において、細胞表面マーカーを認識するまたは抗原受容体（例えば、CAR）を直接認識する高親和性抗体および特に 10^8 Mまたはそれより低い K_D の抗体は、細胞からの抗体の離脱をより緩やかにする。いくつかの例において、細胞の生産および製造に関連して抗原受容体（例えば、CAR）改変細胞を選択するためにそのような抗体が使用される場合、残留抗体が、細胞に接着したままのとき、最終配合物または製品中にとどまり得る危険がある。対象へのそのような製品の投与は、対象において望ましくない効果をもたらし得る。したがって、いくつかの局面において、本明細書で提供される細胞表面コンジュゲートは、この問題を回避し、結合分子試薬が医薬製品にとどまる危険を減らすために、特定の結合分子試薬（例えば、ストレプトアビジンムテイン、例えばStrep Tactin）に対してより低い親和性の相互作用を示す作用物質（例えば、ストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrepTag）を含む。加えて、その結合分子からの作用物質の結合の完全な解離または妨害の方法が、細胞療法の構築に関連して望まれる。

30

【0100】

いくつかの態様において、提供される細胞表面コンジュゲートは、特異的な抗体によって認識されるエピトープを保持または保存することによりコンジュゲートの細胞表面分子（例えば、EGFRtまたはPSMA）の安全スイッチ機能を保持する。例えば、提供される細胞表面コンジュゲートは、コンジュゲートの細胞表面分子に特異的な結合分子（例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント）およびコンジュゲートの作用物質に特異的な結合分子によって特異的に結合され得る、例えば非競合的に結合され得る。いくつかの局面において、細胞表面分子の抗体エピトープの利用能に依存するADCCを通じて細胞表面分子を標的とすることは、様々な用途において細胞表面コンジュゲートの機能向上を提供する。

40

【0101】

ADCCを通じた活性の代わりとして、対象における形質導入細胞生産物の枯渇または減少は、細胞表面コンジュゲートの作用物質を標的とすることによって促進され得る。いくつかの態様において、提供される作用物質は、例えば作用物質に特異的な結合分子を毒素または他の細胞傷害性作用物質（本明細書で、「自殺性作用物質」とも呼ばれる）に連結ま

50

たは結合することによって、安全スイッチ特性を示すようさらに修飾され得る。いくつかの局面において、提供される自殺性作用物質は、いくつかの例において抗体の薬物動態により鈍化し得る細胞自殺のADCC機構に依存しない。いくつかの態様において、結合分子は、抗体または抗原結合フラグメントではない。いくつかの態様において、自殺性作用物質の結合分子は、いくつかの例においてストレプトアビジン結合性作用物質である作用物質に結合するストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテイン、例えば記載される任意のものである。いくつかの態様において、試薬（例えば、Strep Tactin（登録商標））に結合された毒素を作用物質（Strep tag（登録商標））に送達することによる自殺が使用され得る。いくつかの局面において、毒素に結合された試薬により媒介される殺傷は、ADCCを活性化させる抗体の使用と比較してより迅速な送達を実現する。そのような自殺性作用物質、例えばストレプトアビジンムテイン 毒素は、抗体に基づく自殺機構と比較して、改変された細胞に対してより迅速かつ素早い特異的細胞殺傷効果を示し得る。いくつかの態様において、細胞殺傷は、抗体に基づく機構により開始される細胞殺傷よりも約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍超、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍超もしくは約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍またはそれ以上素早く開始される。

10

【0102】

例えば養子療法に関連するプロセッシング、製造または投与後観察に関連する、細胞によって発現された細胞表面コンジュゲートの方法および使用も提供される。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートを発現する形質導入された細胞のインビボまたはエクスピボ検出方法が提供される。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートを発現するよう形質導入することに成功した細胞を選択、例えば単離または回収する方法が提供される。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートを発現する細胞の自殺殺傷方法も提供される。

20

【0103】

いくつかの態様において、提供される方法は、細胞表面コンジュゲートおよび所望の組換え受容体導入遺伝子（例えば、CARまたはTCR）で細胞を同時改変する工程を含む。細胞表面コンジュゲートおよび組換え受容体で細胞を同時改変するためのベクターも提供される。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートのコード配列を含む骨格ベクター構築物が提供される。いくつかの例において、細胞表面コンジュゲートおよび組換え受容体を個別に発現するよう細胞を遺伝的に改変するアプローチにおいてそのような骨格構築物を使用することによって、効率の改善が達成される。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートを含む骨格発現ベクターは、抗原を特異的に標的とする固有の組換え受容体（CARまたはTCR等）の導入配列を挿入するために使用され得る。いくつかの態様において、得られるベクター構築物は、組換え受容体をコードする核酸配列、2Aエレメント、例えばT2Aリボソームスキップエレメントをコードする配列および、例えばCARをコードする配列の下流に、細胞表面コンジュゲートをコードする配列を含む。したがって、いくつかの局面において、組換え受容体（例えば、CAR）をコードする構築物およびコンジュゲートは、同じ構築物から2つのタンパク質を発現させるための2Aエレメント、例えばT2Aリボソームスイッチによって隔てられる。いくつかの態様において、そのような提供される構築物は、任意の組換え受容体（例えば、CAR）を容易にコードするよう修飾され得る。

30

40

【0104】

細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を使用する方法も提供される。細胞単離および遺伝的改変方法が提供される。細胞表面コンジュゲートをコードする核酸、例えば構築物、例えばウイルスベクターならびに/または細胞表面コンジュゲートのコード核酸および/もしくはタンパク質、ならびに例えば形質導入によって、そのような核酸を細胞に導入する方法が提供される。改変された細胞を含む組成物、ならびに例えば養子細胞療法のために当該細胞および組成物を対象に投与するならびに当該細胞および組成物を観察するための方法、キットおよびデバイスも提供される。

【0105】

50

II. 細胞表面コンジュゲート

細胞表面分子と、結合分子によって特異的に認識され得る少なくとも1つの作用物質（例えば、ペプチド）、例えば親和性タグとを含む、細胞表面コンジュゲートが、本明細書に提供される。いくつかの態様において、提供されるコンジュゲートは、融合タンパク質であるまたは融合タンパク質を含む。いくつかの態様において、コンジュゲートの細胞表面分子は、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない。いくつかの局面において、細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して変化した修飾された細胞表面分子である、例えば参照細胞表面分子の細胞内シグナル伝達ドメインのすべてまたは一部を欠如しているならびに/または1つもしくは複数のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を含む短縮化された細胞表面受容体である。いくつかの態様において、コンジュゲートの細胞表面分子は、変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す。いくつかの態様において、作用物質（例えば、ペプチド）、例えば親和性タグは、細胞表面分子のN末端またはC末端部分に連結される。いくつかの態様において、作用物質は、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag（登録商標））であり、細胞表面分子は、修飾されたEGFR、例えば短縮化されたEGFRである。いくつかの態様において、作用物質は、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag（登録商標））であり、細胞表面分子は、修飾されたPSMA、例えば短縮化されたPSMAである。

10

【0106】

いくつかの態様において、提供されるコンジュゲートは、以下の構成要素：細胞表面分子（CSM）、リンカー（L）および作用物質（A）を含み、式 $CSM(L)_q(A)_m$ で表され、ここで q は0またはそれ以上であり、 m は少なくとも1であるまたは1である。いくつかの態様において、変数 q および m は、得られる細胞表面コンジュゲートが細胞上で発現され、作用物質を通じて結合分子によって検出され得、任意で、細胞表面分子のエピトープに特異的な抗体または抗原結合フラグメントによって認識されるよう選択される。いくつかの態様において、 m は1~5、例えば1~4または1~3、例えば少なくとも1、2、3、4もしくは5、または少なくとも約1、2、3、4もしくは5、または約1、2、3、4もしくは5、または1、2、3、4もしくは5である。いくつかの態様において、 q は0~5であり、連結される作用物質の数に依存し得る。いくつかの態様において、数個のリンカーが順に接続され得る。

20

【0107】

いくつかの局面において、少なくとも1つの作用物質は、細胞表面分子に直接的に連結される。いくつかの局面において、少なくとも1つの作用物質は、少なくとも1つのリンカーを通じて細胞表面分子に間接的に連結または接続される。いくつかの態様において、作用物質（例えば、ペプチド）、例えば親和性タグは、そのN末端またはC末端を通じて細胞表面分子に連結される。いくつかの態様において、作用物質は、細胞表面分子の膜遠位細胞外部分に連結される。いくつかの態様において、作用物質は、細胞表面分子のN末端に連結される。いくつかの態様において、作用物質は、細胞表面分子のC末端に連結される。いくつかの態様において、作用物質は、細胞表面分子の細胞外（N末端）または（C末端）部分に直接的にまたはリンカーを通じて間接的に融合された50アミノ酸未満の長さのペプチドタグである。いくつかの態様において、作用物質は、細胞表面分子の細胞外部分またはドメインに連結される。いくつかの態様において、 q は0であり、 m は1であり、作用物質は細胞表面分子のN末端に直接的に連結される。いくつかの態様において、提供されるコンジュゲートは、融合タンパク質、例えば細胞表面分子、リンカーまたは作用物質の1つまたは複数を含む構成要素を含む融合タンパク質であるまたはそのような融合タンパク質を含む。

30

40

【0108】

いくつかの局面において、リンカーは、切断可能または非切断可能であり得るペプチド、ポリペプチドまたは化学リンカーであり得る。いくつかの局面において、リンカーは、ペプチド、例えばポリペプチド配列に接続する短いアミノ酸配列を含むペプチド（またはそのようなアミノ酸配列をコードする核酸）である。いくつかの態様において、リンカー

50

は、細胞表面分子に対する作用物質の接近により引き起こされ得る立体障害を軽減もしくは減少させるおよび/またはコンジュゲートの1つもしくは複数の特性、例えば発現、特異性もしくは免疫原性を増加もしくは変化させるものである。いくつかの態様において、連結またはコンジュゲートは、組換え法によってもたらされ得る。いくつかの態様において、リンカーは、ペプチドまたはポリペプチドであり、提供されるコンジュゲートは融合タンパク質である。

【0109】

融合タンパク質は、ペプチドまたはポリペプチド作用物質、例えば親和性タグ、例えばストレプトアビジン結合ペプチドに直接的または間接的に連結される、細胞表面タンパク質である細胞表面分子、例えば記載される任意のものを含み得る。融合タンパク質をコードする核酸配列は、その核酸配列が2つまたはそれ以上のタンパク質、いくつかの例において2、3、4、5またはそれ以上のタンパク質のコード配列を含むよう、細胞表面タンパク質および少なくとも1つのペプチドまたはポリペプチド作用物質のコード配列を含み得る。いくつかの態様において、コード配列の各々は、その融合タンパク質が宿主細胞内で転写および翻訳されたときに、細胞表面タンパク質および少なくとも1つのペプチドまたはポリペプチド作用物質、例えばストレプトアビジン結合ペプチドを含むタンパク質が生成されるよう、同一リーディングフレーム内に存在する。いくつかの局面において、2つまたはそれ以上のタンパク質の各々は、その構築物内で別のタンパク質と隣接し得るまたは1、2、3もしくはそれ以上であるが、典型的には20、15、10、9、8、7もしくは6アミノ酸未満のアミノ酸を含むリンカーポリペプチド、例えばペプチドリンカーによって隔てられ得る。

10

20

【0110】

例示的なペプチドリンカーは、いくつかの例において可溶性を向上させるよう全体に分散されたいくつかのGluまたはLys残基を含み得る、(Gly Ser)_nアミノ酸配列を含む。リンカーの長さは、作用物質に対する結合分子のアクセス性を確保するようおよびコンジュゲートの細胞表面分子に対する抗体または抗原結合フラグメント（または他の結合分子）のアクセス性を確保するようより長くまたはより短く調整され得る。いくつかの態様において、リンカーは、

GGGSGGGG (SEQ ID NO:59); GGGGS (SEQ ID NO:60); GGGS (SEQ ID

NO:61); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:62); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID

NO:55); GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)

に示される任意のものである。いくつかの態様において、リンカーは、切断可能なリンカーである。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、Phe Leuリンカー、Gly Phe Leu Glyリンカー (SEQ ID NO:99)、(SEQ ID NO:98に示される) Pro Leu Gly Leu Trp Alaリンカー、Val CitリンカーまたはPhe Lysリンカーを含む（例えば、米国特許第6,214,345号を参照のこと）。

【0111】

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートは、非免疫原性である。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートは、免疫原性エピトープを含まないおよび/または免疫応答によって認識されないもしくは動物において検出可能な免疫応答、例えば液性もしくは細胞性免疫を誘導、誘起もしくは開始することができない。細胞性免疫応答は、例えば、T細胞応答、例えば、T細胞増殖、リンホカイン分泌、細胞傷害性応答、局所的炎症反応および/またはさらなる免疫細胞の動員を含む。液性応答は、例えば、免疫原性エピトープに対する抗体の産生をもたらすB細胞の活性化を含む。免疫応答、例えば液性または細胞性免疫応答を誘導または誘起する細胞表面コンジュゲートを発現する細胞の能力は、対象へのそのような細胞の投与後に評価され得る。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートの結合性エピトープに特異的に結合するおよび/または該エピトープを中和する抗体の存在は、対象由来の血清において、ELISpot、細胞内サイトカイン染色、ELISA（例えば、サイトカイン用）または細胞に基づく抗体検出法等の方法によって、例え

40

50

ばフローサイトメトリーによって同定され得る。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートに対する細胞性免疫応答は、特異的に結合し細胞傷害性を誘導するCD8+ T細胞の検出のための細胞傷害性Tリンパ球(CTL)アッセイ、および/または刺激細胞として、細胞表面コンジュゲートを発現する細胞、例えば照射した細胞を用いる混合リンパ球反応を用いて評価され得る。

【0112】

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートをコードするポリヌクレオチドはまた、例えば、細胞膜へのコンジュゲートの挿入のために発現されたタンパク質に分泌経路を標的とさせるために、シグナルペプチドをコードするシグナル配列を含む。いくつかの局面において、シグナルペプチドは、約5~30アミノ酸長であり、コードされるコンジュゲートのN末端に存在する。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、N末端からC末端への順に、シグナルペプチド、作用物質(例えば、親和性タグ、例えばストレプトアビジン結合ペプチド)および細胞表面分子(例えば、修飾された細胞表面分子、例えばEGFRt)を含むコンジュゲートをコードする。いくつかの態様において、シグナルペプチドは、参照細胞表面分子の天然シグナルペプチド(例えば、SEQ ID NO:64~69のいずれかに示される配列に含まれる天然シグナルペプチド)である。いくつかの態様において、シグナルペプチドは、異種または非天然シグナルペプチド、例えば、いくつかの例においてSEQ ID NO:47に示されるヌクレオチドによってコードされる、SEQ ID NO:48に示されるGMCSFRアルファ鎖シグナルペプチドである。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、N末端からC末端への順に、細胞表面分子(例えば、PSMA)または修飾された細胞表面分子(例えば、tPSMA)および作用物質(例えば、親和性タグ、例えばストレプトアビジン結合ペプチド)を含むコンジュゲートをコードする。

【0113】

A. 細胞表面分子、例えば修飾された細胞表面分子

いくつかの態様において、コンジュゲートの細胞表面分子は、少なくとも1つの細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞表面分子は、細胞の表面上で発現させることができる。いくつかの態様において、細胞表面分子は、細胞表面受容体、リガンド、糖タンパク質、細胞接着分子、抗原、インテグリンもしくは分化クラスター(CD)であるまたはそれらの修飾形態である。いくつかの態様において、細胞表面分子は、キメラ抗原受容体ではない。いくつかの態様において、細胞表面分子は、参照細胞接着分子と比較して変化した修飾された細胞表面分子である。いくつかの例において、修飾された細胞表面分子は、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない。

【0114】

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートの細胞表面分子は、参照細胞接着分子と比較して変化した修飾された細胞表面分子を含む。いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、細胞表面受容体、リガンド、糖タンパク質、細胞接着分子、抗原、インテグリンまたは分化クラスター(CD)である。いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、細胞表面受容体である。いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、天然の哺乳動物細胞表面分子、例えば天然の哺乳動物細胞表面受容体である。いくつかの例において、細胞表面分子は、天然のヒト膜タンパク質である。

【0115】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、細胞外ドメインまたは抗体もしくはその抗原結合フラグメントによって認識される1つもしくは複数のエピトープを含む領域を含むものであり得る。抗体または抗原結合フラグメントは、インタクトな抗体および、抗原結合フラグメント(Fab)フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、Fvフラグメント、組換えIgG(rIgG)フラグメント、抗原に特異的に結合することができる可変重鎖(V_H)領域、単鎖可変フラグメント(scFv)を含む単鎖抗体フラグメントおよび単一ドメイン抗体(例えば、sdAb、sdFv、ナノボディ)フラグメントを含む機能的な(抗原結合性の)抗体フラグメントを含むポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含み得

る。抗体またはその抗原結合フラグメントは、IgGおよびそのサブクラス、IgM、IgE、IgAならびにIgDを含む任意のクラスもしくはサブクラスの抗体を含むインタクトもしくは全長抗体、または全長抗体の一部もしくはフラグメントを含み得る。いくつかの局面において、抗体は、臨床的に承認されている抗体またはその抗原結合フラグメントである。いくつかの局面において、1つまたは複数のエピトープは、分子またはタンパク質の連続または非連続配列を含み得る。いくつかの局面において、1つまたは複数のエピトープは、参照細胞表面分子が抗体または抗原結合フラグメントによって認識、同定または検出され得るよう、参照細胞表面分子の細胞外部分または領域に存在する。

【0116】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子の細胞外ドメインはまた、いくつかの例において、結合パートナー、抗原、基質またはリガンドに特異的に結合することができる結合ドメインを含む。そのような態様において、特に提供される細胞表面分子は、その通常と同族結合パートナー、抗原、基質またはリガンドに結合する修飾された細胞表面分子の能力がその結合パートナー、抗原、基質またはリガンドに対する参照細胞表面分子の結合と比較して減少するよう、そのような結合ドメインが修飾されているまたは変化している、例えば変異または欠失されている修飾された細胞表面分子である。いくつかの例において、変化した結合は、40%超もしくは約40%超、50%超もしくは約50%超、60%超もしくは約60%超、70%超もしくは約70%超、80%超もしくは約80%超、90%超もしくは約90%超またはそれ以上減少している。

【0117】

いくつかの態様において、細胞表面分子は、膜タンパク質または膜統合タンパク質である。いくつかの態様において、細胞表面分子は、膜貫通ドメインを含む。いくつかの局面において、細胞表面分子は、I型、II型、III型またはIV型膜タンパク質である。いくつかの局面において、I型タンパク質は、単一の、疎水性残基の膜貫通ストレットを有し、その膜貫通ドメインのアミノ(N)末端側のポリペプチドの部分が膜の外側に露出し、カルボキシ(C)末端部分が細胞質側に露出している。いくつかの局面において、I型膜タンパク質は、Ia型(切断可能なシグナル配列を有する)およびIb型(切断可能なシグナル配列を有さない)に細分類される。いくつかの局面において、II型膜タンパク質は、膜を1回のみ横断するが、それらは、それらのアミノ末端を細胞の細胞質側に、カルボキシ末端を外側に有する。いくつかの局面において、III型膜タンパク質は、単一のポリペプチド鎖内に複数の膜貫通ドメインを有し、IIIa型タンパク質(切断可能なシグナル配列を有する)およびIIIb型(アミノ末端が膜の外側表面に露出しているが、切断可能なシグナル配列を有さない)に細分類され得る。いくつかの局面において、IV型タンパク質は、膜を複数回横断する集合体を構成する複数の相同なドメインを有し、そのドメインは単一のポリペプチド鎖または1つもしくは複数の異なるポリペプチド鎖上に存在する。

【0118】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子はさらに、細胞内(または細胞質)領域またはドメイン、すなわち、細胞の内側におよび/または細胞の細胞質側に存在する1つまたは複数の連続するアミノ酸の領域を含む。いくつかの例において、参照細胞表面分子の細胞内領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを含むならびに/または細胞のシグナル伝達経路を直接的もしくは間接的に調整することによって細胞内シグナルを、および/もしくは下流の応答、機能もしくは活性、例えば遺伝子およびタンパク質の発現、分子の細胞内位置の変化、細胞内トラフィック、タンパク質-タンパク質相互作用の変化、受容体の内在化、細胞の分化、増殖および/もしくは生存を媒介することができる。

【0119】

いくつかの態様において、例えば参照細胞表面分子の細胞質尾部に存在するまたは細胞質尾部を含む細胞内シグナル伝達領域またはドメインは、細胞内のシグナル伝達経路または下流プロセスにおいて分子または細胞シグナルに応じて、例えば活性化されたまたはその同族抗原もしくはリガンドに露出されたときに、リン酸化され得るおよび/または1つもしくは複数のアダプタータンパク質と相互作用することができる1つまたは複数のモチ

ーフまたは残基を含む。いくつかの態様において、モチーフは、チロシンベースのモチーフ（例えば、YXX0、ここでYはチロシンであり、Xは任意のアミノ酸であり、0はかさ高い疎水性基を有するアミノ酸である）もしくはジロイシンベースのモチーフ（例えば、LL）であるまたはそれを含む。いくつかの局面において、参照細胞表面分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、I型膜タンパク質のC末端にもしくはその付近にまたはII型膜タンパク質のN末端にもしくはその付近に存在し得る。そのような態様において、特に提供される細胞表面分子は、細胞のシグナル伝達経路および/または下流の応答、機能もしくは活性を調整する修飾された細胞表面分子の能力が低下するまたは妨げられるよう、そのような細胞内領域またはドメインのアミノ酸残基が、例えば1つまたは複数の置換、欠失、短縮および/または挿入によって、修飾されているまたは変化している、例えば変異している修飾された細胞表面分子である。いくつかの例において、変化したシグナルおよび/または下流の応答、機能もしくは活性は、参照細胞表面分子のそのようなシグナルおよび/または下流の応答、機能もしくは活性と比較して、40%超もしくは約40%超、50%超もしくは約50%超、60%超もしくは約60%超、70%超もしくは約70%超、80%超もしくは約80%超、90%超もしくは約90%超、またはそれ以上減少している。

【0120】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）によって標的とされる抗原、例えば細胞表面発現抗原と相違するおよび/または同一でない。いくつかの態様において、参照細胞表面分子またはその修飾形態は、組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）のリガンドまたは抗原結合ドメインによって特異的に結合および/または認識されない。

【0121】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、細胞表面タンパク質および/または受容体であるまたはそれを含む。いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、EpCAM、V EGFR、インテグリン（例えば、インテグリン α 3、 α 4、 α IIb 3、 α 4 7、 α 5 1、 α v 3、 α v）、TNF受容体スーパーファミリー（例えば、TRAIL R1、TRAIL R2）、PDGF受容体、インターフェロン受容体、葉酸受容体、GPNMB、ICAM 1、HLA DR、CEA、CA 125、MUC1、TAG 72、IL 6受容体、5T4、GD2、GD3、前立腺特異的膜抗原（PSMA）または分化クラスター（例えば、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA 1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/バシジン、CD152/CTLA 4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7）である。

【0122】

適当な参照細胞表面分子、例えば修飾のための細胞表面分子は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8,802,374号に記載されるそれらを含む。いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）、erbB 2受容体チロシンタンパク質キナーゼ、erbB 3受容体チロシンタンパク質キナーゼ、erbB 4受容体チロシンタンパク質キナーゼ、肝細胞成長因子受容体（HGFR/c MET）またはインスリン様成長因子受容体 1（IGFR 1）である。いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、SEQ ID NO:49~54のいずれかに示されるアミノ酸の配列またはSEQ ID NO:49~54のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

【0123】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、3F8、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アデカツムマブ、アフツズマブ、アレムツズマブ、アルツモマブペンテタート、アナツモマブマフェナトックス、アポリズマブ、アルシツモマブ、アセリズマブ、アトリズマブ（=トシリズマブ）、バシリキシマブ、ベクツモマブ、ベンラリズマブ、ベシレソマブ、ピバツズマブメルタンシン、プリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、カンツズマブ

メルタンシン、カプロマブペンデチド、カツマキソマブ、CC49、セデリズマブ、セルモロイキン、シタツズマブボガトックス、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CNT0 95、コナツムマブ、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デツモマブ、エクロメキシマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エロツズマブ、エンリモマブペゴル、エピツモマブシツキセタン、エプラツズマブ、エルリズマブ、エタラシズマブ、ファノレソマブ、ファラリモマブ、ファルレツズマブ、ガリキシマブ、ガビリモマブ、ゲムツズマブオゾガミシン、グレムバツムマブベドチン、ゴミリキシマブ、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ、インテツムマブ、イラツムマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガミシン、イピリムマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ、リンツズマブ、レキサツムマブ、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マバツムマブ、マスリモマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミツモマブ、ムロモナブ CD3、ナブツモマブエスタフエナトックス、ナタリズマブ、オクレリズマブ、オツリモマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オボルツズマブモナトックス、オレゴボマブ、オテリキシズマブ、ペムツモマブ、プリリキシマブ、PRO 140、リツキシマブ、ロベリズマブ、ルプリズマブ、サツモマブペンデチド、シプリズマブ、ソソツズマブ、タドシズマブ、タブリツモマブパブトックス、テネリキシマブ、テプリズマブ、TGN1412、チシリムマブ (=トレメリムマブ)、チガツズマブ、トシリズマブ (=アトリズマブ)、トラリズマブ、トシツモマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブ、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ビシリズマブ、ビタキシマブ、ボロシキシマブ、ボツムマブ、ザノリムマブ、ジラリムマブ、ゾリモマブアリトックス、アテゾリズマブ、ベバシズマブ (アバスチン (登録商標))、デノスマブ、ジヌツキシマブ、ニボルマブ、オビヌツズマブ、ペムプロリズマブ、ピジリズマブ (CT 011)、ラムシルマブ、シルツキシマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、CEA scan Fabフラグメント、OC125モノクローナル抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C、MEDI4736またはそれらの抗原結合フラグメント、類似体もしくは誘導体、またはFabフラグメント、Fab'フラグメントF(ab)'₂フラグメント、単鎖Fv (scFv) もしくはジスルフィド安定化Fv (dsFv) から選択される抗原結合性抗体フラグメントを含むがこれらに限定されない抗体によって認識されるエピトープを含むものであり得る。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、上記抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれかによって認識されるエピトープを含む。

10

20

【0124】

30

いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) である。PSMAは、短い細胞質アミノ末端、単一の膜横断ドメインおよび大きな細胞外ドメインを含む、II型膜貫通タンパク質である。PSMAは、共触媒性メタロペプチダーゼを含むペプチダーゼファミリーM28タンパク質に対する類似性を示すアミノ酸の配列を含む。野生型、全長ヒトPSMAは、19アミノ酸残基の細胞内部分、24アミノ酸残基の膜貫通部分および707アミノ酸残基の細胞外部分を含む750アミノ酸タンパク質である。ヒトにおいて、PSMAは、例えばGenBankアクセッション番号DD461260に記載される (SEQ ID NO:96に示される) FOLH1遺伝子、ならびにそのアイソフォームおよび変種によってコードされる。例示的なヒトPSMAアミノ酸配列は、例えば、UniProtアクセッション番号Q04609に示される (SEQ ID NO:94に示される)。

40

【0125】

いくつかの例において、PSMAの細胞外部分は、3つの特徴的な構造的・機能的ドメイン：野生型ヒトPSMA配列、例えばSEQ ID NO:94に示されるアミノ酸配列における位置を参照して、プロテアーゼドメイン (残基56~116および352~590)、頂端ドメイン (残基117~351) ならびにC末端せんどもドメイン (残基592~750)、に折りたたまれる (例えば、Davis et al., (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. 102(17): 5981 5986; Mesters et al., (2006) EMBO Journal 25: 1375 1384を参照のこと)。

【0126】

いくつかの例において、PSMAは、酵素または触媒活性を有する。いくつかの局面において、PSMA内の特定のドメインおよび/または残基が、酵素または触媒活性に關与する。PS

50

MAは、一般に、二核亜鉛部位を含み、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼまたは葉酸ヒドロラーゼとして作用し、ポリグルタミン酸化葉酸からのグルタミン酸の加水分解的切断を触媒し得る。PSMAはまた、Nアセチル化アルファ連結酸性ジペプチダーゼ (NAALADase) 活性およびジペプチジルペプチダーゼIV型活性を有する。その酵素部位は、2つの亜鉛イオンを含み、グルタミン酸検知ポケット (S1'ポケット) および非ファーマコフォアポケット (S1ポケット) の2つのポケットから構成される。これらの3つのドメインのアミノ酸残基は、一般に、基質認識、結合および/または触媒活性に関与する。いくつかの例において、PSMAにおいて基質結合および/または触媒活性に関与する活性部位残基および/または残基群は、野生型ヒトPSMA配列、例えばSEQ ID NO:94に示されるアミノ酸配列の位置でいう210、257、269、272、377、387、387、424、424、425、433、436、453、517、518、519、552、553、534、535、536、552、553、628、666、689、699および/または700位のアミノ酸残基を含む。いくつかの例において、活性部位残基は、活性亜鉛イオンを配位する1つまたは複数の残基、例えば、例示的なヒトPSMA配列、例えばSEQ ID NO:94に示されるアミノ酸配列の位置でいうHis377、Asp387、Glu425、Asp453および/またはHis553に対応する1つまたは複数の残基を含む。いくつかの態様において、PSMAのNアセチル化アルファ連結酸性ジペプチダーゼ (NAALADase) ドメインはまた、例示的なヒトPSMA配列、例えばSEQ ID NO:94に示されるアミノ酸配列の位置でいうアミノ酸残基274~587を含むものとして定義され得る (Speno et al., (1999) *Molecular Pharmacology* 55:179-185)。

10

【0127】

20

いくつかの局面において、PSMAの細胞内 (N末端) 部分は、細胞内在化、例えばその分子のクラスリン依存エンドサイトーシス内在化に関与するアミノ酸残基を含む。いくつかの局面において、細胞内在化は、N末端アミノ酸、例えばSEQ ID NO:94に示される例示的なヒトPSMAアミノ酸配列の1~5位のアミノ酸残基 (例えば、MWNLL; 例えば、Rajasekaran et al. (2003) *Mol. Biol. Cell.* 14: 4835-4845を参照のこと) により媒介される。いくつかの局面において、PSMAの細胞内部分は、細胞内のシグナル伝達経路または下流プロセスにおいて、例えばその分子の内在化のための、分子または細胞シグナルに応じて、リン酸化され得るおよび/または1つもしくは複数のアダプタータンパク質と相互作用することができるモチーフまたは残基を含む。いくつかの態様において、例示的なモチーフは、ジロイシンベースのモチーフ (例えば、LL) を含む。

30

【0128】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、PSMA、例えば哺乳動物PSMA、例えばヒトPSMAである。いくつかの態様において、参照表面分子は、野生型PSMA、任意で野生型ヒトPSMA、またはその対立遺伝子変種もしくはその他の変種、例えばその選択的アイソフォームもしくはフラグメントである。いくつかの態様において、PSMAは、全長PSMAである。いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、SEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列またはSEQ ID NO:94に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、PSMAは、SEQ ID NO:94に示される配列を含むまたはSEQ ID NO:94に示される配列から本質的になる。

40

【0129】

いくつかの態様において、PSMAは、SEQ ID NO:96に示される核酸配列またはSEQ ID NO:96に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくはそれ以上の配列同一性を示す核酸配列によってコードされる。いくつかの態様において、PSMAは、修飾された核酸配列、例えばCpG非含有であるよう修飾されたおよび/またはコドン最適化された核酸配列によってコードされる。いくつかの態様にお

50

いて、修飾された核酸配列は、ヒト細胞における発現に関してコドン最適化される。いくつかの局面において、コドン最適化は、過剰または限定的とならないよう、公開されているヒトトランスファーRNAの量を用いて選択されたコドンの比率を調整することを含む。いくつかの態様において、PSMAをコードするCpG非含有核酸配列は、CpG配列を含まない修飾されたcDNA配列であるまたはそれを含む。いくつかの局面において、CpG非含有核酸および/またはコドン最適化配列は、野生型または未修飾のPSMAと比較してタンパク質配列を変化させない。いくつかの態様において、参照PSMAは、SEQ ID NO:97に示される核酸配列によってコードされる。いくつかの局面において、CpG非含有PSMAによってコードされるPSMAは、SEQ ID NO:94に示されるタンパク質配列に対して相当のパーセント同一性を有する。

10

【 0 1 3 0 】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子は、J591、DF0 J591、CYT 356、J415、3/A 12、3/F11、3/E7、D2B、107 1A4、YPSMA 1、YPSMA 2、3E6、2G7、24.4E6、GCP 02、GCP 0 4、GCP 05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7 Fc、D7 CH3、4D4、A5またはその抗原結合フラグメント、類似体もしくは誘導体、またはFabフラグメント、Fab'フラグメントF(ab)'2フラグメント、単鎖Fv(scFv)もしくはジスルフィド安定化Fv(dsFv)から選択される抗原結合性抗体フラグメントを含むがこれらに限定されない、抗体またはその抗原結合フラグメントによって認識されるエピトープを含むPSMAである。いくつかの態様において、例示的な抗体またはその抗原結合フラグメントは、例えば、US 2002/0049712; US 20 02/0147312; US 2003/0082187; US 2004/0136998; US 2005/0202020; US 2006/0088539; US 2007/0071759; US 2010/0297653; US 2011/0020273; US 2013/0225541; US 2013/0315 830; US 2014/0099257; US 2014/0227180; US 2015/0168413; US 2016/0303253; US 2017 /0051074; US 6572856; US 7476513; US 8470330; US 8986655; WO 2006/078892; WO 201 0/135431; WO 2014/198223; WO 2015/177360; WO 2016/057917; WO 2016/130819; WO 201 6/145139; WO 2016/201300; WO 2017/004144; WO 2017/023761; AU 2002/356844; AU 200 6/204913; AU 2006/235421; AU 2006/262231; AU 2006/315500; AU 2010/325969; AU 201 3/328619; AU 2015/205574; CA 2353267; EP 1390069; EP 1520588; EP 1581794; EP 159 9228; EP 1610818; EP 2906250; Banerjee et al. (2011) *Angew Chem Int Ed Engl.* 50(39): 9167 9170; Maurer et al. (2016) *Nature Reviews Urology* 13:226 235; Rowe et al. (2016) *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 19(3):223 230; Mease et al., (2013) *Cu rrr Top Med Chem.* 13(8):951 962; Osborne et al., (2013) *Urol Oncol.* 31(2): 144 15 4; Philipp Wolf (2011), *Prostate Specific Membrane Antigen as Biomarker and Ther apeutic Target for Prostate Cancer, Prostate Cancer Diagnostic and Therapeutic A dvances*, Dr. Philippe E. Spiess (Ed.), Intech, pp.81 100; Ruggiero et al., (2011) *J Nucl Med.* 52(10): 1608 1615; Liu et al., (1997) *Cancer Research* 57:3629 3634 ; Regino et al., (2009) *Curr Radiopharm.* January ; 2(1): 9 17; Kampmeier et al. (2014) *EJNMMI Research* 4: 13; Wolf et al., (2010) *The Prostate* 70:562 569; Tykva rt et al. (2014) *The Prostate* 74: 1674 1690; Jin et al., (2016) *EMJ Urol.* 4(1):6 2 69 and Tino et al. (2000) *Hybridoma* 19(3):24957に記載されるもの、またはそのフ ラグメント、そのコンジュゲートもしくはその誘導体を含む。

20

30

40

【 0 1 3 1 】

1. 例示的な修飾された細胞表面分子

いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子と比較して1つまたは複数のアミノ酸修飾、例えば1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失および/または挿入を含む。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子、例えば修飾された細胞表面受容体は、任意のシグナルおよび/またはトラフィックドメインを除去するよう修飾される。いくつかの例において、修飾された細胞表面分子は、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子、例えば修飾された細胞表面受容体は、野生型または未修飾の細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、細胞トラフィ

50

ック、酵素活性および/またはリガンド結合を示す。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、その細胞表面分子に特異的な結合分子、例えば抗体もしくはその抗原結合フラグメントおよび/またはその細胞表面分子に結合することができるリガンドによって認識および/または結合されるエピトープを含むおよび/または保持する。

【0132】

いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸修飾、例えば短縮を含む1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失および/または挿入は、細胞表面分子の細胞内（例えば、細胞質）および/または細胞外部分の1つまたは複数に存在し得る。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、例えば参照細胞表面分子のC末端またはN末端アミノ酸残基の連続配列の連続欠失、例えば参照細胞表面分子の50～800または約50～800アミノ酸、例えば50～600、例えば少なくとも50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600もしくは少なくとも約50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600またはそれ以上の連続アミノ酸の欠失によって、短縮化されたものである。いくつかの局面において、修飾された細胞表面分子は、例えば、例えばI型膜タンパク質のC末端部分またはII型膜タンパク質のN末端部分に存在する、そのタンパク質の細胞内（例えば、細胞質）部分の連続アミノ酸残基の欠失によって、短縮化されたものである。いくつかの局面において、修飾された細胞表面分子は、例えば、例えばI型膜タンパク質のN末端部分またはII型膜タンパク質のC末端部分に存在する、そのタンパク質の細胞外ドメインの連続アミノ酸残基の欠失によって、短縮化されたものである。

【0133】

いくつかの態様において、細胞表面分子は、1つまたは複数の細胞外ドメインまたは領域を含み、修飾は、その細胞表面分子の細胞外部分にある。いくつかの局面において、細胞表面分子の細胞外部分の例示的な修飾は、エピトープ結合、酵素活性および/もしくはリガンド結合ならびに/またはシグナル伝達もしくは機能に關与するドメインまたは領域を除去し得る。いくつかの局面において、細胞表面分子の細胞外部分の例示的な修飾は、その細胞表面分子に特異的な結合分子、例えば抗体もしくはその抗原結合フラグメントおよび/または細胞表面分子に結合することができるリガンドによって認識および/または結合される1つまたは複数のエピトープを含むおよび/または保持する。いくつかの局面において、細胞表面分子の細胞外部分の例示的な修飾は、参照細胞表面分子と比較して変化した酵素活性および/またはリガンド結合を示す修飾された細胞表面分子を生成する。

【0134】

いくつかの態様において、細胞表面分子は、1つまたは複数の細胞内および/または細胞質ドメインまたは領域を含み、修飾は、細胞表面分子の細胞内（例えば、細胞質）部分に存在する。いくつかの局面において、細胞表面分子の細胞内（例えば、細胞質）部分の修飾、例えば置換、欠失、短縮および/または挿入は、細胞シグナルの誘起、伝達、活性化、阻害および/もしくは伝送ならびに/または下流活性もしくは機能、例えば遺伝子およびタンパク質発現、分子の細胞内位置の変化、細胞内トラフィック、タンパク質タンパク質相互作用の変化、受容体内在化、細胞分化、増殖および/もしくは生存に關与するドメインまたは領域を除去し得る。いくつかの局面において、細胞表面分子の細胞内（例えば、細胞質）部分の修飾は、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しおよび/もしくは細胞内シグナル伝達を媒介することができずならびに/または変化した機能もしくは活性、例えば変化した細胞内在化および/もしくは細胞トラフィックを示す、修飾された細胞表面分子を生成する。いくつかの態様において、参照細胞表面分子の細胞表面分子に關連する細胞シグナルならびに/または調節もしくは調整活性および/もしくは機能を誘起、伝達、活性化、阻害および/または伝送する修飾された細胞表面分子の能力は、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%超もしくは約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%超またはそれ以上減少する。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子、例えば修飾された細胞表面受容体は、不活性状態である、例えば細胞内シグナルを誘起または伝達することができない。

【0135】

いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面の膜貫通ドメインおよび参照細胞表面分子の少なくとも1つの細胞外ドメインを保持する。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、SEQ ID NO:49~54または94のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含むが、それぞれ、SEQ ID NO:49~54または94のいずれかの細胞質ドメインに対応するアミノ酸残基を欠如している、例えばそれが短縮または欠失している。

【0136】

いくつかの態様において、参照細胞表面分子の天然リガンドに結合する提供されるコンジュゲートの修飾された細胞表面分子の能力は、変更される。例えば、いくつかの態様において、参照細胞表面分子の天然リガンドに結合する修飾された細胞表面分子の能力は、減少または減弱化される。いくつかの態様において、細胞表面分子は、参照細胞表面分子の少なくとも1つの細胞外ドメインを含むが、参照細胞表面分子の天然リガンドにより認識される1つまたは複数の他の細胞外ドメインを欠如するよう修飾される。いくつかの態様において、参照細胞表面分子のリガンドに対する修飾された細胞表面分子の結合は、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%超もしくは約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%超またはそれ以上減少する。

【0137】

いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子、例えば修飾された細胞表面受容体は、既知の抗体またはその機能的フラグメントによって認識される細胞外エピトープを含む結合ドメインを保持するよう、参照細胞表面分子と比較して修飾または短縮化されている。したがって、いくつかの態様において、そのような細胞表面分子の修飾は、既知の抗体またはその機能的フラグメントによって認識される細胞外ドメインに存在するエピトープを維持し、任意のシグナルもしくはトラフィックドメインおよび/または既知の抗体によって認識されない任意の細胞外ドメインを除去することによって達成される。修飾された細胞表面分子は、上記の例示的な抗体および抗原結合フラグメントの1つまたは複数に対する結合性を保持する、例えば参照細胞表面分子と同一または同様の結合性を示す記載される任意の修飾された細胞表面分子を含み得る。

【0138】

いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、修飾または短縮化されたチロシンキナーゼ受容体である。本明細書に記載される態様にしたがって修飾され得るチロシンキナーゼ受容体の例は、内皮成長因子受容体ファミリーのメンバー（EGRF/ErbB1/HER1; ErbB2/HER2/neu; ErbB3/HER3; ErbB4/HER4）、肝細胞成長因子受容体（HGFR/c Met）およびインスリン様成長因子受容体1（IGF1R）を含むがこれらに限定されない。いくつかの態様にしたがって、提供される細胞表面コンジュゲートは、既知の抗体またはその機能的フラグメントによって認識される細胞外エピトープを保持し、細胞質ドメインまたは少なくともチロシンキナーゼドメインを含むその機能的タンパク質を欠如している修飾されたチロシンキナーゼ受容体を含む。少なくともチロシンキナーゼドメインを欠如している修飾されたチロシンキナーゼ受容体は、その受容体を不活性化する。修飾されたチロシンキナーゼ受容体を認識するのに使用され得る市販の抗体は、AMG 102、AMG 479、BIIB0220A 5D5、CP 751,871、IMC A12、R1507、セツキシマブ、シクスツムマブ、エルツマキシマブ、フィギツムマブ、マツズマブ、ネシツムマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ニモツズマブ、ロバツムマブ、トラスツズマブ、ザルツムマブを含むがこれらに限定されない。

【0139】

いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、修飾された前立腺特異的膜抗原（PSMA）である。修飾されたチロシンキナーゼ受容体を認識するのに使用され得る抗体は、J591、DF0 J591、CYT 356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107 1A4、YPSMA 1、YPSM A 2、3E6、2G7、24.4E6、GCP 02、GCP 04、GCP 05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D 7 Fc、D7 CH3、4D4およびA5を含むがこれらに限定されない。

【0140】

細胞表面コンジュゲートの例示的な細胞表面分子の非限定的な例は、表1に示されている。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 1 】

いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、SEQ ID NO:49～54または94のいずれかに示されるアミノ酸の配列を有する参照細胞表面分子と比較して修飾され、修飾された参照表面分子は少なくとも、参照細胞表面分子の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインの一部を含むが、そのような参照細胞表面分子の細胞質ドメインに対応するアミノ酸残基を欠如している、例えば短縮または欠失している。いくつかの態様において、そのような修飾された細胞表面分子はまた、その細胞表面分子の天然リガンド、例えば表1に示される天然リガンドに対する結合のための1つまたは複数の細胞外リガンド結合ドメインを欠如している。いくつかの態様において、そのような修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子の天然リガンドに対する減少した（例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%超またはそれ以上減少した）結合性を示す。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、参照細胞表面分子に特異的な既知の抗体に対するエピトープ、例えば、表1に示されるまたは本明細書に、例えば第II.A節に記載される抗体のエピトープを含む少なくとも1つの細胞外ドメインを保持している。

10

【 0 1 4 2 】

(表1) 例示的な細胞表面分子

参照細胞表面分子	SEQ ID NO		天然リガンド	抗体
	前駆体	成熟体		
HER1/ErbB1/EGFR	64	49	EGF、ベータセルリン、TGF α 、HB-EGF、アンフィレギュリン、エプレギュリン、エピジェン	セツキシマブ、パニツムマブ、マツズマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ザルツムマブ
HER2/neu/ErbB2	65	50	単独でリガンド結合活性なし (HER4と共に) ニューレグリン EGFRと共にEGF	トラスツズマブ、2C4、エルツマキソマブ、ベルツズマブ
HER3/ErbB3	66	51	ハーギュリン (hergulin) (NRG-1), NRG-2	パトリツマブ
HER4/ErbB4	67	52	NRG-2、NRG-3、ヘパリン結合EGF様成長因子、ベータセルリン	
HGFR/c-Met	68	53	HGF	DN30/ OA-5D5/ AMG 102/ エミベツズマブ
IGF-1 R	69	54	IGF-1、インスリン	CP-751,871、フィギツムマブ、シクスツムマブ、ダロツズマブ、ガニツマブ、R1507
PSMA WT (全長)		94	天然基質:N-アセチルアスパルチルグルタミン酸 (NAAG)、トリ-アルファ-グルタミン酸ペプチドおよびポリ- γ -グルタミル葉酸	J591, DFO-J591, CYT-356, J415, 3/A12, 3/F11, 3/E7, D2B, 107-1A4, YPSMA-1, YPSMA-2, 3E6, 2G7, 24.4E6, GCP-02, GCP-04, GCP-05, J533, E99, 1G9, 3C6, 4.40, 026, D7-Fc, D7-CH3, 4D4, A5

【 0 1 4 3 】

a. 修飾されたEGFR、例えば短縮化されたEGFR

いくつかの態様において、細胞表面分子は、参照EGFR、例えば参照ヒトEGFR、例えばSEQ ID NO:64に示される参照EGFRまたはSEQ ID NO:49に示される成熟配列と比較して修飾されたまたは変化した修飾されたEGFRである。参照天然EGFRの構造は、4つの細胞外ドメイン（ドメインI～IV、それぞれ、SEQ ID NO:64の残基35～206、207～333、334～499および500～645に対応）、膜貫通ドメイン（SEQ ID NO:64の残基646～668に対応）、EGFR膜近傍ドメイン（SEQ ID NO:64の残基669～712に対応）を含む細胞質ドメイン（SEQ ID NO:64の残基669～1210に対応）およびEGFRチロシンキナーゼドメイン（SEQ ID NO:64の残基713～982に対応）を含む。

50

【0144】

1つの態様において、修飾された細胞表面分子は、膜遠位EGF結合ドメインおよびチロシンキナーゼドメインを含む細胞質シグナル尾部を欠如しているが、膜貫通ドメインおよび既知の抗体またはその機能的フラグメント（例えば、セツキシマブ、マツズマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ザルツムマブまたはパニツムマブ）によって認識される細胞外膜近位エピトープを保持している短縮化されたEGFR（tEGFR）である。いくつかの態様において、EGF結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインの非存在は、T細胞によって発現されたときに、EGFRを不活性（不能）状態にする。

【0145】

いくつかの態様において、修飾されたEGFRは、参照EGFRのドメインI、ドメインII、膜近傍ドメインおよびチロシンキナーゼドメインの1つまたは複数を欠如している。いくつかの例において、修飾されたEGFRは、参照EGFRのドメインI、ドメインII、膜近傍ドメインおよびチロシンキナーゼドメインのすべてを欠如している。いくつかの例において、修飾されたEGFRは、ドメインI、ドメインIIおよび細胞質ドメインのすべてを欠如している。そのような態様において、修飾されたEGFRは、参照EGFRのドメインIIIおよびIVを含むまたはそれらを本質的に含む。いくつかの態様において、そのような修飾されたEGFRは、既知の抗体またはその機能的フラグメントによって認識されるエピトープを保持している。

10

【0146】

いくつかの態様において、修飾されたEGFRは、SEQ ID NO:44に示されるアミノ酸の配列もしくはSEQ ID NO:46に示されるその成熟形態、またはSEQ ID NO:44もしくは46に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列に含まれるアミノ酸を含み、EGF結合ドメインを欠如し、既知の抗体によって認識されるエピトープを保持し、そのような参照EGFRの細胞質シグナル伝達ドメインのすべてまたはその機能的部分を欠如している。修飾されたEGFR上のエピトープを認識することができる結合分子の例は、FDAに承認された抗EGFRモノクローナル抗体（mAb）であるセツキシマブまたは別の抗EGFR抗体を含む。

20

【0147】

いくつかの態様において、修飾されたEGFR、例えばtEGFRは、SEQ ID NO:57に示されるヌクレオチドの配列、またはSEQ ID NO:57に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列、例えば縮重コドンを含むその配列によってコードされる。コードされる修飾されたEGFRは、表面分子または表面タンパク質としての発現のためのシグナルペプチドを含み得る。いくつかの態様において、修飾されたEGFR、例えばtEGFRは、SEQ ID NO:64に含まれる参照EGFRの天然シグナルペプチドをコードする配列を含むヌクレオチドによってコードされる。いくつかの態様において、修飾されたEGFR、例えばtEGFRは、例えばSEQ ID NO:48に示される、非天然または異種シグナルペプチドをコードする配列を含むヌクレオチドによってコードされる。いくつかの態様において、修飾されたEGFRは、SEQ ID NO:45に示されるヌクレオチドの配列またはSEQ ID NO:45に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列、例えば縮重コドンを含むその配列によってコードされる。

30

40

【0148】

b. 修飾されたHer2、例えば短縮化されたHer2

いくつかの態様において、細胞表面分子は、参照HER2/neu/ErbB2、例えば参照ヒトHER2

50

/neu/ErbB2、例えばSEQ ID NO:65に示される参照HER2/neu/ErbB2またはSEQ ID NO:50に示される成熟配列と比較して修飾されたまたは変化した修飾されたHER2/neu/ErbB2である。参照天然HER2/neu/ErbB2の構造は、細胞外ドメイン（SEQ ID NO:65の残基23～652に対応）、膜貫通ドメイン（SEQ ID NO:65の残基653～675に対応）および細胞質ドメイン（SEQ ID NO:65の残基676～1255に対応）を含む。参照天然HER2/neu/ErbB2細胞外ドメインの構造は、SEQ ID NO:50の残基1～195、196～319、320～488および489～630に対応する、それぞれ、ドメインI～IVを含む（米国特許出願公開番号US2014/0186867および米国特許第7,449,184号）。

【0149】

1つの態様において、修飾された細胞表面分子は、細胞質ドメインを欠如しているが、膜貫通ドメインおよび既知の抗体またはその機能的フラグメント（例えば、トラスツズマブ、2C4、エルツマキソマブ、ペルツズマブ）によって認識される細胞外膜近位エピトープを保持している短縮化されたHER2/neu/ErbB2（HER2t）である。いくつかの態様において、リガンド結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインの非存在は、T細胞によって発現されたときに、HER2/neu/ErbB2を不活性（不能）状態にする。

