

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7500195号
(P7500195)

(45)発行日 令和6年6月17日(2024.6.17)

(24)登録日 令和6年6月7日(2024.6.7)

(51)国際特許分類	F I
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
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 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04

請求項の数 14 (全109頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-510951(P2019-510951)
(86)(22)出願日	平成29年8月22日(2017.8.22)
(65)公表番号	特表2019-528077(P2019-528077)
	A)
(43)公表日	令和1年10月10日(2019.10.10)
(86)国際出願番号	PCT/US2017/048040
(87)国際公開番号	WO2018/039247
(87)国際公開日	平成30年3月1日(2018.3.1)
審査請求日	令和2年8月14日(2020.8.14)
審判番号	不服2022-4694(P2022-4694/J1)
審判請求日	令和4年3月30日(2022.3.30)
(31)優先権主張番号	62/378,614
(32)優先日	平成28年8月23日(2016.8.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73)特許権者	506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア The Regents of the University of California アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94607-5200, オークランド, フランクリン ストリート 1111, 12番 フロア
(74)代理人	100114557 弁理士 河野 英仁
(74)代理人	100078868 弁理士 河野 登夫
(72)発明者	リム, ウェンデル エー.

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド及びそれらの使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

キメラポリペプチドであって、

N末端からC末端まで共有結合で、

a) ペプチド - 主要組織適合複合体(ペプチド - MHC)に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、

b) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なN o t c h レセプターポリペプチドと、

c) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインと

を有し、

前記ペプチド - MHCへの前記特異的結合メンバーの結合が、前記1つ以上のタンパク質分解切断部位での前記N o t c h レセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより前記細胞内ドメインを放出し、

前記1つ以上のタンパク質分解切断部位は、S2タンパク質分解切断部位、S3タンパク質分解切断部位、またはそれらの組み合わせを含む、

キメラポリペプチド。

【請求項2】

前記特異的結合メンバーは、抗体を含み、

前記抗体は、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、もしくはミニボディ、F(ab')2断片、Fab断片、单鎖可变断片(scFv)、または单一同源性抗体(sdA)

10

20

b) である、

請求項 1 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3】

前記特異的結合メンバーは、細胞内がん抗原ペプチドを含むペプチド - MHC に特異的に結合し、

前記細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドまたはNY-ESOペプチドである、
請求項 1 または 2 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のキメラポリペプチドをコードする核酸、または、
前記核酸を含む発現ベクターであって、

前記核酸は、目的のポリペプチド (POI) をコードする核酸配列に作動可能に連結した
転写活性化因子に応答性の転写制御要素を更に含み、

前記POIは、レポータータンパク質、キメラ抗原受容体 (CAR)、抗体、キメラ二重特異的結合メンバー、操作されたT細胞受容体 (TCR)、及び自然免疫応答誘導因子からなる群から選択される異種ポリペプチドである、

核酸、または、発現ベクター。

【請求項 5】

細胞内で異種ポリペプチドの発現を誘導する方法であって、

細胞をペプチド - 主要組織適合複合体 (ペプチド - MHC) と接触させることを含み、

前記細胞が、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のキメラポリペプチドを発現し、前記キメラポリペプチドの前記転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結した前記異種ポリペプチドをコードする配列を含み、それにより前記キメラポリペプチドの前記細胞内ドメインを放出して、前記異種ポリペプチドの発現を誘導し、

前記異種ポリペプチドは、レポータータンパク質、キメラ抗原受容体 (CAR)、抗体、キメラ二重特異的結合メンバー、操作されたT細胞受容体 (TCR)、及び自然免疫応答誘導因子であり、

人間の治療方法を除く、

方法。

【請求項 6】

宿主細胞であって、

a) 第 1 のペプチド - 主要組織適合複合体 (ペプチド - MHC) に特異的に結合するキメラポリペプチドをコードする請求項 4 に記載の核酸と、

b) 目的のポリペプチド (POI) をコードする核酸に作動可能に連結した前記キメラポリペプチドの前記転写活性化因子に応答性の転写制御要素と
を含む、宿主細胞。

【請求項 7】

宿主細胞であって、

a) キメラポリペプチドをコードする核酸であって、前記キメラポリペプチドが、N末端からC末端まで共有結合で、

i) 標的細胞の表面上に存在する標的分子に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、

ii) 1 つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なNotchレセプターポリペプチドと、

iii) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを有し、前記キメラポリペプチドをコードする核酸、及び、

b) 前記転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結したキメラ二重特異的結合メンバー、抗Fcキメラ抗原受容体 (CAR)、自然免疫応答誘導因子、または免疫抑制因子をコードする核酸

を含み、

前記標的分子への前記特異的結合メンバーの結合が、前記 1 つ以上のタンパク質分解切

10

20

30

40

50

断部位での前記 N o t c h レセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより前記細胞内ドメインを放出し、前記転写制御要素を活性化し、前記キメラ二重特異的結合メンバー、前記抗 F c キメラ抗原受容体 (C A R) 、前記自然免疫応答誘導因子、または前記免疫抑制因子を発現させ、

前記キメラ二重特異的結合メンバーは、がん抗原に特異的な結合ドメインと、免疫細胞の表面上に発現されるタンパク質に特異的な結合ドメインとを含み、

前記キメラ二重特異的結合メンバーは、少なくとも 1 つの抗体由来抗原 - 結合ドメイン、リガンド - 受容体結合対の少なくとも 1 つの受容体もしくはリガンド結合ドメイン、またはそれらの組み合わせを含み、

免疫細胞の表面上に発現される前記タンパク質は、 C D 3 またはナチュラルキラーグループ 2 D (N K G 2 D) 受容体である、

宿主細胞。

【請求項 8】

前記標的分子は、がん抗原、組織特異的分子、器官特異的分子、または細胞型特異的分子である、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

前記宿主細胞が、がん細胞の表面上に存在するがん抗原に特異的な抗体をコードし、かつ前記抗 F c C A R によって結合される F c 領域を含む核酸を更に含み、

前記抗体をコードする前記核酸が、前記転写制御要素に作動可能に連結される、

請求項 7 または 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

対象の新生物を治療するために使用される請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞であって、

請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞の有効量が前記対象に投与され、

前記新生物が、前記標的分子を発現し、

がん細胞の表面上に存在するがん抗原に特異的であり、かつ前記抗 F c C A R によって結合される F c 領域を含む抗体が、前記対象に更に投与される、

宿主細胞。

【請求項 11】

前記自然免疫応答誘導因子は、細菌タンパク質もしくはその断片、ウイルスタンパク質もしくはその断片、真菌タンパク質もしくはその断片、または哺乳動物寄生虫によって発現されるタンパク質もしくはその断片である、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

対象の領域内で局所自然免疫応答を誘導するために使用される請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞であって、

請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞の有効量が前記対象に投与され、

前記領域が、前記標的分子を発現し、

任意で、前記対象の前記領域は、新生物を含む、

宿主細胞。

【請求項 13】

対象における免疫応答を抑制するために使用される請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞であって、

請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞の有効量が前記対象に投与され、

前記対象が、前記標的分子を発現し、

任意で、前記対象は、自己免疫疾患を有する、

宿主細胞。

【請求項 14】

不均一腫瘍を殺傷するために使用される操作された免疫細胞であって、

殺傷抗原を発現する第 1 の細胞ならびに前記殺傷抗原及び感作抗原を発現する第 2 の細

10

20

30

40

50

胞を含む不均一腫瘍が、操作された免疫細胞と接触され、

前記操作された免疫細胞は、

タンパク質分解により切断可能なN o t c h レセプターポリペプチド及び転写活性化因子を含む細胞内ドメインを含む、前記感作抗原に特異的に結合するキメラポリペプチドと、

前記殺傷抗原に特異的に結合する治療ポリペプチドをコードする核酸配列と、

前記転写活性化因子に応答性である、前記核酸配列に作動可能に連結した転写制御要素とを含み、

前記感作抗原への前記キメラポリペプチドの結合が、前記N o t c h レセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより、前記キメラポリペプチドから前記転写活性化因子を含む細胞内ドメインが放出され、前記転写活性化因子が、前記核酸配列に作動可能に連結した前記転写制御要素を活性化して、前記治療ポリペプチドの発現を誘導する、

操作された免疫細胞。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

慣習的に、細胞拳動及び活性の制御は、発現時に細胞拳動及び／または活性を改変するタンパク質の発現を推進する、誘導性発現構築物の使用を通して達成されてきた。研究設定において、誘導性発現系は、細胞生物学、分子生物学、遺伝学、生化学、及び他のものを含む、生命科学の多くの分野についての我々の理解を大いに進歩させている。良く研究された誘導性細胞系（例えば、化学的誘導性、光学的誘導性など）は一般に、細胞拳動及び活性に網羅的に影響を与え、及び／またはある集団の特定の細胞に対する活性の変化を制限するために、または系を制御する（例えば、システムを「オン」もしくは「オフ」に切り替える）ために、ユーザ提供の入力を必要とする。近年、細胞操作は、細胞が、例えば、隣接細胞によってもたらされるようなそれらの環境内のシグナルを検出し、そのようなシグナリング入力を所望の拳動または活性出力へと自主的に伝達するような再プログラミングを試みる能力を提供している。

【発明の概要】

【0002】

本開示は、ポリペプチドの特異的結合メンバーとその結合パートナーとの結合時に誘導される切断事象後に様々な細胞プロセスを調節する、キメラポリペプチドを提供する。キメラポリペプチドを使用して、例えば、遺伝子発現の誘導を含む、細胞機能を調節する方法もまた提供される。主題のキメラポリペプチドをコードする核酸ならびに関連する発現カセット及びベクターだけでなく、そのような核酸及び／または発現カセット及びベクターを含有する細胞もまた提供される。記載される構成要素及び方法を使用して対象を治療する方法だけでなく、主題の方法を実施するためのキットもまた提供される。

【0003】

本開示の態様は、キメラポリペプチドであって、キメラポリペプチドが、N末端からC末端まで共有結合で、a) ペプチド-主要組織適合複合体（ペプチド-MHC）に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、b) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なN o t c h レセプターポリペプチドと、c) 転写活性化因子または抑制因子を含む、細胞内ドメインとを含み、ペプチド-MHCへの特異的結合メンバーの結合が、1つ以上のタンパク質分解切断部位でのN o t c h レセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより細胞内ドメインを放出する、キメラポリペプチドを含む。

【0004】

いくつかの実施形態において、特異的結合メンバーは、抗体を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、もしくはミニボディ、F(ab')₂断片、Fab断片、単鎖可変断片(scfv)、または単一ドメイン抗体(sdAb)である。

【0005】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、特異的結合メンバーは、細胞内がん抗原ペプチドを含むペプチド - MHC に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドまたはNY-ESOペプチドである。

【0006】

いくつかの実施形態において、Notchレセプターペプチドは、そのN末端に、1つ以上の上皮成長因子(EGF)反復を含む。いくつかの実施形態において、Notchレセプターペプチドは、そのN末端に、2~11個のEGF反復を含む。いくつかの実施形態において、Notchレセプターペプチドは、合成リンカーを含む。いくつかの実施形態において、Notchレセプターペプチドは、1つ以上のEGF反復と1つ以上のタンパク質分解切断部位との間に合成リンカーを含む。いくつかの実施形態において、Notchレセプターペプチドは、50アミノ酸長~1000アミノ酸長を有する。いくつかの実施形態において、Notchレセプターペプチドは、300アミノ酸長~400アミノ酸長を有する。いくつかの実施形態において、1つ以上のタンパク質分解切断部位は、S2タンパク質分解切断部位、S3タンパク質分解切断部位、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のタンパク質分解切断部位は、A1a-Va1ジペプチド配列を含むADAMファミリー型プロテアーゼ切断部位(例えば、ADAM-17型プロテアーゼ切断部位など)であるS2タンパク質分解切断部位を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のタンパク質分解切断部位は、G1y-Va1ジペプチド配列を含むガンマ-セクレターゼ(-セクレターゼ)切断部位であるS3タンパク質分解切断部位を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のタンパク質分解切断部位は、S1タンパク質分解切断部位を更に含む。いくつかの実施形態において、S1タンパク質分解切断部位は、アミノ酸配列Arg-X-(Arg/Lys)-Arg(配列番号130)(式中、Xは任意のアミノ酸)を含むフューリン様プロテアーゼ切断部位である。いくつかの実施形態において、Notchレセプターペプチドは、S1タンパク質分解切断部位を欠如する。いくつかの実施形態において、Notchレセプターペプチドは、図31A~32Bに提示される配列と少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、Notchレセプターペプチドは、図31Aに提示される配列または図31Bに提示される配列と少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0007】

本開示の態様は、上記のキメラペプチドのいずれかをコードする核酸を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、核酸は、目的のペプチド(POI)をコードする核酸配列に作動可能に連結した転写活性化因子または抑制因子に応答性の転写制御要素を更に含む。いくつかの実施形態において、POIは、レポータータンパク質、キメラ抗原受容体(CAR)、抗体、キメラ二重特異的結合メンバー、操作されたT細胞受容体(TCR)、及び自然免疫応答誘導因子からなる群から選択される異種ペプチドである。

【0009】

本開示の態様は、上記の核酸のいずれかを含む組み換え発現ベクターを含む。

【0010】

本開示の態様は、細胞内で異種ペプチドの発現を誘導する方法であって、細胞をペプチド-主要組織適合複合体(ペプチド-MHC)と接触させることを含み、細胞が、上記のキメラペプチドのいずれかを発現し、キメラペプチドの転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結した異種ペプチドをコードする配列を含み、それによりキメラペプチドの細胞内ドメインを放出し、異種ペプチドの発現を誘導する、方法を含む。

【0011】

いくつかの実施形態において、異種ペプチドは、レポータータンパク質、キメラ抗原受容体(CAR)、抗体、キメラ二重特異的結合メンバー、操作されたT細胞受容体(TCR)、及び自然免疫応答誘導因子である。

10

20

30

40

50

【0012】

本開示の態様は、宿主細胞であって、a) 第1のペプチド - 主要組織適合複合体 (ペプチド - MHC) に特異的に結合する上記のキメラポリペプチドのいずれかをコードする核酸と、b) 目的のポリペプチド (POI) をコードする核酸に作動可能に連結したキメラポリペプチドの転写活性化因子に応答性の転写制御要素とを含む、宿主細胞を含む。

【0013】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、遺伝子改変されており、核酸及び転写制御要素は、宿主細胞のゲノム内に存在する。いくつかの実施形態において、核酸及び転写制御要素は、宿主細胞内で染色体外に存在する。いくつかの実施形態において、POIは、異種ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、異種ポリペプチドは、レポータータンパク質、キメラ抗原受容体 (CAR)、抗体、キメラ二重特異的結合メンバー、操作されたT細胞受容体 (TCR)、及び自然免疫応答誘導因子からなる群から選択される異種ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、異種ポリペプチドは、第2のペプチド - MHCに特異的に結合するCARである。いくつかの実施形態において、キメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、第1の細胞内がん抗原ペプチドを含む第1のペプチド - MHCに特異的に結合し、CARは、第2の細胞内がん抗原ペプチドを含む第2のペプチド - MHCに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、第1の細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドであり、第2の細胞内がん抗原ペプチドは、NY-ESOペプチドである。いくつかの実施形態において、第1の細胞内がん抗原ペプチドは、NY-ESOペプチドであり、第2の細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドである。いくつかの実施形態において、異種ポリペプチドは、第2のペプチド - MHCに特異的に結合する操作されたTCRである。いくつかの実施形態において、キメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、第1の細胞内がん抗原ペプチドを含む第1のペプチド - MHCに特異的に結合し、操作されたTCRは、第2の細胞内がん抗原ペプチドを含む第2のペプチド - MHCに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、第1の細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドであり、第2の細胞内がん抗原ペプチドは、NY-ESOペプチドである。いくつかの実施形態において、第1の細胞内がん抗原ペプチドは、NY-ESOペプチドであり、第2の細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドである。

【0014】

本開示の態様は、宿主細胞であって、a) キメラポリペプチドをコードする核酸であって、キメラポリペプチドが、N末端からC末端まで共有結合で、i) がん細胞の表面上に存在する標的分子に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、ii) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なNotchレセプターポリペプチドと、iii) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを含む、キメラポリペプチドをコードする核酸と、b) 転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結したキメラ二重特異的結合メンバーをコードする核酸とを含み、標的分子への特異的結合メンバーの結合が、1つ以上のタンパク質分解切断部位でのNotchレセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより細胞内ドメインを放出し、転写制御要素を活性化し、キメラ二重特異的結合メンバーを発現させる、宿主細胞を含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、キメラ二重特異的結合メンバーは、がん抗原に特異的な結合ドメインと、免疫細胞の表面上に発現されるタンパク質に特異的な結合ドメインとを含む。いくつかの実施形態において、キメラ二重特異的結合メンバーは、少なくとも1つの抗体由来抗原 - 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態において、キメラ二重特異的結合メンバーは、二重特異性抗体またはその断片である。いくつかの実施形態において、キメラ二重特異的結合メンバーは、リガンド - 受容体結合対の少なくとも1つの受容体またはリガンド結合ドメインを含む。いくつかの実施形態において、キメラ二重特異的結合メンバーは、少なくとも1つの抗体由来抗原 - 結合ドメインと、リガンド - 受容体結合対の少なくとも1つの受容体またはリガンド結合ドメインとを含む。いくつかの実施形態において、免疫細胞の表面上に発現されるタンパク質は、CD3である。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態において、免疫細胞の表面上に発現されるタンパク質は、ナチュラルキラーグループ2D (NKG2D) 受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、がん抗原である。いくつかの実施形態において、標的分子は、組織特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、器官特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、細胞型特異的分子である。

【0016】

本開示の態様は、対象の新生物を治療する方法であって、対象に、上記のいずれかに従う有効量の宿主細胞を投与することを含み、新生物が、標的分子及びがん抗原を発現する、方法を含む。

【0017】

本開示の態様は、宿主細胞であって、a) キメラポリペプチドをコードする核酸であって、キメラポリペプチドが、N末端からC末端まで共有結合で、i) がん細胞の表面上に存在する標的分子に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、ii) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なNotchレセプターポリペプチドと、iii) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを含む、キメラポリペプチドをコードする核酸と、b) 転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結した抗Fcキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸とを含み、標的分子への特異的結合メンバーの結合が、1つ以上のタンパク質分解切断部位でのNotchレセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより細胞内ドメインを放出し、転写制御要素を活性化し、抗Fc CARを発現させる、宿主細胞を含む。

10

【0018】

いくつかの実施形態において、標的分子は、がん抗原である。いくつかの実施形態において、標的分子は、組織特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、器官特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、細胞型特異的分子である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、がん細胞の表面上に存在するがん抗原に特異的な抗体をコードし、かつ抗Fc CARによって結合されるFc領域を含む核酸を更に含む。いくつかの実施形態において、抗体をコードする核酸は、転写制御要素に作動可能に連結される。

20

【0019】

本開示の態様は、対象の新生物を治療する方法であって、対象に、上記の有効量の宿主細胞のいずれかを投与することを含み、新生物が、標的分子を発現する、方法を含む。

30

【0020】

いくつかの実施形態において、本方法は、対象に、がん細胞の表面上に存在するがん抗原に特異的であり、かつ抗Fc CARによって結合されるFc領域を含む抗体を投与することを更に含む。

【0021】

本開示の態様は、宿主細胞であって、a) キメラポリペプチドをコードする核酸であって、キメラポリペプチドが、N末端からC末端まで共有結合で、i) がん細胞の表面上に存在する標的分子に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、ii) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なNotchレセプターポリペプチドと、iii) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを含む、キメラポリペプチドをコードする核酸と、b) 転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結した自然免疫応答誘導因子をコードする核酸とを含み、標的分子への特異的結合メンバーの結合が、1つ以上のタンパク質分解切断部位でのNotchレセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより細胞内ドメインを放出し、転写制御要素を活性化し、自然免疫応答誘導因子を発現させる、宿主細胞を含む。

40

【0022】

いくつかの実施形態において、標的分子は、組織特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、器官特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、細胞型特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、がん抗原で

50

ある。いくつかの実施形態において、自然免疫応答誘導因子は、細菌タンパク質またはその断片である。いくつかの実施形態において、自然免疫応答誘導因子は、ウイルスタンパク質またはその断片である。いくつかの実施形態において、自然免疫応答誘導因子は、真菌タンパク質またはその断片である。いくつかの実施形態において、自然免疫応答誘導因子は、哺乳動物寄生虫によって発現されるタンパク質またはその断片である。いくつかの実施形態において、哺乳動物寄生虫は、ヒト寄生虫である。

【0023】

本開示の態様は、対象の領域内で局所自然免疫応答を誘導する方法であって、対象に、上記の有効量の宿主細胞を投与することを含み、領域が、標的分子を発現する、方法を含む。いくつかの実施形態において、対象の領域は、新生物を含む。

10

【0024】

本開示の態様は、宿主細胞であって、a) キメラポリペプチドをコードする核酸であって、キメラポリペプチドが、N末端からC末端まで共有結合で、i) がん細胞の表面上に存在する標的分子に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、ii) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なN terminal regionレセプターポリペプチドと、iii) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを含む、キメラポリペプチドをコードする核酸と、b) 転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結した免疫抑制因子をコードする核酸とを含み、標的分子への特異的結合メンバーの結合が、1つ以上のタンパク質分解切断部位でのN terminal regionレセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより細胞内ドメインを放出し、転写制御要素を活性化し、免疫抑制因子を発現させる、宿主細胞を含む。

20

【0025】

いくつかの実施形態において、標的分子は、組織特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、器官特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、細胞型特異的分子である。いくつかの実施形態において、標的分子は、自己抗原である。いくつかの実施形態において、免疫抑制因子は、免疫抑制サイトカインである。いくつかの実施形態において、免疫抑制サイトカインは、IL-10である。いくつかの実施形態において、免疫抑制因子は、細胞間シグナリング免疫抑制リガンドである。いくつかの実施形態において、細胞間シグナリング免疫抑制リガンドは、PD-L1である。

30

【0026】

本開示の態様は、対象における免疫応答を抑制する方法であって、対象に、上記の有効量の宿主細胞のいずれかを投与することを含み、対象が、標的分子を発現する、方法を含む。いくつかの実施形態において、対象は、自己免疫疾患を有する。

【0027】

本開示の態様は、不均一腫瘍を殺傷する方法であって、殺傷抗原を発現する第1の細胞ならびに殺傷抗原及び感作抗原を発現する第2の細胞を含む不均一腫瘍を、操作された免疫細胞と接触させることを含み、操作された免疫細胞が、感作抗原に特異的に結合する、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドと、殺傷抗原に特異的に結合する治療ポリペプチドをコードする核酸配列と、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドに応答性である核酸に作動可能に連結した転写制御要素とを含み、感作抗原へのタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの結合が、転写制御要素を活性化して、殺傷抗原への結合時に不均一腫瘍の第1及び第2の細胞を殺傷する治療ポリペプチドの発現を誘導する、方法を含む。

40

【0028】

いくつかの実施形態において、治療ポリペプチドは、キメラ抗原受容体(CAR)である。いくつかの実施形態において、治療ポリペプチドは、T細胞受容体(TCR)である。いくつかの実施形態において、治療ポリペプチドは、治療抗体である。いくつかの実施形態において、治療ポリペプチドは、キメラ二重特異的結合メンバーである。いくつかの実施形態において、感作抗原または殺傷抗原のうちの少なくとも1つが、MHCとの関連で提示される細胞内抗原である。いくつかの実施形態において、感作抗原及び殺傷抗原の

50

両方が、MHCとの関連で提示される細胞内抗原である。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】受信細胞上に発現されるタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド(synNotch)の一実施形態と、送信細胞の主要組織適合複合体(MHC)提示抗原とが特異的に結合して、受信細胞内で遺伝子またはコード配列(「X」)の発現を誘導することを模式的に示す。

【図2】図1に一般的に示される、MHC提示WT1抗原に特異的な、本明細書に記載の一実施形態に従うタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドを発現する受信細胞内での、青色蛍光タンパク質(BFP)レポーターの特異的発現を実証する。レポーターは、受信細胞がMHC提示WT1抗原を発現する送信細胞に接触した場合には発現されるが、この抗原を発現しない送信細胞に接触した場合には発現されない。

【図3】タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドのWT1細胞内抗原に依存した活性化を示す図2に関連する、定量化を提示する。

【図4】本明細書に記載の一実施形態に従う、抗MHC提示WT1のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの感受性及び抗原濃度に依存したレポーター活性化を実証する。

【図5】一実施形態に従う、CD8+T細胞及びCD4+T細胞内での、抗MHC提示WT1のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの感受性及び抗原濃度に依存したレポーター活性化を実証する。

【図6】MHC提示NY-ESO1抗原に特異的なT細胞受容体(TCR)の発現を推進するMHC提示WT1特異的キメラポリペプチドを利用する、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型回路を模式的に示す。示された実施形態において、T細胞は、WT1及びNY-ESO1細胞内抗原の両方を発現する標的細胞に接触した場合にのみ活性化される。

【図7】WT1及びNY-ESO1細胞内抗原の両方を発現する標的細胞に接触した場合のみの、図6に示される系に従う、(CD69活性化マーカー発現によって示される)タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型T細胞活性化を示す。

【図8】操作されたT細胞がWT1及びNY-ESO1細胞内抗原の両方を発現する標的細胞に接触した場合のみの、図6に示される系に従う、有意なタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型標的細胞殺傷を示す。

【図9】MHC提示NY-ESO1抗原に特異的なT細胞受容体(TCR)の発現を推進する抗GFP特異的キメラポリペプチドを利用する、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型回路を模式的に示す。

【図10】表面-GFP及びNY-ESO1細胞内抗原の両方を発現する標的に接触した場合の、図9に示されるT細胞の活性化を模式的に示す。

【図11】表面-GFP及びNY-ESO1細胞内抗原の両方を発現する標的細胞に接触した場合のみの、図9及び図10に示される系に従う、(CD69活性化マーカー発現によって示される)有意なタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型T細胞活性化を示す。

【図12】表面-GFP及びNY-ESO1細胞内抗原の両方を発現する標的細胞に接触した場合の、図9及び図10に示される系に従う、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型T細胞増殖を示す。

【図13】表面-GFP及びNY-ESO1細胞内抗原の両方を発現する標的細胞に接触した場合のみの、図9及び図10に示される系に従う、有意なタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型T2標的細胞殺傷を示す。

【図14】表面-GFP及びNY-ESO1細胞内抗原の両方を発現する標的細胞に接触した場合のみの、図9及び図10に示される系に従う、有意なタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型A375標的細胞殺傷を示す。抗NY-ESO1 TCRを恒常に発現するCD8 T細胞による標的細胞殺傷との比較は、開閉型TCR発現

10

20

30

40

50

についての特異性の増強を実証することが示される。

【図15】第1の細胞内抗原（「抗原A」）に特異的なタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド（synNotch）の一実施形態を利用して、第2の細胞内抗原（「抗原B」）に特異的なTCRの発現を推進する、二重細胞内-抗原回路の一般的な模式図を提示する。

【図16】T細胞をCD19+腫瘍へと再標的化する - CD19 / CD3二重特異性抗体であるブリナツモマブの発現を制御する、 - GFP synNotchレセプターで操作したCD4+T細胞を示す。

【図17】表面GFP+のみ、CD19+のみ、または表面GFP / CD19+K562と共に同時培養した後に、synNotch T細胞上のCD69（活性化マーカー）発現を示す、図16に関連するヒストグラムデータを提示する。T細胞は、表面GFP / CD19 K562の存在下では強く活性化し、CD19+のみK562と共にインキュベートした場合には、ブリナツモマブ発現の低レベルの基礎漏出のために、わずかなパーセンテージのT細胞が活性化する。

【図18】CD19-非標的K562及び標的CD19+を、それぞれ左側腹部及び右側腹部に皮下注射したNSGマウスを示す。腫瘍移植の4日後、ブリナツモマブ（ - CD19 / CD3 BiTE）発現を制御する - GFP synNotch T細胞を、マウスに静脈内注射した。25日間にわたって、腫瘍をカリパスによって測定した。

【図19】（図18に示される）ブリナツモマブ（ - CD19 / CD3 BiTE）発現を制御する - GFP synNotchレセプターで操作したCD4+T細胞及びCD8+T細胞で治療したマウスにおける、両側のCD19+及びGFP / CD19+K562腫瘍成長曲線を提示する。二重抗原GFP / CD19+腫瘍は、選択的に除去される（n = 5匹のマウス、誤差 = 平均値の標準誤差、有意性はスチュードントt検定によって決定、** p < 0.01）。

【図20】フラゲリンの発現を制御する - GFP synNotchレセプターで操作したCD4+T細胞を示す。レポーター・アッセイにおいて、表面GFP+K562またはGFP-K562と共に同時培養した後にT細胞から上清を収集し、hTLR5 HEK青色分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）レポーター細胞に添加した。24時間後、SEAP活性を監視し、上清中のフラゲリンのレベルを測定した。

【図21】図20に示される、誘導された自然免疫メディエーター・レポーター・アッセイの定量化を提示する。

【図22】本明細書に記載の一実施形態に従って、不均一腫瘍を認識し、それを治療するようなT細胞のプログラミングを模式的に示す。

【図23】本明細書に記載の一実施形態に従って、GFP「感作」抗原及びCD19「殺傷」抗原を発現する不均一腫瘍を認識し、それを治療するようなT細胞のプログラミングを実証するように設計したモデル系を模式的に示す。

【図24】図23に従う、インビトロでモデリングした二重抗原不均一腫瘍（「不均一混合物」）の効果的な標的化及び殺傷を実証する。

【図25】様々な比率の感作抗原発現細胞及び殺傷抗原発現細胞のモデル腫瘍を使用する、図23に示される不均一腫瘍殺傷のモデルの更なる定量化を提示する。「CD19+標的」のバーは上部にあり、「GFP / CD19+標的」のバーは下部にある。

【図26】1:3の比率の感作抗原発現細胞対殺傷抗原発現細胞を有する腫瘍の、図23に示されるモデル系に従う不均一腫瘍殺傷の時間経過を提示する。

【図27】1:19の比率の感作抗原発現細胞対殺傷抗原発現細胞を有する腫瘍の、図23に示されるモデル系に従う不均一腫瘍殺傷の時間経過を提示する。

【図28】免疫抑制物質PD-L1及びIL-10の発現を制御する、 - CD19 synNotchレセプターで操作したCD4+T細胞を模式的に示す。

【図29】図28に示されるように、CD19+K562またはCD19-K562と共に24時間同時培養した後に、PD-L1及び細胞内IL-10を発現するsynNotch T細胞のパーセンテージの定量化を提示する。上清中のIL-10の量もまた、E

10

20

30

40

50

LISAによって決定した。

【図30-1】A～Dは、本開示のNotchレセプターポリペプチドの例示的なNotch制御領域の模式図を提示する。

【図30-2】E～Gは、本開示のNotchレセプターポリペプチドの例示的なNotch制御領域の模式図を提示する。

【図31A-1】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31A-2】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31B-1】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。 10

【図31B-2】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31C】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31D-1】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31D-2】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31E-1】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。 20

【図31E-2】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31F-1】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31F-2】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31G-1】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。

【図31G-2】様々な種のNotchレセプターポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～7）を提示する。 30

【図32】A及びBは、NotchレセプターポリペプチドのNotch制御領域の例及びその中の構成要素（配列番号16～17）を示す。

【図33】野生型親和性TCRまたは増強親和性TCRのいずれかの発現を推進する、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型回路を模式的に示す。

【図34】図33に示される系に従う、二重抗原開閉型サイトカイン分泌を示す。

【図35】操作されたCD4+T細胞内でTCRの発現を推進する、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型回路を模式的に示す。

【図36】図35に示される系に従う、標的化二重抗原を発現する標的細胞に応答した高レベルのサイトカイン分泌を示す。 40

【図37】操作されたCD4+T細胞またはCD8+T細胞を使用して、臨床的に関連する抗原対を標的化する、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型回路を模式的に示す。

【図38】図37に示される系に従う、操作されたCD8+T細胞及びCD4+T細胞の両方による、臨床的に関連する抗原対を発現する標的細胞の特異的殺傷を示す。

【図39】HLA-A2/Mar t1に特異的なTCRの発現を推進する抗GFP特異的キメラポリペプチドを利用する、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型回路を模式的に示す。

【図40】表面GFP及びHLA-A2/Mar t1抗原の両方を発現する標的細胞の存在下でのみ、図39に模式的に示される回路を発現するT細胞の特異的活性化を示す。 50

【図41】抗HER2 CARの発現を推進する抗HLA-A2/WT1特異的キメラポリペプチドを利用する、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチド開閉型内部-外部回路を模式的に示す。

【図42】内部抗原(HLA-A2/WT1)及び外部抗原(HER2)の両方を発現する標的細胞の存在下でのみ、図41に模式的に示される回路を発現するT細胞の特異的活性化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

定義

本明細書で互換的に使用される「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、任意の長さのヌクレオチドの重合体形態、つまりリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかを指す。したがって、この用語は、一本鎖、二本鎖、または多重鎖のDNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、あるいはプリン塩基及びピリミジン塩基、または他の天然、化学修飾もしくは生化学修飾、非天然、もしくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含む重合体を含むが、これらに限定されない。

10

【0031】

「作動可能に連結した」は、そのように記載される構成要素がその意図される様式で機能することを可能する関係にある、並立を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、そのプロモーターはそのコード配列に作動可能に連結される。作動可能に連結した核酸配列は、隣接していてもよいが、必ずしも隣接している必要はない。例えば、場合によっては、プロモーターに作動可能に連結したコード配列は、プロモーターに隣接していてもよい。場合によっては、プロモーターに作動可能に連結したコード配列は、コード配列及び非コード配列を含む1つ以上の介在配列によって分離されてもよい。また、場合によっては、3つ以上の配列が作動可能に連結されてもよい(例えば、2つ以上のコード配列が单一のプロモーターに作動可能に連結される場合を含むが、これに限定されない)。

20

【0032】

「ベクター」または「発現ベクター」は、プラスミド、ファージ、ウイルス、またはコスミドなどのレブリコンであり、これに対して別のDNAセグメント(すなわち、「挿入断片」)が結合して、細胞内で結合されたセグメントの複製をもたらす。

30

【0033】

本明細書で使用される場合、「異種」は、それぞれ天然(例えば、天然に存在する)核酸またはタンパク質には見出されないヌクレオチドまたはポリペプチド配列を意味する。異種核酸またはポリペプチドは、その核酸またはポリペプチドが存在するか、または発現される生物もしくは細胞とは異なる種に由来し得る。したがって、異種核酸またはポリペプチドは一般に、それが存在する細胞または生物と比較して、異なる進化的起源を持つ。