10

【0150】

いくつかの態様において、修飾されたHER2/neu/ErbB2は、参照HER2/neu/ErbB2のドメインI、ドメインIIおよびドメインIIIの1つまたは複数を欠如している。いくつかの例において、修飾されたHER2/neu/ErbB2は、参照HER2/neu/ErbB2の細胞外ドメインのすべてを欠如している。いくつかの例において、修飾されたHER2/neu/ErbB2は、細胞外および細胞質ドメインのすべてを欠如している。そのような態様において、修飾されたHER2/neu/ErbB2は、参照HER2/neu/ErbB2の、保持されているドメインIVおよび膜貫通ドメインを含むまたはそれらを実質的に含む。いくつかの態様において、そのような修飾されたHER2/neu/ErbB2は、既知の抗体またはその機能的フラグメントによって認識されるエピトープを保持している。

20

【0151】

いくつかの態様において、修飾されたHER2/neu/ErbB2は、SEQ ID NO:92に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:92に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列に含まれるアミノ酸を含み、リガンド結合ドメインを欠如し、既知の抗体によって認識されるエピトープを保持し、そのような参照HER2/neu/ErbB2の細胞質シグナル伝達ドメインのすべてまたはその機能的部分を欠如している。いくつかの態様において、リガンド結合ドメインは、EGF、形質転換成長因子（TGF）、アンフィレギュリン、ヘパリン結合EGF様成長因子、ベータセルリンおよびエプレギュリンに結合し得る。修飾されたHER2/neu/ErbB2上のエピトープを認識し得る結合分子の例は、FDAに承認された抗HER2モノクローナル抗体（mAb）であるトラスツズマブ、2C4、エルツマキソマブ、ペルツズマブまたは別の抗HER2/neu/ErbB2抗体を含む。いくつかの態様において、結合分子は、修飾されたHER2/neu/ErbB2のドメインIV内のエピトープを認識し得る（トラスツズマブ）または修飾されたHER2/neu/ErbB2のドメインII内のエピトープを認識し得る（ペルツズマブ）。

30

40

【0152】

いくつかの態様において、修飾されたHER2/neu/ErbB2、例えばHER2tは、SEQ ID NO:91に示されるヌクレオチドの配列またはSEQ ID NO:91に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列、例えば縮小コドンを含むその配列によってコードされる。コードされる修飾されたHER2/neu/ErbB2は、表面分子または表面タンパク質としての発現のためのシグナルペプチドを含み得る。いくつかの態様において、修飾されたHER2/neu/ErbB2、例えばHER2tは、SEQ ID NO:65に含

50

まれる参照HER2/neu/ErbB2の天然シグナルペプチドをコードする配列を含むヌクレオチドによってコードされる。いくつかの態様において、修飾されたHER2/neu/ErbB2、例えばHER2tは、例えばSEQ ID NO:48に示される、非天然または異種シグナルペプチドをコードする配列を含むヌクレオチドによってコードされる。いくつかの態様において、修飾されたHER2/neu/ErbB2は、SEQ ID NO:93に示されるヌクレオチドの配列またはSEQ ID NO:93に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列、例えば縮重コドンを含むその配列によってコードされる。

【0153】

10

c. 修飾されたPSMA、例えば短縮化されたPSMA

いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、修飾された前立腺特異的膜抗原(PSMA)である。いくつかの態様において、修飾された細胞表面分子は、例えばSEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列を含む、PSMA、例えば野生型または未修飾PSMA、例えばヒトPSMAである参照細胞表面分子と比較して修飾されている。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、参照PSMAと比較して1つまたは複数のアミノ酸修飾、例えば1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、短縮および/または挿入を含む。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、参照、野生型または未修飾PSMAと比較して変化した細胞内在化、細胞トラフィック、酵素活性および/またはリガンド結合を示す。

【0154】

20

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、野生型もしくは未修飾PSMAの膜貫通ドメインのすべてもしくは実質的にすべてを含むか、または修飾されたPSMAは、野生型もしくは未修飾PSMAの膜貫通ドメインと同じもしくは少なくとも同数のアミノ酸を有する膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、PSMAは、PSMAに結合する本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれかによって認識されるエピトープを含む細胞外ドメインを含む。

【0155】

いくつかの態様において、参照、野生型または未修飾PSMAは、ヒトPSMAである、および/またはSEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、SEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列の細胞外ドメインおよび/もしくは膜貫通ドメインまたはその一部分もしくはフラグメントを含む。

30

【0156】

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、例えばSEQ ID NO:94に示されるPSMA内の位置でいうW2Gに対応する、トリプトファンがグリシンに置換される第2のアミノ酸残基に、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、W2Gに対応する少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、またはW2を含まない、またはSEQ ID NO:94に示されるPSMA配列内の位置でいう2位の残基を含まない。例えば、いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、SEQ ID NO:95に示されるアミノ酸の配列もしくはそのフラグメント、またはSEQ ID NO:95に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくはそれ以上の配列同一性を示す配列もしくはそのフラグメントを含み、かつ少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。

40

【0157】

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、SEQ ID NO:94に示されるPSMA配列内の位置でいう2、3、4、5、6、7、8、9、10または14位のアミノ酸残基の1つまたは複数においてアラニンへのアミノ酸置換を含む。

【0158】

いくつかの態様において、PSMAは、野生型または未修飾PSMAと比較して、細胞内部分の1つまたは複数のN末端アミノ酸残基の欠失を含む修飾されたPSMAである。野生型、全長ヒ

50

トPSMAは、19アミノ酸残基の細胞内部分、24アミノ酸残基の膜貫通部分および707アミノ酸残基の細胞内部分を含む750アミノ酸タンパク質である。例えば、いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、(PSMAまたはその修飾された形態をコードする核酸配列におけるコード配列の5'末端に対応する)N末端に欠失を含み、この欠失はPSMAの細胞内部分に位置する。

【0159】

いくつかの局面において、その細胞内部分に1つまたは複数の欠失を含む修飾されたPSMAはまた、短縮化形態のPSMA、短縮化されたPSMAまたはtPSMAとも称される。いくつかの局面において、短縮化されたPSMAまたはtPSMAは、野生型または未修飾PSMAのN末端またはその付近において、1つまたは複数のアミノ酸残基、任意で連続するアミノ酸残基の欠失または短縮を含む。いくつかの局面において、修飾されたPSMAは、PSMAの細胞内部分またはドメイン内に、1つまたは複数のアミノ酸残基、例えば1つまたは複数の連続するアミノ酸残基の欠失または短縮を含む。いくつかの態様において、N末端アミノ酸の欠失を含むPSMAタンパク質は、N末端修飾されたPSMAを細胞膜および中心体に首尾よく局在化させ、ならびに/または野生型もしくは未修飾PSMAと比較して(i)減少した内因性シグナルを示す；(ii)増加した細胞表面発現を示す；および/もしくは(iii)減少した細胞内在化を示す。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、例えば20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%超もしくは約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%超またはそれ以上減少した、減少した内因性シグナルまたは減少した細胞内在化を示す。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、例えば20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%超もしくは約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%超またはそれ以上増加した、増加した細胞表面発現または細胞膜および中心体への増加した局在化を示す。いくつかの局面において、細胞表面発現および/または細胞内在化は、細胞画像化技術、例えばPSMAまたはその変種に特異的に結合する標識された結合分子、例えば抗体を用いる共焦点顕微鏡観察を用いて評価され得る。

10

20

【0160】

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、いくつかの例において翻訳に必要とされる最初の残基としてのメチオニンを含むまたは保持している。いくつかの態様において、PSMAは、野生型または未修飾PSMAと比較して、細胞内部分内の1つまたは複数のN末端アミノ酸残基、任意で連続するアミノ酸残基の欠失を含むが、翻訳に必要とされる最初のメチオニンの欠失を含まない修飾されたPSMAである。

30

【0161】

いくつかの態様において、PSMAまたは修飾されたPSMAは、例えば国際PCT公開番号W02015143029、Rajasekaran et al. (2003) Mol. Biol. Cell. 14: 4835 4845、Rajasekaran et al. (2008) Mol Cancer Ther. (2008) 7(7): 2142 2151、Barinka et al. (2004) Eur. J. Biochem. 271:2782 2790およびDavis et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. 102(17) 5981 5986に記載されるPSMAを含む。

【0162】

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、野生型または未修飾PSMA、例えばSEQ ID NO:94に示されるPSMA配列内の位置でいう11個のN末端アミノ酸および/または最初の11個のアミノ酸の欠失を含むまたは欠如している。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、野生型または未修飾PSMA、例えばSEQ ID NO:94に示されるPSMA配列内の位置でいう15個のN末端アミノ酸の欠失を含むまたは欠如している。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、野生型または未修飾PSMA、例えばSEQ ID NO:94に示されるPSMA配列内の位置でいうN末端アミノ酸6~14の欠失を含むまたは欠如している。

40

【0163】

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、1つまたは複数のC末端アミノ酸残基の欠失を含む。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、SEQ ID NO:94に示されるPSMA内の位置でいう103~750、626~750、721~747または736~750のアミノ酸残基の欠失を含む。いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、SEQ ID NO:94に示されるPSMA内の位置で

50

いう15個のC末端アミノ酸残基の欠失を含む。

【0164】

いくつかの態様において、修飾されたPSMAは、修飾された核酸配列、例えばCpG非含有であるよう修飾されたおよび/またはコドン最適化された核酸配列によってコードされる。

【0165】

B. 作用物質（例えば、親和性タグ）

細胞表面コンジュゲートのいくつかの態様において、細胞表面分子、例えば修飾された細胞表面分子は、少なくとも1つの作用物質に連結される。いくつかの態様において、作用物質は、ペプチドまたはポリペプチドである。いくつかの態様において、作用物質は、ペプチドである。いくつかの態様においてペプチドは、人工的なもの、合成的なもの、またはより長いポリペプチドの一部である。ペプチドは一般に、長さが2アミノ酸超または2アミノ酸に等しいもの、例えば2アミノ酸超または2アミノ酸に等しく、50もしくは40アミノ酸未満または50もしくは40アミノ酸に等しい長さのものである。いくつかの態様において、ペプチドは、7~40アミノ酸、8~20アミノ酸、10~17アミノ酸、7~13アミノ酸または8~10アミノ酸である。いくつかの態様において、ペプチドは、7~20アミノ酸の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20アミノ酸の長さを有する。

【0166】

いくつかの態様において、作用物質は、結合分子によって認識されることが分かっている親和性タグである。いくつかの態様において、親和性タグは、抗体によってまたは非抗体結合分子によって認識されるエピトープを提供するのに十分な残基を有するが、いくつかの局面において、上記の既知の抗体によって認識される細胞表面分子のエピトープと干渉しないまたはエピトープを立体的に妨げないように十分短い。適当なタグポリペプチドは一般に、少なくとも5または6アミノ酸残基、通常約8~50アミノ酸残基、典型的に9~30残基を有する。そのようなタグは、周知であり、容易に合成および設計することができる。

【0167】

いくつかの態様において、作用物質、例えば親和性タグは、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag）、オリゴヒスチジンまたはポリヒスチジン（例えば、Hisタグ）、MATタグ、グルタチオン S トランスフェラーゼ、免疫グロブリンドメイン、カルモジュリンもしくはその類似体、チオレドキシシン、キチン結合タンパク質（CBP）、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、FLAGペプチド、HAタグ、マルトース結合タンパク質（MBP）、HSVエピトープ（例えば、gdタグ）、mycエピトープ、および/またはビオチニル化キャリアタンパク質である。そのような作用物質、例えば親和性タグの例は、MATタグ（配列：His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys）（SEQ ID NO:63）

、HAタグ

（配列：Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala）（SEQ ID NO: 20）

、VSV Gタグ

（配列：Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys）（SEQ ID NO: 21）

、HSV タグ

（配列：Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp）（SEQ ID NO: 22）

、T7エピトープ

（Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly）（SEQ ID NO: 22）

、マルトース結合タンパク質（MBP）、単純ヘルペス糖タンパク質DのGln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp（SEQ ID NO: 24）

の配列のHSVエピトープ、配列

Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu（SEQ ID NO: 25）

の転写因子c mycの「myc」エピトープ、V5タグ

（配列：Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr）（SEQ ID NO: 26）

、またはグルタチオン S トランスフェラーゼ（GST）を含む。そのような作用物質、例え

ば親和性タグの例はまた、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag）、例えばSEQ ID NO:7~19のいずれかに示される配列を含むいずれかを含み得る。そのようなタグを認識することが分かっている結合分子は知られており、インフルエンザヘマグルチニン（HA）タグポリペプチドを認識する抗体12CA5（Field et al. (1988) Mol. Cell. Bio. 5:2159 2165）；c mycタグを認識する8F9、3C7、6E10、G4、B7および9E10抗体（例えば、Evan et al. (1985) Molecular and Cellular Biology 5: 3610 3616を参照のこと）；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D（gD）タグおよびその抗体を認識する公知の抗体（Paborsky et al. (1990) Protein Engineering 3: 547 553）またはストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag）を認識する任意の公知の結合分子、例えばストレプトアビジンムテイン（例えば、Strep Tactin）を含む抗体分子または試薬を含むがこれらに限定されない。

10

【0168】

作用物質のさらなる例は、ジニトロフェノールまたはジゴキシゲニン、レクチン、プロテインA、プロテインG、金属、金属イオン、ニトリロ三酢酸誘導体（NTA）、RGDモチーフ、デキストラン、ポリエチレンイミン（PEI）、レドックス高分子、糖タンパク質、アプタマー、色素、アミロース、マルトース、セルロース、キチン、グルタチオン、カルモジュリン、ゼラチン、ポリミキシン、ヘパリン、NAD、NADP、リジン、アルギニン、ベンズアミジン、ポリUまたはオリゴdTを含むがこれらに限定されない。レクチン、例えばコンカバリンAは、多糖およびグリコシル化タンパク質に結合することが知られている。色素の具体例は、NADH依存的酵素に特異的に結合するトリアジン色素、例えばCibacronブルーF3G A（CB）またはレッドHE 3Bである。典型的に、グリーンAは、Co Aタンパク質、ヒト血清アルブミンおよびデヒドロゲナーゼに結合する。いくつかの例において、色素7アミノアクチノマイシンDおよび4',6 ジアミジノ 2 フェニルインドールは、DNAに結合する。

20

【0169】

いくつかの態様において、作用物質（例えば、ペプチド）、例えば親和性タグは、 10^4 ~ 10^{10} Mもしくは約 10^4 ~ 約 10^{10} Mの平衡解離定数（ K_D ）または 10^4 ~ 10^{10} M⁻¹もしくは約 10^4 ~ 約 10^{10} M⁻¹の平衡結合定数（ K_A ）で結合分子によって認識される。いくつかの態様において、作用物質、例えば親和性タグ、例えばペプチドは、低い結合親和性、例えば 10^7 M、 10^6 M、 10^5 M、 10^4 M超もしくは約 10^7 M、 10^6 M、 10^5 M、 10^4 M超もしくはそれ以上の K_D または 10^7 M⁻¹、 10^6 M⁻¹、 10^5 M⁻¹、 10^4 M⁻¹もしくは約 10^7 M⁻¹、 10^6 M⁻¹、 10^5 M⁻¹、 10^4 M⁻¹もしくはそれ未満の K_A で結合分子によって認識される。

30

【0170】

いくつかの態様において、作用物質、例えば親和性タグは、その作用物質に結合する少なくとも1つの結合部位Zを有する結合試薬であるまたはそのような結合試薬を含む結合分子によって認識される。いくつかの態様において、結合部位Zは、アビジンもしくはストレプトアビジンまたはそのムテインもしくは類似体の天然ビオチン結合部位であり、それに対する結合部位は、個別分子内に最大4つ存在し得（例えば、四量体は、4つの結合部位Zを含み）、そのためホモ四量体は同じである、すなわちZ1である最大4つの結合部位を含み得、ヘテロ四量体は相違し得る、例えばZ1およびZ2を含む最大4つの結合部位を含み得る。

40

【0171】

いくつかの態様において、作用物質は、オリゴマーまたは多量体である試薬であるまたはそのような試薬を含む結合分子によって認識される。いくつかの態様において、オリゴマーまたは多量体は、単量体の個別分子または個別分子を構成するサブユニットのコンジュゲートを直接的または間接的のいずれかで連結（例えば、タンパク質の二量体、三量体、四量体等をそれが自然界で起こるのと同様に直接的または間接的に連結）することによって、そのタンパク質の個別分子をそれが自然界で起こるのと同様に直接的または間接的に連結することによって、生成され得る。例えば、ストレプトアビジンまたはアビジンの四量体化ホモ二量体またはヘテロ二量体は、それぞれのオリゴマーまたは多量体の個別分

50

子または最小構築単位と称され得る。いくつかの態様において、オリゴマーまたは多量体は、タンパク質の少なくとも2つの個別分子の連結を含み得る（例えば、2マー）、またはタンパク質の個別分子の少なくとも3マー、4マー、5マー、6マー、7マー、8マー、9マー、10マー、11マー、12マー、13マー、14マー、15マー、16マー、17マー、18マー、19マー、20マー、25マー、30マー、35マー、40マー、45マーまたは50マー（例えば、単量体、四量体）であり得る。いくつかの例において、オリゴマーは、複数の結合部位Z1、例えば少なくとも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、30、31、32、33、34、35、40、45、50またはそれ以上の結合部位Z1を含み得る。いくつかの態様において、オリゴマーは、（例えば、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンもしくはアビジンムテインの）ヘテロ四量体であり得る複数の個別分子からおよび/またはそれらの結合部位Z、例えばZ1およびZ2が相違する、いくつかの例において複数の異なる結合部位Z、例えばZ1およびZ2がオリゴマー内に存在し得る、複数の2つまたはそれ以上の異なる個別分子（例えば、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンもしくはアビジンムテインの異なるホモ四量体）から生成または製造され得る。例えば、いくつかの例において、オリゴマーは、合わせて、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、40、45、50またはそれ以上の総結合部位Z1およびZ2を含み得る、複数の結合部位Z1および複数の結合部位Z2を含み得る。

10

20

【0172】

オリゴマーは、当技術分野で公知の任意の方法、例えば公開された米国特許出願番号US 2004/0082012に記載されるものを用いて生成され得る。いくつかの態様において、オリゴマーまたは多量体は、例えば多糖または二官能性リンカーによって架橋され得る2つまたはそれ以上の個別分子を含む。

【0173】

いくつかの態様において、オリゴマーまたは多量体は、多糖の存在下で個別分子または個別分子を構成するサブユニットのコンジュゲートを架橋することによって得られる。いくつかの態様において、オリゴマーまたは多量体は、多糖、例えばデキストランにカルボキシル残基を導入することによって調製され得る。いくつかの局面において、試薬の個別分子（例えば、単量体、四量体）は、従来のカルボジイミド化学を用いて、内部リジン残基および/または遊離N末端の一級アミノ基を通じてデキストラン骨格のカルボキシル基に連結され得る。いくつかの態様において、連結反応は、デキストラン1モルあたり試薬の個別分子（例えば、単量体、四量体）約60モルのモル比で行われる。

30

【0174】

いくつかの例において、作用物質と少なくとも1つの結合部位Zとの間の結合相互作用は、非共有結合相互作用である。いくつかの態様において、作用物質と少なくとも1つの結合部位Zとの間の結合相互作用、例えば非共有結合相互作用は、可逆的である。いくつかの態様において、結合試薬は、作用物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む。そのような可逆系において使用され得る結合分子試薬は、当技術分野で報告され公知となっている、例えば米国特許第5,168,049号；同第5,506,121号；同第6,103,493号；同第7,776,562号；同第7,981,632号；同第8,298,782号；同第8,735,540号；同第9,023,604号；および国際公開PCT出願番号W02013/124474およびW02014/076277を参照のこと。

40

【0175】

いくつかの態様において、結合分子による作用物質の認識は、可逆的である、例えば競合物質の存在下で競合する。いくつかの態様において、作用物質は、試薬によっても認識または結合され得る結合部位であるまたはそのような結合部位を含む競合物質の存在下で可逆的結合が媒介され得るものである。いくつかの局面において、競合物質は、結合分子と作用物質との間の結合親和性よりも高い競合物質と結合分子との間の結合親和性により、ならびに/または作用物質よりも高濃度で存在し、それによって作用物質と結合分子との間の相互作用を剥離および/もしくは解離させることにより、競合相手として作用し得

50

る。いくつかの局面において、作用物質と結合分子との間の可逆的結合は、細胞表面コンジュゲートを発現し、結合分子によって結合される細胞を、競合物質と接触させることによって、例えば、そのような細胞組成物に競合物質を添加することによってもたらされ得る。

【0176】

いくつかの態様において、作用物質は、親和性タグとして当業者に公知の部分であるまたはそのような部分を含む。いくつかのそのような態様において、結合分子は、対応する結合パートナー、例えば親和性タグに結合することが知られている抗体または抗体フラグメントである試薬であるまたはそのような試薬を含む。そのような態様において、抗体または抗体フラグメントであり得る試薬の1つまたは複数の結合部位Zと抗原との間で形成される複合体は、遊離抗原、すなわち遊離ペプチド（エピトープタグ）または遊離タンパク質（例えば、MBPもしくはCPB）を添加することによって競合的に妨害され得る。いくつかの態様において、親和性タグはまた、オリゴヌクレオチドタグであり得る。いくつかの例において、そのようなオリゴヌクレオチドタグは、例えば、オリゴヌクレオチドに、試薬に連結されたまたは含まれる相補的配列をハイブリダイズさせるために使用され得る。

10

【0177】

いくつかの例において、結合分子は、遷移金属イオンに結合することができ、その試薬をオリゴヒスチジン親和性タグ、多量体グルタチオンSトランスフェラーゼまたはビオチニル化キャリアタンパク質または他の作用物質に結合できるようにする少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬であるまたはそのような試薬を含む。一般に、金属、例えばNi、Cd、Zn、CoまたはCuのカチオンは典型的に、親和性タグ、例えばヘキサヒスチジンまたはHis-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys

20

タグ（MATタグ；SEQ ID NO:63）を含むオリゴヒスチジン含有配列およびNメタクリロイル（L）システインメチルエステルに結合するために使用される。いくつかの態様において、作用物質（例えば、ペプチド）、例えば親和性タグと試薬の1つまたは複数の結合部位Zとの間の結合は、二価、三価または四価カチオンの存在下で起こる。これに関して、いくつかの態様において、試薬は、典型的に適当なキレート物質によって保持、例えば錯体化された二価、三価または四価カチオンを含む。いくつかの態様において、作用物質（例えば、ペプチド）、例えば親和性タグは、二価、三価または四価カチオンを含む、例えば錯体化する部分を含み得る。いくつかのそのような態様において、作用物質と試薬の1つまたは複数の結合部位Zとの間の結合は、金属イオンのキレート化によって妨害され得る。金属キレート化は、例えば、EGTAまたはEDTAの添加によって達成され得る。各金属キレート物質の例は、エチレンジアミン、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、エチレンジアミン四酢酸（EGTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、N,Nビス（カルボキシメチル）グリシン（ニトリロ三酢酸、NTAとも呼ばれる）、1,2ビス（oアミノフェノキシ）エタン N,N,N',N' 四酢酸（BAPTA）、2,3ダイマーカプト1プロパノール（ジメルカプロール）、ポルフィンおよびヘムを含むがこれらに限定されない。例として、EDTAは、大部分の一価、二価、三価および四価金属イオン、例えば銀（Ag⁺）、カルシウム（Ca²⁺）、マンガン（Mn²⁺）、銅（Cu²⁺）、鉄（Fe²⁺）、コバルト（Co⁺）およびジルコニウム（Zr⁴⁺）と錯体を形成するのに対して、BAPTRAは、Ca²⁺に特異的である。具体例として、当技術分野で使用される標準的方法は、キレート物質ニトリロ三酢酸（NTA）によって示される、オリゴヒスチジntagと銅（Cu²⁺）、ニッケル（Ni²⁺）、コバルト（Co²⁺）または亜鉛（Zn²⁺）イオンとの間の錯体の形成である。

30

40

【0178】

いくつかの態様において、例えば米国特許第5,985,658号に記載されるように、作用物質、例えば親和性タグは、カルモジュリン結合ペプチドを含み、結合分子試薬は、多量体カルモジュリンを含む。いくつかの態様において、作用物質、例えば親和性タグは、FLAGペプチドを含み、結合分子試薬は、FLAGペプチド、例えば米国特許第4,851,341号に記載されるモノクローナル抗体4E11に結合するFLAGペプチドに結合する抗体を含む。1つの態

50

様において、作用物質、例えば親和性タグは、オリゴヒスチジンタグを含み、試薬は、オリゴヒスチジンタグに結合する抗体または遷移金属イオンを含む。いくつかの例において、これらすべての結合錯体の妨害は、例えばEDTAまたはEGTAの添加による、金属イオンのキレート化、例えばカルシウムキレート化によって達成され得る。いくつかの態様において、カルモジュリン、抗体、例えば4E11またはキレート化金属イオンまたは遊離キレート物質は、従来の方法によって、例えばビオチン化およびストレプトアビジンもしくはアビジンもしくはそれらのオリゴマーとの錯体形成によってまたは第1工程における本質的にNoguchi, A, et al. Bioconjugate Chemistry (1992)3, 132-137に記載されるような多糖、例えばデキストランへのカルボキシル残基の導入および第2の工程における従来のカルボジイミド化学を用いた多糖、例えばデキストラン骨格内のカルボキシル基への一級アミノ基を通じたカルモジュリンもしくは抗体もしくはキレート化金属イオンもしくは遊離キレート物質の連結によって多量体化され得る。

10

【0179】

いくつかの例において、結合分子は、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはストレプトアビジンの任意の類似体もしくはムテインまたはアビジンの類似体もしくはムテイン（例えば、ニュートラビジン）である試薬であるまたはそのような試薬を含む。いくつかの態様において、結合分子試薬は、ストレプトアビジン結合ペプチドである作用物質に結合することができる。いくつかの態様において、結合の妨害または解消は、ビオチンまたはビオチン類似体もしくは模倣体を用いて行われ得る。そのような作用物質を認識することが知られているそのようなストレプトアビジン結合ペプチドおよび結合分子試薬の例は、以下に記載されている。

20

【0180】

1. 例示的なストレプトアビジン結合ペプチド作用物質およびそれに対する結合分子

いくつかの態様において、作用物質（例えば、ペプチド）、例えば親和性タグは、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインであるまたはそれを含む試薬によって認識される。いくつかの態様において、作用物質は、ビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体、またはストレプトアビジン結合ペプチドまたはストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテインもしくは類似体、アビジンもしくはアビジンムテインもしくは類似体に特異的に結合することができる他の分子であり得る。いくつかの態様において、作用物質、例えば親和性タグは、ストレプトアビジン結合ペプチドである。

30

【0181】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、SEQ ID NO:9に示される一般式を有する配列を含む、例えばSEQ ID NO:10に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチド配列は、SEQ ID NO:11に示される、例えばSEQ ID NO:12に示される一般式を有する。1つの例において、ペプチド配列は、
Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly

（Strep tag（登録商標）とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される）である。1つの例において、ペプチド配列は、
Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:58)

または最小配列

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

40

（Strep tag（登録商標）IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される）である。いくつかの態様において、作用物質は、少なくとも2つのストレプトアビジン結合ペプチドモジュールの連続配置を含み、2つのモジュール間の距離は少なくとも0でありかつ50アミノ酸超ではなく、1つの結合モジュールは3~8アミノ酸を有し、少なくとも配列His Pro Xaa（SEQ ID NO:9）を含み、ここでXaaはグルタミン、アスパラギンまたはメチオニンであり、他方の結合モジュールは、例えばSEQ ID NO:11に示される同じまたは異なるストレプトアビジンペプチドリガンドを有する（例えば、国際公開PCT出願番号W002/077018；米国特許第7,981,632号を参照のこと）。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、SEQ ID NO:13または14のいずれかに示される式を有する配列を含む。いくつかの態様に

50

において、作用物質は、例えば、例えば配列
(SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK)(SEQ ID NO: 16)

を含む、例えばIBA GmbH, Gottingen, GermanyからTwin Step tag (登録商標)として市販されている、2つのストレプトアビジン結合ペプチドモジュールの連続配置による、ツインステップタグを含み得る。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、SEQ ID NO:15~19のいずれかに示されるアミノ酸の配列を有する。大部分の例において、これらのストレプトアビジン結合ペプチドはすべて、同じ結合部位、すなわちストレプトアビジンのビオチン結合部位に結合する。

【0182】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、そのペプチドに対する結合親和性を示す、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインを含む試薬によって認識される。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドに対するストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインの結合親和性は、 1×10^4 M、 5×10^4 M、 1×10^5 M、 5×10^5 M、 1×10^6 M、 5×10^6 Mまたは 1×10^7 M未満であるが、一般に 1×10^{13} M、 1×10^{12} Mまたは 1×10^{11} Mを超える K_D を有する。例えば、例えば米国特許第5,506,121号に開示される、ペプチド配列 (Strep tag) は、ビオチン模倣体として作用し得、ストレプトアビジンに対して例えばおおよそ 10^4 M ~ 10^5 Mの K_D の結合親和性を示し得る。いくつかの例において、結合親和性はさらに、ストレプトアビジン分子内に変異を加えることによって改善され得る、例えば米国特許第6,103,493号または国際公開PCT番号WO/2014/076277を参照のこと。いくつかの態様において、結合親和性は、当技術分野で公知の方法、例えば以下に記載されるいずれかによって決定され得る。

【0183】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテインもしくは類似体、アビジン、アビジンムテインもしくは類似体 (例えば、ニュートラアビジン)、またはそれらの混合物であるか、またはそれを含む試薬により認識され、そのような試薬は、ストレプトアビジン結合ペプチドを含む作用物質との可逆的結合のための1つまたは複数の結合部位Zを含む。いくつかの態様において、試薬は、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジンの類似体もしくはムテインまたはアビジンの類似体もしくはムテインであるかまたはそれらを含む。いくつかの態様において、物質 (例えば、競合試薬) は、作用物質と、1つまたは複数の結合部位Zに対する結合について競合することができるビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体またはストレプトアビジン結合ペプチドであり得る。いくつかの態様において、コンジュゲートの作用物質および物質 (例えば、競合試薬) は異なり、物質 (例えば、競合試薬) は作用物質の親和性と比較して1つまたは複数の結合部位Zに対してより高い結合親和性を示す。

【0184】

いくつかの態様において、作用物質を認識する結合分子、例えば、ストレプトアビジン結合ペプチド (例えば、Strep tag) は、ストレプトアビジンであるかまたはそれを含み、ストレプトアビジンは、野生型ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテインまたは類似体、例えばストレプトアビジン様ポリペプチドであり得る。いくつかの態様において、結合分子は、ストレプトアビジンであるかまたはそれを含み、ストレプトアビジンは、野生型アビジンまたはアビジンのムテインもしくは類似体、例えば、典型的により中性の pI を示し、ネイティブアビジンの代替物として利用可能である修飾アルギニンを有する脱グリコシル化アビジンであるニュートラアビジンであり得る。通常、脱グリコシル化された中性形態のアビジンは、市販されている形態、例えばSigma Aldrichから入手可能な「Extravidin」またはThermo ScientificもしくはInvitrogenから入手可能な「NeutrAvidin」を含む。

【0185】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドなどの作用物質は結合分子試薬により認識され、結合分子試薬は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンム

テインもしくは類似体であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、野生型ストレプトアビジン (wt ストレプトアビジン) は、Argarana et al, *Nucleic Acids Res.* 14

(1986) 1871 1882に開示されるアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) を有する。一般に、ストレプトアビジンは、自然状態で、各サブユニットがビオチン、ビオチン誘導體もしくは類似体またはビオチン模倣体に対する単一の結合部位を含む4つの同一のサブユニットの四量体として存在する、すなわち、ホモ四量体である。ストレプトアビジンサブユニットの例示的な配列は、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列であるが、そのような配列はまた、他のストレプトマイセス種由来のそのホモログに存在する配列も含み得る。特に、ストレプトアビジンの各サブユニットは、ビオチンに対して、約 10^{14} Mのオーダーの解離定数 (K_d) の強い結合親和性を示し得る。いくつかの例において、ストレプトアビジンは、4つの結合部位のうちの1つのみが機能的である一価四量体 (Howarth et al. (2006) *Nat. Methods*, 3:267 73; Zhang et al. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463:1059 63)、4つの結合部位のうちの2つが機能的である二価四量体 (Fairhead et al. (2013) *J. Mol. Biol.*, 426:199 214) として存在し得、または単量体もしくは二量体形態で存在し得る (Wu et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280:23225 31; Lim et al. (2010) *Biochemistry*, 50:8682 91)。

10

【 0 1 8 6 】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンは、任意の形態、例えば、野生型または非修飾ストレプトアビジンであり得、例えば、作用物質 (例えば、ストレプトアビジン結合ペプチド) に対する、および/またはビオチン、ビオチン誘導體もしくは類似体もしくはビオチン模倣体に対する結合部位を含む少なくとも1つの機能的サブユニットを含む、例えば通常SEQ ID NO:1に示されるストレプトマイセス・アビジニイ (*Streptomyces avidinii*) 由来の野生型ストレプトアビジンの少なくとも1つの機能的サブユニットもしくはその機能的に活性なフラグメントを含むストレプトマイセス種由来のストレプトアビジンもしくはその機能的に活性なフラグメントであり得る。例えば、いくつかの態様において、ストレプトアビジンは、Nおよび/またはC末端で短縮された野生型ストレプトアビジンのフラグメントを含み得る。そのような最小ストレプトアビジンは、N末端においてSEQ ID NO:1のアミノ酸位置10~16の領域で始まり、C末端においてSEQ ID NO:1のアミノ酸位置133~142の領域で終了する任意のものを含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンの機能的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジン、例えばSEQ ID NO:2に示されるものはさらに、SEQ ID NO:1に示される番号でいうAla13に対応する位置にN末端メチオニンを含み得る。ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインにおける残基の位置の参照は、SEQ ID NO:1における残基の番号を参照する。

20

30

【 0 1 8 7 】

いくつかの局面において、ストレプトアビジンムテインは、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失または付加によって非修飾または野生型ストレプトアビジンの配列から区別されるが、作用物質 (例えば、ストレプトアビジン結合ペプチド) に対する、および/またはビオチン、ビオチン誘導體もしくは類似体またはストレプトアビジン結合ペプチドに対する結合部位を含む少なくとも1つの機能的サブユニットを含むポリペプチドを含む。いくつかの局面において、ストレプトアビジン様ポリペプチドおよびストレプトアビジンムテインは、本質的に野生型ストレプトアビジンと免疫学的に等価であり、特にwt ストレプトアビジンと同じまたは異なる親和性でビオチン、ビオチン誘導體またはビオチン類似体に結合することができるポリペプチドであり得る。いくつかの例において、ストレプトアビジン様ポリペプチドまたはストレプトアビジンムテインは、野生型ストレプトアビジンの一部ではないアミノ酸を含み得るまたはそれらは野生型ストレプトアビジンの一部のみを含み得る。いくつかの態様において、ストレプトアビジン様ポリペプチドは、宿主により産生されたポリペプチドを野生型ストレプトアビジンの構造に変換するために必要とされる酵素を宿主が有さないために、野生型ストレプトアビジンと同一でないポリペプチドである。いくつかの態様において、ストレプトアビジンはまた、ストレプトアビジン四

40

50

量体およびストレプトアビジン二量体、特にストレプトアビジンホモ四量体、ストレプトアビジンホモ二量体、ストレプトアビジンヘテロ四量体およびストレプトアビジンヘテロ二量体として存在し得る。一般に、各サブユニットは通常、ビオチンもしくはビオチン類似体に対するまたはストレプトアビジン結合ペプチドに対する結合部位を有する。ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインの例は、例えば、WO 86/02077、DE 1964 1876 AI、US 6,022,951、WO 98/40396またはWO 96/24606において言及されている。

【0188】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、非修飾もしくは野生型ストレプトアビジンの一部ではないアミノ酸を含み得るまたは野生型もしくは非修飾ストレプトアビジンの一部のみを含み得る。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、非修飾または野生型ストレプトアビジンのサブユニットとの比較で、例えばSEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンサブユニットまたは例えばSEQ ID NO:2に示される、その機能的に活性なフラグメントとの比較で1つまたは複数のアミノ酸置換 (substitutions) (置換 (replacements)) を有し得る少なくとも1つのサブユニットを含む。

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインの少なくとも1つのサブユニットは、野生型もしくは非修飾ストレプトアビジンと比較して少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個のアミノ酸の相違を有し得、および/またはSEQ ID NO:1もしくは2に示されるアミノ酸配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上または少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む少なくとも1つのサブユニットを含み、そのようなストレプトアビジンムテインは、作用物質 (例えば、ストレプトアビジン結合ペプチド) および/またはビオチン、ビオチン誘導體もしくは類似体またはビオチン模倣体に結合する機能的活性を示す。いくつかの態様において、アミノ酸の置換 (replacements) (置換 (substitutions)) は、保存的または非保存的変異である。ストレプトアビジンムテインの例は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,168,049号；同第5,506,121号；同第6,022,951号；同第6,156,493号；同第6,165,750号；同第6,103,493号；もしくは同第6,368,813号；または国際公開PCT出願番号W02014/076277を参照されたい。

【0189】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、ビオチン、ビオチン誘導體もしくは類似体またはストレプトアビジン結合ペプチドに対する1つまたは複数の結合部位Zを含む1または2つ以上の機能的サブユニット、例えば、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上およびいくつかの例においては、5、6、7、8、9、10、11、12またはそれ以上の機能的サブユニットを含むタンパク質を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、単量体；ヘテロ二量体もしくはホモ二量体を含む、二量体；ホモ四量体、ヘテロ四量体、一価四量体もしくは二価四量体を含む四量体を含み得、またはそれらのより高次の多量体もしくはオリゴマーを含み得る。

【0190】

いくつかの態様において、結合分子試薬は、ストレプトアビジンムテインであるまたはストレプトアビジンムテインを含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンまたはその生物学的に活性な部分との比較で1つまたは複数の変異 (例えば、アミノ酸の置換) を含む。例えば、ストレプトアビジンの生物学的に活性な部分は、いくつかの例において最小ストレプトアビジンと呼ばれる、Nおよび/またはC末端で短縮されたストレプトアビジンバリエーションを含み得る。いくつかの態様において、任意の変異が導入され得るN末端短縮最小ストレプトアビジンは、SEQ ID NO:1に示される配列との比較で、N末端がアミノ酸位置10~16の領域から始まり、C末端がアミノ酸位置133~142の領域で終わる。いくつかの態様において、任意の変異が導入され得るN末端短縮ストレプトアビジンは、SEQ ID NO:2に示されるアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含む。いくつかの態様において、最小ストレプトアビジンは、Ala13位～Ser139位のアミノ酸配列を含み、任意で、Ala13の代わりにN末端メチオニン残基を有する。本願の目的上、アミノ酸位置の番号は、全体を通して、SEQ ID NO:1に示されるwt ストレプトアビジンの番号を参照する。(Argarana et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986), 1871-1882を参照のこと、図3も参照のこと)。

【0191】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、米国特許第6,103,493号に記載される変異体である。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、例えばSEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンのアミノ酸配列に基づくアミノ酸位置44～53の領域内に少なくとも1つの変異を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、1つまたは複数の残基44、45、46および/または47に変異を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、野生型ストレプトアビジンの44位のGluから疎水性脂肪族アミノ酸、例えばVal、Ala、IleもしくはLeuへの置換、45位の任意のアミノ酸、46位の脂肪族アミノ酸、例えば疎水性脂肪族アミノ酸および/または47位のValから塩基性アミノ酸、例えばArgもしくはLys、例えば通常Argへの置換を含む。いくつかの態様において、Alaが46位にありおよび/またはArgが47位にありおよび/またはValもしくはIleが44位にある。いくつかの態様において、ストレプトアビジン変異体は、例えばSEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含む例示的なストレプトアビジンムテイン(ストレプトアビジン変異体1、SAM1としても公知)に示される、残基Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、例えばSEQ ID NO:5または6に示されるアミノ酸配列を含む例示的なストレプトアビジンムテイン(SAM2としても公知)に示される、残基Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷を含む。いくつかの例において、そのようなストレプトアビジンムテインは、例えば、米国特許第6,103,493号に記載されており、Strep Tactin(登録商標)という商標の下で市販されている。

【0192】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、国際公開PCT出願番号W0 2014/076277に記載される変異体である。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸位置でいうアミノ酸位置44～53の領域に少なくとも2つのシステイン残基を含む。いくつかの態様において、システイン残基は、これらのアミノ酸を連結するジスルフィド架橋を形成するよう45位および52位に存在する。そのような態様において、アミノ酸44は典型的にグリシンまたはアラニンであり、アミノ酸46は典型的にアラニンまたはグリシンであり、アミノ酸47は典型的にアルギニンである。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸位置でいうアミノ酸残基115～121の領域に少なくとも1つの変異またはアミノ酸の相違を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、アミノ酸位置117、120および121における少なくとも1つの変異ならびに/またはアミノ酸位置118および119の欠失ならびに少なくともアミノ酸121の置換を含む。

【0193】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、117位に対応する位置に変異を含み、その変異は、Trp、TyrもしくはPheのような大型疎水性残基またはGlu、AspもしくはArgのような荷電残基またはAsnもしくはGlnのような親水性残基またはいくつかの例では疎水性残基Leu、MetもしくはAlaまたは極性残基Thr、SerもしくはHisであり得る。いくつかの態様において、117位の変異は、SerまたはAlaまたはGlyのような小型残基であり得る120位に対応する位置における変異、ならびに疎水性残基、例えばTrp、TyrまたはPheのようなかさ高い疎水性残基であり得る121位に対応する位置における変異と組み合わせられる。いくつかの態様において、117位の変異は、疎水性残基、例えばLeu、Ile、MetもしくはValまたは通常TyrもしくはPheであり得るSEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンまたはその生物学的に活性なフラグメントの120位に対応する位置における変異、およびGly、AlaもしくはSerのような小型残基であり得るSEQ ID NO:1に示される野生型

ストレプトアビジンまたはその生物学的に活性なフラグメントとの比較で121位に対応する位置における変異、またはGln、またはLeu、Val、Ile、Trp、Tyr、PheもしくはMetのような疎水性残基と組み合わされる。いくつかの態様において、そのようなムテインはまた、残基Val44 Thr45 Ala46 Arg47または残基Ile44 Gly45 Ala46 Arg47を含み得る。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、残基Val44、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120およびTyr121を含む。いくつかの態様において、ムテインストレプトアビジンは、SEQ ID NO:27もしくはSEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:27もしくはSEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上または少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含み、残基Val44、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120およびTyr121を含み、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに結合する機能的活性を示す。

10

【0194】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、上記変異のいずれかを任意の組み合わせで含み得、得られるストレプトアビジンムテインは、ストレプトアビジン結合ペプチド、例えば、アミノ酸Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Glyを含み；Strep tag（登録商標）とも呼ばれるもの（SEQ ID NO:7に示される）に対して 2.7×10^4 M未満の K_D 、および/またはストレプトアビジン結合ペプチド、例えば、アミノ酸Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lysを含み；Strep tag（登録商標）IIとも呼ばれるもの（SEQ ID NO:8またはSEQ ID NO:58に示される）に対して 1.4×10^4 M未満の K_D 、および/またはSEQ ID NO:7~19または58のいずれかに示されるストレプトアビジン結合ペプチドのいずれかにに対して 1×10^4 M、 5×10^4 M、 1×10^5 M、 5×10^5 M、 1×10^6 M、 5×10^6 Mもしくは 1×10^7 M未満であるが通常 1×10^{13} M、 1×10^{12} Mもしくは 1×10^{11} Mより大きい K_D の結合親和性を示し得る。

20

【0195】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:3~6、27もしくは28のいずれかに示されるアミノ酸配列またはSEQ ID NO:3~6、27もしくは28のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、かつストレプトアビジン結合ペプチド、例えば、アミノ酸Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Glyを含み；Strep tag（登録商標）とも呼ばれるもの（SEQ ID NO:7に示される）に対して 2.7×10^4 M未満の K_D 、および/またはストレプトアビジン結合ペプチド、例えば、アミノ酸Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lysを含み；Strep tag（登録商標）IIとも呼ばれるもの（SEQ ID NO:8または58に示される）に対して 1.4×10^4 M未満の K_D 、および/またはSEQ ID NO:7~19または58のいずれかに示されるペプチドリガンドのいずれかにに対して 1×10^4 M、 5×10^4 M、 1×10^5 M、 5×10^5 M、 1×10^6 M、 5×10^6 Mもしくは 1×10^7 M未満であるが通常 1×10^{13} M、 1×10^{12} Mもしくは 1×10^{11} Mより大きい K_D の結合親和性を示す。

30

40

【0196】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインはまた、他のストレプトアビジンリガンド、例えば、非限定的に、ビオチン、イミノビオチン、リポ酸、デスチオビオチン、ジアミノビオチン、HABA（ヒドロキシアゾベンゼン安息香酸）および/またはジメチルHABAに対する結合を示す。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、別のストレプトアビジンリガンド、例えばビオチンまたはデスチオビオチンに対して、例えばSEQ ID NO:7~19または58のいずれかに示されるストレプトアビジンペプチドリガンドに対するストレプトアビジンムテインの結合親和性よりも大きい結合親和性を示す。したがって、いくつかの態様において、ビオチンまたはビオチン類似体もしくは誘導体（例えば、デスチオビオチン）は、提供される方法において競合試薬として使用され得る。例

50

えば、例として、（例えば、SEQ ID NO:4に示される配列を含む）Strep tactin（登録商標）と命名されたムテインストレプトアビジンと、（例えば、SEQ ID NO:8または58に示されるアミノ酸を含む）Strep tag（登録商標）IIと命名されたストレプトアビジンペプチドとの相互作用は、ビオチン ストレプトアビジン相互作用に関するおよそ 10^{13} Mとの比較で、およそ 10^{16} Mの K_D の結合親和性によって特徴づけられる。いくつかの例において、Strep tactin（登録商標）に対して $10^{10} \sim 10^{13}$ Mまたは約 $10^{10} \sim 10^{13}$ Mの K_D の高い親和性で結合し得るビオチンは、この結合部位に関してStrep tag（登録商標）IIと競合し得る。

【0197】

いくつかの態様において、結合分子は、1つまたは複数のストレプトアビジンもしくはアビジン、またはストレプトアビジンの任意の類似体もしくはムテインまたはアビジンの類似体もしくはムテイン（例えば、ニュートラアビジン）のオリゴマーまたはポリマーである試薬である。いくつかの態様において、オリゴマーは、同じストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、またはアビジンムテインの複数の個別分子（例えば、複数のホモ四量体）から作製または生成され、この場合に、オリゴマーの各結合部位Z、例えばZ1は同じである。

【0198】

いくつかの態様において、結合分子試薬は、1つまたは複数のストレプトアビジンもしくはアビジン、またはストレプトアビジンの任意の類似体もしくはムテインまたはアビジンの類似体もしくはムテイン（例えば、ニュートラアビジン）のオリゴマーまたはポリマーである。いくつかの態様において、オリゴマーは、同じストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンまたはアビジンムテインの複数の個別分子（例えば、複数のホモ四量体）から生成または生産され、この例で、オリゴマーの各結合部位Z、例えばZ1は同じである。例えば、いくつかの例において、オリゴマーは、複数の結合部位Z1、例えば少なくとも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、30、31、32、33、34、35、40、45、50またはそれ以上の結合部位Z1を含み得る。いくつかの態様において、オリゴマーは、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンもしくはアビジンムテインのヘテロ四量体であり得る複数の個別分子から、および/またはそれらの結合部位Z、例えばZ1およびZ2に関して異なるストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンもしくはアビジンムテインの複数の2つもしくはそれ以上の異なる個別分子（例えば、異なるホモ四量体）から生成または生産され、この例で、複数の異なる結合部位Z、例えばZ1およびZ2が、オリゴマー内に存在し得る。例えば、いくつかの例において、オリゴマーは、複数の結合部位Z1および複数の結合部位Zを含み得、合わせて、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、40、45、50またはそれ以上の総結合部位Z1およびZ2を含み得る。

【0199】

いくつかの例において、各オリゴマーまたはポリマーは、多糖によって架橋され得る。1つの態様において、ストレプトアビジンまたはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの類似体（例えば、ニュートラアビジン）のオリゴマーまたはポリマーは、最初の工程で、本質的にNoguchi, A, et al, Bioconjugate Chemistry (1992) 3,132-137に記載されるように、カルボキシル残基を多糖、例えばデキストランに導入することによって調製され得る。いくつかのそのような局面において、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはそれらの類似体は、次に、第2工程で、従来のカルボジイミド化学を用いて、内部リジン残基の一級アミノ基および/または遊離N末端を通じてデキストラン骨格のカルボキシル基に連結され得る。いくつかの例において、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意の類似体の架橋オリゴマーまたはポリマーはまた、リンカーとして機能する二官能性分子、例えばグルタルアルデヒドを通じてまたは当技術分野で報告されている他の方法によって架橋することによって取得

10

20

30

40

50

され得る。

【0200】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、二官能性リンカーもしくは他の化学リンカー、例えばグルタルジアルデヒドを用いて、または当技術分野で公知の他の方法によって、個別分子または個別分子を形成するサブユニットの複合体を架橋することによって得られる。いくつかの局面において、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意のムテインもしくは類似体の架橋オリゴマーまたはポリマーは、リンカーとして機能する二官能性分子、例えばグルタルジアルデヒドを通じてまたは当技術分野で報告されている他の方法によって個々のストレプトアビジンまたはアビジン分子を架橋することによって取得され得る。例えば、ストレプトアビジンムテインにチオール基を導入することによってストレプトアビジンムテインのオリゴマーを生成することが可能である（これは、例えば、ストレプトアビジンムテインと2 イミノチオラン（Trauts試薬）を反応させることによっておよび、例えば、別の反応においてストレプトアビジンムテイン中の利用可能なアミノ基を活性化させることによって行われ得る）。いくつかの態様において、このアミノ基の活性化は、ストレプトアビジンムテインと市販のヘテロ二官能性架橋剤、例えばスルホスクシンイミジル4（N マレイミドメチル）シクロヘキサン 1 カルボキシレート（スルホSMCC）またはスクシンイミジル6 [(マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート（SMPH）の反応によって達成され得る。いくつかのそのような態様において、それによって得られる2つの反応産物が混合され、それによって典型的に修飾ストレプトアビジンムテインの1つのバッチに含まれるチオール基と、修飾ストレプトアビジンムテインの他のバッチの（例えば、マレイミド機能によって）活性化されたアミノ酸を反応させる。いくつかの例において、この反応により、ストレプトアビジンムテインの多量体/オリゴマーが形成される。これらのオリゴマーは、任意の適当な数、例えば、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、40、45、50またはそれ以上の個別分子を有し得、そのオリゴマー化度は、反応条件によって異なり得る。