【0034】

「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は、任意のアイソタイプの抗体または免疫グロブリン、抗原への特異的結合を保持する抗体の断片(Fab、Fv、scFv、及びFd断片を含むが、これらに限定されない)、キメラ抗体、ヒト化抗体、单鎖抗体(scAb)、单ードメイン抗体(dAb)、单ードメイン重鎖抗体、单ードメイン軽鎖抗体、ナノボディ、二重特異性抗体、多特異性抗体、ならびに抗体及び非抗体タンパク質の抗原-結合(本明細書では抗原結合とも称される)部分を含む融合タンパク質を含む。抗体は、例えば、放射性同位体、検出可能な産物を生成する酵素、蛍光タンパク質などで検出可能に標識され得る。抗体は、特異的結合対のメンバー(例えば、ビオチン(ビオチン-アビジン特異的結合対のメンバー)などの他の部分に更に共役されてもよい。抗体はまた、ポリスチレンプレートまたはビーズなどを含むが、これらに限定されない、固体支持体にも結合してもよい。Fab'、Fv、F(ab')2、及びまたは抗原への特異的結合を保持する他の抗体断片、ならびにモノクローナル抗体もまた、この用語によって包含される。本明細書で使用される場合、モノクローナル抗体は、それら全てが反復細胞複製によつ

40

50

て単一の細胞から產生された同一の細胞群によって產生される抗体である。つまり、細胞のクローニングは、単一の抗体種のみを產生する。モノクローナル抗体は、雑種細胞產生技術を使用して產生することができるが、当業者にとって既知である他の產生方法（例えば、抗体ファージ提示ライプラリ由来の抗体）が使用されてもよい。抗体は、一価または二価であり得る。抗体は、4つのポリペプチド鎖（ジスルフィド結合によって接続された2つの重鎖及び2つの軽鎖）からなる「Y形」分子であるIg单量体であり得る。

【0035】

本明細書で使用される場合、「ヒト化免疫グロブリン」という用語は、異なる起源の免疫グロブリンの部分を含む免疫グロブリンを指し、少なくとも1つの部分が、ヒト起源のアミノ酸配列を含むものである。例えば、ヒト化抗体は、必要な特異性を有する非ヒト起源（マウスなど）の免疫グロブリンに由来する部分と、ヒト起源の免疫グロブリン配列に由来する部分（例えば、キメラ免疫グロブリン）とを慣習的な技術（例えば、合成）によって化学的に共に接合させたもの、または遺伝子操作技術を使用して近接ポリペプチドとして調製したもの（例えば、キメラ抗体のタンパク質部分をコードするDNAを発現させて、近接ポリペプチド鎖を產生することができる）を含み得る。ヒト化免疫グロブリンの別の例は、非ヒト起源の抗体に由来する相補性決定領域（CDR）と、ヒト起源の軽鎖及び/または重鎖に由来するフレームワーク領域とを含む、1つ以上の免疫グロブリン鎖を含有する免疫グロブリン（例えば、フレームワーク変化を有するCDR移植抗体またはそれを有しないCDR移植抗体）である。キメラまたはCDR移植单鎖抗体もまた、ヒト化免疫グロブリンという用語によって包含される。例えば、Cabillyらの米国特許第4,816,567号、Cabillyらの欧州特許第0,125,023B1号、Bossらの米国特許第4,816,397号、Bossらの欧州特許第0,120,694B1号、Neuberger, M. S. らのWO 86/01533、Neuberger, M. S. らの欧州特許第0,194,276B1号、Winterの米国特許第5,225,539号、Winterの欧州特許第0,239,400B1号、Padlan, E. A. らの欧州特許出願第0,519,596A1号を参照されたい。单鎖抗体について、Ladnerらの米国特許第4,946,778号、Hustonの米国特許第5,476,786号、及びBird, R. E. et al., Science, 242:423-426 (1988) もまた参照されたい。

【0036】

本明細書で使用される場合、「ナノボディ」（Nb）という用語は、天然に存在する重鎖抗体に由来する最小の抗原結合断片または单一可変ドメイン（VHH）を指し、当業者にとって既知である。それらは、ラクダ類に見られる重鎖のみ抗体に由来する（Hamer - Castermanら、1993；Desmyterら、1996）。「ラクダ類」の科では、軽鎖ポリペプチドを欠く免疫グロブリンが見出される。「ラクダ類」は、旧世界ラクダ（Camelus bactrianus 及び Camelus dromedarius）ならびに新世界ラクダ（例えば、Llama pacos、Llama glama、Llama guanicoe、及び Llama vicugna）を含む。单一可変ドメイン重鎖抗体は、本明細書ではナノボディまたはVHH抗体と称される。

【0037】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部分、例えば、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片、ダイアボディ、直鎖抗体（Zapata et al., Protein Eng. 8 (10) : 1057-1062 (1995)）、ドメイン抗体（dAb、Holt et al. (2003) Trends Biotechnol. 21: 484）、单鎖抗体分子、ならびに抗体断片から形成される多特異性抗体が挙げられる。抗体のペプシン消化により、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片（各々が单一抗原結合部位を有する）と、容易に結晶化する能力を反映する名称である残りの「Fc」断片とがもたらされる。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、かつ依然として抗原を架橋することができるF(ab')₂断片がもたらされる。

10

20

30

40

50

【0038】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含有する最小の抗体断片である。この領域は、緊密な非共有結合性会合にある1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この構成において、各可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、 $V_H - V_L$ 二量体の表面上に抗原結合部位を画定する。合わせて、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を与える。しかしながら、結合部位全体よりも低い親和性を備えているが、単一可変ドメイン（または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）さえも、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。

【0039】

「Fab」断片はまた、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン（CH₁）も含有する。Fab断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む重鎖CH₁ドメインのカルボキシル末端に数個の残基が付加されている点でFab'断片とは異なる。Fab' - SHは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を持つFab'の本明細書における名称である。Fab'抗体断片は元来、それらの間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学結合もまた既知である。

【0040】

任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に異なる型のうちの1つに割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMという5つの主要なクラスが存在し、これらのクラスのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2に更に分けることができる。サブクラスは、例えば、IgG2a及びIgG2bなどの型に更に分けることができる。

20

【0041】

「単鎖Fv」または「sFv」または「scFv」抗体断片は、抗体のV_Hドメイン及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖内に存在する。いくつかの実施形態において、Fvポリペプチドは、V_HドメインとV_Lドメインとの間にポリペプチドリンカーを更に含み、これにより、sFvが抗原結合のために所望の構造を形成することができる。sFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994)を参照されたい。

30

【0042】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小抗体断片を指し、これらの断片は、同じポリペプチド鎖（V_H - V_L）内の軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続した重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短過ぎるリンカーを使用することによって、ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を作製させる。ダイアボディは、例えば、EP 404,097、WO 93/11161、及び Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448により詳細に記載されている。

40

【0043】

本明細書で使用される場合、「親和性」という用語は、2つの物質（例えば、抗体及び抗原）の可逆結合の平衡定数を指し、解離定数（K_D）として表される。親和性は、無関係のアミノ酸配列に対する抗体の親和性よりも、少なくとも1倍大きい、少なくとも2倍大きい、少なくとも3倍大きい、少なくとも4倍大きい、少なくとも5倍大きい、少なくとも6倍大きい、少なくとも7倍大きい、少なくとも8倍大きい、少なくとも9倍大きい、少なくとも10倍大きい、少なくとも20倍大きい、少なくとも30倍大きい、少なく

50

とも40倍大きい、少なくとも50倍大きい、少なくとも60倍大きい、少なくとも70倍大きい、少なくとも80倍大きい、少なくとも90倍大きい、少なくとも100倍、もしくは少なくとも1,000倍大きいか、またはそれ以上大きくあり得る。標的タンパク質に対する抗体の親和性は、例えば、約100ナノモル(nM)～約0.1nM、約100nM～約1ピコモル(pM)、もしくは約100nM～約1フェムトモル(fM)、またはそれ以上であり得る。本明細書で使用される場合、「結合力」という用語は、2つ以上の物質の複合体の希釈後の解離に対する耐性を指す。「免疫反応性」及び「優先的に結合する」という用語は、抗体及び/または抗原結合断片に関して本明細書で互換的に使用される。

【0044】

10

「結合」という用語は、例えば、共有結合、静電結合、疎水結合、及びイオン結合、及び/または水素結合の相互作用(塩橋及び水架橋などの相互作用を含む)による2つの分子間の直接会合を指す。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの細胞外ドメイン内に存在する特異的結合メンバーは、ペプチド-主要組織適合複合体(ペプチド-MHC)に特異的に結合する。「特異的結合」は、少なくとも約10⁻⁷M以上、例えば、5×10⁻⁷M、10⁻⁸M、5×10⁻⁸M、及びそれ以上の親和性を有する結合を指す。「非特異的結合」は、約10⁻⁷M未満の親和性を有する結合、例えば、10⁻⁶M、10⁻⁵M、10⁻⁴Mなどの親和性を有する結合を指す。

【0045】

20

本明細書で互換的に使用される「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸(遺伝子コードアミノ酸及び非遺伝子コードアミノ酸、化学修飾もしくは生化学修飾アミノ酸、または誘導体化アミノ酸を含み得る)の重合体形態ならびに修飾ペプチド主鎖を有するポリペプチドを指す。この用語は、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、N末端メチオニン残基の有無に関わらず異種及び相同リーダー配列を有する融合タンパク質、免疫学的にタグ付けされたタンパク質などを含むが、これらに限定されない、融合タンパク質を含む。

【0046】

「単離」ポリペプチドは、その天然環境の構成要素から特定され、分離及び/または回収されたものである。その天然環境の混入構成要素は、そのポリペプチドの診断上または治療上の使用に干渉する材料であり、これらには、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性または非タンパク質性溶質が含まれ得る。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、(1)ローリー法によって決定される、抗体の90重量%超、95重量%超、もしくは98重量%超、例えば、99重量%超まで、(2)回転カップ配列決定装置の使用によって、N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15個の残基を得るために十分な程度まで、または(3)還元もしくは非還元条件下でクーマシーブルーもしくは銀染色を使用して、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって均一になるまで、精製される。単離ポリペプチドは、組み換え細胞内にインサイチュでポリペプチドを含むが、これは、ポリペプチドの天然環境の少なくとも1つの構成要素が存在しないためである。場合によっては、単離ポリペプチドは、少なくとも1つの精製ステップにより調製される。

30

【0047】

40

本明細書で互換的に使用される「キメラ抗原受容体」及び「CAR」という用語は、細胞外ドメイン(例えば、リガンド/抗原結合ドメイン)、膜貫通ドメイン、及び1つ以上の細胞内シグナリングドメインを一般には含むが、これらのみを排他的に含むわけではない免疫細胞の活性化を引き起こすか、またはそれを阻害することができる人工的な多モジュール分子を指す。CARという用語は、特にCAR分子のみに限定されず、CARバリアントもまた含まれる。CARバリアントには、CARの細胞外部分(例えば、リガンド結合部分)及び細胞内部分(例えば、細胞内シグナリング部分)が2つの別々の分子上に存在する、分離CARが含まれる。CARバリアントには、例えば、分離CARの2つの部分の条件的なヘテロ二量体化が薬理学的に制御されている分離CAR(例えば、PCT

50

公開第WO 2014 / 127261A1号及び米国特許出願第2015 / 0368342 A1号に記載のものであり、これらの開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる)を含む条件的に活性化可能なCARである、ONスイッチCARも含まれる。CARバリアントには、一次CARの活性を増幅または阻害し得る二次CAR結合ドメインを含む、二重特異性CARも含まれる。CARバリアントには、例えば、二次CAR結合ドメインの結合が一次CAR活性化の阻害をもたらす二重特異性CAR系の構成要素として使用され得る、阻害キメラ抗原受容体(iCAR)も含まれる。CAR分子及びそれらの誘導体(すなわち、CARバリアント)は、例えば、PCT出願第US 2014 / 016527号、Fedorov et al. Sci Transl Med (2013) ; 5 (215) : 215ra172、Glienke et al. Front Pharmacol (2015) 6 : 21、Kakarla & Gottschalk 52 Cancer J (2014) 20 (2) : 151 - 5、Riddell et al. Cancer J (2014) 20 (2) : 141 - 4、Pegram et al. Cancer J (2014) 20 (2) : 127 - 33、Cheadle et al. Immunol Rev (2014) 257 (1) : 91 - 106、Barrett et al. Annu Rev Med (2014) 65 : 333 - 47、Sadelain et al. Cancer Discov (2013) 3 (4) : 388 - 98、Cartellieri et al. , J Biomed Biotechnol (2010) 956304に記載され、これらの開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。有用なCARには、Novartis (Basel, Switzerland)によって商品化されるレンチウイルス負荷CTL019(チサゲンレクロイセル-T)CAR-T細胞によって発現される、抗CD19 - 4 - 1BB - CD3 CARもまた含まれる。

【0048】

本明細書で使用される場合、「治療」、「治療すること」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び/または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に予防するという観点で予防的であり得、及び/または疾患及び/またはその疾患に起因する有害作用の部分的もしくは完全な治癒という観点で治療的であり得る。本明細書で使用される場合、「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、(a)その疾患に罹りやすいが、まだそれを有するとは診断されていない対象において疾患の発生を予防すること、(b)その疾患を阻害すること、すなわち、その発症を抑止すること、及び(c)その疾患を軽減すること、すなわち、その疾患の退行を引き起こすことを含む。

【0049】

「治療有効量」または「有効量」は、疾患を治療するために哺乳動物または他の対象に投与した場合に、その疾患のそのような治療をもたらすために十分である、ある薬剤の量または2つの薬剤の合計量を指す。「治療有効量」は、薬剤(複数可)、疾患及びその重症度、ならびに治療される対象の年齢、体重などに応じて変動する。

【0050】

本明細書で互換的に使用される「個体」、「対象」、「宿主」、及び「患者」は、マウス(例えば、ラット、マウス)、非ヒト靈長類、ヒト、イヌ、ネコ、有蹄動物(例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ)、ウサギ類などを含むが、これらに限定されない、哺乳動物を指す。場合によっては、個体は、ヒトである。場合によっては、個体は、非ヒト靈長類である。場合によっては、個体は、齧歯類、例えば、ラットまたはマウスである。場合によっては、個体は、ウサギ類、例えば、ウサギである。

【0051】

本明細書で使用される場合、「免疫細胞」という用語は一般に、骨髄内で產生される造血幹細胞(HSC)に由来する白血球細胞(白血球)を含む。「免疫細胞」には、例えば、リンパ球(T細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞)及び骨髄系由来細胞(好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、樹状細胞)が含まれる。

【0052】

10

20

30

40

50

「T細胞」には、Tヘルパー細胞（CD4⁺細胞）、細胞傷害性T細胞（CD8⁺細胞）、T制御細胞（T_{reg}）、及びガンマ-デルタT細胞を含む、CD3を発現する全ての型の免疫細胞が含まれる。

【0053】

「細胞傷害性細胞」には、CD8⁺T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、及び好中球が含まれ、これらの細胞は、細胞傷害性応答を媒介することができる。

【0054】

本明細書で使用される場合、「合成」という用語は一般に、人工由来のポリペプチドまたは天然に存在しない核酸をコードするポリペプチドを指す。そのような合成ポリペプチド及び／または核酸は、例えば、單一アミノ酸、單一ヌクレオチドなどを含む塩基性サブユニットから新規に組み立てられても、例えば、組み換え法を通して、人工由来であるか人工由来であるかに関わらず、既存のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに由来してもよい。

10

【0055】

本明細書で使用される場合、「組み換え」という用語は、その起源または操作のために、本来それが会合するポリヌクレオチド配列の全部または一部と会合しない核酸分子（例えば、ゲノム、cDNA、ウイルス、半合成、及び／または合成起源のポリヌクレオチド）を説明する。タンパク質またはポリペプチドに関して使用される、組み換えという用語は、組み換えポリヌクレオチドからの発現によって產生されるポリペプチドを意味する。宿主細胞またはウイルスに関して使用される、組み換えという用語は、組み換えポリヌクレオチドが導入されている宿主細胞またはウイルスを意味する。組み換えはまた、本明細書において、材料（例えば、細胞、核酸、タンパク質、またはベクター）に関して、その材料が異種材料（例えば、細胞、核酸、タンパク質、またはベクター）の導入によって修飾されていることを指すためにも使用される。

20

【0056】

本発明を更に説明する前に、本発明は、記載される特定の実施形態に限定されず、したがって、当然ながら変動し得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するためのものに過ぎず、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定的であるようには意図されないことも理解されたい。

30

【0057】

値の範囲が提示される場合、別途文脈が明確に指示しない限り、下限値の単位の10分の1までの、その範囲の上限値と下限値との間の各介在値、ならびにその記載範囲内の任意の他の記載値または介在値が、本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値は独立して、より小さい範囲内に含まれてもよく、また記載範囲内の任意の具体的に除外される限度に従って、本発明にも包含される。上限値及び下限値の一方または両方が記載範囲に含まれる場合、それらの含まれる上限値及び下限値の一方または両方を除外する範囲もまた、本発明に包含される。

【0058】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載の方法及び材料と同様もしくは同等の任意の方法及び材料を本発明の実施または試験に使用してもよいが、好ましい方法及び材料は、これから説明されるものである。本明細書に言及される全ての出版物は、それらに関連して出版物が引用される方法及び／または材料を開示し、説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0059】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、別途文脈が明確に指示しない限り、单数形の「a」、「a n」、及び「t h e」は、複数の参照対象を含むことに留意されたい。したがって、例えば、「細胞（a c e l l）」への言及は、複数のそのような細胞を含み、「細胞（t h e c e l l）」への言及は、1つ以上の細胞及び当業者に既知のそれらの同等物への言及を含むなどである。特許請求の範囲が、いかなる任意の要素

50

も除外するように立案されてもよいことに更に留意されたい。したがって、この記載は、特許請求の範囲の要素の引用との関連での「単に」、「のみ」などの排他的な専門用語の使用、または「否定的な」限定の使用のための先行記述として機能することが意図される。

【0060】

明確さのために、別々の実施形態との関連で記載される本発明の特定の特徴が、単一の実施形態において組み合わせで提供され得ることが理解される。逆に、簡潔さのために、単一の実施形態との関連で記載される本発明の様々な特徴もまた、別々に、または任意の好適な下位組み合わせで提供され得る。本発明に関連する実施形態の全ての組み合わせは、本発明によって具体的に包含され、ありとあらゆる組み合わせが個々にかつ明確に開示されたかのように、本明細書に開示される。加えて、様々な実施形態及びそれらの要素の全ての下位組み合わせもまた、本発明によって具体的に包含され、ありとあらゆるそのような下位組み合わせが個々にかつ明確に本明細書に開示されたかのように、本明細書に開示される。

10

【0061】

本明細書に考察される出版物は、本出願の出願日前のそれらの開示に対してのみ提供される。本明細書におけるいづれの内容も、本発明が先行発明のためにそのような出版物に先行する資格がないことを認めるものと解釈されるべきではない。更に、提供される出版物の日付は、実際の出版日とは異なる場合があり、独立して確認する必要があり得る。

【0062】

本開示は、キメラポリペプチドの特異的結合メンバーとその結合パートナーとの結合時に誘導される切断事象後に様々な細胞プロセスを調節する、キメラポリペプチドを提供する。キメラポリペプチドを使用して、例えば、遺伝子発現の誘導を含む、細胞機能を調節する方法もまた提供される。主題のキメラポリペプチドをコードする核酸ならびに関連する発現力セット及びベクターだけでなく、そのような核酸及び/または発現力セット及びベクターを含有する細胞もまた提供される。記載される構成要素及び方法を使用して対象を治療する方法だけでなく、主題の方法を実施するためのキットもまた提供される。

20

【0063】

方法

結合誘導切断事象を受けて、キメラポリペプチドから細胞内ドメインを放出するキメラポリペプチドを使用して、1つ以上の細胞プロセス及び/または活性及び/または機能を調節するための方法が提供される。より詳細に後述されるように、本開示のキメラポリペプチドは一般に、a) 特異的結合メンバーを含む細胞外ドメインと、b) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なN o t c h レセプターポリペプチドと、c) 細胞内ドメインとを含み得る。本開示の方法は、そのようなキメラポリペプチドを使用して、特異的結合メンバーとその結合パートナーとの結合時に、1つ以上の細胞プロセス及び/または活性及び/または機能を調節することを含む。

30

【0064】

場合によっては、本明細書に記載の方法に従って、キメラポリペプチドは、キメラポリペプチドをコードする、細胞内のまたは細胞に導入された核酸から発現される。したがって、場合によっては、本方法は、キメラポリペプチドをコードする核酸と細胞とを接触させることを含んでもよく、そのような接触は、核酸を細胞に導入するために十分である。ウイルストラנסフェクション、電気穿孔、リポフェクション、照射、化学形質転換、形質導入可能な担体（例えば、形質導入可能な担体タンパク質）の使用などを含むが、これらに限定されない、核酸を細胞に導入する任意の簡便な方法が本明細書において用途を見出しえる。

40

【0065】

導入された核酸は、細胞内に維持されても、一過的に存在してもよい。したがって、場合によっては、導入された核酸は、細胞内に維持され得る（例えば、ゲノム内に組み込まれ得る）。例えば、ウイルス系組み込み、トランスポゾン系組み込み、相同組み換え系組み込みなどを含むが、これらに限定されない、任意の簡便な核酸組み込み方法が主題の方

50

法において用途を見出し得る。場合によっては、導入された核酸は、一過的に存在し得る（例えば、細胞内で染色体外に存在し得る）。一過的に存在する核酸は、例えば、任意の簡便な一過的にトランスフェクトされたベクターの一部として存続し得る。

【0066】

本開示のキメラポリペプチドをコードする導入された核酸は、キメラポリペプチドの発現を推進するプロモーターに作動可能に連結されるような様式で導入され得る。そのようなプロモーターの供給源は変動し得、例えば、プロモーターが、例えば、発現構築物の一部として核酸と共に導入される場合、またはプロモーターが核酸の導入前に細胞内に存在するか、もしくは核酸の後に導入される場合を含み得る。本明細書により詳細に記載されるように、有用なプロモーターには、内在プロモーター及び異種プロモーターが含まれ得る。例えば、場合によっては、核酸は、核酸に作動可能に連結した異種プロモーターを含有する発現構築物の一部として導入されてもよい。場合によっては、核酸は、核酸が導入される細胞に内在するプロモーターの複製物を含有する発現構築物の一部として導入されてもよい。場合によっては、核酸はプロモーターなしで導入されてもよく、細胞のゲノムへの組み込み時に、核酸はその細胞内に既に存在する内在プロモーターに作動可能に連結されてもよい。利用される確認及び／またはプロモーターに応じて、核酸からのキメラポリペプチドの発現は、恒常的、誘導性、組織特異的、細胞型特異的（それらの組み合わせを含む）などであるように構成され得る。

【0067】

導入方法に関わらず、細胞内の本開示のキメラポリペプチドは一般に、そのようなキメラポリペプチドの特異的結合メンバーがその結合パートナーに結合していない場合には、血漿膜内に存在し、不活性のままである。本明細書で使用される場合、本開示のキメラポリペプチドとの関係で、「不活性」は、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが切断可能なポリペプチド（例えば、切断可能なNotchポリペプチド）に連結されたままであるために、細胞内ドメインが隔絶され、細胞内機能及び／または細胞活性を調節することができないことを意味する。特異的結合メンバーとその結合パートナーとの結合時に、キメラポリペプチドは活性になると言うことができ、ここで「活性」という用語は一般に、結合によって引き起される切断事象により、キメラポリペプチドから細胞内ドメインが放出されるために、細胞内ドメインが解放され、細胞内機能及び／または細胞活性に影響を与えることを指す。

【0068】

本方法に従って調節され得る細胞プロセス及び／または活性及び／または機能は変化することになり、それらとしては、遺伝子または他のコード配列の発現の調節、例えば、遺伝子またはコード配列の発現の誘導、遺伝子またはコード配列の発現の抑制などが挙げられるが、これらに限定されない。したがって、場合によっては、主題の方法において使用されるキメラポリペプチドの細胞内ドメインには、例えば、転写活性化因子または転写抑制因子を含む転写調節因子が含まれてもよい。

【0069】

場合によっては、調節され得る細胞プロセス及び／または活性及び／または機能としては、例えば、細胞の遺伝子産物の発現、細胞の増殖、細胞のアポトーシス、非アポトーシス性細胞死、細胞の分化、細胞の脱分化、細胞の遊走、細胞からの分子の分泌（例えば、治療ポリペプチドの分泌、サイトカインの分泌など）、細胞の細胞接着、免疫細胞活性化（例えば、T細胞活性化など）、エフェクター分子（例えば、サイトカイン、抗体、成長因子など）の産生、標的核酸の転写、標的mRNAの翻訳、オルガネラ活性、細胞内輸送などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0070】

場合によっては、サイトカインの発現及び／または分泌が調節され得る。サイトカインの非限定的な例、それらの調節され得る発現／分泌としては、例えば、インターロイキン及び関連物（例えば、IL-1様、IL-1、IL-1、IL-1RA、IL-18、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、IL-3、IL

10

20

30

40

50

- 5、GM-CSF、IL-6様、IL-6、IL-11、G-CSF、IL-12、LIF、OSM、IL-10様、IL-10、IL-20、IL-14、IL-16、IL-17など)、インターフェロン(例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ など)、TNFファミリー(例えば、CD154、LT- α 、TNF- α 、TNF- β 、4-1BB、APRIL、CD70、CD153、CD178、GITRL、LIGHT、OX40L、TALL-1、TRAIL、TWEAK、TRANCEなど)、TGF- β ファミリー(例えば、TGF- β -1、TGF- β -2、TGF- β -3など)などが挙げられるが、これらに限定されない。場合によっては、本開示のキメラポリペプチド(複数可)を通した細胞の活性化は、キメラポリペプチドが存在しないか、もしくは別様に不活性である同等の細胞のサイトカイン発現及び/または分泌と比較して、サイトカイン発現及び/または分泌の増加を誘導し得る。増加の量は変動してもよく、例えば、10%以上、25%以上、50%以上、75%以上、100%以上、150%以上、200%以上、250%以上、300%以上、350%以上、400%以上などを含むが、これらに限定されない、10%以上の増加からの範囲であり得る。10

【0071】

場合によっては、より詳細に後述される二重抗原認識が用いられる場合、標的細胞の両方の抗原の結合によって活性化される細胞は、1つの抗原のみに結合した対応する細胞と比較して、細胞活性化またはサイトカインの発現/分泌の増加を示し得る。場合によっては、そのような増加は、例えば、10%以上、25%以上、50%以上、75%以上、100%以上、150%以上、200%以上、250%以上、300%以上、350%以上、400%以上などを含むが、これらに限定されない、10%以上の増加からの範囲であり得る。20

【0072】

場合によっては、本明細書に記載の方法は、細胞をキメラポリペプチドの特異的結合メンバーの結合パートナーと接触させることによって、本開示のキメラポリペプチドを発現する細胞内でポリペプチドの発現を誘導する方法を含む。特定の構成に応じて、そのような方法は、内在遺伝子もしくはコード配列または異種遺伝子もしくはコード配列の発現を誘導することを含み得る。場合によっては、特異的結合メンバーの結合パートナーは、細胞の表面上に存在してもよい。場合によっては、特異的結合メンバーの結合パートナーは、細胞の表面上に存在していないなくてもよく、例えば、未結合または自由拡散型の基質(例えば、プレートまたはビーズの表面などの固体支持体)に結合していてもよい。したがって、本明細書に記載の方法が、細胞をキメラポリペプチドの特異的結合メンバーの結合パートナーと接触させることを含む場合、そのような接触は、例えば、自由拡散型の結合パートナーを含有する培地との接触、それらの表面上に結合パートナーを発現する細胞との接触、結合パートナーが結合している基質との接触などを含み得るが、これらに限定されない。未結合または自由拡散型の特異的結合メンバーは、場合によっては、例えば、錨細胞と受信細胞との間の結合を促進して、主題の切断可能なキメラポリペプチドの活性化に必要な力を生成する可溶性アダプター分子(例えば、PCT出願第US2016/019188号(公開第WO2016/138034号)に記載されるようなものであり、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる)として機能し得る。場合によっては、未結合または自由拡散型の結合パートナーは、その後、例えば、未結合または自由拡散型の結合パートナーに特異的に結合し、かつ基質または細胞表面に結合または別様に会合する追加の結合パートナーの導入を含むが、これに限定されない、任意の簡便な手段によって捕捉または繫留され得る。30

【0073】

主題の方法において、任意の簡便な特異的結合メンバーと結合パートナーとの対を利用することができますが、但し、その対が、キメラポリペプチドを活性化するために十分に互いに特異的に結合することを条件とする。場合によっては、有用な特異的結合メンバーと結合パートナーとの対は、例えば、抗体が特異的結合メンバーとして利用され、抗原が結合パートナーとして利用されるか、または抗原が特異的結合メンバーとして利用され、抗40

体が結合パートナーとして利用される、抗原抗体対を含み得る。

【 0 0 7 4 】

場合によっては、本明細書に記載の方法は、ペプチド - M H C がキメラポリペプチドの特異的結合メンバーに結合する十分な条件下で、細胞をペプチド - 主要組織適合複合体(ペプチド - M H C)と接触させることによって、キメラポリペプチドを発現する細胞の細胞活性を調節する方法を含む。場合によっては、ペプチド - M H C とキメラポリペプチドとの結合は、細胞内ドメインを放出し、細胞内でポリペプチドの発現を誘導するキメラポリペプチドを活性化する。

【 0 0 7 5 】

本開示の方法が、キメラポリペプチドを発現する細胞を結合パートナーと接触させて、遺伝子またはコード配列の発現を誘導することを含む場合、本質的に任意の天然または組み換えポリペプチドが発現されるように誘導され得る。場合によっては、発現されるポリペプチドは、目的のポリペプチド(P O I)と称され得る。 P O I は、本質的に任意のポリペプチドであり得、研究目的のポリペプチド(例えば、レポーターポリペプチド、変異ポリペプチド、新規合成ポリペプチドなど)、治療目的のポリペプチド(例えば、天然に存在する治療タンパク質、組み換え治療ポリペプチドなど)、産業目的のポリペプチド(例えば、産業用途(例えば、製造など)において使用されるポリペプチド)などを含み得るが、これらに限定されない。

【 0 0 7 6 】

場合によっては、発現のために誘導されるポリペプチドは、例えば、レポータータンパク質、キメラ抗原受容体(C A R)、抗体、キメラ二重特異的結合メンバー、操作された T 細胞受容体(T C R)、自然免疫応答誘導因子などを含み得るが、これらに限定されない。

【 0 0 7 7 】

本方法の「接触」は文脈に応じて変動し得、インビトロ接触、エキソビオ接触、及びインビオ接触を含み得る。例えば、場合によっては、例えば、キメラポリペプチドを発現する細胞がインビトロで培養される場合、接触は、結合パートナーまたは結合パートナーを発現する細胞または結合パートナーが結合した基質を、インビトロ培養物に添加することを含み得る。場合によっては、例えば、結合パートナーがある個体内にインビオで存在する場合(例えば、個体内にインビオで存在する細胞上に存在する場合を含む)、接触は、キメラポリペプチドを発現する細胞をその個体に投与することを含み得る。場合によっては、例えば、キメラポリペプチドを発現する細胞がある個体内にインビオで存在する場合、接触は、結合パートナーをその個体に投与すること、細胞をその個体から除去し、細胞をエキソビオで結合パートナーと接触させること、キメラポリペプチド及び結合パートナーの両方をインビオで同時に発現させることなどを含み得る。

【 0 0 7 8 】

細胞の活性を調節するための本開示の方法は、単一細胞内または多細胞環境内(例えば、天然に存在する組織、人工組織など)で実行することができる。細胞の活性を調節するための本開示の方法は、並行または連続で実行することができる。

【 0 0 7 9 】

本開示の方法は、例えば、細胞を結合パートナーと接触させる前に細胞を培養すること、細胞を結合パートナーと接触させながら細胞を培養すること、細胞を結合パートナーと接触させた後に細胞を培養することを含むが、これらに限定されない、本開示のキメラポリペプチドを発現する細胞を培養することを更に含み得る。任意の簡便な細胞培養方法を用いることができる一方で、そのような方法は、例えば、培養される細胞の型、細胞の意図される用途(例えば、細胞が研究目的で培養されるのか、治療目的で培養されるのか)などを含むが、これらに限定されない、様々な要因に基づいて変動する。場合によっては、本開示の方法は、例えば、細胞培養物を播種すること、細胞培養物に栄養を与えること、細胞培養物を継代培養すること、細胞培養物を分離すること、細胞培養物を分析すること、細胞培養物を薬物で処理すること、細胞培養物を収集することなどを含むが、これら

10

20

30

40

50

に限定されない、一般的な細胞培養のプロセスを更に含み得る。

【0080】

本開示の方法は、場合によっては、主題の方法に使用される細胞を受容及び／または採取することを更に含み得る。場合によっては、細胞は、対象から採取される。対象から細胞を採取することは、対象から組織試料を得、組織試料の細胞を富化、単離、及び／または増殖させることを含み得る。細胞の単離及び／または富化は、例えば、培養（例えば、接着培養、懸濁培養など）、細胞選別（例えば、F A C S）などによる単離／富化を含む、任意の簡便な方法を使用して実行することができる。細胞は、例えば、血液（例えば、末梢血、臍帯血などを含む）、骨髄、生検、皮膚試料、口腔粘膜検体などを含むが、これらに限定されない、任意の簡便な細胞組織試料から採取してもよい。場合によっては、細胞は、例えば、血液バンク、組織バンクなどを含む供給源から受容される。受容される細胞は、以前に単離されたものであっても、または組織試料の一部として受容されるもの（したがって、細胞受容後かつ使用前に単離／富化が実行され得る）であってもよい。特定の例において、受容される細胞は、例えば、培養細胞株の細胞を含む非初代細胞であってもよい。本明細書に記載の方法で使用するために好適な細胞を、本明細書において更に詳述する。

10

【0081】

治療方法

本開示の方法は、本明細書に記載の1つ以上のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドを使用して、対象を治療する方法を含む。キメラポリペプチドを送達する任意の簡便な方法が、主題の方法において用途を見出し得る。場合によっては、主題のキメラポリペプチドは、対象に、キメラポリペプチドを発現する細胞を投与することによって送達され得る。場合によっては、主題のキメラポリペプチドは、対象に、キメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を投与することによって送達され得る。対象にキメラポリペプチドをコードする核酸を投与することは、対象に、核酸（核酸は発現されていても、まだ発現されていないてもよい）を含有する細胞を投与することを含み得る。場合によっては、対象にキメラポリペプチドをコードする核酸を投与することは、対象に、核酸を細胞に送達するように設計したベクターを投与することを含み得る。

20

【0082】

したがって、主題の治療方法において、キメラポリペプチドをコードする核酸は、インビトロ、エキソビオ、またはインビオで投与され得る。場合によっては、細胞を対象から採取し、核酸でトランスフェクトしてもよく、更なる操作（例えば、インビトロ増殖を含むが、これに限定されない）をして、または操作をせずに、トランスフェクトした細胞を対象に投与してもよい。場合によっては、例えば、送達ベクターを有する核酸またはそれを有しない核酸を、対象に直接投与してもよい。

30

【0083】

主題のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの使用を通して調節され得る細胞活性の多様性を考慮すると、本治療方法は、様々な用途に利用することができる。非限定的な例として、本方法は、例えば、*A canthamoeba* 感染症、*A c i n e t o b a c t e r* 感染症、アデノウイルス感染症、*A D H D*（注意欠陥／多動障害）、*A I D S*（後天性免疫不全症候群）、*A L S*（筋萎縮性側索硬化症）、アルツハイマー病、アメーバ症、腸（*E n t a m o e b a h i s t o l y t i c a* 感染症）、アナプラズマ症、ヒト、貧血、*A n g i o s t r o n g y l u s* 感染症、動物関連疾患、*A n i s a k i s* 感染症（アニサキス症）、炭疽、大動脈瘤、大動脈解離、アレナウイルス感染症、関節炎（例えば、小児関節炎、線維筋痛症、痛風、ループス（*S L E*）（全身性エリテマトーデス）、変形性関節症、関節リウマチなど）、*A s c a r i s* 感染症（回虫症）、*A s p e r g i l l u s* 感染症（アスペルギルス症）、喘息、注意欠陥／多動障害、自閉症、鳥インフルエンザ、Bウイルス感染症（ヘルペスBウイルス）、*B . c e p a c i a* 感染症（*B u r k h o l d e r i a c e p a c i a* 感染症）、バベシア症（*B a b e s i a* 感染症）、細菌性髄膜炎、細菌性膿症（*B V*）、*B a l a m u t h i a* 感染症（*B a l a*

40

50

Mut hia mandrillaris 感染症)、*Bala muthia mandrillaris* 感染症、*Paranichigawum* 症、*Bala ntidi um* 感染症 (パランチジウム症)、*Bay lisascari s* 感染症、*Bilharzia*、先天異常、黒肺塵症 (炭坑夫塵肺)、*Blastocystis hominis* 感染症、*Blastocystis* 感染症、*Plasmodium* 蚊子症、出血障害、血液障害、コロモジラミ (*Pediculus humanus corporis*)、*Borrelia burgdorferi* 感染症、ボツリヌス中毒 (*Clostridium botulinum*)、ウシ海綿状脳症 (BSE)、ブレーナード下痢症 (*Brainerd Diarrhea*)、乳癌、細気管支炎、気管支炎、*Brucella* 感染症 (ブルセラ症)、ブルセラ症、*Burkholderia cepacia* 感染症 (*B. cepacia* 感染症)、*Burkholderia mallei*、*Burkholderia pseudomallei* 感染症、*Campylobacter* 感染症 (カンピロバクター症)、カンピロバクター症、がん (例えば、結腸直腸 (結腸) 癌、婦人科癌、肺癌、前立腺癌、皮膚癌など)、*Candida* 感染症 (カンジダ症)、カンジダ症、イヌインフルエンザ、*Capillaria* 感染症 (毛細虫症)、毛細虫症、カルバペネム耐性 *Klebsiella* 肺炎 (CRKP)、ネコノミ条虫、住血吸虫性皮膚炎、脳性麻痺、子宮頸癌、シャーガス病 (*Trypanosoma cruzi* 感染症)、水痘 (水痘病)、チクングニア熱 (CHIKV)、小児関節炎、風疹 (風疹ウイルス)、麻疹、流行性耳下腺炎、ロタウイルス感染症、*Chlamydia* (*Chlamydia trachomatis* 病)、*Chlamydia pneumoniae* 感染症、*Chlamydia trachomatis* 病、コレラ (*Vibrio cholerae* 感染症)、慢性疲労症候群 (CFS)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、シガテラ魚中毒、シガトキシン、古典的クロイツフェルト・ヤコブ病、肝吸虫症、*Clonorchis* 感染症 (肝吸虫症)、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile* 感染症、*Clostridium perfringens* 感染症、*Clostridium tetani* 感染症、凝固障害、CMV (*Cytomegalovirus* 感染症)、炭坑夫塵肺、コクシジオイデス症、結腸直腸 (結腸) 癌、感冒、結膜炎、クーリー貧血、COPD (慢性閉塞性肺疾患)、*Corynebacterium diphtheriae* 感染症、*Coxiella burnetii* 感染症、クロイツフェルト・ヤコブ病、CRKP (カルバペネム耐性 *Klebsiella* 肺炎)、クローン病、クリプトコッカス症、クリプトスボリジウム症、*Cryptosporidium* 感染症 (クリプトスボリジウム症)、*Cyclospora* 感染症 (シクロスボラ症)、シクロスボラ症、のう虫症、*Cystoisospora* 感染症 (シストイソスボーラ症)、シストイソスボーラ症、サイトメガロウイルス感染症 (CMV)、デング熱 (DF)、デング出血熱 (DHF)、皮膚糸状菌、皮膚症、糖尿病、ダイアモンド・ブラックファン貧血 (DBA)、*Dientamoeba fragilis* 感染症、ジフテリア (*Corynebacterium diphtheriae* 感染症)、裂頭条虫症、*Diphyllobothrium* 感染症 (裂頭条虫症)、*Dipylidium* 感染症、イヌノミ条虫、ダウン症 (21番染色体トリソミー)、メジナ虫症、小形条虫 (*Hymenolepis* 感染症)、*E. coli* 感染症 (*Escherichia coli* 感染症)、耳感染症 (中耳炎)、東部馬脳炎 (EEE)、エボラ出血熱、エキノコックス症、エーリキア症、象皮症、脳炎 (蚊媒介性及びダニ媒介性)、*Entamoeba histolytica* 感染症、*Enterobius vermicularis* 感染症、*Enterovirus* 感染症 (非ポリオ)、発疹チフス、てんかん、エプスタイン・バーウイルス感染症 (EBV 感染症)、*Escherichia coli* 感染症、広範囲薬剤耐性 TB (XDR TB)、*Fasciolopsis* 感染症 (肝蛭症)、*Fasciolopsis* 感染症 (肥大吸虫症)、線維筋痛症、伝染性紅斑 (パルボウイルス B19 感染症)、調味料関連肺疾患、毛包炎、食品関連疾患、*Clostridium perfringens* 感染症、脆弱 X 症候群、*Francisella tularensis* 感染症、性器カンジダ症 (外陰部カンジダ症 (VVC))、性器ヘルペス (単純ヘルペスウイルス感染症)、性器疣贅、風疹 (風疹ウイルス) 10 20 30 40 50

、*Giardia*感染症(ジアルジア症)、鼻疽(*Burkholderia mallei*)、*Gnathostoma*感染症、顎口虫症(*Gnathostoma*感染症)、淋病(*Neisseria gonorrhoeae*感染症)、痛風、アメーバ性肉芽腫性脳炎(GAE)、グループA *Strep*感染症(GAS)(グループA連鎖球菌感染症)、グループB *Strep*感染症(GBS)(グループB連鎖球菌感染症)、ギニア虫病(メジナ虫症)、婦人科癌(例えば、子宮頸癌、卵巣癌、子宮癌、膣癌及び外陰癌など)、H1N1インフルエンザ、*Haemophilus influenzae*感染症(Hib感染症)、手足口病(HFMD)、ハンセン病、ハンタウイルス肺症候群(HPS)、アタマジラミ(*Pediculus humanus capititis*)、心疾患(循環器系疾患)、熱ストレス、ヘモクロマトーシス、血友病、ヘンドラウイルス感染症、ヘルペスBウイルス、単純ヘルペスウイルス感染症、*Heterophyes*感染症(異形吸虫症)、Hib感染症(*Haemophilus influenzae*感染症)、血圧上昇、*Histoplasma capsulatum*病、ヒストプラスマ症(*Histoplasma capsulatum*病)、温浴毛包炎(*Pseudomonas dermatitidis*感染症)、HPV感染症(ヒトパピローマウイルス感染症)、ヒトエーリキア症、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトヒトパピローマウイルス感染症(HPV感染症)、膜様条虫感染症、高血圧症、高熱、低体温、膿瘍疹、伝染性単核症、炎症性腸疾患(IBD)、インフルエンザ、鳥インフルエンザ、H1N1インフルエンザ、新型インフルエンザ、季節性インフルエンザ、ブタインフルエンザ、侵襲性カンジダ症、鉄過剰症(ヘモクロマトーシス)、*Isospora*感染症(イソスpora症)、日本脳炎、黄疸、*K. pneumoniae*(*Klebsiella pneumoniae*)、Kala-Azar、川崎症候群(KS)、核黄疸、*Klebsiella pneumoniae*(*K. pneumoniae*)、ラクロス脳炎(LAC)、ラクロス脳炎ウイル(LACV)、ラッサ熱、ラテックスアレルギー、鉛中毒、レジオネラ病(レジオネラ症)、*Leishmania*感染症(リーシュマニア症)、ハンセン病、*Leptospira*感染症(レプトスピラ症)、レプトスピラ症、白血病、シラミ、*Listeria*感染症(リステリア症)、リステリア症、肝疾患及び肝炎、*Loa loa*感染症、開口障害、ルー・ゲーリック病、肺癌、ループス(SLE)(全身性エリテマトーデス)、ライム病(*Borrelia burgdorferi*感染症)、リンパ管フィラリア症、リンパ浮腫、リンパ球性脈絡髄膜炎(LCMV)、*Lymphogranuloma venerereum*感染症(LGV)、マラリア、マールブルグ出血熱、麻疹、類鼻疽(*Burkholderia pseudomallei*感染症)、髄膜炎(髄膜炎菌病)、髄膜炎菌病、メチシリン耐性*Staphylococcus aureus*(MRSA)、微量栄養素欠乏、*Microsporidia*感染症、伝染性軟屬腫、サルBウイルス、サル痘、モルジエロンズ、蚊媒介性疾患、ムコール症、多剤耐性TB(MDR TB)、流行性耳下腺炎、*Mycobacterium abscessus*感染症、*Mycobacterium avium*複合体(MAC)、*Mycoplasma pneumoniae*感染症、はえ幼虫症、*Naegleria*感染症(原発性アメーバ性髄膜脳炎(PAM))、壞死性筋膜炎、顧みられない熱帯病(NTD)、*Neisseria gonorrhoeae*感染症、神経囊虫症、新変異型クロイツフェルト・ヤコブ病、新生児黄疸(核黄疸)、ニパウイルス脳炎、ノカルジア症、非ポリオエンテロウイルス感染症、非病原性(無害)腸内原虫、ノロウイルス感染症、ノーウォーク様ウイルス(NLV)、新規H1N1インフルエンザ、オンコセルカ症、*Opisthorchis*感染症、口腔癌、オーフウイルス、中咽頭カンジダ症(OPC)、変形性関節症(OA)、骨粗鬆症、中耳炎、卵巣癌、新型インフルエンザ、肺吸虫症、*Paragonimus*感染症(肺吸虫症)、寄生虫症、バルボウイルスB19感染症、*Pediculus humanus capititis*、*Pediculus humanus corporis*、骨盤内炎症性疾患(PID)、末梢動脈疾患(PAD)、百日咳、ケジラミ症、結膜炎(Pink Eye)(結膜炎(Conjunctivitis))、蟻虫感染(*Enterobius vermicularis*感染症)、ペスト(*Yersinia pestis*感染症)、*Pne*

10

20

30

40

50

u m o c y s t i s j i r o v e c i i 肺炎、肺炎、ポリオ感染症（灰白髄炎感染症）、ポンティアック熱、ブリオン病（伝達性海綿状脳症（T S E））、前立腺癌、P s e u d o m o n a s d e r m a t i t i s 感染症、オウム病、モジラミ（ケジラミ症）、肺高血圧症、Q熱（C o x i e l l a b u r n e t i i 感染症）、狂犬病、アライグマ回虫感染症（B a y l i s a s c a r i s 感染症）、崩咬症（R B F）（S t r e p t o b a c i l l u s m o n i l i f o r m i s 感染症）、レクレーション水病（R W I）、回帰熱、R S ウイルス感染症（R S V）、関節リウマチ（R A）、R i c k e t t s i a r i c k e t t s i i 感染症、リフトバレー熱（R V F）、白癬（皮膚糸状菌）、動物白癬、眼オンコセルカ症（オンコセルカ症）、ロッキー山紅斑熱（R M S F）（R i c k e t t s i a r i c k e t t s i i 感染症）、ロタウイルス感染症、R V F（リフトバレー熱）、R W I（レクレーション水病）、S a l m o n e l l a 感染症（サルモネラ症）、疥癬、猩紅熱、住血吸虫症（S c h i s t o s o m a 感染症）、季節性インフルエンザ、重症急性呼吸器症候群、性行為感染症（S T D）（例えば、細菌性腔症（B V）、クラミジア、性器ヘルペス、淋病、ヒトパピローマウイルス感染症、骨盤内炎症性疾患、梅毒、トリコモナス症、H I V / A I D S など）、S h i g e l l a I n f e c t i o n (S h i g e l l o s i s)、S h i n g l e s (V a r i c e l l a Z o s t e r V i r u s (V Z V))、鎌状赤血球症、単一遺伝子疾患、副鼻腔感染症（副鼻腔炎）、皮膚癌、睡眠病（アフリカトリパノソーマ症）、痘瘡（大痘瘡及び小痘瘡）、口内炎感染症（オーフウイルス）、南部ダニ関連発疹病（S T A R I）、開放性二分脊椎症（脊髄髄膜瘤）、スプロトトリクム症、紅斑熱群R i c k e t t s i a (S F G R)、セントルイス脳炎、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 感染症、S t r e p t o b a c i l l u s m o n i l i f o r m i s 感染症、連鎖球菌疾患、S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e 感染症、脳卒中、S t r o n g y l o i d e s 感染症（糞線虫症）、乳児突然死症候群（S I D S）、セルカリア皮膚炎（住血吸虫性皮膚炎）、ブタインフルエンザ、梅毒（T r e p o n e m a p a l l i d u m 感染症）、全身性エリテマトーデス、条虫感染症（T a e n i a 感染症）、精巣癌、破傷風疾患（C l o s t r i d i u m t e t a n i 感染症）、鷦口瘡（中咽頭カンジダ症（O P C））、ダニ媒介性回帰熱、ダニ媒介性疾患（例えば、アナプラズマ症、バベシア症、エリキア症、ライム病、トウレット症候群（T S）、毒素ショック症候群（T S S）、トキソカラ症（T o x o c a r a 感染症）、トキソプラズマ症（T o x o p l a s m a 感染症）、トロコーマ感染症、伝達性海綿状脳症（T S E）、外傷性脳損傷（T B I）、旋毛虫症（T r i c h i n e l l o s i s）（旋毛虫症（T r i c h i n o s i s））、トリコモナス症（T r i c h o m o n a s 感染症）、結核（T B）（M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s 感染症）、野兎病（F r a n c i s e l l a t u l a r e n s i s 感染症）、腸チフス（S a l m o n e l l a t y p h i 感染症）、子宮癌、腫瘍及び外陰癌、バンコマイシン中等度 / 耐性S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 感染症（V I S A / V R S A）、バンコマイシン耐性E n t e r o c o c c i 感染症（V R E）、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（v C J D）、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、大痘瘡及び小痘瘡、V i b r i o c h o l e r a e 感染症、V i b r i o p a r a h a e m o l y t i c u s 感染症、V i b r i o v u l n i f i c u s 感染症、ウイルス性胃腸炎、ウイルス性出血熱（V H F）、ウイルス性ヘルペス、ウイルス性髄膜炎（無菌性髄膜炎）、フォン・ヴィルブランド病、外陰部カンジダ症（V V C）、ウエストナイルウイルス感染症、西部馬腦炎感染症、鞭虫感染症（鞭虫症）、ホイットモア病（W h i t m o r e ' s D i s e a s e）、百日咳、異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス感染症、黄熱、Y e r s i n i a p e s t i s 感染症、エルシニア症（Y e r s i n i a e n t e r o c o l i t i c a 感染症）、動物由来鉤虫、接合菌症などを含むが、これらに限定されない、様々な疾患を対象とする治療において用途を見出し得る。

【0084】

場合によっては、本開示の1つ以上のタンパク質分解により切断可能なポリペプチドを利用する治療方法は、がんの治療において用途を見出し得る。がんであって、それらの治

10

20

30

40

50

療が本開示の1つ以上のタンパク質分解により切断可能なポリペプチドの使用を含み得るがんは、変動し得るが、例えば、急性リンパ芽球性白血病（A L L）、急性骨髓性白血病（A M L）、副腎皮質癌、A I D S 関連癌（例えば、カポジ肉腫、リンパ腫など）、肛門癌、虫垂癌、星細胞腫、非定型奇形腫／ラブドトイド腫瘍、基底細胞癌、胆管癌（肝臓外）、膀胱癌、骨癌（例えば、ユーイング肉腫、骨肉腫、及び悪性線維性組織球腫など）、脳幹神経膠腫、脳腫瘍（例えば、星細胞腫、中枢神経系胚芽腫、中枢神経系胚細胞性腫瘍、頭蓋咽頭腫、上衣腫など）、乳癌（例えば、女性乳癌、男性乳癌、小児乳癌など）、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍（例えば、小児、胃腸など）、原発不明腫瘍、心臓（心）腫瘍、中枢神経系（例えば、非定型奇形腫／ラブドトイド腫瘍、中枢神経系胚芽腫、胚細胞性腫瘍、リンパ腫など）、子宮頸癌、小児癌、脊索腫、慢性リンパ性白血病（C L L）、慢性骨髓性白血病（C M L）、慢性骨髓増殖性腫瘍、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、管（例えば、胆管、肝臓外など）、非浸潤性乳管癌（D C I S）、中枢神経系胚芽腫、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、鼻腔神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管癌、眼癌（例えば、眼球内黑色腫、網膜芽細胞腫など）、骨線維性組織球腫（例えば、悪性、骨肉腫など）、胆囊癌、胃癌（G a s t r i c C a n c e r）（胃癌（S t o m a c h C a n c e r））、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（G I S T）、胚細胞腫瘍（例えば、頭蓋外、性腺外、卵巣、精巣など）、妊娠性絨毛性疾患、神経膠腫、有毛細胞性白血病、頭頸部癌、心臓癌、肝細胞（肝臓）癌、組織球増加症（例えば、ランゲルハンス細胞など）、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黑色腫、脾島腫瘍（例えば、脾神経内分泌腫瘍など）、カポジ肉腫、腎臓癌（例えば、腎細胞、ウィルムス腫瘍、小児腎臓腫瘍など）、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭癌、白血病（例えば、急性リンパ芽球性（A L L）、急性骨髓性（A M L）、慢性リンパ性（C L L）、慢性骨髓性（C M L）、有毛細胞性など）、口唇癌及び口腔癌、肝臓癌（原発性）、非浸潤性小葉癌（L C I S）、肺癌（例えば、非小細胞、小細胞など）、リンパ腫（例えば、A I D S 関連、バーキット、皮膚T細胞、ホジキン、非ホジキン、原発性中枢神経系（C N S）など）、マクログロブリン血症（例えば、ヴァルデンストレームなど）、男性乳癌、骨悪性線維性組織球及び骨肉腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明転移性扁平上皮性頸部癌、N U T 遺伝子関連正中線管癌、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髓腫／形質細胞腫瘍、菌状息肉腫、骨髓異形成症候群、骨髓異形成／骨髓増殖性疾患、骨髓性白血病（例えば、慢性（C M L）など）、骨髓性白血病（例えば、急性（A M L）など）、骨髓増殖性疾患（例えば、慢性など）、鼻腔癌及び副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、口腔癌（O r a l C a n c e r）、口腔癌（O r a l C a v i t y C a n c e r）（例えば、口唇など）、口腔咽頭癌、骨肉腫及び骨悪性線維性組織球腫、卵巣癌（例えば、上皮性、胚細胞腫瘍、低悪性度腫瘍など）、脾臓癌、脾神経内分泌腫瘍（脾島細胞腫瘍）、乳頭腫、傍神経節腫、副鼻腔癌及び鼻腔癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系（C N S）リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞（腎臓）癌、腎孟及び尿管、移行上皮癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫（例えば、ユーイング、カポジ、骨肉腫、横紋筋肉腫、軟部組織、子宮など）、セザリー症候群、皮膚癌（例えば、小児、黒色腫、メルケル細胞癌、非黒色腫など）、小細胞肺癌、小腸癌、軟部組織肉腫、扁平上皮細胞癌、扁平上皮性頸部癌（例えば、原発不明、転移性など）、胃癌（G a s t r i c C a n c e r）（胃癌（S t o m a c h C a n c e r））、T細胞リンパ腫、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、腎孟及び尿管の移行上皮癌、尿管癌及び腎孟腎癌、子宮癌（例えば、子宮内膜など）、子宮肉腫、膣癌、外陰癌、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍などを含み得るが、これらに限定されない。

【0085】

場合によっては、本開示の方法は、新生物を有する対象に、本開示のキメラポリペプチドを発現する細胞または本開示のキメラポリペプチドをコードする核酸を投与することによって新生物を治療することを含む。場合によっては、そのような方法は、対象に、キメ

10

20

30

40

50

ラポリペプチドの細胞内ドメインによって制御される転写制御要素に作動可能に連結した核酸を投与することを更に含み得る。本明細書で使用される場合、「新生物」という用語は一般に、固体腫瘍、血液癌など（例えば、本明細書に列挙されるがんを含む、例えば、任意のがんを含む）を含むが、これらに限定されない、組織の異常成長または異常増殖細胞もしくは細胞集団を指す。新生物は、良性または悪性であり得る。

【0086】

場合によっては、本方法は、不均一腫瘍の治療に適用することができる。本明細書で使用される場合、「不均一腫瘍」という用語は一般に、少なくとも1つの抗原を差次的に発現する、少なくとも2つの異なる型の腫瘍細胞を有する腫瘍を指す。例えば、不均一腫瘍は、第1の抗原を発現する1つの型の腫瘍細胞と、その抗原を発現しない第2の型の腫瘍細胞とを含み得る。場合によっては、不均一腫瘍は、第1の抗原を高度に発現する1つの型の腫瘍細胞と、その抗原が低発現である第2の型の腫瘍細胞とを含み得る。「低発現」は、治療薬での抗原の直接的な標的化が非実用的になるレベルで、抗原が発現されることを意味する。本明細書に記載の不均一腫瘍を標的化する方法は一般に、少なくとも2つの異なる細胞型の腫瘍（例えば、抗原を差次的に発現する2つの細胞型を含む）を治療的に標的化することを含む。したがって、不均一腫瘍を標的化する本明細書に記載の方法は、本方法において標的化される細胞型の抗原を発現しないか、またはその低発現を示す、ある細胞型の腫瘍に対する治療効果を可能にし得る。

10

【0087】

不均一腫瘍を治療する記載の方法に有用な、差次的に発現される抗原は本質的に、例えば、がん細胞抗原（例えば、表面発現がん抗原、細胞内がん抗原など）、組織特異的抗原、細胞型特異的抗原などを含むが、これらに限定されない、本明細書に記載の特異的結合メンバーで標的化され得る任意の抗原を含み得る。場合によっては、抗原は、細胞によって内在的に発現される。場合によっては、抗原は、それが発現される細胞に対して異種であり得る（例えば、発現される異種タンパク質が抗原として機能する場合を含む）。

20

【0088】

場合によっては、不均一腫瘍を治療する方法は、腫瘍を、感作抗原に特異的なタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドを発現するように操作された免疫細胞と接触させることを含み得る。本明細書で使用される場合、「感作抗原」という用語は一般に、不均一腫瘍の近くでキメラポリペプチドを活性化するために十分な抗原を指す。場合によっては、感作抗原は、不均一腫瘍の細胞のサブセット内に存在する抗原、例えば、不均一腫瘍のいくつかの細胞上に存在するが、不均一腫瘍の全ての細胞には存在しない抗原であり得る。場合によっては、感作抗原によるキメラポリペプチドの活性化時に、キメラポリペプチドの解放された細胞内ドメインは、第2の抗原特異的ポリペプチドの発現を誘導し得る。場合によっては、第2の抗原特異的ポリペプチドの抗原は、本明細書では「治療抗原」または「殺傷抗原」と称され得る。本明細書で使用される場合、「治療抗原」という用語は一般に、治療構築物が指向される抗原、例えば、治療構築物によって直接標的化される抗原（例えば、抗体、CAR、TCR、キメラ二重特異的結合メンバーなどを含むが、これらに限定されない）を指し得る。本明細書で使用される場合、「殺傷抗原」という用語は一般に、細胞を殺傷に標的化するように設計した構築物が指向される抗原、例えば、殺傷抗原を発現する細胞の免疫細胞による殺傷をもたらす構築物によって標的化される抗原（例えば、抗体、CAR、TCR、キメラ二重特異的結合メンバーなどを含むが、これらに限定されない）を指し得る。場合によっては、第2の抗原特異的ポリペプチドは、不均一腫瘍の全てまたはほぼ全てまたは大部分の細胞に存在する治療抗原に指向され得る。

30

【0089】

場合によっては、本明細書に記載の方法は、対象において自然免疫応答を誘導することを含む。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、発現時に対象において自然免疫応答を誘導するポリペプチドの発現を誘導し得る。本開示のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、特定の抗原への結合に応答してキメラポリペプチドを活性化するよう操作され得るため、場合によっては、自然免疫応答は、特定の抗原の存在に応答して誘

40

50

導され得る。キメラポリペプチドは、例えば、がん抗原、細胞型特異的抗原、組織特異的抗原、感染性疾患抗原（例えば、細菌抗原、ウイルス抗原、真菌抗原、病原抗原など）などを含むが、これらに限定されない、任意の簡便かつ適切な抗原によって活性化されるように操作され得る。場合によっては、自然免疫応答は、例えば、抗原の局所的存在、例えば、腫瘍内に局所的に存在する抗原、腫瘍微小環境内に局所的に存在する抗原、感染領域または組織に局所的に存在する抗原などに基づいて、局所的に活性化され得る。

【 0 0 9 0 】

場合によっては、本明細書に記載の方法は、対象において1つ以上の免疫抑制因子の発現を制御することを含む。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、発現時に対象において免疫抑制を誘導するポリペプチドの発現を誘導し得る。本開示のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、特定の抗原への結合に応答してキメラポリペプチドを活性化するように操作され得るため、場合によっては、免疫抑制応答は、特定の抗原の存在に応答して誘導され得る。キメラポリペプチドは、例えば、自己抗原（例えば、自己免疫応答を誘導する自己抗原）、細胞型特異的抗原、組織特異的抗原などを含むが、これらに限定されない、任意の簡便かつ適切な抗原によって活性化されるように操作され得る。場合によっては、免疫抑制は、例えば、抗原の局所的存在、例えば、組織内に局所的に存在する抗原、器官内に局所的に存在する抗原などに基づいて、局所的に活性化され得る。場合によっては、免疫抑制は、例えば、網羅的に存在する抗原を使用して、本開示のキメラポリペプチドを活性化することによって網羅的に実行され得る。場合によっては、本明細書に記載の方法に従う免疫抑制を必要とする対象は、自己免疫疾患有する対象であり得る。

10

【 0 0 9 1 】

容易に理解されるように、本明細書に記載の治療方法は、場合によっては、1つ以上の慣習的な治療と組み合わせることができる。例えば、腫瘍学の場合、本明細書に記載の方法は、場合によっては、例えば、慣習的な化学療法、慣習的な放射線療法、慣習的な免疫療法、手術などを含むが、これらに限定されない、慣習的ながん療法と組み合わせることができる。場合によっては、本明細書に記載の方法は、慣習的な療法の前または後に使用することができる。例えば、本明細書に記載の方法は、例えば、対象が慣習的な療法から改善を見た後に補助療法として使用しても、対象が慣習的な療法に応答していない場合に使用してもよい。場合によっては、本明細書に記載の方法は、追加療法の前に使用して、例えば、対象を追加療法（例えば、本明細書に記載の慣習的な療法）に対して準備してもよい。

20

【 0 0 9 2 】

慣習的ながん療法はまた、例えば、Ado - トラスツズマブエムタンシン（Kadcycla）標的化HER2（ERBB2/neu）（乳癌における使用に承認）；アファチニブ（Gilotrif）標的化EGFR（HER1/ERBB1）、HER2（ERBB2/neu）（非小細胞肺癌における使用に承認）；アルデスロイキン（Proleukin）標的化（腎細胞癌、黒色腫における使用に承認）；アレクチニブ（Alencept）標的化ALK（非小細胞肺癌における使用に承認）；アレムツズマブ（Campath）標的化CD52（B細胞慢性リンパ性白血病における使用に承認）；アテゾリズマブ（Tecentriq）標的化PD-L1（尿路上皮癌、非小細胞肺癌における使用に承認）；アベルマブ（Bavencio）標的化PD-L1（メルケル細胞癌における使用に承認）；アキシチニブ（Inlyta）標的化KIT、PDGFR、VEGFR1/2/3（腎細胞癌における使用に承認）；ベリムマブ（Benlysta）標的化BAFF（エリテマトーデスにおける使用に承認）；ベリノスタット（Belodadag）標的化HDAC（末梢T細胞リンパ腫における使用に承認）；ベバシズマブ（Avastin）標的化VEGFRリガンド（子宮頸癌、結腸直腸癌、卵管癌、膠芽腫、非小細胞肺癌、卵巣癌、腹膜癌、腎細胞癌における使用に承認）；ブリナツモマブ（Blinacyto）標的化CD19/CD3（急性リンパ球性白血病（前駆B細胞）における使用に承認）；ボルテゾミブ（Velcade）標的化プロテアソーム（多発性骨髄腫、マントル細胞リ

30

40

50

ンパ腫における使用に承認) ; ボスチニブ (Bosulif) 標的化ABL (慢性骨髓性白血病における使用に承認) ; ブレンツキシマブベドチン (Adcetris) 標的化CD30 (ホジキンリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫における使用に承認) ; ブリガチニブ (Alunbrig) 標的化ALK (非小細胞肺癌 (ALK+) における使用に承認) ; カボザンチニブ (Cabometyx, Cometriq) 標的化FLT3, KIT, MET, RET, VEGFR2 (甲状腺髓様癌、腎細胞癌における使用に承認) ; カルフィルゾミブ (Kyprolis) 標的化プロテアソーム (多発性骨髓腫における使用に承認) ; セリチニブ (Zykadia) 標的化ALK (非小細胞肺癌における使用に承認) ; セツキシマブ (Erbitux) 標的化EGFR (HER1/ERBB1) (結腸直腸癌、頭頸部扁平上皮細胞癌における使用に承認) ; コビメチニブ (Cotellic) 標的化MEK (黑色腫における使用に承認) ; クリゾチニブ (Xalkori) 標的化ALK、MET、ROS1 (非小細胞肺癌における使用に承認) ; ダブラフェニブ (Tafinlar) 標的化BRAF (黑色腫、非小細胞肺癌における使用に承認) ; ダラツムマブ (Darzalex) 標的化CD38 (多発性骨髓腫における使用に承認) ; ダサチニブ (Sprycel) 標的化ABL (慢性骨髓性白血病、急性リンパ芽球性白血病における使用に承認) ; デノスマブ (Xgeva) 標的化RANKL (骨巨細胞腫における使用に承認) ; ジヌツキシマブ (Unituxin) 標的化B4GALNT1 (GD2) (小児神経芽細胞腫における使用に承認) ; デュルバルマブ (Imfinzi) 標的化PD-L1 (尿路上皮癌における使用に承認) ; エロツズマブ (Empliciti) 標的化SLAMF7 (CS1/CD319/CRACC) (多発性骨髓腫における使用に承認) ; エナシデニブ (Idhifa) 標的化IDH2 (急性骨髓性白血病における使用に承認) ; エルロチニブ (Tarceva) 標的化EGFR (HER1/ERBB1) (非小細胞肺癌、膵臓癌における使用に承認) ; エベロリムス (Afinitor) 標的化mTOR (膵臓、胃腸、または肺起源の神経内分泌腫瘍、腎細胞癌、切除不可能な上衣下巨細胞性星状細胞腫、乳癌における使用に承認) ; ゲフィチニブ (Iressa) 標的化EGFR (HER1/ERBB1) (非小細胞肺癌における使用に承認) ; イブリツモマブチウキセタン (Zevalin) 標的化CD20 (非ホジキンリンパ腫における使用に承認) ; イブルチニブ (Imbruvica) 標的化BTK (マントル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症における使用に承認) ; イデラリシブ (Zydelig) 標的化PI3K (慢性リンパ性白血病、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫における使用に承認) ; イマチニブ (Gleevec) 標的化KIT、PDGFR、ABL (消化管間質腫瘍 (KIT+)、隆起性皮膚線維肉腫、多発性血液系腫瘍における使用に承認) ; イピリムマブ (Yervoy) 標的化CTLA-4 (黑色腫における使用に承認) ; イキサゾミブ (Ninlaro) 標的化プロテアソーム (多発性骨髓腫における使用に承認) ; ラバチニブ (Tykerb) 標的化HER2 (ERBB2/neu)、EGFR (HER1/ERBB1) (乳癌 (HER2+) における使用に承認) ; レンバチニブ (Lenvima) 標的化VEGFR2 (腎細胞癌、甲状腺癌における使用に承認) ; ミドスタウリン (Rydapt) 標的化FLT3 (急性骨髓性白血病 (FLT3+)) における使用に承認) ; ネシツムマブ (Portrazza) 標的化EGFR (HER1/ERBB1) (扁平上皮非小細胞肺癌における使用に承認) ; ネラチニブ (Nerlynx) 標的化HER2 (ERBB2/neu) (乳癌における使用に承認) ; ニロチニブ (Tasigna) 標的化ABL (慢性骨髓性白血病における使用に承認) ; ニラバリブ (Zejulka) 標的化PARP (卵巣癌、卵管癌、腹膜癌における使用に承認) ; ニボルマブ (Opdivo) 標的化PD-1 (結腸直腸癌、頭頸部扁平上皮細胞癌、ホジキンリンパ腫、黑色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、尿路上皮癌における使用に承認) ; オビヌツズマブ (Gazyva) 標的化CD20 (慢性リンパ性白血病、濾胞性リンパ腫における使用に承認) ; オファツムマブ (Arzerra, HuMax-CD20) 標的化CD20 (慢性リンパ性白血病における使用に承認) ; オラバリブ (Lynparza) 標的化PARP (卵巣癌における使用に承認) ; オララツマブ (Lartruvo) 標的化PDGFR (軟部組織肉腫における使用に承認) ; オシメルチ