10

20

【0201】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマー試薬は、サイズ排除クロマトグラフィーを通じて単離され得、任意の望ましい画分が結合分子として使用され得る。例えば、いくつかの態様において、2 イミノチオランおよびヘテロ二官能性架橋剤、例えばスルホSMCCの存在下で修飾ストレプトアビジンムテインを反応させた後、オリゴマーまたはポリマー試薬は、サイズ排除クロマトグラフィーを通じて単離され得、所望の望ましい画分が試薬として使用され得る。いくつかの態様において、オリゴマーは、単一の分子量を有さない（かつ有する必要がない）が、それらは統計的な重量分布、例えばガウス分布を示し得る。いくつかの例において、4つ以上のストレプトアビジンまたはムテイン四量体、例えばホモ四量体またはヘテロ四量体、例えば、通常、3~50個の四量体、例えばホモ四量体もしくはヘテロ四量体、10~40個の四量体、例えばホモ四量体もしくはヘテロ四量体、または25~35個の四量体、例えばホモ四量体もしくはヘテロ四量体を含む任意のオリゴマーが、可溶性試薬として使用され得る。オリゴマーは、例えば、3~25個のストレプトアビジンムテイン四量体、例えばホモ四量体またはヘテロ四量体を有し得る。いくつかの局面において、ストレプトアビジンムテインの分子量が約50 kDaである場合、可溶性オリゴマーは、約150kDa~約2000 kDa、約150 kDa~約1500 kDa、約150 kDa~約1250 kDa、約150 kDa~1000 kDa、約150 kDa~約500 kDaまたは約150 kDa~約300 kDa、約300 kDa~約2000 kDa、約300 kDa~約1500 kDa、約300 kDa~約1250 kDa、約300 kDa~1000 kDa、約300 kDa~約500 kDa、約500 kDa~約2000 kDa、約500 kDa~約1500 kDa、約500 kDa~約1250 kDa、約500 kDa~1000 kDa、約1000 kDa~約2000 kDa、約1000 kDa~約1500 kDa、約1000 kDa~約1250 kDa、約1250 kDa~約2000 kDaまたは約1500 kDa~約2000 kDaの分子量を有し得る。通常、各ストレプトアビジン分子/ムテインは4つのビオチン結合部位を有するので、そのような試薬は12~160個の結合部位Z、例えば12~100個の結合部位Zを提

30

40

50

供し得る。

【0202】

いくつかの態様において、結合分子試薬、例えば記載のストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテイン（例えば、Strep Tactin（登録商標））試薬のいずれかは、1つまたは複数の検出マーカーで標識することができる。いくつかの態様において、試薬は蛍光マーカーで標識される。例示的な標識Strep Tactin（登録商標）試薬は公知であるかまたは市販されており、例えば、各々がIBA（Goettingen Germany）から入手可能である、Strep Tactin HRP、Strep Tactin AP、Strep Tactin Chromeo 488、Strep Tactin Chromeo 546、またはStrep Tactin Oyster 645を含む。

【0203】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag（登録商標）IIまたはtwin Strep tagなどのStrep tag）は、抗体または抗原結合フラグメントによって認識することができる。いくつかの態様において、抗体は、細胞表面コンジュゲートの作用物質のエピトープまたは領域に特異的に結合することができる少なくとも1つの結合部位を含む。そのようなストレプトアビジン結合ペプチドに対する抗体は公知であり、例えば、Strep tag（登録商標）IIまたはtwin strep tag中に存在する、ペプチド配列SAWSHPQFEK（SEQ ID NO:58）または最小配列WSHPQFEK（SEQ ID NO:8）に対する抗体を含む（Schmidt T. & Skerra A., Nature protocols, 2007; 国際特許出願公開番号W020 15067768）。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag（登録商標）IIまたはtwin Strep tagなどのStrep tag）は、例えば、市販のStrepM AB Classic（IBA, Goettingen Germany）、StrepMAB Immo（IBA）、抗Streptag II抗体（Genscript）、またはStrep tag抗体（Qiagen）などを用いて検出することができる。いくつかの態様において、抗体または結合パートナーは、操作された細胞の精製、選択、および/または検出を容易にするために、1つまたは複数の検出マーカーで標識される。例えば、分離は、蛍光標識された抗体への結合に基づいてもよい。

【0204】

C. 例示的なコンジュゲート

いくつかの態様において、コンジュゲートは、改変EGFR、およびストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインに結合することができる少なくとも1つの作用物質（例えば、親和性タグ）を含む。いくつかの態様において、改変EGFRは、SEQ ID NO: 46に示されるEGFRtなど、上記のいずれかである。いくつかの態様において、コンジュゲートは、改変HER2、およびストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインに結合することができる少なくとも1つの作用物質（例えば、親和性タグ）を含む。いくつかの態様において、改変HER2/neu/ErbB2は、上記のいずれか、例えばSEQ ID NO: 92に示されるHER2tなどである。いくつかのそのような態様において、作用物質は、Strep tag（登録商標）、Strep Tag（登録商標）II、またはtwin strep Tagなどのストレプトアビジン結合ペプチドであり、上記およびSEQ ID NO:7、8、15~19、または58に示されるいずれかを含む。

【0205】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、細胞表面分子のN末端部分と融合する。いくつかの態様において、提供される細胞表面コンジュゲートは、N末端からC末端の順序で、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、SEQ ID NO: 7、8、15~19、または58のいずれかに示されるような、Strep tag（登録商標）、Strep Tag（登録商標）II、またはtwin strep Tag）および改変EGFR（例えば、SEQ ID NO: 46に示されるような、EGFRt）を含むアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの場合には、ストレプトアビジン結合ペプチドは、改変EGFRと直接的に融合する。いくつかの場合には、ストレプトアビジン結合ペプチドは、例えば、記載される（例えば、SEQ ID NO: 55、56、59~62、98、または99のいずれか1つに示される）ような少なくとも1つのポリペプチドリンカーを介して、改変EGFRと間接的に融合するかまたは連結される。例えば、いくつかの局面において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、改変EGFRに付着させた第1のポリペプチドリンカーに接続される。いくつかの局面において、EGFRtおよびストレプトア

10

20

30

40

50

ビジン結合ペプチドを含む細胞表面コンジュゲートは融合タンパク質である。

【0206】

いくつかの態様において、提供される細胞表面コンジュゲートは、N末端からC末端の順序で、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、SEQ ID NO: 7、8、15～19、または58のいずれかに示されるような、Strep tag（登録商標）、Strep Tag（登録商標）II、またはtwin strep Tag）および改変HER2/neu/ErbB2（例えば、SEQ ID NO: 92に示されるような、HER2t）を含むアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの場合には、ストレプトアビジン結合ペプチドは、改変HER2/neu/ErbB2と直接的に融合する。いくつかの場合には、ストレプトアビジン結合ペプチドは、例えば記載される（例えば、SEQ ID NO: 55、56、59～62、98、または99のいずれか1つに示される）ような少なくとも1つのポリペプチドリンカーを介して、改変EGFRと間接的に融合するかまたはそれに連結される。例えば、いくつかの局面において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、改変HER2/neu/ErbB2に付着させた第1のポリペプチドリンカーに接続される。いくつかの局面において、HER2tおよびストレプトアビジン結合ペプチドを含む細胞表面コンジュゲートは融合タンパク質である。

10

【0207】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、N末端からC末端の順番で、（1）SEQ ID NO: 8、15～19、または58のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8、15～19、または58のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列を有する少なくとも1つの作用物質（例えば、Strep tag（登録商標））；（2）任意で、少なくとも1つのペプチドリンカー、例えば、SEQ ID NO: 55、56、59～62、98、または99に示されるペプチドリンカー；および（3）SEQ ID NO: 46に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 46に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列を有する改変EGFRを含む。

20

【0208】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、N末端からC末端の順番で、（1）SEQ ID NO: 8、15～19、または58のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8、15～19、または58のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列を有する少なくとも1つの作用物質（例えば、Strep tag（登録商標））；（2）任意で、少なくとも1つのペプチドリンカー、例えば、SEQ ID NO: 55、56、59～62、98、または99に示されるペプチドリンカー；および（3）SEQ ID NO: 92に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 92に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列を有する改変HER2/neu/ErbB2を含む。

30

40

【0209】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、PSMAまたはその改変形態、例えば改変PSMA、およびストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインに結合することができる少なくとも1つの作用物質（例えば、親和性タグ）を含む。いくつかの態様において、改変PSMAは上記のいずれか、例えば、SEQ ID NO: 95に示される改変PSMAまたはSEQ ID NO: 94のN末端切断型である。いくつかのそのような態様において、作用物質は、Strep tag（登録商標）、Strep Tag（登録商標）II、またはtwin strep Tagなどのストレプトアビ

50

ジン結合ペプチドであり、上記またはSEQ ID NO: 7、8、15～19、または58に示されるいずれかを含む。

【0210】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、N末端からC末端の順番で、(1) SEQ ID NO: 94または95のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 94または95のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列を有する、PSMAまたは改変PSMA；(2) 任意で、少なくとも1つのペプチドリンカー、例えば、SEQ ID NO: 55、56、59～62、98、または99に示されるペプチドリンカー；および(3) SEQ ID NO: 8、15～19、または58のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8、15～19、または58のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有する配列を有する、少なくとも1つの作用物質(例えば、Strep tag(登録商標))を含む。

10

【0211】

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートタンパク質は、表面または膜タンパク質として膜内に挿入するために分泌経路に発現したコンジュゲートを向けるためのシグナルペプチドをそのN末端にさらに含む。いくつかの態様において、シグナルペプチドは、細胞表面分子のネイティブなシグナルペプチド、例えば、SEQ ID NO:64に含まれるEGFRである。いくつかの態様において、シグナルペプチドは、非ネイティブなまたは異種のシグナルペプチドである。いくつかの態様において、シグナルペプチドは、SEQ ID NO: 48に示されるアミノ酸の配列を有する顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体(GMCSFR)鎖に由来し、例えば、SEQ ID NO: 47に示される配列またはその縮重コドンによる配列によってコードされる。

20

【0212】

III. 操作された細胞

提供される細胞表面コンジュゲートのいずれかを発現する操作された細胞が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、操作された細胞は、細胞表面コンジュゲートおよび1つまたは複数の組換え抗原受容体を同時発現する。いくつかの態様において、細胞は、キメラ抗原受容体などの組換え受容体によって遺伝子操作された細胞を含み得る。

30

【0213】

A. 組換え抗原受容体

組換え受容体を発現する操作された細胞、例えばT細胞などが提供され、該組換え受容体には、リガンド結合ドメインまたはその結合フラグメントを含むキメラ受容体、例えば機能的非TCR抗原受容体など、例えばキメラ抗原受容体(CAR)などが含まれ、またT細胞受容体(TCR)、例えばトランスジェニックTCRなど、およびその構成成分も含まれる。CARなどのキメラ受容体には概して、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達構成成分に連結された細胞外抗原(またはリガンド)結合ドメインが含まれ、いくつかの局面において、リンカーおよび/または膜貫通ドメインを介する。

40

【0214】

1. キメラ抗原受容体

いくつかの態様において、特定の抗原(またはマーカーもしくはリガンド)、例えば特定の細胞型の表面上に発現した抗原などに対する特異性を有するCARを発現する、操作された細胞、例えばT細胞などが提供される。いくつかの態様において、抗原はポリペプチドである。いくつかの態様において、それは糖質または他の分子である。いくつかの態様において、抗原は、正常なまたは標的ではない細胞または組織と比較して、疾患または状態の細胞、例えば、腫瘍または病原性細胞の上に選択的に発現するかまたは過剰発現する

50

。他の態様において、抗原は正常な細胞上に発現する、および/または操作された細胞上に発現する。

【0215】

特定の態様において、キメラ受容体などの組換え受容体は、活性化または刺激細胞質シグナル伝達ドメインまたは領域（活性化または刺激細胞内シグナル伝達ドメインまたは領域とも互換的に呼ばれる）を含む、細胞内シグナル伝達ドメインまたは領域、例えば、T細胞において一次活性化シグナルを誘導することができる活性化または刺激細胞質（細胞内）ドメインまたは領域、例えば、T細胞受容体（TCR）構成成分の細胞質シグナル伝達ドメインまたは領域（例えば、CD3ゼータ（CD3 ζ ）鎖のゼータ鎖の細胞質シグナル伝達ドメインもしくは領域またはその機能的変異体もしくはシグナル伝達部分）を含む、および/または免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）を含む。

10

【0216】

いくつかの態様において、キメラ受容体は、リガンド（例えば抗原）抗原に特異的に結合する細胞外リガンド結合ドメインをさらに含む。いくつかの抗体において、キメラ受容体は、抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインを含むCARである。いくつかの態様において、抗原などのリガンドは、細胞の表面上に発現したタンパク質である。いくつかの態様において、CARはTCR様CARであり、抗原はプロセッシングされたペプチド抗原、例えば細胞内タンパク質のペプチド抗原などであり、TCRと同様に、主要組織適合複合体（MHC）分子に関連して細胞表面上で認識される。

【0217】

CARを含む例示的な抗原受容体、およびそのような受容体を操作し細胞に導入するための方法には、例えば、国際特許出願公開番号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061、米国特許出願公開番号US2002131960、US2013287748、US20130149337、米国特許第6,451,995号、第7,446,190号、第8,252,592号、第8,339,645号、第8,398,282号、第7,446,179号、第6,410,319号、第7,070,995号、第7,265,209号、第7,354,762号、第7,446,191号、第8,324,353号、および第8,479,118号、ならびに欧州特許出願番号EP2537416に記載されているもの、ならびに/またはSadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75によって記載されているものが含まれる。いくつかの局面において、抗原受容体には、米国特許第7,446,190号に記載されているCAR、および国際特許出願公開番号W0/2014055668 A1に記載されているものが含まれる。CARの例には、W02014031687、US8,339,645、US7,446,179、US2013/0149337、米国特許第7,446,190号、米国特許第8,389,282号、Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; およびBrentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177) などの、上述の刊行物のいずれかに開示されているCARが含まれる。W02014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、米国特許第7,446,190号、および米国特許第8,389,282号もまた参照のこと。

20

30

【0218】

いくつかの態様において、特定の抗原（またはマーカーもしくはリガンド）、例えば養子療法によって標的とされるべき特定の細胞型において発現する抗原など、例えばがんマーカー、および/または減衰反応の誘導を目的とする抗原、例えば正常なまたは非疾患の細胞型上に発現する抗原などに対する特異性を有するCARが構築される。したがって、CARは典型的には、その細胞外部分に、1つまたは複数の抗原結合分子、例えば1つまたは複数の抗原結合フラグメント、ドメイン、もしくは部分、または1つまたは複数の抗体可変ドメイン、および/または抗体分子を含む。いくつかの態様において、CARには、抗体分子の抗原結合部分、例えば、モノクローナル抗体（mAb）の可変重（VH）鎖および可変軽（VL）鎖に由来する単鎖抗体フラグメント（scFv）などが含まれる。

40

【0219】

50

いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合部分は、抗原受容体などの組換え受容体の一部として細胞上に発現する。抗原受容体の中には、キメラ抗原受容体（CAR）などの機能的非TCR抗原受容体がある。概して、ペプチドMHC複合体に対して向けられたTCR様特異性を示す抗体または抗原結合フラグメントを含むCARは、TCR様CARと呼ばれてもよい。いくつかの態様において、TCR様CARのMHCペプチド複合体に特異的な細胞外抗原結合ドメインは、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達構成成分に連結され、いくつかの局面において、リンカーおよび/または膜貫通ドメインを介する。いくつかの態様において、そのような分子は典型的には、TCRなどの天然の抗原受容体によるシグナル、および任意で、共刺激受容体との組み合わせでのそのような受容体によるシグナルを模倣するかまたはそれらに近似し得る。

10

【0220】

いくつかの態様において、組換え受容体、例えばキメラ受容体（例えば、CAR）は、抗原（またはリガンド）に結合する、例えば特異的に結合する、リガンド結合ドメインを含む。キメラ受容体が標的とする抗原の中には、養子細胞療法によって標的とされるべき疾患、状態、または細胞型の状況で発現するものがある。疾患および状態の中には、がんおよび腫瘍を含む、増殖性、新生物性、および悪性の疾患および障害があり、血液がん、免疫系のがん、例えばリンパ腫、白血病、および/または骨髄腫など、例えばB、Tおよび骨髄性白血病、リンパ腫、ならびに多発性骨髄腫などが含まれる。

【0221】

いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）はポリペプチドである。いくつかの態様において、それは糖質または他の分子である。いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は、正常なまたは標的ではない細胞または組織と比較して、疾患または状態の細胞、例えば、腫瘍または病原性細胞の上に選択的に発現するかまたは過剰発現する。他の態様において、抗原は正常細胞上に発現する、および/または操作された細胞上に発現する。

20

【0222】

いくつかの態様において、CARは、細胞の表面上に発現した抗原、例えばインタクトな抗原などを特異的に認識する、抗体または抗原結合フラグメント（例えば、scFv）を含む。

【0223】

いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は腫瘍抗原またはがんマーカーである。いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は、v6インテグリン（avb6インテグリン）、B細胞成熟抗原（BCMA）、B7 H3、B7 H6、炭酸脱水酵素9（CA9、CAIXまたはG250としても公知）、がん精巢抗原、がん/精巢抗原1B（CTAG、NY ESO 1およびLAGE 2としても公知）、がん胎児性抗原（CEA）、サイクリン、サイクリンA2、CCモチーフケモカインリガンド1（CCL1）、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、上皮成長因子タンパク質（EGFR）、切断型上皮成長因子タンパク質（tEGFR）、III型上皮成長因子受容体変異（EGFR VIII）、上皮糖タンパク質2（EPG2）、上皮糖タンパク質40（EPG40）、エフリンB2、エフリン受容体A2（EPHa2）、エストロゲン受容体、Fc受容体様5（FCRL5；Fc受容体ホモログ5またはFCRH5としても公知）、胎児アセチルコリン受容体（胎児AChR）、葉酸結合タンパク質（FBP）、葉酸受容体アルファ、ガングリオシドGD2、Oアセチル化GD2（OGD2）、ガングリオシドGD3、糖タンパク質100（gp100）、Gタンパク質共役型受容体5D（GPCR5D）、Her2/neu（受容体チロシンキナーゼerbB2）、Her3（erbB3）、Her4（erbB4）、erbB二量体、ヒト高分子メラノーマ関連抗原（HMWMAA）、B型肝炎表面抗原、ヒト白血病抗原A1（HLA A1）、ヒト白血病抗原A2（HLA A2）、IL22受容体アルファ（IL22Ra）、IL13受容体アルファ2（IL13Ra2）、キナーゼ挿入ドメイン受容体（kdr）、カップ軽鎖、L1細胞接着分子（L1CAM）、L1CAMのCE7エピトープ、ロイシンリッチリピート含有8ファミリメンバーA（LRRRC8A）、ルイスY、メラノーマ関連抗原（MAGE）A1、MAGE A3、MAGE A6、メソテリン、cMet、マウスサイトメガロウイルス（CMV）、ムチン1（MUC1）、MUC16、ナチュラルキラ

30

40

50

ーグループ2メンバーD (NKG2D) リガンド、メラニンA (MART 1)、神経細胞接着分子 (NCAM)、がん胎児性抗原、メラノーマの優先発現抗原 (PRAME)、プロゲステロン受容体、前立腺特異的抗原、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (ROR1)、サバイビン、栄養膜糖タンパク質 (TPBG、5 T4としても公知)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG72)、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR)、血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2)、ウィルムス腫瘍1 (WT 1)、病原体特異的抗原、またはユニバーサルタグ (universal tag) と会合させた抗原、および/またはバイオチン化分子、および/またはHIV、HCV、HBVもしくは他の病原体によって発現される分子であるか、またはそれらを含む。受容体によって標的とされる抗原は、いくつかの態様では、B細胞悪性腫瘍に関連する抗原、例えば、複数の公知のB細胞マーカーのいずれかなどを含む。いくつかの態様において、抗原は、CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、IgG、IgM、CD79a、CD79b、またはCD30であるか、またはそれらを含む。

10

【0224】

いくつかの態様において、抗原 (またはリガンド) は、腫瘍抗原またはがんマーカーである。いくつかの態様において、抗原 (またはリガンド) は、オーファンチロシンキナーゼ受容体ROR1、tEGFR、Her2、L1 CAM、CD19、CD20、CD22、BCMA、メソテリン、CEA、およびB型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP 2、EGP 4、EPHa2、ErbB2、3、もしくは4、FBP、胎児アセチルコリン (acetylcholine) e受容体、GD2、GD3、HMW MAA、IL 22R アルファ、IL 13R アルファ2、kdr、カップ軽鎖、ルイスY、L1 細胞接着分子、MAGE A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY ESO 1、MART 1、gp100、がん胎児性抗原、TAG72、VEGF R2、がん胎児性抗原 (CEA)、前立腺特異的抗原、PSMA、Her2/neu、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS 1、c Met、GD 2、およびMAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1 (WT 1)、サイクリン、例えばサイクリンA1 (CCNA1) など、ならびに/またはバイオチン化分子、ならびに/またはHIV、HCV、HBV、もしくは他の病原体によって発現される分子であるか、またはそれらを含む。受容体によって標的とされる抗原は、いくつかの態様では、B細胞悪性腫瘍に関連する抗原、例えば、複数の公知のB細胞マーカーのいずれかなどを含む。いくつかの態様において、受容体によって標的とされる抗原は、CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、IgG、IgM、CD79a、CD79b、またはCD30である。

20

【0225】

いくつかの態様において、抗原は、病原体特異的抗原または病原体発現抗原である。いくつかの態様において、抗原は、ウイルス抗原 (例えば、HIV、HCV、HBV由来ウイルス抗原等)、細菌抗原、および/または寄生生物抗原である。

30

【0226】

いくつかの態様において、CARは、MHC ペプチド複合体として細胞表面上に提示される、TCR様抗体、例えば、腫瘍関連抗原などの細胞内抗原を特異的に認識する抗体または抗原結合フラグメント (例えば、scFv) などを含む。いくつかの態様において、MHC ペプチド複合体を認識する抗体またはその抗原結合部分は、抗原受容体などの組換え受容体の一部として細胞上に発現させることができる。抗原受容体の中には、キメラ抗原受容体 (CAR) など機能的非TCR抗原受容体がある。概して、ペプチド MHC複合体に対して向けられたTCR様特異性を示す抗体または抗原結合フラグメントを含むCARは、TCR様CARと呼ばれてもよい。

40

【0227】

「主要組織適合性複合体」 (MHC) への言及は、いくつかの場合には、細胞機構によって処理されるペプチド抗原を含む、ポリペプチドのペプチド抗原と複合体を形成することができる、多形性ペプチド結合部位または結合溝を含む、タンパク質、一般には糖タンパク質を指す。いくつかの場合には、MHC分子は、TCRまたはTCR様抗体などのT細胞上の抗原受容体によって認識可能な立体構造での抗原の提示のために、細胞表面上に提示または発現される可能性があり、ペプチドとの複合体、すなわちMHC ペプチド複合体としてのものを含む。概して、MHCクラスI分子は、いくつかの場合には3つの ドメインを有する、膜貫

50

通鎖、および非共有結合性 2ミクログロブリンを有するヘテロ二量体である。概して、MHCクラスII分子は、2つの膜貫通糖タンパク質、および で構成され、それらのどちらも典型的には膜を貫通する。MHC分子は、ペプチドに結合するための抗原結合部位および適切な抗体受容体による認識にとって必要な配列を含むMHCの有効な部分を含み得る。いくつかの態様において、MHCクラスI分子はサイトゾル中に生じるペプチドを細胞表面に送達し、ここで、MHCペプチド複合体はT細胞、例えば、概してCD8⁺T細胞だが、いくつかの場合にはCD4⁺T細胞、によって認識される。いくつかの態様において、MHCクラスII分子は、小胞系中に生じるペプチドを細胞表面に送達し、ここで、それらは典型的には、CD4⁺T細胞によって認識される。概して、MHC分子は、関連する遺伝子座のグループによってコードされ、マウスではH2とヒトではヒト白血球抗原（HLA）と集的に名付けられている。したがって、典型的には、ヒトMHCはヒト白血球抗原（HLA）とも呼ぶことができる。

10

【0228】

「MHCペプチド複合体」もしくは「ペプチドMHC複合体」という用語またはそれらの変化形は、例えば、一般には、MHC分子の結合溝または結合間隙におけるペプチドの非共有結合性相互作用による、ペプチド抗原およびMHC分子の複合体または会合を指す。いくつかの態様において、MHCペプチド複合体は、細胞の表面上に存在するかまたは表面上に示される。いくつかの態様において、MHCペプチド複合体は、TCR、TCR様CAR、またはそれらの抗原結合部分などの抗原受容体によって特異的に認識することができる。

【0229】

いくつかの態様において、ポリペプチドのペプチド、例えばペプチド抗原またはエピトープなどは、例えば抗原受容体による認識のために、MHC分子と会合することができる。概して、ペプチドは、より長い生体分子、例えばポリペプチドまたはタンパク質などのフラグメントに由来するかまたはそれに基づく。いくつかの態様において、ペプチドは典型的には、約8から約24アミノ酸長である。いくつかの態様において、ペプチドは、MHCクラスII複合体における認識のために、9から22アミノ酸または約9から約22アミノ酸の長さを有する。いくつかの態様において、ペプチドは、MHCクラスI複合体における認識のために、8から13アミノ酸または約8から約13アミノ酸の長さを有する。いくつかの態様において、MHCペプチド複合体などのMHC分子の状況におけるペプチドの認識の際に、TCRまたはTCR様CARなどの抗原受容体は、T細胞応答、例えば、T細胞増殖、サイトカイン産生、細胞傷害性T細胞応答、または他の応答などを誘導する、活性化シグナルをT細胞に生じさせるまたは引き起こす。

20

30

【0230】

いくつかの態様において、TCR様抗体または抗原結合部分は、公知であるか、または当技術分野において公知の方法によって作製することができる（例えば、米国公開出願第US 2002/0150914号；第 US 2003/0223994号；第 US 2004/0191260号；第 US 2006/0034850号；第 US 2007/00992530号；第 US20090226474号；第 US20090304679号；および国際PCT公開第WO 03/068201号を参照のこと）。

【0231】

いくつかの態様において、MHCペプチド複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、特異的MHCペプチド複合体を含む免疫源の有効量で宿主を免疫化することによって作製することができる。いくつかの場合には、MHCペプチド複合体のペプチドは、腫瘍抗原など、MHCに結合することができる抗原のエピトープであり、例えば、後述のようなユニバーサル腫瘍抗原（universal tumor antigen）、骨髄腫抗原、または他の抗原である。いくつかの態様において、免疫源の有効量は次いで、免疫応答を誘発するために宿主に投与され、ここで、免疫源は、MHC分子の結合溝におけるペプチドの三次元提示に対して免疫応答を誘発するのに十分な期間、その三次元形態を保持する。宿主から収集された血清は次いで、MHC分子の結合溝中におけるペプチドの三次元提示を認識する所望の抗体が作製されているかどうかを判定するためにアッセイされる。いくつかの態様において、作製された抗体は、抗体がMHCペプチド複合体をMHC分子単独、関心対象のペプチド

40

50

単独、およびMHCと無関係のペプチドとの複合体と区別できることを確認するために評価することができる。次いで、所望の抗体が単離され得る。

【0232】

いくつかの態様において、MHC ペプチド複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、ファージ抗体ライブラリーなどの抗体ライブラリーディスプレイ法を利用することによって作製することができる。いくつかの態様において、例えば、ライブラリーのメンバーがCDRの1つまたは複数の残基で変異されている、変異Fab、scFv、または他の抗体形態のファージディスプレイライブラリーを作製することができる。そのような方法の例は当技術分野において公知である（例えば、米国公開出願第US20020150914号、第US2014/0294841号；およびCohen C.J. et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324 332を参照のこと）。

10

【0233】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で用いられ、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含み、インタクトな抗体および機能性（抗原結合）抗体フラグメントを含み、フラグメント抗原結合（Fab）フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、Fvフラグメント、組換え IgG (rIgG) フラグメント、抗原に特異的に結合することができる可変重鎖（V_H）領域、単鎖可変フラグメント（scFv）を含む単鎖抗体フラグメント、およびシングルドメイン抗体（例えば、sdAb、sdFv、ナノボディ）フラグメントを含む。該用語は、免疫グロブリンの遺伝子操作されたおよび/またはその他の方法で改変された形態、例えば、イントラボディ、ペプチボディ、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、およびヘテロ共役抗体、多特異性抗体、例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ、トリアボディ、およびテトラボディ、タンデムジscFv (tandem di scFv)、タンデムトリscFv (tandem tri scFv) などを包含する。別段の記載がない限り、「抗体」という用語は、その機能的抗体フラグメントを包含するように理解されるべきである。該用語はまた、インタクトな抗体または全長抗体も包含し、IgGおよびそのサブクラス、IgM、IgE、IgA、およびIgDを含む、任意のクラスまたはサブクラスの抗体を含む。

20

【0234】

いくつかの態様において、抗原結合タンパク質、抗体、およびその抗原結合フラグメントは、全長抗体の抗原を特異的に認識する。いくつかの態様において、抗体の重鎖および軽鎖は全長であり得る、または抗原結合部分（Fab、F(ab')₂、Fv、または単鎖Fvフラグメント（scFv））であり得る。他の態様において、抗体重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、およびIgEから選択され、具体的には、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から、より具体的には、IgG1（例えば、ヒトIgG1）から選択される。別の態様において、抗体軽鎖定常領域は、例えば、カッパまたはラムダ、特にカッパから選択される。

30

【0235】

提供される抗体の中には、抗体フラグメントがある。「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の部分を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントの例には、これらに限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab' SH、F(ab')₂；ダイアボディ；線状抗体；可変重鎖（V_H）領域、単鎖抗体分子、例えばscFvおよびシングルドメインV_Hシングル抗体など；ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれる。特定の態様において、抗体は、可変重鎖領域および/または可変軽鎖領域を含む単鎖抗体フラグメント、例えばscFvなどである。

40

【0236】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に關与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。ネイティブな抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、V_HおよびV_L）は概して、類似する構造を有しており、各ドメインは4つの保存されるフレームワーク領域（FR）および3つのCDRを含む（例えば、Kindt et al. Kub y Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照のこと）。単一のV_HまたはV_Lドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定

50

の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体由来の V_H または V_L ドメインを用いて相補的な V_H または V_L ドメインのライブラリーをそれぞれスクリーニングして、単離され得る。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880 887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624 628 (1991) を参照のこと。

【0237】

シングルドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部を含む抗体フラグメントである。ある特定の態様において、シングルドメイン抗体は、ヒトシングルドメイン抗体である。いくつかの態様において、CARは、抗原、例えば、標的とされるべき細胞または疾患、例えば腫瘍細胞またはがん細胞などのがんマーカーまたは細胞表面抗原、例えば、本明細書に記載のまたは当技術分野において公知の標的抗原のいずれかなどに特異的に結合する、抗体重鎖ドメインを含む。

10

【0238】

抗体フラグメントは、これらには限定されないが、インタクトな抗体のタンパク質消化ならびに組換え宿主細胞による産生を含む、様々な技法により製造することができる。いくつかの態様において、抗体は、組換え生成フラグメント、例えば天然に生じない配置を含むフラグメントなど、例えばペプチドリンカーなどの合成リンカーによって連結された2つ以上の抗体領域および鎖を有するもの、または天然に生じるインタクトな抗体の酵素消化によって生成することができない配置を含むフラグメントなどである。いくつかの態様において、抗体フラグメントはscFvである。

20

【0239】

「ヒト化」抗体は、すべてのまたは実質的にすべてのCDRアミノ酸残基が非ヒトCDRに由来し、かつすべてのまたは実質的にすべてのFRアミノ酸残基がヒトFRに由来する抗体である。ヒト化抗体は任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けて、典型的にはヒトに対する免疫原性が低下する一方で、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保持している、非ヒト抗体の変異体を指す。いくつかの態様において、ヒト化抗体における一部のFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を回復または向上させるために、非ヒト抗体（例えば、CDR残基が由来する抗体）由来の対応する残基と置換される。

【0240】

したがって、いくつかの態様において、TCR様CARを含むキメラ抗原受容体は、抗体または抗体フラグメントを含む細胞外部分を含む。いくつかの態様において、抗体またはフラグメントはscFvを含む。いくつかの局面において、キメラ抗原受容体は、抗体またはフラグメントを含む細胞外部分および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0241】

いくつかの態様において、組換え受容体、例えばCAR、例えばその抗体部分は、スペーサーをさらに含み、スペーサーは、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分またはその変種もしくは変異体、例えばヒンジ領域、例えばIgG4ヒンジ領域ならびに/またはCH1/CLおよび/もしくはFc領域を含む。いくつかの態様において、定常領域または一部分は、ヒトIgG、例えばIgG4またはIgG1のものである。いくつかの局面において、定常領域の一部は、抗原認識構成成分、例えばscFvと膜貫通ドメインとの間のスペーサー領域として役立つ。スペーサーは、スペーサーが存在しない場合と比較して、抗原結合後の細胞の応答性を増加させる長さのものであってよい。いくつかの例において、スペーサーは、12アミノ酸長もしくは約12アミノ酸長または12アミノ酸長以下である。例示的なスペーサーには、少なくとも約10~229アミノ酸、約10~200アミノ酸、約10~175アミノ酸、約10~150アミノ酸、約10~125アミノ酸、約10~100アミノ酸、約10~75アミノ酸、約10~50アミノ酸、約10~40アミノ酸、約10~30アミノ酸、約10~20アミノ酸、または約10~15アミノ酸（列挙された範囲の任意の端点間の任意の整数を含む）を有するものが含まれる。いくつかの態様において、スペーサー領域は約12個以下のアミノ酸、約119個以下のアミノ酸、または約229個以下のアミノ酸を有する。例示的なスペーサーは、IgG4ヒンジのみ、CH2およ

40

50

びCH3ドメインに連結されたIgG4ヒンジ、またはCH3ドメインに連結されたIgG4ヒンジを含む。例示的なスペーサーは、Hudecek et al, (2013) Clin Cancer Res. 19: 3153または国際特許出願公開W02014/031687に記載のものを含むがそれらに限定されない。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:70に示される配列を有し、SEQ ID NO:71に示される配列によりコードされる。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:72に示される配列を有する。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:73に示される配列を有する。

【0242】

いくつかの態様において、定常領域またはその一部分はIgDのものである。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:74に示される配列を有する。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:70、72、73、および74のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上または少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する。

【0243】

この抗原認識ドメインは一般に、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達構成成分、例えば、CARの場合であればTCRコンジュゲートなどの抗原受容体コンジュゲートを介する活性化を模倣し、かつ/または別の細胞表面受容体を通してシグナル伝達するシグナル伝達構成成分などに、連結される。したがって、いくつかの態様において、抗原結合構成成分（例えば、抗体）は、1つまたは複数の膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは細胞外ドメインに融合される。1つの態様では、受容体、例えばCAR中のドメインの1つに天然で付随している膜貫通ドメインが使用される。場合によっては、膜貫通ドメインは、受容体コンジュゲートの他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのそのようなドメインの結合を回避するように選択され、またはアミノ酸置換によって修飾される。

【0244】

膜貫通ドメインはいくつかの態様において、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来する。供給源が天然である場合、ドメインはいくつかの局面において、任意の膜結合型タンパク質または膜貫通タンパク質に由来する。膜貫通領域には、T細胞受容体のアルファ、ベータ、またはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、および/またはCD154に由来する（すなわち、少なくともその膜貫通領域を含む）ものが含まれる。あるいは、膜貫通ドメインはいくつかの態様において合成による。いくつかの局面において、合成膜貫通ドメインは、主に、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含む。いくつかの局面において、合成膜貫通ドメインの各末端には、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが見出されるであろう。いくつかの態様において、連結はリンカー、スペーサー、および/または膜貫通ドメインによる。

【0245】

細胞内シグナル伝達ドメインには、天然抗原受容体を介するシグナル、共刺激受容体と組み合わせられたそのような受容体を介するシグナル、および/または共刺激受容体のみを介するシグナルを模倣するか、またはそれらに近似するものが含まれる。いくつかの態様では、短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、例えば2~10アミノ酸長のリンカー、例えばグリシンおよびセリン（例えば、グリシン セリンダブレット）を含有するものなどが存在し、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成する。

【0246】

受容体、例えばCARは、一般に、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達構成成分または細胞内シグナル伝達構成成分群を含む。いくつかの態様において、受容体は、TCRコンジュ

10

20

30

40

50

ゲートの細胞内構成成分、例えばT細胞活性化および細胞傷害性を媒介するTCR CD3鎖など、例えばCD3ゼータ鎖を含む。したがって、いくつかの局面において、ROR1結合抗体は1つまたは複数の細胞シグナル伝達モジュールに連結される。いくつかの態様において、細胞シグナル伝達モジュールは、CD3膜貫通ドメイン、CD3細胞内シグナル伝達ドメイン、および/または他のCD膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、受容体、例えばCARは、Fc受容体、CD8、CD4、CD25、またはCD16などの1つまたは複数の付加的な分子の一部をさらに含む。例えば、いくつかの局面において、CARまたは他のキメラ受容体は、CD3ゼータ (CD3) またはFc受容体 とCD8、CD4、CD25、またはCD16とのキメラ分子を含む。

【0247】

いくつかの態様では、CARの連結時に、CARの細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫細胞、例えばCARを発現するように操作されたT細胞、の正常なエフェクター機能または応答の少なくとも1つを活性化する。例えば、状況によっては、CARは、細胞溶解活性またはTヘルパー活性などといったT細胞の機能、例えばサイトカインまたは他の因子の分泌などを誘導する。いくつかの態様では、例えば、抗原受容体構成成分または共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインの切断された部分が、エフェクター機能シグナルを伝達するのであれば、インタクトな免疫刺激鎖の代わりにそれが使用される。いくつかの態様において、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体 (TCR) の細胞質配列を含み、いくつかの局面では、天然状況においてそのような受容体と協調して作用して、抗原受容体会合後にシグナル伝達を開始させる、共受容体、および/もしくはそのような分子の任意の誘導體または変異体の細胞質配列、ならびに/または同じ機能を有する合成配列も、含む。

【0248】

天然のTCRの状況において、完全な活性化は一般に、TCRを介するシグナル伝達のみならず、共刺激シグナルも必要とする。したがって、いくつかの態様では、完全な活性化を促進するために、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生成するための構成成分もまたCARに含まれる。他の態様において、CARは、共刺激シグナルを生成するための構成成分を含まない。いくつかの局面では、同じ細胞中で付加的なCARが発現され、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生成するための構成成分を提供する。

【0249】

T細胞活性化は、いくつかの局面において、2つのクラスの細胞質シグナル伝達配列：TCRを介する抗原依存性一次活性化を開始するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）；および抗原非依存的様式で作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供するもの（二次細胞質シグナル伝達配列）によって媒介されると説明される。いくつかの局面において、CARは、そのようなシグナル伝達構成成分の一方または両方を含む。

【0250】

いくつかの局面において、CARは、TCRコンジュゲートの一次活性化を調節する一次細胞質シグナル伝達配列を含む。刺激様式で作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシン活性化モチーフまたはITAMとして公知であるシグナル伝達モチーフを含有し得る。ITAM含有一次細胞質シグナル伝達配列の例には、TCRもしくはCD3ゼータ、FcRガンマ、またはFcRベータに由来するものが含まれる。いくつかの態様において、CAR中の細胞質シグナル伝達分子は、CD3ゼータ由来の、細胞質シグナル伝達ドメイン、その一部、または配列を含有する。

【0251】

いくつかの態様において、CARは、CD28、41BB、OX40、DAP10、およびICOSなどの共刺激受容体のシグナル伝達ドメインおよび/または膜貫通部分を含む。いくつかの局面では、同じCARが活性化構成成分と共刺激構成成分の両方を含む。

【0252】

いくつかの態様では、活性化ドメインが1つのCAR内に含まれる一方で、共刺激構成成分は、別の抗原を認識する別のCARによって提供される。いくつかの態様において、CARは、

10

20

30

40

50

いずれも同じ細胞上に発現される活性化または刺激CAR、および共刺激CARを含む（W02014/055668を参照されたい）。

【0253】

ある特定の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3（例えば、CD3 ゼータ）細胞内ドメインに連結されたCD28膜貫通およびシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ細胞内ドメインに連結されたキメラCD28およびCD137（4 1BB、TNFRSF9）共刺激ドメインを含む。

【0254】

いくつかの態様において、CARは、細胞質部分において、1つまたは複数の、例えば2つまたはそれ以上の、共刺激ドメインおよび活性化ドメイン、例えば一次活性化ドメインを包含する。例示的なCARは、CD3 ゼータ、CD28、および4 1BBの細胞内構成成分を含む。

10

【0255】

場合により、CARは、第1世代CAR、第2世代CAR、および/または第3世代CARと称される。いくつかの局面において、第1世代CARは、抗原結合時にCD3鎖誘導性シグナルを単に提供するものであり；いくつかの局面において、第2世代CARは、そのようなシグナルおよび共刺激シグナルを提供するもの、例えばCD28またはCD137などの共刺激受容体からの細胞内シグナリングドメインを含むものであり；いくつかの局面において、第3世代CARは、異なる共刺激受容体の複数の共刺激ドメインを含むものである。

【0256】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、本明細書に記載の抗体またはフラグメントを含む細胞外部分を含む。いくつかの局面において、キメラ抗原受容体は、本明細書に記載の抗体またはフラグメントを含む細胞外部分、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、抗体またはフラグメントは、scFvまたはシングルドメインV_H抗体を含み、細胞内ドメインはITAMを含有する。いくつかの局面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ゼータ（CD3 ）鎖のゼータ鎖のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する膜貫通ドメインを含む。

20

【0257】

いくつかの局面において、膜貫通ドメインは、CD28の膜貫通部分を含む。細胞外ドメインおよび膜貫通は直接的にまたは間接的に連結することができる。いくつかの態様において、細胞外ドメインおよび膜貫通は、スペーサー、例えば本明細書に記載のいずれかなどによって連結される。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、例えば、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間などに、T細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含む。いくつかの局面において、T細胞共刺激分子はCD28または41BBである。

30

【0258】

いくつかの態様において、CARは、抗体、例えば抗体フラグメント、CD28の膜貫通部分またはその機能的変異体であるかまたはそれを含む膜貫通ドメイン、ならびにCD28のシグナル伝達部分またはその機能的変異体およびCD3ゼータのシグナル伝達部分またはその機能的変異体を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、CARは、抗体、例えば抗体フラグメント、CD28の膜貫通部分またはその機能的変異体であるかまたはそれを含む膜貫通ドメイン、ならびに4 1BBのシグナル伝達部分またはその機能的変異体およびCD3ゼータのシグナル伝達部分またはその機能的変異体を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかのそのような態様において、受容体は、Ig分子、例えばヒトIg分子などの一部分、例えばIgヒンジなど、例えば、IgG4ヒンジを含むスペーサー、例えばヒンジのみのスペーサーなどをさらに含む。

40

【0259】

いくつかの態様において、受容体、例えばCARの膜貫通ドメインは、ヒトCD28の膜貫通ドメインまたはその変異体、例えば、ヒトCD28（アクセッション番号：P10747.1）の27アミノ酸膜貫通ドメインであるか、またはSEQ ID NO: 77に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:77に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、

50

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む膜貫通ドメインであり；いくつかの態様において、組換え受容体の膜貫通ドメイン含有部分は、SEQ ID N 0: 78に示されるアミノ酸の配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくはそれを上回る配列同一性を有するアミノ酸の配列を含む。

【0260】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、T細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含む。いくつかの局面において、T細胞共刺激分子はCD28または41BBである。

【0261】

いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD28の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的変異体またはその部分、例えば、その41アミノ酸ドメインおよび/またはネイティブなCD28タンパク質の186~187位にLLからGGへの置換を有するそのようなドメインなどを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 79もしくは80に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 79もしくは80に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含むことができる。いくつかの態様において、細胞内ドメインは、41BBの細胞内共刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的変異体もしくは部分、例えばヒト41BB（アクセッション番号 Q07011.1）の42アミノ酸細胞質ドメインまたはその機能的変異体もしくは部分など、例えば、SEQ ID NO: 81に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 81に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

【0262】

いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3ゼータ刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的変異体、例えば、ヒトCD3（アクセッション番号: P20963.2）のアイソフォーム3の112 AA細胞質ドメインまたは米国特許第7,446,190号または米国特許第8,911,993号に記載されているようなCD3ゼータシグナル伝達ドメインなどを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 82、83、もしくは84に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 82、83、もしくは84に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

【0263】

いくつかの局面において、スペーサーは、IgGのヒンジ領域のみ、例えばIgG4またはIgG1のヒンジのみ、例えばSEQ ID NO:70に示されるヒンジのみのスペーサーを含む。他の態様において、スペーサーは、CH2ドメインおよび/またはCH3ドメインに連結された、Igヒンジ、例えば、IgG4ヒンジである。いくつかの態様において、スペーサーは、CH2ドメインおよび/またはCH3ドメインに連結された、Igヒンジ、例えば、IgG4ヒンジであり、例えばSEQ ID NO:73などに示される。いくつかの態様において、スペーサーは、CH3ドメインのみに連結された、Igヒンジ、例えば、IgG4ヒンジであり、例えばSEQ ID NO:72などに示される。いくつかの態様において、スペーサーは、グリシン セリンに富む配列または公

10

20

30

40

50

知の可動性リンカーなど他の可動性リンカーであるかまたはそれを含む。

【0264】

2. T細胞受容体

いくつかの態様において、標的ポリペプチドのペプチドエピトープまたはT細胞エピトープ、例えば、腫瘍、ウイルス、または自己免疫タンパク質の抗原などを認識するT細胞受容体（TCR）またはその抗原結合部分を発現する、操作された細胞、例えばT細胞などが提供される。

【0265】

いくつかの態様において、「T細胞受容体」または「TCR」は、可変鎖および鎖（それぞれTCR およびTCR としても公知）もしくは可変鎖および鎖（それぞれTCR およびTCR としても公知）、またはその抗原結合部分を含む分子であり、MHC分子に結合しているペプチドに特異的に結合することができる。いくつかの態様において、TCRは形態である。典型的には、形態および形態で存在するTCRは概して、構造的に類似しているが、それらを発現するT細胞は、異なる解剖学的位置または機能を有し得る。TCRは、細胞の表面上でまたは可溶性形態で見出すことができる。概して、TCRはT細胞（またはTリンパ球）の表面上に認められ、ここで、TCRは概して、主要組織適合性複合体（MHC）分子に結合している抗原を認識する役割を担う。

【0266】

別段の記載がない限り、「TCR」という用語は、全TCRならびにその抗原結合部分または抗原結合フラグメントを包含すると理解されるべきである。いくつかの態様において、TCRは、インタクトなTCRまたは全長TCRであり、形態または形態でのTCRが含まれる。いくつかの態様において、TCRは、全長TCRより小さいが、MHC分子に結合している特異的ペプチドに結合する、例えばMHC ペプチド複合体などに結合する、抗原結合部分である。いくつかの場合には、TCRの抗原結合部分またはフラグメントは、全長TCRまたはインタクトなTCRの構造ドメインの一部のみを含み得るが、全TCRが結合するペプチドエピトープ、例えばMHC ペプチド複合体などに依然として結合することができる。いくつかの場合には、抗原結合部分は、特定のMHC ペプチド複合体への結合のための結合部位を形成するのに十分な、TCRの可変ドメイン、例えばTCRの可変鎖および可変鎖などを含む。概して、TCRの可変鎖は、ペプチド、MHC、および/またはMHC ペプチド複合体の認識に関与する相補性決定領域を含む。

【0267】

いくつかの態様において、TCRの可変ドメインは、一般に、抗原認識能力および結合能力ならびに特異性の要因となる、超可変ループ、または相補性決定領域（CDR）を含む。いくつかの態様において、TCRのCDRまたはそれらの組み合わせは、所与のTCR分子のすべてのまたは実質的にすべての抗原結合部位を形成する。TCR鎖の可変領域内の種々のCDRは、CDRと比較してTCR分子の中で低い可変性を概して示す、フレームワーク領域（FR）によって隔てられる（例えば、Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988を参照のこと；Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003も参照のこと）。いくつかの態様において、CDR3は、抗原結合または特異性を担う主なCDRであるか、または抗原認識にとっておよび/またはペプチド MHC複合体の処理されたペプチド部分との相互作用にとって、所与のTCR可変領域上の3つのCDRの中で最も重要である。いくつかの状況において、アルファ鎖のCDR1は、ある特定の抗原性ペプチドのN末端部分と相互作用することができる。いくつかの状況において、ベータ鎖のCDR1は、ペプチドのC末端部分と相互作用することができる。いくつかの状況において、CDR2は、MHC ペプチド複合体のMHC部分との相互作用またはその認識に最も強力に寄与するか、またはそれを担う主なCDRである。いくつかの態様において、鎖の可変領域は、さらなる超可変領域（CDR4またはHVR4）を含有することができ、それは概して、スーパー抗原結合に関与し、抗原認識には関与しない（Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411 426）。

【0268】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、TCRは、定常ドメイン、膜貫通ドメイン、および/または短い細胞質尾部も含むことができる（例えば、Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997を参照のこと）。いくつかの局面において、TCRの各鎖は、1つのN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、およびC末端に短い細胞質尾部を保有し得る。いくつかの態様において、TCRは、シグナル伝達を媒介するのに関与するCD3複合体のインバリアントタンパク質に関連する。

【0269】

いくつかの態様において、TCR鎖は1つまたは複数の定常ドメインを含む。例えば、所与のTCR鎖（例えば、鎖または鎖）の細胞外部分は、2つの免疫グロブリン様ドメイン、例えば可変ドメイン（例えば、V またはV ; 典型的には、Kabatの番号付け Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.に基づくアミノ酸1から116）および細胞膜に近接する定常ドメイン（例えば、鎖定常ドメインもしくはC、典型的には、Kabatの番号付けに基づく該鎖の117位から259位、または鎖定常ドメインもしくはC、典型的にはKabatに基づく該鎖の117位から295位）などを含むことができる。例えば、いくつかの場合には、2つの鎖によって形成されるTCRの細胞外部分は、2つの膜に近位の定常ドメイン、および可変ドメインがそれぞれCDRを含有する2つの膜に遠位の可変ドメインを含有する。TCRの定常ドメインは、システイン残基がジスルフィド結合を形成し、それによってTCRの2つの鎖を連結する、短い連結配列を含有してもよい。いくつかの態様において、TCRは、定常ドメインに2つのジスルフィド結合を含有するように、および鎖のそれぞれにさらなるシステイン残基を有してもよい。

【0270】

いくつかの態様において、TCR鎖は膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは正電荷を持つ。いくつかの場合には、TCR鎖は細胞質尾部を含む。いくつかの場合には、該構造は、TCRをCD3およびそのサブユニットのような他の分子と会合させる。例えば、膜貫通領域を有する定常ドメインを含むTCRは、細胞膜中にタンパク質を固定して、CD3シグナル伝達装置または複合体のインバリアントサブユニットと会合してもよい。CD3シグナル伝達サブユニット（例えば、CD3鎖、CD3鎖、CD3鎖、およびCD3鎖）の細胞内尾部は、TCR複合体のシグナル伝達能に関与する、1つまたは複数の免疫受容体チロシン活性化モチーフまたはITAMを含む。

【0271】

いくつかの態様において、TCRは、2つの鎖 および （または任意で および ）のヘテロ二量体であってもよく、または単一鎖TCR構築物であってもよい。いくつかの態様において、TCRは、1つまたは複数のジスルフィド結合などによって連結される2つの別個の鎖（ および 鎖または および 鎖 ）を含むヘテロ二量体である。

【0272】

いくつかの態様において、TCRは、実質的に全長のコード配列が容易に入手可能である、公知のTCR配列、例えばV鎖、V鎖の配列などから作製することができる。細胞供給源から、V鎖配列を含む、全長TCR配列を得るための方法は周知である。いくつかの態様において、TCRをコードする核酸は、所与の細胞内のもしくは該細胞から単離されるTCRコード核酸のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、または公的に入手可能なTCR DNA配列の合成などによって、多様な供給源から得ることができる。