10

20

30

40

50

ニブ (Tagrisso) 標的化EGFR (非小細胞肺癌における使用に承認) ; パルボシクリブ (Brance) 標的化CDK4、CDK6 (乳癌における使用に承認) ; パニツムマブ (Vectibix) 標的化EGFR (HER1/ERBB1) (結腸直腸癌における使用に承認) ; パノビノスタット (Farydak) 標的化HDAC (多発性骨髓腫における使用に承認) ; パゾパニブ (Votrient) 標的化VEGFR、PDGF、KIT (腎細胞癌における使用に承認) ; ペムプロリズマブ (Keytruda) 標的化PD-1 (古典的ホジキンリンパ腫、黑色腫、非小細胞肺癌 (PD-L1+))、頭頸部扁平上皮細胞癌、固形腫瘍 (MSI-H) における使用に承認) ; ペルツズマブ (Perejeta) 標的化HER2 (ERBB2/neu) (乳癌 (HER2+)) における使用に承認) ; ポナチニブ (Iclusig) 標的化ABL、FGFR1-3、FLT3、VEGFR2 (慢性骨髓性白血病、急性リンパ球性白血病における使用に承認) ; ラムシルマブ (Cyrامza) 標的化VEGFR2 (結腸直腸癌、胃癌または食道胃接合部 (GEJ) 腺癌、非小細胞肺癌における使用に承認) ; レゴラフェニブ (Stivarga) 標的化KIT、PDGFR、RAF、RET、VEGFR1/2/3 (結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、肝細胞癌腫における使用に承認) ; リボシクリブ (Kisqali) 標的化CDK4、CDK6 (乳癌 (HR+、HER2-)) における使用に承認) ; リツキシマブ (Rituxan、Mabthera) 標的化CD20 (非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、関節リウマチ、多発血管炎性肉芽腫症における使用に承認) ; リツキシマブ/ヒアルロニダーゼヒト (Rituxan Hycela) 標的化CD20 (慢性リンパ性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫における使用に承認) ; ロミデプシン (Istodax) 標的化HDAC (皮膚T細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫における使用に承認) ; ルカパリブ (Rubraca) 標的化PARP (卵巣癌における使用に承認) ; ルキソリチニブ (Jakafi) 標的化JAK1/2 (骨髄線維症における使用に承認) ; シルツキシマブ (Sylvant) 標的化IL-6 (多中心性キャッスルマン病における使用に承認) ; シプロイセルT (Provenge) 標的化 (前立腺癌における使用に承認) ; ソニデギブ (Odomzo) 標的化スムーズンド (基底細胞癌における使用に承認) ; ソラフェニブ (Nexavar) 標的化VEGFR、PDGFR、KIT、RAF (肝細胞癌腫、腎細胞癌、甲状腺癌における使用に承認) ; テムシロリムス (Torisel) 標的化mTOR (腎細胞癌における使用に承認) ; トシツモマブ (Bexxar) 標的化CD20 (非ホジキンリンパ腫における使用に承認) ; トラメチニブ (Mekinist) 標的化MEK (黑色腫、非小細胞肺癌における使用に承認) ; トラスツズマブ (Herceptin) 標的化HER2 (ERBB2/neu) (乳癌 (HER2+))、胃癌 (HER2+) における使用に承認) ; バンデタニブ (Caprelsa) 標的化EGFR (HER1/ERBB1)、RET、VEGFR2 (甲状腺髓様癌における使用に承認) ; ベムラフェニブ (Zelboraf) 標的化BRAF (黑色腫における使用に承認) ; ベネトクラクス (Venclexta) 標的化BCL2 (慢性リンパ性白血病における使用に承認) ; ビスモデギブ (Erivedge) 標的化PTCH、スムーズンド (基底細胞癌における使用に承認) ; ボリノスタット (Zolindra) 標的化HDAC (皮膚T細胞リンパ腫における使用に承認) ; Ziv-Aflibercept (Zaltrap) 標的化PIGF、VEGFA/B (結腸直腸癌における使用に承認) などを含むが、これらに限定されない、がんに対する標的化療法も含む。

【0093】

場合によっては、本開示の方法は、いかなる追加の慣習的な療法もなしで使用することができる（例えば、本明細書に記載の方法が対象の治療に使用される唯一の方法である場合を含む）。例えば、腫瘍学の場合、本明細書に記載の方法は、場合によっては、対象のがんの治療に使用される唯一の方法であり得る。

【0094】

キメラポリペプチド

本開示は、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドを提供する。本開示のキメラポリペプチドは一般に、a) 特異的結合メンバーを含む細胞外ドメインと、b) 1

10

20

30

40

50

つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なN o t c h レセプターポリペプチドと、c) 細胞内ドメインとを含み得る。特異的結合メンバーとその結合パートナーとの結合は一般に、1つ以上のタンパク質分解切断部位でのタンパク質分解により切断可能なN o t c h レセプターの切断を誘導し、それにより細胞内ドメインを放出する。細胞内ドメインの放出は、細胞の活性を調節し得るか、または一般に細胞内に含有されるか、細胞表面上に発現されるか、もしくは分泌される、負荷量の產生を引き起こし得る。本開示のキメラポリペプチドは一般に、N o t c h レセプターポリペプチドに対して異種である（すなわち、N o t c h レセプターに由来しない）少なくとも1つの配列を含む（例えば、細胞外ドメインがN o t c h レセプターポリペプチドに対して異種である場合、細胞内ドメインがN o t c h レセプターポリペプチドに対して異種である場合、細胞外ドメイン及び細胞内ドメインの両方がN o t c h レセプターポリペプチドに対して異種である場合などを含む）。

【0095】

ドメイン、例えば、細胞外ドメイン、N o t c h レセプターポリペプチド制御ドメイン、細胞内ドメインなどは、直接、すなわち、介在アミノ酸残基なしで接合されても、2つのドメインを接合するペプチドリンクターを含んでもよい。ペプチドリンクターは、合成由来または天然由来（例えば、天然に存在するポリペプチドの断片を含む）であり得る。

【0096】

ペプチドリンクターは、例えば、3アミノ酸長～10アミノ酸長、5アミノ酸長～15アミノ酸長、10アミノ酸長～25アミノ酸長、25アミノ酸長～50アミノ酸長、50アミノ酸長～75アミノ酸長、75アミノ酸長～100アミノ酸長、100アミノ酸長～125アミノ酸長、125アミノ酸長～150アミノ酸長、150アミノ酸長～175アミノ酸長、または175アミノ酸長～200アミノ酸長を含むが、これらに限定されない、約3アミノ酸長（aaa）以下～約200酸長以上で変動し得る。ペプチドリンクターは、3アミノ酸長～30アミノ酸長、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30アミノ酸長を有し得る。ペプチドリンクターは、5アミノ酸長～50アミノ酸長、例えば、5アミノ酸長～40アミノ酸長、5アミノ酸長～35アミノ酸長、5アミノ酸長～30アミノ酸長、5アミノ酸長～25アミノ酸長、5アミノ酸長～20アミノ酸長、5アミノ酸長～15アミノ酸長、または5アミノ酸長～10アミノ酸長を有し得る。

【0097】

細胞外ドメイン

本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドは一般に、特異的結合パートナーに特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインを含む。特異的結合メンバーとその特異的結合パートナーとの結合は、N o t c h レセプターポリペプチドのタンパク質分解切断を引き起こし、キメラポリペプチドを発現する細胞の活性を調節する細胞内ドメインを放出する。

【0098】

細胞外ドメインの特異的結合メンバーは一般に、キメラポリペプチドの特異性を決定する。場合によっては、キメラポリペプチドは、その特異的結合メンバーに基づいて決定されるその特異性に従って称され得る。例えば、結合パートナー「X」を有する特異的結合メンバーは、Xキメラポリペプチドまたは抗Xキメラポリペプチドと称され得る。

【0099】

例えば、抗原-抗体対、リガンド受容体対、足場タンパク質対などを含むが、これらに限定されない、任意の簡便な特異的結合対、すなわち、特異的結合メンバー及び特異的結合パートナー対が、本開示のキメラポリペプチドにおいて用途を見出し得る。場合によっては、特異的結合メンバーは抗体であり得、その結合パートナーは抗体が特異的に結合する抗原であり得る。場合によっては、特異的結合メンバーは受容体であり得、その結合パートナーは受容体が特異的に結合するリガンドであり得る。場合によっては、特異的結合

メンバーは足場タンパク質であり得、その結合パートナーは足場タンパク質が特異的に結合するタンパク質であり得る。

【0100】

場合によっては、キメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、抗体である。抗体は、任意の抗原結合抗体系ポリペプチドであることができ、それらは様々なものが当該技術分野において既知である。場合によっては、特異的結合メンバーは、モノクローナル抗体、単鎖Fv (scFv)、Fabなどであるか、またはそれを含む。他の抗体系認識ドメイン (cAb VH (ラクダ類抗体可変ドメイン) 及びヒト化バージョン、IgNAR VH (サメ抗体可変ドメイン) 及びヒト化バージョン、sdAb VH (単一ドメイン抗体可変ドメイン)、ならびに「ラクダ化」抗体可変ドメインの使用が好適である。場合によっては、単鎖TCR (scTv、V V を含有する単鎖2ドメインTCR) などのT細胞受容体 (TCR) 系認識ドメインの使用もまた好適である。

10

【0101】

本開示のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーが抗体系結合メンバーである場合、キメラポリペプチドは、抗体系結合メンバーに対する結合パートナー (例えば、抗体系結合メンバーによって特異的に結合される抗原を含む) の存在下で活性化され得る。場合によっては、抗体系結合メンバーは、関連技術において一般的に行われるよう、抗体系結合メンバーによって結合される抗原に基づいて定義され得る (例えば、抗体系結合メンバーが「抗」抗原抗体、例えば、抗CD19抗体として説明されている場合を含む)。したがって、本開示のキメラポリペプチドに含めるために好適な抗体系結合メンバーは、様々な抗原結合特異性を有し得る。

20

【0102】

場合によっては、抗原結合ドメインは、がん抗原、すなわち、新生物またはがん細胞によって発現される (合成される) 抗原、すなわち、がん細胞関連抗原またはがん (もしくは腫瘍) 特異的抗原に特異的である。

【0103】

がん細胞関連抗原は、例えば、乳癌細胞、B細胞リンパ腫、脾臓癌、ホジキンリンパ腫細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、中皮腫、肺癌細胞 (例えば、非小細胞肺癌細胞)、非ホジキンB細胞リンパ腫 (B-NHL) 細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、中皮腫細胞、肺癌細胞 (例えば、小細胞肺癌細胞)、黒色腫細胞、慢性リンパ性白血病細胞、急性リンパ性白血病細胞、神経芽細胞腫細胞、神経膠腫、膠芽腫、髄芽細胞腫、結腸直腸癌細胞などに関連する抗原であり得る。がん細胞関連抗原はまた、非がん性細胞によっても発現され得る。

30

【0104】

がん細胞特異的抗原は、がん及び/または特定のがん型もしくはがん細胞型 (例えば、乳癌細胞、B細胞リンパ腫、脾臓癌、ホジキンリンパ腫細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、中皮腫、肺癌細胞 (例えば、非小細胞肺癌細胞)、非ホジキンB細胞リンパ腫 (B-NHL) 細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、中皮腫細胞、肺癌細胞 (例えば、小細胞肺癌細胞)、黒色腫細胞、慢性リンパ性白血病細胞、急性リンパ性白血病細胞、神経芽細胞腫細胞、神経膠腫、膠芽腫、髄芽細胞腫、結腸直腸癌細胞などを含む) に特異的な抗原であり得る。がん (または腫瘍) 特異的抗原は一般に、非がん性細胞 (または非腫瘍細胞) によっては発現されない。場合によっては、がん (または腫瘍) 特異的抗原は、1つ以上の非がん性細胞型 (または非腫瘍細胞型) によって最小限で発現され得る。「最小限で発現される」は、1細胞当たりの発現レベルまたは発現する細胞数のいずれかに関する発現レベルが、最小限で、わずかに、または検出不能に特異的結合メンバーと抗原を発現する非がん性細胞との結合をもたらすことを意味する。

40

【0105】

場合によっては、キメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、主要組織適合複合体 (MHC) 分子と組み合わせてタンパク質 (例えば、ペプチド) の断片を含む標的に特異的に結合し得る。MHC分子は、細胞内に発現されるタンパク質及び細胞外に発現されるタ

50

ンパク質の両方のペプチド断片を提示するため、MHC - ペプチド複合体に指向される特異的結合メンバーは、細胞内抗原及び細胞外に発現される抗原の標的化を可能にする。

【0106】

細胞内に発現される標的タンパク質（例えば、細胞質内に発現される（すなわち、細胞質タンパク質）、核内に発現される（すなわち、核タンパク質）など）は、細胞内抗原（例えば、細胞質抗原、核抗原など）と称され得る。したがって、本開示の特異的結合メンバーは、MHCと複合体化した細胞内抗原断片、例えば、ペプチド - MHC複合体（場合によっては、ヒト白血球抗原（HLA） - ペプチド複合体とも記載される）に特異的であり得る。

【0107】

全ての内在細胞タンパク質（宿主または病原体）は、HLA分子に関連して細胞表面上での提示のために短いペプチドへとプロセシングされる。細胞表面上に提示されるペプチド - HLAクラスI複合体は、T細胞媒介免疫応答において重要な役割を果たす。約9残基長のペプチドは、細胞内のプロテアソームによって消化されるタンパク質に起源を持つ。T細胞受容体がペプチドを自己または非自己として認識するかに応じて、免疫応答が開始され得る。がん細胞の表面上に特異的に提示されるペプチド - HLA複合体は、操作されたT細胞または「TCR様」抗体を含む、標的化がん治療薬を開発するための優れた機会を提供する。例えば、MHC系四量体技術を含む様々な技術の出現により、TCR様抗 HLA / ペプチド特異的抗体を開発する能力が進歩している。

10

【0108】

場合によっては、主題のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーの結合パートナーは、ペプチド - MHCまたはHLA / ペプチド複合体を含み得る。場合によっては、主題のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、例えば、HLA - A / ペプチド複合体、HLA - B / ペプチド複合体、またはHLA - C / ペプチド複合体を含む、MHCクラスI MHC - ペプチド複合体に特異的である。場合によっては、主題のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、例えば、HLA - DPA1 / ペプチド複合体、HLA - DPB1 / ペプチド複合体、HLA - DQA1 / ペプチド複合体、HLA - DQB1 / ペプチド複合体、HLA - DRA / ペプチド複合体、またはHLA - DRB1 / ペプチド複合体を含む、MHCクラスII MHC - ペプチド複合体に特異的である。場合によっては、主題のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、MHCクラスII MHC - ペプチド複合体に特異的である。

20

【0109】

ペプチド - MHC結合パートナーは一般に、MHCとの関連で提示される標的タンパク質断片ペプチドを含む。そのようなペプチドのサイズは、例えば、それらが結合しているMHC分子のクラスを含む、多数の要因に応じて変動する。例えば、クラスI MHC関連ペプチドは一般に9アミノ酸長であるが、サイズは変動し得る（例えば、8アミノ酸長または10アミノ酸長を含むが、これらに限定されない、約9アミノ酸長未満または約9アミノ酸長超を含む）。一方で、クラスII MHC関連ペプチドのサイズもまた、例えば、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、20アミノ酸長、21アミノ酸長、22アミノ酸長、23アミノ酸長、24アミノ酸長、または25アミノ酸長を含むが、これらに限定されない、約13アミノ酸長～約25アミノ酸長まで変動し得る。

30

【0110】

ペプチド - MHC複合体を標的化する特異的結合メンバーが指向され得る例示的なタンパク質標的、及び各タンパク質標的のMHCとの関連の例示的なペプチドを、以下の表1に提示する。

40

【0111】

50

【表 1 - 1】

表 1 : 抗ペプチド-MHC 標的

標的	例示的なペプチド	HLA	参考文献
WT1	RMFPNAPYL (配列番号18)	HLA-A2	Leukemia. (2015) 29 (11) : 238-47
KRAS及びKRA S変異体 (例 えば、G12V及 びG12C)	KLVVVGAGGV (配列番号19)、 KLVVVGAVGV (配列番号20)、 KLVVVGACGV (配列番号21)、 KLVVVGADGV (配列番号22)、 VVGAVGVGK (配列番号23)、 VVGACGVGK (配列番号24)、 VVGAGGVGK (配列番号25)	HLA-A 2、 HLA-A3	Proc Natl Acad Sci USA. (2015) 112 (32)
EGFP及びEGF P変異体 (例 えば、L858R)	KITDFGLAK (配列番号26)、 KITDFGRAK (配列番号27)、	HLA-A3	Proc Natl Acad Sci USA. (2015) 112 (32)
PR1／プロテ イナーゼ3	VLQELNVTV (配列番号28)	HLA-A2	Cytotherapy. (2016) 18 (8) : 985-94
MAGE-A1	EADPTGHSY (配列番号29)	HLA-A1	Blood. (2011) 117 (16) : 426 2-4272
MAGE3	FLWGPRALV (配列番号30)	HLA-A2	Eur J Immunol (2005) 35 : 28 64-2875
P53	LLGRNSFEV (配列番号31)、 STTPPPGTRV (配列番号32) RMPEAAPPV (配列番号33) GLAPPQHLIRV (配列番号34)	HLA-A2	Gene Ther. (2001) 8 (21) : 1601-8 PLoS One (2017) 12 : 1-16
MART-1	ELAGIGILTV (配列番号35) EAAGIGILTV (配列番号36)	HLA-A2	Biomark "Med." (2010) 4 (4) : 496-7 Eur J Immunol (2007) 37 : 20 08-2017
gp100	IMDQVPFSV (配列番号37) KTWGQYWQV (配列番号38) YLEPGPVTV (配列番号39) YLEPGPVTA (配列番号40) ITDQVPFSV (配列番号41)	HLA-A2	Biomark "Med." (2010) 4 (4) : 496-7 J Immunol (2002) 169 : 4399-407 米国特許公開第US2003/0223994号 J Immunol (2003) 171 : 2197-2207
CMV pp65	NLVPMVATV (配列番号42)	HLA-A2	Biomark "Med." (2010) 4 (4) : 496-7
HIV Vpr	AIIRILQQL (配列番号43)	HLA-A2	Biomark "Med." (2010) 4 (4) : 496-7
HA-1H	VLHDDLLEA (配列番号44)、	HLA-A2	Biomark "Med." (2010) 4 (4) :

10

20

30

40

【0 1 1 2】

【表 1 - 2】

	VLRDDLLEA (配列番号45)		496-7
NY-ESO-1	SLLMWITQV (配列番号46)	HLA-A2	Gene Ther. (2014) 21 (6) : 575-84
EBNA3C	LLDFVRFMGV (配列番号47)	HLA-A2	Proc Natl Acad Sci USA. (2009) 106 (14) : 5784-8
AFP	FMNKFIYEI (配列番号48)	HLA-A2	Cancer Gene Ther. (2012) 19 (2) : 84-100
Her2	KIFGSLAFL (配列番号49)	HLA-A2	Clin Cancer Res. (2016) pii : clincanres1203. 2016
hCG-ベータ	GVLPALPV (配列番号50) TMTRVLQGV (配列番号51)	HLA-A2	J Natl Cancer Inst. (2013) 105 (3) : 202-18 Vaccine (2008) 26 : 3092-3102
HBV Env183-91	FLLTRILTI (配列番号52)	HLA-A2	J Immunol. (2006) 177 (6) : 4187-95
hTERT	ILAKFLHWL (配列番号53) RLVDDFLLV (配列番号54)	HLA-A2	Cancer Res (2002) 62 : 3184-3194
MUC1	LLLTVLTVV (配列番号55)	HLA-A2	Cancer Res (2002) 62 : 5835-5844
TARP	FLRNFSLML (配列番号56)	HLA-A2	Eur J Immunol (2008) 38 : 1706-1720
チロシナーゼ	YMDGTMSQV (配列番号57)	HLA-A2	J Immunol (2009) 182 : 6328-41
p68	YLLPAIVHI (配列番号58)	HLA-A2	Cancer Immunol Immunother (2010) 59 : 563-573
MIF	FLSELTQQL (配列番号59)	HLA-A2	J Immunol (2011) 186 : 6607
PRAME	ALYVDSLFFL (配列番号60)	HLA-A2	J Clin Invest (2017) 1-14

【0113】

場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、表1の細胞内がん抗原ペプチドを有するペプチド-MHCに特異的に結合する。場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、WT1ペプチド-MHCに特異的に結合する。場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、NY-ESO-1ペプチド-MHCに特異的に結合する。

【0114】

場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、表1の細胞内がん抗原ペプチドを有するペプチド-MHCに特異的に結合する抗体（例えば、scFv）である。場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、WT1ペプチド-MHCに特異的に結合する抗体（例えば、scFv）である。

【0115】

場合によっては、WT1ペプチド-MHCに特異的に結合する抗体は、SYAMS（配列番号61）、QIDPWGQETLYADSVKG（配列番号62）、及びLTGRFDY（配列番号63）の重鎖（VH）CDR配列のうちの1つ以上または全てを含む。

【0116】

10

20

30

40

50

場合によっては、WT 1ペプチド - MHCに特異的に結合する抗体は、R A S Q S I S S Y L N (配列番号 64)、S A S Q L Q S (配列番号 65)、及びQ Q G P G T P N T (配列番号 66)の軽鎖 (VL) CDR配列のうちの1つ以上または全てを含む。

【0117】

場合によっては、WT 1ペプチド - MHCに特異的に結合する抗体は、以下のアミノ酸配列を有するscFvである。

【0118】

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q
A P G K G L E W V S Q I D P W G Q E T L Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K L T G R F D Y W G Q G T L V T V S S G G G
G S G G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q
S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Q L Q S G V P S R F S G S G S
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q G P G T P N T F G Q G T K V E I K
R A (配列番号 67)。

10

【0119】

場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、N Y - E S O - 1ペプチド - MHCに特異的に結合する抗体 (例えば、scFv) である。

【0120】

場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、K R A S - G 1 2 Vペプチド - MHCに特異的に結合する抗体 (例えば、scFv) である (例えば、抗H L A - A 2 / K R A S - G 1 2 V scFv)。

20

【0121】

場合によっては、K R A S - G 1 2 Vペプチド - MHCに特異的に結合する抗体は、以下のアミノ酸配列を有するscFvである。

【0122】

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q Q Y Y Y Y P P T F G Q G T K V E I K R T G G G S G G G G S G
G G A S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I N G S Y I H W
V R Q A P G K G L E W V A Y I D P E T G Y S R Y A D S V K G R F T I S A D T S K
N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R D S A S D A M D V W G Q G T L V T
V S S (配列番号 68)。

30

【0123】

場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、K R A S - G 1 2 V / Cペプチド - MHCに特異的に結合する抗体 (例えば、scFv) である (例えば、抗H L A - A 2 / K R A S - G 1 2 V / C scFv)。

【0124】

場合によっては、K R A S - G 1 2 V / Cペプチド - MHCに特異的に結合する抗体は、以下のアミノ酸配列を有するscFvである。

40

【0125】

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I A C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q Q Y Y Y Y P P T F G Q G T K V E I K R T G G G S G G G G S G
G G A S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F H I N G S Y I H W
V R Q A P G K G L K W V A Y I D P E T G Y S R Y A D S V K G R F A I S A D M S K
N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R D S A S D A M D V W G Q G T L V T
V S S (配列番号 69)。

【0126】

50

場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、EGFR-L858Rペプチド-MHCに特異的に結合する抗体（例えば、scFv）である（例えば、抗HLA-A3/EGFR-L858R scFv）。

【0127】

場合によっては、EGFR-L858Rペプチド-MHCに特異的に結合する抗体は、以下のアミノ酸配列を有するscFvである。

【0128】

DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK
PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQYYSYPPTFGQGTTKVEIKRTGGGSGGGGSG
GGASEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNITSSYIHW
VRQAPGKGLEWVAYISPEDGYARHADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRDDTYYYSA MDVWGQGTL
VTVSS（配列番号70）。

10

【0129】

場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの特異的結合メンバー（例えば、抗体、scFvなど）は、例えば、NLRP4ペプチド（例えば、HLSPIDCEV（配列番号71））-MHC複合体、UMODL1ペプチド（例えば、LTSMWSPAV（配列番号72））-MHC複合体、NLRP4ペプチド（例えば、HLDHPHPAV（配列番号73））-MHC複合体、MAGEC2ペプチド（例えば、SLSVMSNSNV（配列番号74））-MHC複合体、NLRP4ペプチド（例えば、MMAWSDNKI（配列番号75））-MHC複合体、COX7B2ペプチド（例えば、TQIGIEWNL（配列番号76））-MHC複合体、NLRP4ペプチド（例えば、CLFEMQDPA（配列番号77））-MHC複合体、UMODL1ペプチド（例えば、YLSHPSCNV（配列番号78））-MHC複合体、COX7B2ペプチド（例えば、GIEWNLSPV（配列番号79））-MHC複合体、MAGEA11ペプチド（例えば、GLGCSPASI（配列番号80））-MHC複合体、RPE65ペプチド（例えば、RQAFEEFPQI（配列番号81））-MHC複合体、NLRP4ペプチド（例えば、GMWTDTFEF（配列番号82））-MHC複合体、TRIM51ペプチド（例えば、YLNWQDTAV（配列番号83））-MHC複合体、MAGEA11ペプチド（例えば、VLWGPITQI（配列番号84））-MHC複合体、NLRP4ペプチド（例えば、TLDHTGVVV（配列番号85））-MHC複合体、RPE65ペプチド（例えば、TMGVWLHIA（配列番号86））-MHC複合体、MAGEC2ペプチド（例えば、KVWVQGHYL（配列番号87））-MHC複合体、UMODL1ペプチド（例えば、KINCNNFRL（配列番号88））-MHC複合体などを含むが、これらに限定されない、Dhanik et al. BMC Bioinformatics (2016) 17:286に記載のペプチド-MHCに特異的に結合し、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

30

【0130】

例えば、米国特許第6,042,831号、同第6,252,052号、同第6,291,430号、同第6,602,510号、同第7,157,091号、同第7,622,569号、同第7,632,923号、同第7,638,124号、同第7,718,777号、同第8,119,139号、同第8,647,629号、同第8,815,528号、同第8,961,985号、同第9,023,348号、同第9,040,669号、同第9,074,000号、同第9,095,533号、同第9,334,317号、米国特許出願公開第20070092530号、同第20090042285号、同第20090226474号、同第20090304679号、同第20100062001号、同第20100111957号、同第20100158927号、同第20100158931号、同第20110020357号、同第20110033473号、同第20110293623号、同第20110318369号、同第201201415

40

50

17号、同第20120294874号、同第20130101594号、同第20140024809号、同第20140065708号、同第20140271644号、同第20140294841号、同第20140296492号、同第20140363440号、同第20150125477号、同第20150125478号、同第20150259436号、同第20150320848号、同第20150322154号、同第20150368298号、同第20160017031号、同第20160168200号、PCT公開第WO2002014870号、同第WO2003068201号、同第WO2005120166号、同第WO2007030451号、同第WO2007143104号、同第WO2008120202号、同第WO2008120203号、同第WO2009108372号、同第WO2009125394号、同第WO2009125395号、同第WO2009138236号、同第WO2010037514号、同第WO2010106431号、同第WO2011062560号、同第WO2012007950号、同第WO2012007951号、同第WO2012017003号、同第WO2012109659号、同第WO2012135854号、同第WO2014011489号、同第WO2014143835号、同第WO2015018805号、同第WO2015063302号、同第WO2015070061号、同第WO2015070078号、同第WO2015090229号、同第WO2015130766号、同第WO2015142675号、同第WO2015169945号、同第WO2015193359号、同第WO2015199617号、同第WO2016102272号などに記載の、例えば、好適な抗ペプチド-MHC結合メンバー及び抗体、ならびにそれらの好適なエピトープに対する抗体を含むが、これらに限定されない、任意の好適な抗ペプチド-MHC特異的結合メンバー（例えば、抗ペプチド-MHC抗体）が、本明細書に記載の主題のキメラポリペプチドの細胞外ドメインの特異的結合メンバーとして用途を見出すことができ、これらの開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0131】

場合によっては、本明細書に記載の主題のキメラポリペプチドの細胞外ドメインの特異的結合メンバーとして用途を見出しえる抗ペプチド-MHC特異的結合メンバー（例えば、抗ペプチド-MHC抗体）としては、例えば、T Cells Expressing Cars Directed Against HLA-0201 eRmf WT-1 Peptide Complex Can Effectively Eradicate WT1+A0201+Tumor Cells in-Vitro. (2014) Biol Blood Marrow Transplant, A novel TCR-like CAR with specificity for PR1/HLA-A2 effectively targets myeloid leukemia in vitro when expressed in human adult peripheral blood and cord blood T cells. (2016) Cytotherapy, Functional Comparison of Engineered T Cells Carrying a Native TCR versus TCR-like Antibody-Based Chimeric Antigen Receptors Indicates Affinity/Avidity Thresholds. (2014) Journal of Immunology, Affinity maturation of T-cell receptor-like antibodies for Wilms tumor 1 peptide greatly enhances therapeutic potential. (2015) Leukemia, Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. (2014) Gene Therapy, Targeting the Intracellular WT1 Oncogene Product with a Therapeutic Human Antibody. (2015) Journal of Immunotherapy, A novel T-cell receptor-like antibody specific for WT1 on WT1-expressing tumor cells.

2013) *Science Translational Medicine*、A phage display selected Fab fragment with MHC class I-restricted specificity for MAGE-A1 allows for retargeting of primary human T lymphocytes. (2001) *Gene Therapy*、Therapeutic bispecific T-cell engager antibody targeting the intracellular oncoprotein WT1. (2015) *Nature Biotechnology*、Generation of MANAbodies specific to HLA-restricted epitopes encoded by somatically mutated genes. (2015) *PNAS*、Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody targeting Major Histocompatibility complex class i-Her2 Peptide complexes. (2013) *Journal of the National Cancer Institute*、Anti-melanoma activity of T cells redirected with a TCR-like chimeric antigen receptor. (2014) *Scientific Reports* などに記載の、例えば、好適な抗ペプチド-MHC結合メンバー及び抗体、ならびにそれらの好適なエピトープに対する抗体を挙げができるが、これらに限定されない。

【0132】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、例えば、Dahan & Reiter. *Expert Rev Mol Med.* (2012) 14: e6 及び/または Cohen & Reiter. *Antibodies* (2013), 2: 517-534 に記載のもの（例えば、クローン G2D12 標的化 HLA-A2 / gp100-154；クローン 1A7 標的化 HLA-A2 / gp100-209；クローン G1 標的化 HLA-A2 / gp100-209；クローン 2F1 標的化 HLA-A2 / gp100-280；クローン TA2 標的化 HLA-A2 / チロシナーゼ-369；クローン CAG10、CLA12 標的化 HLA-A2 / MART-1-26；クローン Fab-G8 標的化 HLA-A1 / MAGE-A1；クローン Fab-Hyb3 標的化 HLA-A1 / MAGE-A1；クローン 7D4 標的化 HLA-A2 / MAGE3-271；クローン RL6A 標的化 HLA-A2 / p68 RNA ヘリカーゼ-128；クローン 3M4E5、3M4F4 標的化 HLA-A2 / NYESO-1-157；クローン T1 標的化 HLA-A2 / NYESO-1-157；クローン D2 標的化 HLA-A2 / TARP-29；クローン RL4B、1B10 標的化 HLA-A2 / hCG-47；クローン 3F9 標的化 HLA-A2 / hCG-40；クローン 1B8 標的化 HLA-A2 / Her2-369；クローン 8F4 標的化 HLA-A2 / PR1；クローン F2 標的化 HLA-A2 / WT1-db126；クローン M3A1、M3B8 標的化 HLA-A2 / MUC-1-D6-13；クローン 4A9、4G9 標的化 HLA-A2 / テロメラーゼ-540；クローン 3G3、3H2 標的化 HLA-A2 / テロメラーゼ-865；クローン T3A4、T3D4、T3E3、T3F2、T3D3、T2H9 標的化 HLA-A2 / TAX-11；クローン M1-D1、M1-G8、M1-D12、M1-A2 標的化 HLA-A2 / M1-58；クローン 標的化 HLA-A2 / ENV-183；クローン C3 標的化 HLA-C7/Nef-105；クローン 4F7 標的化 HLA-A2 / eIF4G-720；クローン scFv3、scFv27 標的化 HLA-A24 / Nef-138；クローン H9 標的化 HLA-A2 / pp65-495などを含むが、これらに限定されない）を含むが、これらに限定されない、T 細胞受容体様抗ペプチド-MHC 抗体を含み得、これらの開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0133】

本明細書に記載のペプチド-MHC 結合パートナーに加えて、またはそれと引き換えに、本開示のキメラポリペプチドは、場合によっては、表面発現抗原を標的化することができる。

10

20

30

40

50

きる。本明細書で使用される場合、「表面発現抗原」という用語は一般に、タンパク質の少なくとも一部分が細胞の外側に曝露され、結合パートナーとの結合に利用可能となるよう、少なくとも部分的に細胞外に発現される抗原タンパク質を指す。本質的に、任意の表面発現タンパク質が、本開示のキメラポリペプチドの標的として用途を見出し得る。表面発現抗原の非限定的な例としては、例えば、CD19、CD20、CD30、CD38、Her2/neu、ERBB2、CA125、MUC-1、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、CD44表面上接着分子、メソテリン、癌胎児抗原(CEA)、上皮成長因子受容体(EGFR)、EGFRvIII、血管内皮増殖因子受容体2(VEGFR2)、高分子量-黒色腫関連抗原(HMW-MAA)、IL-13R-a2、GD2などが挙げられるが、これらに限定されない。標的化され得る表面発現抗原としては、例えば、慣習的ながん療法において特異的に標的化されるもの(例えば、本明細書に記載の標的化がん治療薬の標的を含む)もまた挙げられるが、これらに限定されない。

【0134】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、がん関連抗原を標的化することができる。場合によっては、本開示の特異的結合メンバーは、がん関連抗原に特異的な抗体を含み得る。がん関連抗原の非限定的な例としては、例えば、CD19、CD20、CD38、CD30、Her2/neu、ERBB2、CA125、MUC-1、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、CD44表面上接着分子、メソテリン、癌胎児抗原(CEA)、上皮成長因子受容体(EGFR)、EGFRvIII、血管内皮増殖因子受容体2(VEGFR2)、高分子量-黒色腫関連抗原(HMW-MAA)、MAGE-A1、IL-13R-a2、GD2などが挙げられるが、これらに限定されない。がん関連抗原としては、例えば、4-1BB、5T4、腺癌抗原、アルファ-胎児タンパク質、BAFF、Bリンパ腫細胞、C242抗原、CA-125、炭酸脱水酵素9(CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IGE受容体)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNTO888、CTLA-4、DRS、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、フィブロネクチンエクストラドメインB、葉酸受容体1、GD2、GD3ガングリオシド、糖タンパク質75、GPNMB、HER2/neu、HGF、ヒト散乱係数受容体キナーゼ、IGF-1受容体、IGF-I、IGG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン51、インテグリンv3、MORAb-009、MS4A1、MUC1、ムチンCanAg、N-グリコリルノイラミン酸、NPC-1C、PDGF-R、PDL192、ホスファチジルセリン、前立腺癌細胞、RANKL、RON、ROR1、SCH900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、テネイシンC、TGFベータ2、TGF-、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、VEGFA、VEGFR-1、VEGFR2、及びビメンチンも挙げられる。

【0135】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーは、例えば、Tamura et al. (JCI Insight. 2016; 1(9): e87607)に記載のPRL3-ズマブなどの、再生肝ホスファターゼ3(PRL-3、PTP4A3としても知られる)を標的化する抗体の全部または一部を標的化しても、それを含んでもよく、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0136】

場合によっては、キメラポリペプチドの細胞外ドメインは、1つの特異的結合メンバーのみを含み得る。場合によっては、キメラポリペプチドの細胞外ドメインは、単一特異性であり得る。

【0137】

場合によっては、キメラポリペプチドの細胞外ドメインは、多特異的(例えば、二重特異的を含む)であり得る。場合によっては、キメラポリペプチドの二重特異性細胞外ドメ

インは、二重特異性キメラ結合メンバーまたはその一部分（例えば、二重特異性抗体を含むが、これに限定されない、例えば、本明細書に記載のものを含む）を含み得る。場合によっては、二重特異性細胞外ドメインは、互いに連結される（例えば、直接連結を含む）か、またはリンカーを介して連結される、2つの特異的結合ドメインを含み得る。

【0138】

場合によっては、キメラポリペプチドの細胞外ドメインは、2つ以上の特異的結合メンバーを含む2つ以上の特異的結合メンバーを含んでもよく、これには、2つ以上の特異的結合メンバーが互いに連結（直接的もしくは間接的（例えば、リンカーの使用を通して）のいずれか）されても、またはそれらの各々がキメラポリペプチドの別の構成要素に連結（直接的もしくは間接的（例えば、リンカーの使用を通して）のいずれか）されてもよい、2つ以上の特異的結合メンバーが含まれる。

10

【0139】

多特異的細胞外ドメインは、任意の組み合わせの結合パートナーを認識するか、またはそれに結合することができ、したがって、例えば、本明細書に記載の結合パートナー及び標的を含むが、これらに限定されない、任意の組み合わせの標的を標的化することができる。したがって、例えば、二重特異性細胞外ドメインは、例えば、2つの異なる細胞内抗原、2つの異なる細胞外（例えば、表面発現）抗原、または細胞内抗原及び細胞外（例えば、表面発現）抗原を含むが、これらに限定されない、2つの異なる抗原を標的化することができる。場合によっては、二重特異性細胞外ドメインは、例えば、各々が抗原（例えば、本明細書に記載の抗原を含む）に結合する本明細書に記載の2つの特異的結合メンバーを含む、2つの特異的結合メンバーを含み得る。

20

【0140】

多特異的細胞外ドメインの特異的結合ドメインは各々、それらが一部分をなすキメラポリペプチドを活性化し得る。二重特異性細胞外ドメインの特異的結合ドメインは各々、それらが一部分をなすキメラポリペプチドを活性化し得る。場合によっては、多特異的または二重特異的結合ドメインは、本明細書に記載の分子回路の一部分として（例えば、本明細書に記載の回路のORゲートとして）用途を見出し得る。

30

【0141】

場合によっては、特異的結合ドメインによって結合される結合パートナーは、野生型結合パートナーと比較して、変異していてもよい。場合によっては、変異結合パートナーを認識する特異的結合ドメインは、野生型結合パートナーに特異的に結合しなくてもよい。場合によっては、変異結合パートナーを認識する特異的結合ドメインは、変異結合パートナーとのその結合親和性と比較して、より低い親和性で野生型結合パートナーに特異的に結合してもよい。

【0142】

任意の結合パートナー（例えば、本明細書に記載のものを含む）は変異していても、変異結合パートナーであってもよい。したがって、本開示のキメラポリペプチドは、変異（すなわち、非野生型）結合パートナーに特異的に結合する特異的結合メンバーを含み得る。変異結合パートナーの非限定的な例としては、例えば、変異抗原、変異がん抗原、変異自己抗原、変異細胞外抗原、変異細胞外がん抗原、変異細胞外自己抗原、変異表面抗原、変異表面がん抗原、変異表面自己抗原、変異抗原ペプチドを提示するペプチド-MHC複合体、変異がん抗原ペプチドを提示するペプチド-MHC複合体、変異自己抗原ペプチドを提示するペプチド-MHC複合体などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0143】

がんは一般に、その疾患に関連する変異タンパク質に関与する。がんにおいて一般に変異される遺伝子としては、例えば、ABI1、ABL1、ABL2、ACKR3、ACS L3、ACSL6、AFF1、AFF3、AFF4、AKAP9、AKT1、AKT2、ALDH2、ALK、AMER1、APC、ARHGAP26、ARHGEF12、ARID1A、ARID2、ARNT、ASPSCR1、ASXL1、ATF1、ATIC、ATM、ATP1A1、ATP2B3、ATRX、AXIN1、BAP1、BCL10、

50

BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL3, BCL6, BCL7A, BCL9, BCOR, BCR, BIRC3, BLM, BMPR1A, BRAF, BRCA1, BRC A2, BRD3, BRD4, BRIP1, BTG1, BUB1B, C15orf65, C2orf44, CACNA1D, CALR, CAMTA1, CANT1, CARD11, CARS, CASC5, CASP8, CBFA2T3, CBFB, CBL, CBLB, CBL-C, CCDC6, CCNB1IP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD274, CD74, CD79A, CD79B, CDC73, CDH1, CDH11, CDK12, CDK4, CDK6, CDKN2A, CDKN2C, CDX2, CE BPA, CEP89, CHCHD7, CHEK2, CHIC2, CHN1, CIC, CIITA, CLIP1, CLP1, CLTC, CLTCL1, CNBP, CNOT3, CNTRL, COL1A1, COL2A1, COX6C, CREB1, CREB3L1, CREB3L2, CREBBP, CRLF2, CRTCA1, CRTCA3, CSF3R, CTNB1, CUX1, CYLD, DAXX, DCTN1, DDB2, DDIT3, DDX10, DDX5, DDX6, DEK, DICER1, DNM2, DNMT3A, EBF1, ECT2L, EGFR, EIF3E, EIF4A2, ELF4, ELK4, ELL, ELN, EML4, EP300, EPS15, ERBB2, ERC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EWSR1, EXT1, EXT2, EZH2, EZR, FAM46C, FANCA, FANC C, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FAS, FBXO11, FBXW7, FCGR2B, FCRL4, FEV, FGFR1, FGFR10P, FGFR2, FGFR3, FH, FHIT, FIP1L1, FLCN, FLI1, FLT3, FNBP1, FOXA1, FOXL2, FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXP1, FSTL3, FUBP1, FUS, GAS7, GATA1, GATA2, GATA3, GMPS, GNA11, GNAQ, GNAS, GOLGA5, GOPC, GPC3, GPHN, H3F3A, H3F3B, HERPUD1, HEY1, HIP1, HIST1H4I, HLA-A, HLF, HMGA1, HMGA2, HNF1A, HNRNPA2B1, HOOK3, HOXA11, HOXA13, HOXA9, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13, HRAS, HSP90AA1, HSP90AB1, IDH1, IDH2, IKZF1, IL2, IL21R, IL6ST, IL7R, IRF4, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, JAZF1, JUN, KAT6A, KAT6B, KCNJ5, KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KDSR, KIAA1549, KIAA1598, KIF5B, KIT, KLF4, KLF6, KLK2, KMT2A, KMT2C, KMT2D, KRAS, KTN1, LASP1, LCK, LCP1, LHF P, LIFR, LMNA, LMO1, LMO2, LPP, LRIG3, LSM14A, LY1, MAF, MAFB, MALT1, MAML2, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAX, MDM2, MDM4, MECOM, MED12, MEN1, MET, MITF, MKL1, MLF1, MLH1, MLLT1, MLLT10, MLLT11, MLLT3, MLLT4, MLLT6, MN1, MNX1, MPL, MSH2, MSH6, MSI2, MSN, MTCP1, MUC1, MUTYH, MYB, MYC, MYCL, MYCN, MYD88, MYH11, MYH9, MYO5A, NAB2, NACA, NBN, NCKIPSD, NCOA1, NCOA2, NCOA4, NDRG1, NF1, NF2, NFATC2, NFE2L2, NFIB, NFKB2, NIN, NKX2-1, NOON, NOTCH1, NOTCH2, NPM1, NR4A3, NRAS, NRG1, NSD1, NT5C2, NTRK1, NTRK3, NUMA1, NUP214, NUP98, NUTM1, NUTM2A, NUTM2B, OLIG2, OMD, P2RY8, PAFAH1B2, PALB2, PATZ1, PAX3, PAX5, PAX7, PAX8, PRM1, PBX1, PCM1, PCSK7, PDCD1LG2, PDE4DIP, PDGF B, PDGFRA, PDGFRB, PER1, PHF6, PHOX2B, PIICALM, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PLAG1, PLCG1, PML, PMS1, PMS2, POT1, POU2AF1, POU5F1, PPARG, PPFIBP1, 10 20 30 40 50

PPP2R1A、PRCC、PRDM1、PRDM16、PRF1、PRKAR1A、PRRX1、PSIP1、PTCH1、PTEN、PTPN11、PTPRB、PTPRC、PTPRK、PWWP2A、RABEP1、RAC1、RAD21、RAD51B、RAF1、RALGDS、RANBP17、RAP1GDS1、RARA、RB1、RBM15、RECQL4、REL、RET、RHOH、RMI2、RNF213、RNF43、ROS1、RPL10、RPL22、RPL5、RPN1、RSPO2、RSPO3、RUNX1、RUNX1T1、SBDS、SDC4、SDHAF2、SDHB、SDHC、SDHD、SEPT5、SEPT6、SEPT9、SET、SETBP1、SETD2、SF3B1、SFPQ、SH2B3、SH3GL1、SLC34A2、SLC45A3、SMAD4、SMARCA4、SMARCB1、SMARCE1、SMO、SOCS1、SOX2、SPECC1、SRGAP3、SRSF2、SRSF3、SS18、SS18L1、SSX1、SSX2、SSX2B、SSX4、SSX4B、STAG2、STAT3、STAT5B、STAT6、STIL、STK11、SUFU、SUZ12、SYK、TAF15、TAL1、TAL2、TBL1XR1、TCEA1、TCF12、TCF3、TCF7L2、TCL1A、TERT、TET1、TET2、TFE3、TFEB、TFG、TFPT、TFRC、THRAP3、TLX1、TLX3、TMPRSS2、TNFAIP3、TNFRSF14、TNFRSF17、TOP1、TP53、TPM3、TPM4、TPR、TRAF7、TRIM24、TRIM27、TRIM33、TRIP11、TRRAP、TSC1、TSC2、TSHR、TTL、U2AF1、UBR5、USP6、VHL、VTI1A、WAS、WHSC1、WHSC1L1、WIF1、WRN、WT1、WWTR1、XPA、XPC、XPO1、YWHAE、ZBTB16、ZCCHC8、ZMYM2、ZNF331、ZNF384、ZNF521、及びZRSR2が挙げられる。場合によっては、特異的結合メンバーは、例えば、上記に列挙されるものを含むが、これらに限定されない、がんにおいて一般に変異される遺伝子の変異バージョンに結合する。場合によっては、特異的結合メンバーは、例えば、上記に列挙されるものを含むが、これらに限定されない、がんにおいて一般に変異される遺伝子の変異バージョンに由来する変異がん抗原ペプチドを提示するペプチド-MHC複合体に結合する。場合によっては、特異的結合メンバーは、変異K-RASペプチドを提示するペプチド-MHC複合体に結合する。

【0144】

場合によっては、結合パートナー／特異的結合メンバー対は、直交化され得る。本明細書で使用される場合、「直交化」は、それらの元来の形態または野生型の形態から修飾されることで、直交対が互いに特異的に結合するが、その対の非修飾構成要素または野生型構成要素には特異的または実質的に結合しないことを意味する。例えば、本明細書に記載の結合パートナー／特異的結合対を含むが、これらに限定されない、いずれの結合パートナー／特異的結合対が直交化されてもよい。

【0145】

本明細書に記載のキメラポリペプチドならびに方法及び回路における使用に適合され得る、特定の細胞外ドメイン及びそれらの構成要素としては、例えば、PCT出願第U.S.2016/019188号（公開第WO2016/138034号）に記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0146】

Notchレセプターポリペプチド

上記のように、本開示のキメラポリペプチドは、Notchレセプターポリペプチドを含む。主題のキメラポリペプチドのNotchレセプターポリペプチドの長さは変動し、約50アミノ酸長以下～約1000アミノ酸長以上の範囲であってもよく、一般に1つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む。Notchレセプターポリペプチドは、Notch制御領域またはその修飾形態を含む合成受容体を含む。

【0147】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペ

10

20

30

30

40

50

プチドは、50アミノ酸長（aa）～1000アミノ酸長、例えば、50アミノ酸長～75アミノ酸長、75アミノ酸長～100アミノ酸長、100アミノ酸長～150アミノ酸長、150アミノ酸長～200アミノ酸長、200アミノ酸長～250アミノ酸長、250アミノ酸長～300アミノ酸長、300アミノ酸長～350アミノ酸長、350アミノ酸長～400アミノ酸長、400アミノ酸長～450アミノ酸長、450アミノ酸長～500アミノ酸長、500アミノ酸長～550アミノ酸長、550アミノ酸長～600アミノ酸長、600アミノ酸長～650アミノ酸長、650アミノ酸長～700アミノ酸長、700アミノ酸長～750アミノ酸長、750アミノ酸長～800アミノ酸長、800アミノ酸長～850アミノ酸長、850アミノ酸長～900アミノ酸長、900アミノ酸長～950アミノ酸長、または950アミノ酸長～1000アミノ酸長を有する。場合によつては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、300アミノ酸長～400アミノ酸長を有する。場合によつては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、300アミノ酸長～350アミノ酸長を有する。場合によつては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、300アミノ酸長～325アミノ酸長を有する。場合によつては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、350アミノ酸長～400アミノ酸長を有する。場合によつては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、310アミノ酸長～320アミノ酸長、例えば、310アミノ酸長、311アミノ酸長、312アミノ酸長、313アミノ酸長、314アミノ酸長、315アミノ酸長、316アミノ酸長、317アミノ酸長、318アミノ酸長、319アミノ酸長、または320アミノ酸長を有する。場合によつては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、315アミノ酸長を有する。場合によつては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、360アミノ酸長～370アミノ酸長、例えば、360アミノ酸長、361アミノ酸長、362アミノ酸長、363アミノ酸長、364アミノ酸長、365アミノ酸長、366アミノ酸長、367アミノ酸長、368アミノ酸長、369アミノ酸長、または370アミノ酸長を有する。場合によつては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、367アミノ酸長を有する。

【0148】

場合によつては、Notchレセプターポリペプチドは、例えば、配列番号1、2、及び5～15のいずれかを含むNotchレセプターのアミノ酸配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によつては、NotchレセプターポリペプチドのNotch制御領域は、例えば、マウスNotch（例えば、マウスNotch1、マウスNotch2、マウスNotch3、もしくはマウスNotch4）制御領域、ラットNotch制御領域（例えば、ラットNotch1、ラットNotch2、もしくはラットNotch3）、ヒトNotch制御領域（例えば、ヒトNotch1、ヒトNotch2、ヒトNotch3、もしくはヒトNotch4）などを含むが、これらに限定されない、哺乳動物Notch制御領域であるか、または哺乳動物Notch制御領域に由来し、かつ例えば、配列番号1、2、及び5～15のいずれかを含む哺乳動物Notchレセプターアミノ酸配列の哺乳動物Notch制御領域のアミノ酸配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%のアミノ酸配列同一性を有するNotch

10

20

30

40

50

ch制御領域である。

【0149】

主題のNotch制御領域は、それらの様々な構成要素（例えば、ドメイン、切断部位など）を含んでも、除外してもよい。必要に応じて全体的または部分的に存在しても、不在でもよいNotch制御領域のそのような構成要素の例としては、例えば、1つ以上のEGF様反復ドメイン、1つ以上のLin12/Notch反復ドメイン、1つ以上のヘテロ二量体化ドメイン（例えば、HD-NもしくはHD-C）、膜貫通ドメイン、1つ以上のタンパク質分解切断部位（例えば、フューリン様プロテアーゼ部位（例えば、S1部位）、ADAM-ファミリープロテアーゼ部位（例えば、S2部位）、及び/またはガンマ-セクレターゼプロテアーゼ部位（例えば、S3部位））などが挙げられる。Notchレセプターポリペプチドは、場合によっては、例えば、デルタ結合ドメインなどのNotchリガンド結合ドメインを含む、1つ以上のNotch細胞外ドメインの全部または一部を除外してもよい。Notchレセプターポリペプチドは、場合によっては、例えば、デルタ結合ドメインなどのNotchリガンド結合ドメインを含む、1つ以上のNotch細胞外ドメインの1つ以上の非機能性バージョンを含んでもよい。Notchレセプターポリペプチドは、場合によっては、例えば、NotchRbp関連分子ドメイン（すなわち、RAMドメイン）、Notchアンキリン反復ドメイン、Notchトランス活性化ドメイン、NotchPESTドメインなどを含む、1つ以上のNotch細胞内ドメインの全部または一部を除外してもよい。Notchレセプターポリペプチドは、場合によっては、例えば、非機能性NotchRbp関連分子ドメイン（すなわち、RAMドメイン）、非機能性Notchアンキリン反復ドメイン、非機能性Notchトランス活性化ドメイン、非機能性NotchPESTドメインなどを含む、1つ以上のNotch細胞内ドメインの1つ以上の非機能性バージョンを含んでもよい。

10

20

30

40

【0150】

TMドメインを含むNotchレセプターポリペプチド

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、以下のアミノ酸配列、I P Y K I E A V K S E P V E P P L P S Q L H L M Y V A A A A F V L L F F V G C G V L L S R K R R Q L C I Q K L（配列番号89）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、式中、TMドメインには下線が引かれ、NotchレセプターポリペプチドはS2タンパク質分解切断部位及びS3タンパク質分解切断部位を含み、Notchレセプターポリペプチドは50アミノ酸長（aa）～65アミノ酸長、例えば、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、または65アミノ酸長を有する。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、以下のアミノ酸配列、I P Y K I E A V K S E P V E P P L P S Q L H L M Y V A A A A F V L L F F V G C G V L L S R K R R Q L C I Q K L（配列番号89）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、式中、TMドメインには下線が引かれ、NotchレセプターポリペプチドはS2タンパク質分解切断部位及びS3タンパク質分解切断部位を含み、Notchレセプターポリペプチドは56アミノ酸長を有する。

【0151】

LNRセグメント、HD-Nセグメント、HD-Cセグメント、及びTMドメインを含むNotchレセプターポリペプチド

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) LNR-Aセグメント、ii) LNR-Bセグメント、iii) LNR-Cセグメント、iv) HD-Nセグメント、v) HD-Cセグメント、及びvi) TMドメインを含む。LNR-Aセグメント、LNR-Bセグメント

50

、及びLNR-Cセグメントは合わせて、「LNRセグメント」と称され得る。そのようなNotchレセプターポリペプチドを、図30Aに模式的に示す。

【0152】

LNRセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1442～1562、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ90アミノ酸長～150アミノ酸長、例えば、90アミノ酸長（aa）～100アミノ酸長、100アミノ酸長～110アミノ酸長、110アミノ酸長～120アミノ酸長、120アミノ酸長～130アミノ酸長、130アミノ酸長～140アミノ酸長、または140アミノ酸長～150アミノ酸長を有し得る。場合によっては、LNRセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1442～1562、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ115アミノ酸長～125アミノ酸長、例えば、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、または125アミノ酸長を有する。

10

【0153】

LNRセグメントは、以下のアミノ酸配列、PPQIEEACELPPECQVDAGNKVCNLQCNNHACGWDGGSDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSQCNSAGCLFDGFDCQLTEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHCQGCGNSAECEWDGGLDC（配列番号90）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ118～122アミノ酸長（例えば、118、119、120、121、または122アミノ酸長）を有し得る。

20

【0154】

HD-Nセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1563～1664、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ90アミノ酸長（aa）～110アミノ酸長、例えば、90アミノ酸長～95アミノ酸長、95アミノ酸長～100アミノ酸長、100アミノ酸長～105アミノ酸長、または105アミノ酸長～110アミノ酸長を有し得る。場合によっては、HD-Nセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1563～1664、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ95アミノ酸長～105アミノ酸長、例えば、95、96、98、98、99、100、101、102、103、104、または105アミノ酸長を有する。

30

【0155】

HD-Cセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1665～1733、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ60アミ

40

50

ノ酸長 (a a) ~ 8 0 アミノ酸長、例えば、6 0 アミノ酸長 ~ 6 5 アミノ酸長、6 5 アミノ酸長 ~ 7 0 アミノ酸長、7 0 アミノ酸長 ~ 7 5 アミノ酸長、または7 5 アミノ酸長 ~ 8 0 アミノ酸長を有し得る。場合によっては、HD - C セグメントは、図 3 1 A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1 6 6 5 ~ 1 7 3 3、または別の N o t c h レセプターポリペプチドの対応するセグメント (対応するセグメントの例は図 3 1 B ~ 3 1 G に示す) と少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ 6 5 アミノ酸長 ~ 7 5 アミノ酸長、例えば、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、または 7 5 アミノ酸長を有する。

【 0 1 5 6 】

HD セグメント (HD - N プラス HD - C) は、以下のアミノ酸配列、A A G T L V L V V L L P P D Q L R N N S F H F L R E L S H V L H T N V V F K R D A Q G Q Q M I F P Y Y G H E E E L R K H P I K R S T V G W A T S S L L P G T S G G R Q R R E L D P M D I R G S I V Y L E I D N R Q C V Q S S S Q C F Q S A T D V A A F L G A L A S L G S L N I P Y K I E A V K S E P V E P P L P (配列番号 9 1) と少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ 1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、または 1 5 4 アミノ酸長を有し得る。

【 0 1 5 7 】

膜貫通セグメントは、図 3 1 A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1 7 3 6 ~ 1 7 5 6、または別の N o t c h レセプターポリペプチドの対応するセグメント (対応するセグメントの例は図 3 1 B ~ 3 1 G に示す) と少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ 1 5 アミノ酸長 (a a) ~ 2 5 アミノ酸長、例えば、1 5、1 6、1 7、1 8、2 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、または 2 5 アミノ酸長を有し得る。

【 0 1 5 8 】

膜貫通セグメントは、以下のアミノ酸配列、H L M Y V A A A A F V L L F F V G C G V L L S (配列番号 9 2) と少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ 2 1、2 2、2 3、2 4、または 2 5 アミノ酸長を有し得る。

【 0 1 5 9 】

場合によっては、N o t c h レセプターポリペプチドは、約 3 1 0 アミノ酸長 (a a) ~ 約 3 2 0 アミノ酸長 (例えば、3 1 0 アミノ酸長、3 1 1 アミノ酸長、3 1 2 アミノ酸長、3 1 3 アミノ酸長、3 1 4 アミノ酸長、3 1 5 アミノ酸長、3 1 6 アミノ酸長、3 1 7 アミノ酸長、3 1 8 アミノ酸長、3 1 9 アミノ酸長、または 3 2 0 アミノ酸長) を有し、かつ図 3 1 A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1 4 4 2 ~ 1 7 5 6、または別の N o t c h レセプターポリペプチドの対応するセグメント (対応するセグメントの例は図 3 1 B ~ 3 1 G に示す) と少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 1 6 0 】

場合によっては、N o t c h レセプターポリペプチドは、以下のアミノ酸配列、P P Q I E E A C E L P E C Q V D A G N K V C N L Q C N N H A C G W D G G D C S L N F N D P W K N C T Q S L Q C W K Y F S D G H C D S Q C N S A G C L F D G F D C Q L T E G Q C N P L Y D Q Y C K D H F S D G H C D Q G C N S A E C E W D G L D C A E H V P E R L A A G T L V L V V L L P P D Q L R N N S F H F L R E L S H V L H T N V V F K R D A Q G Q Q M I F P Y Y G H E E E L R K H P I K R S T V G W A T S S L L

10

20

30

40

50

PGTSGGRQRRELDPMDIRGSIVYLEIDNRQCVQSSSQCFQ
 SATDVAAFLGALASLGSLNIPYKIEAVKSEPVEPPLPSQL
 HLMYVAAAAFVLFFVGCGVLLS (配列番号93)と少なくとも50%
 、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ300アミノ酸長～310アミノ酸長(例えば、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、または310アミノ酸長)を有する。

【0161】

10

場合によっては、Notchレセプターポリペプチドは、以下のアミノ酸配列、PCV
 GSNPCYNQGTCEPTSENPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSF
 TGGAGRDI PPPQIEEACELPPECQVDAGNKVCNLCQCNNHAC
 GWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSQCN
 GCLFDGFDCAQLEEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHC
 DQGCNSA
 EC EWDG LDCAEHVPERLAAGTLVVLVLLPPDQLRNNSFHF
 LREL SHVLHTNVVFKRDAQGQQMIFPYYGHEEELRKHPIK
 RSTVGWATSSLLPGTSGGRQRRELDPMDIRGSIVYLEIDN
 RQCVQSSSQCFQSATDVAAFLGALASLGSLNIPYKIEAVK
 SEPVEPPLPSQLHLMYVAAAAFVLFFVGCGVLLS (配列番号
 94)と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、
 少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも
 90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の
 アミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ350アミノ酸長～370アミ
 ノ酸長(例えば、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、または370アミノ酸長)を有する。

20

【0162】

単一EGF反復、LNRセグメント、HD-Nセグメント、HD-Cセグメント、及びTMドメインを含むNotchレセプターポリペプチド

30

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペ
 ッチドは、N末端からC末端の順で、i) 単一EGF反復、ii) LNRセグメント、ii
 i) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。
 そのようなNotchレセプターポリペプチドを、図30Bに模式的に示す。

【0163】

EGF反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1390～1430、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、
 少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35アミノ酸長(aa)～45アミノ酸長(例えば、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、または45アミノ酸長)を有し得る。

40

【0164】

EGF反復は、以下の配列、PCVGSNPCYNQGTCEPTSENPFYRCL
 CPAKFNGLLCH (配列番号95)と少なくとも75%、少なくとも80%、
 少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、
 少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35ア
 ミノ酸長～40アミノ酸長(例えば、35、36、37、38、39、または40アミ
 ノ酸長)を有し得る。

【0165】

50

L N R セグメントは、図 3 1 A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1 4 4 2 ~ 1 5 6 2 、または別の N o t c h レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図 3 1 B ~ 3 1 G に示す）と少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ 9 0 アミノ酸長 ~ 1 5 0 アミノ酸長、例えば、9 0 アミノ酸長 (a a) ~ 1 0 0 アミノ酸長、1 0 0 アミノ酸長 ~ 1 1 0 アミノ酸長、1 1 0 アミノ酸長 ~ 1 2 0 アミノ酸長、1 2 0 アミノ酸長 ~ 1 3 0 アミノ酸長、1 3 0 アミノ酸長 ~ 1 4 0 アミノ酸長、または 1 4 0 アミノ酸長 ~ 1 5 0 アミノ酸長を有し得る。場合によっては、L N R セグメントは、図 3 1 A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1 4 4 2 ~ 1 5 6 2 、または別の N o t c h レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図 3 1 B ~ 3 1 G に示す）と少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ 1 1 5 アミノ酸長 ~ 1 2 5 アミノ酸長、例えば、1 1 5 、1 1 6 、1 1 7 、1 1 8 、1 1 9 、1 2 0 、1 2 1 、1 2 2 、1 2 3 、1 2 4 、または 1 2 5 アミノ酸長を有する。

【 0 1 6 6 】

L N R セグメントは、以下のアミノ酸配列、P P Q I E E A C E L P E C Q V D A G N K V C N L Q C N N H A C G W D G G D C S L N F N D P W K N C T Q S L Q C W K Y F S D G H C D S Q C N S A G C L F D G F D C Q L T E G Q C N P L Y D Q Y C K D H F S D G H C D Q G C N S A E C E W D G L D C (配列番号 9 0) と少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ 1 1 8 ~ 1 2 2 アミノ酸長 (例えば、1 1 8 、1 1 9 、1 2 0 、1 2 1 、または 1 2 2 アミノ酸長) を有し得る。

【 0 1 6 7 】

H D - N セグメントは、図 3 1 A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1 5 6 3 ~ 1 6 6 4 、または別の N o t c h レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図 3 1 B ~ 3 1 G に示す）と少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ 9 0 アミノ酸長 (a a) ~ 1 1 0 アミノ酸長、例えば、9 0 アミノ酸長 ~ 9 5 アミノ酸長、9 5 アミノ酸長 ~ 1 0 0 アミノ酸長、1 0 0 アミノ酸長 ~ 1 0 5 アミノ酸長、または 1 0 5 アミノ酸長 ~ 1 1 0 アミノ酸長を有し得る。場合によっては、H D - N セグメントは、図 3 1 A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1 5 6 3 ~ 1 6 6 4 、または別の N o t c h レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図 3 1 B ~ 3 1 G に示す）と少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ 9 5 アミノ酸長 ~ 1 0 5 アミノ酸長、例えば、9 5 、9 6 、9 8 、9 8 、9 9 、1 0 0 、1 0 1 、1 0 2 、1 0 3 、1 0 4 、または 1 0 5 アミノ酸長を有する。

【 0 1 6 8 】

H D - C セグメントは、図 3 1 A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1 6 6 5 ~ 1 7 3 3 、または別の N o t c h レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図 3 1 B ~ 3 1 G に示す）と少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ 6 0 アミノ酸長 (a a) ~ 8 0 アミノ酸長、例えば、6 0 アミノ酸長 ~ 6 5 アミノ酸長、6 5 アミノ酸長 ~ 7 0 アミノ酸長、7 0 アミノ酸長 ~ 7 5 アミノ酸長、または 7 5 アミノ酸長 ~ 8 0 アミノ酸長を有し得る。場合によっては、H D - C セグメントは、図 3 1 A に示される

10

20

30

40

50

アミノ酸配列のアミノ酸 1665 ~ 1733、または別のNotch レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B ~ 31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ65アミノ酸長～75アミノ酸長、例えば、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、または75アミノ酸長を有する。

【0169】

HDセグメント (HD - N プラス HD - C) は、以下のアミノ酸配列、AAGTLLV
VVLLPPDQLRNNSFHFLRELSHVLTNVVFKRDAGQQMIF
FPYYGHEEEELRKHPIKRSTVGWATSSLPLPGTSGGRQRREL
DPMMDIRGSIVYLEIDNRQCVQSSSQCFQSATDVAAFLGAL
ASLGSLNIPYKIEAVKSEPVEPPLP (配列番号91) と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ150、151、152、153、または154アミノ酸長を有し得る。

【0170】

膜貫通セグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1736 ~ 1756、または別のNotch レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B ~ 31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ15アミノ酸長 (aa) ~ 25アミノ酸長、例えば、15、16、17、18、29、20、21、22、23、24、または25アミノ酸長を有し得る。

【0171】

膜貫通セグメントは、以下のアミノ酸配列、HLMYVAAAAFVLLFFVGCG
VLLS (配列番号92) と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、
少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ21、22、23、24、または25アミノ酸長を有し得る。

【0172】

場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、約360アミノ酸長 (aa) ~ 約375アミノ酸長（例えば、360アミノ酸長、361アミノ酸長、362アミノ酸長、363アミノ酸長、364アミノ酸長、365アミノ酸長、366アミノ酸長、367アミノ酸長、368アミノ酸長、369アミノ酸長、370アミノ酸長、371アミノ酸長、372アミノ酸長、373アミノ酸長、374アミノ酸長、または375アミノ酸長）を有し、かつ図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1390 ~ 1756、または別のNotch レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B ~ 31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0173】

場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、合成リンカーを含む。例えば、場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 合成リンカー、ii) EGF反復、iii) LNRセグメント、iv) HD - Nセグメント、v) HD - Cセグメント、及びvi) TMドメインを含む。そのようなNotch レセプターポリペプチドを、図30Cに模式的に示す。

【0174】

合成リンカーは、約10アミノ酸長 (aa) ~ 約200アミノ酸長、例えば、10アミノ酸長～25アミノ酸長、25アミノ酸長～50アミノ酸長、50アミノ酸長～75アミ

10

20

30

40

50

ノ酸長、75アミノ酸長～100アミノ酸長、100アミノ酸長～125アミノ酸長、125アミノ酸長～150アミノ酸長、150アミノ酸長～175アミノ酸長、または175アミノ酸長～200アミノ酸長を有し得る。合成リンカーは、10アミノ酸長～30アミノ酸長、例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30アミノ酸長を有し得る。合成リンカーは、30アミノ酸長～50アミノ酸長、例えば、30アミノ酸長～35アミノ酸長、35アミノ酸長～40アミノ酸長、40アミノ酸長～45アミノ酸長、または45アミノ酸長～50アミノ酸長を有し得る。

【0175】

場合によっては、本明細書に記載の合成リンカーは、細胞外タンパク質構成ドメインまたはその一部分を含み得る。合成リンカーとしての使用に好適な細胞外タンパク質構成ドメインとしては、例えば、Ig様細胞外構成ドメイン、Fc細胞外構成ドメイン、フィブロネクチン細胞外構成ドメインなどが挙げられるが、これらに限定されない。場合によっては、合成リンカーは、複数の細胞外タンパク質構成ドメインを含み得、この複数のドメインは、複数の同じドメインまたは複数の異なるドメインを含み得る。

10

【0176】

2～11個のEGF反復、LNRセグメント、HD-Nセグメント、HD-Cセグメント、及びTMドメインを含むNotchレセプターポリペプチド

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 2～11個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。そのようなNotchレセプターポリペプチドを、図30Dに模式的に示す。

20

【0177】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 2個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

30

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 3個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 4個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

30

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 5個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 6個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

40

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 7個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 8個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 9個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 10個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

50

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 11個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

む。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドに存在するNotchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 11個のEGF反復、ii) LNRセグメント、iii) HD-Nセグメント、iv) HD-Cセグメント、及びv) TMドメインを含む。

【0178】

EGF反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1390～1430、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35アミノ酸長（aa）～45アミノ酸長（例えば、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、または45アミノ酸長）を有し得る。

10

【0179】

EGF反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸869～905（DINECVLSPCRHGASCQNTHGGYRCHCQAGYSGRNCE、配列番号96）、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35アミノ酸長～約40アミノ酸長（aa）（例えば、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長）を有し得る。

20

【0180】

EGF反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸907～943（DIDDCRPNPCHNGGSCTDGINTAFCDCLPGFRGTFCE、配列番号97）、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35アミノ酸長～約40アミノ酸長（aa）（例えば、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長）を有し得る。

30

【0181】

EGF反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸945～981（DINECASDPCRNGANCTDCVD SYTCTCPAGFSGIHCE、配列番号98）、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35アミノ酸長～約40アミノ酸長（aa）（例えば、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長）を有し得る。

40

【0182】

EGF反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸988～1019（TESSCFNGGTCVDGINSFTCLCP PGFTGSY CQ、配列番号99）、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ30アミノ酸長～35アミノ酸長（aa）（例えば、30、31、32、33、34、または35アミノ酸長）を有し得る。

【0183】

EGF反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1021～1057（D V

50

N E C D S Q P C L H G G T C Q D G C G S Y R C T C P Q G Y T G P N C Q、配列番号100)、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35アミノ酸長～約40アミノ酸長(a a)(例えば、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長)を有し得る。

【0184】

E G F 反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1064～1090(D S S P C K N G G K C W Q T H T Q Y R C E C P S G W T、配列番号101)、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ25アミノ酸長(a a)～30アミノ酸長(例えば、25、26、27、28、29、または30アミノ酸長)を有し得る。

10

【0185】

E G F 反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1146～1180(L V D E C S P S P C Q N G A T C T D Y L G G Y S C K C V A G Y H G V N C、配列番号102)、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35アミノ酸長～約40アミノ酸長(a a)(例えば、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長)を有し得る。

20

【0186】

E G F 反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1184～1219(I D E C L S H P C Q N G G T C L D L P N T Y K C S C P R G T Q G V H C E、配列番号103)、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35アミノ酸長～約40アミノ酸長(a a)(例えば、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長)を有し得る。

30

【0187】

E G F 反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1238～1265(C F N N G T C V D Q V G G Y S C T C P P G F V G E R C E、配列番号104)、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ25アミノ酸長(a a)～30アミノ酸長(例えば、25、26、27、28、29、または30アミノ酸長)を有し得る。

40

【0188】

E G F 反復は、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1267～1305(D V N E C L S N P C D A R G T Q N C V Q R V N D F H C E C R A G H T G R R C E、配列番号105)、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、か

50

つ35アミノ酸長～約40アミノ酸長(aa)(例えば、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長)を有し得る。

【0189】

EGF反復は、以下の配列、PCVGSNPCYNQGTCEPTSENPFYRCLCPAKFNGLLCH(配列番号95)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ35アミノ酸長～40アミノ酸長(例えば、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長)を有し得る。

【0190】

LNRセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1442～1562、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ90アミノ酸長～150アミノ酸長、例えば、90アミノ酸長(aa)～100アミノ酸長、100アミノ酸長～110アミノ酸長、110アミノ酸長～120アミノ酸長、120アミノ酸長～130アミノ酸長、130アミノ酸長～140アミノ酸長、または140アミノ酸長～150アミノ酸長を有し得る。場合によっては、LNRセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1442～1562、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ115アミノ酸長～125アミノ酸長、例えば、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、または125アミノ酸長を有する。