【0273】

いくつかの態様において、TCRは、生物学的供給源、例えば、T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）などの細胞、T細胞ハイブリドーマ、または他の公的に入手可能な供給源などから得られる。いくつかの態様において、T細胞はインビボで単離した細胞から得ることができる。いくつかの態様において、TCRは胸腺で選択されたTCRである。いくつかの態様において、TCRはネオエピトープ拘束性TCRである。いくつかの態様において、T細胞は、培養したT細胞ハイブリドーマまたはクローンであり得る。いくつかの態様において、TCRま

たはその抗原結合部分は、TCRの配列の知識から合成的に作製することができる。

【0274】

いくつかの態様において、TCRは、標的ポリペプチド抗原またはその標的T細胞エピトープに対する候補TCRのライブラリーのスクリーニングから同定または選択されたTCRから作製される。TCRライブラリーは、PBMC、脾臓、または他のリンパ器官に存在する細胞を含む、対象から単離されたT細胞からのV_H およびV_L のレパートリーの増幅によって作製することができる。いくつかの場合には、T細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）から増幅することができる。いくつかの態様において、TCRライブラリーは、CD4+細胞またはCD8+細胞から作製することができる。いくつかの態様において、TCRは、正常な健全な対象のT細胞供給源、すなわち、正常なTCRライブラリーから増幅することができる。いくつかの態様において、TCRは、疾患状態の対象のT細胞供給源、すなわち、疾患状態のTCRライブラリーから増幅することができる。いくつかの態様において、縮重プライマーが、ヒトから得られた試料、例えばT細胞などにおけるRT-PCRなどによって、V_H およびV_L の遺伝子レパートリーを増幅するために用いられる。いくつかの態様において、scTvライブラリーは、増幅産物がクローン化されているかまたはリンカーによって分離されるように構築されている、ナイーブなV_H ライブラリーおよびV_L ライブラリーから構築することができる。対象の供給源および細胞に応じて、ライブラリーはHLAアレル特異的であり得る。あるいは、いくつかの態様において、TCRライブラリーは、親またはスキャホールドTCR分子の突然変異誘発または多様化によって作製することができる。いくつかの局面において、TCRは、例えば鎖または鎖の突然変異誘発などによる、定向進化に供される。いくつかの局面において、TCRのCDR内の特定の残基が変更される。いくつかの態様において、選択されたTCRは親和性成熟によって改変することができる。いくつかの態様において、抗原特異的T細胞は、例えば、ペプチドに対するCTL活性を評価するスクリーニングなどによって、選択されてもよい。いくつかの局面において、TCR、例えば抗原特異的T細胞上に存在するTCRは、例えば、結合活性、例えば抗原に対する特定の親和性またはアビディティなどによって、選択されてもよい。

【0275】

いくつかの態様において、TCRまたはその抗原結合部分は、改変または操作されているものである。いくつかの態様において、定向進化法が、例えば、特定のMHCペプチド複合体に対して高い親和性を有するなど、変更された特性を有するTCRを作製するために用いられる。いくつかの態様において、定向進化は、これらに限定されないが、酵母ディスプレイ（Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92）、ファージディスプレイ（Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54）、またはT細胞ディスプレイ（Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84）を含む、ディスプレイ法によって達成される。いくつかの態様において、ディスプレイアプローチは、公知TCR、親TCR、または参照TCRを操作するまたは改変することを伴う。例えば、いくつかの場合には、野生型TCRが、CDRの1つまたは複数の残基が変異されている突然変異誘発TCRを生成させるための鋳型として用いることができ、所望の標的抗原に対するより高い親和性などの所望の変更された特性を有する変異体が選択される。

【0276】

いくつかの態様において、関心対象のTCRを生成または作製するのに使用するための標的ポリペプチドのペプチドは公知であるか、または当業者によって容易に特定することができる。いくつかの態様において、TCRまたは抗原結合部分の作製での使用に適するペプチドは、関心対象の標的ポリペプチド、例えば以下に記載する標的ポリペプチドなどにおけるHLA拘束性モチーフの存在に基づき判定することができる。いくつかの態様において、ペプチドは、当業者に公知のコンピュータ予測モデルを用いて特定される。いくつかの態様において、MHCクラスI結合部位を予測するための、そのようなモデルには、これらに限定されないが、ProPred1（Singh and Raghava (2001) Bioinformatics 17 (12) :1236-1237、およびSYFPEITHI（Schuler et al. (2007) Immunoinformatics Methods in Mole

10

20

30

40

50

cular Biology, 409 (1) : 75 93 2007を参照のこと)が含まれる。いくつかの態様において、MHC拘束性エペトープはHLA A0201であり、全白色人種のおよそ39~46%に発現し、したがって、TCRまたは他のMHCペプチド結合分子を調製する使用に適したMHC抗原の選択となる。

【0277】

コンピュータ予測モデルを用いるHLA A0201結合モチーフならびにプロテアソームおよび免疫プロテアソームのための切断部位は、当業者に公知である。MHCクラスI結合部位を予測するための、そのようなモデルには、これらに限定されないが、ProPred1 (Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA DR binding sites. BIOINFORMATICS 17 (12) : 1236 1237 2001においてより詳細に記載される)、およびSYFPEITHI (Schuler et al. SY FPEITHI, Database for Searching and T Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409 (1) : 75 93 2007を参照のこと)が含まれる。

10

【0278】

いくつかの態様において、TCRまたはその抗原結合部分は、1つまたは複数の特性、例えば結合特性などが変更されている、組換え産生された天然タンパク質またはその変異形態であってもよい。いくつかの態様において、TCRは、ヒト、マウス、ラット、または他の哺乳動物など、種々の動物種の1つに由来してもよい。TCRは細胞に結合していてもよく、または可溶性形態であってもよい。いくつかの態様において、提供される方法のために、TCRは細胞の表面上に発現した細胞結合形態である。

20

【0279】

いくつかの態様において、TCRは全長TCRである。いくつかの態様において、TCRは抗原結合部分である。いくつかの態様において、TCRは二量体TCR (dTCR) である。いくつかの態様において、TCRは単鎖TCR (sc TCR) である。いくつかの態様において、dTCRまたはsc TCRは、WO 03/020763、WO 04/033685、WO2011/044186に記載されるような構造を有する。

【0280】

いくつかの態様において、TCRは膜貫通配列に対応する配列を含む。いくつかの態様において、TCRは細胞質配列に対応する配列を含む。いくつかの態様において、TCRはCD3とTCR複合体を形成することができる。いくつかの態様において、dTCRまたはscTCRを含むTCRのいずれかは、T細胞の表面上に活性TCRをもたらすシグナル伝達ドメインに連結することができる。いくつかの態様において、TCRは細胞の表面上に発現する。

30

【0281】

いくつかの態様において、dTCRは、TCR 鎖可変領域配列に対応する配列がTCR 鎖定常領域細胞外配列に対応する配列のN末端に融合されている第1のポリペプチド、およびTCR 鎖可変領域配列に対応する配列がTCR 鎖定常領域細胞外配列に対応する配列のN末端に融合されている第2のポリペプチドを含み、第1および第2のポリペプチドはジスルフィド結合によって連結される。いくつかの態様において、結合は、ネイティブ二量体 TCR中に存在するネイティブな鎖間ジスルフィド結合に相当し得る。いくつかの態様において、鎖間ジスルフィド結合はネイティブTCR中に存在しない。例えば、いくつかの態様において、1つまたは複数のシステインを、dTCRポリペプチド対の定常領域細胞外配列内に組み入れることができる。いくつかの場合には、ネイティブジスルフィド結合および非ネイティブジスルフィド結合の両方が望ましい可能性がある。いくつかの態様において、TCRは、膜に固定するための膜貫通配列を含有する。

40

【0282】

いくつかの態様において、dTCRは、可変 ドメイン、定常 ドメイン、および定常 ドメインのC末端に付着させた第1の二量体形成モチーフを含むTCR 鎖、ならびに可変 ドメイン、定常 ドメイン、および定常 ドメインのC末端に付着させた第1の二量体形成モチーフを含むTCR 鎖を含み、ここで、第1および第2の二量体形成モチーフは容易に相互作用して、第1の二量体形成モチーフにおけるアミノ酸と、TCR 鎖およびTCR 鎖共に連結している第2の二量体形成モチーフにおけるアミノ酸との間に共有結合を形成する。

50

【0283】

いくつかの態様において、TCRはscTCRである。典型的には、scTCRは当業者に公知の方法を用いて作製することができる、例えば、Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 47 59 (1992); Wulfing, C. and Pluckthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); 国際公開PCT番号WO 96/13593、WO 96/1810 5、WO99/60120、WO99/18129、W003/020763、W02011/044186; およびSchlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996)を参照のこと。いくつかの態様において、scTCRは、TCR鎖の会合を促進するために、導入された非ネイティブジスルフィド鎖間結合を含有する(例えば、国際公開PCT番号WO 03/020763を参照のこと)。いくつかの態様において、scTCRは、そのC末端に融合された異種ロイシンジッパーが鎖会合を促進する、非ジスルフィド結合切断型TCRである(例えば、国際公開PCT番号WO99/60120を参照のこと)。いくつかの態様において、scTCRは、ペプチドリンカーを介してTCR 可変ドメインに共有結合されたTCR 可変ドメインを含む(例えば、国際公開PCT第WO99/18129)。

10

【0284】

いくつかの態様において、scTCRは、TCR 鎖可変領域に対応するアミノ酸配列によって構成される第1のセグメント、TCR 鎖定常ドメイン細胞外配列に対応するアミノ酸配列のN末端に融合されたTCR 鎖可変領域配列に対応するアミノ酸配列によって構成される第2のセグメント、および第1のセグメントのC末端を第2のセグメントのN末端に連結するリンカー配列を含む。

20

【0285】

いくつかの態様において、scTCRは、鎖細胞外定常ドメイン配列のN末端に融合された鎖可変領域配列によって構成される第1のセグメント、および鎖の細胞外定常配列および膜貫通配列の配列のN末端に融合された鎖可変領域配列によって構成される第2のセグメント、および任意で、第1のセグメントのC末端を第2のセグメントのN末端に連結するリンカー配列を含む。

20

【0286】

いくつかの態様において、scTCRは、鎖細胞外定常ドメイン配列のN末端に融合されたTCR 鎖可変領域配列によって構成される第1のセグメント、および鎖細胞外定常配列および膜貫通配列の配列のN末端に融合された鎖可変領域配列によって構成される第2のセグメント、および任意で、第1のセグメントのC末端を第2のセグメントのN末端に連結するリンカー配列を含む。

30

【0287】

いくつかの態様において、第1のTCRセグメントと第2のTCRセグメントとを連結するscTCRのリンカーは、単一ポリペプチド鎖を形成する一方で、TCR結合特異性を保持することができる任意のリンカーであり得る。いくつかの態様において、リンカー配列は、例えば、式PAAAPを有してもよく、式中、Pはプロリンであり、かつAAIは、アミノ酸がグリシンおよびセリンであるアミノ酸配列である。いくつかの態様において、第1のセグメントおよび第2のセグメントは、その可変領域配列がそのような結合に適応するように対を形成する。したがって、いくつかの場合には、リンカーは、第1のセグメントのC末端と第2のセグメントのN末端との間、またその逆、の距離をつなぐのに十分な長さを有するが、scTCRの標的リガンドへの結合を妨げるまたは低下させるほど長くはない。いくつかの態様において、リンカーは、10から45アミノ酸または約10から約45アミノ酸、例えば10から30アミノ酸または26から41アミノ酸残基、例えば29、30、31または32アミノ酸を含み得る。いくつかの態様において、リンカーは、式PGGG(SGGGG)Pを有し、式中、Pはプロリンであり、Gはグリシンであり、かつSはセリンである(SEQ ID NO:89)。いくつかの態様において、リンカーは、配列GSADDAKKDAAKKGKS (SEQ ID NO:90)

40

を有する。

【0288】

いくつかの態様において、scTCRは、鎖の定常ドメインの免疫グロブリン領域の残基

50

を鎖の定常ドメインの免疫グロブリン領域の残基に連結する共有結合性ジスルフィド結合を含有する。いくつかの態様において、ネイティブTCRにおける鎖間ジスルフィド結合は存在しない。例えば、いくつかの態様において、1つまたは複数のシステインを、scTCRポリペプチドの第1および第2のセグメントの定常領域細胞外配列に組み入れることができる。いくつかの場合には、ネイティブなおよび非ネイティブなジスルフィド結合の両方が望ましい可能性がある。

【0289】

導入された鎖間ジスルフィド結合を含むdTCRまたはscTCRのいくつかの態様において、ネイティブなジスルフィド結合は存在しない。いくつかの態様において、ネイティブな鎖間ジスルフィド結合を形成するネイティブなシステインの1つ複数は、セリンまたはアラニンなどの別の残基に置換される。いくつかの態様において、導入されたジスルフィド結合は、第1および第2のセグメント上の非システイン残基をシステインに変異させることによって形成することができる。TCRの例示的な非ネイティブなジスルフィド結合は、公開された国際PCT番号W02006/000830に記載される。

【0290】

いくつかの態様において、TCRまたはその抗原結合フラグメントは、 $10^5 \sim 10^{12}$ Mまたは約 10^5 から約 10^{12} Mおよびこれらの中にあるすべての個別の値および範囲の標的抗原に対する平衡結合定数による親和性を示す。いくつかの態様において、標的抗原はMHCペプチド複合体またはリガンドである。

【0291】

いくつかの態様において、鎖および鎖などのTCRをコードする核酸は、PCR、クローニング、または他の適した手段によって増幅され、適した発現ベクター内にクローニングすることができる。発現ベクターは、任意の適した組換え発現ベクターであってよく、任意の適した宿主を形質転換またはトランスフェクトするために用いることができる。適したベクターには、繁殖および増大のためにまたは発現のためにまたはその両方のために設計されたベクター、例えばプラスミドおよびウイルスなどが含まれる。

【0292】

いくつかの態様において、ベクターは、pUCシリーズ (Fermentas Life Sciences)、pBluescriptシリーズ (Stratagene, LaJolla, Calif.)、pETシリーズ (Novagen, Madison, Wis.)、pGEXシリーズ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)、またはpEXシリーズ (Clontech, Palo Alto, Calif.) のベクターであり得る。いくつかの場合には、バクテリアオフジャーベクター、例えば、G10、GT11、ZapII (Stratagene)、EMBL4、およびNM1149等も用いることができる。いくつかの態様において、植物発現ベクターを用いることができ、これらには、pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121、およびpBIN19 (Clontech) が含まれる。いくつかの態様において、動物発現ベクターには、pEUK CI、pMAM、およびpMAMneo (Clontech) が含まれる。いくつかの態様において、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクターが用いられる。

【0293】

いくつかの態様において、組換え発現ベクターは、標準的な組換えDNA技術を用いて調製することができる。いくつかの態様において、ベクターは、必要に応じて、かつベクターがDNAベースまたはRNAベースであるかどうかを考慮して、調節配列、例えば、転写コドン、翻訳開始コドン、および停止コドンなどを含むことができ、これらの配列は、ベクターが導入されるべき宿主のタイプ (例えば、細菌、真菌、植物、または動物) に特異的である。いくつかの態様において、ベクターは、TCRまたは抗原結合部分 (または他のMHCペプチド結合分子) をコードするヌクレオチド配列に機能的に連結される非ネイティブなプロモーターを含むことができる。いくつかの態様において、プロモーターは、非ウイルスプロモーターまたはウイルスプロモーター、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター、およびマウス幹細胞ウイルスの末端反復配列において見出されるプロモーターなどであり得る。当業者に公知の他のプロモーターも企図される。

10

20

30

40

50

【0294】

いくつかの態様において、TCRコードするベクターを作製するために、鎖および鎖は、関心対象のTCRを発現するT細胞クローンから単離された総cDNAからPCR増幅され、発現ベクター内にクローニングされる。いくつかの態様において、鎖および鎖は、同じベクター内にクローニングされる。いくつかの態様において、鎖および鎖は異なるベクター内にクローニングされる。いくつかの態様において、作製された鎖および鎖は、レトロウイルス、例えば、レンチウイルスのベクター内に組み入れられる。

【0295】

3. キメラ自己抗体受容体 (CAAR)

いくつかの態様において、組換え受容体はキメラ自己抗体受容体 (CAAR) である。いくつかの態様において、CAARは自己抗体に特異的である。いくつかの態様において、CAARを発現する細胞、例えばCAARを発現するように操作されたT細胞などは、自己抗体発現細胞に特異的に結合してそれらを死滅させるが、正常な抗体発現細胞にはそうしないように用いることができる。いくつかの態様において、CAAR発現細胞は、自己抗原の発現に関連している自己免疫疾患、例えば自己免疫疾患などを処置するために用いることができる。いくつかの態様において、CAAR発現細胞は、最終的に自己抗体を産生し、その細胞表面上に自己抗体を示すB細胞を標的とし、治療的介入のための疾患特的な標的としてこれらのB細胞に印をつけることができる。いくつかの態様において、CAAR発現細胞は、抗原特異的キメラ自己抗体受容体を用いて、疾患を引き起こすB細胞を標的とすることによって、自己免疫疾患において病原性B細胞を効率的に標的とし死滅させるために用いることができる。いくつかの態様において、組換え受容体はCAAR、例えば、米国特許出願公開第US 2017/0051035号に記載のいずれかなどである。

【0296】

いくつかの態様において、CAARは、自己抗体結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達領域を含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達領域は細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン、T細胞において一次活性化シグナルを誘発することができるシグナル伝達ドメイン、T細胞受容体 (TCR) 構成成分のシグナル伝達ドメイン、および/または免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含むシグナル伝達ドメインであるか、またはそれらを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達領域は、二次または共刺激シグナル伝達領域 (二次細胞内シグナル伝達領域) を含む。

【0297】

いくつかの態様において、自己抗体結合ドメインは、自己抗原またはそのフラグメントを含む。自己抗原の選択は、標的とされる自己抗体のタイプによって左右され得る。例えば、自己抗原は、特定の疾患状態、例えば、自己抗体媒介性自己免疫疾患などの自己免疫疾患に関連している標的細胞、例えばB細胞など、上の自己抗体を認識するために、選択されてもよい。いくつかの態様において、自己免疫疾患には、尋常性天疱瘡 (PV) が含まれる。例示的な自己抗原には、デスモグレイン1 (Dsg1) およびDsg3が含まれる。

【0298】

B. 核酸およびベクター

細胞表面コンジュゲートおよび組換え受容体をコードするポリヌクレオチド (核酸分子)、そのようなコンジュゲートおよび受容体が発現するように細胞を遺伝子操作するためのベクター、および操作された細胞を作製するための方法が提供される。

【0299】

いくつかの態様において、本明細書において提供される細胞表面コンジュゲートのいずれかをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、単一コード配列、例えば細胞表面コンジュゲートをコードするコード配列のみ、を含む。他の例において、ポリヌクレオチドは、少なくとも2種類の異なるコード配列、例えば、細胞表面コンジュゲートをコードする第1の核酸配列および組換え受容体をコードする第2の核酸配列などを含む。いくつかの局面において、組換え受容体は、キメラ

抗原受容体 (CAR) であるか、またはそれを含む。いくつかの局面において、組換え受容体はT細胞受容体 (TCR)、例えば、トランスジェニックTCRなどであるか、またはそれを含む。いくつかの局面において、組換え受容体はキメラ自己抗体受容体 (CAAR) であるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドおよびベクターは、細胞表面コンジュゲートおよび組換え受容体の細胞における同時発現のために用いられる。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、細胞の表面上に発現することができる細胞表面コンジュゲートをコードする。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートをコードする核酸は、細胞外部分および膜貫通部分を含む細胞表面分子をコードする。

【0300】

いくつかの場合には、コンジュゲートをコードする核酸配列は、シグナルペプチドをコードするシグナル配列を含む。いくつかの局面において、シグナル配列は、ネイティブな細胞表面分子に由来するシグナルペプチドをコードしてもよい。他の局面において、シグナル配列は、異種のまたは非ネイティブなシグナルペプチド、例えば、SEQ ID NO: 48に示されかつSEQ ID NO:47に示されるヌクレオチド配列によってコードされるGMCSFRアルファ鎖の例示的シグナルペプチドなどをコードしてもよい。

10

【0301】

いくつかの場合には、キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸配列は、シグナルペプチドをコードするシグナル配列を含む。非限定的な例示的なシグナルペプチドの例には、例えば、SEQ ID NO: 48に示されるGMCSFRアルファ鎖シグナルペプチドまたはSEQ ID NO:75に示されるCD8アルファシグナルペプチドが含まれる。

20

【0302】

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートおよび/または組換え受容体をコードするポリヌクレオチドは、細胞表面コンジュゲートおよび/または組換え受容体の発現を制御するように機能的に連結されている少なくとも1つのプロモーターを含む。いくつかの例において、ポリヌクレオチドは、細胞表面コンジュゲートおよび/または組換え受容体の発現を制御するように機能的に連結された2、3、またはそれらを上回るプロモーターを含む。

【0303】

核酸分子が2種類以上の異なるポリペプチド鎖をコードするある特定の場合において、ポリペプチド鎖の各々は、別個の核酸分子によってコードされ得る。例えば、2つの別個の核酸が提供され、各々は細胞における発現のために細胞内に個々に移入または導入され得る。

30

【0304】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチドが第1および第2の核酸配列を含むものなど、異なるポリペプチド鎖の各々をコードするコード配列は、プロモーターに機能的に連結される可能性があり、該プロモーターは同じまたは異なる可能性がある。いくつかの態様において、核酸分子は、2種類以上の異なるポリペプチド鎖の発現を駆動するプロモーターを含むことができる。いくつかの態様において、そのような核酸分子は、マルチシストロン性 (バイシストロン性またはトリシストロン性、例えば米国特許第6,060,273号を参照のこと) であり得る。いくつかの態様において、転写単位は、単一プロモーターからのメッセージによって遺伝子産物 (例えば、コンジュゲートをコードする遺伝子産物および組換え受容体をコードする遺伝子産物) の同時発現を可能にする、IRES (配列内リボソーム進入部位) を含有するバイシストロン性単位として操作され得る。あるいは、いくつかの場合には、単一プロモーターは、単一のオープンリーディングフレーム (ORF) 中に、自己切断ペプチド (例えば、2A配列) またはプロテアーゼ認識部位 (例えば、フェーリン) をコードする配列によって互いに分離される2つまたは3つの遺伝子 (例えば、コンジュゲートをコードする遺伝子および組換え受容体をコードする遺伝子) を含むRNAの発現に方向付けてもよい。よって、ORFは、翻訳時 (2Aの場合には) または翻訳後のいずれかに、個別のタンパク質にプロセッシングされる、単一のポリペプチドをコードする。いくつかの場合には、T2Aなどのペプチドは、リボソームに2AエレメントのC末端でのペプチド結合

40

50

の合成をさせず（リボソームスキップ）、2A配列の末端と次のペプチド下流との間を分離させることができる（例えば、de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) and deFelipe et al. Traffic 5:616 626 (2004) を参照のこと）。多数の2Aエレメントが当技術分野において公知である。これらに限定されないが、本明細書において開示される方法およびシステムにおいて用いることができる2A配列の例は、米国特許公開第20070116690号に記載されているような、口蹄疫ウイルス（F2A、例えば、SEQ ID NO: 88）、ウマ鼻炎Aウイルス（E2A、例えば、SEQ ID NO: 87）、ゾセア・アシグナ（*Thosea asigna*）ウイルス（T2A、例えば、SEQ ID NO: 43またはSEQ ID NO:76）、およびブタテッシュウウイルス1（P2A、例えば、SEQ ID NO: 85または86）からの2A配列である。

【0305】

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートおよび/または組換え受容体をコードするポリヌクレオチドは、例えば、レトロウイルス形質導入、トランスフェクション、または形質転換などによって、培養細胞を含有する組成物内に導入される。

【0306】

ポリヌクレオチドのセットまたは組み合わせもまた提供される。いくつかの態様において、セットまたは組み合わせは、細胞表面コンジュゲート、例えば本明細書において記載されるいずれかなどをコードする核酸を含む第1のポリヌクレオチド、および組換え受容体をコードする核酸を含む第2のポリヌクレオチドを含む。ポリヌクレオチドのそのようなセットまたは組み合わせを含有する組成物もまた提供される。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドのセットまたは組み合わせは、細胞の操作のために一緒に用いられる。いくつかの態様において、セットにおける第1のおよび第2のポリヌクレオチドは、操作のために細胞内に任意の順番で、同時にまたは連続して導入される。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲート、例えば本明細書に記載されるいずれかなどをコードする核酸を含む第1のポリヌクレオチド、およびキメラ受容体および/または組換え抗原受容体をコードする核酸を含む第2のポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドのセットが存在する。

【0307】

そのような核酸分子を含有するベクターまたは構築物もまた提供される。いくつかの態様において、ベクターまたは構築物は、その発現を駆動するようにポリペプチドまたは受容体をコードするヌクレオチドに機能的に連結された1つまたは複数のプロモーターを含む。いくつかの態様において、プロモーターは、1つまたは2つ以上の核酸分子に機能的に連結される。よって、本明細書において提供されるポリヌクレオチドのいずれかを含有するような、ベクターも提供される。いくつかの場合には、ベクターは、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターである。

【0308】

ベクターのセットまたは組み合わせも提供される。いくつかの態様において、ベクターのセットまたは組み合わせは第1のベクターおよび第2のベクターを含み、ここで、第1のベクターは、第1のポリヌクレオチド、例えば、細胞表面コンジュゲートをコードする第1のポリヌクレオチドを含み、かつ第2のベクターは、組換え受容体、例えば、CARをコードする第2のポリヌクレオチドを含む。そのようなベクターのセットまたは組み合わせを含む組成物もまた提供される。いくつかの態様において、ベクターのセットまたは組み合わせは、細胞の操作のために一緒に用いられる。いくつかの態様において、セット中の第1および第2のベクターは、操作のために細胞内に任意の順番で、同時にまたは連続して導入される。

【0309】

いくつかの態様において、ベクターには、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスもしくはレンチウイルスベクター、非ウイルスベクターまたはトランスポゾン、例えば、Sleeping Beautyトランスポゾンシステム、シミアンウイルス40（SV40）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）に由来するベクター、レンチウイルスベクターまたはレ

10

20

30

40

50

トロウイルスベクター、例えばガンマレトロウイルスベクター、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV)、マウス胚性幹細胞ウイルス (MESV)、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、脾フォーカス形成ウイルス (SFFV)、もしくはアデノ随伴ウイルス (AAV) に由来するレトロウイルスベクターなど、が含まれる。

【0310】

本明細書において記載される細胞表面コンジュゲートおよび/または組換え受容体のいずれかは、任意の組み合わせまたは配置で、細胞表面コンジュゲートおよび/または組換え受容体をコードする1つまたは複数の核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされ得る。例えば、1つ、2つ、3つ、またはそれを上回るポリヌクレオチドは、1つ、2つ、3つ、またはそれを上回る異なるポリペプチド、例えば、細胞表面コンジュゲートおよび/または組換え受容体をコードすることができる。いくつかの態様において、1つのベクターまたは構築物は、細胞表面コンジュゲートをコードする核酸配列を含み、別個のベクターまたは構築物は、組換え受容体、例えば、CARをコードする核酸配列を含む。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートをコードする核酸および組換え受容体をコードする核酸は、2つの異なるプロモーターに機能的に連結される。いくつかの態様において、組換え受容体をコードする核酸は、細胞表面コンジュゲートをコードする核酸の下流に存在する。

【0311】

C. 操作のための細胞および細胞の調製

細胞、例えば、本明細書に記載されているような、細胞表面コンジュゲートおよび/または操作された組換え受容体を含む細胞などもまた提供される。そのような細胞の集団、そのような細胞を含むおよび/またはそのような細胞について濃縮された組成物もまた提供され、例えば、ここで、細胞表面コンジュゲートおよび/または組換え受容体、例えばキメラ受容体を発現する細胞は、組成物またはある特定の型の細胞、例えばT細胞またはCD8+もしくはCD4+細胞などにおいて総細胞の少なくとも50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、またはそれを上回るパーセントを構成する。組成物には、薬学的組成物、および養子細胞療法などのための投与用の製剤が含まれる。対象、例えば患者に細胞および組成物を投与するための治療方法もまた提供される。

【0312】

したがって、細胞表面コンジュゲートおよび/または組換え受容体 (例えば、CAR) を発現する、遺伝子操作された細胞もまた提供される。標的細胞を含む組成物に含まれる細胞は、通常、真核生物細胞、例えば哺乳動物細胞であり、典型的に、ヒト細胞である。いくつかの態様において、細胞は、血液、骨髄、リンパもしくはリンパ器官由来であるか、免疫系の細胞、例えば自然もしくは適応免疫の細胞、例えば骨髄もしくは典型的にはT細胞および/もしくはNK細胞であるリンパ球を含むリンパ細胞である。他の例示的な細胞は、幹細胞、例えば複能性および多能性幹細胞を含み、人工多能性幹細胞 (iPSC) を含む。細胞は典型的に、初代細胞、例えば対象から直接単離されたおよび/または対象から単離され凍結された細胞である。いくつかの態様において、細胞は、T細胞または他の細胞型の1つまたは複数のサブセット、例えば、総T細胞集団、CD4+細胞、CD8+細胞およびそれらのサブ集団、例えば機能、活性化状態、成熟度、分化、増大、再循環、局在化および/もしくは持続性に関する能力、抗原特異性、抗原受容体のタイプ、特定器官もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、ならびに/または分化度により定義されるものを含む。処置される対象に関して、細胞は、同種および/または自己であり得る。特にこの方法は、既製の方法を含む。いくつかの局面において、例えば既製品技術に関して、細胞は、多能性および/または複能性細胞、例えば幹細胞、例えば人工多能性幹細胞 (iPSC) である。いくつかの態様において、この方法は、対象から細胞を単離する工程、本明細書に記載されるようにそれらを調製、処理、培養および/または改変する工程、ならびに凍結保存の前または後にそれらを同一患者に再導入する工程を含む。

【0313】

特に、T細胞ならびにノまたはCD4+およびノもしくはCD8+ T細胞のサブタイプおよびサブ集団は、ナイーブT (TN) 細胞、エフェクターT細胞 (TEFF)、メモリーT細胞およびこれらのサブタイプ、例えば幹細胞メモリーT (TSCM)、セントラルメモリーT (TCM)、エフェクターメモリーT (TEM) または最終分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、未成熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT (MAIT) 細胞、自然および適応調節性T (Treg) 細胞、ヘルパーT細胞、例えばTH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞、アルファ/ベータT細胞、ならびにデルタ/ガンマT細胞である。

【0314】

いくつかの態様において、細胞は、ナチュラルキラー (NK) 細胞である。いくつかの態様において、細胞は、単球または顆粒球、例えば骨髄細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、肥満細胞、好酸球およびノまたは好塩基球である。

10

【0315】

いくつかの態様において、細胞は、遺伝子操作により導入された1種または複数種の核酸を含み、それによってそのような核酸の組換え産物または遺伝子操作された産物を発現する。いくつかの態様において、核酸は異種であり、すなわち細胞中または細胞から得られた試料中に通常は存在せず、例えば別の生物または細胞から得られるものであり、これは例えば操作される細胞およびノまたはそのような細胞の由来元の生物には通常は見出されない。いくつかの態様において、核酸は天然に存在せず、例えば自然界には見出されない核酸などであり、これには複数の異なる細胞型からの様々なドメインをコードする核酸のキメラ組み合わせを含むものが含まれる。

20

【0316】

いくつかの態様において、操作された細胞の調製は、1回または複数回の培養およびノまたは調製工程を含む。細胞表面コンジュゲートおよびノまたは組換え受容体 (例えば、CAR) の導入のための細胞は、試料、例えば生物学的試料、例えば対象から得られたまたは対象由来のものから単離され得る。いくつかの態様において、細胞を単離する対象は、疾患もしくは状態を有する者または細胞療法を必要とする者または細胞療法を受けるであろう者である。対象は、いくつかの態様において、特定の治療的介入、例えばそのために細胞を単離、処理およびノまたは改変する養子細胞療法を必要とするヒトである。

【0317】

したがって、細胞は、いくつかの態様において、初代細胞、例えば初代ヒト細胞である。試料は、組織、体液および対象から直接採取された他の試料ならびに1つまたは複数の処理工程、例えば分離、遠心分離、遺伝子操作 (例えば、ウイルスベクターを用いた形質導入)、洗浄およびノまたはインキュベートから得られる試料を含む。生物学的試料は、生物学的供給源から直接得られる試料または処理された試料であり得る。生物学的試料は、それら由来の処理された試料を含む、体液、例えば血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗、組織および器官試料を含むがこれらに限定されない。

30

【0318】

いくつかの局面において、細胞がそれに由来するまたは細胞がそこから単離される試料は、血液もしくは血液由来試料である、またはアフエレーシスもしくは白血球アフエレーシス産物であるもしくはそれ由来である。例示的な試料は、全血、末梢血単核細胞 (PBMC)、白血球、骨髄、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、腸関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、他のリンパ組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、頸部、精巣、卵巣、扁桃腺もしくは他の器官、およびノまたはそれら由来の細胞を含む。試料は、細胞療法、例えば養子細胞療法に関して、自己および同種源由来の細胞を含む。

40

【0319】

いくつかの態様において、細胞は、細胞株、例えばT細胞株由来である。細胞は、いくつかの態様において、異種供給源から、例えばマウス、ラット、非ヒト霊長類またはブタから得られる。

50

【0320】

いくつかの態様において、細胞の単離は、1つまたは複数の調製および/または非親和性に基づく細胞分離工程を含む。いくつかの例において、細胞は、例えば望まない成分を除去するため、望む成分を濃縮するため、特定の試薬に対する感受性を有する細胞を溶解または除去するために、1つまたは複数の試薬の存在下で、洗浄、遠心分離および/またはインキュベートされる。いくつかの態様において、細胞は、1つまたは複数の特性、例えば密度、接着特性、サイズ、特定の成分に対する感受性および/または耐性に基づき分離される。

【0321】

いくつかの例において、細胞は対象の循環血から、例えばアフエーシスまたは白血球アフエーシスによって得られる。試料は、いくつかの局面において、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球および/または血小板を含むリンパ球を含み、いくつかの局面において、赤血球および血小板以外の細胞を含む。

10

【0322】

いくつかの態様において、対象から回収された血液細胞は、例えば血漿画分を除去するためおよび細胞をその後の処理工程のための適当な緩衝液または培地に入れるために洗浄される。いくつかの態様において、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄される。いくつかの態様において、洗浄溶液は、カルシウムおよび/もしくはマグネシウムならびに/または多くのもしくはすべての二価カチオンを含まない。いくつかの局面において、洗浄工程は、半自動化「フロースルー」型遠心分離装置(例えば、Cobe 2991細胞処理装置、Baxter)を製造元の指示にしたがって用いて達成される。いくつかの局面において、洗浄工程は、タンジェンシャルフロー濾過(TFF)を製造元の指示にしたがって用いて達成される。いくつかの態様において、細胞は、洗浄後に様々な生体適合性緩衝液、例えばCa⁺⁺/Mg⁺⁺非含有PBSに再懸濁される。特定の態様において、血液細胞試料の成分は除去され、細胞は培養培地に直接再懸濁される。

20

【0323】

いくつかの態様において、この方法は、密度に基づく細胞分離方法、例えば、赤血球の溶解およびPercollまたはFicoll勾配を通じた遠心分離による末梢血からの白血球の調製、を含む。

【0324】

いくつかの態様において、単離方法は、1つまたは複数の特定分子、例えば表面マーカー、例えば、表面分子もしくは表面タンパク質、細胞内マーカーまたは核酸の細胞内での発現または存在に基づく異なる細胞型の分離を含む。いくつかの態様において、そのようなマーカーに基づく任意の公知の分離方法が使用され得る。いくつかの態様において、分離は、親和性または免疫親和性に基づく分離である。例えば、単離は、いくつかの局面において、1つまたは複数のマーカー、典型的には細胞表面マーカー、表面分子、もしくは表面タンパク質の発現または発現レベルに基づく、細胞および細胞集団の分離を含み、例えば、そのようなマーカーに特異的に結合する抗体または結合パートナーとインキュベートすること、ならびに通常はその後の洗浄工程および抗体または結合パートナーに結合していない細胞から抗体または結合パートナーに結合した細胞を分離することによる分離を含む。

30

40

【0325】

そのような分離工程は、試薬に結合した細胞がさらなる使用のために維持される正選択、および/または抗体もしくは結合パートナーに結合しなかった細胞が維持される負選択に基づき得る。いくつかの例において、両方の画分が、さらなる使用のために維持される。いくつかの局面において、負選択は、異種集団内である細胞型を特異的に特定する抗体が利用可能でない場合に特に有用であり得、分離は、望まれる集団以外の細胞により発現されるマーカーに基づき最適に実施される。

【0326】

分離は、特定の細胞集団または特定のマーカーを発現する細胞の100%濃縮または除去

50

を必要とするものではない。例えば、特定型の細胞、例えばあるマーカーを発現するそれらの正選択または濃縮は、そのような細胞の数またはパーセンテージの増加を表すが、それはそのマーカーを発現しない細胞が完全に存在しないことを必要とするものではない。同様に、特定型の細胞、例えばあるマーカーを発現する細胞の負選択、除去または排除は、そのような細胞の数またはパーセンテージの減少を表すが、すべてのそのような細胞が完全に除去されることを必要とするものではない。

【0327】

いくつかの例において、1回の工程から正または負選択された画分を、別の分離工程、例えば後続の正または負選択に供する、複数回の分離工程が実施される。いくつかの例において、1回の分離工程は、複数のマーカーを同時に発現する細胞を、例えば、各々が負選択の標的となるマーカーに特異的な複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、排除し得る。同様に、様々な細胞型において発現される複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞型が同時に正選択され得る。

10

【0328】

例えば、いくつかの局面において、T細胞の特定のサブ集団、例えば、1つまたは複数の表面マーカーについて陽性であるかまたはそれを高レベルで発現する細胞、例えば、CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺および/またはCD45RO⁺ T細胞が、正または負選択技術によって単離される。

【0329】

例えば、CD3⁺、CD28⁺ T細胞は、抗CD3/抗CD28コンジュゲート磁気ビーズ（例えば、DYN ABEADS（登録商標）M 450 CD3/CD28 T Cell Expander）を用いて正選択され得る。

20

【0330】

いくつかの態様において、単離は、正選択による特定の細胞集団の濃縮、または負選択による特定の細胞集団の排除によって、実施される。いくつかの態様において、正または負選択は、それぞれ正または負選択される細胞において発現される（マーカー⁺）かまたは相対的に高いレベルで発現される（マーカー^高）1つまたは複数の表面マーカーに特異的に結合する1つまたは複数の抗体または他の結合物質と共に細胞をインキュベートすることによって達成される。

【0331】

いくつかの態様において、T細胞は、非T細胞、例えばB細胞、単球または他の白血球において発現されるマーカー、例えばCD14の負選択によってPBMC試料から分離される。いくつかの局面において、CD4⁺またはCD8⁺選択工程は、CD4⁺ヘルパーおよびCD8⁺細胞傷害性T細胞を分離するために使用される。そのようなCD4⁺またはCD8⁺集団はさらに、1つまたは複数のナイーブ、メモリーおよび/またはエフェクターTサブ集団において発現されるかまたは相対的に高い程度発現されるマーカーについての正または負選択によってサブ集団に分類され得る。

30

【0332】

いくつかの態様において、CD8⁺細胞はさらに、例えばそれぞれのサブ集団に関連する表面抗原に基づく正または負選択によって、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリーおよび/またはセントラルメモリー幹細胞について濃縮される、またはそれらを排除される。いくつかの態様において、セントラルメモリーT（T_{CM}）細胞の濃縮は、効能を高めるために、例えば投与後の長期間の生存、増大および/または生着を改善するために実施され、それは、いくつかの局面において、そのようなサブ集団において特に確実である。Terakura et al. (2012) Blood.1:72 82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689 701を参照のこと。いくつかの態様において、TCM濃縮CD8⁺ T細胞およびCD4⁺ T細胞の混合は、効果をさらに向上させる。

40

【0333】

態様において、メモリーT細胞は、CD8⁺末梢血リンパ球のCD62L⁺およびCD62L⁻の両サブセットに存在する。PBMCは、例えば抗CD8および抗CD62L抗体を用いて、CD62L⁺CD8⁺および

50

／もしくはCD62L⁺CD8⁺画分について濃縮され得るまたはそれらを排除され得る。

【0334】

いくつかの態様において、セントラルメモリーT (TCM) 細胞についての濃縮は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3および／またはCD127の陽性または高い表面発現に基づき、いくつかの局面において、それはCD45RAおよび／またはグランザイムBを発現するまたは高度に発現する細胞についての負選択に基づく。いくつかの局面において、TCM細胞について濃縮されたCD8⁺集団の単離は、CD4、CD14、CD45RAを発現する細胞の排除およびCD62Lを発現する細胞についての正選択または濃縮によって実施される。1つの局面において、セントラルメモリーT (TCM) 細胞についての濃縮は、CD4発現に基づいて選択された細胞の負画分から出発し、これがCD14およびCD45RAの発現に基づく負選択およびCD62Lに基づく正選択に供されることによって実施される。そのような選択は、いくつかの局面において、同時に実施され、他の局面においては、いずれかの順で順次実施される。いくつかの局面において、CD8⁺細胞集団またはサブ集団を調製するのに使用したのと同じCD4発現に基づく選択設定が、CD4⁺細胞集団またはサブ集団を生成するためにも使用され、したがってCD4に基づく分離からの正および負の両画分が維持され、任意で1回または複数回のさらなる正または負選択工程を行った後に、この方法の後続の工程において使用される。

10

【0335】

特定の例において、PBMCの試料または他の白血球試料は、CD4⁺細胞の選択に供され、ここで、負画分および正画分の両方が保持される。次いで、負画分は、CD14およびCD45RAまたはROR1の発現に基づく負選択、およびセントラルメモリーT細胞のマーカー特性、例えばCD62LまたはCCR7に基づく正選択に供され、ここで、負選択および正選択はいずれの順番でも実施される。

20

【0336】

CD4⁺ Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することによって、ナイーブ、セントラルメモリーおよびエフェクター細胞に分類される。CD4⁺リンパ球は、標準的な方法によって取得され得る。いくつかの態様において、ナイーブCD4⁺ Tリンパ球は、CD45RO、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺ T細胞である。いくつかの態様において、セントラルメモリーCD4⁺細胞は、CD62L⁺およびCD45RO⁺である。いくつかの態様において、エフェクターCD4⁺細胞は、CD62L⁺およびCD45RO⁺である。

【0337】

1つの例において、負選択によりCD4⁺細胞について濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは典型的に、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA DRおよびCD8に対する抗体を含む。いくつかの態様において、抗体または結合パートナーは、正および／または負選択により細胞を分離できるよう、固体支持体またはマトリクス、例えば磁気ビーズまたは常磁性ビーズに結合される。例えば、いくつかの態様において、細胞および細胞集団は、(Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17 25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher (著作権) Humana Press Inc., Totowa, NJで概説されている) 免疫磁気(または親和性磁気)分離技術を用いて分離または単離される。

30

【0338】

いくつかの局面において、分離される細胞の試料または組成物は、小さな、磁化可能なまたは磁気反応性の材料、例えば磁気反応粒子または微粒子、例えば常磁性ビーズ(例えば、DynabeadsまたはMACSビーズ)と共にインキュベートされる。磁気反応性材料、例えば粒子は、通常、分離が望まれる、例えば負または正選択されることが望まれる、細胞、細胞群または細胞集団に存在する分子、例えば表面マーカーに特異的に結合する結合パートナー、例えば抗体に、直接的または間接的に付着される。

40

【0339】

いくつかの態様において、磁気粒子またはビーズは、特異的結合メンバー、例えば抗体または他の結合パートナーに結合された磁気反応性材料を含む。多くの周知の磁気反応性材料が、磁気分離方法において使用される。適当な磁気粒子は、参照により本明細書に組

50

み入れられるMoldayの米国特許第4,452,773号および欧州特許明細書EP 452342 Bに記載されるものを含む。コロイド状のサイズ指定された粒子、例えばOwenの米国特許第4,795,698号およびLibertiらの米国特許第5,200,084号に記載されるものが、他の例である。

【0340】

インキュベートは通常、磁気粒子またはビーズに付着された、抗体もしくは結合パートナーまたはそのような抗体もしくは結合パートナーに特異的に結合する分子、例えば二次抗体もしくは他の試薬が、試料中の細胞上に存在する場合に細胞表面分子に特異的に結合する条件下で、実施される。

【0341】

いくつかの局面において、試料は磁場に置かれ、磁気反応性または磁化可能粒子が付着された細胞は、磁石に誘引され、非標識細胞から分離される。正選択の場合、磁石に誘引される細胞が維持され、負選択の場合、誘引されない細胞（非標識細胞）が維持される。いくつかの局面において、同じ選択工程の間に正および負選択の組み合わせが実施され、正および負画分が維持され、さらに処理されるかまたはさらなる分離工程に供される。

10

【0342】

特定の態様において、磁気反応性粒子は、一次抗体もしくは他の結合パートナー、二次抗体、レクチン、酵素またはストレプトアビジンでコーティングされる。特定の態様において、磁気粒子は、1つまたは複数のマーカーに特異的な一次抗体のコーティングを通じて細胞に付着される。特定の態様において、ビーズではなく細胞が、一次抗体または結合パートナーによって標識され、次いで細胞型特異的な二次抗体または他の結合パートナー（例えばストレプトアビジン）でコーティングされた磁気粒子が添加される。特定の態様において、ストレプトアビジンコーティングされた磁気粒子が、ビオチニル化された一次または二次抗体と組み合わせて使用される。

20

【0343】

いくつかの態様において、磁気反応性粒子は、その後にインキュベート、培養および/または改変される細胞に付着したまま維持され、いくつかの局面において、粒子は、患者に投与するための細胞に付着したまま維持される。いくつかの態様において、磁化可能または磁気反応性粒子は、細胞から除去される。細胞から磁化可能粒子を除去する方法は公知であり、例えば、競合する非標識抗体、磁化可能粒子または切断可能なリンカーにコンジュゲートされた抗体等の使用を含む。いくつかの態様において、磁化可能粒子は、生分解性である。

30

【0344】

いくつかの態様において、親和性に基づく選択は、磁気活性化細胞選別（MACS）（Milt enyi Biotec, Auburn, CA）を通じた選択である。磁気活性化細胞選別（MACS）システムは、磁化粒子が付着した細胞の高純度選択を実現する。特定の態様において、MACSは、外部磁場の適用後に非標的種および標的種が順次溶出される様式で動作する。すなわち、磁化粒子に付着した細胞はその場で維持され、非付着種が溶出する。次いで、この第1の溶出工程が完了した後に、磁場内で捕捉され溶出を妨げられていた種が、溶出し回収され得るよう何らかの様式で自由にされる。特定の態様において、非標的細胞は、標識され、異種細胞集団から排除される。

40

【0345】

特定の態様において、単離または分離は、この方法の単離、細胞調製、分離、処理、インキュベート、培養および/または製剤化工程の1つまたは複数を実施するシステム、デバイスまたは装置を用いて実施される。いくつかの局面において、システムは、閉鎖または滅菌環境下でこれらの工程の各々を実施するよう、例えば、失敗、使用者による操作および/または混入を最小限に抑えるよう、使用される。1つの例において、システムは、国際特許出願公開番号W02009/072003またはUS 20110003380 A1に記載されるシステムである。

【0346】

いくつかの態様において、システムまたは装置は、統合型もしくは内蔵型システム内で

50

および/または自動もしくはプログラム可能方式で、単離、処理、改変および製剤化工程の1つまたは複数、例えばすべてを実施する。いくつかの局面において、システムまたは装置は、使用者が処理、単離、改変および製剤化工程の結果をプログラム、制御、評価できるならびに/またはそれらの工程の様々な局面を調節できるようにする、システムまたは装置と連携するコンピュータおよび/またはコンピュータプログラムを含む。

【0347】

いくつかの局面において、分離および/または他の工程は、例えば、閉鎖滅菌システムにおける臨床規模レベルでの細胞の自動分離のために、CliniMACSシステム (Miltenyi Biotec) を用いて実施される。構成要素は、統合マイクロコンピュータ、磁気分離ユニット、蠕動ポンプおよび様々なピンチ弁を含み得る。統合コンピュータは、いくつかの局面において、機器のすべての構成要素を制御し、繰り返される手順を標準化された順でシステムに実施させる。磁気分離ユニットは、いくつかの局面において、可動式永久磁石および選択カラム用ホルダーを含む。蠕動ポンプは、配管一式を通じて流速を制御し、ピンチ弁と共に、システムを通る緩衝液の流れの制御および細胞の継続的な分離を確実にする。

【0348】

CliniMACSシステムは、いくつかの局面において、滅菌、非発熱性溶液で供給される抗体結合磁化可能粒子を使用する。いくつかの態様において、細胞が磁気粒子で標識された後、過剰な粒子を除去するために細胞は洗浄される。その後、細胞調製バッグが配管一式に接続され、これがさらに緩衝液を含むバッグおよび細胞回収バッグに接続される。配管一式は、プレカラムおよび分離カラムを含む組み立て済み滅菌管からなり、一回使いきりである。分離プログラムの開始後、システムは自動的に細胞試料を分離カラムに投入する。標識された細胞はカラム内で維持され、非標識細胞は一連の洗浄工程によって除去される。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法において使用される細胞集団は標識されず、カラム内で維持されない。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法において使用される細胞集団は標識され、カラム内で維持される。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法において使用される細胞集団は、磁場の除去後にカラムから流出され、細胞回収バッグに回収される。

【0349】

特定の態様において、分離および/または他の工程は、CliniMACS Prodigyシステム (Miltenyi Biotec) を用いて実施される。CliniMACS Prodigyシステムは、いくつかの局面において、遠心分離による細胞の自動洗浄および分画を可能にする細胞処理ユニットを装備している。CliniMACS Prodigyシステムはまた、オンボードカメラおよび巨視的なソース細胞産物の層を識別することによって最適な細胞分画エンドポイントを決定する画像認識ソフトウェアを含み得る。例えば、末梢血は、自動的に赤血球、白血球および血漿層に分離され得る。CliniMACS Prodigyシステムはまた、細胞培養プロトコル、例えば細胞の分化および増大、抗原添加および長期的細胞培養を行う統合型細胞培養チャンバーを含み得る。投入口は、培地の無菌的除去および補充を可能にし得、細胞は統合型顕微鏡を用いてモニターされ得る。例えば、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651 660、Terakura et al. (2012) Blood. 1:72 82、およびWang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689 701を参照のこと。

【0350】

いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞集団は、複数の細胞表面マーカーについて染色された細胞が流体の流れで運搬されるフローサイトメトリーを通じて、回収および濃縮 (または排除) される。いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞集団は、調製目的 (FACS) 選別を通じて回収および濃縮 (または排除) される。特定の態様において、本明細書に記載される細胞集団は、FACSに基づく検出システムと組み合わせた微小電気機械システム (MEMS) チップの使用によって回収および濃縮 (または排除) される (例えば、WO 2010/033140、Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567 1573; および Godin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355 376を参照のこと)。両方の例において、細胞は、十分に定義されたT細胞サブセットの高純度の単離が可能ないように複数のマーカー