【0191】

LNRセグメントは、以下のアミノ酸配列、PPQIEEACELPECQVDAGNKVCNLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSQCN SAGCLFDGFDCQLTEGQCNPLYDQYCKDHFS DGHCDQGCNSAEC EWDGLDC(配列番号90)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ118～122アミノ酸長(例えば、118、119、120、121、または122アミノ酸長)を有し得る。

【0192】

HD-Nセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1563～1664、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ90アミノ酸長(aa)～110アミノ酸長、例えば、90アミノ酸長～95アミノ酸長、95アミノ酸長～100アミノ酸長、100アミノ酸長～105アミノ酸長、または105アミノ酸長～110アミノ酸長を有し得る。場合によっては、HD-Nセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1563～1664、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ95アミノ酸長～105アミノ酸長、例えば、95、96、98、98、99、100、101、102、103、104、または105アミノ酸長を有し得る。

10

20

30

40

50

05 アミノ酸長を有する。

【0193】

HD-Cセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1665～1733、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ60アミノ酸長（aa）～80アミノ酸長、例えば、60アミノ酸長～65アミノ酸長、65アミノ酸長～70アミノ酸長、70アミノ酸長～75アミノ酸長、または75アミノ酸長～80アミノ酸長を有し得る。場合によっては、HD-Cセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1665～1733、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ65アミノ酸長～75アミノ酸長、例えば、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、または75アミノ酸長を有する。

【0194】

HDセグメント（HD-NプラスHD-C）は、以下のアミノ酸配列、AAGT L V L V V L L P P D Q L R N N S F H F L R E L S H V L H T N V V F K R D A Q G Q Q M I F P Y Y G H E E E L R K H P I K R S T V G W A T S S L L P G T S G G R Q R R E L D P M D I R G S I V Y L E I D N R Q C V Q S S S Q C F Q S A T D V A A F L G A L A S L G S L N I P Y K I E A V K S E P V E P P L P（配列番号91）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ150、151、152、153、または154アミノ酸長を有し得る。

【0195】

膜貫通セグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1736～1756、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ15アミノ酸長（aa）～25アミノ酸長、例えば、15、16、17、18、29、20、21、22、23、24、または25アミノ酸長を有し得る。

【0196】

膜貫通セグメントは、以下のアミノ酸配列、H L M Y V A A A A F V L L F F V G C G V L L S（配列番号92）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ21、22、23、24、または25アミノ酸長を有し得る。

【0197】

場合によっては、Notchレセプターポリペプチドは、約490アミノ酸長（aa）～約900アミノ酸長を有し、かつ図31Aに示されるアミノ酸配列のi)アミノ酸1267～1756、ii)1238～1756、iii)1184～1756、iv)1146～1756、v)1064～1756、vi)1021～1756、vii)988～1756、viii)945～1756、ix)907～1756、またはx)869～1756、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図31B～31Gに示す）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0198】

場合によっては、Notchレセプターポリペプチドは、合成リンカーを含む。例えば、場合によっては、Notchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) 2~11個のEGF反復、ii)合成リンカー、iii)LNRセグメント、iv)HD-Nセグメント、v)HD-Cセグメント、及びvi)TMドメインを含む。そのようなNotchレセプターポリペプチドを、図30Eに模式的に示す。

【0199】

合成リンカーは、約10アミノ酸長(aa)~約200アミノ酸長、例えば、10アミノ酸長~25アミノ酸長、25アミノ酸長~50アミノ酸長、50アミノ酸長~75アミノ酸長、75アミノ酸長~100アミノ酸長、100アミノ酸長~125アミノ酸長、125アミノ酸長~150アミノ酸長、150アミノ酸長~175アミノ酸長、または175アミノ酸長~200アミノ酸長を有し得る。合成リンカーは、10アミノ酸長~30アミノ酸長、例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30アミノ酸長を有し得る。合成リンカーは、30アミノ酸長~50アミノ酸長、例えば、30アミノ酸長~35アミノ酸長、35アミノ酸長~40アミノ酸長、40アミノ酸長~45アミノ酸長、または45アミノ酸長~50アミノ酸長を有し得る。

10

【0200】

HD-Cセグメント及びTMドメインを含むNotchレセプターポリペプチド

場合によっては、Notchレセプターポリペプチドは、N末端からC末端の順で、i) HD-Cセグメント及びii) TMドメインを含み、Notchレセプターポリペプチドは、LNRセグメントを含まない。場合によっては、LNRセグメントは、異種ポリペプチドで置き換えられる。そのようなNotchレセプターポリペプチドを、図30Fに模式的に示す。

20

【0201】

HD-Cセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1665~1733、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B~31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ60アミノ酸長(aa)~80アミノ酸長、例えば、60アミノ酸長~65アミノ酸長、65アミノ酸長~70アミノ酸長、70アミノ酸長~75アミノ酸長、または75アミノ酸長~80アミノ酸長を有し得る。場合によっては、HD-Cセグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1665~1733、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B~31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ65アミノ酸長~75アミノ酸長、例えば、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、または75アミノ酸長を有する。

30

【0202】

膜貫通セグメントは、図31Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸1736~1756、または別のNotchレセプターポリペプチドの対応するセグメント(対応するセグメントの例は図31B~31Gに示す)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ15アミノ酸長(aa)~25アミノ酸長、例えば、15、16、17、18、29、20、21、22、23、24、または25アミノ酸長を有し得る。

40

【0203】

膜貫通セグメントは、以下のアミノ酸配列、HLMYVAAAAFVLFLFFVGCGVLLS(配列番号92)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、

50

少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、かつ 21、22、23、24、または 25 アミノ酸長を有し得る。

【0204】

場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、図 31A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1665 ~ 1756、または別のNotch レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図 31B ~ 31G に示す）と少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ 85 アミノ酸長 (aa) ~ 95 アミノ酸長 (例えば、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、または 95 アミノ酸長) を有する。

10

【0205】

場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、図 31A に示されるアミノ酸配列のアミノ酸 1665 ~ 1756、または別のNotch レセプターポリペプチドの対応するセグメント（対応するセグメントの例は図 31B ~ 31G に示す）と少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ Notch レセプターポリペプチドの N 末端にインフレームで融合した異種ポリペプチドを含む。

20

【0206】

タンパク質分解切断部位

上記のように、本開示のキメラポリペプチドは、例えば、50 アミノ酸長 ~ 1000 アミノ酸長を有し、かつ 1 つ以上のタンパク質分解切断部位を有する、Notch レセプターポリペプチドを含む。

【0207】

場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、1 つのタンパク質分解切断部位のみを含む。場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、2 つのタンパク質分解切断部位を含む。場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、3 つのタンパク質分解切断部位を含む。単純さのために、切断部位は、本明細書では「S1」、「S2」、及び「S3」タンパク質分解切断部位と称される。

30

【0208】

場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、S1 タンパク質分解切断部位を含む。S1 タンパク質分解切断部位は、HD - N セグメントと HD - C セグメントとの間に位置し得る。場合によっては、S1 タンパク質分解切断部位は、フューリン様プロテアーゼ切断部位である。フューリン様プロテアーゼ切断部位は、標準配列 Arg - X - (Arg / Lys) - Arg (配列番号 130) (式中、X は任意のアミノ酸) を有し得、このプロテアーゼは、標準配列に対してすぐ C 末端で切断される。例えば、場合によっては、S1 タンパク質分解切断部位を含むアミノ酸配列は、アミノ酸配列 G R R R R E L D P M (配列番号 106) を有し得、切断は「RE」配列間で発生する。別の例として、S1 タンパク質分解切断部位を含むアミノ酸配列は、アミノ酸配列 R Q R R E L D P M (配列番号 107) を有し得、切断は「RE」配列間で発生する。

40

【0209】

場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、S2 タンパク質分解切断部位を含む。S2 タンパク質分解切断部位は、HD - C セグメント内に位置し得る。場合によっては、S2 タンパク質分解切断部位は、例えば、A D A M - 17 型プロテアーゼ切断部位などの A D A M ファミリー型プロテアーゼ切断部位である。A D A M - 17 型プロテアーゼ切断部位は、A1a - V1a ジペプチド配列を含み得、酵素は、A1a と V1a との間で切断される。例えば、場合によっては、S2 タンパク質分解切断部位を含むアミノ酸配列は、アミノ酸配列 K I E A V K S E (配列番号 108) を有し得、切断は「AV」配列間で発生する。別の例として、S2 タンパク質分解切断部位を含むアミノ酸配列は、ア

50

ミノ酸配列 K I E A V Q S E (配列番号 109) を有し得、切断は「 A V 」配列間で発生する。

【 0 2 1 0 】

場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、S3 タンパク質分解切断部位を含む。S3 タンパク質分解切断部位は、TM ドメイン内に位置し得る。場合によっては、S3 タンパク質分解切断部位は、ガンマ - セクレターゼ (- セクレターゼ) 切断部位である。 - セクレターゼ切断部位は、G1y - V a 1 ジペプチド配列を含み得、酵素は、G1y と V a 1 との間で切断される。例えば、場合によっては、S3 タンパク質分解切断部位は、アミノ酸配列 V G C G V L L S (配列番号 110) を有し、切断は「 G V 」配列間で発生する。場合によっては、S3 タンパク質分解切断部位は、アミノ酸配列 G C G V L L S (配列番号 111) を含む。

10

【 0 2 1 1 】

場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、S1 タンパク質分解切断部位を欠如する。場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、S2 タンパク質分解切断部位を欠如する。場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、S3 タンパク質分解切断部位を欠如する。場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、S1 タンパク質分解切断部位及び S2 タンパク質分解切断部位の両方を欠如する。場合によっては、Notch レセプターポリペプチドは、S3 タンパク質分解切断部位を含み、かつ S1 タンパク質分解切断部位及び S2 タンパク質分解切断部位の両方を欠如する。例を図 30G に模式的に示す。

20

【 0 2 1 2 】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの Notch レセプターポリペプチドは、図 32A ~ 32B の Notch レセプターポリペプチドであっても、図 32A ~ 32B に提示される Notch レセプターポリペプチドの全部または 1 つ以上の部分を含んでもよい。

【 0 2 1 3 】

本明細書に記載のキメラポリペプチドならびに方法及び回路における使用に適合され得る、特定の Notch レセプターポリペプチド及びそれらの構成要素としては、例えば、PCT 出願第 US 2016 / 019188 号 (公開第 WO 2016 / 138034 号) に記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【 0 2 1 4 】

細胞内ドメイン

上記のように、本開示のキメラポリペプチドは、キメラポリペプチドと細胞外特異的結合メンバーの結合パートナーとの結合後に放出される細胞内ドメインを含み、そのような結合は、上述のタンパク質分解切断部位の切断を誘導する。

【 0 2 1 5 】

細胞内ドメインは、Notch レセプターポリペプチドに対して異種であるアミノ酸配列を含む。換言すると、細胞内ドメインは、Notch レセプターポリペプチドに天然に存在しないアミノ酸配列を含む。

40

【 0 2 1 6 】

場合によっては、細胞内ドメインは、キメラポリペプチドからの放出時に細胞内で転写応答を誘導するか、または別様に転写を調節する。例えば、場合によっては、細胞内ドメインは、細胞内で転写を活性化し、したがって、転写活性化因子として機能し、転写活性化ドメインを含有し得る。

【 0 2 1 7 】

細胞内ドメインは、発現されるペプチドまたはタンパク質に起因し得る本質的に任意のエフェクター機能を提供することができ、そのようなエフェクター機能としては、例えば、細胞による 1 つ以上のサイトカインの産生の増加、細胞による 1 つ以上のサイトカインの産生の低減、細胞によるホルモンの産生の増加または減少、細胞による抗体の産生、小

50

器官活性の変化、細胞内のポリペプチド輸送の変化、標的遺伝子の転写の変化、タンパク質の活性の変化、細胞活性の変化（例えば、細胞死）、細胞増殖、細胞分化に対する影響、細胞生存に対する影響、細胞シグナリング応答の調節などを挙げることができるが、これらに限定されない。場合によっては、細胞内ドメインは、キメラポリペプチドからの放出時に標的遺伝子の転写の変化を提供する。場合によっては、細胞内ドメインは、キメラポリペプチドからの放出時に標的遺伝子の転写の増加を提供する。場合によっては、細胞内ドメインは、キメラポリペプチドからの放出時に標的遺伝子の発現の減少を提供する。

【0218】

場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの細胞内ドメインは、転写活性化因子を含む。任意の簡便な転写活性化因子は、本開示のキメラポリペプチドの細胞内ドメインにおいて用途を見出しえる。細胞内または系内で、転写活性化因子は、転写活性化因子に応答性の転写制御要素と対応して、例えば、転写制御要素に作動可能に連結した目的のポリペプチドをコードする核酸の発現を推進することができる。有用な転写活性化因子、転写制御要素、活性化因子／制御要素対、及びそのような系の構成要素としては、例えば、誘導性発現系において使用されるもの（例えば、Goverdhan et al. Mol Ther. (2005) 12(2): 189-211、米国特許出願公開第20160152701号、同第20150376627号、同第20130212722号、同第20070077642号、同第20050164237号、同第20050066376号、同第20040235169号、同第20040038249号、同第20030220286号、同第20030199022号、同第20020106720号に記載のものを含むが、これらに限定されない）を挙げることができるが、これらに限定されず、これらの開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0219】

場合によっては、有用な転写活性化因子は、哺乳動物転写因子またはそれらの操作された形態もしくは変異形態を含み得る。場合によっては、有用な転写活性化因子は、ヒト転写因子またはそれらの操作された形態もしくは変異形態を含み得る。場合によっては、有用な転写活性化因子は、マウス転写因子またはそれらの操作された形態もしくは変異形態を含み得る。場合によっては、有用な転写活性化因子は、ラット転写因子またはそれらの操作された形態もしくは変異形態を含み得る。場合によっては、有用な転写活性化因子は、ウシ転写因子またはそれらの操作された形態もしくは変異形態を含み得る。場合によっては、有用な転写活性化因子は、ブタ転写因子またはそれらの操作された形態もしくは変異形態を含み得る。

【0220】

場合によっては、哺乳動物転写因子の使用は、転写因子が哺乳動物において免疫応答を誘導する可能性を低減し得る。場合によっては、例えば、変異または操作された哺乳動物転写因子を含む、操作された転写因子または変異転写因子の使用は、転写因子が哺乳動物において免疫応答を誘導する可能性を低減し得る。有用な哺乳動物転写因子としては、例えば、亜鉛フィンガー（ZnF）タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0221】

場合によっては、細胞内ドメインは、転写活性化因子である。場合によっては、細胞内ドメインは、以下のテトラサイクリン制御転写活性化因子（tTA）アミノ酸配列、MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVQEQLTYWHVKKNKRALLDALAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKERETPTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIICGLEKQLKCESGGPADALDDFDLDMLPADALDDFDLDMLPADALDDFDLDMLPG（配列番号112）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、ま

10

20

30

40

50

たは100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ約245アミノ酸長～252アミノ酸長（例えば、248、249、250、251、または252アミノ酸長）を有する。

【0222】

いくつかの実施形態において、細胞内ドメインは、転写活性化因子を含む。場合によつては、転写活性化因子は、GAL4-VP16である。場合によつては、転写活性化因子は、VP64-Zip(+)である。場合によつては、転写活性化因子は、亜鉛フィンガーなどの操作されたタンパク質、またはVP64などのエフェクタードメインに融合したTAL-E系DNA結合ドメインである。当該技術分野において既知である様々な他の転写トランスクレッセス活性化因子の使用が好適である。

10

【0223】

場合によつては、細胞内ドメインは、以下のGAL4-VP64配列、M K L L S S I E Q A C D I C R L K K L K C S K E K P K C A K C L K N N W E C R Y S P K T K R S P L T R A H L T E V E S R L E R L E Q L F L L I F P R E D L D M I L K M D S L Q D I K A L L T G L F V Q D N V N K D A V T D R L A S V E T D M P L T L R Q H R I S A T S S S E E S S N K G Q R Q L T V S A A A G G S G G S G G S D A L D D F D L D M L G S D A L D D F D L D M L G S D A L D D F D L D M L G S D A L D D F D L D M L G S (配列番号113)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ208～214アミノ酸長（例えば、208、209、210、211、212、213、または214アミノ酸長）を有する。

20

【0224】

場合によつては、細胞内ドメインは、以下のVP64-Zip(+)転写活性化因子配列、P K K K R K V D A L D D F D L D M L G S D A L D D F D L D M L G S D A L D D F D L D M L G S D A L D D F D L D M L G S G G S G G S G G S L E I E A A F L E R E N T A L E T R V A E L R Q R V Q R L R N R V S Q Y R T R Y G P L G G G K (配列番号114)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ105～115アミノ酸長（例えば、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、または115アミノ酸長）を有する。

30

【0225】

場合によつては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの細胞内ドメインは、キメラポリペプチドの活性化時に、POIの発現を誘導する。POIは、本質的に任意のポリペプチドであり得、研究目的のポリペプチド（例えば、レポーターポリペプチド、変異ポリペプチド、新規合成ポリペプチドなど）、治療目的のポリペプチド（例えば、天然に存在する治療タンパク質、組み換え治療ポリペプチドなど）、産業目的のポリペプチド（例えば、産業用途（例えば、製造など）において使用されるポリペプチド）などを含み得るが、これらに限定されない。

40

【0226】

場合によつては、POIは、例えば、腫瘍、がんなどの新生物を治療するための治療ポリペプチドを含むが、これに限定されない、治療ポリペプチドであり得る。場合によつては、新生物を治療するための治療POIは、がんの免疫療法において使用されるPOIであり得る。場合によつては、治療POIは、CARであり得る。場合によつては、治療POIは、TCRであり得る。場合によつては、治療POIは、抗体であり得る。場合によつては、治療POIは、キメラ二重特異的結合メンバーであり得る。場合によつては、治療POIは、自然免疫応答誘導因子であり得る。場合によつては、治療POIは、免疫抑制因子であり得る。

【0227】

50

本開示のPOIは、直交化POIを含む。直交化POIは、それらの元来の形態または野生型の形態から修飾されていることで、直交POIが特定の直交化パートナーと特異的に反応または結合するが、非修飾パートナーまたは野生型パートナーとは特異的または実質的に反応も結合もしない、POIを含む。例えば、本明細書に記載のPOIを含むが、これらに限定されない、任意のPOIが直交化され得る。

【0228】

場合によっては、治療POIは、抗Fc CARであり得る。抗Fc CARは一般に、Fc受容体の細胞外ドメインと、細胞内シグナリングドメインと、任意で同時刺激ドメインとを含む。治療の状況に応じて、抗Fc CARは、例えば、Fc - ガンマ受容体（例えば、Fc RI (CD64)、Fc RIIIA (CD32)、Fc RIIB (CD32)、Fc RIIC (CD16a)、Fc RIIB (CD16b)）、Fc - アルファ受容体（例えば、Fc RI (CD89)）、またはFc - イプシロン受容体（例えば、Fc RI、Fc RII (CD23)）を含む、任意のFc受容体の細胞外ドメインを含み得る。例えば、場合によっては、抗Fc CARは、CD16 Fc受容体の細胞外ドメインを含み得る。場合によっては、抗Fc CARは、CD16 Fc受容体の細胞外ドメインと、CD3 - ゼータ細胞内シグナリングドメインと、4-1BB同時刺激ドメインとを含み得る。場合によっては、抗Fc CARは、抗体結合T細胞受容体 (ACTR)（例えば、Unum Therapeutics Inc.、Cambridge, MAから入手可能なものの）であり得る。

【0229】

場合によっては、抗Fc CARの1つ以上のドメインは、変異ドメインであってもよく、これは例えば、結合パートナーに対する親和性の調節（例えば、親和性の増加または親和性の減少）、細胞内シグナリング特性の調節（例えば、シグナリングの増加またはシグナリングの減少）などのために、ドメインが変異している場合を含む。

【0230】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、キメラポリペプチドの特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが細胞内の核酸配列からの抗Fc CARの転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。場合によっては、抗Fc CARに結合する抗体及び腫瘍抗原は、そのような細胞も投与される対象に投与され得る。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、キメラポリペプチドの特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが細胞内の1つ以上の核酸配列からの抗Fc CAR及び抗Fc CARに結合する抗体、ならびに腫瘍抗原の転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。

【0231】

場合によっては、治療POIは、キメラ二重特異的結合メンバーであり得る。本明細書で使用される場合、「キメラ二重特異的結合メンバー」は、2つの異なる結合パートナー（例えば、2つの異なる抗原）に対する二重特異性を有するキメラポリペプチドを意味する。キメラ二重特異的結合メンバーの非限定的な例としては、二重特異性抗体、二重特異性共役モノクローナル抗体 (mab)₂、二重特異性抗体断片（例えば、F(ab)₂、二重特異性scFv、二重特異性ダイアボディ、単鎖二重特異性ダイアボディなど）、二重特異性T細胞エンゲイジャー (BiTE)、二重特異性共役単一ドメイン抗体、ミカボディ (micobody)、及びそれらの変異体などが挙げられる。キメラ二重特異的結合メンバーの非限定的な例には、Kontermann. Mabs. (2012) 4 (2) : 182 - 197、Stamova et al. Antibodies 2012, 1 (2) : 172 - 198、Farhadfar et al. Leuk Res. (2016) 49 : 13 - 21、Benjamin et al. Ther Adv Hematol. (2016) 7 (3) : 142 - 56、Kiefer et al. Immunol Rev. (2016) 270 (1) : 178 - 92、Fan et al. J Hematol Oncol. (2015) 8 : 130、May et al. Am J Health Syst Pharm. (2016) 73 (1) : e6 - e13に記載のキメラ二重特異

10

20

30

40

50

性物質もまた含まれ、これらの開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0232】

場合によっては、キメラ二重特異的結合メンバーは、二重特異性抗体であり得る。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの活性化に応答して発現され得る二重特異性抗体は、例えば、本明細書に記載の少なくとも1つの（例えば、2つを含む）がん抗原を含むが、これらに限定されない、少なくとも1つのがん抗原（例えば、2つのがん抗原を含む）を標的化する二重特異性抗体であり得る。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの活性化に応答して発現され得る二重特異性抗体は、例えば、本明細書に記載のがん抗原及び本明細書に記載の免疫抗原を含むが、これらに限定されない、1つのがん抗原及び1つの免疫細胞抗原を標的化する二重特異性抗体であり得る。

10

【0233】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの活性化に応答して発現され得る二重特異性抗体は、例えば、b s A b M D X - 2 1 0 (H e r 2 及び C D 6 4 を標的化)、M D X - H 2 1 0 (H e r 2 及び C D 6 4 を標的化)、M D X - 4 4 7 (標的化 E G F R 及び C D 6 4)、H R S - 3 / A 9 (C D 3 0 抗原及び受容体 F c R I I I (C D 1 6)) を標的化する二重特異性 F (a b ') 抗体)、抗 C D 3 × 抗 E p C A M T r i o m A b / b s A b 、カツマキソマブ、エルツマキソマブ、B i 2 0 (リンフォマン (L y m p h o m u n) または f B T A 0 5) 、抗 C D 1 9 × C D 3 ダイアボディ、抗 C D 1 9 × C D 1 6 ダイアボディ、抗 E G F R × C D 3 ダイアボディ、抗 P S M A × C D 3 ダイアボディ、r M 2 8 及び N G 2 を標的化するダイアボディ、抗 C D 2 8 × C D 2 0 二重特異性タンデム s c F v などであり得る。

20

【0234】

場合によっては、キメラ二重特異的結合メンバーは、二重特異性 T 細胞エンゲイジャー (B i T E) であり得る。 B i T E は一般に、免疫細胞抗原に結合する特異的結合メンバー（例えば、s c F v ）を、がん抗原（例えば、腫瘍関連抗原、腫瘍特異的抗原など）に結合する特異的結合メンバー（例えば、s c F v ）に融合することによって作製される。例えば、例示的な B i T E としては、短いペプチドリンカー（例えば、5 アミノ酸長リンカー、例えば、G G G G S (配列番号 1 1 5) ）を介して抗腫瘍関連抗原（例えば、E p C A M 、 C D 1 9 など） s c F v に融合した抗 C D 3 s c F v が挙げられる。

30

【0235】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの活性化に応答して発現され得る B i T E は、例えば、本明細書に記載のがん抗原を含むが、これに限定されない、少なくとも1つのがん抗原を標的化する B i T E であり得る。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの活性化に応答して発現され得る B i T E は、例えば、本明細書に記載のがん抗原及び本明細書に記載の免疫抗原を含むが、これらに限定されない、1つのがん抗原及び1つの免疫細胞抗原を標的化する B i T E であり得る。

【0236】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、キメラポリペプチドの特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが細胞内の核酸配列からの B i T E の転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、ペプチド - M H C 特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが B i T E の転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。場合によっては、本明細書に記載のような使用に好適な B i T E としては、例えば、抗 C D 3 × 抗 C D 1 9 B i T E (例えば、ブリナツモマブ) 、抗 E p C A M × 抗 C D 3 B i T E (例えば、M T 1 1 0) 、抗 C E A × 抗 C D 3 B i T E (例えば、M T 1 1 1 / M E D I - 5 6 5) 、抗 C D 3 3 × 抗 C D 3 B i T E 、抗 H E R 2 B i T E 、抗 E G F R B i T E 、抗 I g E B i T E などが挙げられる。

40

【0237】

場合によっては、キメラ二重特異的結合メンバーは、ミカボディまたはその変異体であり得る。ミカボディは一般に、N K G 2 D 受容体に特異的に結合する少なくとも1つのド

50

メインに連結した抗原特異的結合部分を含む。場合によっては、ミカボディまたはその変異体は、NKG2D受容体に特異的に結合する、操作されたMICA 1 - 2ドメインを含む。

【0238】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの活性化に応答して発現され得るミカボディまたはその変異体は、例えば、本明細書に記載のがん抗原を含むが、これに限定されない、少なくとも1つのがん抗原を標的化するミカボディまたはその変異体であり得る。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドの活性化に応答して発現され得るミカボディまたはその変異体は、HER2を標的化するミカボディまたはその変異体（例えば、抗HER2ミカボディまたはその変異体）であり得る。ミカボディ及び関連する構成要素の非限定的な例、ならびに作動原理は、例えば、Cho et al., Cancer Res. (2010) 70 (24) : 10121 - 30、Bauer et al. Science. (1999) 285 (5428) : 727 - 9、Morvan et al. Nat Rev Cancer. (2016) 16 (1) : 7 - 19に記載され、これらの開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0239】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、キメラポリペプチドの特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが細胞内の核酸配列からのミカボディまたはその変異体の転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、ペプチド - MHC特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインがミカボディまたはその変異体の転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。ミカボディ及びそれらの変異体としては、AvidBiotics (South San Francisco, CA) によって開発され、オンライン上で (avidbiotics(dot)com) に記載のものが挙げられる。

【0240】

場合によっては、キメラ二重特異的結合メンバーは、CAR-T細胞アダプターであり得る。本明細書で使用される場合、「CAR-T細胞アダプター」は、CARの抗原認識ドメインに結合し、CARを第2の抗原に再指向する、発現される二重特異性ポリペプチドを意味する。一般に、CAR-T細胞アダプターは、2つの結合領域を有し、1つは、それが指向されるCAR上のエピトープに特異的であり、1つは、結合時にCARを活性化する結合シグナルを伝達する結合パートナーに指向される第2のエピトープに特異的である。有用なCAR-T細胞アダプターとしては、例えば、Kim et al. J Am Chem Soc. (2015) 137 (8) : 2832 - 5、Ma et al. Proc Natl Acad Sci USA. (2016) 113 (4) : E450 - 8、及びCao et al. Angew Chem Int Ed Engl. (2016) 55 (26) : 7520 - 4に記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、これらの開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0241】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドによって誘導される治療POIは、抗体である。好適な抗体としては、例えば、41及び47インテグリンの4サブユニットを標的化するナタリズマブ (Tysabri、Biogen Idec / Elan)（多発性硬化症及びクローン病の治療に使用されるもの）、47インテグリンを標的化するベドリズマブ (MLN2、Millennium Pharmaceuticals / Takeda)（潰瘍性大腸炎及びクローン病の治療に使用されるもの）、BAFFを標的化するベリムマブ (Benlysta、Human Genome Sciences / GlaxoSmithKline)（SLEの治療に使用されるもの）、BAFF及びAPRILを標的化するアタシセプト (TACI-Ig、Merck / Serono)（SLEの治療に使用されるもの）、CD2を標的化するアレファセプト (Amevive、Astellas)（尋常性乾癬、移植片対宿主病の治療に使用されるもの）、CD3を標的化するオテリキシズマブ (TRX4、Tolerx / GlaxoSmithKline)（SLEの治療に使用されるもの）である。

10

20

30

40

50

line) (1型糖尿病の治療に使用されるもの)、CD3を標的化するテプリズマブ(MGA031、MacroGenics/ Eli Lilly) (1型糖尿病の治療に使用されるもの)、CD20を標的化するリツキシマブ(Rituxan/Mabthera、Genentech/Roche/Biogen Idec) (非ホジキンリンパ腫、(TNF遮断に対して不適切な応答を有する患者における)RA、及びCLLの治療に使用されるもの)、CD20を標的化するオファツムマブ(Arzerra、Genmab/GlaxoSmithKline) (CLL、RAの治療に使用されるもの)、CD20を標的化するオクレリズマブ(2H7、Genentech/Roche/Biogen Idec) (RA及びSLEの治療に使用されるもの)、CD22を標的化するエプラツズマブ(hLL2、Immunomedics/UCB) (SLE及び非ホジキンリンパ腫の治療に使用されるもの)、CD52を標的化するアレムツズマブ(Campath/MabCampath、Genzyme/Bayer) (CLL、MSの治療に使用されるもの)、CD80及びCD86を標的化するアバタセプト(Orencia、Bristol-Myers Squibb) (RA及び若年性特発性関節炎、潰瘍性大腸炎及びクローン病、SLEの治療に使用されるもの)、C5補体タンパク質を標的化するエクリズマブ(Soliris、Alexion pharmaceuticals) (発作性夜間ヘモグロビン尿症の治療に使用されるもの)、IgEを標的化するオマリズマブ(Xolair、Genentech/Roche/Novartis) (中等度から重度の持続性アレルギー性喘息の治療に使用されるもの)、IL-1を標的化するカナキヌマブ(Iclaris、Novartis) (クリオピリン関連周期熱症候群、全身型若年性特発性関節炎、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、及び急性痛風の治療に使用されるもの)、IL-5を標的化するメポリズマブ(Bosatrisa、GlaxoSmithKline) (好酸球増加症候群の治療に使用されるもの)、IL-5を標的化するレスリズマブ(SCH55700、Ception Therapeutics) (好酸球性食道炎の治療に使用されるもの)、IL-6Rを標的化するトシリズマブ(Actemra/RoActemra、Chugai/Roche) (RA、若年性特発性関節炎の治療に使用されるもの)、IL-12及びIL-23を標的化するウステキヌマブ(Stelara/Centocor) (尋常性乾癬、乾癬性関節炎、クローン病の治療に使用されるもの)、IL-12及びIL-23を標的化するブリアキヌマブ(ABT-874、Abbott) (乾癬及び尋常性乾癬の治療に使用されるもの)、TNFを標的化するエタネルセプト(Enbrel、Amgen/Pfizer) (RA、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎、大動脈弁狭窄症、及び尋常性乾癬の治療に使用されるもの)、TNFを標的化するインフリキシマブ(Remicade/Centocor/Merck) (クローン病、RA、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸炎、大動脈弁狭窄症、及び尋常性乾癬の治療に使用されるもの)、TNFを標的化するアダリムマブ(Humira/Truveda、Abbott) (RA、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎、クローン病、大動脈弁狭窄症、及び尋常性乾癬の治療に使用されるもの)、TNFを標的化するセルトリズマブペゴル(Cimzia/UCB) (クローン病及びRAの治療に使用されるもの)、TNFを標的化するゴリムマブ(Simponi/Centocor) (RA、乾癬性関節炎、及び大動脈弁狭窄症の治療に使用されるもの)などが挙げられる。

【0242】

場合によっては、產生が誘導される抗体は、がんの治療のための治療抗体である。そのような抗体としては、例えば、CTLA-4を標的化するイピリムマブ(黑色腫、前立腺癌、腎細胞癌の治療に使用されるもの)、CTLA-4を標的化するトレメリムマブ(結腸直腸癌、胃癌、黑色腫、非小細胞肺癌の治療に使用されるもの)、PD-1を標的化するニボルマブ(黑色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌の治療に使用されるもの)、PD-1を標的化するMK-3475(黑色腫の治療に使用されるもの)、PD-1を標的化するピディリズマブ(血液系腫瘍の治療に使用されるもの)、PD-L1を標的化するBMS-936559(黑色腫、非小細胞肺癌、卵巣癌、腎細胞癌の治療に使用されるもの)、PD-1を標的化するMED14736、PD-L1を標的化するMPDL33280A(

10

20

30

40

50

黒色腫の治療に使用されるもの)、CD20を標的化するリツキシマブ(非ホジキンリンパ腫の治療に使用されるもの)、イブリツモマブチウキセタン及びトシツモマブ(リンパ腫の治療に使用されるもの)、CD30を標的化するブレンツキシマブベドチン(ホジキンリンパ腫の治療に使用されるもの)、CD33を標的化するゲムツズマブオゾガマイシン(急性骨髄性白血病の治療に使用されるもの)、CD52を標的化するアレムツズマブ(慢性リンパ性白血病の治療に使用されるもの)、EpCAMを標的化するIGN101及びアデカツムマブ(上皮性腫瘍(乳腺腫瘍、結腸腫瘍、及び肺腫瘍)の治療に使用されるもの)、CEAを標的化するラベツズマブ(乳腺腫瘍、結腸腫瘍、及び肺腫瘍の治療に使用されるもの)、gpA33を標的化するhuA33(結腸直腸癌の治療に使用されるもの)、ムチンを標的化するペムツモマブ及びオレゴボマブ(乳腺腫瘍、結腸腫瘍、肺腫瘍、及び卵巣腫瘍の治療に使用されるもの)、TAG-72を標的化するCC49(ミニレツモマブ)(乳腺腫瘍、結腸腫瘍、及び肺腫瘍の治療に使用されるもの)、CAIXを標的化するcG250(腎細胞癌の治療に使用されるもの)、PSMAを標的化するJ591(前立腺癌の治療に使用されるもの)、葉酸結合タンパク質を標的化するMOv18及びMORAb-003(ファーレツズマブ)(卵巣腫瘍の治療に使用されるもの)、ガングリオシド(GD2、GD3、及びGM2など)を標的化する3F8、ch14.18、及びKW-2871(神経外胚葉性腫瘍及び一部の上皮性腫瘍の治療に使用されるもの)、Lyを標的化するhu3S193及びIgN311(乳腺腫瘍、結腸腫瘍、肺腫瘍、及び前立腺腫瘍の治療に使用されるもの)、VEGFを標的化するベバシズマブ(腫瘍脈管構造の治療に使用されるもの)、VEGFRを標的化するIM-2C6及びCDP791(上皮由来固形腫瘍の治療に使用されるもの)、インテグリン_V_3を標的化するエタラシズマブ(腫瘍脈管構造の治療に使用されるもの)、インテグリン_5_1を標的化するボロシキシマブ(腫瘍脈管構造の治療に使用されるもの)、EGFRを標的化するセツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、及び806(神経膠腫、肺腫瘍、乳腺腫瘍、結腸腫瘍、及び頭頸部腫瘍の治療に使用されるもの)、ERBB2を標的化するトラスツズマブ及びペルツズマブ(乳腺腫瘍、結腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、及び前立腺腫瘍の治療に使用されるもの)、ERBB3を標的化するMM-121(乳腺腫瘍、結腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、及び前立腺腫瘍の治療に使用されるもの)、METを標的化するAMG102、METMAB、及びSCH900105(乳腺腫瘍、卵巣腫瘍、及び肺腫瘍の治療に使用されるもの)、IGF1Rを標的化するAVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、及びCP751871(神経膠腫、肺癌、乳癌、頭頸部癌、前立腺癌、及び甲状腺癌の治療に使用されるもの)、EPHA3を標的化するKB004及びIIIA4(肺腫瘍、腎臓腫瘍、及び結腸腫瘍、黒色腫、神経膠腫、ならびに血液系腫瘍の治療に使用されるもの)、TRAILR1を標的化するマバツズマブ(HGS-ETR1)(結腸腫瘍、肺腫瘍、及び膵臓腫瘍、ならびに血液系腫瘍の治療に使用されるもの)、TRAILR2を標的化するHGS-ETR2及びCS-1008、RANKLを標的化するデノスマブ(前立腺癌及び骨転移の治療に使用されるもの)、FAPを標的化するシプロツズマブ及びF19(結腸腫瘍、乳腺腫瘍、肺腫瘍、膵臓腫瘍、及び頭頸部腫瘍の治療に使用されるもの)、テネイシンを標的化する81C6(神経膠腫、乳腺腫瘍、及び前立腺腫瘍の治療に使用されるもの)、CD3を標的化するブリナツモマブ(Blinacyto、Amgen)(ALLの治療に使用されるもの)、がん免疫療法において使用されるPD-1を標的化するペムプロリズマブ、c-Mycを標的化する9E10抗体などが挙げられる。

【0243】

場合によっては、有用な抗体(それらの発現が本開示のキメラポリペプチドによって誘導され得るもの)としては、8H9、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アビツズマブ、アブリルマブ、アクトクスマブ、アデュカヌマブ、アフェリモマブ、アフツズマブ、アラシズマブペゴール、ALD518、アリロクマブ、アルツモマブペンテタート、アマツキシマブ、アナツモマブマフェナトックス、アネツマブラブタンシン、アニフロルマブ、アンルキンズマブ、アポリズマブ、アルシツモマブ、アスクリンバクマブ、アセリズマブ、ア

10

20

30

40

50

テゾリズマブ、アチヌマブ、アトリズマブ／トシリズマブ、アトロリムマブ、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、ベクツモマブ、ベゲロマブ (B e g e l o m a b)、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ、ベシレソマブ、ベバシズマブ／ラニビズマブ、ベズロトクスマブ、ビシロマブ、ビマグルマブ、ビメキズマブ、ビバツズマブメルタンシン、プロソズマブ、ボコシズマブ、ブレンツキシマブベドチン、プロダルマブ、プロルシズマブ、ブロンチクツズマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン、カプラシズマブ、カプロマブペンデチド、カルルマブ、カツマキソマブ、c B R 9 6 - ドキソルビシン免疫複合体、セデリツマブ、C h . 1 4 . 1 8 、シタツズマブボガトクス、シズツムマブ、クラザキズマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、コドリツズマブ、コルツキシマブラブタンシン、コナツムマブ、コンシズマブ (C o n c i z u m a b)、C R 6 2 6 1 、クレネズマブ、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ、ダピロリズマブペゴル、ダラツムマブ、デクトレクマブ、デミシズマブ、デニンツズマブマホドチン、デルロツキシマブピオチン、デツモマブ、ジヌツキシマブ、ジリダブマブ (D i r i d a v u m a b)、ドルリモマブアリトクス、ドロジツマブ、デュリゴツマブ、デュピルマブ、デュルバルマブ、デュシギツマブ、エクロメキシマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エフングマブ、エルデルマブ、エルゲムツマブ、エロツズマブ、エルシリモマブ、エマクツズマブ、エミベツズマブ、エナバツズマブ、エンフォルツマブベドチン、エンリモマブペゴール、エノビリツズマブ、エノキズマブ、エノチクマブ、エンシツキシマブ、エピツモマブシツキセタン (E p i t u m o m a b c i t u x e t a n)、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エトロリズマブ、エビナクマブ、エボロクマブ、エクスピビルマブ、ファノレソマブ、ファラリモマブ、ファーレツズマブ、ファシヌマブ、F B T A 0 5 、フェルビズマブ、フェザキヌマブ、フィクラツズマブ、フィギツムマブ、フィリブマブ、フランボツマブ、フレキクマブ、フォントリズマブ、フォラルマブ、フォラビルマブ、フレソリムマブ、フルラヌマブ、フツキシマブ、ガリキシマブ、ガニツマブ、ガンテネルマブ、ガビリモマブ、ゲボキズマブ、ギレンツシキマブ、グレムバツムマブベドチン、ゴミリキシマブ、グセルクマブ、イバリズマブ、イバリズマブ、イクルクマブ、イダルシズマブ、イゴボマブ、I M A B 3 6 2 、イマルマブ、インシロマブ、イムガツズマブ、インクラクマブ、インダツキシマブラブタンシン、インデュサツマブベドチン、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、インテツムマブ、イラツムマブ、イサツキシマブ、イトリズマブ、イキセキズマブ、ケリキシマブ、ランプロリズマブ、ランパリズマブ、レブリキズマブ、レマレソマブ、レンジルマブ、レルデリムマブ、レクサツムマブ、リビビルマブ、リファスツズマブベドチン、リゲリズマブ、リロトマブサテトラキセタン、リンツズマブ、リリルマブ、ロデルシズマブ、ロキベトマブ、ロルボツズマブメルタンシン、ルカツムマブ、ルリズマブペゴール、ルミリキシマブ、ルムレツズマブ、マルゲツキシマブ、マスリモマブ、マツズマブ、マブリリムマブ、メテリムマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミルベツキシマブソラブタンシン、ミツモマブ、モガムリズマブ、モロリムマブ、モロリムマブ免疫、モタビズマブ、モキセツモマブパスドトクス、ムロモナブ - C D 3 、ナコロマブタフェナトキス、ナミルマブ、ナブツモマブエスタフェナトクス、ナルナツマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネモリズマブ、ネレリモマブ、ネスバクマブ、ノフェツモマブメルベンタン、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、オデュリモマブ、オララツマブ、オロキズマブ、オナルツズマブ、オンツキシズマブ、オビシヌマブ (O p i c i n u m a b)、オポルツズマブモナトクス、オルチクマブ、オトレルツズマブ、オキセルマブ、オザネズマブ、オゾラリズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パンコマブ、パノバクマブ、パルサツズマブ、パスコリズマブ、パソツキシズマブ (P a s o t u x i z u m a b)、パテクリズマブ、パトリツマブ、ペラキズマブ、パキセリズマブ、ビナツズマブベドチン、ピンツモマブ、プラクルマブ、ポラツズマブベドチン、ポネズマブ、プリリキシマブ、プリトキサキシマブ、プリツムマブ、P R O 1 4 0 、クイリズマブ、ラコツモマブ、ラドレツマブ、ラフィビルマブ、ラルパンシズマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レファネツマブ、レガビルマブ、リロツムマブ、リヌクマブ、ロバツムマブ、ロレデュマブ、ロモソズマブ

10

20

30

40

50

、ロンタリズマブ、ロベリズマブ、ラプリズマブ、サシツズマブゴビテカン、サマリズマブ、サリルマブ、サツモマブペンデチド、セクキヌマブ、セリバンツマブ、セトキサキシマブ、セビルマブ、SGN-CD19A、SGN-CD33A、シファリムマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ、シプリズマブ、シルクマブ、ソフィツズマブベドチン、ソラネズマブ、ソリトマブ、ソネプシズマブ、ソンツズマブ、スタムルマブ、スレソマブ、スピズマブ、タバルマブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、タネズマブ、タブリツモマブパクトクス、タレクスツマブ、テフィバズマブ、テリモマブアリトクス、テナツモマブ、テネリキシマブ、テプロツムマブ、テシドルマブ、テツロマブ、TGN1412、チシリムマブ／トレメリムマブ、ティガツズマブ、チルドラキズマブ、TNX-650、トラリズマブ、トサトクスマブ、トベツマブ、トラロキヌマブ、TRBS07、トレガリズマブ、トレボグルマブ、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、ウブリツキシマブ、ウロクブルマブ、ウレルマブ、ウルトキサズマブ、バンドルツズマブベドチン (Vandortuzumab vedotin)、バンチクツマブ、バヌシズマブ、バパリキシマブ、バルリルマブ、バテリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ベセンクマブ、ビジリズマブ、ボルセツズマブマフォドチン、ボツムマブ、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ、ジラリムマブ (Ziralimumab)、ゾリモマブアリトクスなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0244】

場合によっては、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドは、細胞内でT細胞受容体 (TCR) の発現を誘導し得る。本開示の方法を使用して、例えば、様々なエピトープ (例えば、がん細胞の表面上に発現されるエピトープ、がん細胞の表面上のペプチド-MHC複合体などを含む) のいずれかに特異的なTCRを含む、任意のTCRをキメラポリペプチドによって誘導することができる。TCRは一般に、アルファ鎖及びベータ鎖を含み、主要組織適合複合体によって提示された場合に抗原を認識する。場合によっては、TCRは、操作されたTCRである。

【0245】

本開示の方法を使用して、免疫細胞活性化機能を有する任意の操作されたTCRを誘導することができる。そのようなTCRとしては、例えば、抗原特異的TCR、モノクローナルTCR (MTCR)、単鎖MTCR、高親和性CDR2変異体TCR、CD1結合MTCR、高親和性NY-ESO TCR、VYGYHLA-A24テロメラーゼTCR (例えば、PCT公開第WO2003/020763号、同第WO2004/033685号、同第WO2004/044004号、同第WO2005/114215号、同第WO2006/000830号、同第WO2008/038002号、同第WO2008/039818号、同第WO2004/074322号、同第WO2005/113595号、同第WO2006/125962、Strommes et al. Immunol Rev. 2014; 257(1): 145-64、Schmitt et al. Blood 2013; 122(3): 348-56、Chapuls et al. Sci Transl Med. 2013; 5(174): 174ra27、Thaxton et al. Hum Vaccin Immunother. 2014; 10(11): 3313-21 (PMID: 25483644)、Gschweng et al. Immunol Rev. 2014; 257(1): 237-49 (PMID: 24329801)、Hinrichs et al. Immunol Rev. 2014; 257(1): 56-71 (PMID: 24329789)、Zoete et al. Front Immunol. 2013; 4: 268 (PMID: 24062738)、Marr et al. Clin Exp Immunol. 2012; 167(2): 216-25 (PMID: 22235997)、Zhang et al. Adv Drug Deliv Rev. 2012; 64(8): 756-62 (PMID: 22178904)、Chhabra et al. Scientific World Journal. 2011; 11: 121-9 (PMID: 21218269)、Boulter et al. Clin Exp Immunol. 2005; 142(3): 454-60 (PMID: 16297157) 50

、Sami et al. *Protein Eng Des Sel.* 2007; 20 (8) : 397 - 403、Boulter et al. *Protein Eng.* 2003; 16 (9) : 707 - 11、Ashfield et al. *IDrugs.* 2006; 9 (8) : 554 - 9、Li et al. *Nat Biotechnol.* 2005; 23 (3) : 349 - 54、Dunn et al. *Protein Sci.* 2006; 15 (4) : 710 - 21、Liddy et al. *Mol Biotechnol.* 2010; 45 (2)、Liddy et al. *Nat "Med."* 2012; 18 (6) : 980 - 7、Oates, et al. *Oncoimmunology.* 2013; 2 (2) : e22891、McCormack, et al. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 Apr; 62 (4) : 773 - 85、Bossi et al. *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63 (5) : 437 - 48、及びOates, et al. *Mol Immunol.* 2015 Oct; 67 (2 Pt A) : 67 - 74に記載のものを含む)が挙げられ、これらの開示の全体が、
参考により本明細書に組み込まれる。
10

【0246】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、例えば、細胞内がん抗原を含むがん抗原を標的化する、操作されたTCRの発現を誘導する。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドによって発現されるように誘導される、操作されたTCRは、以下の表2に列挙される抗原標的を標的化する、操作されたTCRである。

【0247】

20

30

40

50

【表2】

表2：操作されたT C Rの標的

標的	HLA	参考文献
NY-ESO-1	HLA-A2	J Immunol. (2008) 180 (9) : 6116-31
MART-1	HLA-A2	J Immunol. (2008) 180 (9) : 6116-31 ; Blood. (2009) 114 (3) : 535-46
MAGE-A3	HLA-A2	J Immunother. (2013) 36 (2) : 133-51
MAGE-A3	HLA-A1	Blood. (2013) 122 (6) : 863-71
CEA	HLA-A2	Mol Ther. (2011) 19 (3) : 620-626
gp100	HLA-A2	Blood. (2009) 114 (3) : 535-46
WT1	HLA-A2	Blood. (2011) 118 (6) : 1495-503
HBV	HLA-A2	J Hepatol. (2011) 55 (1) : 103-10
gag (WT及び／または α ／6)	HLA-A2	Nat "Med." (2008) 14 (12) : 1390-5
P53	HLA-A2	Hum Gene Ther. (2008) 19 (11) : 1219-32
DR4に結合したTRA IL	該当せず	J Immunol. (2008) 181 (6) : 3769-76
HPV-16 (E6及び／またはE7)	HLA-A2	Clin Cancer Res. (2015) 21 (19) : 4431-9
スルビビン	HLA-A2	J Clin Invest. (2015) 125 (1) : 157-68
KRAS変異体	HLA-A11	Cancer Immunol Res. (2016) 4 (3) : 204-14
SSX2	HLA-A2	PLoS One. (2014) 9 (3) : e93321
MAGE-A10	HLA-A2	J ImmunoTherapy Cancer. (2015) 3 (Suppl12) : P14
MAGE-A4	HLA-A24	Clin Cancer Res. (2015) 21 (10) : 2268-77
AFP	HLA-A2	J ImmunoTherapy Cancer. (2013) 1 (Suppl11) : P10

10

20

30

【0248】

場合によっては、特定の抗原を標的化する、発現されるT C Rは、抗[抗原]T C Rと記載され得る。したがって、場合によっては、本開示のキメラポリペプチドによって発現されるように誘導され得る例示的なT C Rとしては、例えば、抗NY-ESO-1 T C R、抗M A R T - 1 T C R、抗M A G E - A 3 T C R、抗M A G E - A 3 T C R、抗C E A T C R、抗g p 1 0 0 T C R、抗W T 1 T C R、抗H B V T C R、抗g a g (W T及び／または／6) T C R、抗P 5 3 T C R、D R 4に結合した抗-T R A I L T C R、抗H P V - 1 6 (E 6及び／またはE 7) T C R、抗スルビビンT C R、抗K R A S変異体T C R、抗S S X 2 T C R、抗M A G E - A 1 0 T C R、抗M A G E - A 4 T C R、抗A F P T C Rなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0249】

場合によっては、T C Rは、抗N Y - E S O 1 T C R (例えば、抗H L A - A 2 / N Y - E S O 1 s c T v)である。場合によっては、抗N Y - E S O 1 T C Rは、以下の配列を有する。

【0250】

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

50

I P T F G R G T S L I V H P G S A D D A K K D A A K K D G K S M S I G L L C C A
 A L S L L W A G P V N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N H E
 Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G T T D R G E V P N G Y N V S R S T
 I E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S Y V G D T G E L F F G E G S R L
 T V L (配列番号 116)。

【0251】

有用な TCR としては、それらのそれぞれの抗原に対して野生型親和性を有するもの、及びそれらのそれぞれの抗原に対して増強親和性を有するものが挙げられる。それらのそれぞれの抗原に対して増強された親和性を有する TCR は、「親和性増強」TCR または「増強親和性」TCR と称され得る。TCR の親和性は、結合部位操作（すなわち、合理的設計）、スクリーニング（例えば、TCR 提示）などを含むが、これらに限定されない、任意の簡便な手段によって増強することができる。親和性増強 TCR、及び親和性増強 TCR を生成する方法の非限定的な例としては、例えば、PCT 公開第 20150118208 号、同第 2013256159 号、同第 20160083449 号、同第 20140349855 号、同第 20100113300 号、同第 20140371085 号、同第 20060127377 号、同第 20080292549 号、同第 20160280756 号、同第 20140065111 号、同第 20130058908 号、同第 20110038842 号、同第 20110014169 号、同第 2003276403 号などに記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、これらの開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0252】

有用な TCR には、場合によっては、1 つ以上のシステイン修飾を含む修飾 TCR 鎖も含まれ得る。そのようなシステイン修飾は、2 つの修飾 TCR 鎖間で対合され得る。2 つの TCR 鎖間で対合された場合、対応する修飾は、対合した鎖間に組み換えジスルフィド結合をもたらし得る。

20

【0253】

いくつかの実施形態において、TCR は、アルファ鎖内に第 1 のシステイン修飾及びベータ鎖内に第 2 のシステイン修飾を含んでもよく、第 1 及び第 2 のシステイン修飾は、両方の鎖が細胞内に存在する場合、アルファ鎖とベータ鎖との間に組み換えジスルフィド結合を形成する。組み換えジスルフィド結合を形成するそのようなシステイン修飾は、「対応するシステイン修飾」と称され得る。

30

【0254】

場合によっては、修飾 TCR アルファ鎖は、組み換えジスルフィド結合を生成するために十分なシステイン修飾をもたらす、システインへの残基の置換を含み得る。システインへの変異時に組み換えジスルフィド結合をもたらす、TCR ベータ鎖内に対応する残基を有する TCR アルファ鎖の任意の適切な残基を、システイン修飾アルファ鎖の生成に用いることができる。場合によっては、置換される残基は、TCR アルファ定常領域内に存在する残基である。場合によっては、置換は、チロシンからシステインへの置換である。場合によっては、置換は、以下のヒト TCR アルファ鎖定常領域配列、P N I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D M R S M D F K S N S A V A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S S C D V K L V E K S F E T D T N L N F Q N L S V I G F R I L L K V A G F N L L M T L R L W S S (配列番号 131) に存在する T48C 置換などの、T48C 置換または対応する変異である。場合によっては、置換は、以下のマウス TCR アルファ鎖定常領域配列、P Y I Q N P E P A V Y Q L K D P R S Q D S T L C L F T D F D S Q I N V P K T M E S G T F I T D K T V L D M K A M D S K S N G A I A W S N Q T S F T C Q D I F K E T N A C Y P S S D V P C D A T L T E K S F E T D M N L N F Q N L S V M G L R I L L K V A G F N L L M T L R L W S S (配列番号 132) に存在する T84C 置換などの、T84C 置換または対応する変異である。

40

【0255】

50

場合によっては、主題の T C R アルファ鎖またはその対応するドメイン（例えば、アルファ可変ドメイン、アルファ定常ドメイン、アルファ膜貫通ドメイン、アルファ接続ペプチドドメインなど）は、例えば、上記に提示される T 4 8 C または T 8 4 C 含有 T C R アルファ配列などのシステイン修飾アルファ鎖と少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有し得る。

【 0 2 5 6 】

場合によっては、修飾 T C R ベータ鎖は、組み換えジスルフィド結合を生成するために十分なシステイン修飾をもたらす、システインへの残基の置換を含み得る。システインへの変異時に組み換えジスルフィド結合をもたらす、 T C R ベータ鎖内に対応する残基を有する T C R ベータ鎖の任意の適切な残基を、システイン修飾ベータ鎖の生成に用いることができる。場合によっては、置換される残基は、 T C R ベータ定常領域内に存在する残基である。場合によっては、置換は、セリンからシステインへの置換である。場合によっては、置換は、以下のヒト T C R ベータ鎖定常領域配列、 E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A T G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V C T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y C L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S V S Y Q Q G V L S A T I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D F (配列番号 1 3 3) に存在する S 5 8 C 置換などの、 S 5 8 C 置換または対応する変異である。場合によっては、置換は、以下のマウス T C R ベータ鎖定常領域配列、 E D L R N V T P P K V S L F E P S K A E I A N K Q K A T L V C L A R G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q A Y K E S N Y S Y C L S S R L R V C A T F W H N P R N H F R C Q V Q F H G L S E E D K W P E G S P K P V T Q N I S A E A W G R A D C G I T S A S Y Q Q G V L S A T I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S T L V V M A M V K R K N S (配列番号 1 3 4) に存在する S 7 9 C 置換などの、 S 7 9 C 置換または対応する変異である。

【 0 2 5 7 】

場合によっては、主題の T C R ベータ鎖またはその対応するドメイン（例えば、ベータ可変ドメイン、ベータ定常ドメイン、ベータ膜貫通ドメイン、ベータ接続ペプチドドメインなど）は、例えば、上記に提示される S 5 8 C または S 7 9 C 含有 T C R アルファ配列などのシステイン修飾ベータ鎖と少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有し得る。

【 0 2 5 8 】

場合によっては、治療 P O I は、自然免疫応答誘導因子であり得る。本明細書で使用される場合、「自然免疫応答誘導因子」は、哺乳動物における発現時に自然免疫応答を誘導する任意のタンパク質を意味する。自然免疫誘導因子としては、例えば、細菌由来のタンパク質またはそれらの断片、ウイルス由来のタンパク質またはそれらの断片、真菌由来のタンパク質またはそれらの断片、哺乳動物寄生虫（例えば、ヒト寄生虫を含む）由来のタンパク質またはそれらの断片が挙げられるが、これらに限定されない。哺乳動物細胞による発現時に自然免疫応答を誘導する任意のタンパク質が、本開示の自然免疫誘導因子として用途を見出しえる。場合によっては、自然免疫応答誘導因子は、フラゲリンタンパク質であり得る。

【 0 2 5 9 】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、キメラポリペプチドの特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが細胞内の核酸配列からの自然免疫応答誘導因子の転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、ペプチド - M H C 特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが自然免疫応答誘導因子の転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。

10

20

30

40

50

【0260】

場合によっては、治療P O Iは、免疫抑制因子であり得る。本明細書で使用される場合、「免疫抑制因子」は、哺乳動物における発現時に免疫応答を抑制する任意のタンパク質を意味する。免疫抑制因子としては、例えば、免疫抑制サイトカイン（例えば、IL-10）、免疫抑制細胞間シグナリングリガンド（例えば、PD-L1）、免疫抑制分泌タンパク質（例えば、TGF-ベータ）、免疫抑制抗体（例えば、抗CD3抗体（例えば、Orthoclone OKT3（ムロモナブ-CD3としても知られる）など）、抗CD25抗体（例えば、バシリキシマブ、ダクリズマブなど）抗CD52抗体（例えば、Campath-1H（アレムツズマブとしても知られる）など）などが挙げられるが、これらに限定されない。哺乳動物細胞による発現時に免疫応答を抑制する任意のタンパク質が、本開示の免疫抑制因子として用途を見出しえる。場合によっては、免疫抑制因子は、IL-10であり得る。場合によっては、免疫抑制因子は、PD-L1であり得る。場合によっては、免疫抑制因子は、TGF-ベータであり得る。場合によっては、免疫抑制因子は、免疫抑制抗体（例えば、（例えば、抗CD3抗体（例えば、Orthoclone OKT3（ムロモナブ-CD3としても知られる）など）、抗CD25抗体（例えば、バシリキシマブ、ダクリズマブなど）、抗CD52抗体（例えば、Campath-1H（アレムツズマブとしても知られる）など）であり得る。

10

【0261】

場合によっては、キメラポリペプチドは、例えば、免疫抑制サイトカイン及び免疫抑制細胞間シグナリングリガンド、2つ以上の免疫抑制サイトカイン、2つ以上の免疫抑制細胞間シグナリングリガンドなどを含む、2つ以上の免疫抑制因子の発現を推進し得る。場合によっては、キメラポリペプチドは、IL-10及びPD-L1の両方の発現を推進し得る。場合によっては、キメラポリペプチドは、3つ以上の免疫抑制因子の発現を推進し得る。

20

【0262】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、キメラポリペプチドの特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが細胞内の核酸配列からの免疫抑制因子の転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドは、ペプチド-MHC特異的結合パートナーへの結合時に、キメラポリペプチドの細胞内ドメインが免疫抑制因子の転写を誘導するように、細胞上で発現され得る。

30

【0263】

場合によっては、治療P O Iは、ケモカインであり得る。発現されるケモカインは、細胞遊走を含むが、これに限定されない、1つ以上の細胞挙動に影響を与える。場合によっては、本開示のキメラ受容体ポリペプチドの細胞内ドメインは、ケモカインの発現を誘導し得る。好適なケモカインの例としては、例えば、MIP-1、MIP-1、MCP-1、RANTES、IP10などが挙げられる。好適なケモカインの追加の例としては、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド-2(CCL2、単球走化性タンパク質-1またはMCP1とも称される)、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド-3(CCL3、マクロファージ炎症性タンパク質-1AまたはMIP1Aとも称される)、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド-5(CCL5、RANTESとしても知られる)、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド-17(CCL17、胸腺及び活性化制御ケモカインまたはTARCとしても知られる)、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド-19(CCL19、EBI1リガンドケモカインまたはELCとしても知られる)、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド-21(CCL21、6CKineとしても知られる)、C-Cケモカイン受容体7型(CCR7)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド9(CXCL9、ガムマインターフェロンによって誘導されるモノカインまたはMIGとしても知られる)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド10(CXCL10、インターフェロンガム誘導タンパク質10またはIP-10としても知られる)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド11(CXCL11、インターフェロン誘導性T細胞アルフ

40

50

ア化学誘引物質またはI-TACとも呼ばれる)、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド16(CXCL16)、ケモカイン(Cモチーフ)リガンド(XCL1)、リンホタクチンとしても知られる)、及びマクロファージコロニー刺激因子(MCSF)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0264】

本明細書に記載のキメラポリペプチドならびに方法及び回路における使用に適合され得る、特定の細胞内ドメイン及びそれらの構成要素としては、例えば、PCT出願第U.S.2016/019188号(公開第WO2016/138034号)に記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0265】

追加のポリペプチド

本開示のキメラポリペプチドは、1つ以上の追加のポリペプチドを更に含んでもよく、好適な追加のポリペプチドとしては、シグナル配列、エピトープタグ、親和性ドメイン、核局在化シグナル(NLS)、及び検出可能なシグナルを生成するポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。1つ以上の追加の配列は、適切な場合、例えば、N末端、C末端、2つのドメイン間(例えば、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、細胞外ドメインとN-terminusレセプターポリペプチドとの間、N-terminusレセプターポリペプチドと細胞内シグナリングドメインとの間など)を含む、本質的にどの位置でもキメラポリペプチドに付加されてもよい。追加の配列は、他のドメインとは独立してキメラポリペプチドと共に機能しても、キメラポリペプチドの任意のドメインと関連し、それと共に機能してもよい。

【0266】

本開示のキメラポリペプチドにおける使用に好適であるシグナル配列としては、天然に存在するシグナル配列、合成(例えば、人工)シグナル配列などを含む、任意の真核生物シグナル配列が挙げられる。

【0267】

好適なエピトープタグとしては、赤血球凝集素(HA、例えば、YPYDVPDYA(配列番号117)、FLAG(例えば、DYKDDDDK(配列番号118)、c-myc(例えば、EQKLISEEDEL、配列番号119)などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0268】

親和性ドメインは、例えば、特定または精製に有用である固体支持体上に固定化されたものなどの、結合パートナーと相互作用し得るペプチド配列を含む。ヒスチジンなどの複数の連続した单アミノ酸は、本開示のキメラポリペプチドに融合している場合、ニッケルSepharoseなどの樹脂カラムへの高親和性結合によって組み換えキメラポリペプチドの1ステップ精製に使用することができる。例示的な親和性ドメインとしては、His5(HHHHH)(配列番号120)、His6(HHHHHH)(配列番号121)、C-myc(EQKLISEEDEL)(配列番号119)、Flag(DYKDDDDK)(配列番号118)、StrepTag(WSHPPQEKK)(配列番号122)、赤血球凝集素、例えば、HAタグ(YPYDVPDYA)(配列番号117)、GST、チオレドキシン、セルロース結合ドメイン、RYIRS(配列番号123)、Phenylalanine-His-His-Thr(配列番号124)、キチン結合ドメイン、S-ペプチド、T7ペプチド、SH2ドメイン、C末端RNAタグ、WEAAAREACCRECCARA(配列番号125)、金属結合ドメイン、例えば、亜鉛結合ドメインまたはカルシウム結合ドメイン(例えば、カルモジュリン、トロポニンC、カルシニューリンB、ミオシン軽鎖、リカバリン、S-モジュリン、ビジニン、VILIP、ニューロカルシン、ヒポカルシン、フリクエニン、カルトラクチン、カルパイン大サブユニット、S100タンパク質、パルブルアルブミン、カルビンディンD9K、カルビンディンD28K、及びカルレチニンなどのカルシウム結合タンパク質由来のもの)、インテイン、ビオチン、ストレプトアビジン、MyoD、Id、ロイシンジッパー配列、ならびにマルトース結合タンパク質が

10

20

30

40

50

挙げられる。

【0269】

好適な核局在化シグナル（「NLS」、本明細書では「核局在化配列」とも称される）としては、例えば、PKKKRKV（配列番号126）、KRPAATKKAGQAKKKK（配列番号127）、MVPKKKRK（配列番号128）、MAPKKKRKVGIHGVPA（配列番号129）などが挙げられる。NLSは、本開示のキメラポリペプチドのN末端、本開示のキメラポリペプチドのN末端付近（例えば、N末端の5アミノ酸以内、10アミノ酸以内、もしくは20アミノ酸以内）、本開示のキメラポリペプチドのC末端、本開示のキメラポリペプチドのC末端付近（例えば、Cの末端の5アミノ酸以内、10アミノ酸以内、もしくは20アミノ酸以内）、または本開示のキメラポリペプチド内部に存在し得る。

10

【0270】

好適な検出可能なシグナル生成タンパク質としては、例えば、蛍光タンパク質、産物として検出可能なシグナルを生成する反応を触媒する酵素などが挙げられる。

【0271】

好適な蛍光タンパク質としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）またはそのバリエント、GFPの青色蛍光バリエント（BFP）、GFPのシアン蛍光バリエント（CFP）、GFPの黄色蛍光バリエント（YFP）、増強GFP（EGFP）、増強CFP（ECCFP）、増強YFP（EYFP）、GFP S65T、Emerald、Topaz（TYFP）、Venus、Citrine、mCitrine、GFPuv、不安定化EGFP（dEGFP）、不安定化ECFP（dECCFP）、不安定化EYFP（dEYFP）、mCFPm、Cerulean、T-Sapphire、CyPet、YPet、mKO、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、DsRed-monomer、J-Red、dimer2、t-dimer2（12）、mRFP1、ポシロポリン、Renilla GFP、Monster GFP、pAGFP、Kaedeタンパク質及びキンドリングタンパク質、フィコビリンタンパク質及びフィコビリンタンパク質共役体（B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン、及びアロフィコシアニンを含む）が挙げられるが、これらに限定されない。蛍光タンパク質の他の例としては、mHoneydew、mBanana、mOrange、dTOMATO、tdTOMATO、mTangerine、mStrawberry、mCherry、mGrape1、mRaspberry、mGrape2、mPlum（Shaner et al. (2005) Nat. Methods 2: 905-909）などが挙げられる。例えば、Matz et al. (1999) Nature Biotechnol. 17: 969-973に記載の、Anthozoa種由来の様々な蛍光及び有色タンパク質のいずれの使用も好適である。

20

【0272】

好適な酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、ベータ-ガラクトシダーゼ（GAL）、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、ベータ-N-アセチルグルコサミニダーゼ、-グルクロニダーゼ、インペルターゼ、キサンチンオキシダーゼ、ホタルルシフェラーゼ、グルコース酸化酵素（GO）などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0273】

本明細書に記載のキメラポリペプチドならびに方法及び回路における使用に適合され得る、特定の追加のポリペプチド及びそれらの構成要素としては、例えば、PCT出願第US 2016/019188号（公開第WO 2016/138034号）に記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0274】

核酸

本開示は、本開示のタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドをコードする

50

ヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、発現ベクター内に含有される。したがって、本開示は、本開示のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む組み換え発現ベクターを提供する。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、転写制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）に作動可能に連結される。場合によっては、転写制御要素は、誘導性である。場合によっては、転写制御要素は、恒常的である。場合によっては、プロモーターは、真核細胞内で機能性である。場合によっては、プロモーターは、細胞型特異的プロモーターである。場合によっては、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。

【0275】

10

利用される宿主／ベクター系に応じて、恒常的及び誘導性プロモーター、転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含む、いくつかの好適な転写及び翻訳制御要素のいずれが、発現ベクター内で使用されてもよい（例えば、Bittner et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153: 516 - 544 を参照されたい）。

【0276】

20

プロモーターは、恒常的に活性なプロモーター（すなわち、恒常的に活性／「オン」の状態にあるプロモーター）であってもよく、それは、誘導性プロモーター（すなわち、その状態（活性／「オン」または不活性／「オフ」）が外部刺激（例えば、特定の温度、化合物、またはタンパク質の存在）によって制御されるプロモーター）であってもよく、それは、空間的に制限されたプロモーター（すなわち、転写制御要素、エンハンサーなど）（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーターなど）であってもよく、それは、時間的に制限されたプロモーター（すなわち、プロモーターは、胚発生の特定の段階中または生物学的プロセス（例えば、マウスにおける毛包周期など）の特定の段階中に「オン」状態または「オフ」状態にある）であってもよい。

【0277】

30

好適なプロモーター及びエンハンサー要素は、当該技術分野において既知である。細菌細胞内での発現のために、好適なプロモーターとしては、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダP、及びtrcが挙げられるが、これらに限定されない。真核細胞内での発現のために、好適なプロモーターとしては、軽鎖及び／または重鎖免疫グロブリン遺伝子プロモーター及びエンハンサー要素、サイトメガロウイルス最初期プロモーター、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター、初期及び後期SV40プロモーター、レトロウイルスの末端反復配列内に存在するプロモーター、マウスマタロチオネイン-Iプロモーター、ならびに様々な当該技術分野において既知である組織特異的プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0278】

40

場合によっては、本明細書に記載の核酸の転写制御要素は、シス作用制御配列を含み得る。任意の好適なシス作用制御配列が、本明細書に記載の核酸において用途を見出し得る。例えば、場合によっては、シス作用制御配列は、上流活性化配列（upstream activating sequence）または上流活性化配列（upstream activation sequence）（UAS）であっても、それを含んでもよい。場合によっては、本明細書に記載の核酸のUASは、Gal4応答性UASであってもよい。

【0279】

50

可逆誘導性プロモーターを含む好適な可逆プロモーターが、当該技術分野において既知である。そのような可逆プロモーターは、多くの生物（例えば、真核生物及び原核生物）から単離しても、それらに由来してもよい。第2の生物において使用するための、第1の生物由来の可逆プロモーターの修飾（例えば、第1の原核生物及び第2の真核生物、第1の真核生物及び第2の原核生物など）が、当該技術分野において周知である。そのような可逆プロモーター、及びそのような可逆プロモーターに基づくが追加の制御タンパク質も