で染色され得る。

【0351】

いくつかの態様において、抗体また結合パートナーは、正および/または負選択のための分離を容易にするために、1つまたは複数の検出マーカーで標識される。例えば、分離は、蛍光標識された抗体への結合に基づき得る。いくつかの例において、1つまたは複数の細胞表面マーカーに特異的な抗体または他の結合パートナーの結合に基づく細胞の分離は、例えば調製目的（FACS）を含む蛍光活性化細胞選別（FACS）および/または例えばフローサイトメトリー検出システムと組み合わせた微小電気機械システム（MEMS）チップによって、流体の流れの中で実施される。そのような方法は、複数のマーカーに基づく同時の正および負選択を可能にする。

10

【0352】

いくつかの態様において、調製方法は、単離、インキュベートおよび/または改変の前または後のいずれかに、細胞を凍結、例えば凍結保存する工程を含む。いくつかの態様において、凍結およびその後の解冻工程は、細胞集団内の顆粒球および、一定程度、単球を除去する。いくつかの態様において、細胞は、例えば血漿および血小板を除去する洗浄工程の後に、凍結溶液中に懸濁される。いくつかの局面において、任意の様々な公知の凍結溶液およびパラメータが使用され得る。1つの例は、20% DMSOおよび8%ヒト血清アルブミン（HSA）を含むPBSまたは他の適当な細胞凍結培地を使用する。これはその後、DMSOおよびHSAの終濃度がそれぞれ10%および4%となるよう培地で1:1希釈される。細胞はその後、毎分1°の速度で80℃まで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの蒸気相の中で保管される。

20

【0353】

いくつかの態様において、提供される方法には、培養（cultivation）工程、インキュベーション工程、培養（culture）工程、および/または遺伝子操作工程が含まれる。例えば、いくつかの態様において、枯渇細胞集団および培養開始組成物をインキュベートおよび/または操作するための方法が提供される。

【0354】

よって、いくつかの態様において、細胞集団は培養開始組成物中でインキュベートされる。インキュベーションおよび/または操作は、培養容器、例えば、ユニット、チャンバー、ウェル、カラム、チューブ、配管一式、弁、バイアル、培養皿、バッグ、または培養または細胞を培養するための他の容器などにおいて実施されてもよい。

30

【0355】

いくつかの態様において、細胞は、遺伝子改変の前にまたはそれに関連してインキュベートおよび/または培養される。インキュベート工程は、培養（culture）、培養（cultivation）、刺激、活性化および/または繁殖を含み得る。いくつかの態様において、組成物または細胞は、刺激条件または刺激物質の存在下でインキュベートされる。そのような条件は、集団内の細胞の増殖、増大、活性化および/もしくは生存を誘導するよう、抗原曝露を模倣するよう、ならびに/または遺伝子改変のため、例えば組換え抗原受容体の導入のために細胞を準備するよう設計されたものを含む。

【0356】

条件は、特定の培地、温度、酸素量、二酸化炭素量、時間、作用物質、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオンおよび/または刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体および細胞を活性化するよう設計された任意の他の作用物質の1つまたは複数を含み得る。

40

【0357】

いくつかの態様において、刺激条件または作用物質は、TCRコンジュゲートの細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することができる1つまたは複数の作用物質、例えばリガンドを含む。いくつかの局面において、作用物質は、T細胞においてTCR/CD3細胞内シグナル伝達カスケードを起動または始動させる。そのような作用物質は、例えば固体支持体、例えばビーズに結合された、抗体、例えばTCR成分および/もしくは共刺激受容体に特異的

50

なもの、例えば、抗CD3、抗CD28、ならびに／または1つもしくは複数のサイトカインを含み得る。任意で、増大方法はさらに、（例えば、少なくとも約0.5 ng/mlの濃度で）培養培地に抗CD3および／または抗CD28抗体を添加する工程を含み得る。いくつかの態様において、刺激性の作用物質は、IL 2および／またはIL 15、例えば少なくとも約10ユニット/mLのIL 2濃度を含む。

【0358】

いくつかの局面において、インキュベートは、Riddellらに対する米国特許第6,040,177号、Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651 660、Terakura et al. (2012) Blood.1:72 82および／またはWang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689 701に記載されるような技術にしたがい実施される。

10

【0359】

いくつかの態様において、T細胞は、培養開始組成物にフィーダー細胞、例えば非分裂末梢血単核細胞（PBMC）を（例えば、得られる細胞集団が、増大しようとする初期集団内の各Tリンパ球につき少なくとも約5、10、20もしくは40個またはそれ以上のPBMCフィーダー細胞を含むように）添加し、培養物を（例えば、T細胞数が増大されるのに十分な時間）インキュベートすることによって増大される。いくつかの局面において、非分裂フィーダー細胞は、ガンマ線照射されたPBMCフィーダー細胞を含み得る。いくつかの態様において、PBMCは、細胞分裂を防ぐために、約3000～3600ラドの範囲のガンマ線で照射される。いくつかの局面において、フィーダー細胞は、T細胞集団の添加前に培養培地に添加される。

20

【0360】

いくつかの態様において、刺激条件は、ヒトTリンパ球の増殖に適した温度、例えば、少なくとも摂氏約25度、通常少なくとも約30度、および通常摂氏37度もしくは約37度を含む。任意で、インキュベートはさらに、フィーダー細胞としての非分裂EBV形質転換リンパ芽球様細胞（LCL）の添加を含み得る。LCLは、約6000～10,000ラドの範囲のガンマ線で照射され得る。LCLフィーダー細胞は、いくつかの局面において、任意の適当な量、例えば少なくとも約10：1のLCLフィーダー細胞対初期Tリンパ球の比率で提供される。

【0361】

いくつかの態様において、抗原特異的T細胞、例えば抗原特異的CD4+および／またはCD8+ T細胞は、ナイーブまたは抗原特異的Tリンパ球を抗原で刺激することによって得られる。例えば、抗原特異的T細胞株またはクローンは、サイトメガロウイルス抗原に対して、感染対象からT細胞を単離し、細胞をインビトロで同抗原によって刺激することによって生成され得る。

30

【0362】

D. 遺伝子操作のためのベクターおよび方法

遺伝子操作された構成成分、例えば、細胞表面コンジュゲートおよび組換え受容体、例えばCARまたはTCRの導入のための種々の方法は周知であり、提供される方法および組成物によって用いられてもよい。例示的な方法には、ポリペプチドまたは受容体をコードする核酸の移入のためのものが含まれ、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクター、非ウイルスベクターまたはトランスポゾン、例えば、Sleeping Beautyトランスポゾンシステムを介するものが含まれる。遺伝子移入の方法は、形質導入、エレクトロポレーション、または細胞への遺伝子移入をもたらす他の方法を含むことができる。

40

【0363】

いくつかの態様において、遺伝子導入は、例えばサイトカインまたは活性化マーカーの発現によって測定される増殖、生存、および／または活性化などの応答を誘導する刺激剤と培養細胞を混合することなどによって、最初に細胞を刺激し、続いて活性化細胞の形質導入、および臨床適用に十分な数への培養中での増大を行うことによって達成される。

【0364】

状況によっては、刺激因子（例えば、リンホカインまたはサイトカイン）の過剰発現が

50

、対象にとって望まれない結果または低い有効性、例えば、毒性に関連する因子をもたらし得る可能性に対する予防措置が望まれる。したがって、状況によっては、操作された細胞は、養子免疫療法における投与時などに、細胞がインビボで負選択を受け得るようにする遺伝子セグメントを含む。例えば、いくつかの局面において、細胞は、それらが投与された患者のインビボ状態における変化の結果として排除され得るように操作される。負選択可能な表現型は、投与される薬剤、例えば化合物に対する感受性を付与する遺伝子の挿入に起因し得る。負選択可能な遺伝子には、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ (HSV I TK) 遺伝子 (Wigler et al., Cell 2: 223, 1977); 細胞ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子、細胞アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (APRT) 遺伝子、細菌シトシンデアミナーゼ (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)) が含まれる。

10

【 0 3 6 5 】

いくつかの態様において、組換え核酸は、例えば、シミアンウイルス40 (SV40)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV) に由来するベクターなど、組換え感染性ウイルス粒子を用いて、細胞に移入される。いくつかの態様において、組換え核酸は、組換えレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクター、例えばガンマレトロウイルスベクターなどを用いて、T細胞に移入される (例えば、Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28 (10) : 1137 46; Alonso Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29 (11) : 550 557を参照のこと)。

20

【 0 3 6 6 】

いくつかの態様において、レトロウイルスベクター、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV)、マウス胚性幹細胞ウイルス (MESV)、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、脾フォーカス形成ウイルス (SFFV)、またはアデノ随伴ウイルス (AAV) 由来のレトロウイルスベクターは、長い末端反復配列 (LTR) を有する。大部分のレトロウイルスベクターは、マウスレトロウイルスに由来する。いくつかの態様において、レトロウイルスには、任意の鳥類細胞または哺乳動物細胞供給源に由来するものが含まれる。レトロウイルスは典型的に広宿主性であり、広宿主性とは、それらが、ヒトを含むいくつかの種の宿主細胞に感染する能力を有することを意味する。1つの態様では、発現されるべき遺伝子でレトロウイルスの gag、pol、および/または env 配列を置き換える。実例となるレトロウイルス系がいくつか記載されている (例えば、米国特許第5,219,740号; 第6,207,453号; 第5,219,740号; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7: 980 990; Miller, A.D. (1990) Human Gene Therapy 1:5 14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849 852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033 8037; および Boris Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102 109)。

30

【 0 3 6 7 】

レンチウイルス形質導入の方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Wang et al. (2012) J. Immunother. 35 (9): 689 701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637 1644; Verhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506:97 114; および Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497 505に記載されている。

40

【 0 3 6 8 】

いくつかの態様において、組換え核酸は、エレクトロポレーションによってT細胞に導入される (例えば、Chicaybam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298、および Van Tedeboom et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431 1437を参照されたい)。いくつかの態様において、組換え核酸は、転位によってT細胞に導入される (例えば、Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427 437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; および Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115 126を参照されたい)。免疫細胞に遺伝物質を導入し発現させる他の方法には、(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載されているような) リン酸カルシウムトランスフェクション、プロトプラスト融合、カチオン性リポソーム媒介性ト

50

ランスフェクション；タングステン粒子促進性微粒子銃（Johnston, Nature, 346: 776 777 (1990)）、およびリン酸ストロンチウムDNA共沈殿（Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031 2034 (1987)）が含まれる。

【0369】

組換え産物をコードする核酸を導入するための他のアプローチおよびベクターは、例えば国際特許出願公開番号W02014055668および米国特許第7,446,190号に記載されているものである。

【0370】

いくつかの態様では、増大中または増大後のいずれかに、細胞、例えばT細胞に、例えば、細胞表面コンジュゲート、T細胞受容体（TCR）、またはキメラ抗原受容体（CAR）をトランスフェクトしてもよい。所望のポリペプチドまたは受容体の遺伝子を導入するためのこのトランスフェクションは、例えば任意の適切なレトロウイルスベクターを用いて行うことができる。次いで、遺伝子改変された細胞集団を初期刺激（例えば、CD3/CD28刺激）から解放し、その後、例えば新規に導入された受容体を通して第2の型の刺激で刺激することができる。この第2の型の刺激は、ペプチド/MHC分子、遺伝子導入された受容体の同族（架橋）リガンド（例えば、CARの天然リガンド）、または（例えば、受容体内の定常領域を認識することにより）新たな受容体のフレームワーク内に直接結合する任意のリガンド（抗体など）の形態の抗原刺激を含み得る。例えば、Cheadle et al, 「Chimeric antigen receptors for T cell based therapy」 Methods Mol Biol. 2012; 907:645 66またはBarrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333 347 (2014) を参照されたい。

【0371】

付加的な核酸、例えば導入するための遺伝子には、移植された細胞の生存度および/または機能を促進することなどによって、治療の有効性を改善するためのもの；インビボでの生存または局在性を評価するためのもの、細胞の選択および/または評価のための遺伝子マーカーを提供するための遺伝子；例えば、Lupton S.D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991)；およびRiddell et al., Human Gene Therapy 3:319 338 (1992) に記載されているように、細胞がインビボで負選択を受け得るようにすることによって、安全性を改善するための遺伝子が含まれる。優性正選択可能マーカーを負選択可能マーカーと融合することによって得られる二機能性選択可能融合遺伝子の使用を記載している、LuptonらによるPCT/US91/08442およびPCT/US94/05601の刊行物もまた参照されたい。例えば、Riddellらの米国特許第6,040,177号の第14～17欄を参照されたい。

【0372】

いくつかの態様において、細胞は、遺伝子操作の前にまたは遺伝子操作に関連して、インキュベートおよび/または培養される。インキュベーション工程は、培養（culture）、培養（cultivation）、刺激、活性化、および/または繁殖を含むことができる。インキュベーションおよび/または操作は、培養容器、例えば、ユニット、チャンバー、ウェル、カラム、チューブ、配管一式、弁、バイアル、培養皿、バッグ、または培養または細胞を培養するための他の容器などにおいて実施されてもよい。いくつかの態様において、組成物または細胞は、刺激条件または刺激物質の存在下でインキュベートされる。そのような条件には、集団内の細胞の増殖、増大、活性化、および/もしくは生存を誘導する、抗原曝露を模倣する、ならびに/または遺伝子操作のために、例えば組換え抗原受容体の導入のために、細胞を準備するように設計されたものが含まれる。

【0373】

条件は、特定の培地、温度、酸素量、二酸化炭素量、時間、作用物質、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオン、および/または刺激因子など、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、および細胞を活性化するように設計された任意の他の作用物質などの1つまたは複数を含み得る。

【0374】

いくつかの態様において、刺激条件または作用物質は、TCR複合体の細胞内シグナル伝

達ドメインを活性化することができる1つまたは複数の作用物質、例えばリガンドを含む。いくつかの局面において、作用物質は、T細胞においてTCR/CD3細胞内シグナル伝達カスケードを起動または始動させる。そのような作用物質は、抗体、例えばTCRに特異的なもの、例えば抗CD3などを含み得る。いくつかの態様において、刺激条件は、共刺激受容体を刺激することができる、例えば抗CD28である1つまたは複数の作用物質、例えば、リガンドを含む。いくつかの態様において、そのような作用物質および/またはリガンドは、ビーズなどの固体支持体、および/または1つまたは複数のサイトカインに結合されてもよい。任意で、増大方法はさらに、抗CD3および/または抗CD28抗体を培養培地に（例えば、少なくとも約0.5 ng/mlの濃度で）添加する工程を含んでもよい。いくつかの態様において、刺激性の作用物質には、IL 2、IL 15および/またはIL 7が含まれる。いくつかの局面において、IL 2濃度は少なくとも約10ユニット/ mLである。

10

【0375】

いくつかの局面において、インキュベーションは、Riddellらに対する米国特許第6,040,177号、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9) : 651 660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72 82、および/またはWang et al. (2012) J Immunother. 35 (9) :689 701に記載されるような技術にしたがい実施される。

【0376】

いくつかの態様において、T細胞は、培養開始組成物にフィーダー細胞、例えば非分裂末梢血単核球（PBMC）を（例えば、得られる細胞の集団が、増大しようとする初期集団中の各Tリンパ球に対して少なくとも約5、10、20もしくは40個またはそれを上回るPBMCフィーダー細胞を含むように）添加すること；および培養物を（例えば、T細胞の数を増大させるのに十分な時間）インキュベートすることによって増大される。いくつかの局面において、非分裂フィーダー細胞は、ガンマ線照射されたPBMCフィーダー細胞を含み得る。いくつかの態様において、PBMCは、細胞分裂を防ぐために、約3000から3600ラドの範囲のガンマ線で照射される。いくつかの局面において、フィーダー細胞は、T細胞の集団の添加前に培養培地に添加される。

20

【0377】

いくつかの態様において、刺激条件は、ヒトTリンパ球の増殖に適した温度、例えば、少なくとも摂氏約25度、概して少なくとも約30度、および概して摂氏37度もしくは約37度を含む。任意で、インキュベーションはさらに、フィーダー細胞として非分裂EBV形質転換リンパ芽球様細胞（LCL）を添加することを含んでもよい。LCLは、約6000から10,000ラドの範囲のガンマ線で照射され得る。LCLフィーダー細胞は、いくつかの局面において、任意の適当な量、例えば少なくとも約10：1のLCLフィーダー細胞 対 初期Tリンパ球の比率で提供される。

30

【0378】

いくつかの態様において、調製方法は、単離、インキュベーションおよび/または操作の前または後のいずれかに、細胞を凍結、例えば凍結保存する工程を含む。いくつかの態様において、凍結およびその後の解凍工程は、細胞集団内の顆粒球および、一定程度、単球を除去する。いくつかの態様において、細胞は、例えば血漿および血小板を除去する洗浄工程の後に、凍結溶液中に懸濁される。いくつかの局面において、任意の様々な公知の凍結溶液およびパラメータが使用されてもよい。1つの例は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミン（HSA）を含むPBS、または他の適した細胞凍結培地を使用することを含む。これはその後、DMSOおよびHSAの最終濃度がそれぞれ10%および4%となるように培地で1：1希釈される。細胞は概してその後、毎分1°の速度で 80 まで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの蒸気相の中で保管される。

40

【0379】

IV. 形質導入細胞を選択または検出する方法

遺伝子操作された細胞の製造、例えば調製および処理などに関連して、細胞表面コンジュゲートの作用物質（例えば、strep tagなどの親和性タグ）を標的とする方法が提供される。いくつかの態様において、細胞表面分子と少なくとも1つの作用物質とを含む細胞

50

表面コンジュゲートは、細胞表面コンジュゲートが形質導入された細胞の検出のために用いられる。さらなる態様において、細胞表面コンジュゲートが形質導入された細胞の細胞検出の後に、細胞表面コンジュゲートが形質導入された細胞の単離および特定が続く。

【0380】

いくつかの局面において、細胞を操作する方法の遺伝子移入工程、細胞処理工程、インキュベーション工程、培養工程、および/または製剤化工程の1つまたは複数の工程の前、間、または後に、例えば上述のような処理工程のいずれかの間に、遺伝子改変した細胞を検出、選択、または単離する方法が提供される。いくつかの局面において、遺伝子改変した細胞（例えば、T細胞）の産生およびさらなる処理の過程で、導入遺伝子について陽性である細胞のみを特異的に選択しさらに処理することは関心対象である。提供される方法において、遺伝子改変細胞の検出および選択は、細胞表面コンジュゲートの作用物質（例えば、ペプチド）、例えば親和性タグなどの検出によって、例えば、ストレプトアビジン結合タンパク質（例えば、Strep tag）の検出などによって、実施される。いくつかの局面において、細胞表面コンジュゲートの検出は、細胞表面コンジュゲートと同時に導入されるおよび/または同時に発現される組換え受容体についての代替マーカーである。

【0381】

いくつかの局面において、検出のための細胞を含有する組成物は、1つまたは複数の処理工程、例えば、分離、遠心分離、遺伝子操作（例えば、ウイルスベクターによる形質導入）、洗浄、および/またはインキュベーションなどから生じる試料を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載されているいずれかのような、細胞を操作する方法の遺伝子移入（例えば、ウイルスベクターによる形質導入）、細胞処理、インキュベーション、培養、洗浄、および/または製剤化工程の1つまたは複数の工程の前、間、または後に得られる細胞または細胞の組成物は、コンジュゲートの作用物質に特異的な結合分子と接触する。ある特定の態様において、接触は、組成物の細胞中に存在する細胞表面コンジュゲートの作用物質に対する結合分子の結合を許容する条件下である。ある特定の態様において、方法は、結合分子と試料中のコンジュゲートの作用物質との間で複合体が形成されるかどうかを検出する工程、および/またはそのような結合の存在または非存在またはレベルを検出する工程をさらに含む。いくつかの態様において、結合分子は、蛍光成分で標識されるなど、検出可能に標識される。

【0382】

提供される方法のいくつかの局面において、検出は、細胞表面コンジュゲートの作用物質（例えば、ペプチド）、例えば親和性タグなどに特異的に結合することができる抗体または抗原結合フラグメントを用いて実施される。上述のいずれかなど、細胞表面コンジュゲートの親和性タグに対する公知の抗体または抗原結合フラグメントのいずれかを、用いることができる。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートは、記載されるようなストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep tag（例えば、Strep tag（登録商標））またはtwin strep tag）などを含み、抗体または抗原結合フラグメントは、ストレプトアビジン結合ペプチドに特異的に結合する。いくつかの態様において、抗体は、蛍光標識など検出可能に標識される。

【0383】

提供される方法のいくつかの局面において、検出は、非抗体結合分子試薬を用いて実施される。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートは、記載されるようなストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep tag（例えば、Strep tag（登録商標））またはtwin strep tag）などを含み、試薬は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインまたはストレプトアビジンもしくはストレプトアビジンムテインのオリゴマーであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、結合分子試薬は、SEQ ID NO: 3、4、5、6、27または28のいずれかに示されるストレプトアビジンムテインであるか、もしくはそれを含むか、またはそのオリゴマーである。いくつかの態様において、結合分子試薬は、Strep Tactin（登録商標）またはStrep Tacin（登録商標）XTとしての公知の市販の試薬である。いくつかの態様において、非抗体結合分子試薬は、蛍光標識など検出可能に

10

20

30

40

50

標識される。

【0384】

いくつかの態様において、結合分子は、例えば、細胞表面コンジュゲート（例えば、STEGFRtまたはST PSMA）に陽性であり、したがって組換え受容体に対しても陽性である遺伝子改変細胞の単離のために、本開示の細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を特定、選別、濃縮、または単離するために用いることができる。いくつかの態様において、提供される方法は、遺伝子移入（例えば、ウイルスベクターによる形質導入）、洗浄、細胞処理、インキュベーション、培養および/または製剤化工程の1つまたは複数の工程の前、間、または後に得られた細胞または細胞の組成物を、コンジュゲートの作用物質に特異的な結合分子と接触させる工程、および結合分子の結合に陽性である細胞を選択または単離する工程を含む。いくつかの態様において、結合分子は、作用物質に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメント（例えば、抗Strep Tag（登録商標）抗体などの抗作用物質抗体）である。いくつかの態様において、結合分子は、作用物質に特異的に結合する非抗体タンパク質試薬（例えば、Strep tagに結合するStrep Tactin（登録商標））である。いくつかの局面において、コンジュゲートの作用物質に特異的な（例えば、親和性タグに特異的な）結合分子が固定化、コンジュゲート、または結合されている、マトリクス、例えば磁気ビーズ、アガロース粒子、細胞培養皿、または他の固体表面マトリクスなどを利用することができる。いくつかの態様において、試薬は、支持体、例えば固体支持体または表面、例えばビーズまたは固定相（クロマトグラフィーマトリクス）などの上に含まれる。ある特定の態様において、そのような細胞は、磁気ビーズもしくは常磁性ビーズに基づく分離を用いて、または親和性カラムを用いることによって、選別、濃縮、または単離される。

10

20

【0385】

いくつかの態様において、作用物質に特異的な結合分子、例えば任意の抗体または非抗体試薬（例えば、Streptacinなどのストレプトアビジンムテイン）は、支持体、例えば固体支持体または表面、例えば、ビーズまたは固定相（クロマトグラフィーマトリクス）などの上に含まれる。いくつかのそのような態様において、試薬は、支持体上に可逆的に固定化される。いくつかの場合には、試薬は、共有結合を介して支持体に固定化される。いくつかの局面において、試薬は、非共有結合により支持体に可逆的に固定化される。

【0386】

いくつかの態様において、支持体は固体支持体である。任意の固体支持体（表面）は、抗体または非抗体試薬を含む、結合分子の固定化のために用いることができる。その上に結合分子を固定化することができる固体支持体の事例には、磁気ビーズ、ポリマービーズ、細胞培養プレート、マイクロタイタープレート、メンブレン、または中空繊維が含まれる。いくつかの局面において、中空繊維は、TerumoBCT Inc. (Lakewood, CO, USA) から入手可能なQuantum（登録商標）Cell Expansion Systemにおけるバイオリアクターとして用いることができる。いくつかの態様において、結合分子は固体支持体に共有結合により付着される。他の態様において、固定化、例えばプラスチック基材上への固定化のために、非共有結合的相互作用を用いることもできる。

30

【0387】

いくつかの態様において、結合分子は、例えば、記載されるようにストレプトアビジン結合ペプチドに結合するストレプトアビジンまたはアビジンムテインを含む非抗体薬試薬であり得る。そのようなストレプトアビジンムテインは、任意の表面、例えば、クロマトグラフィーマトリクス精製のために用いられる樹脂（ビーズ）に共有結合により付加することができる。IBA GmbH, Göttingenから、例えば、Strep Tactin（登録商標）Sepharose、Strep Tactin（登録商標）Superflow（登録商標）、Strep Tactin（登録商標）Superflow（登録商標）強化型、またはStrep Tactin（登録商標）MacroPrep（登録商標）などの形態で市販される。

40

【0388】

商業的に容易に入手可能な他の事例は、オリゴヒスチジンタグ付加（hisタグ付加）タ

50

ンパク質の固定化のために、例えば、ペンタまたはヘキサヒスチジンタグなどのオリゴヒスチジンタグの結合のために、用いることができる固定化金属親和性クロマトグラフィー（IMAC）樹脂、例えばTALON（登録商標）樹脂（Westburg, Leusden, The Netherlands）などである。他の例には、作用物質（親和性タグ）がカルモジュリン結合ペプチドであるコンジュゲートに結合するために用いることができる、GE Life Sciencesから入手可能なカルモジュリンセファロースが含まれる。さらなる例には、グルタチオンが連結されるセファロースが含まれ、これは、作用物質（親和性タグ）がグルタチオン S 転フェラーゼであるコンジュゲートに結合するために用いることができる。

【0389】

いくつかの態様において、本方法で利用される固体支持体は、磁氣的に誘引可能な物体、例えば1つまたは複数の磁氣的に誘引可能な粒子または磁性流体を含んでもよい。各々の磁氣的に誘引可能な粒子は、標的細胞に結合することができる結合部位を有する試薬を含んでもよい。いくつかの場合には、磁氣的に誘引可能な粒子は、反磁性、共時性、常磁性、または超常磁性材料を含んでもよい。一般に、超常磁性材料は、永久磁化を起こすことなく誘起磁場による磁場に反応する。酸化鉄に基づく磁気粒子は、例えば、DynaL BiotechからDynabeads（登録商標）として、Miltenyi Biotecから磁性MicroBeadsとして、CPG

Inc.から磁性多孔性ガラスビーズとして、ならびに種々の他の供給源、ほんの数例を挙げると、例えばRoche Applied Science、BIOCLON、BioSource International Inc.、micromod、AMBION、Merck、Bangs Laboratories、Polysciences、またはNovagen Inc.などから市販されている。超常磁性CoおよびFeCoならびに強磁性Coナノ結晶に基づく磁性ナノ粒子は、例えばHutten, A. et al. (J. Biotech. (2004), 112, 47-63) によって、記載されている。いくつかの態様において、細胞および細胞集団は、免疫磁気（または親和性磁気）分離技術（Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher（著作権）Humana Press Inc., Totowa, NJにおいて概説される）を用いて分離または単離される。

【0390】

いくつかの態様において、支持体は固定相を含む。したがって、いくつかの態様において、結合分子は、固定相（クロマトグラフィーマトリクスとも呼ばれる）上に含まれる。いくつかのそのような態様において、結合分子は、固定相上に可逆的に固定化される。いくつかの場合には、結合分子、共有結合を介して固定相に可逆的に固定化される。いくつかの局面において、結合分子は、非共有結合により固定相に可逆的に固定化される。

【0391】

任意の材料が、クロマトグラフィーマトリクスとして使用され得る。一般に、適当なクロマトグラフィー材料は、例えば、充填されたクロマトグラフィーカラムにおいて所望の条件下で使用される際に、本質的に無害なもの、すなわち、細胞の生存度に対して弊害をもたらさないものである。いくつかの態様において、固定相は、予め定められた場所、例えば、予め定められた位置で維持され、それに対して試料の場所が移動する。したがって、いくつかの態様において、固定相は、移動相が（フロースルーによりまたはバッチモードでのいずれかで）流動し、相間で（溶解したまたは分散したのいずれかの）液体相中に含まれる成分の分配が生じる、クロマトグラフィーシステムの一部である。

【0392】

いくつかの態様において、クロマトグラフィーマトリクスは、固体または半固体相の形態を有し、単離/分離したい標的細胞を含む試料は液体相である。クロマトグラフィーマトリクスは、（任意の適当なサイズおよび形状の）特定の材料または紙基材もしくはメンブレンを含むモノリシックなクロマトグラフィー材料である。したがって、いくつかの局面において、クロマトグラフィーは、カラムクロマトグラフィーおよび平面クロマトグラフィーの両方であり得る。いくつかの態様において、標準的なクロマトグラフィーカラムに加えて、双方向の流れを実現するカラム、例えばPhyNexus, Inc. San Jose, CA, U.S.A.から入手可能なPhyTip（登録商標）カラムまたはピペットチップが、カラムベース/フ

ロースルーモードに基づく方法で使用され得る。したがって、いくつかの例において、双方向の流れを実現するピペットチップまたはカラムもまた、本発明の方法において有用なクロマトグラフィーカラムに含まれる。いくつかの例において、例えば粒状のマトリクス材料が使用される場合、粒状のマトリクス材料は、例えば、約 $5\mu\text{m}$ ~約 $200\mu\text{m}$ 、または約 $5\mu\text{m}$ ~約 $400\mu\text{m}$ 、または約 $5\mu\text{m}$ ~約 $600\mu\text{m}$ の平均粒子サイズを有し得る。いくつかの局面において、クロマトグラフィーマトリクスは、例えば、ポリマー樹脂または金属酸化物または半金属酸化物であり得るかまたはそれらを含み得る。いくつかの局面において、例えば平面クロマトグラフィーが使用される場合、マトリクス材料は、平面クロマトグラフィーに適した任意の材料、例えば、従来のセルロースベースもしくは有機ポリマーベースのメンブレン（例えば、紙製メンブレン、ニトロセルロースメンブレンもしくはフッ化ポリビニリデン（PVDF）メンブレン）またはシリカコーティングされたガラスプレートであり得る。1つの態様において、クロマトグラフィーマトリクス/固定相は、非磁性材料または非磁化性材料である。1つの態様において、本発明に採用されるクロマトグラフィーマトリクスは、磁力に引きつけられるいかなる物質も含まない。

10

【0393】

いくつかの態様において、本発明の方法に適した非磁性または非磁化性クロマトグラフィー固定相は、誘導体化シリカまたは架橋ゲルを含む。いくつかの局面において、架橋ゲルは、天然ポリマー、例えば自然界で発生するポリマークラスのものに基づき得る。例えば、クロマトグラフィー固定相の基礎となり得る天然ポリマーは、多糖である。いくつかの例において、各多糖は、通常、架橋される。多糖マトリクスの例は、アガロースゲル（例えば、Superflow（商標）アガロースまたはSephacryl（登録商標）材料、例えば異なるビーズおよび孔サイズで市販されているSuperflow（商標）Sephacryl（登録商標））または架橋デキストランのゲルを含むがこれらに限定されない。さらなる実例は、共にGE Healthcareから入手可能な、Sephadex（登録商標）またはSuperdex（登録商標）として（様々なビーズサイズおよび様々な孔サイズで）市販されている、デキストランが共有結合される粒状架橋アガロースマトリクスである。そのようなクロマトグラフィー材料の別の実例は、Sephacryl（登録商標）であり、これもGE Healthcareから異なるビーズおよび孔サイズで入手可能である。

20

【0394】

いくつかの態様において、架橋ゲルはまた、合成ポリマー、例えば自然界で発生しないポリマークラスのものに基づき得る。いくつかの局面において、クロマトグラフィー固定相の基礎となるそのような合成ポリマーは、極性単量体単位を有し、したがってそれ自体が極性であるポリマーである。したがって、いくつかの例において、そのような極性ポリマーは、親水性である。疎油性とも称される親水性分子は、いくつかの局面において、水分子と双極子 双極子相互作用を形成し得る部分を含む。一般に、親油性とも称される疎水性分子は、水から分離する傾向を有する。

30

【0395】

適当な合成ポリマーの実例は、ポリアクリルアミド、スチレンジビニルベンゼンゲルならびにアクリレートおよびジオールまたはアクリルアミドおよびジオールのコポリマーである。実例は、Fractogel（登録商標）として市販されているポリメタクリレートゲルである。さらなる例は、Toyopearl（登録商標）として市販されているエチレングリコールおよびメタクリレートのコポリマーである。いくつかの態様において、クロマトグラフィー固定相はまた、天然および合成ポリマー成分、例えば、複合マトリクスもしくは複合材または多糖およびアガロースのコポリマー、例えばポリアクリルアミド/アガロース複合材、または多糖およびN,N'メチレンビスアクリルアミドのコポリマーを含み得る。デキストランおよびN,N'メチレンビスアクリルアミドのコポリマーの実例は、上記のSephacryl（登録商標）シリーズの材料である。いくつかの態様において、誘導体化シリカは、合成または天然ポリマーに連結されたシリカ粒子を含み得る。そのような態様の例は、多糖結合シリカ、ポリビニルピロリドン結合シリカ、ポリエチレンオキシド結合シリカ、ポリ(2ヒドロキシエチルアスパルトアミド)シリカおよびポリ(N'イソプロピルアクリルアミ

40

50

ド)結合シリカを含むがこれらに限定されない。

【0396】

いくつかの態様において、固体支持体、例えばビーズまたはクロマトグラフィーマトリクスなどは、該固体支持体（例えば、マトリクス）を記載されたように濃縮または選択されている細胞を含む試料と接触させることによって、本明細書に記載されたような濃縮および選択方法において用いることができる。いくつかの態様において、選択された細胞は、結合分子と作用物質（例えば、親和性タグ）との相互作用を破壊することによって、固体支持体（例えば、マトリクス）から溶出または遊離される。

【0397】

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートの作用物質への結合分子の結合は可逆的である。いくつかの態様において、作用物質への結合分子の可逆的結合の破壊は、結合分子と作用物質との間の結合を元に戻すことができる物質を含む組成物と細胞を接触させることによって達成される。例えば、物質は、遊離した結合パートナーであるか、および/または競合作用物質である（例えば、ビオチン、ビオチン類似体、それらの生物学的に活性なフラグメント）。いくつかの態様において、方法は、それに結合する結合分子を含む固体支持体に試料中の細胞を接触させる工程の後に、競合物質を適用して、コンジュゲートの作用物質（例えば、親和性タグ）と結合分子との間の結合を破壊し、それによって、固体表面から選択された細胞を回収する工程を含む。提供される方法での使用のための例示的な競合物質は上述されており、競合物質の選択は特定の作用物質および結合分子によって決まる。いくつかの態様において、結合分子は、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag）作用物質の認識のためのストレプトアビジンムテイン（例えば、Strep Tactin）であり、競合物質はビオチンまたはビオチン類似体である。

【0398】

提供される態様において、結合分子（例えば、Strep Tactinなどのストレプトアビジンムテイン試薬）と細胞表面コンジュゲートの作用物質（例えば、Strep tag）との間の可逆的結合を用いる製造工程の過程での形質導入された細胞の選択は、対象に投与される産物において細胞へ付着したままである可能性がある、細胞表面コンジュゲートに対して高い親和性を有する抗体を用いる場合より有利である。いくつかの態様において、Strep Tactin（登録商標）が試薬として用いられる。いくつかの態様において、試薬による細胞表面コンジュゲートの作用物質部分の検出は可逆的であり、ビオチンの試料への添加は形質導入された細胞を緩やかに遊離させることができる。

【0399】

いくつかの局面において、可逆性は、ストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag）とストレプトアビジンムテイン結合試薬との間の結合は高いが、ビオチンまたはビオチン類似体に対するストレプトアビジン結合試薬の結合親和性より低いために、達成することができる。したがって、いくつかの態様において、ビオチン（ビタミンH）またはビオチンの類似体は、結合に競合するために添加され、固体支持体（例えば、ビーズまたはクロマトグラフィーマトリクス）上のストレプトアビジンムテイン結合試薬とコンジュゲートのストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag）との間の結合相互作用を破壊することができる。いくつかの態様において、相互作用は、低濃度のビオチンまたは類似体の存在下、例えば、0.1 mMから10 mM、0.5 mMから5 mM、または1 mMから3 mM、例えば概して少なくとも1 mMもしくは約1 mMまたは少なくとも2 mMもしくは約2 mM、例えば2.5 mMまたは約2.5 mMの存在下で、元に戻すことができる。いくつかの態様において、競合作用物質、例えばビオチンまたはビオチン類似体などの存在下でのインキュベーションは、クロマトグラフィーマトリクスまたはビーズなどの固体支持体から選択された細胞を遊離する。

【0400】

いくつかの態様において、方法はさらに、構成成分の可逆的解離後に残存する1つまたは複数の構成成分を分離または除去する工程を含む。いくつかの態様において、標的細胞（例えば、形質導入T細胞などの遺伝子改変T細胞）中の任意の非結合または残存ビオチン

10

20

30

40

50

が分離または除去され得る。いくつかの態様において、結合分子試薬は、標的細胞組成物中の細胞から除去または分離される。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートからの可逆的に結合した結合分子（例えば、Strep Tactin試薬など、ストレプトアビジンムテインを含む試薬）の解離のために、提供される方法は、単離された細胞が接触またはインキュベーション期間の終了時点で結合分子を含まないというさらなる利点を有する。いくつかの態様において、標的細胞を含む組成物はいかなる試薬も含まず、いくつかの局面において、診断適用（例えば、さらなるFACS（商標）ソーティング）に関連する使用にとってまたは任意の細胞に基づく治療適用にとって有利である。

【0401】

いくつかの態様において、結合分子の分離/除去は、第2の固定相を用いて実施することができる。この目的で、標的細胞および1つまたは複数の残留構成成分を含む混合物が、上述した第1の固定相の上へ適用される前または後に、適した第2の固定相上のクロマトグラフィーに曝される。この第2の固定相は、ゲル濾過マトリクスおよび/または親和性クロマトグラフィーマトリクスであってもよく、ここで、ゲル濾過マトリクスおよび/または親和性クロマトグラフィーマトリクスは親和性試薬を含む。クロマトグラフィー樹脂上に含まれる親和性試薬は、結合分子試薬（例えば、Strep Tactinなどのストレプトアビジンムテイン）の結合部位Zに（特異的に）結合し、それによって固定相上に結合分子試薬を固定化する、結合パートナーDを含む。Strep Tactinなどのストレプトアビジンベースの結合試薬が用いられ、コンジュゲートの作用物質がストレプトアビジン結合ペプチド（例えば、Strep tag）であるかまたはそれを含む場合、この第2の固定相の親和性試薬中に含まれる結合パートナーDはビオチンであり得る。組成物中の任意の残留ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、次いで、クロマトグラフィーマトリクス、例えば市販されているビオチン セファロース（商標）などに共有結合により通常連結されるビオチンに結合する。いくつかのそのような態様において、標的細胞（例えば、形質導入T細胞などの遺伝子改変T細胞）は、結合分子試薬から離して回収することができる。

【0402】

いくつかの態様において、作用物質と結合分子との間の結合を破壊または逆転させるために用いられる競合物質は、（例えば、国際特許出願WO 2013/124474に記載される）「除去カートリッジ」を通じて、刺激された細胞集団から容易に除去され得る。例えば固体支持体、例えばバイオリクター表面または磁気ビーズに結合分子が固定化されるいくつかの例においては、それは使用されない。したがって、遊離した作用物質および競合試薬の除去のための除去カートリッジの使用は、溶出試料（例えば、可逆的結合の破壊後に得られる試料）を第2のクロマトグラフィーカラムに投入することを含み得る。いくつかの態様において、このクロマトグラフィーカラムは、親和性クロマトグラフィーマトリクスであり同時にゲル透過マトリクスとしても機能し得る適当な固定相を有する。いくつかの局面において、この親和性クロマトグラフィーマトリクスには、親和性試薬が固定化される。いくつかの態様において、親和性試薬は、例えば、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテインまたはそれらの混合物であり得る。

【0403】

いくつかの態様において、クロマトグラフィーマトリクスは、例えば本明細書に記載される除去カートリッジにおいて使用される場合、ゲル濾過マトリクスである。一般に、ゲル濾過は、それが起こるよう設計された特性によって特徴づけられ得る。したがって、ゲル濾過マトリクスは、いくつかの局面において、概ねそれらのサイズに基づいて細胞または他の生物学的物体の分離を実現する。いくつかのそのような局面において、各クロマトグラフィーマトリクスは典型的に、上記のような粒状多孔性材料である。クロマトグラフィーマトリクスは、特定の排除限界を有し得、排除限界は典型的に、それを上回ると分子が孔に侵入できず完全に除去される分子量という点から定義される。いくつかの態様において、サイズ排除限界を定義する各分子量は、標的細胞の重量に対応する重量を下回るよう選択され得る。そのような態様において、標的細胞は、サイズ排除クロマトグラフィーマトリクスの孔に侵入することが妨げられる。同様に、固定相は、選択された標的細胞の

10

20

30

40

50

サイズよりも小さいサイズの孔を有し得る。例示的な態様において、クロマトグラフィーマトリクスは、0~約500 nmの平均孔サイズを有する。

【0404】

いくつかの態様において、試料中に存在する成分、例えば競合物質は、孔の排除限界を下回るサイズを有し得、したがってクロマトグラフィーマトリクスの孔に侵入し得る。いくつかの局面において、部分的または完全に孔容積に侵入することができるそのような成分のうち、孔容積に対するアクセス性が低いより大きな分子が最初に溶出し得、最も小さい分子は典型的に最後に溶出する。いくつかの態様において、クロマトグラフィーマトリクスの排除限界は、標的細胞の最大幅を下回るよう選択される。したがって、いくつかの局面において、孔容積に対するアクセス性を有する成分は、標的細胞よりもクロマトグラフィーマトリクス内または上でより長く維持され得る。したがって、いくつかの例において、標的細胞は、試料の他の物体/成分から分離されてクロマトグラフィーカラムの溶出物中に回収され得る。したがって、いくつかの局面において、成分、例えば競合物質は、標的細胞よりも後の時点でゲル濾過マトリクスから溶出し得る。いくつかの態様において、例えば、ゲル透過マトリクスが、試料中に存在する競合物質に結合することができる結合部位Zを含む(例えば、それに共有結合された)親和性試薬を含む場合に、この効果はさらに増加する。いくつかの例において、競合物質は、試薬の結合部位Zによって結合され得、それによってマトリクス上に固定化され得る。いくつかの局面において、この方法は、除去カートリッジにおいて実施される。

10

【0405】

いくつかの態様において、第1および第2の固定相の少なくとも1つの配置、例えば標的細胞の選択のためのクロマトグラフィーカラム(選択カートリッジ)および試薬の除去のための第2のクロマトグラフィーカラム(除去カートリッジ)を含む装置が提供される。装置は、直列に流体接続されている第1および第2の固定相(クロマトグラフィーカラム)の複数の配置を含み得る。装置は、第1および第2の固定相の第1の配列の第1の固定相に流体接続されている試料投入口を含み得る。いくつかの態様において、装置はまた、クロマトグラフィー用の第1および第2の固定相の少なくとも1つの配置の最後の第2の固定相に流体接続されている、細胞のための試料流出口を含み得る。いくつかの局面において、装置はまた、第1および第2の固定相の配置の第1の固定相の少なくとも1つに流体接続されている競合試薬容器を含み得る。

20

30

【0406】

いくつかの態様において、組成物から試薬および他の成分を除去する能力は、任意の固体支持体、例えば磁気ビーズを回避することができるというさらなる利点を有する。いくつかの態様において、これは、そのような磁気ビーズにより標的細胞(例えば、遺伝子導入T細胞などの遺伝子組換えT細胞)が混入する危険がないかまたは最小限であることを意味する。いくつかの態様において、これはまた、他の方法、例えば最終的なT細胞集団が磁気ビーズを含まないことを確実にするためにさらなる手段が採用されなければならないDynabeads(登録商標)の使用と比較してGMP標準に適合するプロセスをより容易に構築することができることを意味する。

【0407】

いくつかの態様において、固相(例えば、磁気ビーズ)が存在しないことから、本発明は、公知の細胞増大システム、例えばGE Healthcare(HYPERLINK "http://en.wikipedia.org/wiki/Little_Chalfont"/o"Little_Chalfont" Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom)から入手可能なXuri Cell Expansion System W25およびWAVE Bioreactor 2/10 System、またはTerumoBCT Inc.(Lakewood, CO, USA)から入手可能なQuantum(登録商標) Cell Expansion Systemなどに組み込むことができる、細胞の増大のための自動化された閉鎖システムもまた提供する。

40

【0408】

いくつかの態様において、閉鎖システムは自動化される。いくつかの態様において、システムに関連する構成要素は、システムの種々の部品間の流体の流れを制御するために、

50

統合マイクロコンピュータ、蠕動ポンプ、および様々な弁、例えばピンチ弁または二方コックなどを含むことができる。統合コンピュータは、いくつかの局面において、機器のすべての構成要素を制御し、標準化された順序で繰り返される手順を実施するようシステムを方向付ける。いくつかの態様において、蠕動ポンプは、配管一式を通過する流束を制御し、ピンチ弁と共に、システムを通る緩衝液の流れの制御を可能にする。

【0409】

いくつかの態様において、方法は、コンジュゲートの作用物質（例えば、親和性タグ）、例えばストレプトアビジン結合ペプチドなどの検出に基づき、細胞表面コンジュゲートを発現する細胞の選択、単離、または濃縮を実施する。いくつかの局面において、単離、濃縮、または選択された細胞は、細胞表面コンジュゲートおよび任意で同時に発現される組換え受容体、例えばCARなどをコードする核酸分子で、例えば形質導入などによって、遺伝子操作されている細胞である。いくつかの態様において、提供される方法は、細胞表面コンジュゲートを発現する細胞について、よって組換え受容体を発現する細胞についても濃縮された細胞を含む細胞組成物を産生するかまたはもたらす。

【0410】

いくつかの態様において、濃縮した組成物における細胞表面コンジュゲートを発現する細胞の収量、すなわち、出発試料における同じ細胞の集団の数と比較した集団における濃縮した細胞の数は、10%から100%、例えば、20%から80%、20%から60%、20%から40%、40%から80%、40%から60%、または60%から80%である。

【0411】

いくつかの態様において、濃縮または単離した組成物における細胞表面コンジュゲートを発現する細胞のパーセンテージ、すなわち、濃縮または単離した細胞の集団における総細胞に対する選択した細胞表面コンジュゲートに対して陽性である細胞のパーセンテージは、少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、または約70%、約75%、約80%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%である、および概して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、またはそれ以上である。

【0412】

V. 組成物および製剤

投与のための、細胞、例えば、細胞表面コンジュゲートおよび/またはさらなる組換え受容体、例えばCARを含有する操作された細胞などを含む組成物が提供される。いくつかの局面において、薬学的組成物および製剤は、所定の用量またはその分割量での投与のための数の細胞を含む単位用量形態組成物として提供される。薬学的組成物および製剤は概して、1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体または賦形剤を含む。いくつかの態様において、組成物は、少なくとも1つのさらなる治療剤を含む。

【0413】

「薬学的製剤」という用語は、その中に含有される活性成分の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態であって、かつその製剤が投与される対象にとって容認できないほどの毒性がある付加的な構成成分を含有しない調製物を指す。

【0414】

「薬学的に許容される担体」とは、対象にとって非毒性である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0415】

いくつかの局面において、担体の選択は、一部には、特定の細胞によって、および/または投与方法によって決まる。したがって、種々の適切な製剤が存在する。例えば、薬学的組成物は保存剤を含有し得る。適切な保存剤には、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、および塩化ベンザルコニウムが含まれ得る。いくつかの局面では、2種またはそれ以上の保存剤の混合物が使用される。保存剤またはその混合物

10

20

30

40

50

は典型的に、組成物全体の約0.0001重量%～約2重量%の量で存在する。担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) によって記載されている。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度において一般に受容者にとって非毒性であり、これには、緩衝剤、例えばリン酸、クエン酸、および他の有機酸など；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニンを含む；保存剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3ペンタノール；およびmクレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなど；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドンなど；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなど；単糖、二糖、および他の糖質、例えばグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む；キレート剤、例えばEDTAなど；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなど；塩形成対イオン、例えばナトリウムなど；金属錯体（例えば、Znタンパク質コンジュゲート）；ならびに/または非イオン性界面活性剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）などが含まれるが、これらに限定されない。

【0416】

いくつかの局面では、緩衝物質が組成物中に含まれる。適切な緩衝物質には、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに様々な他の酸および塩が含まれる。いくつかの局面では、2種またはそれ以上の緩衝物質の混合物が使用される。緩衝物質またはその混合物は典型的に、組成物全体の約0.001重量%～約4重量%の量で存在する。投与可能な薬学的組成物を調製する方法は公知である。例示的な方法は、例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005) に詳述されている。

【0417】

製剤または組成物は、細胞で処置される特定の適応症、疾患、または状態に有用な2種以上の活性成分、好ましくは細胞を補完する活性を有し、それぞれの活性が互いに有害な影響を及ぼさないものもまた含有し得る。そのような活性成分は、意図される目的に有効な量の組み合わせで適切に存在する。したがって、いくつかの態様において、薬学的組成物は、他の薬学的に活性のある作用物質または薬物、例えば化学療法剤など、例えば、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ピンブラスチン、ピンクリスチン等をさらに含む。いくつかの態様において、細胞または抗体は、塩、例えば薬学的に許容される塩の形態で投与される。薬学的に許容される適切な酸付加塩には、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸、および硫酸などの鉱酸、ならびに酒石酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸、安息香酸、グリコール酸、グルコン酸、コハク酸、およびアリアルスルホン酸、例えばpトルエンスルホン酸などの有機酸から誘導されるものが含まれる。

【0418】

活性成分は、マイクロカプセル、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）、またはマクロエマルジョン中に封入され得る。ある特定の態様において、薬学的組成物は、シクロデキストリン包接コンジュゲートなどの包接コンジュゲートとして、またはリポソームとして製剤化される。リポソームは、宿主細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）が特定組織を標的とするのに役立ち得る。リポソームの調製には、例えば、Szoka et al., Ann.

Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980)、ならびに米国特許第4,235,871号、第4,501,728号、第4,837,028号、および第5,019,369号に記載されているものなど、多くの方法を利用することができる。

【0419】

薬学的組成物はいくつかの局面において、組成物の送達、処置されるべき部位の感作の前に、その感作を引き起こすのに十分な時間起こるように、持続放出型、遅延放出型、および徐放型の送達系を使用し得る。多くの型の放出送達系が利用可能であり、それらは公知である。そのような系は、組成物の反復投与を回避し、それによって対象および医師の利便性を高め得る。

【0420】

薬学的組成物はいくつかの態様において、治療有効量または予防有効量などの、疾患または状態を処置または予防するのに有効な量で、操作された細胞を含有する。治療有効性または予防有効性はいくつかの態様において、処置された対象の定期評価によってモニターされる。状態に応じた数日またはそれ以上にわたる反復投与の場合、処置は、疾患症状の望ましい抑制が起こるまで繰り返される。しかしながら、他の投与計画が有用である場合もあり、それが決定され得る。望ましい投薬量は、組成物の単回ボラス投与によって、組成物の複数回ボラス投与によって、または組成物の持続注入投与によって送達され得る。

10

【0421】

薬学的組成物、例えば操作された細胞を含む薬学的組成物は、標準的な投与技法、製剤、および/または装置を用いて投与され得る。組成物の貯蔵および投与のための、シリンジおよびバイアルなどの製剤および装置が提供される。操作された細胞の投与は、自家投与または異種投与であってよい。例えば、ある対象から免疫応答細胞または前駆細胞を入手し、同じ対象または異なる適合対象に投与することができる。末梢血由来免疫応答細胞またはそれらの子孫（例えば、インビボ、エクスピボ、またはインビトロで得られる）は、カテーテル投与を含む局所注射、全身注射、局所注射、静脈内注射、または非経口投与によって投与することができる。治療用組成物（例えば、遺伝子改変された免疫応答細胞を含有する薬学的組成物）を投与する場合、治療用組成物は一般に注射可能な単位剤形（溶液、懸濁液、エマルジョン）で製剤化される。

20

【0422】

製剤には、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、肺投与、経皮投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、頬側投与、舌下投与、または坐剤投与用のものが含まれる。いくつかの態様において、細胞集団は非経口投与される。本明細書で用いられる「非経口」という用語は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与、腔投与、および腹腔内投与を含む。いくつかの態様において、細胞集団は、静脈内注射、腹腔内注射、または皮下注射による末梢全身送達を用いて対象に投与される。

30

【0423】

組成物はいくつかの態様において、無菌液体調製物、例えば、等張性水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液、または粘性組成物として提供され、それらはいくつかの局面において、選択されたpHに緩衝化され得る。液体調製物は通常、ゲル、他の粘性組成物、および固体組成物よりも調製が容易である。加えて、液体組成物の方が、投与するのに、特に注射によって投与するのにいくらか便利である。一方、粘性組成物は、特定組織とのより長い接触期間を提供するために、適切な粘性範囲内で製剤化され得る。液体組成物または粘性組成物は担体を含んでよく、担体は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）、およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であってよい。

40

【0424】

無菌注射溶液は、細胞を溶媒中に組み入れて、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロース、または同様のものなどの適切な担体、希釈剤、または賦形剤と混合するなどして調製され得る。組成物はまた凍結乾燥され得る。組成物は、投与経路および所望の調製物に応じて、湿潤剤、分散剤、または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、pH緩衝物質、ゲル化または増粘性添加剤、保存剤、香味剤、着色剤、および同様のものなどの補助物質を含有し得る。いくつかの局面では、適切な調製物を調製するために標準的な教本を参照することができる。

50

【0425】

抗菌性保存剤、抗酸化剤、キレート剤、および緩衝剤を含む、組成物の安定性および無菌性を増加させる様々な添加剤が添加され得る。微生物作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、および同様のものによって保証され得る。注射可能な薬学的形態の長期吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。

【0426】

徐放性調製物を調製することもできる。徐放性調製物の適切な例には、造形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態をした、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスが含まれる。

10

【0427】

インビボ投与に使用されるべき製剤は一般に無菌である。無菌性は、例えば無菌濾過膜を介する濾過などによって容易に達成され得る。

【0428】

VI. 投与の方法および処置関連方法

組換え受容体（例えば、CAR）によって認識される抗原を発現している疾患、状態、および障害の処置における、操作された細胞を含むような、分子および組成物を使用する方法ならびにそれらの使用もまた提供される。操作された細胞によって発現される細胞表面コンジュゲートの認識によって、操作された細胞を含有するような、分子および組成物の特定、検出、または選択のための方法および使用もまた提供される。いくつかの態様において、そのような方法は、診断および予後診断方法、ならびに、いくつかの場合には、操作された細胞の自殺または除去方法を含む。そのような方法の中には、例えば養子細胞療法に関連して、投与された操作された細胞をモニターする方法および操作された細胞を調節する方法が含まれる。

20

【0429】

いくつかの態様において、細胞表面分子と少なくとも1つの作用物質とを含有する細胞表面コンジュゲートは、細胞表面コンジュゲートが形質導入された細胞の検出のために用いられる。いくつかの態様において、検出はインビボまたはエクスピボである。いくつかの態様において、細胞表面受容体コンジュゲートは、操作された細胞の自殺による死滅（suicide killing）のために操作された細胞を標的とするために用いられる。いくつかの局面において、細胞表面コンジュゲートを発現するように形質転換された細胞の死滅は、発現した細胞表面コンジュゲートの細胞表面分子に特異的な結合分子を用いる。他の局面において、毒素などの細胞傷害性物質に連結されたコンジュゲートの作用物質に特異的な結合分子を含む分子を用いて細胞表面コンジュゲートの作用物質を標的とすることによって、細胞を死滅させる方法が提供される。

30

【0430】

A. 養子細胞療法の方法

操作された細胞および組成物を投与する方法、ならびにがんを含む疾患、状態、および障害を処置または予防するためのそのような操作された細胞および組成物の使用が提供される。いくつかの態様では、操作された細胞および組成物が、例えば養子T細胞療法などの養子細胞療法によって、処置されるべき特定の疾患または状態を有する対象または患者に投与される。いくつかの態様では、提供された細胞および組成物が、疾患もしくは状態を有するかまたはそれらのリスクがある対象などの対象に投与される。いくつかの局面において、本方法はそれにより、操作されたT細胞によって認識される抗原を発現するがんにおける腫瘍量を減らすことなどによって、疾患または状態の1つまたは複数の症状を処置する、例えば改善する。

40

【0431】

養子細胞療法のために、操作された細胞を投与する方法は公知であり、提供される方法および組成物と関連して使用され得る。例えば、養子T細胞療法は、例えば、Gruenberg e

50

t alの米国特許出願公開番号2003/0170238 ; 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を参照されたい。

【 0 4 3 2 】

本明細書で用いられる場合、「対象」は、ヒトまたは他の動物などの哺乳動物であり、典型的にはヒトである。いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチド、操作された細胞、または組成物が投与される対象、例えば患者は、哺乳動物、典型的にはヒトなどの霊長類である。いくつかの態様において、霊長類はサルまたは類人猿である。対象は男性または女性であってよく、幼児、若年、青年、成人、および老年対象を含む適切な年齢であってよい。いくつかの態様において、対象は、齧歯類などの非霊長類哺乳動物である。

10

【 0 4 3 3 】

本明細書で用いられる場合、「処置」（および「処置する」または「処置すること」などの、その文法上の変形）は、疾患もしくは状態もしくは障害、またはそれに伴う症状、有害作用、もしくは転帰、もしくは表現型の完全なまたは部分的な改善または軽減を指す。処置の望ましい効果には、疾患の発症または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減縮、転移の予防、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、ならびに寛解または予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。本用語は、疾患の完全な治癒、または任意の症状の完全な除去、またはすべての症状もしくは転帰に対する効果を意味するものではない。

20

【 0 4 3 4 】

本明細書で用いられる場合、「疾患の発症を遅延させること」とは、疾患（がんなど）の発症を延期し、妨げ、減速させ、遅らせ、安定化し、抑制し、かつ／または先延ばしにすることを意味する。この遅延は、処置される疾患および／または個体の病歴に応じて、様々な時間の長さであり得る。当業者には明白であるように、十分なまたは著しい遅延は、個体が疾患を発症しないという点で、事実上、予防を包含し得る。例えば、転移の発症などの末期がんが遅延され得る。

【 0 4 3 5 】

本明細書で用いられる「予防すること」は、ある疾患に対する素因を有し得るがまだその疾患とは診断されていない対象において、該疾患の発症または再発に対する予防を提供することを含む。いくつかの態様において、提供される細胞および組成物は、疾患の発症を遅延させるためまたは疾患の進行を減速させるために使用される。

30

【 0 4 3 6 】

本明細書で用いられる場合、機能または活性を「抑制する」こととは、関心対象の条件またはパラメータを除くその他の点で同じ条件と比較して、あるいは別の条件と比較して、その機能または活性を低下させることである。例えば、腫瘍成長を抑制する細胞は、その細胞が存在しない場合の腫瘍の成長速度と比較して、腫瘍の成長速度を低下させる。

【 0 4 3 7 】

投与との関連における、作用物質、例えば、薬学的製剤、細胞、または組成物の「有効量」とは、必要な投薬量／量および期間において、治療結果または予防結果などの所望の結果を達成するのに有効な量を指す。

40

【 0 4 3 8 】

作用物質、例えば、薬学的製剤または操作された細胞の「治療有効量」とは、必要な投薬量および期間において、疾患、状態、もしくは障害の処置などに関する所望の治療結果、および／または処置の薬物動態学的もしくは薬力学的な効果を達成するのに有効な量を指す。治療有効量は、対象の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに投与される免疫調節ポリペプチドまたは操作された細胞などの因子にしたがって変動し得る。いくつかの態様において、提供される方法は、免疫調節ポリペプチド、操作された細胞、または組成物を有効量で、例えば治療有効量で投与することを伴う。

50

【0439】

「予防有効量」とは、必要な投薬量および期間において、所望の予防結果を達成するのに有効な量を指す。予防用量は疾患の前または初期段階に対象において使用されるため、典型的には予防有効量は治療有効量よりも少ないが、必ずしもそうとは限らない。

【0440】

処置される疾患または状態は、抗原の発現が、疾患状態または障害の病因に関連しており、かつ/または関与している、例えばそのような疾患、状態、または障害を引き起こす、悪化させる、またはその他の点でそれらに関与している任意のものであってよい。例示的な疾患および状態には、悪性腫瘍もしくは細胞の形質転換を伴う疾患もしくは状態（例えば、がん）、自己免疫疾患もしくは炎症性疾患、または例えば細菌、ウイルス、もしくは他の病原体によって引き起こされる感染症が含まれ得る。処置され得る様々な疾患および状態に関連している抗原を含む例示的な抗原は、上記されている。特定の態様において、免疫調節ポリペプチドおよび/または組換え受容体、例えば、キメラ抗原受容体またはトランスジェニックTCRは、疾患または状態と関連している抗原に特異的に結合する。

10

【0441】

いくつかの態様において、疾患または状態は、腫瘍、例えば固形腫瘍、リンパ腫、白血病、血腫、転移性腫瘍、または他のがんもしくは腫瘍タイプなどである。

【0442】

いくつかの態様において、疾患または状態は、感染性の疾患または状態、例えば、これらに限定されないが、ウイルス感染、レトロウイルス感染、細菌感染、および原虫感染、免疫不全、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、アデノウイルス、BKポリオマウイルスなどである。いくつかの態様において、疾患または状態は、自己免疫性または炎症性の疾患または状態、例えば、関節炎、例えば関節リウマチ（RA）、1型糖尿病、全身性エリトマトーデス（SLE）、炎症性腸疾患、乾癬、強皮症、自己免疫性甲状腺疾患、ブレイブス病、クローン病、多発性硬化症、喘息、および/または移植に関連する疾患もしくは状態などである。

20

【0443】

いくつかの態様において、疾患または障害に関連する抗原は、 α v β 6インテグリン（ α v β 6インテグリン）、B細胞成熟抗原（BCMA）、B7 H3、B7 H6、炭酸脱水酵素9（CA9、CAIXまたはG250としても公知）、がん 精巢抗原、がん/精巢抗原1B（CTAG、NY ESO 1およびLAG2としても公知）、がん胎児性抗原（CEA）、サイクリン、サイクリンA2、C Cモチーフケモカインリガンド1（CCL1）、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、上皮成長因子タンパク質（EGFR）、切断型上皮成長因子タンパク質（tEGFR）、III型上皮成長因子受容体変異（EGFR vIII）、上皮糖タンパク質2（EPG2）、上皮糖タンパク質40（EPG40）、エフリンB2、エフリン受容体A2（EPHa2）、エストロゲン受容体、Fc受容体様5（FCRL5；Fc受容体ホモログ5またはFCRH5としても公知）、胎児アセチルコリン受容体（胎児AChR）、葉酸結合タンパク質（FBP）、葉酸受容体アルファ、ガングリオシドGD2、Oアセチル化GD2（OGD2）、ガングリオシドGD3、糖タンパク質100（gp100）、Gタンパク質共役型受容体5D（GPCR5D）、Her2/neu（受容体チロシンキナーゼerb B2）、Her3（erb B3）、Her4（erb B4）、erbB二量体、ヒト高分子メラノーマ関連抗原（HMW MAA）、B型肝炎表面抗原、ヒト白血病抗原A1（HLA A1）、ヒト白血病抗原A2（HLA A2）、IL 22受容体アルファ（IL 22Ra）、IL 13受容体アルファ2（IL 13Ra2）、キナーゼ挿入ドメイン受容体（kdr）、カップ軽鎖、L1細胞接着分子（L1 CAM）、L1 CAMのCE7エピトープ、ロイシンリッチリピート含有8ファミリーメンバーA（LRRC8A）、ルイスY、メラノーマ関連抗原（MAGE）A1、MAGE A3、MAGE A6、メソテリン、c Met、マウスサイトメガロウイルス（CMV）、ムチン1（MUC1）、MUC16、ナチュラルキラーグループ2メンバーD（NKG2D）リガンド、メラニンA（MART1）、神経細胞接着分子（NCAM）、がん胎児性抗原、メラノーマの優先発現抗原（PRAME）、プロゲステロン受容体、前立腺特異的抗原、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）、サバイピン、栄養膜糖タンパク質（TPB）

30

40

50

G、5T4としても公知)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG72)、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR)、血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2)、ウィルムス腫瘍1 (WT1)、病原体特異的抗原、またはユニバーサルタグに関連する抗原、および/またはビオチン化分子、および/またはHIV、HCV、HBVもしくは他の病原体によって発現される分子からなる群より選択される。受容体によって標的とされる抗原は、いくつかの態様において、B細胞悪性腫瘍に関連する抗原、例えば、複数の公知のB細胞マーカーのいずれかを含む。いくつかの態様において、抗原は、CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Igカッパ、Igラムダ、CD79a、CD79b、またはCD30であるか、またはそれらを含む。

【0444】

いくつかの態様において、抗原は、病原体特異的抗原または病原体発現抗原であるか、またはそれらを含む。いくつかの態様において、抗原は、ウイルス抗原 (例えば、HIV、HCV、HBV由来ウイルス抗原等)、細菌抗原、および/または寄生生物抗原である。

10

【0445】

いくつかの態様において、疾患または障害に関連する抗原は、オーファンチロシンキナーゼ受容体ROR1、tEGFR、HER2、L1 CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、およびB型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP 2、EGP 4、OEPHa2、ErbB2、3、もしくは4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW MAA、IL 22R アルファ、IL 13R アルファ2、kdr、カッパ軽鎖、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY ESO 1、MART 1、gp100、がん胎児性抗原、TAG72、VEGF R2、がん胎児性抗原 (CEA)、前立腺特異的抗原、PSM A、HER2/neu、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS 1、c Met、GD 2、およびMAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1 (WT1)、サイクリン、例えばサイクリンA1 (CCNA1)、および/またはビオチン化分子、および/またはHIV、HCV、HBVもしくは他の病原体によって発現される分子からなる群より選択される。

20

【0446】

提供される方法および使用には、養子細胞療法のための方法および使用が含まれる。いくつかの態様において、本方法は、対象、組織、または細胞、例えば疾患、状態、もしくは障害を有するか、それらのリスクがあるか、またはそれらを含むと疑われるものなどへの、操作された細胞または該細胞を含有する組成物の投与を含む。いくつかの態様では、細胞、集団、および組成物が、例えば養子T細胞療法などの養子細胞療法によって、処置されるべき特定の疾患または状態を有する対象に投与される。いくつかの態様では、細胞または組成物が、疾患もしくは状態を有するかまたはそれらのリスクがある対象などの対象に投与され、疾患または状態の1つまたは複数の症状を改善する。

30

【0447】

いくつかの態様において、細胞療法、例えば養子T細胞療法は、細胞療法を受ける予定の対象から、またはそのような対象に由来する試料から細胞が単離され、かつ/またはその他の方法で調製される自家移植によって行われる。したがって、いくつかの局面において、細胞は、処置および細胞を必要とする対象、例えば患者に由来し、単離および処理後に同じ対象に投与される。

【0448】

いくつかの態様において、細胞療法、例えば養子T細胞療法は、細胞療法を受ける予定であるかまたは最終的に細胞療法を受ける対象以外の対象、例えば第1対象から細胞が単離され、かつ/またはその他の方法で調製される同種移植によって行われる。そのような態様において、この細胞は次いで、同じ種の異なる対象、例えば第2対象に投与される。いくつかの態様において、第1対象と第2対象は遺伝子的に同一である。いくつかの態様において、第1対象と第2対象は遺伝的に類似している。いくつかの態様において、第2対象は第1対象と同じHLAクラスまたはスーパータイプを発現する。細胞は、任意の適切な手段によって投与され得る。投薬および投与は、投与が短期的であるか長期的であるかに一部依存し得る。様々な投薬計画には、単回または様々な時点にわたる複数回投与、ボラス投与、およびパルス注入が含まれるが、これらに限定されない。

40

50

【0449】

ある特定の態様において、細胞または細胞のサブタイプの個々の集団は、約100万～約1000億個の範囲の細胞および/または体重1キログラムにつきその量の細胞、例えば100万～約500億個の細胞など（例えば、約500万個の細胞、約2500万個の細胞、約5億個の細胞、約10億個の細胞、約50億個の細胞、約200億個の細胞、約300億個の細胞、約400億個の細胞、または前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）、例えば約1000万～約1000億個の細胞（例えば、約2000万個の細胞、約3000万個の細胞、約4000万個の細胞、約6000万個の細胞、約7000万個の細胞、約8000万個の細胞、約9000万個の細胞、約100億個の細胞、約250億個の細胞、約500億個の細胞、約750億個の細胞、約900億個の細胞、または前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）、および場合によっては約1億個の細胞～約500億個の細胞（例えば、約1億2000万個の細胞、約2億5000万個の細胞、約3億5000万個の細胞、約4億5000万個の細胞、約6億5000万個の細胞、約8億個の細胞、約9億個の細胞、約30億個の細胞、約300億個の細胞、約450億個の細胞）、またはこれらの範囲の間にある任意の値が、かつ/または体重1キログラムにつき、対象に投与される。投薬量は、疾患もしくは障害および/または患者および/または他の処置に特有の特質に応じて変動し得る。

10

【0450】

いくつかの態様において、例えば、対象がヒトである場合、用量は、約 5×10^5 個より少ない組換え受容体（例えば、CAR）発現細胞、T細胞、または末梢血単核球（PBMC）の合計、例えば、約 1×10^6 から 5×10^8 個の範囲のそのような細胞、例えば 2×10^6 個、 5×10^6 個、 1×10^7 個、 5×10^7 個、 1×10^8 個、もしくは 5×10^8 個またはそのような細胞の合計、または前述の値の任意の2つの値の間の範囲を含む。

20

【0451】

いくつかの態様において、細胞療法は、 1×10^5 から 5×10^8 個もしくは約 1×10^5 から 5×10^8 個の総組換え受容体発現細胞、総T細胞、もしくは総末梢血単核球（PBMC）、 5×10^5 から 1×10^7 個もしくは約 5×10^5 から 1×10^7 個の総組換え受容体発現細胞、総T細胞、もしくは総末梢血単核球（PBMC）、または 1×10^5 から 1×10^7 個もしくは約 1×10^5 から 1×10^7 個の総組換え受容体発現細胞、総T細胞、もしくは総末梢血単核球（PBMC）の細胞の数（それぞれ両端の数値を含む）を含む用量の投与を含む。いくつかの態様において、細胞療法は、少なくとも 1×10^5 個または少なくとも約 1×10^5 個の総組換え受容体発現細胞、総T細胞、または総末梢血単核球（PBMC）の細胞の数、例えば、少なくとも 1×10^6 個または少なくとも約 1×10^6 個、少なくとも 1×10^7 個または少なくとも約 1×10^7 個、少なくとも 1×10^8 個または少なくとも約 1×10^8 個のそのような細胞を含む細胞の用量の投与を含む。いくつかの態様において、数は、CD3+またはCD8+の総数に関し、いくつかの場合では、組換え受容体発現（例えば、CAR+）細胞にも関する。いくつかの態様において、細胞療法は、 1×10^5 から 5×10^8 個もしくは約 1×10^5 から 5×10^8 個のCD3+もしくはCD8+総T細胞またはCD3+もしくはCD8+組換え受容体発現細胞、 5×10^5 から 1×10^7 個もしくは約 5×10^5 から 1×10^7 個のCD3+もしくはCD8+総T細胞またはCD3+もしくはCD8+組換え受容体発現細胞、または 1×10^6 から 1×10^7 個もしくは約 1×10^6 から 1×10^7 個のCD3+もしくはCD8+総T細胞またはCD3+もしくはCD8+組換え受容体発現細胞の細胞の数（それぞれ両端の数値を含む）を含む用量の投与を含む。いくつかの態様において、細胞療法は、 1×10^5 から 5×10^8 個もしくは約 1×10^5 から 5×10^8 個の総CD3+/CAR+もしくはCD8+/CAR+細胞、 5×10^5 から 1×10^7 個もしくは約 5×10^5 から 1×10^7 個の総CD3+/CAR+もしくはCD8+/CAR+細胞、または 1×10^6 から 1×10^7 個もしくは約 1×10^6 から 1×10^7 個の総CD3+/CAR+もしくはCD8+/CAR+細胞の細胞の数（それぞれ両端の数値を含む）を含む用量の投与を含む。

30

40

【0452】

いくつかの態様において、該用量のT細胞には、CD4+T細胞、CD8+T細胞、またはCD4+およびCD8+T細胞が含まれる。

【0453】

いくつかの態様において、例えば、対象がヒトである場合、CD4+およびCD8+ T細胞を含

50

む用量において含む、用量のCD8+ T細胞は、約 1×10^6 から 5×10^8 個の間の総組換え受容体（例えば、CAR）発現CD8+細胞、例えば、約 5×10^6 から 1×10^8 個の範囲のそのような細胞、 1×10^7 個、 2.5×10^7 個、 5×10^7 個、 7.5×10^7 個、 1×10^8 個、または 5×10^8 個のそのような細胞の合計、または前述の値の任意の2つの値の間の範囲を含む。いくつかの態様において、患者は、複数の用量を投与され、各用量または総用量は、前述の値のいずれかの範囲内であり得る。いくつかの態様において、細胞の用量は、 1×10^7 から 0.75×10^8 個もしくは約 1×10^7 から 0.75×10^8 個の総組換え受容体発現CD8+ T細胞、 1×10^7 から 2.5×10^7 個の総組換え受容体発現CD8+ T細胞、 1×10^7 から 0.75×10^8 個もしくは約 1×10^7 から 0.75×10^8 個の総組換え受容体発現CD8+ T細胞（それぞれ両端の数値を含む）の投与を含む。いくつかの態様において、細胞の用量は、 1×10^7 個、 2.5×10^7 個、 5×10^7 個、 7.5×10^7 個、 1×10^8 個、もしくは 5×10^8 個、または約 1×10^7 個、 2.5×10^7 個、 5×10^7 個、 7.5×10^7 個、 1×10^8 個、もしくは 5×10^8 個の総組換え受容体発現CD8+ T細胞の投与を含む。

【0454】

いくつかの態様において、細胞、例えば、組換え受容体発現T細胞の用量は、1回用量として対象に投与されるか、または2週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、または1年以上の期間内に1回のみ投与される。

【0455】

いくつかの態様において、細胞は、併用処置の一部として、例えば、別の治療的介入、例えば抗体または操作された細胞または受容体または作用物質など、例えば細胞毒性剤または治療剤などと同時に、または任意の順序で逐次的に投与される。細胞はいくつかの態様において、1種または複数種の付加的な治療剤と、または別の治療的介入と関連して、同時にまたは任意の順序で逐次的に共投与される。状況によっては、細胞は、細胞集団が1種もしくは複数種の付加的な治療剤の効果を増強するように、またはその逆になるように、十分に近い時間内に別の治療法と共投与される。いくつかの態様において、細胞は、1種または複数種の付加的な治療剤の前に投与される。いくつかの態様において、細胞は、1種または複数種の付加的な治療剤の後に投与される。いくつかの態様において、1種または複数種の付加的な作用物質には、例えば持続性を増強するための、IL 2などのサイトカインが含まれる。いくつかの態様において、本方法は、化学療法剤の投与を含む。

【0456】

細胞の投与後、操作された細胞集団の生物学的活性はいくつかの態様において、例えばいくつかの公知の方法のいずれかによって測定される。評価するパラメータには、例えばイメージングによるインピボでの、または例えばELISAもしくはフローサイトメトリーによるエクスピボでの、抗原に対する操作されたT細胞もしくは天然T細胞または他の免疫細胞の特異的結合が含まれる。ある特定の態様において、標的細胞を破壊する操作された細胞の能力は、例えばKochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689 702 (2009) およびHerman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25 40 (2004) に記載されている細胞傷害性アッセイなどの、当技術分野で公知の任意の適切な方法を用いて測定され得る。ある特定の態様において、細胞の生物学的活性は、CD107a、IFN、IL 2、およびTNFなどの1種または複数種のサイトカインの発現および/または分泌をアッセイすることによって測定される。いくつかの局面において、生物学的活性は、腫瘍量または腫瘍負荷量の減少などの臨床転帰を評価することによって測定される。

【0457】

ある特定の態様において、操作された細胞は、それらの治療有効性または予防有効性が増加するように、いくつかの方法でさらに改変される。例えば、集団によって発現される操作された組換え受容体、例えば、CARまたはTCRは、ターゲティング部分に直接的に、またはリンカーを介して間接的にコンジュゲートされ得る。化合物、例えばCARまたはTCRをターゲティング部分にコンジュゲートする実践は、当技術分野において公知である。例えば、Wadwa et al., J. Drug Targeting 3:1 1 1 (1995) および米国特許第5,087,616号を参照されたい。

【0458】

10

20

30

40

50

B, 検出およびモニター

いくつかの態様において、対象に投与された細胞をモニターする、例えば、検出するまたは特定するための、例えば、対象におけるそのような細胞の存在、数、または位置を決定または評価するための、方法が提供される。いくつかの態様において、検出は、対象由来の試料からエキスピボで実施される。いくつかの態様において、検出はインピボで実施される。

【0459】

いくつかの態様において、モニターする方法はエキスピボで行われ、細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と細胞表面コンジュゲートを発現するかまたは発現する可能性がある細胞を含有する組成物を接触させることによって、細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を検出する工程を含む。いくつかの局面において、試料は対象から得られ、記載のいずれかを含むコンジュゲートの作用物質に結合する結合分子、例えば抗体または非抗体試薬などと接触される。例えば、生物学的試料は、これらに限定されないが、体液、例えば血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗、組織および器官試料などを含み、それら由来の処理された試料を含む。

10

【0460】

いくつかの態様において、上述のような方法のいずれかは、対象由来の試料から得られた細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を検出または特定するために利用することができる。ある特定の態様において、コンジュゲートを発現する組換え細胞は、作用物質への特異性を伴って結合する抗体を用いることによって、または非抗体試薬（例えば、Strep tag（登録商標）に結合するStrep Tactin（登録商標））を用いることによって、エキスピボで検出または追跡されてもよい。いくつかの態様において、作用物質は、ストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep tagなどである、記載されているようなStrep tag（登録商標）IIまたはtwin Strep tagを含む。いくつかの態様において、作用物質を認識する結合分子は、作用物質に可逆的に結合することができる試薬、例えばストレプトアビジンムテインなどであり、作用物質に特異的に結合するStrep Tactinまたは他のストレプトアビジンムテインを含む。いくつかの態様において、作用物質を認識する結合分子は抗体、例えば抗Strep tag抗体などである。

20

【0461】

いくつかの局面において、細胞表面コンジュゲートを発現する細胞の検出の後に、結合分子に結合した細胞を単離または選択するための工程が続く。いくつかの態様において、細胞は、1つまたは複数の特性または活性、例えば、細胞表面マーカー（例えば、活性化マーカー）の発現、組換え受容体（例えば、CAR）の発現に基づく細胞表面表現型などについて、または細胞傷害性活性、サイトカイン分泌能、もしくは増殖能を含む1つもしくは複数の抗原特異的な活性について、さらに分析または評価され得る。

30

【0462】

いくつかの態様において、モニターする方法は、コンジュゲートの作用物質に特異的に結合する結合分子を対象に投与することによって、インピボで行われる。いくつかの態様において、対象に投与される結合分子は、作用物質を認識するもの、例えば本明細書において記載されるいずれかである。いくつかの態様において、作用物質は、ストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep tagなどであり、記載されるようなStrep tag（登録商標）IIまたはtwin Strep tagを含む。いくつかの態様において、結合分子は、作用物質に可逆的に結合することができる非抗体作用物質、例えばストレプトアビジンムテインなどであり、作用物質に特異的に結合するStrep Tactinまたは他のストレプトアビジンムテインを含む。いくつかの態様において、作用物質を認識する結合分子は、抗体、例えば抗Strep tag抗体などである。いくつかの態様において、細胞、例えばコンジュゲート、したがって組換え受容体を発現する細胞のリアルタイムでの画像化は、形質導入細胞の位置をインピボで明らかにする。

40

【0463】

そのような方法の局面において、対象に投与される結合分子は可溶性である。態様にお

50

いて、結合分子は抗体であるか、またはインタクトな抗体が結合する作用物質（例えば、Strep tag）に結合するインタクトな抗体の一部を含む抗原結合フラグメントである。他の態様において、結合分子は、コンジュゲートの作用物質に結合することができる非抗体試薬である。

【0464】

Strep Tactinまたは他のストレプトアビジンムテインを含むストレプトアビジンムテインなどの非抗体試薬の場合、結合分子は、固体支持体に結合されない、すなわち、それは可溶性形態で存在するかまたは可溶性である。原則として、支持体、例えば上述したような固体支持体または固定相に固定化される試薬の場合と同じ試薬が使用され得る。例えば、上記の試薬の任意の例が、そのような試薬を支持体に固定化または付加することなく、例えば、固体支持体または固定相に付加せずに使用され得る。いくつかの態様において、試薬は、結合パートナーCとの相互作用を通じた結合物質への可逆的結合のための複数の結合部位Zを含む。いくつかの例において、試薬は、個別分子のオリゴマーもしくはポリマー、または個別分子を形成するサブユニットのコンジュゲートのオリゴマーもしくはポリマー（例えば、二量体、三量体もしくは四量体タンパク質のオリゴマーもしくはポリマー）である。いくつかの態様において、試薬は、例えば、ストレプトアビジンムテインオリゴマー、カルモジュリンオリゴマー、あるいは、遷移金属イオンに結合することができ、それによってその試薬をオリゴヒスチジン親和性タグ、多量体グルタチオンSトランスフェラーゼまたはビオチニル化担体タンパク質に結合できるようにする少なくとも2つのキレート基Kを提供する化合物（オリゴマー）であり得る。

10

20

【0465】

いくつかの態様において、結合分子、例えば、非抗体試薬（例えば、四量体ストレプトアビジンムテインなどの、ストレプトアビジンまたはムテイン）は、試薬に付加された固体支持体（表面）の不存在により特徴づけられる。例えば、いくつかの態様において、試薬は、粒子、ビーズ、ナノ粒子、マイクロスフィアまたは他の固体支持体を含まないかまたはそれらに（直接的もしくは間接的に）付加されない。いくつかの態様において、試薬は、硬直している、柔軟性のないもしくは堅いものではない、または硬直している、柔軟性のないもしくは堅い表面を含まないかもしくはそれに付加されない。いくつかの態様において、試薬は、柔軟であるまたは実質的に柔軟である。いくつかの例において、試薬は、細胞の表面の形状に対して調節するまたは適合させることができる。いくつかの態様において、試薬は、球形または実質的に球形の形状を含まない。

30

【0466】

いくつかの態様において、結合分子、例えば、非抗体試薬（例えば、四量体ストレプトアビジンムテインなどの、ストレプトアビジンまたはムテイン）の実質的にすべて、すなわち、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%超またはそれ以上が、有機物である、有機物から構成されるまたは有機物を含む。例えば、いくつかの態様において、結合分子、例えば非抗体試薬（例えば、四量体ストレプトアビジンムテインなどの、ストレプトアビジンまたはムテイン）の80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%超またはそれ以上が、脂質、糖質、タンパク質、ペプチドもしくはそれらの混合物である、それらから構成されるまたはそれらを含む。いくつかの態様において、試薬は、無機物、無機コア、例えば金属、例えば鉄、合成または無機ポリマー、例えばスチレンポリマー、例えばポリスチレン、ラテックス、シリカもしくは磁性コアを本質的に含まない、本質的にそれらから構成されないまたは本質的にそれらを含まない。例えば、いくつかの態様において、試薬の一部として含まれる試薬における無機物の相対パーセンテージは、20%、15%、10%、5%未満またはそれより少ない。

40

【0467】

いくつかの態様において、水溶液中の、結合分子、例えば、非抗体試薬（例えば、四量体ストレプトアビジンムテインなどの、ストレプトアビジンまたはムテイン）の全体の大部分（すなわち、50%超）、例えば60%、70%、80%、90%、95%、99%超またはそれ以

50

上は、試薬を含む個別タンパク質分子、例えば個別分子または個別分子を形成するサブユニットのコンジュゲート（例えば、四量体分子）のオリゴマーもしくはポリマーからなる。いくつかの態様において、可溶性試薬の総密度は、 1.2 g/cm^3 、 1.1 g/cm^3 、 1.0 g/cm^3 未満またはそれより小さい。

【0468】

いくつかの態様において、例えば支持体または固体支持体に付加されていない（例えば、ビーズに付加されていない）可溶性試薬は、比較的小さいサイズ、例えば、通常、 20 nM 未満または約 20 nM 未満のサイズ、例えば、 15 nM 未満もしくは約 15 nM 未満、 10 nM 未満もしくは約 10 nM 未満、 5 nM 未満もしくは約 5 nM 未満、またはそれより小さい。

【0469】

いくつかの態様において、例えば支持体または固体支持体に付加されていない（例えば、ビーズに付加されていない）可溶性試薬は、生物学的に不活性である、すなわち、それは生細胞に対して非毒性である。いくつかの態様において、試薬は生分解性であり得る、例えば、それは酵素的活性によって分解され得るまたは食細胞によって除去され得る。

【0470】

いくつかの態様において、結合分子、例えば、非抗体試薬（例えば、四量体ストレプトアビジンムテインなどの、ストレプトアビジンまたはムテイン）を担体、例えば有機担体に反応させることが可能である。いくつかの局面において、多糖との反応に加えて、担体タンパク質として生理学的または薬学的に許容されるタンパク質、例えば血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）またはウシ血清アルブミン（BSA））を使用することも可能である。そのような例において、試薬、例えば、（個別の四量体としてまたはオリゴマーの形態のいずれかの）ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、非共有結合的相互作用を通じて担体タンパク質に連結され得る。いくつかのそのような態様において、（様々な販売元、例えば、いくつか挙げるとThermoFisher Scientific、Sigma AldrichまたはVectorlabs、から市販されている）ビオチニル化BSAを、試薬（例えば、ストレプトアビジンムテイン）と反応させることができる。いくつかの局面において、試薬オリゴマー（例えば、ストレプトアビジンオリゴマー）の一部は、オリゴマーの結合部位Zの大部分を作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）および本明細書に記載される任意のさらなる作用物質との結合に利用可能な状態で残しつつ、1つまたは複数の結合部位Zを通じて、ビオチニル化担体タンパク質に非共有結合的に連結され得る。したがって、そのようなアプローチによって、複数の結合部位Zを有する可溶性試薬が調製され得る。

【0471】

他の態様において、試薬、例えば、（個別の四量体としてまたはオリゴマーの形態のいずれかの）ストレプトアビジンムテインは、合成担体、例えばポリエチレングリコール（PEG）分子に、共有結合的に連結され得る。任意の適当なPEG分子が、例えば、この目的で使用され得、PEG分子および各試薬は可溶性であり得る。典型的に、 1000 Da の分子量までのPEG分子は、本発明の方法において使用され得る水または培養培地に可溶性である。いくつかの例において、そのようなPEGベースの試薬は、市販の活性化PEG分子（例えば、NOF North America Corporation, Irvine, California, USAから入手可能なPEG NHS誘導体またはCreative PEGWorks, Chapel Hills, North Carolina, USAから入手可能な活性化PEG誘導体）とストレプトアビジンムテインのアミノ基とを用いて調製され得る。

【0472】

いくつかの局面において、インビボ検出は、インビボで検出可能なシグナルを提供するまたはシグナルを誘導する部分にコンジュゲートされる抗体または非抗体試薬（例えば、四量体ストレプトアビジンムテインなどのストレプトアビジンまたはムテイン）のような、結合分子を用いて実施される。いくつかの態様において、結合分子は、画像化モダリティにコンジュゲートされる。いくつかの局面において、画像化モダリティには、これらに限定されないが、X線、CTスキャン、MRIスキャン、PETスキャン、超音波、フローサイトメトリー、近赤外線画像化システム、または他の画像化モダリティによる検出について当

10

20

30

40

50

技術分野において公知である、蛍光化合物、放射性同位体、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート、酵素、酸化鉄ナノ粒子、または他の画像化作用物質が含まれる（例えば、Yu et al., Theranostics 2:3, 2012を参照のこと）。

【0473】

いくつかの態様において、試薬は、検出マーカー、例えば生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート、酵素、酸化鉄ナノ粒子、ナノ粒子、蛍光化合物、蛍光マーカー、および酵素によりタグ付加される。検出マーカー/標識の例には、種々の酵素、補欠分子属、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が含まれる。適した酵素の例には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適した補欠分子属複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる。適した蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロ[pi]アジニルアミンフルオレセイン (dichlorot[pi]azinyllamine fluorescein)、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例にはルミノールが含まれる。生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる。本明細書に記載される診断の方法の特定の態様において、検出可能な部分は放射性核種である。ある特定の態様において、放射性核種は、⁴⁷Sc、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁸⁹Sr、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁹⁰Y、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁸Ag、¹¹¹In、^{117m}Sn、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、²¹²Bi、¹⁸F、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、⁵⁵Co、⁶⁰Cu、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁶Ga、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸²Rb、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁹⁰Y、¹¹¹In、⁹⁹Tc、および²⁰¹Tlからなる群より選択される。

【0474】

いくつかの態様において、細胞を検出するためのインビボ画像化方法は、磁気共鳴画像法 (MRI)、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法 (SPECT)、コンピュータ断層撮影 (CT)、コンピュータ体軸断層撮影 (CAT)、電子線コンピュータ断層撮影 (EBCT)、高解像度コンピュータ断層撮影 (HRCT)、下環状断層撮影、陽電子放出断層撮影 (PET)、シンチグラフィ、ガンマカメラ、検出器、検出器、蛍光イメージング、低照度イメージング、X線、生物発光イメージング、および他の画像化モダリティであり得る。

【0475】

いくつかの態様において、検出および/またはモニタリングは、コンジュゲートの細胞表面分子部分を検出および/またはモニターすることによって行うことができる。例えば、いくつかの態様において、改変された細胞表面分子は、細胞表面分子に結合できるかまたはそれを標的にできる、および検出することができる、例えば検出可能な標識を含む、結合分子または標的指向性分子と接触させることによって、検出および/またはモニターできる。いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートは、対応する抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは他の細胞表面分子標的指向性分子、例えば、表1に記載される任意の抗体またはそれらの抗原結合フラグメントを用いて、検出することができる。いくつかの態様において、そのような抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは他の標的指向性分子は、本明細書において提供される検出またはモニタリング方法のいずれかにおいて用いることができる。

【0476】

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートの細胞表面分子部分を標的とする、検出する、および/またはモニターするための標的指向性分子は、例えば、これらに限定されないが、3F8、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アダカツムマブ、アフツズマブ、アレムツズマブ、アルツモマブペンテタート、アナツモマブマフェナトックス、アポリズマブ、アルシツモマブ、アセリズマブ、アトリズマブ (= トシリズマブ)、パシリキシマブ、ベクツモマブ、ベンラリズマブ、ベシレソマブ、ピバツズマブメルタンシン、プリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、カンツズマブメルタンシン、カプロマブペンデチド、カツマキシマブ、CC49、セデリズマブ、セルモロイキン、シタツズマブボガトックス、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CNT0 95、コナツムマブ、ダセツズ

マブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デツモマブ、エクロメキシマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エロツズマブ、エンリモマブペゴル、エピツモマブシツキセタン、エブラツズマブ、エルリズマブ、エタラシズマブ、ファノレソマブ、ファラリモマブ、ファルレツズマブ、ガリキシマブ、ガビリモマブ、ゲムツズマブオゾガミシン、グレムバツムマブベドチン、ゴミリキシマブ、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ、インテツムマブ、イラツムマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガミシン、イピリムマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ、リンツズマブ、レキサツムマブ、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マバツムマブ、マスリモマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミツモマブ、ムロモナブ CD3、ナプツモマブエスタフェナトックス、ナタリズマブ、オクレリズマブ、オツリモマブ、オファツムマブ、オララツマブ、オポルツズマブモナトックス、オレゴボマブ、オテリキシズマブ、ペムツモマブ、プリリキシマブ、PRO 140、リツキシマブ、ロベリズマブ、ルプリズマブ、サツモマブペンデチド、シプリズマブ、ソソツズマブ、タドシズマブ、タブリツモマブパブトックス、テネリキシマブ、テプリズマブ、TGN1412、チシリムマブ(=トレメリムマブ)、チガツズマブ、トシリズマブ(=アトリズマブ)、トラリズマブ、トシツモマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブ、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ビシリズマブ、ビタキシマブ、ボロシキシマブ、ボツムマブ、ザノリムマブ、ジラリムマブ、ゾリモマブアリトックス、アテゾリズマブ、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、デノスマブ、ジヌツキシマブ、ニボルマブ、オビヌツズマブ、ペムプロリズマブ、ピジリズマブ(CT 011)、ラムシルマブ、シルツキシマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、CEA scan Fabフラグメント、OC125モノクローナル抗体、ab75705、B72.3、M PDL3280A、MSB001078C、MEDI4736を含む抗体、またはその抗原結合フラグメント、その類似体もしくは誘導体、またはFabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)'₂フラグメント、単鎖 Fv(scFv)、もしくはジスルフィド安定化Fv(dsFv)から選択される抗原結合抗体フラグメントを含むことができる。いくつかの態様において、改変細胞表面分子は、上述の抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれかによって認識されるエピトープを含む。

10

20

【0477】

いくつかの態様において、細胞表面分子はPSMAまたはその改変形態である。いくつかの態様において、結合分子または標的指向性分子は、抗体またはその抗原結合フラグメントであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、結合分子または標的指向性分子は、リガンドおよび/または低分子であるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、結合分子は、PSMAの活性部位または基質結合部位に結合することができる低分子であるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、結合分子は、PSMAおよび/またはその改変形態のアンタゴニスト、選択的アンタゴニスト、インバースアゴニスト、選択的インバースアゴニスト、アゴニスト、選択的アゴニスト、阻害剤、および/または選択的阻害剤であるか、またはそれらを含む。いくつかの態様において、結合分子はPSMAの阻害剤であるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、結合分子は、低分子、および/または低分子量分子、および/または低分子量阻害剤であるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、結合分子は、低分子および/または検出可能な部分である、PSMAまたはその改変形態に結合することができる部分であるかまたはそれらを含む。いくつかの態様において、検出可能な部分は検出可能なシグナルを生じることができる。いくつかの場合には、検出可能な部分は、蛍光タンパク質および/または放射線核種を含む。いくつかの態様において、結合分子または標的指向性分子は、アプタマー、ペプチド、またはそのコンジュゲートであるか、またはそれを含む。

30

40

【0478】

いくつかの態様において、結合分子または標的指向性分子は、J591、DF0 J591、CYT 35 6、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107 1A4、YPSMA 1、YPSMA 2、3E6、2G7、24.4E6、G CP 02、GCP 04、GCP 05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7 Fc、D7 CH3、4D4、A5、またはその抗原結合フラグメント、類似体、もしくはその誘導体、またはFabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)'₂フラグメント、単鎖 Fv(scFv)、もしくはジスルフィ

50

ド安定化Fv (dsFv) から選択される抗原結合抗体フラグメントの中から選択される、抗体またはその抗原結合フラグメントであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、改変細胞表面分子は、上述の抗体のいずれかまたはその抗原結合フラグメントによって認識されるエピトープを含む。

【0479】

いくつかの態様において、結合分子または標的指向性分子は、例えば、US 2002/004971 2; US 2002/0147312; US 2003/0082187; US 2004/0136998; US 2005/0202020; US 2006/0088539; US 2007/0071759; US 2010/0297653; US 2011/0020273; US 2013/0225541; US 2013/0315830; US 2014/0099257; US 2014/0227180; US 2015/0168413; US 2016/0303253; US 2017/0051074; US 6572856; US 7476513; US 8470330; US 8986655; WO 2006/07889 2; WO 2010/135431; WO 2014/198223; WO 2015/177360; WO 2016/057917; WO 2016/13081 9; WO 2016/145139; WO 2016/201300; WO 2017/004144; WO 2017/023761; AU 2002/35684 4; AU 2006/204913; AU 2006/235421; AU 2006/262231; AU 2006/315500; AU 2010/32596 9; AU 2013/328619; AU 2015/205574; CA 2353267; EP 1390069; EP 1520588; EP 158179 4; EP 1599228; EP 1610818; EP 2906250; Banerjee et al. (2011) *Angew Chem Int Ed Engl.* 50 (39): 9167-9170; Maurer et al. (2016) *Nature Reviews Urology* 13:226-235; Rowe et al. (2016) *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 19 (3): 223-230; Mease et al., (2013) *Curr Top Med Chem.* 13 (8): 951-962; Osborne et al., (2013) *Urol Oncol.* 31 (2): 144-154; Philipp Wolf (2011), *Prostate Specific Membrane Antigen as Biomarker and Therapeutic Target for Prostate Cancer, Prostate Cancer Diagnostic and Therapeutic Advances*, Dr. Philippe E. Spiess (Ed.), Intech, pp.81-100; Ruggiero et al., (2011) *J Nucl Med.* 52 (10): 1608-1615; Liu et al., (1997) *Cancer Research* 57:3629-3634; Regino et al., (2009) *Curr Radiopharm.* January; 2 (1): 9-17; Kampmeier et al. (2014) *EJNMMI Research* 4:13; Wolf et al., (2010) *The Prostate* 70:562-569; Tykvar et al. (2014) *The Prostate* 74:1674-1690; Jin et al., (2016) *EMJ Urol.* 4 (1): 62-69 and Tino et al. (2000) *Hybridoma* 19 (3): 24957に記載されているもの、またはそのフラグメント、そのコンジュゲートもしくはその誘導体であるか、またはそれらを含む。

【0480】

C. 自殺による死滅

いくつかの態様において、例えば、抗体依存性細胞障害 (ADCC) を介してまたは細胞傷害性物質により細胞を特異的に標的とすることを介して媒介される、操作された細胞のインピボでの消失および/または除去のために用いることができる方法が提供される。

【0481】

1. ADCC

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートは、細胞自殺を誘導するために用いられてもよい。例えば、細胞表面分子、例えば、本明細書に記載される改変細胞表面分子は、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 経路を介する自殺遺伝子として用いられてもよい。ADCCは、Fc受容体を発現する非特異的細胞傷害性細胞、例えばナチュラルキラー細胞、好中球、およびマクロファージなどが、標的細胞上の結合抗体を認識して、標的細胞の溶解をもたらす、細胞媒介性反応を指す。ADCC活性は、米国特許第5,821,337号に記載されているものなどの方法を用いて評価されてもよい。

【0482】

いくつかの態様において、ADCCは、コンジュゲートの細胞表面分子を標的とする任意の抗体を対象に投与することによって媒介されてもよい。いくつかの態様において、表1に提供される例示的な改変細胞表面分子は、表1に提供される対応する抗体の対象への投与によって媒介されるADCCの活性化を介する自殺遺伝子として用いられてもよい。いくつかの局面において、改変EGFR細胞表面分子は、ADCCのセツキシマブ媒介活性化を介する自殺遺伝子として用いられてもよい。いくつかの局面において、セツキシマブまたはADCCによって媒介される自殺による死滅は、細胞表面分子に連結された作用物質 (Strep Tag (登

録商標)) を利用する選択プロセスによる影響を受けない。いくつかの局面において、細胞表面上に発現するように操作されたPSMAまたはその改変形態は、抗PSMA抗体、例えば本明細書に記載のいずれかなどである結合分子または標的指向性分子の投与を介して、例えばADCCの活性化によって、自殺遺伝子として用いられてもよい。別の態様において、本明細書において提供される細胞表面コンジュゲートを発現する操作されたT細胞の除去は、コンジュゲートの作用物質(例えば、親和性タグ)に特異的な抗体を投与することによって達成されてもよい。本明細書において記載されるものを含む、親和性タグに特異的な例示的な抗体作用物質は、公知である。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep Tag(登録商標)などが作用物質として用いられる場合、抗Strep Tag(登録商標)抗体または抗Strep Tag(登録商標) scFvが、ADCC経路を活性化するために用いることができる。例示的な抗Strep tag抗体には、市販のStrepMAB Classic、モノクローナル抗体StrepMAB Immo(IBA)、抗Streptag II抗体(Genscript)、またはStrep tag抗体(Qiagen) が含まれる。

10

【0483】

2. 細胞傷害性分子によって標的とされる作用物質

いくつかの態様において、自殺による死滅は、コンジュゲートの作用物質(例えば、親和性タグ)に特異的な細胞傷害性分子を対象に投与することによって達成される。いくつかの態様において、そのような細胞傷害性分子は、抗体または非抗体試薬を含む作用物質に特異的な結合分子が、細胞傷害性作用物質にコンジュゲートされているものを含む。そのような方法の局面において、対象が、操作された細胞の毒性または免疫原性に関連するなど、投与された細胞に有害な副作用を有するまたは有するおそれがあるまたは発生することが公知であるかまたはそのような疑いがある場合に、細胞傷害性分子が対象に投与される。

20

【0484】

いくつかの態様において、結合分子は、ストレプトアビジンムテイン、例えばStrept T actinまたは他のストレプトアビジンムテインを含む記載されているいずれかなどであるか、またはそのオリゴマーである。本明細書において、細胞傷害性作用物質に連結またはコンジュゲートとされる、ストレプトアビジンもしくはストレプトアビジンムテインまたはストレプトアビジンもしくはストレプトアビジンムテインのオリゴマー、例えば本明細書に記載されるいずれかなども提供される。いくつかの局面において、結合分子試薬は、SEQ ID NO: 3~6、27もしくは28のいずれかに示されるストレプトアビジンもしくはストレプトアビジンムテイン、またはSEQ ID NO: 3~6、27もしくは28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、またはそれを上回る配列同一性を示しかつストレプトアビジン結合ペプチド作用物質(例えば、Strep tag)に結合するアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、結合分子は、作用物質に特異的な抗体または抗原結合フラグメントである。

30

【0485】

いくつかの場合には、細胞傷害性作用物質は毒素または放射性金属であり得る。他の細胞傷害性作用物質には、これらに限定されないが、細胞傷害性成分(例えば、抗有糸分裂剤(例えば、ビンデシン)などの化学療法剤、葉酸拮抗剤、アルキル化剤(例えば、テモゾロミド)、細菌性毒素、リシン、抗ウイルス剤、放射性同位元素、放射性金属)が含まれる。そのような細胞傷害性作用物質は、特定の細胞を対象とする場合に、例えば、組換え受容体の活性が望ましいものではない場合、操作された細胞を特異的に死滅させるまたは無効にさせるのに有用であり得る。

40

【0486】

いくつかの態様において、細胞毒性試薬は、酵素(Aユニット)を細胞内に能動的に移動させる輸送体タンパク質(Bユニットまたは結合ユニット)を用いる、AB毒素と呼ばれる細菌性毒素の主要なクラスに属する細菌性毒素である。AB毒素の例には、ボツリヌス神

50

経毒素、炭疽毒素、ジフテリア毒素、志賀毒素、志賀様毒素、エキソトキシンA、およびコレラ毒素が含まれる。これらの毒素のすべての間で作用のメカニズムが類似していることから、すべてのこれらの毒素は、本発明の種々の局面において機能することが企図される。これらのおよび多様な他の毒素のAおよびB成分は周知である。

【0487】

細菌性毒素はしばしば、AおよびBと名付けられる、2種類の機能的に異なる部分を有する。「A」成分は通常「活性」部分であり、「B」成分は通常「結合」部分である。したがって、A部分または成分は触媒活性を含む一方で、B部分または成分は、標的細胞内へのA部分の細胞質送達に必要なとされる決定基を持つ。これらの送達決定機は、受容体結合活性および、常にではないが、多くの場合、膜透過活性を含む。多くの細菌性毒素、例えばジフテリア毒素などは、単一ポリペプチド内に両方の部分を含む。炭疽毒素は、これとは対照的に、A機能およびB機能が別々のタンパク質に存在しているクラスである、いわゆる二成分毒素のメンバーである。分かれてはいるものの、A機能およびB機能を有するタンパク質は、細胞の中毒時に相互作用する。炭疽毒素は、2つの代替的A部分、浮腫因子（EF; 89 kDa）および致死因子（LF; 89 kDa）を細胞質内に送達するための、単一のB部分、防御抗原（PA; 83 kDa）を用いる（細菌性毒素の例として国際特許出願公開番号W02012096926号を参照のこと）。

【0488】

いくつかの局面において、毒素は、ペプチド毒素、リシンA鎖毒素、アプリンA鎖、ジフテリア毒素（DT）A鎖、シュードモナス（*Pseudomonas*）外毒素、志賀毒素A鎖、ゲロニン、モモルジン、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サポリン、トリコサンチンまたは大麦毒素である。いくつかの局面において、毒素はフォトトキシンである。いくつかの態様において、ペプチド毒素は、SEQ ID NO:100に示されるアミノ酸の配列を含む。

【0489】

いくつかの態様において、細胞傷害性作用物質の投与は、操作された細胞を含まないおよび/または抗原を発現しない細胞または組織の、健全な組織または健全な細胞の死滅または破壊を誘導しない、かまたはそれらを実質的に誘導しない。

【0490】

3. 二量体形成が媒介する死滅

いくつかの態様において、細胞表面コンジュゲートを発現する細胞の自殺による死滅は、例えば二量体形成時に、細胞の死滅を媒介することができる細胞内シグナル伝達ドメインを有する細胞表面コンジュゲートを利用することによって達成される。いくつかの態様において、死滅は、アポトーシスにつながる細胞破壊を開始するカスパーゼ活性を介して媒介される。いくつかの局面において、細胞表面コンジュゲートは、アポトーシス経路の一部である、カスパーゼ9のシグナル伝達ドメインを含む。

【0491】

いくつかの態様において、二量体形成は、コンジュゲートの作用物質に特異的に結合する結合分子を対象に投与することによって実施される。いくつかの態様において、コンジュゲートの作用物質への結合分子の結合は、カスパーゼサブユニットの二量体形成を誘導し、シグナル伝達ドメインによるシグナル伝達を誘導、調節、活性化、媒介、および/または促進する。いくつかの態様において、二量体形成は、細胞のカスパーゼ9依存性細胞死をもたらすことができる。

【0492】

いくつかの態様において、対象に投与される結合分子は、本明細書に記載されるいずれかなどの作用物質を認識する結合分子である。いくつかの態様において、作用物質は、ストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep tagなどであり、記載のようなStrep tag（登録商標）IIまたはtwin Strep tagを含む。いくつかの態様において、結合分子は、作用物質に特異的に結合することができる、いくつかの場合では可逆的に結合することができる非抗体作用物質、例えば、ストレプトアビジンムテインなどであり、Strep Tactinまたは他のストレプトアビジンムテインおよびそのオリゴマーを含む。いくつかの態様におい

10

20

30

40

50

て、作用物質を認識する結合分子は抗体、例えば抗Strep tag抗体などである。

【0493】

VII. 定義

本明細書で用いられる場合、ヌクレオチドまたはアミノ酸位置が開示した配列、例えば配列表に示される配列などにおけるヌクレオチドまたはアミノ酸位置「に対応する」という記載は、GAPアルゴリズムなどの標準的なアライメントアルゴリズムを用いて同一性が最大になるように、開示した配列によるアライメントによって特定されたヌクレオチドまたはアミノ酸位置を指す。配列を整列させることによって、当業者は、例えば、保存される同一のアミノ酸残基をガイドとして用いて、対応する残基を特定することができる。一般に、対応する位置を特定するために、アミノ酸の配列は、最も高い順序の適合 (order match) が得られるように整列させる (例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Human a Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073を参照のこと)。

10

【0494】

本明細書で用いられる「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。本用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、およびそれが導入された宿主細胞のゲノム中に組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが機能的に連結されている核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。ベクターには、ウイルスベクター、例えばガンマレトロウイルスベクターといったレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターなどが含まれる。

20

【0495】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫も含む。宿主細胞には「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これには初代形質転換細胞、および継代数に関係なくそれらに由来する子孫が含まれる。子孫は、核酸の内容が親細胞と完全に一致していなくてもよく、変異を含有してもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も、本明細書に含まれる。

30

【0496】

本明細書で用いられる場合、細胞または細胞の集団が特定マーカに関して「陽性」であるという記述は、特定マーカ、典型的には表面マーカが、細胞上または細胞中に検出可能な程度に存在することを指す。表面マーカに言及する場合、本用語は、フローサイトメトリーによって、例えばマーカに特異的に結合する抗体で染色し該抗体を検出することによって、検出される表面発現の存在を指し、この場合、染色は、アイソタイプ一致対照を他の点では同一の条件下で用いて同じ手順を行って検出される染色を実質的に上回るレベルで、および/またはそのマーカに関して陽性であることが公知である細胞のレベルと実質的に類似するレベルで、および/またはそのマーカに関して陰性であることが公知である細胞のレベルよりも実質的に高いレベルで、フローサイトメトリーによって検出可能である。

40

【0497】

本明細書で用いられる場合、細胞または細胞の集団が特定マーカに関して「陰性」であるという記述は、特定マーカ、典型的には表面マーカが、細胞上または細胞中に実質的に検出可能な程度に存在しないことを指す。表面マーカに言及する場合、本用語は、フローサイトメトリーによって、例えばマーカに特異的に結合する抗体で染色し該抗

50

体を検出することによって、検出される表面発現の非存在を指し、この場合、染色は、アイソタイプ一致対照を他の点では同一の条件下で用いて同じ手順を行って検出される染色を実質的に上回るレベルで、および/またはそのマーカーに関して陽性であることが公知である細胞のレベルよりも実質的に低いレベルで、および/またはそのマーカーに関して陰性であることが公知である細胞のレベルと比較して実質的に類似するレベルで、フローサイトメトリーによって検出されない。

【0498】

本明細書で用いられる場合、「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」および「パーセント同一性」は、アミノ酸配列(参照ポリペプチド配列)に関して用いられる場合、必要に応じて、最大のパーセント配列配列を達成するように、配列を整列させかつギャップを導入した後の、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である候補配列(例えば、対象の抗体またはフラグメント)におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義され、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮しない。パーセントアミノ酸配列同一性を判定することを目的としたアライメントは、当技術分野における技術の範囲内である種々の方法で達成することができ、例えば、BLAST、BLAST 2、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを用いる。当業者は、配列を整列させるのに適切なパラメータを決定することができ、比較されるべき配列の全長に対して最大のアライメントを達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを含む。

【0499】

本明細書で用いられる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その」は、特に文脈によって明白に指示されていない限り、その対象物の複数形も含む。例えば、「1つの(a)」または「1つの(an)」は、「少なくとも1つの」または「1つまたは複数の」を意味する。本明細書に記載される局面および変形は、局面および変形「からなる」ならびに/または局面および変形「から本質的になる」を含むと理解される。

【0500】

本開示を通して、特許請求される主題の様々な局面は、範囲形式で提示される。範囲形式での記載は、単に便宜上および簡潔化のためであり、特許請求される主題の範囲に対する確固たる限定として解釈されるべきでないことが、理解されるべきである。したがって、範囲の記載は、可能な部分範囲およびその範囲内の個々の数値をすべて具体的に開示しているとは見なされるべきである。例えば、ある値域が提供される場合、その範囲の上限値と下限値との間の各介在値、およびその規定範囲内の任意の他の規定値または介在値が、特許請求される主題内に包含されることが理解される。これらのより小さな範囲の上限値および下限値は、独立的にそのより小さな範囲内に含まれてよく、これらもまた、規定範囲における任意の具体的に除外される限界値にしたがって、特許請求される主題内に包含される。規定範囲が限界値の一方または両方を含む場合、それら含まれた限界値の一方または両方を除外する範囲もまた、特許請求される主題内に含まれる。このことは、範囲の幅とは無関係に適用される。

【0501】

本明細書で用いられる「約」という用語は、当業者にとっては明白な、各値に関する通常の誤差範囲を指す。本明細書において「約」のついた値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータそのものに向けられた態様を含む(および記載する)。例えば、「約X」に言及する記載は「X」の記載を含む。

【0502】

本明細書で用いられる場合、組成物とは、2種またはそれ以上の、細胞を含めた製品、物質、または化合物の任意の混合物を指す。組成物は、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性、またはそれらの任意の組み合わせであってよい。

【0503】

本明細書で用いられる場合、「対象」は、ヒトまたは他の動物である哺乳動物であり、典型的にはヒトである。

【0504】

特に定義されない限り、本明細書で用いられる専門用語、表記、ならびに他の技術用語および科学用語または用語法はすべて、特許請求される主題が関係する技術分野の当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有することが意図される。場合によっては、一般に理解されている意味を有する用語を、明確にするためにおよび/またはすぐに参照できるように本明細書において定義するが、本明細書にそのような定義を含めることは、当技術分野において一般に理解されているものとの実質的な相違を表すと必ずしも解釈されるべきではない。

【0505】

本願で参照されている、特許文書、科学文献およびデータベースを含むすべての刊行物は、各々個々の刊行物が個別に参照により組み入れられるように、すべての目的のために、それらの全体が参照により組み入れられる。本明細書に示されている定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、出願、公開された出願および他の刊行物に示されている定義と相反するまたは別の形で整合しない場合、参照により本明細書に組み入れられる定義よりも、本明細書に示されている定義が優先される。

【0506】

本明細書で使用される節の見出しは、編集上の目的を有するにすぎず、記載される内容を限定するものと解釈されるべきでない。

【0507】

VIII. 例示的態様

提供される態様には以下が含まれる：

1. (a) 機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子；ならびに

(b) ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに結合することができる、細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

2. 作用物質が、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインに対して 10^4 M ~ 10^{10} Mまたは約 10^4 M ~ 約 10^{10} Mの平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、態様1の細胞表面コンジュゲート。

3. (a) 機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子；ならびに

(b) 該細胞表面分子に連結され、かつ、試薬に可逆的に結合することができるおよび/または競合物質の存在下で競合し得る、少なくとも1つの作用物質であって、50アミノ酸未満の長さのペプチドである、作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

4. 作用物質が、試薬に対して 10^4 M ~ 10^{10} Mまたは約 10^4 M ~ 約 10^{10} Mの平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、態様3の細胞表面コンジュゲート。

5. 試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインである、態様3または態様4の細胞表面コンジュゲート。

6. (a) 機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない細胞表面分子；ならびに

(b) 試薬に対して 10^7 M超の平衡解離定数 (K_D) または 10^7 M未満の平衡結合定数 (K_A) の結合親和性を有する、該細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

7. 試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインである、態様6の細胞表面コンジュゲート。

8. 細胞表面分子が、膜貫通ドメインを含むおよび/または細胞表面上で発現され得る、態様1~7のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

9. 細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して修飾されており、任意で、参照細胞表面分子が、細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞表面受容体である、態様1~8のいずれか

10

20

30

40

50

の細胞表面コンジュゲート。

10. 修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す、態様9の細胞表面コンジュゲート。

11.a) 参照細胞表面分子と比較して修飾された細胞表面分子であって、修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す、細胞表面分子；ならびに

(b) ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに結合することができる、該細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

12. 細胞表面分子が、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない、態様11の細胞表面コンジュゲート。

13. (a) 前立腺特異的膜抗原 (PSMA) を含む細胞表面分子、またはその修飾された細胞表面分子；および

(b) ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに結合することができる、該細胞表面分子に連結された少なくとも1つの作用物質を含む、細胞表面コンジュゲート。

14. 修飾された細胞表面分子が、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/もしくは細胞内シグナル伝達を媒介することができず；ならびに/または

修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して修飾されており、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/もしくはリガンド結合を示す、

態様13の細胞表面コンジュゲート。

15. 細胞表面分子が、膜貫通ドメインを含むおよび/または細胞表面上で発現され得る、態様11~14のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

16. 作用物質が、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインに対して 10^4 M ~ 10^{10} M または約 10^4 M ~ 約 10^{10} M の平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、態様11~15のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

17. 試薬に対する作用物質の結合が、可逆的であるおよび/または競合物質の存在下で競合し得る、態様1~16のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

18. 試薬に対して作用物質が示す結合親和性よりも、試薬に対して競合物質が示す結合親和性の方が高い、態様17の細胞表面コンジュゲート。

19. 試薬に対して競合物質が示す結合親和性が、 10^{10} M ~ 10^{14} M もしくは約 10^{10} M ~ 約 10^{14} M の平衡解離定数 (K_D) であり；および/または

試薬に対して作用物質が示す結合親和性が、 10^{10} M 超の平衡解離定数 (K_D) である、態様18の細胞表面コンジュゲート。

20. ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに対する作用物質の結合が、可逆的である、および/またはビオチン、ビオチン類似体もしくはその生物学的に活性なフラグメントの存在下で競合し得る、態様1、2、5、および7~20のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

21. 少なくとも1つの作用物質が、細胞表面分子に直接的に連結されている、態様1~20のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

22. 少なくとも1つの作用物質が、少なくとも1つのリンカーを通じて細胞表面分子に間接的に連結されている、態様1~20のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

23. 少なくとも1つの作用物質が、1~4個もしくは約1~4個または1~2個もしくは約1~2個の作用物質を含む、態様1~22のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

24. 少なくとも1つの作用物質が、1つのみの作用物質を含む、態様1~23のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

25. 作用物質が、細胞表面分子の細胞外部分または領域に連結され、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、態様1~24のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

10

20

30

40

50

- 26.作用物質が、細胞表面分子のN末端に連結されている、態様1～25のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 27.作用物質が、細胞表面分子のC末端に連結されている、態様1～26のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 28.細胞表面分子の細胞外部分または領域で作用物質に連結された細胞表面分子を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインであるまたはそれを含む試薬に結合することができ、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、細胞表面コンジュゲート。
- 29.細胞表面分子の細胞外部分または領域で作用物質に連結された細胞表面分子を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、試薬に可逆的に結合することができ、作用物質が、50アミノ酸未満の長さのペプチドであり、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、細胞表面コンジュゲート。
- 30.作用物質が、 10^4 M～ 10^{10} Mまたは約 10^4 M～約 10^{10} Mの平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、態様28または態様29の細胞表面コンジュゲート。
- 31.細胞表面分子の細胞外部分または領域で作用物質に連結された細胞表面分子を含む、細胞表面コンジュゲートであって、作用物質が、試薬に対して 10^7 M超の平衡解離定数 (K_D) または 10^7 M未満の平衡結合定数 (K_A) の結合親和性を示し、任意で、細胞外部分または領域が、細胞表面分子のN末端またはC末端にある、細胞表面コンジュゲート。
- 32.作用物質が、細胞表面分子のN末端に連結されている、態様28～31のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 33.作用物質が、細胞表面分子のC末端に連結されている、態様28～31のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 34.試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはストレプトアビジンムテインであるまたはそれを含む、態様28～33のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 35.試薬に対する作用物質の結合が、可逆的であるおよび/または競合物質の存在下で競合し得る、態様28～34のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 36.試薬に対して作用物質が示す結合親和性よりも、試薬に対して競合物質が示す結合親和性の方が高い、態様35の細胞表面コンジュゲート。
- 37.試薬に対して競合物質が示す結合親和性が、 10^{10} M～ 10^{14} Mもしくは約 10^{10} M～約 10^{14} Mの平衡解離定数 (K_D) であり；および/または
 試薬に対して作用物質が示す結合親和性が、 10^{10} M超の平衡解離定数 (K_D) である、態様36の細胞表面コンジュゲート。
- 38.ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインに対する作用物質の結合が、可逆的である、および/またはビオチンもしくはビオチン類似体の存在下で競合し得る、態様28および34～37のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 39.作用物質が、細胞表面分子に直接的に連結されている、態様28～38のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 40.作用物質が、少なくとも1つのリンカーを通じて細胞表面分子に間接的に連結されている、態様28～38のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 41.細胞表面分子が、1つのみの作用物質に連結されている、態様28～40のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 42.細胞表面分子が、キメラ抗原受容体 (CAR) でない、態様1～41のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 43.細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して修飾されている、態様28～30のいずれかの細胞表面コンジュゲート。
- 44.修飾された細胞表面分子が、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/もしくは細胞内シグナル伝達を媒介することができず；ならびに/または修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/もしくはリガンド結合を示す、態様43の細胞表面コンジュゲート。
- 45.参照細胞表面分子が、天然の哺乳動物細胞表面分子である、態様43または態様44の細胞

10

20

30

40

50

胞表面コンジュゲート。

46.細胞表面分子が、抗体またはその抗原結合フラグメントによって認識され得るエピートープを含む、態様1~45のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

47.融合タンパク質である、態様1~33のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

48.ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう44位~47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列 Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷を含む、態様1、2、5、7~28および34~47のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

49.ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

a) SEQ ID NO:3~6、27および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:3~6、27および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) 作用物質に可逆的に結合する、a) もしくはb) の機能的フラグメントを含む、態様1、2、5、7~28および34~48のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

50.ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう117、120および/または121に対応する位置に1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、態様48または態様49の細胞表面コンジュゲート。

51.1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹もしくはPhe¹²¹の中から選択されるか；または

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹の1つもしくは複数から選択されるか；または

複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹から選択される、態様50の細胞表面コンジュゲート。

52.ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

a) SEQ ID NO:27または28に示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:27または28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) 作用物質に可逆的に結合する、a) もしくはb) の機能的フラグメントを含む、態様1、2、5、7~28および34~51のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

53.競合物質が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはその生物学的に活性なフラグメントであるまたはそれを含む、態様3~5、17~19および35~37のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

54.作用物質が、親和性タグである、態様1~53のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

55.作用物質が、Strep tag、Hisタグ、Flagタグ、Xpressタグ、Aviタグ、カルモジュリンタグ、ポリグルタメートタグ、HAタグ、Mycタグ、Nusタグ、Sタグ、Xタグ、SBPタグ、Sof tag、V5タグ、CBP、GST、MBP、GFP、チオレドキシントグもしくはそれらの任意の組み合わせであるまたはそれを含む、態様3、4、6、8~10、17~19、21~27、29~33、35~37、39~47および54のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

56.作用物質が、任意でStrep tagである1つまたは複数のストレプトアビジン結合ペプチドであるまたはそれを含む、態様1~55のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

57.ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列

10

20

30

40

50

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8) または Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)

を含む、態様56の細胞表面コンジュゲート。

58.作用物質が、配列 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

を含む、態様56または態様57の細胞表面コンジュゲート。

59.参照細胞表面分子が、細胞表面受容体、リガンド、糖タンパク質、細胞接着分子、抗原、インテグリンまたは分化クラスター (CD) である、態様9~58のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

60.参照細胞表面分子が、細胞表面受容体である、態様59の細胞表面コンジュゲート。

61.参照細胞表面分子が、EpCAM、VEGFR、インテグリン、任意でインテグリン v 3、 4、 IIb 3、 4 7、 5 1、 v 3または v、TNF受容体スーパーファミリーのメンバー、任意でTRAIL R1またはTRAIL R2、上皮成長因子受容体ファミリーのメンバー、PDGF受容体、インターフェロン受容体、葉酸受容体、GPNMB、ICAM 1、HLA DR、CEA、CA 125、MU C1、TAG 72、IL 6受容体、5T4、GD2、GD3、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) または分化細胞表面分子クラスター、任意でCD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA 1、CD15、CD18/ITGB 2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/バシジン、CD152/CTLA 4、CD154/CD40L、CD195/CCR5およびCD319/SLAMF7から選択される、態様9~60のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

20

62.参照細胞表面分子が、上皮成長因子受容体ファミリーのメンバーである、態様9~61のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

63.参照細胞表面分子が、上皮成長因子受容体 (EGFR)、erbB 2受容体チロシンタンパク質キナーゼ (errb2、HER2)、erbB 3受容体チロシンタンパク質キナーゼ、erbB 4受容体チロシンタンパク質キナーゼ、肝細胞成長因子受容体 (HGFR/c MET) またはインスリン様成長因子受容体 1 (IGF 1 R) である、態様9~62のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

30

64.参照細胞表面分子が、ヒトである、態様9~63のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

65.修飾された細胞表面分子が、機能的な細胞内シグナル伝達ドメインを欠如しているおよび/または細胞内シグナル伝達を媒介することができない、態様9~64のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

66.修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して細胞内シグナル伝達ドメインまたはトラフィックドメインのすべてまたは一部を欠如するよう短縮されている、態様9~65のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

67.修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子と比較して変化した細胞内在化、酵素活性および/またはリガンド結合を示す、態様9~66のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

40

68.修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子の1つまたは複数の細胞外ドメインを含む、態様9~67のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

69.修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子の天然リガンドおよび/または基質に結合することができる、態様9~68のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

70.修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子の天然リガンドおよび/または基質に対して減弱化されているまたはそれらに結合しない、態様9~68のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

71.修飾された細胞表面分子が、参照細胞表面分子の少なくとも1つの細胞外ドメインを含

50

むが、参照細胞表面分子の天然リガンドおよび/または基質によって認識される1つまたは複数の他の細胞外ドメインを欠如している、態様70の細胞表面コンジュゲート。

72.少なくとも1つの細胞外ドメインが、参照細胞表面分子に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントによって認識されるエピトープを含む、態様71の細胞表面コンジュゲート。

73.抗体またはその抗原結合フラグメントが、AMG 102、AMG 479、BIIIB0220A 5D5、CP 751、871、IMC A12、R1507、3F8、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アデカツムマブ、アフツズマブ、アレムツズマブ、アルツモマブペンテタート、アナツモマブマフェナトックス、アポリズマブ、アルシツモマブ、アセリズマブ、アトリズマブ(=トシリズマブ)、バシリキシマブ、ベクツモマブ、ベンラリズマブ、ベシレソマブ、ピバツズマブメルタンシン、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、カンツズマブメルタンシン、カプロマブペンデチド、カツマキソマブ、CC49、セデリズマブ、セルモロイキン、セツキシマブ、シクスツムマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CNT0 95、コナツムマブ、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デツモマブ、エクロメキシマブ、エルツマキソマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エロツズマブ、エンリモマブペゴル、エピツモマブシツキセタン、エブラツズマブ、エルリズマブ、エタラシズマブ、ファノレソマブ、ファラリモマブ、ファルレツズマブ、フィギツムマブ、ガリキシマブ、ガピリモマブ、ゲムツズマブオゾガミシン、グレムバツムマブベドチン、ゴミリキシマブ、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ、インテツムマブ、イラツムマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガミシン、イピリムマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ、リンツズマブ、レキサツムマブ、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マバツムマブ、マスリモマブ、マツズマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミツモマブ、ムロモナブ CD3、ナブツモマブエスタフェナトックス、ナタリズマブ、ネシツムマブ、オクレリズマブ、オヅリモマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オボルツズマブモナトックス、オレゴボマブ、オテリキシズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ペムツモマブ、プリリキシマブ、PRO 140、ニモツズマブ、ロバツムマブ、リツキシマブ、ロベリズマブ、ルプリズマブ、サツモマブペンデチド、シプリズマブ、ソソツズマブ、タドシズマブ、タブリツモマブパプトックス、テネリキシマブ、テプリズマブ、TGN1412、チシリムマブ(=トレメリムマブ)、チガツズマブ、トシリズマブ(=アトリズマブ)、トラリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブ、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ピシリズマブ、ピタキシン、ポロキシマブ、ポツムマブ、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ジラリムマブ、ゾリモマブアリトックス、アテゾリズマブ、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、デノスマブ、ジヌツキシマブ、ニボルマブ、オビヌツズマブ、ペムプロリズマブ、ピジリズマブ(CT 011)、ラムシルマブ、シルツキシマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、CEA scan Fabフラグメント、OC125モノクローナル抗体、ab75705、B72.3、M PDL3280A、MSB001078C、MEDI4736またはそれらの抗原結合フラグメントから選択される、態様46~72のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

74.参照細胞表面分子が参照EGFRであり、修飾された細胞表面分子が、修飾されたEGFRである、態様9~73のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

75.修飾されたEGFRが、セツキシマブまたはその抗原結合フラグメントによって特異的に認識されるエピトープを含む、態様74の細胞表面コンジュゲート。

76.修飾されたEGFRが、参照EGFRのEGFRドメインI、EGFRドメインII、EGFR膜近傍ドメインおよびEGFRチロシンキナーゼドメインの1つまたは複数に欠如している、態様74または態様75の細胞表面コンジュゲート。

77.修飾されたEGFRが、参照EGFRのEGFRドメインI、EGFRドメインII、EGFR膜近傍ドメインおよびEGFRチロシンキナーゼドメインのドメインのすべてに欠如している、態様74~76のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

78.修飾されたEGFRが、参照EGFRのサブドメインIIIおよびサブドメインIVからなるまたはそれらから本質的になる細胞外ドメインを含む、態様74~77のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

10

20

30

40

50

79.修飾されたEGFRが、SEQ ID NO:44もしくは46に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:44もしくは46に対して少なくとも85%、90%もしくは95%もしくは約85%、約90%もしくは約95%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、態様74~78のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

80.参照細胞表面分子が参照HER2であり、修飾された細胞表面分子が、修飾されたHER2である、態様973のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

81.修飾されたHER2が、トラスツズマブまたはその抗原結合フラグメントによって特異的に認識されるエピトープを含む、態様80の細胞表面コンジュゲート。

82.修飾されたHER2が、参照HER2のHER2ドメインI、HER2ドメインII、HER2ドメインIIIの1つまたは複数を欠如している、態様80または態様81の細胞表面コンジュゲート。

83.修飾されたHER2が、参照HER2のHER2ドメインI、HER2ドメインIIおよびHER2ドメインIIIのドメインのすべてを欠如している、態様80~82のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

84.修飾されたHER2が、参照HER2のドメインIVからなるまたはそれから本質的になる細胞外ドメインを含む、態様80~83のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

85.修飾されたHER2が、SEQ ID NO:92に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:92に対して少なくとも85%、90%もしくは95%もしくは約85%、約90%もしくは約95%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、態様80~84のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

86.参照細胞表面分子が参照PSMAであり、修飾された細胞表面分子が、修飾されたPSMAである、態様9~72のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

87.参照PSMAが、野生型PSMA、任意で野生型ヒトPSMAである、態様86の細胞表面コンジュゲート。

88.参照PSMAが、ヒトPSMAである、および/またはSEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列もしくはSEQ ID NO:96もしくは97に示されるヌクレオチドの配列によりコードされるアミノ酸の配列を含む、態様87の細胞表面コンジュゲート。

89.修飾されたPSMAが、参照PSMAの細胞外部分および膜貫通ドメインを含む、態様86~88のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

90.修飾されたPSMAが、参照PSMAと比較して、細胞内領域に1つまたは複数のアミノ酸修飾を含む、態様86~89のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

91.1つまたは複数のアミノ酸修飾が、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失および/または挿入を含む、態様86~90のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

92.修飾されたPSMAが、参照PSMAと比較して変化した細胞内在化を示す、態様86~91のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

93.修飾されたPSMAが、SEQ ID NO:94に示されるアミノ酸の配列における位置でいうW2Gに対応するアミノ酸置換を含む、またはW2を含まない、または2位にいかなる残基も含まない、態様86~92のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

94.修飾されたPSMAが、参照PSMAと比較して、11個のN末端アミノ酸の欠失または短縮を含む、態様86~93のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

95.修飾されたPSMAが、抗体またはその抗原結合フラグメントが認識することができるエピトープを含む、態様86~94のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

96.抗体またはその抗原結合フラグメントが、J591、DF0 J591、CYT 356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107 1A4、YPSMA 1、YPSMA 2、3E6、2G7、24.4E6、GCP 02、GCP 04、GCP 05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7 Fc、D7 CH3、4D4、A5およびそれらの抗原結合フラグメントの中から選択される、態様95の細胞表面コンジュゲート。

97.免疫原性でない、および/またはそれを投与した対象において免疫応答を誘導しない、態様1~96のいずれかの細胞表面コンジュゲート。

98.態様1~97のいずれかの細胞表面コンジュゲートをコードする核酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

99.核酸配列が、シグナル配列をさらに含む、態様98のポリヌクレオチド。

100.シグナル配列が、GMCSFRアルファ鎖由来のシグナルペプチドをコードする、態様99の

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド。

101.核酸配列が第1の核酸配列であり、ポリヌクレオチドが、組換え受容体をコードする第2の核酸配列をさらに含む、態様98~100のいずれかのポリヌクレオチド。

102.組換え受容体が、キメラ抗原受容体 (CAR) であるまたはそれを含む、態様101のポリヌクレオチド。

103.第1および第2の核酸配列が、内部リボソーム侵入部位 (IRES)、または自己切断性ペプチドもしくは任意でT2A、P2A、E2AもしくはF2Aであるリボソームスキップを引き起こすペプチドをコードするヌクレオチド配列によって隔てられている、態様101または態様102のポリヌクレオチド。

104.第1の核酸配列が、第2の核酸配列の上流にある、態様101~103のいずれかのポリヌクレオチド。

105.第1の核酸配列が、第2の核酸配列の下流にある、態様101~103のいずれかのポリヌクレオチド。

106.態様98~105のいずれかのポリヌクレオチドを含む、ベクター。

107.ウイルスベクターである、態様106のベクター。

108.レトロウイルスベクターである、態様106または態様107のベクター。

109.レンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターである、態様106~108のいずれかのベクター。

110.態様96~105のいずれかのポリヌクレオチドまたは態様106~109のいずれかのベクターを細胞に導入する工程を含む、改変された細胞を製造する方法。

111.態様110の方法によって製造された、改変された細胞。

112.態様98~105のいずれかのポリヌクレオチドまたは態様106~109のいずれかのベクターを含む、改変された細胞。

113.態様1~97のいずれかの細胞表面コンジュゲートを含む、改変された細胞。

114.組換え受容体をさらに含む、態様113の改変された細胞。

115.組換え受容体が、疾患もしくは障害の細胞もしくは組織に関連する、疾患もしくは障害の細胞もしくは組織に特異的である、および/または疾患もしくは障害の細胞もしくは組織において発現される標的抗原に結合することができる、態様114の改変された細胞。

116.疾患または障害が、感染疾患もしくは障害、自己免疫疾患、炎症疾患、または腫瘍もしくはがんである、態様115の改変された細胞。

117.標的抗原が、腫瘍抗原である、態様115または態様116の改変された細胞。

118.標的抗原が、 α v β 6インテグリン (av β 6インテグリン)、B細胞成熟抗原 (BCMA)、B7 H3、B7 H6、炭酸脱水酵素9 (CA9; CAIXまたはG250としても公知)、がん精巢抗原、がん/精巢抗原1B (CTAG; NY ESO 1およびLAGE 2としても公知)、がん胎児性抗原 (CEA)、サイクリン、サイクリンA2、CCモチーフケモカインリガンド1 (CCL 1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、上皮成長因子タンパク質 (EGFR)、短縮化された上皮成長因子タンパク質 (tEGFR)、III型上皮成長因子受容体変異 (EGFR vIII)、上皮糖タンパク質2 (EPG 2)、上皮糖タンパク質40 (EPG 40)、エフリンB2、エフリン受容体A2 (EPHa2)、エストロゲン受容体、Fc受容体様5 (FCRL5; Fc受容体ホモログ5またはFCRH5としても公知)、胎児型アセチルコリン受容体 (胎児型AChR)、葉酸結合タンパク質 (FBP)、葉酸受容体アルファ、ガングリオシドGD2、Oアセチル化GD2 (OGD2)、ガングリオシドGD3、糖タンパク質100 (gp100)、Gタンパク質共役受容体5D (GPCR5D)、Her2/neu (受容体チロシンキナーゼerb B2)、Her3 (erb B3)、Her4 (erb B4)、erbB二量体、ヒト高分子量黒色腫関連抗原 (HMW MA A)、B型肝炎表面抗原、ヒト白血球抗原A1 (HLA A1)、ヒト白血球抗原A2 (HLA A2)、IL 22受容体アルファ (IL 22R α)、IL 13受容体アルファ2 (IL 13Ra2)、キナーゼインサートドメイン受容体 (kdr)、カップ軽鎖、L1細胞接着分子 (L1 CAM)、L1 CAMのCE7エピトープ、ロイシンリッチリピート含有8ファミリーメンバーA (LRRC8A)、ルイスY、黒色腫関連抗原 (MAGE) A1、MAGE A3、MAGE A6、メソテリン、c Met、マウスサイトメガロウイルス (CMV)、ムチン1 (MUC1)、MUC16、ナチュラルキラーグループ2メンバーD (NKG2D)

10

20

30

40

50

リガンド、メラニンA (MART 1)、神経細胞接着分子 (NCAM)、腫瘍胎児抗原、黒色腫優先発現抗原 (PRAME)、プロゲステロン受容体、前立腺特異的抗原、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (ROR1)、サバイピン、トロホブラスト糖タンパク質 (TPBG; 5T4としても公知)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG72)、血管内皮成長因子受容体 (VEGFR)、血管内皮成長因子受容体2 (VEGFR2)、ウィルムス腫瘍1 (WT 1) からなる群より選択される、態様115~117のいずれかの改変された細胞。

119.標的抗原が、ROR1、HER2、L1 CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、B型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP 2、EGP 4、EP Ha2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW MAA、IL 22R アルファ、IL 13R アルファ2、kdr、カップ軽鎖、ルイスY、L1 細胞接着分子、MAGE A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY ESO 1、MART 1、gp100、腫瘍胎児抗原、TAG72、VEGF R2、がん胎児性抗原 (CEA)、前立腺特異的抗原、PSMA、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS 1、c Met、GD 2、MAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1 (WT 1) およびサイクリンA1 (CCNA1) からなる群より選択される、態様115~118のいずれかの改変された細胞。

120.組換え受容体が、機能的な非TCR抗原受容体またはトランスジェニックTCRである、態様114~119のいずれかの改変された細胞。

121.組換え受容体が、キメラ抗原受容体 (CAR) である、態様114~120のいずれかの改変された細胞。

122.組換え受容体が、抗原結合ドメインを含む細胞外部分を含む、態様114~121のいずれかの改変された細胞。

123.抗原結合ドメインが、抗体または抗体フラグメントであるまたはそれを含む、態様122の改変された細胞。

124.抗体フラグメントが、単鎖フラグメントである、態様123の改変された細胞。

125.フラグメントが、フレキシブルリンカーによって接続された抗体可変領域を含む、態様123または態様124の改変された細胞。

126.フラグメントが、scFvを含む、態様123~125のいずれかの改変された細胞。

127.組換え受容体が、細胞内シグナル伝達領域を含む、態様114~126のいずれかの改変された細胞。

128.細胞内シグナル伝達領域が、細胞内シグナル伝達ドメインを含む、態様127の改変された細胞。

129.細胞内シグナル伝達ドメインが、一次シグナル伝達ドメイン、T細胞において一次活性化シグナルを誘導することができるシグナル伝達ドメイン、T細胞受容体 (TCR) 構成要素のシグナル伝達ドメイン、および/または免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含むシグナル伝達ドメインであるまたはそれを含む、態様128の改変された細胞。

130.細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3鎖、任意でCD3ゼータ (CD3 ζ) 鎖の細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分であるまたはそれを含む、態様128または態様129の改変された細胞。

131.細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達領域との間に配置された膜貫通ドメインをさらに含む、態様127~130のいずれかの改変された細胞。

132.細胞内シグナル伝達領域が、共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、態様127~131のいずれかの改変された細胞。

133.共刺激シグナル伝達ドメインが、T細胞共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分を含む、態様132の改変された細胞。

134.共刺激シグナル伝達ドメインが、CD28、4 1BBもしくはICOSの細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分を含む、態様132または態様133の改変された細胞。

135.共刺激シグナル伝達ドメインが、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間にある、態様132~134のいずれかの改変された細胞。

136.免疫細胞である、態様111~135のいずれかの改変された細胞。

10

20

30

40

50

- 137.リンパ球である、態様136の改変された細胞。
- 138.T細胞またはNK細胞である、態様111～137のいずれかの改変された細胞。
- 139.CD8+ T細胞またはCD4+ T細胞であるT細胞である、態様138の改変された細胞。
- 140.態様111～139のいずれかの改変された細胞を含む、組成物。
- 141.薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、態様140の組成物。
- 142.態様111～139のいずれかの改変された細胞または態様140もしくは態様141の組成物を、疾患または障害を有する対象に投与する工程を含む、処置方法。
- 143.疾患または障害が、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは障害、または感染疾患である、態様142の方法。
- 144.改変された細胞上で発現された細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子を対象に投与する工程、および該細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を検出する工程をさらに含む、態様142または態様143の方法。 10
- 145.検出が、インビボ画像化を含む、態様144の方法。
- 146.細胞表面コンジュゲートを発現する細胞を同定する方法であって、態様1～97のいずれかの細胞表面コンジュゲートを発現するもしくは発現する可能性のある細胞または態様111～139のいずれかの改変された細胞を含む組成物、あるいは態様140もしくは態様141の組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程を含む、方法。
- 147.インビトロ、エクスピボまたはインビボで実施される、態様146の方法。
- 148.細胞表面分子を発現する細胞が、インビボ画像化を通じて検出される、態様146または態様147のいずれかの方法。 20
- 149.インビボ画像化法が、磁気共鳴画像化(MRI)、単光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)、コンピュータ断層撮影(CT)、コンピュータ体軸断層撮影(CAT)、電子ビームコンピュータ断層撮影(EBCT)、高分解能コンピュータ断層撮影(HRCT)、下環状断層撮影、ポジトロン放出断層撮影(PET)、シンチグラフィ、ガンマ線カメラ、 γ 検出装置、 β 検出装置、蛍光画像化、微光画像化、X線および生物発光画像化の中から選択される、態様145または態様148の方法。
- 150.結合分子が、インビボで検出可能なシグナルを提供するまたは誘導する部分にコンジュゲートされている、態様145、態様148または態様149の方法。
- 151.前記部分が、放射性同位体、生物発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレートまたは酵素である、態様150の方法。 30
- 152.細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を同定する方法であって、
 (a)細胞表面コンジュゲートをコードする態様98～105のいずれかのポリヌクレオチドもしくは態様106～109のいずれかのベクターを形質導入された組成物または態様111～139のいずれかの改変された細胞または態様140もしくは態様141の組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程；および
 (b)該結合分子に結合した細胞を同定する工程
 を含む、方法。
- 153.細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を同定する方法であって、
 (a)細胞表面コンジュゲートをコードする態様98～105のいずれかのポリヌクレオチドもしくは態様106～109のいずれかのベクターを細胞に導入する工程； 40
 (b)(a)の細胞を含む組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程；および
 (c)該結合分子に結合した組成物の細胞を同定する工程
 を含む、方法。
- 154.細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を選択する方法であって、
 (a)細胞表面コンジュゲートをコードする態様98～105のいずれかのポリヌクレオチドもしくは態様106～109のいずれかのベクターを形質導入された組成物または態様111～139のいずれかの改変された細胞または態様140もしくは態様141の組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程；および 50

(b) 該結合分子に結合した細胞を単離する工程を含む、方法。

155.細胞表面コンジュゲートを形質導入された細胞を選択する方法であって、

(a) 細胞表面コンジュゲートをコードする態様98~105のいずれかのポリヌクレオチドまたは態様106~109のいずれかのベクターを細胞に導入する工程；

(b) (a)の細胞を含む組成物を、該細胞表面コンジュゲートの作用物質を認識することができる結合分子と接触させる工程；および

(c) 該結合分子に結合した組成物の細胞を単離する工程を含む、方法。

156.結合分子が、検出可能な部分にコンジュゲートされているまたは検出可能なシグナルを生成することができる、態様154または態様155の方法。

157.検出可能な部分が、蛍光タンパク質を含む、態様156の方法。

158.作用物質が、ストレプトアビジン結合ペプチドである、態様144~157のいずれかの方法。

159.ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)もしくはTrp-Arg-His-
Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)

であるまたはそれを含む、態様158の方法。

160.ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-
Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-
Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-
(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

であるまたはそれを含む、態様159の方法。

161.結合分子が、作用物質に可逆的に結合することができるおよび/または競合物質の存在下で競合し得る試薬である、態様144~160のいずれかの方法。

162.試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン類似体またはムテインである、態様161の方法。

163.ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう44位~47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列 Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷を含む、態様162の方法。

164.ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

a) SEQ ID NO:3~6、27および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:3~6、27および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷または Ile⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) 作用物質に可逆的に結合する、a)もしくはb)の機能的フラグメントを含む、態様162および態様163の方法。

165.ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう117、120および/または121に対応する位置に1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、態様163または態様164の方法。

166.1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹もしくはPhe¹²¹の中から選択されるか；または

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹の1つもしくは複数

10

20

30

40

50

から選択されるか；または

複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹から選択される、
態様165の方法。

167. ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

a) SEQ ID NO:27または28に示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:27または28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) 作用物質に可逆的に結合する、a)もしくはb)の機能的フラグメントを含む、態様162～166のいずれかの方法。

168. 作用物質に対する結合分子の可逆的結合を妨害する工程をさらに含む、態様161～167のいずれかの方法。

169. 妨害する工程が、結合分子と作用物質との間の結合を解消することができる競合物質を含む組成物を細胞と接触させる工程を含む、態様168の方法。

170. 競合物質が、遊離結合パートナーであるおよび/または競合作用物質である、態様169の方法。

171. 競合物質が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはその生物学的に活性なフラグメントであるまたはそれを含む、態様169または態様170の方法。

172. 結合分子が、作用物質に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントである、態様144～171のいずれかの方法。

173. 結合分子が、抗StrepTag抗体である、態様172の方法。

174. 細胞傷害性作用物質にコンジュゲートされたストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインを含む、分子。

175. ストレプトアビジン類似体またはムテインを含む、態様174の分子。

176. ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインが、ストレプトアビジン結合ペプチドに結合する、態様174または態様175の分子。

177. ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)もしくはTrp-Arg-His-

Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)

であるまたはそれを含む、態様176の分子。

178. ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-

(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

であるまたはそれを含む、態様176または態様177の分子。

179. ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体もしくはムテインが、ストレプトアビジン結合ペプチドに対して 10^4 M～ 10^{10} Mまたは約 10^4 M～約 10^{10} Mの平衡解離定数 (K_D) の結合親和性を示す、態様176～178のいずれかの分子。

180. ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう44位～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷またはIle⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷を含む、態様174～179のいずれかの分子。

181. ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

10

20

30

50

a) SEQ ID NO:3~6、27および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；
 b) SEQ ID NO:3~6、27および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴ Thr⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷またはIle⁴⁴ Gly⁴⁵ Ala⁴⁶ Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または
 c) ストレプトアビジン結合ペプチドに結合する、a)もしくはb)の機能的フラグメントを含む、態様174~180のいずれかの分子。

10

182. ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列のストレプトアビジン内での位置でいう117、120および/または121に対応する位置に1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、態様180または態様181の分子。

183. 1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹もしくはPhe¹²¹の中から選択されるか；または

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹の1つもしくは複数から選択されるか；または

複数のアミノ酸置換が、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰もしくはTyr¹²¹から選択される、態様182の分子。

184. ストレプトアビジン類似体またはムテインが：

20

a) SEQ ID NO:27または28に示されるアミノ酸の配列；

b) SEQ ID NO:27または28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を示し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含み、作用物質に可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

c) ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、a)もしくはb)の機能的フラグメント

を含む、態様174~183のいずれかの分子。

30

185. 細胞傷害性作用物質が、毒素である、態様174~184のいずれかの分子。

186. 毒素が、ペプチド毒素、リシンA鎖毒素、アブリンA鎖、ジフテリア毒素(DT)A鎖、緑膿菌外毒素、志賀毒素A鎖、ゲロニン、モモルジン、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サボリン、トリコサンチンまたは大麦毒素である、態様185の分子。

187. 毒素が、光毒素である、態様185の分子。

188. 態様111~139のいずれかの細胞または態様140もしくは態様141の組成物を以前に投与された対象に、態様174~187のいずれかの分子を投与する工程を含む、細胞を死滅させる方法。

189. 投与された細胞に関連する毒性症状を対象が示したときに、または投与された細胞に対する検出可能なおよび/もしくは細胞性の免疫応答を対象が示したときに、前記分子が投与される、態様188の方法。

40

190. 毒性症状が、神経毒性またはサイトカイン放出症候群(CRS)に関連する、態様189の方法。

【0508】

本発明は、本明細書に開示される態様によってその範囲が限定されず、これらの態様は、本発明の個々の局面の一例であることが意図されており、機能的に等価であるあらゆるものが本発明の範囲に包含される。本明細書に記載されているものに加えて、本発明の組成物および方法に対する様々な改変物が、上記の説明および教示から当業者に明らかとなり、それらも同様に本発明の範囲に包含されることが意図されている。そのような改変物または他の態様は、本発明の真の範囲および精神から逸脱することなく実施され得る。

50

【 0 5 0 9 】

配列

SEQ ID	配列	詳細
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS IDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	ストレプトアビジン 種: ストレプトマイセス・アビジニイ (<i>Streptomyces avidinii</i>) UniProt No. P22629
2	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	最小ストレプトアビジン 種: ストレプトマイセス・アビジニイ
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY VTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS IDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	ムテインストレプトアビジン Val44-Thr45-Ala46-Arg47 種: ストレプトマイセス・アビジニイ
4	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY VTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	ムテインストレプトアビジン Val44-Thr45-Ala46-Arg47 種: ストレプトマイセス・アビジニイ
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY IGAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS IDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	ムテインストレプトアビジン Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 種: ストレプトマイセス・アビジニイ
6	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY IGAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	ムテインストレプトアビジン Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 種: ストレプトマイセス・アビジニイ
7	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	ストレプトアビジン結合ペプチド, Strep-tag ^(登録商標)
8	WSHPQFEK	Strep-tag ^(登録商標) II
9	His-Pro-Baa	ストレプトアビジン結合ペプチド Baaはグルタミン、アスパラギンおよびメチオニンから選択される
10	His-Pro-Gln-Phe	ストレプトアビジン結合ペプチド
11	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	ストレプトアビジン結合ペプチド

		OaaはTrp、LysまたはArgであり; Xaaは任意のアミノ酸であり; YaaはGlyまたはGluであり; ZaaはGly、LysまたはArgである
12	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	ストレプトアビジン結合ペプチド Xaaは任意のアミノ酸であり; YaaはGlyまたはGluであり; ZaaはGly、LysまたはArgである
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	ストレプトアビジン結合ペプチドの連続するモジュール Xaaは任意のアミノ酸であり; nは8または12のいずれかである
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	ストレプトアビジン結合ペプチドの連続するモジュール nは2または3である
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHQFEK	Twin-Strep-tag
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHQFEK	Twin-Strep-tag
18	WSHPQFEKGGGSGGGSWSHQFEK	Twin-Strep-tag
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA-タグ
21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G-タグ
22	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV-タグ
23	Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	T7エピトープ
24	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	HSVエピトープ
25	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	Mycエピトープ
26	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	V5-タグ
27	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEE NAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	ムテインストレプトアビジン Val44-Thr45-Ala46-Arg47 および Glu117, Gly120, Try121 (ムテインm1-9) 種: ストレプトマイセス・アビジニイ
28	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARI	ムテインストレプトアビジン Val44-Thr45-Ala46-

	NTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Arg47 および Glu117, Gly120, Try121 (ムテインm1-9) 種: ストレプトマイセス・ アビジニイ
29	AMQVQLKQSGPGLVQPSQSLSTICTVSGFSLTTFGVHWRQSPGKGLEWLGVIWASGITDYNVPMFMSRLSITKDNSKSVFFKLNLSLQDDTAIYYCAKNDPGTGFAYWGGQTLVTVSAGSTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSAWSPQFEKGGGSGGGSSGSAWSPQFEK	Fabフラグメントm13B8.2の 可変重鎖
30	AMDIQMTQSPASLSASVGETVFTFCRASEMIYSYLAWYQQKQKSPQLLVHDAKTLAEGVPSRFSGGGSGTQFSLKINTLQPEDFGTYTCQAHYGNPPTFGGGTKLEIKRGIAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGS	Fabフラグメントm13B8.2の 可変軽鎖
31	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	抗CD3抗体OKT3の可変重鎖
32	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	抗CD3抗体OKT3の可変軽鎖
33	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	抗CD28抗体CD28.3の 可変重鎖
34	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	抗CD28抗体CD28.3の 可変軽鎖
35	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	CD3 ゼータ ホモサピエンス (Homo sapiens)
36	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL	CD3 ゼータ ホモサピエンス

	HMQALPPR	
37	RVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDYDAL HMQALPPR	CD3 ゼータ ホモサピエンス
38	ESKYGPPCPPCP	スペーサー (IgG4ヒンジ) (aa) ホモサピエンス
39	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	スペーサー (IgG4ヒンジ) (nt) ホモサピエンス
40	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	ヒンジ-CH3 スペーサー ホモサピエンス
41	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	ヒンジ-CH2-CH3 スペーサー ホモサピエンス
42	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEE QEERETKTPECP SHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHL TWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHP SLPPQRLMALREPAQAQAPVKLSLNLLASDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILL MWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVS HEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-ヒンジ-Fc ホモサピエンス
43	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A 人工物
44	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRT DLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNK NLKYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPE PRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPN CTYGCTGPGLEGCTPNGPKIPSIATGMVGAALLLVVALGIGLFM	tEGFR 人工物
45	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcat tcctcctgatcccacgcaaagtgtgtaacggaataggattggtgaatttaa agactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacc tccatcagtgggcatctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactcct tcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgt aaaggaaatcacaggggttttctgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacg gacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaac atggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggatt acgctccctcaaggagataagtgtgagatgtgataatttcaggaaacaaa aatttgtgctatgcaaatacaataaaactggaaaaactgttgggacctcgg gtcagaaaacaaaattataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccac aggccaggtctgccatgcttgtgctccccgagggctgctggggcccgag cccagggactgctctcttgcgggaatgtcagccgaggcaggaatgctgg acaagtgcaaccttctggaggggtgagccaaggagtttgggagaactctga gtgcatacagtgccaccagagtgctgctcaggccatgaacatcacctgc acaggacggggaccagacaactgtatccagtggtgccactacattgacggcc cccactgctcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaaacaacacct ggctctggaagtacgcagacgcccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaac tgcacctacggatgcaactggccaggctcttgaaggctgtccaacgaatgggc ctaagatcccgtccatcgccactgggatggggggccctcctcttctgctgct gggtggggccctggggatcgccctcttcatg	tEGFR 人工物
46	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQF LAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLKYANTINWKKLFGTSGQKTK IISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNL	tEGFR 人工物

	LEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVK TCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPS IATGMV GALLLLLVVALGIGLFM	
47	atgcttctcctgggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcat tcctcctgatccca	GMCSFRアルファ鎖 シグナル配列 ホモサピエンス
48	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	GMCSFRアルファ鎖 シグナル配列 ホモサピエンス UniProt No. P15509
49	LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFSLQRMFN NCEVVLGNLEITYVQRNYDL SFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDAN KTGLKELPMRNLQEIILHGAVRF SNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDF QNHLSGCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLT KII CAQQCSGRGRGKSPSDCC HNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNPTTYQMDVNPEGK YSFGATCVKKCP RNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKV CNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI SGLHLILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGFSLAV VSLNITSLGLRSLKEISDGDVILSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIIS NRGENSCKATGQVCHALCSPGCGWPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCP AGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIAT GMV GALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKR TLRRLQLERELVEPLTPSGEAPN QALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGT VYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATS PKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVRE HKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLED RRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDF GLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELM TFGSKPYDGPASEI SSILEKGERLPQPP ICTIDVYMI MVKCMIDADSRPK FRELIIEF SKMARDPQRYLV IQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVD ADEYLIPQQGFFSSPSTSRTP LLSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDS FLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLN PAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLN TVQPTCVNSTFD SPAHWAQKGS HQI SL D NPDYQQDFFPKAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA	HER1/ErbB1/EGFR 全長 (成熟) 膜貫通ドメイン: アミノ酸 622~644 細胞質ドメイン: アミノ酸 645~1186 ホモサピエンス UniProt No. P00533
50	TQVCTGTDMLRLPASPETHLDMRLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFL QDIQEVGGYVLI AHNQVRQVPLQRLRIVRG TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNT TPVTGASPGGLRELQRLSLEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQ LALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSR CWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCKGP LPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALV TYNTDTFESM PNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCP LHNQEVTAEDGTQRCEKC SKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQE FAGCKKIFGSLAFLPESFDGPA SNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PDL SVFQNLQVIRGRILHN GAYSLTLQGLGISWLGRLSRLRELGSLALIHNT HLCFVHTVPWDQLFRNPH QALLHTANRPEDECVGEG LACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVE ECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDP FCVARCP SGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQPCP INCTHSCVDLDDKGC PAEQ RASPLTSII SAVVGILLVVVLGVVFG ILLKRRQQKIRKY TMRRLQETELVE PLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGT VYKGIWIPDGENVKIPV AIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGV GSPYVSRL LGICLTSTVQLVTQLMP YGCLLDHVREN RGR LGSQDLLNWCMI AKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVK SPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVP IKWMALESILRRRFTHQSDVW SYGVTVWELMTFGAKPYDGPAREIPDLLEKGERLPQPP ICTIDVYMI MVK WMIDSECRPRFREL VSEFSRMARDPQRFVVIQNE DLGPASPLDSTFYRSLLE DDDMGDLVDAEYLVLPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGDLTLG LEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGA AKGLQSLP THDPSPLQRYSE DPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVVRPQPPSPREGPLPAARPAGAT	HER2/neu/ErbB2 全長 (成熟) 膜貫通ドメイン: アミノ酸 631~653 細胞質ドメイン: アミノ酸 654~1233 ホモサピエンス UniProt No. P04626

	LERPKT LSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLT PQGGAAPQPHPPAFSPAFL NLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTP TAENPEYLGLDVPV	
51	SEVGN SQAVCPGTLNGLSVTGAENQYQTL YKLYERCEVVMGNLEIVLTGHN ADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNY NTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCMDTIDWRDIVRDRDAEIV VKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNPNQCC HDECAGGCSGPDQDFACRHFNDSGACVPRCPQLVYNKLTFLQLEPNPHTK YQYGGVCVASCPHNFVVDQTSVVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKAC EGTGSGRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEK LNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKN LNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTTEERLDIKHN RPRRDCVAEGKVCDFLCSGGCWGPGGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGE PREFAHEAEFC SCHPECPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPH GVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLT MALTVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRRIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEK ANKVLARIFKETELRKLKVLGSGVFGTVHKGWVPEGESIKIPVCIKVIEDK SGRQSFQAVTDHMLAIGSLDHAHIVRLLGLCPGSSQLVLTQYLPGLSLLDHV RQHRGALGPQLLLNWCVQIAKGMYYLEEHGMVHRNLAARNVLLKSPSQVQVA DFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTPIKWMALESIHF GKYTHQSDVWSYGVTVWE LMTFGAEPYAGLRLAEVDPDLLEKGERLAQPQICTIDVYVMVKCWMIDENIR PTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAPGPEPHGLTNKKLEEVELEP ELDLDLLEAEEDNLATTTLSALSPLVGTNLNRPRGSQSLSPSSGYMPMNQ GNLGESCQESAVSGSSERCPRPVSLHPMPRGCLASESSEGHVGTGSEAELEK VSMCRSRSRSPRPRGDSAYHSQRHSLTPVTPPLSPPGLEEEDVNGYVMPD THLKGTPSSREGTSSVGLSSVLGTEEEDEDEEYEMNRRRRHSPPHPPRPS SLEELGYEYAMDVGSDLASLSTQSCPLHPVPI MP TAGTTPDEDEYEMNRQR DGGPGGDIYAAMGACPAEQGYEEMRAFQGPGHQAPHVHYARLKTLSLEAT DSAFDNDPYWHSRLFPKANAQRT	HER3/ErbB3 全長 (成熟) 膜貫通ドメイン: アミノ酸 625~645 細胞質ドメイン: アミノ酸 646~1323 ホモサピエンス UniProt No. P21860
52	QSV CAGTENKLSLSDLEQQYRALRKYENCEVVMGNLEITSIEHNRDLSFL RSVREVTGYVLVALNQFRYLPLENLRIIRGTKLYEDRYALAIFLNYRKDGNF GLQELGLKNLTEILNGGVYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTN GSSGCGRCHKSC TGRCWGPTENHCQTLTRTVCAEQCDGRCYGPVSDCCBRE CAGGCSGPKDTCFACMNFNDSGACVTQCPQTFVYNPTTFQLEHNFNAKYTY GAFVCKKCPHNFVVDSSSCVRACPPSKMEVEENGIKMCKPCTDICPKACDGI GTGSLMSAQTVDSSNIDKFINCTKINGNLI FLVVTGIHGDPYNAIEAIDPEKL NVFRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQG ITSLQFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYYHTINWTTLFSTINQRIVIRDNRKA ENCTAEGMVCNHLCS SDGCWGPDPQCLSCRFRSRGRICIESCNLYDGEFRE FENGSI CVECDPQCEKMEDGLLTCHGPGPDNCTKCSHF KDGPNCVEKCPDGL QGANSFIFKYADPDRECHPCHPNCTQGCNGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQ HAR TPLIAAGVIGGLFILVIVGLTFAVYVRRKSIKKRALRRFLETELVEPLTPS GTAPNQALRILKETELKRVKVLGSGAFGTVYKGIWVPEGETVKIPVAIKIL NETTGPKANVEFMDALIMASMDHPLVRLVGCLSP TIQLVTLMPHGCLL EYVHEHKDNIQS QLLLNWCVQIAKGMYYLEERRLVHRDLAARNVLVKSPNHV KITDFGLARLLEGEDEKEYNADGGKMP IKWMALECIHYRKFTHQSDVWSYGV I WELMTFGGKPYDGIPTREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYVMVKCWMIDA DSRPKFKE LAAEFSRMARDPQRYLVIQGD DRMKLPSPNDSKFFQNL LDEEDL EDMMDAE EYLVPQAFNIPPIYTSRARI DSNRSEIGHSPPPAYTPMSGNQFV YRDGGFAAEQGVSVPYRAP TSTIPEAPVAQGATAEIFDDSCCNGTLRKP VAP HVQEDSSTQRY SADPTVFAPERSPRGELDEEGYMPMRDKPKQEYLN PVEEN PFVSRKNGDLQALDNPEYHNASNGPPKA EDEYVNEPLYLNTFANTLGKAEY LKNNILSMPEKAKKAFDNDPYWNHSLPPRSTLQHPDYLQEYSTKYFYKQNGR IRPIVAENPEYLSEFSLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	HER4/ErbB4 全長 (成熟) 膜貫通ドメイン: アミノ酸 627~650 細胞質ドメイン: アミノ酸 651~1283 ホモサピエンス UniProt No. Q15303
53	ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETP IQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEE DLQKVAEYKTPVLEHPDCFPQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDTYDD QLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSAL GAKVLS SVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHP LHSISVRRLKETKDGFMFLTDQ SYIDVLP EFRDSYPIKYVHAFESNNEIYFLTVQRETLD AQT FHTRIIRFCSI NSGLHSYMEMPLECILTEKRKRKSTKKEVFNIIQAAYVSKPGAQLARQIGAS	HGFR/c-Met 全長 (成熟) 膜貫通ドメイン: アミノ酸 909~931

	LNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFP IKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQH FYGPNHEHCNFRNTRLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFGQFSEVLLT SISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVVSPEVIV EHTLNQNGYTLVITGKKITKIPNLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDK CVRSEECLSGTWTQOICLPAIYKVFVNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKF DLKKTRVLLGNESECTLTSESTMTNLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQ YSTFSYVDPVITSI SPKYGPMAGGTLTTLTGNYNLNSGNSRHISIGGKTCTLK SVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFS YREDP IVEIHPKTS FISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNF TVACQHRNSSEI ICCTTP SLQQNLNLQPLKTKAFFMLDGLLSKYFDLIYVHNPFVKPFKPVMI SMGNEN VLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELN IEWKQAISSSTVLGKVIQPDQNF TGLIAGVVSISTALLLLGFFLWLKRRKQ IKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTEMVSNESVDYRATFPEDQF PNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTS GDS DISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQ AVQHVVI G P S S L I V H F N E V I G R G H F G C V Y H G T L L D N D G K K I H C A V K S L N R I T DIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGSPLVVLPYMKHGD LRNF IRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKV ADFGGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALES LQTQKFTTKSDVVSFGVL LWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRRLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKA EMRPSFSELVSRISALFSTF IGEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNAD DEVDTRPASFWETS	細胞質ドメイン: アミノ酸 932~1366 ホモサピエンス UniProt No. P08581
54	MKSGSGGGSP TSLWGLLFLSAALS L W P T S G E I C G P G I D I R N D Y Q Q L K R L E N C TVIEGYLHILLISKAEDYRSYRFPKLT V I T E Y L L L F R V A G L E S L G D L F P N L T VIRGWKLFYNYALVIFEMTNLKD I G L Y N L R N I T R G A I R I E K N A D L C Y L S T V D WSLILD AVSNNYIVGNKPPKECGDLCPGTMEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTT NRCQKMPSTYCGRACTENNECCHPECLGSCSAPDNDTACVACRHYYYAGVC VPACPPNTYRFEGWRACVDRDFCANILSAESSDSEGFVIHDGECMQECPSGFI RNGSQSMYCIPCEGPCPKVCEEEKTKTIDS V T S A Q M L Q G C T I F K G N L L I N I RRGNNIASELENFMGLIEVVVTGYVKIRHSHALVLSLFLKNLRLILGEEQLEG NYSFYVLDNQNQLQQLWDWDHRNLT I K A G K M Y F A F N P K L C V S E I Y R M E E V T G T KGRQSKGDINTRNNGERASCESDVLHFTSTTTSKNR IIIITWHRYRPPDYRDL ISFTVYYKEAPFKNVTEYDGDACGSNSWNMVDVLDLPPNKDVEPGILLHGLK PWTQYAVYVKA V T L T M V E N D H I R G A K S E I L Y I R T N A S V P S I P L D V L S A S N S S SQLIVKWNPPSLPNGNLSYYIVRWQRQPQDGYLYRHNYCSKDKIPIRKYADG TIDIEEVTENPKTEVCGGEGKGPCCACP K T E A E K Q A E K E E A E Y R K V F E N F L H N SIFVPRPERKRRDVMQVANTTMSRSRNTTAADTYNITDPEELETEYPPFES RVDNKERTVINSLRPFTLYRIDIHSCNHEAEKLGCSASNFVFARTMPAEGAD DIPGPVTWEPRPENSIFLKWPEPENPNGLIILMYEIKYGSQVEDQRECVSRQE YRKYGGAKLNRLNPNGYTARIQATSLSGNGSWTDPVFFYVQAKTGYENFIHL IIALPVAVLLIVGGLVIMLYV F H R K R N N S R L G N G V L Y A S V N P E Y F S A A D V Y V PDEWEVAREKITMSRELGQGSFGMVYEGVAKGVVKDEPETRVAIKTVNEAAS MRERIEFLNEASVMKEFNCHHVRL LGVVSQGP TLVIMELMTRGDLKSYLR SLRPEMENN P V L A P P S L S K M I Q M A G E I A D G M A Y L N A N K F V H R D L A A R N C M V A EDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPELKDGVFTTYSDVW SFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLR F V M E G L L D K P D N C P D M L F E L M R M C WQYNPKMRPSFLEI I S S I K E E M E P G F R E V S F Y Y S E E N K L P E P E E L D L E P E N M ESVPLDPSASSSSLP L P D R H S G H K A E N G P G P G V L V L R A S F D E R Q P Y A H M N G G RKNERALPLPQSSTC	IGF-1 R 全長 (成熟) 膜貫通ドメイン: アミノ酸 906~929 細胞質ドメイン: アミノ酸 930~1337 ホモサピエンス UniProt No. P08069
55	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	リンカー 人工物
56	GGGGSGGGGS	リンカー 人工物
57	cgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactcactctcca taaagtctacgaatattaacacttcaaaaaactgcacctccatcagtgccga tctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcct cctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaggaatcacag gggttttctgctgattcaggccttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctt	tEGFR 人工物

	tgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggtcagttttct cttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaagg agataagtgatggagatgtgataatcctcaggaacaaaaatttgtgctatgc aaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaacaaa attataagcaacagaggtgaaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgcc atgecttgtgctccccgagggctgctggggcccgagcccaggactgcgt ctcttggccgaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgaacctt ctggaggggtgagccaagggagtcttgggagaactctgagtgcatacagtgcc accagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggacc agacaactgtatccagtggtgcccactacattgacggccccactgcgtcaag acctgcccggcaggagtcatgggagaaaaacaacacctggtctggaagtacg cagacgcggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatg cactgggccaggtcttgaaggctgtccaacgaatgggectaagatcccgtcc atcgccactgggatggtgggggcccctcctcttgetgctggtggtggcctgg ggatcggcctcttcatg	
58	SAWSHPQFEK	ストレプトアビジン結合 ペプチド、 Strep-tag ^(登録商標) II 人工物
59	GGGSGGGS	リンカー 人工物
60	GGGGS	リンカー 人工物
61	GGGS	リンカー 人工物
62	GGGSGGGGSGGGGS	リンカー 人工物
63	His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys	MATタグ 人工物
64	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFSLQ RMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAQYVLIALNTVERIPLNL QIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPAL CNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNLHLSGCKQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQ KLTKIICAQQCSGRRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATC KDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKCKPRNYVVDHGSCVRACG ADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTS ISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTD LHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEP RDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCT GRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC TYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATGMVGAALLLVVALGIGLFMRRRHIVRK RTLRLQLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYK GLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLGI CLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIQSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDNR LVHRDLAARNVLVKTQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVPKWMAL SILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQP PICTIDVYMIWKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGD LPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVDADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSA TSNNSTVACIDRNLQSCP IKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEY INQSVPKRPAQSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQP TCVNSTFDSPAHWAKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAE	HER1/ErbB1/EGFR 全長 (前駆体) シグナルペプチド: アミノ酸 1~24 細胞外ドメイン: アミノ酸 25~645 膜貫通ドメイン: アミノ酸 646~668 細胞質ドメイン: アミノ酸 669~1210 ホモサピエンズ UniProt No.

	YLRVAPQSSEFIGA	P00533
65	MELAAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLKRLPASPETHLDMLRHLYQG CQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHQNQVRQVPLQRLRIVRG TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQ RNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQALALTLDITNRSRACHPCSPMCKGSRWGES SEDCQSLTRTVACAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHFNH SGICELHCPALVYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCT LVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEF AGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWP DSLPLDSVFNQNLQVIRGRILHNGAYSLLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALI HHNTHLCFVHTVVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECEVGEGLACHQLCARGHC WGPQPTQCVNCSQFLRGQECVVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPQNG SVTFCFGPEADQCVACAHYKDPFVCVARCPGSKPDLSYMP IWKFPDEEGACQ PCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIK RRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGS GAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLENTSPKANKEILDEAYVMAGVGS YVSRLGIGICTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMIKAG MSYLEDEVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKV PIKWMALLESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPIAREIPDLLE KGERLQPPICTIDVYIMVVKCWMIDSECRPRFRLVSEF SRMARDPQRV IQNEDLGPASPLDSTFYRSLLLEDDMDGLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAG GMVHHRHRSSTRSGGDLLTGLEPSEEEAPRSP LAPSEGAGSDVFDGDLGM GAAKGLQSLP THDPSLPQRYSEDP TVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPD VRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKT LSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEY LTPQGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEY LGLDVPV	HER2/neu/ErbB2 全長 (前駆体) シグナルペプチド: アミノ酸 1~22 細胞外ドメイン: アミノ酸 23~652 膜貫通ドメイン: アミノ酸 653~675 細胞質ドメイン: アミノ酸 676~1255 ホモサピエンス UniProt No. P04626
66	MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNQAVCPGTLNGLSVTGDENQYQTYLKL YERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLNLRV VRGTQVYDYGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLC HMDTIDWRD IVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGEEDCQTLTKT ICAPQCNGHCFGNPNPQCCHDECAGGCSGPQD TDCFACRHFNDSGACVPRCP QPLVYNKLTTFQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQ TSCVRACPPDKMEV DKNGLKMCPECGGLCPKACEGTGSGSRFQ TVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFL ITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVRFTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVFSNLT TIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHS NWTKVLRGPTTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVC DPLCSSGGCWGPGPGQCLSC RNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDT CAQCAHFRDGPFCVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGP ELQDCLGQTLVLIQKTHLTMALTVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRRIQNKRA MRRYLGERGESIEPLDPSEKANKVLARIFKETE LRLKVLGSGVFGTVHKGVW IPEGESIKIPVCIKVIEDKSGRQSFQAVTDHMLAIGSLDHAHIVRLLGLCPG SSLQLVTVQYPLPLGSLLDHVRQHRGALGPQLLLNNGVQIAKGMYYLEEHGMVH RNLAARNVLLKSPSQVQVADFVADLLPPDDKQLLYSEAKTPIKWMALESI FGKYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAEPYAGLRLAEV D LLEKGERLAQPQIC TIDVYVMVVKCWMIDENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAP GPEPHGLTNKKLEEVELEPELDLDDLEAEEDNLATTTLGSALS LPVGT LNR PRGSQSLSPSSGYMPMNQGNLGESEAVSGSSERCPRPVS LHPMPRGCL ASESSEGHVTGSEAELEQEKVSMCRSRSRSPRPRGDSAYHSQRHSLTPVT PLSPPGLEEEDVNGYVMPDTHLKGTPSSREGTLSSVGLSSVLGTEEEDEEE YEYMNRRRRHSPPHPRPSSLEELGYEYMDVGS DLSASLGSTQSCPLHPVPI MPTAGTTPDEDEY EYMNRQRDGGGPGDYAAMGACPASEQGYEEMRAFQGP GHQAPHVHYARLKT LRSLEATDSAFDNPDYWHSRLFPKANAQRT	HER3/ErbB3 全長 (前駆体) シグナルペプチド: アミノ酸 1~19 細胞外ドメイン: アミノ酸 20~643 膜貫通ドメイン: アミノ酸 644~664 細胞質ドメイン: アミノ酸 665~1342 ホモサピエンス UniProt No. P21860
67	MKPATGLWVWVSLVAAGTVQPSDSQSV CAGTENKLSLSDLEQQYRALRKY YENCEVVMGNLEITSIEHNRDLSFLRSVREVTGYVLVALNQFRYLPLENLRI IRGTKLYEDRYALAI F LNYRKDGNFGLQELGLKNL TEILNGGVYVDQNKFLC YADTIHWQDIVRNPWPSNLT LVSTNGSSGCRCHKSC TGRCWGPTENHCQTL TRTVCAEQCDGRYGPYVSDCCHRECAGGCSGPKD TDCFACMNFNDSGACVT QCPQTFVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAF CVKKCPHNFVVDSSSCVRACPSK MEVEENGIKMCKPCTDICPKACDGI GTGSLMSAQTV DSSNIDKFINCTKING	HER4/ErbB4 全長 (前駆体) シグナルペプチド: アミノ酸 1~25

	<p>NLIFLVTGIHGDPYNAIEAIDPEKLNVFRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSV FSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSLSLQFQSLKEISAGNIYITDNSNLCY YHTINWTTLFSTINQRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNHLCCSSDGCWGPDPQC LSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFFREFENGSI CVECDPQCEKMEDGLLTCHGP GPDNCTKCSHFKDGPNCEVEKCPDGLQGANSFIFKYADPDRECHPCHPNTQG CNGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHARTPLIAAGVIGGLF ILVI VGLTF AVYVR RKS I KKKRALRRFLETELVEPLTPSGTAPNQAQLRILKETELKRVKVLGSGA FGTVYKGIWVPEGETVKIPVAIKILNETTGPKANVEFMDREALIMASMDHPLH VRLLGVCLSP TIQLVLTQLMPHGCLLEYVHEHKDNIQS QLLLNWCVQIAKGMM YLEERRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLEGEDEKEYNADGGKMPI KWMALECIHYRKFTHQSDVWSYGVTIWELMTFGGKPYDGIPTREIPDLLEKG ERLPQPPICTIDVYVMVKCWMIDADSRPKFKELAAEF SRMARDPQRYLVIQ GDDRMKLPSPNDSKFFQNLLEDLEDMDAAEYLVLPQAFNIPPIYTSRAR IDSNRSEIGHSPPPAYTPMSGNQFVYRDGGFAAEQGVSVPYRAPTSTIPEAP VAQGATAEIFDDSCCNGLTRKPVAPHVQEDSSTQRY SADPTVFAPERSPRGE LDEEGYMTPMRDKPKQEYLNPFVEENPFVSRKNGDLQALDNPEYHNASNGPP KAED EYVNEPLYLNTFANTLGKAEYLKNNILSMPEKAKKAFDNPDYWNHSLP PRSTLQHPDYLQEYSTKYFYKQNGRIRPIVAENPEYLSEFSLKPGTVLPPPP YRHRNTVV</p>	<p>細胞外ドメイン: アミノ酸 26~651</p> <p>膜貫通ドメイン: アミノ酸 652~675</p> <p>細胞質ドメイン: アミノ酸 676~1308</p> <p>ホモサピエンス</p> <p>UniProt No. Q15303</p>
68	<p>MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPI QNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTPVLEHPDCFPQCDCSSK ANLSGGVWKDNI MALVVDTYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHHTADIQS EVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSVVKDRFINFFVGN TINSSYFPD HPLHSISVRRLKETKDGFMFLTDQSYIDVLP EFRDSYPIKYVHAFESNNFIY FLTVQRETLD AQT FHTRIIRFCSINSLHSYMEMPLECILTEKRKRSTKKE VFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCA FPIKYVNDFFNKIVNKNVRCLOHFYGPNEHEHCNRTLNRNSGCEARRDEY RTEFTTALQ RVDLFMGQFSEVLLTSTSTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVS RSGPSTPHVNFLLD SHPVSEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGC RHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVFPS APLEGGTRLTICGWDFGFRRNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTNTLKC TVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISP KYGPMAGGTLT LTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDL ANRETSIFSYREDPIVYIEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVH EAGRNF TVACQHRNSSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFD LIYVHNPFVKPFKPVMI SMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCEN IHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNF TGLIA GVVSISTALLLLLGFFLWLKRRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARS VSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDS DISSPLLQNTVHIDL SALNPELVQAVQHVVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCV YHGTLDDNDGKKIHC AVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLG ICLRSEGSPLVVLPMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLA SKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFG LARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVK WMALES LQTQKFTTKSDVWSFVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGR RLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISAIFSTF IGEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDTRPASFWETS</p>	<p>HGFR/c-Met 全長 (前駆体)</p> <p>シグナルペプチド: アミノ酸 1~24</p> <p>細胞外ドメイン: アミノ酸 25~932</p> <p>膜貫通ドメイン: アミノ酸 933~955</p> <p>細胞質ドメイン: アミノ酸 956~1390</p> <p>ホモサピエンス</p> <p>UniProt No. P08581</p>
69	<p>MKSGSGGSP TSLWGLLFLSAALS LWP TSGEICGPGIDIRNDYQQLKRENC TVIEGYLHILLISKAEDYRSYRFPKLTVI TEYLLLFRVAGLES LGDLFPNLT VIRGWKLFYNYALVIFEMTNLKD IGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVD WSLILD AVSN NYIVGNKPPKECGDLCPGTMEEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTT NRCQKMCPSTCGKRACTENNECCHPECLGSCSAPDNDTACVACRHYYYAGVC VPACPPNTYRFE GWRCVDRDFCANILSAESSDSEGFVIHDGECMQECPSGFI RNGSQSMYCIPCEGPCPKVCEEEKTKTIDSV TSAQMLQGCTIFKGNLLINI RRGNNIASELENFMGLIEVVTGYVKIRHSHALVLSLFLKNLRLILGEEQLEG NYSFYVLDNQNQLQ LWDWDHRNLTIKAGKMYFAFNP KLCVSEIYRMEEVTGT KGRQSKGDINTRNNGERASCESDVLHFTSTTT SKNR III TWHRYP PPDYRDL ISFTVYYKEAFPKNVTEYDGDACGSNSWNVMDVLDLPPNKDVEPGILLHGLK PWTQYAVYVKA VTLTMVENDHIRGAKSEILYIRTNASVPSIPLDVLSASNS SQLIVKWNPPSLPNGNLSYYIVRWQRQPQDGYLYRHNYCSKDKIPIRKYADG</p>	<p>IGF-1 R 全長 (前駆体)</p> <p>シグナルペプチド: アミノ酸 1~30</p> <p>細胞外ドメイン: アミノ酸 741~935</p> <p>膜貫通ドメイン: アミノ酸 936~959</p>

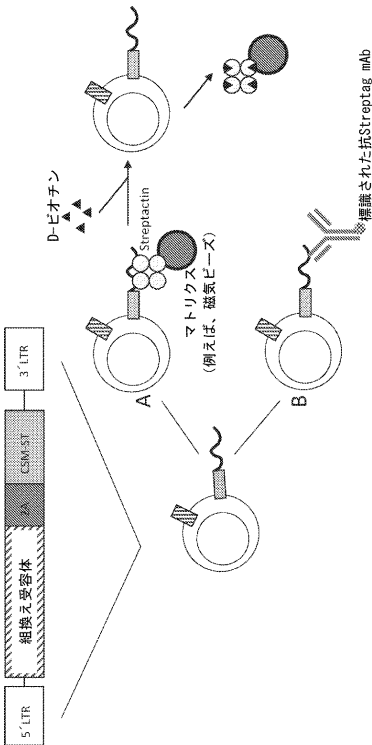
	TIDIEEVTENPKTEVCGGEEKGPCACPKTEAEKQAEKEEEAEYRKVFENFLHN SIFVPRPERKRRDVMQVANTTMSRSRNTTAADTYNITDPEELETEYPPFFES RVDNKERTVISNLRPFLLYRIDIHSCNHEAEKLGCSASNFVFARTMPAEGAD DIPGPVTWEPRPENSIFLKWPEPENPNGLILMYEIKYGSQVEDQRECVSRQE YRKYGGAKLNRLNPNYNTARIQATSLSGNGSWTDPVFFVYQAKTGYENFIHL IIALPVAVLLIVGGLVIMLYVFRKRNRNSRLGNGVLYASVNPYFSAADVYV PDEWEVAREKITMSRELGGQSGFMVYEGVAKGVVKDEPETRVAIKTVNEAAS MRERIEFLNEASVMKEFNCHHVRLLGVVSSQGPQLVIMELMTRGDLKSYLR SLRPEMENNVLAPPVSLSKMIQAGEIADGMAYLNANKFVHRDLAARNCMVA EDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPELKDGVFTTYSDVW SFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLRVMEGGLLDKPDNCPDMLFELMRMC WQYNPKMRPSFLEIISSIKEEMEPGFREVSFYSEENKLPEPEELDLEPENM ESVPLDPSASSSSLPDRHSGHKAENGGPGVVLVLRASFDERQPYAHMNGG RKNERALPLPQSSTC	細胞質ドメイン: アミノ酸 960~1367 ホモサピエンズ UniProt No. P08069
70	ESKYGPCPPCP	スパーサー (IgG4ヒンジ)
71	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	スパーサー (IgG4ヒンジ)
72	ESKYGPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSLGK	ヒンジ-CH3 スパーサー
73	ESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	ヒンジ-CH2-CH3 スパーサー
74	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEE QEERETKTPECP SHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHL TWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQS QHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHP SLPPQRLMALREPAQAQPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILL MWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVS HEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	IgD-ヒンジ-Fc
75	MALPVTALLLPLALLLHA	CD8アルファ シグナルペプチド
76	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
77	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (アクセッション 番号P10747のアミノ酸 153~179)
78	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (アクセッション 番号P10747のアミノ酸 114~179)
79	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747のアミノ酸 180~220)
80	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LLからGG)
81	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1のアミノ酸 214~255)
82	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRR NPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQUALP PR	CD3 ゼータ
83	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRR NPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQUALP PR	CD3 ゼータ
84	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRR NPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQUALP PR	CD3 ゼータ
85	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
86	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
87	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A

88	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
89	PGGG- (SGGGG) 5-P- ここでPはプロリンであり、Gはグリシンであり、Sはセリンである	リンカー
90	GSADDAKKDAAKKGDKS	リンカー
91	TGCCACCCTGAGTGTGAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACCTGTTTTGGACCGG AGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCACTATAAAGGACCCCTCCCTTCTGCGT GGCCCGCTGCCCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACATGCCCATCTGG AAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCCCATCAACTGCACCC ACTCCTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCGCCGAGCAGAGAGCCAG CCCTCTGACGGGTGGAGGAAGCGGAGGTGGCAGCTCCATCATCTCTGCGGTG GTTGGCATTCTGCTGGTCTGGTCTTGGGGGTGGTCTTTGGGATCCTCATC	修飾されたHER2t(nt) 人工物
92	CHPECQPQNGSVTCFGEADQCVACAHYKDPFVCVARCPGKPDLSYMPIW KFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTGGGSGGGSSIIISAV VGILLVVVLGVVFGILI	修飾されたHER2t(aa) 人工物
93	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCAT TCCTCCTGATCCCATGCCACCCTGAGTGTGAGCCCCAGAATGGCTCAGTGAC CTGTTTTGGACCGGAGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCACTATAAAGGAC CCTCCCTTCTGCGTGGCCCGCTGCCCGAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCT ACATCAACCTGACCCCAAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCC CATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCGCC GAGCAGAGAGCCAGCCCTCTGACGGGTGGAGGAAGCGGAGGTGGCAGCTCCA TCATCTCTGCGGTGGTTGGCATTCTGCTGGTCTGGTCTTGGGGGTGGTCTT TGGGATCCTCATC	シグナル配列を有する 修飾されたHER2t(nt) 人工物
94	MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGLFGLGWFVKSSNEATNI TPKHNMKAFLEDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFG LDSVELAHYDVLSSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPPIPGYENVSD IVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVARIYKGV FRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNIILN LNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGGS APPDSSWRGSLKVPYNVGPFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRG AVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTI LFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP LMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGND FEVFFQRLGIASGRARYTKNWEITNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKY HLTVAQVRGGMVFEELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKT YSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPVLRRMMNDQLMFLERAFI DPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNYAGESFPGIYDALFDIESKVDPKAWGEV KRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA	PSMA WT (全長)
95	MGNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGLFGLGWFVKSSNEATNI TPKHNMKAFLEDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFG LDSVELAHYDVLSSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPPIPGYENVSD IVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVARIYKGV FRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNIILN LNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGGS APPDSSWRGSLKVPYNVGPFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRG AVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTI LFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP LMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGND FEVFFQRLGIASGRARYTKNWEITNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKY HLTVAQVRGGMVFEELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKT YSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPVLRRMMNDQLMFLERAFI DPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNYAGESFPGIYDALFDIESKVDPKAWGEV KRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA	PSMA W2G (全長)
96	atgtggaatctccttcacgaaaccgactcggetgtggccaccgcgccgccc cgcgctggctgtgcgctggggcgctgggtgctggcgggtggcttctttctcct cggettctcttcgggtggtttataaaaatcctccaatgaagctactaacatt actccaaagcataaatatgaaagcatttttggatgaattgaaagctgagaaca tcaagaagtcttatataattttacacagataccacatttagcaggaacaga acaaaactttcagcttgcaaagcaaatccaatcccagtggaagaatttggc	PSMA WT (nt)

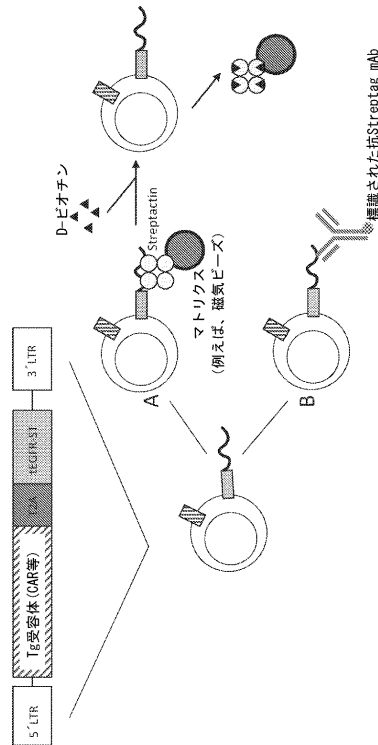
	<p>ctggattctggtgagctagcacattatgatgtcctggtgtcctacccaata agactcatcccaactacatctcaataattaatgaagatggaaatgagatttt caacacatcattatgtgaaccacctcctccaggatgaaaatgtttcggat attgtaccacctttcagtgctttctctcctcaaggaatgccagagggcgatc tagtgtatgtaactatgcacgaactgaagacttctttaattggaacggga catgaaaatcaattgctctgggaaaaattgtaattgccagatgaggaaagt ttcagaggaataaaggttaaaaatgccagctggcagggggccaaaggagtca ttctctactccgacctgctgactactttgctcctggggtgaagtcctatcc agatggttggaatcttctcctggaggtggtgtccagcgtggaatatcctaaat ctgaatggtgcaggagacctctcacaccaggttaccagcaaatgaatatg cttataggcgtggaattgcagaggctgttggctctccaagtattcctggtca tccaattggatactatgatgcacagaagctcctagaaaaaatgggtggctca gcaccaccagatagcagctggagaggaagtctcaaagtgccctacaatggtg gacctggctttactggaaaacttttctacacaaaaagtcaagatgcacatcca ctctaccaatgaagtgacaagaatttacaatgtgataggtactctcagagga gcagtggaaccagacagatgatcattctgggaggtcaccgggactcatggg tgtttgggtggtattgacctcagagtgagcagctgttgttcatgaaattgt gaggagctttggaacactgaaaaaggaagggtggagacctagaagaacaatt ttgtttgcaagctgggatgcagaagaatttggctctcttggttctactgagt gggcagaggagaattcaagactccttcaagagcgtggcgtggcttatatta tgctgactcatctatagaaggaaaactacactctgagagttgattgtacaccg ctgatgtacagcttggtagacacacctaacaaaagagctgaaaagcctgatg aaggctttgaaggcaaatctctttatgaaagtggactaaaaaaagtccttc cccagagttcagtggtatgccaggaataagcaaatgggatctggaatgat tttgaggtgttctccaacgacttggaaattgcttcaggcagagcacggtata ctaaaaattgggaaacaaacaaattcagcggctatccactgtatcacagtgt ctatgaaacatagagtgggtggaaaagttttatgatccaatgtttaaatat cacctcactgtggccaggctcgaggaggatggtgtttagcctagccaatt ccatagtgctcccttttgattgtcgagattatgctgtagttttaagaaagta tgctgacaaaatctacagtatctctatgaaacatccacaggaaatgaagaca tacagtgatcatttgattcactttttctgcagtaagaattttacagaaa ttgcttccaagttcagtgagagactccaggactttgacaaaagcaaccaat agtattaagaatgatgaatgatcaactcatgtttctggaaagagcatttatt gatccattagggttaccagacaggcctttttataggcatgtcatctatgctc caagcagccacaacaagtatgcaggggagtcattcccaggaatttatgatgc tctgtttgatattgaaagcaagtgacccttccaaggcctggggagaagtg aagagacagatttatggtgcagccttcacagtgcaggcagctgcagagactt tgagtgaagtagec</p>	
97	<p>ATGTGGAATCTCCTTCATGAAACAGACTCTGCTGTGGCCACAGCCAGAAGAC CCAGATGGCTGTGTGCTGGGGCCCTGGTGC TGGCTGGTGGCTTCTTTCTCCT GGGCTTCTCTTTGGGTGGTTTATAAAAATCCTCCAATGAAGCTACTAACATT ACTCCAAAGCATAATATGAAAGCATTTTTGGATGAATTGAAAGCTGAGAACA TCAAGAAGTTCTTATATAATTTACACAGATACCACATTTAGCAGGAACAGA ACAAAAC TTTAGCTTGCAAAGCAAATTC AATCCCAGTGGAAAGAATTTGGC CTGGATTCTGTTGAGCTAGCACATTATGATGTCTGTTGTCTTACCCAAATA AGACTCATCCCAACTACATCTCAATAATTAATGAAGATGGAAATGAGATTTT CAACACATCATTATTTGAACCACCTCCTCCAGGATATGAAAATGTTTCTGAT ATTGTACCACCTTTTCAGTGCTTTCTCTCCTCAAGGAATGCCAGAGGGAGATC TAGTGTATGTTAACTATGCAAGAACTGAAGACTTCTTTAAATTGGAAAGGGA CATGAAAATCAATTGCTCTGGGAAAAATTGTAATTGCCAGATATGGGAAAGTT TTCAGAGGAAAATAAGGTTAAAAATGCCAGCTGGCAGGGGGCCAAAGGAGTCA TTCTCTACTCTGACCTGCTGACTACTTTGCTCCTGGGGTGAAGTCCTATCC AGATGGTTGGAATCTTCTGGAGGTGGTGTCCAGAGAGGAAAATATCCTAAAT CTGAATGGTGCAGGAGACCTCTCACACCAGGTTACCCAGCAAATGAATATG CTTATAGGAGAGGAATTGCAGAGGCTGTTGGTCTTCCAAGTATTCTGTTCA TCCAATTGGATACTATGATGCACAGAAGCTCCTAGAAAAAATGGGTGGCTCA GCACCACCAGATAGCAGCTGGAGAGGGAAGTCTCAAAGTGCCTTACAATGTTG GACCTGGCTTTACTGGAAAATTTTCTACACAAAAAGTCAAGATGCACATCCA CTCTACCAATGAAGTGACAAGAATTTACAATGTGATAGGTACTCTCAGAGGA</p>	CpG非含有PSMA

	<pre>GCAGTGGAAACCAGACAGATATGTCATTCTGGGAGGTCACAGGGACTCATGGG TGTTTGGTGGTATTGACCCCTCAGAGTGGAGCAGCTGTTGTTTCATGAAATTGT GAGGAGCTTTGGAACACTGAAAAAGGAAGGTTGGAGACCTAGAAGAACAATT TTGTTTGAAGCTGGGATGCAGAAGAATTTGGTCTTCTGGTTCCTACTGAGT GGGCAGAGGAGAATTCAAGACTCCTTCAAGAGAGGGGAGTGGCTTATATTA TGCTGACTCATCTATAGAAGGAAACTACACTCTGAGAGTTGATTGTACACCC CTGATGTACAGCTTGGTACACAACCTAACAAAAAGAGCTGAAAAGCCCTGATG AAGGCTTTGAAGCAAATCTCTTTATGAAAGTTGGACTAAAAAAGTCCTTC CCCAGAGTTTCAGTGGCATGCCCAGGATAAGCAAATTTGGGATCTGGAAATGAT TTTGAGGTGTTCTTCCAAAGACTTGGAAATGCTTCAGGCAGAGCAAGGTATA CTAAAAATTTGGGAAACAAACAAATTCAGTGGCTATCCACTGTATCACAGTGT CTATGAAACATATGAGTTGGTGGAAAAAGTTTTATGATCCAATGTTTAAATAT CACCTCACTGTGGCCAGGTTAGAGGAGGGATGGTGTGTTGAGCTAGCCAATT CCATAGTGCTCCCTTTTGATTGTAGAGATTATGCTGTAGTTTTTAAGAAAGTA TGCTGACAAAAATCTACAGTATTTCTATGAAACATCCACAGGAAATGAAGACA TACAGTGTATCATTGATTCACCTTTTTTCTGCAGTAAAGAATTTTACAGAAA TTGCTTCCAAGTTTCAGTGAAGACTCCAGGACTTTGACAAAAGCAACCCAAT AGTATTAAGAATGATGAATGATCAACTCATGTTTCTGGAAAGAGCATTATTT GATCCATTAGGGTTACCAGACAGGCCTTTTTATAGGCATGTCATCTATGCTC CAAGCAGCCACAACAAGTATGCAGGGGAGTCATTTCCAGGAATTTATGATGC TCTGTTTGATATTGAAAGCAAAGTGGACCCTTCCAAGGCCGGGGAGAAGTG AAGAGACAGATTTATGTTGCAGCCTTCACAGTGCAGGCAGCTGCAGAGACTT TGAGTGAAGTAGCCATA</pre>	
98	PLGLWA	切断可能なリンカー
99	GFLG	リンカー
100	KLAKLAKKLAKLAK	ペプチド毒素

【図1】



【図2】



【配列表】

2020505034000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2018/000380

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 A61K39/00 C07K14/47 C12N5/0783 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPO		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 115 066 A1 (TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN [DE]; CZECH ACADEMY OF SCIENCES [CZ]) 11 January 2017 (2017-01-11) figure 1A paragraphs [0156], [0161] ----- -/--	1-61, 64-72, 86-190
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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
5 July 2018		09/10/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schmitz, Till

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/IB2018/000380**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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:
- 13(completely); 1-12, 14-61, 64-72, 86-190(partially)

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

International application No

PCT/IB2018/000380

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CYRIL BARINKA ET AL: "Selection and characterization of Anticalins targeting human prostate-specific membrane antigen (PSMA)", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 29, no. 3, 21 January 2016 (2016-01-21), pages 105-115, XP055490037, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzv065 figure 1a section "SF-PSMA"; page 112</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-61, 64-72, 86-190
X	<p>PETRA MLCOCHOVÁ ET AL: "Prostate-specific membrane antigen and its truncated form PSM", PROSTATE., vol. 69, no. 5, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 471-479, XP055490378, US ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/pros.20894 page 473, last paragraph - page 474, paragraph 1 figures 1, 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-61, 64-72, 86-190
X	<p>WO 2016/176651 A2 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]) 3 November 2016 (2016-11-03)</p> <p>figures 25-28 claims 1, 3, 4, 12 example 1 paragraph [0286]; example 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-61, 64-72, 86-190
X	<p>X. WANG ET AL: "A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells", BLOOD, vol. 118, no. 5, 4 August 2011 (2011-08-04), pages 1255-1263, XP055062819, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2011-02-337360 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-61, 64-72, 86-190
A	<p>CHRISTIAN STEMBERGER ET AL: "Novel Serial Positive Enrichment Technology Enables Clinical Multiparameter Cell Sorting", PLOS ONE, vol. 7, no. 4, 24 April 2012 (2012-04-24), page e35798, XP055043969, DOI: 10.1371/journal.pone.0035798 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-61, 64-72, 86-190
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2018/000380

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SKERRA A ET AL: "Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins", METHODS IN ENZYMO, ACADEMIC PRESS, US, vol. 326, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 271-304, XP009176755, ISSN: 0076-6879 the whole document -----	1-61, 64-72, 86-190
A	LINGFENG LIU ET AL: "Inclusion of Strep-tag II in design of antigen receptors for T-cell immunotherapy", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 34, no. 4, 22 February 2016 (2016-02-22), pages 430-434, XP055290073, US ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3461 the whole document -----	1-61, 64-72, 86-190
A	SCHMIDT THOMAS G M ET AL: "The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins", NATURE PROTOCOLS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 2, no. 6, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 1528-1535, XP001536704, ISSN: 1750-2799, DOI: 10.1038/NPROT.2007.209 the whole document -----	1-61, 64-72, 86-190

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2018/000380

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3115066	A1	11-01-2017	EP 3115066 A1 11-01-2017
			EP 3319641 A1 16-05-2018
			WO 2017005799 A1 12-01-2017

WO 2016176651	A2	03-11-2016	EP 3288569 A2 07-03-2018
			JP 2018521628 A 09-08-2018
			WO 2016176651 A2 03-11-2016

International Application No. PCT/IB2018/000380

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 13(completely); 1-12, 14-61, 64-72, 86-190(partially)

Cell surface conjugate comprising PSMA lacking a functional intracellular domain and an agent capable of binding streptavidin.

2-65. claims: 1-12, 14-190(all partially)

As invention 1, but relating to a cell surface molecule selected from EpCAM, VEGFR, integrins alphavbeta3, alpha4, alpha1Ibbeta3, alpha4beta7, alpha5beta1, alphavbeta3 or alphav, TRAIL-R1 or TRAIL-R2, PDGF Receptor, interferon receptor, folate receptor, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, IL-6 receptor, 5T4, GD2, GD3, or CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/IgE Receptor, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigin, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5 and CD319/SLAMF7, epidermal growth factor receptor (EGFR), an erbB-2 receptor tyrosine-protein kinase (erbb2, HER2), an erbB-3 receptor tyrosine-protein kinase, an erbB-4 receptor tyrosine-protein kinase, a hepatocyte growth factor receptor (HGFR/c-MET) or an insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-1 R) respectively.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13		
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10		
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/04		
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	D	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	E	
A 6 1 K 49/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	G	
A 6 1 K 49/14 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 K 49/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C	
A 6 1 K 51/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L	
A 6 1 K 51/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 39/395	U	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 47/68		
	A 6 1 K 47/64		
	A 6 1 K 49/08		
	A 6 1 K 49/14		
	A 6 1 K 49/16		
	A 6 1 K 51/08		
	A 6 1 K 51/10		
	A 6 1 K 35/17	Z	
	G 0 1 N 33/53	Y	
	G 0 1 N 33/53	U	

(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 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
 (72)発明者 ゲルメロート ローター
 ドイツ連邦共和国 8 1 6 7 5 ミュンヘン グリルパーザーシュトラッセ 1 0
 (72)発明者 シュテムベルガー クリスティアン
 ドイツ連邦共和国 8 1 6 7 5 ミュンヘン グリルパーザーシュトラッセ 1 0
 F ターム(参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 4C076 AA95 BB11 CC04 CC07 CC27 CC31 CC32 EE41 EE59 FF67
 FF68
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 MA66 NA05 NA13 ZB11 ZB26 ZB35
 4C085 AA25 AA26 BB01 BB07 BB11 BB17 BB18 CC07 CC21 EE01
 GG01
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB63 BB65 BC83 CA12 DA20 MA66
 NA05 NA13 ZB11 ZB26 ZB35
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA11 BA12 BA13 BA14 BA15
 BA16 BA17 BA18 BA19 BA41 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20
 EA50 FA74

【要約の続き】

专利名称(译)	细胞表面结合物及相关细胞组成和方法		
公开(公告)号	JP2020505034A	公开(公告)日	2020-02-20
申请号	JP2019539186	申请日	2018-01-19
[标]发明人	ゲルメロートローター シュテムベルガークリスティアン		
发明人	ゲルメロート ローター シュテムベルガー クリスティアン		
IPC分类号	C12N15/12 C07K19/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/28 C12N15/62 C12N15/13 C12N15/867 C12N5/10 A61K35/12 A61K48/00 A61K35/76 A61K39/00 A61P31/04 A61P37/06 A61P29/00 A61P35/00 A61K39/395 A61K47/68 A61K47/64 A61K49/08 A61K49/14 A61K49/16 A61K51/08 A61K51/10 A61K35/17 G01N33/53		
CPC分类号	A61K47/6901 A61K2039/5156 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/705 C07K2317/622 C07K2318/20 C07K2319/03 C07K2319/22 C07K2319/70		
FI分类号	C12N15/12 C07K19/00.ZNA C07K14/47 C07K14/705 C07K16/28 C12N15/62.Z C12N15/13 C12N15/867.Z C12N5/10 A61K35/12 A61K48/00 A61K35/76 A61K39/00.G A61K39/00.H A61P31/04 A61P37/06 A61P29/00 A61P35/00 A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.G A61K39/395.N A61K39/395.C A61K39/395.L A61K39/395.T A61K39/395.U A61K47/68 A61K47/64 A61K49/08 A61K49/14 A61K49/16 A61K51/08 A61K51/10 A61K35/17.Z G01N33/53.Y G01N33/53.U		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC27 4C076/CC31 4C076/CC32 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF67 4C076/FF68 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA13 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4C084/ZB35 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/BB01 4C085/BB07 4C085/BB11 4C085/BB17 4C085/BB18 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/GG01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB37 4C087/BB63 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/DA20 4C087/MA66 4C087/NA05 4C087/NA13 4C087/ZB11 4C087/ZB26 4C087/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA11 4H045/BA12 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/448936 2017-01-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了包含细胞表面分子和至少一种试剂，例如至少一种亲和和标签的细胞表面缀合物，以及表达这种细胞表面缀合物的修饰细胞。在一些实施方案中，细胞表面分子不包含细胞内信号传导域或不能介导细胞内信号传导。在一些实施方案中，已经被修饰以包含细胞表面缀合物的细胞，例如T细胞，具有经遗传修饰的重组受体，其特异性结合抗原，例如嵌合抗原受体 (CAR)。包括进一步。检测，鉴定，选择或靶向表达细胞表面缀合物的细胞，例如，与产生修饰的细胞的方法有关或与向受试者施用此类细胞有关，包括过继细胞疗法的方法。还提供了这样做的方法。

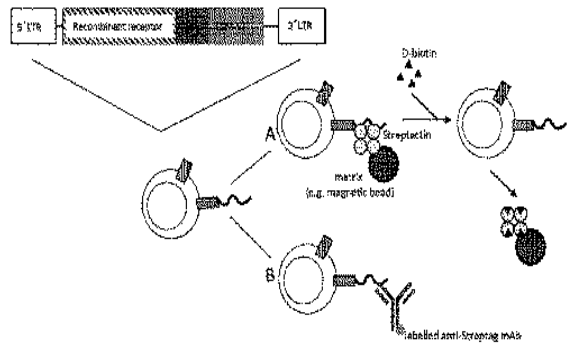


FIG. 1