また含む系としては、アルコール制御プロモーター（例えば、アルコール脱水素酵素 I (a l c A) 遺伝子プロモーター、アルコールトランス活性化因子タンパク質 (A l c R) に応答性のプロモーターなど）、テトラサイクリン制御プロモーター（例えば、T e t A c t i v a t o r、T e t O N、T e t O F Fなどを含むプロモーター系）、ステロイド制御プロモーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体プロモーター系、ヒトエストロゲン受容体プロモーター系、レチノイドプロモーター系、甲状腺プロモーター系、エクジソンプロモーター系、ミフェプリストンプロモーター系など）、金属制御プロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター系など）、病原性関連制御プロモーター（例えば、サリチル酸制御プロモーター、エチレン制御プロモーター、ベンゾチアジアゾール制御プロモーターなど）、温度制御プロモーター（例えば、熱ショック誘導性プロモーター（例えば、H S P - 7 0、H S P - 9 0、大豆熱ショックプロモーターなど）、光制御プロモーター、合成誘導性プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。 10

【 0 2 8 0 】

使用に好適である誘導性プロモーターとしては、本明細書に記載されるか、または当業者に既知である、任意の誘導性プロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターの例としては、非限定的に、アルコール制御プロモーターなどの化学／生化学制御及び物理制御プロモーター、テトラサイクリン制御プロモーター（例えば、テトラサイクリン抑制因子タンパク質 (t e t R)、テトラサイクリン作動配列 (t e t O)、及びテトラサイクリントランス活性化因子融合タンパク質 (t T A) を含む、アンヒドロテトラサイクリン (a T c) 応答性プロモーター及び他のテトラサイクリン応答性プロモーター系）、ステロイド制御プロモーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体、ヒトエストロゲン受容体、ガエクジソン受容体に基づくプロモーター、及びステロイド／レチノイド／甲状腺受容体スーパーファミリー由来のプロモーター）、金属制御プロモーター（例えば、酵母、マウス、及びヒト由来のメタロチオネイン（金属イオンに結合して隔絶するタンパク質）遺伝子）由来のプロモーター、（例えば、サリチル酸、エチレン、またはベンゾチアジアゾール (B T H) によって誘導される）病原性制御プロモーター、温度／熱誘導性プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター）、ならびに光制御プロモーター（例えば、植物細胞由来の光応答性プロモーター）が挙げられる。 20

【 0 2 8 1 】

場合によっては、プロモーターは、C D 8 細胞特異的プロモーター、C D 4 細胞特異的プロモーター、好中球特異的プロモーター、またはN K 特異的プロモーターである。例えば、C D 4 遺伝子プロモーターが使用されてもよく、例えば、S a l m o n e t a l . (1993) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 7 7 3 9、及びM a r o d o n e t a l . (2003) B l o o d 1 0 1 : 3 4 1 6 を参照されたい。別の例として、C D 8 遺伝子プロモーターが使用されてもよい。N K 細胞特異的発現は、N c r 1 (p 4 6) プロモーターの使用によって達成することができ、例えば、E c k e l h a r t e t a l . (2011) B l o o d 1 1 7 : 1 5 6 5 を参照されたい。 30

【 0 2 8 2 】

場合によっては、本開示のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、組み換え発現ベクターであるか、または組み換え発現ベクター内に含まれる。いくつかの実施形態において、組み換え発現ベクターは、ウイルス構築物、例えば、組み換えアデノ関連ウイルス (A A V) 構築物、組み換えアデノウイルス構築物、組み換えレンチウイルス構築物、組み換えレトロウイルス構築物などである。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、組み換えレンチウイルスベクターである。場合によっては、本開示のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、組み換えA A Vベクターである。 40

【 0 2 8 3 】

好適な発現ベクターとしては、ウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルスに基づくウイルスベクター（例えば、L i e t a l . , I n v e s t O p t h a l m o l V i s S c i 3 5 : 2 5 4 3 2 5 4 9 , 1 9 9 4、 50

Borrás et al., Gene Ther 6: 515-524, 1999, Li and Davidson, PNAS 92: 7700-7704, 1995, Sakamoto et al., Hum Gene Ther 5: 1088-1097, 1999, WO 94/12649, WO 93/03769, WO 93/19191, WO 94/28938, WO 95/11984, 及びWO 95/00655を参照されたい)、アデノ関連ウイルス(例えば、Ali et al., Hum Gene Ther 9: 81-86, 1998, Flannery et al., PNAS 94: 6916-6921, 1997, Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38: 2857-2863, 1997, Jomary et al., Gene Ther 4: 683-690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10: 641-648, 1999, Ali et al., Hum Mol Gene 10
t 5: 591-594, 1996, SrivastavaのWO 93/09239, Samulski et al., J. Virol. (1989) 63: 3822-3828, Mendelson et al., Virol. (1988) 166: 154-165、及び Flotte et al., PNAS (1993) 90: 10613-10617を参照されたい)、SV40、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(例えば、Miyoshi et al., PNAS 94: 10319-23, 1997, Takahashi et al., J. Virol. 73: 7812-7816, 1999を参照されたい)、レトロウイルスベクター(例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ならびにラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、及び乳房腫瘍ウイルスなどのレトロウイルス由来のベクター)などが挙げられるが、これらに限定されない。場合によっては、ベクターは、レンチウイルスベクターである。ピギーバックベクター及びスリーピングビューティーベクターなどのトランスポゾン媒介ベクターもまた好適である。

【0284】

本開示の核酸は、目的のポリペプチド(POI)をコードする核酸配列を含み得る。POIは、本質的に任意のポリペプチドであり得、研究目的のポリペプチド(例えば、レポーターポリペプチド、変異ポリペプチド、新規合成ポリペプチドなど)、治療目的のポリペプチド(例えば、天然に存在する治療タンパク質、組み換え治療ポリペプチドなど)、産業目的のポリペプチド(例えば、産業用途(例えば、製造など)において使用されるポリペプチド)などを含み得るが、これらに限定されない。

【0285】

場合によっては、POIは、転写活性化因子であり得る。場合によっては、POIは、CARであり得る。場合によっては、POIは、TCRであり得る。場合によっては、POIは、抗体であり得る。場合によっては、POIは、キメラ二重特異的結合メンバーであり得る。場合によっては、POIは、自然免疫応答誘導因子であり得る。場合によっては、POIは、免疫抑制因子であり得る。場合によっては、POIは、本明細書に記載の(例えば、本明細書に記載の多構成要素回路において使用される)タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドであり得る。

【0286】

本明細書に記載のキメラポリペプチドならびに方法及び回路における使用に適合され得る、特定の核酸及びそれらの構成要素としては、例えば、PCT出願第US 2016/019188号(公開第WO 2016/138034号)に記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0287】

細胞

本開示は、本明細書に記載のキメラポリペプチドを発現するように操作された細胞を含む。場合によっては、本開示の細胞は、本明細書に記載のキメラポリペプチドをコードする核酸を含む。場合によっては、本開示の細胞は、本開示のキメラポリペプチドの解放された細胞内ドメインに応答性であり、それによりキメラポリペプチドの活性化時に核酸の

10

20

30

40

50

発現を誘導する、転写制御要素（例えば、転写活性化因子）に作動可能に連結された核酸を含む。任意の目的のポリペプチドが、本開示のキメラポリペプチドに応答性の転写制御要素に作動可能に連結した細胞内の核酸からコードされ得る。

【0288】

本開示の方法を使用して、任意の真核細胞の活性を調節することができる。場合によつては、細胞は、インビボである。場合によつては、細胞は、エキソビボである。場合によつては、細胞は、インビトロである。場合によつては、細胞は、哺乳動物細胞である。場合によつては、細胞は、ヒト細胞である。場合によつては、細胞は、非ヒト靈長類細胞である。場合によつては、細胞は、齧歯類細胞である。場合によつては、細胞は、マウス細胞である。場合によつては、細胞は、ラット細胞である。

10

【0289】

好適な細胞としては、神経細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、免疫細胞、心臓細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、肺細胞などが挙げられる。

【0290】

好適な細胞としては、幹細胞（例えば、胚性幹（E S）細胞、誘導多能性幹（i P S）細胞）、胚細胞（例えば、卵母細胞、精子、卵原細胞、精原細胞など）、体細胞、例えば、線維芽細胞、オリゴデンドロサイト、グリア細胞、造血細胞、ニューロン、筋細胞、骨細胞、肝細胞、膵臓細胞などが挙げられる。

【0291】

好適な細胞としては、ヒト胚性幹細胞、胎児心筋細胞、筋線維芽細胞、間葉系幹細胞、自家移植増殖心筋細胞、脂肪細胞、全能性細胞、多能性細胞、血液幹細胞、筋芽細胞、成体幹細胞、骨髓細胞、間葉系細胞、胚性幹細胞、実質細胞、上皮細胞、内皮細胞、中皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、外来細胞、内在細胞、幹細胞、造血幹細胞、骨髓由来前駆細胞、心筋細胞、骨格細胞、胎児細胞、未分化細胞、多能性前駆細胞、単能性前駆細胞、単球、心筋芽細胞、骨格筋芽細胞、マクロファージ、毛細血管内皮細胞、異種間細胞、同種間細胞、及び出生後幹細胞が挙げられる。

20

【0292】

場合によつては、細胞は、免疫細胞、ニューロン、上皮細胞、及び内皮細胞、または幹細胞である。場合によつては、免疫細胞は、T細胞、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、またはマクロファージである。場合によつては、免疫細胞は、細胞傷害性T細胞である。場合によつては、免疫細胞は、ヘルパーT細胞である。場合によつては、免疫細胞は、制御T細胞（T r e g）である。

30

【0293】

場合によつては、細胞は、幹細胞である。場合によつては、細胞は、誘導多能性幹細胞である。場合によつては、細胞は、間葉系幹細胞である。場合によつては、細胞は、造血幹細胞である。場合によつては、細胞は、成体幹細胞である。

【0294】

好適な細胞としては、気管支肺胞上皮幹細胞（B A S C）、バルジ上皮幹細胞（b E S C）、角膜上皮幹細胞（C E S C）、心筋幹細胞（C S C）、表皮神経堤幹細胞（e N C S C）、胚性幹細胞（E S C）、内皮前駆細胞（E P C）、肝臓卵形細胞（H O C）、造血幹細胞（H S C）、ケラチノサイト幹細胞（K S C）、間葉系幹細胞（M S C）、神経幹細胞（N S C）、膵幹細胞（P S C）、網膜幹細胞（R S C）、及び皮膚由来前駆体（S K P）が挙げられる。

40

【0295】

場合によつては、幹細胞は、造血幹細胞（H S C）であり、転写因子は、H S Cの分化を誘導して、赤血球細胞、血小板、リンパ球、単球、好中球、好塩基球、または好酸球へと分化させる。場合によつては、幹細胞は、間葉系幹細胞（M S C）であり、転写因子は、骨、軟骨、平滑筋、腱、靭帯、間質、髄、真皮、または脂肪の細胞などの結合組織細胞へのM S Cの分化を誘導する。

【0296】

50

本開示の細胞は、例えば、本開示の核酸で修飾された遺伝子改変宿主細胞、すなわち、本開示のキメラポリペプチドをコードするスクレオチド配列を含む核酸で遺伝子改変された宿主細胞であってもよい。一実施形態において、本開示は、細胞（例えば、本発明の核酸を含有するように遺伝子改変された宿主細胞）内で異種ポリペプチドの発現を誘導する方法を提供する。本方法は一般に、細胞を、本開示のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーの結合パートナーと接触させることに関与する。そのような結合は、1つ以上のタンパク質分解切断部位でのN o t c h レセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより細胞内ドメインを放出する。細胞内ドメインの放出は、細胞の活性を調節（例えば、異種遺伝子またはコード配列の発現を誘導）し得る。

【0297】

10

一実施形態において、本開示の方法は一般に、細胞を、本開示のキメラポリペプチドの特異的結合メンバーに結合するペプチド-MHCと接触させることに関与する。そのような結合は、1つ以上のタンパク質分解切断部位でのN o t c h レセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより細胞内ドメインを放出する。細胞内ドメインの放出は、細胞の活性を調節（例えば、異種遺伝子またはコード配列の発現を誘導）し得る。

【0298】

場合によっては、細胞は、真核細胞である。場合によっては、細胞は、哺乳動物細胞、両生類細胞、爬虫類細胞、鳥類細胞、または植物細胞である。場合によっては、細胞は、植物細胞である。

【0299】

20

場合によっては、細胞は、哺乳動物細胞である。場合によっては、細胞は、ヒト細胞である。場合によっては、細胞は、マウス細胞である。場合によっては、細胞は、ラット細胞である。場合によっては、細胞は、非ヒト靈長類細胞である。場合によっては、細胞は、ウサギ類細胞である。場合によっては、細胞は、有蹄動物細胞である。

【0300】

場合によっては、細胞は、免疫細胞、例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、単球などである。場合によっては、細胞は、T細胞である。場合によっては、細胞は、細胞傷害性T細胞（例えば、CD8⁺ T細胞）である。場合によっては、細胞は、ヘルパーT細胞（例えば、CD4⁺ T細胞）である。場合によっては、細胞は、制御T細胞（「Treg」）である。場合によっては、細胞は、B細胞である。場合によっては、細胞は、マクロファージである。場合によっては、細胞は、樹状細胞である。場合によっては、細胞は、末梢血単核球である。場合によっては、細胞は、単球である。場合によっては、細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞である。場合によっては、細胞は、CD4⁺、FOXP3⁺ Treg細胞である。場合によっては、細胞は、CD4⁺、FOXP3⁻ Treg細胞である。

30

【0301】

場合によっては、細胞は、個体から得られる。例えば、場合によっては、細胞は、初代細胞である。別の例として、細胞は、個体から得られる幹細胞または前駆細胞である。

【0302】

40

非限定的な一例として、場合によっては、細胞は、個体から得られる免疫細胞である。一例として、細胞は、個体から得られるTリンパ球である。別の例として、細胞は、個体から得られる細胞傷害性細胞（例えば、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞など）である。別の例として、細胞は、個体から得られるヘルパーT細胞であり得る。別の例として、細胞は、個体から得られるNK細胞であり得る。別の例として、細胞は、個体から得られるマクロファージであり得る。別の例として、細胞は、個体から得られる樹状細胞であり得る。別の例として、細胞は、個体から得られるB細胞であり得る。別の例として、細胞は、個体から得られる末梢血単核球であり得る。

【0303】

場合によっては、宿主細胞は、体細胞、例えば、線維芽細胞、造血細胞、ニューロン、

50

臍臍細胞、筋細胞、骨細胞、肝細胞、脾臍細胞、上皮細胞、内皮細胞、心筋細胞、T細胞、B細胞、骨細胞などである。

【0304】

場合によっては、細胞は、例えば、2つの異なる本開示のキメラポリペプチド、3つの異なる本開示のキメラポリペプチド、4つの異なる本開示のキメラポリペプチド、5つの異なる本開示のキメラポリペプチドなどを含むが、これらに限定されない、2つ以上の異なる本開示のキメラポリペプチドを発現するように遺伝子改変されている。

【0305】

キメラポリペプチドにおける使用に適合され得る、及び／または本明細書に記載の方法及び回路において調節され得る、特定の細胞ならびにそれらの構成要素及び活性としては、例えば、PCT出願第US2016/019188号（公開第WO2016/138034号）に記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0306】

回路

本開示のキメラポリペプチドの細胞内ドメインは、細胞外ドメインの特異的結合メンバーへの結合パートナーの結合時に放出されると、本明細書に記載の様々なポリペプチドの発現を誘導し得る。場合によっては、2つ以上のポリペプチドの誘導された発現は、論理開閉型回路を生成し得る。そのような論理開閉型回路としては、例えば、高次ANDゲート、高次ORゲート、高次NOTゲート、高次組み合わせゲート（すなわち、AND、OR、及び／またはNOTゲートのいくつかの組み合わせを使用するゲート）を含む、例えば、高次ゲートを含む、例えば、「ANDゲート」、「ORゲート」、「NOTゲート」、及びそれらの組み合わせを挙げることができるが、これらに限定されない。

20

【0307】

本開示の「AND」ゲートは、シグナルの伝播に2つ以上の入力が必要とされる場合を含む。例えば、場合によっては、ANDゲートは、本開示のキメラポリペプチド及び第2の結合依存分子を通したシグナリングを可能にする。ANDゲートでは、2つの入力、例えば、回路を通したシグナリングに2つの抗原が必要とされる。

【0308】

本開示の「OR」ゲートは、2つ以上の入力のいずれかがシグナルの伝播を可能にする場合を含む。例えば、場合によっては、ORゲートは、本開示の2つの異なるキメラポリペプチドのいずれかを通したシグナリングを可能にする。ORゲートでは、いずれか1つの入力、例えば、2つの抗原のいずれかが、回路のシグナリング出力を誘導し得る。一実施形態において、ORゲートは、2つの別々の分子または構築物の使用を通して達成され得る。別の実施形態において、ORゲートは、例えば、各々が異なる結合パートナーに結合するが、いずれかがキメラポリペプチドを活性化することができる、2つの異なる特異的結合メンバーを有するタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドを含む、2つの抗原を認識する単一の構築物の使用を通して達成され得る。場合によっては、ORゲートは、例えば、各々が異なる抗原に結合するが、いずれかの抗原がキメラポリペプチドを活性化することができる、2つの異なる抗体特異的結合メンバーを有するタンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドを含む、2つの抗原を認識する単一の構築物の使用を通して達成され得る。

30

40

【0309】

本開示の「NOT」ゲートは、入力がシグナルの伝播を予防することができる場合を含む。例えば、場合によっては、NOTゲートは、本開示のキメラポリペプチドを通したシグナリングを阻害する。一実施形態において、NOTゲートは、結合相互作用の阻害を含み得る。例えば、本開示の分離キメラポリペプチドの一部の結合を予防する競合的阻害剤は、回路を通したシグナリングを予防するNOTゲートとして機能し得る。別の実施形態において、NOTゲートは、回路の要素の機能的阻害を含み得る。例えば、本開示のキメラポリペプチドを通したシグナリング、または回路を通したシグナリングの結果を機能的

50

に予防する阻害剤は、NOTゲートとして機能し得る。

【0310】

場合によっては、免疫抑制物質（例えば、免疫抑制因子）の生成は、本明細書に記載の多入力回路においてNOTゲート機能性を提供し得る。

【0311】

多入力ゲートは、様々な異なる方法でNOTゲートを利用して、回路のいくつかの他の構成要素を通したシグナリングを予防するか、またはNOTゲートを活性化するシグナル（例えば、特定の陰性抗原）が存在する場合及び／または場所で細胞応答をオフにし得る。例えば、AND + NOTゲートは、第1の抗原の存在下で特定の細胞活性に正の影響を与える本開示のキメラポリペプチドと、第2の抗原の存在下で特定の細胞活性に負の影響を与える本開示のキメラポリペプチドとを含み得る。

10

【0312】

場合によっては、本開示の回路は、細胞内抗原のペプチドを提示するペプチド-MHC複合体に特異的な特異的結合メンバーによって提供される細胞内抗原の認識を利用し得る。細胞内抗原認識を利用する回路は、場合によっては、細胞内抗原認識を第2の抗原の認識と組み合わせることができ、第2の抗原もまた、細胞内抗原であっても、細胞外（例えば、表面発現）抗原であってもよい。したがって、場合によっては、回路は、回路が2つの細胞内抗原の認識に依存する「内部-内部」回路であってもよい。場合によっては、回路は、回路が細胞内抗原の第1の認識及び細胞外抗原の第2の認識に依存する「内部-外部」回路であってもよい。場合によっては、回路は、回路が2つの細胞外抗原の認識に依存する「外部-外部」回路であってもよい。そのような回路は、2つの抗原に限定されず、場合によっては、例えば、内部-内部-内部抗原回路、内部-内部-外部抗原回路、内部-外部-内部抗原回路、外部-内部-内部抗原回路、内部-外部-外部抗原回路などを含み得る。

20

【0313】

一実施形態において、「内部-内部」回路は、ペプチド-MHCとの関連の第1の細胞内抗原への結合時に、例えば、TCR、CAR、抗体、キメラ二重特異的結合メンバーなどを含む、ペプチド-MHCとの関連の第2の細胞内抗原を認識する治療薬の発現を誘導する、第1のキメラポリペプチドを含み得る。一実施形態において、「内部-内部」回路は、MHCとの関連のWT1細胞内抗原への結合時に、例えば、TCR、CAR、抗体、キメラ二重特異的結合メンバーなどを含む、ペプチド-MHCとの関連の第2の細胞内抗原を認識する治療薬の発現を誘導する、第1のキメラポリペプチドを含み得る。一実施形態において、「内部-内部」回路は、MHCとの関連のNY-ESO1細胞内抗原への結合時に、例えば、TCR、CAR、抗体、キメラ二重特異的結合メンバーなどを含む、ペプチド-MHCとの関連の第2の細胞内抗原を認識する治療薬の発現を誘導する、第1のキメラポリペプチドを含み得る。

30

【0314】

一実施形態において、「内部-外部」回路は、ペプチド-MHCとの関連の細胞内抗原への結合時に、例えば、TCR、CAR、抗体、キメラ二重特異的結合メンバーなどを含む、細胞外抗原を認識する治療薬の発現を誘導する、キメラポリペプチドを含み得る。一実施形態において、「内部-外部」回路は、MHCとの関連のWT1細胞内抗原への結合時に、例えば、TCR、CAR、抗体、キメラ二重特異的結合メンバーなどを含む、細胞外抗原を認識する治療薬の発現を誘導する、キメラポリペプチドを含み得る。一実施形態において、「内部-外部」回路は、MHCとの関連のNY-ESO1細胞内抗原への結合時に、例えば、TCR、CAR、抗体、キメラ二重特異的結合メンバーなどを含む、細胞外抗原を認識する治療薬の発現を誘導する、キメラポリペプチドを含み得る。

40

【0315】

本開示の多入力回路及び論理開閉型系は、具体的に記載されるものに限定されず、代替的な構成及び／または記載のものと比較してより高次のゲートを含み得る。例えば、場合

50

によっては、本開示の論理開閉型系は、2入力ゲート、3入力ゲート、4入力ゲート、5入力ゲート、6入力ゲート、7入力ゲート、8入力ゲート、9入力ゲート、10入力ゲート、またはそれ以上の入力ゲートであり得る。例えば、キメラポリペプチド、CAR、TCR、キメラ二重特異的結合メンバーなどを含む本明細書に記載の任意の構築物は、例えば、キメラポリペプチド、CAR、TCR、キメラ二重特異的結合メンバー、第2のキメラポリペプチド、第2のCAR、第2のTCR、第2のキメラ二重特異的結合メンバーなどを含む、本明細書に記載の任意の他の構築物と組み合わせて回路において用途を見出しえる。

【0316】

本明細書に記載のキメラポリペプチド及び方法と共に使用するために適合され得る、特定の回路及びそれらの構成要素としては、例えば、PCT出願第US2016/019188号(公開第WO2016/138034号)に記載のものが挙げられるが、これらに限定されず、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0317】

キット

本開示は、本明細書に記載の方法を実行するため、及び/または1つ以上のキメラポリペプチド、キメラポリペプチドをコードする核酸、それらの構成要素などを構築するためのキットを提供する。

【0318】

場合によっては、主題のキットは、本開示のキメラポリペプチドまたはその1つ以上の部分をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。場合によっては、主題のキットは、本開示のキメラポリペプチドを含む。

20

【0319】

場合によっては、主題のキットは、本開示のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で遺伝子改変されているか、またはそれで遺伝子改変される予定である細胞(例えば、宿主細胞または宿主細胞株)を含む。場合によっては、主題のキットは、本開示のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクターで遺伝子改変されているか、またはそれで遺伝子改変される予定である細胞(例えば、宿主細胞)を含む。キット構成要素は、同じ容器内にあっても、別々の容器内にあってもよい。

【0320】

上述のキットのいずれも、1つ以上の追加の試薬を更に含んでもよく、そのような追加の試薬は、希釈緩衝液、再構成溶液、洗浄緩衝液、対照試薬、対照発現ベクター、陰性対照ポリペプチド(例えば、結合時に細胞内ドメインが放出されないように、1つ以上のタンパク質分解切断部位を欠如するキメラポリペプチド)、陽性対照ポリペプチド、キメラポリペプチドのインビトロ産生用の試薬などから選択され得る。

30

【0321】

上述の構成要素に加えて、主題のキットは、キットの構成要素を使用して主題の方法を実施するための説明書を更に含んでもよい。主題の方法を実施するための説明書は一般に、好適な記録媒体上に記録される。例えば、説明書は、紙またはプラスチックなどの基材に印刷されてもよい。したがって、説明書は、添付文書としてキット内、キットまたはその構成要素の容器のラベル内(すなわち、パッケージまたはサブパッケージに関連して)などに存在し得る。他の実施形態において、説明書は、好適なコンピューター可読記憶媒体(例えば、CD-ROM、ディスクケット、フラッシュドライブなど)上に存在する電子記憶データファイルとして存在する。更に他の実施形態において、実際の説明書がキット内に存在するのではなく、例えば、インターネットを介して、遠隔ソースから説明書を得るための手段が提供される。この実施形態の一例は、説明書を閲覧することができる、及び/または説明書をダウンロードすることができるウェブアドレスを含むキットである。説明書と同様に、説明書を得るためのこの手段は、好適な基材に記録されていてもよい。

40

【0322】

本開示の非限定的な態様の例

50

上述した本発明の主題の実施形態を含む態様は、単独で、または1つ以上の他の態様または実施形態との組み合わせで有益であり得る。上述の説明を限定することなく、以下の通り番号付けした本開示の特定の非限定的な態様が提供される。本開示の閲読時に当業者に明らかとなるように、個々に番号付けした態様の各々を、先行または後続の個々に番号付けした態様のうちのいずれかと共に使用しても、組み合わせてもよい。これは、態様の全てのそのような組み合わせに対する支持を提供することが意図され、以下に明示的に提示される態様の組み合わせに限定されない。

【0323】

1. キメラポリペプチドであって、
N末端からC末端まで共有結合で、
a) ペプチド - 主要組織適合複合体 (ペプチド - MHC) に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、
b) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なN o t c h レセプターポリペプチドと、
c) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを有し、

前記ペプチド - MHCへの前記特異的結合メンバーの結合が、前記1つ以上のタンパク質分解切断部位での前記N o t c h レセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより前記細胞内ドメインを放出する、

キメラポリペプチド。

2. 前記特異的結合メンバーは、抗体を含む、態様1に記載のキメラポリペプチド。
3. 前記抗体は、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、もしくはミニボディ、F (a b') 2 断片、F a b 断片、単鎖可変断片 (scFv)、または単一ドメイン抗体 (s dAb) である、態様2に記載のキメラポリペプチド。
4. 前記特異的結合メンバーは、細胞内がん抗原ペプチドを含むペプチド - MHCに特異的に結合する、態様1～3のいずれかに記載のキメラポリペプチド。
5. 前記細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドまたはNY-ESOペプチドである、態様4に記載のキメラポリペプチド。

【0324】

6. 前記N o t c h レセプターポリペプチドは、そのN末端に、1つ以上の上皮成長因子 (EGF) 反復を含む、態様1～5のいずれかに記載のキメラポリペプチド。
7. 前記N o t c h レセプターポリペプチドは、そのN末端に、2～11個のEGF反復を含む、態様6に記載のキメラポリペプチド。
8. 前記N o t c h レセプターポリペプチドは、合成リンカーを含む、態様1～7のいずれかに記載のキメラポリペプチド。
9. 前記N o t c h レセプターポリペプチドは、1つ以上のEGF反復と1つ以上のタンパク質分解切断部位との間に合成リンカーを含む、態様8に記載のキメラポリペプチド。
10. 前記N o t c h レセプターポリペプチドは、50アミノ酸長～1000アミノ酸長を有する、態様1～9のいずれかに記載のキメラポリペプチド。

【0325】

11. 前記N o t c h レセプターポリペプチドは、300アミノ酸長～400アミノ酸長を有する、態様10に記載のキメラポリペプチド。
12. 前記1つ以上のタンパク質分解切断部位は、S2タンパク質分解切断部位、S3タンパク質分解切断部位、またはそれらの組み合わせを含む、態様1～11のいずれかに記載のキメラポリペプチド。
13. 前記1つ以上のタンパク質分解切断部位は、A1a - V1a1ジペプチド配列を含むADAM-17型プロテアーゼ切断部位であるS2タンパク質分解切断部位を含む、態様12に記載のキメラポリペプチド。
14. 前記1つ以上のタンパク質分解切断部位は、G1y - V1a1ジペプチド配列を含むガンマ-セクレターゼ (-セクレターゼ) 切断部位であるS3タンパク質分解切断部位を含む、態様1～13のいずれかに記載のキメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

15. 前記1つ以上のタンパク質分解切断部位は、S1タンパク質分解切断部位を更に含む、態様1～14のいずれかに記載のキメラポリペプチド。

【0326】

16. 前記S1タンパク質分解切断部位は、アミノ酸配列Arg-X-(Arg/Lys)-Arg(配列番号130)を含むフューリン様プロテアーゼ切断部位である(式中、Xは任意のアミノ酸)、態様15に記載のキメラポリペプチド。

17. 前記Notchレセプターポリペプチドは、S1タンパク質分解切断部位を欠如する、態様1～16のいずれかに記載のキメラポリペプチド。

18. 前記Notchレセプターポリペプチドは、図31A～32Bに提示される配列と少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する、態様1～17のいずれかに記載のキメラポリペプチド。

10

19. 前記Notchレセプターポリペプチドは、図31Aに提示される配列または図31Bに提示される配列と少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する、態様18に記載のキメラポリペプチド。

20. 態様1～19のいずれかに記載のキメラポリペプチドをコードする、核酸。

【0327】

21. 目的のポリペプチド(POI)をコードする核酸配列に作動可能に連結した転写活性化因子に応答性の転写制御要素を更に含む、態様20に記載の核酸。

22. 前記POIは、レポータータンパク質、キメラ抗原受容体(CAR)、抗体、キメラ二重特異的結合メンバー、操作されたT細胞受容体(TCR)、及び自然免疫応答誘導因子からなる群から選択される異種ポリペプチドである、態様21に記載の核酸。

20

23. 態様20～22のいずれかに記載の核酸を含む、組み換え発現ベクター。

24. 細胞内で異種ポリペプチドの発現を誘導する方法であって、

細胞をペプチド-主要組織適合複合体(ペプチド-MHC)と接触させることを含み、前記細胞が、態様1～19のいずれかに記載のキメラポリペプチドを発現し、前記キメラポリペプチドの前記転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結した前記異種ポリペプチドをコードする配列を含み、それにより前記キメラポリペプチドの前記細胞内ドメインを放出し、前記異種ポリペプチドの発現を誘導する、方法。

25. 前記異種ポリペプチドは、レポータータンパク質、キメラ抗原受容体(CAR)、抗体、キメラ二重特異的結合メンバー、操作されたT細胞受容体(TCR)、及び自然免疫応答誘導因子である、態様24に記載の方法。

30

【0328】

26. 宿主細胞であって、

a) 第1のペプチド-主要組織適合複合体(ペプチド-MHC)に特異的に結合する態様20～22のいずれかに記載のキメラポリペプチドをコードする核酸と、

b) 目的のポリペプチド(POI)をコードする核酸に作動可能に連結した前記キメラポリペプチドの前記転写活性化因子に応答性の転写制御要素とを含む、宿主細胞。

27. 遺伝子改変されており、前記核酸及び前記転写制御要素が、前記宿主細胞のゲノム内に存在する、態様26に記載の宿主細胞。

40

28. 前記核酸及び前記転写制御要素が、前記宿主細胞内で染色体外に存在する、態様26に記載の宿主細胞。

29. 前記POIは、異種ポリペプチドである、態様26～28のいずれかに記載の宿主細胞。

30. 前記異種ポリペプチドが、レポータータンパク質、キメラ抗原受容体(CAR)、抗体、キメラ二重特異的結合メンバー、操作されたT細胞受容体(TCR)、及び自然免疫応答誘導因子からなる群から選択される、態様29に記載の宿主細胞。

【0329】

31. 前記異種ポリペプチドは、第2のペプチド-MHCに特異的に結合するCARである、態様30に記載の宿主細胞。

50

32. 前記キメラポリペプチドの前記特異的結合メンバーが、第1の細胞内がん抗原ペプチドを含む第1のペプチド-MHCに特異的に結合し、前記CARが、第2の細胞内がん抗原ペプチドを含む第2のペプチド-MHCに特異的に結合する、態様31に記載の宿主細胞。

33. 前記第1の細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドであり、前記第2の細胞内がん抗原ペプチドは、NY-ESOペプチドである、態様32に記載の宿主細胞。

34. 前記第1の細胞内がん抗原ペプチドは、NY-ESOペプチドであり、前記第2の細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドである、態様32に記載の宿主細胞。

35. 前記異種ポリペプチドは、第2のペプチド-MHCに特異的に結合する操作されたTCRである、態様30に記載の宿主細胞。 10

【0330】

36. 前記キメラポリペプチドの特異的結合メンバーが、第1の細胞内がん抗原ペプチドを含む第1のペプチド-MHCに特異的に結合し、前記操作されたTCRが、第2の細胞内がん抗原ペプチドを含む第2のペプチド-MHCに特異的に結合する、態様35に記載の宿主細胞。

37. 前記第1の細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドであり、前記第2の細胞内がん抗原ペプチドは、NY-ESOペプチドである、態様36に記載の宿主細胞。

38. 前記第1の細胞内がん抗原ペプチドは、NY-ESOペプチドであり、前記第2の細胞内がん抗原ペプチドは、WT1ペプチドである、態様36に記載の宿主細胞。

39. 宿主細胞であって、 20

a) キメラポリペプチドをコードする核酸であって、

前記キメラポリペプチドが、N末端からC末端まで共有結合で、

i) がん細胞の表面上に存在する標的分子に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、

ii) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なNotchレセプターポリペプチドと、

iii) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを有し、前記キメラポリペプチドをコードする核酸、及び、

b) 前記転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結したキメラ二重特異的結合メンバーをコードする核酸を含み、 30

前記標的分子への前記特異的結合メンバーの結合が、前記1つ以上のタンパク質分解切断部位での前記Notchレセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより前記細胞内ドメインを放出し、前記転写制御要素を活性化し、前記キメラ二重特異的結合メンバーを発現させる、

宿主細胞。

40. 前記キメラ二重特異的結合メンバーは、がん抗原に特異的な結合ドメインと、免疫細胞の表面上に発現されるタンパク質に特異的な結合ドメインとを含む、態様39に記載の宿主細胞。

【0331】

41. 前記キメラ二重特異的結合メンバーは、少なくとも1つの抗体由来抗原-結合ドメインを含む、態様39または40に記載の宿主細胞。 40

42. 前記キメラ二重特異的結合メンバーは、二重特異性抗体またはその断片である、態様41に記載の宿主細胞。

43. 前記キメラ二重特異的結合メンバーは、リガンド-受容体結合対の少なくとも1つの受容体またはリガンド結合ドメインを含む、態様39~41のいずれかに記載の宿主細胞。

44. 前記キメラ二重特異的結合メンバーは、少なくとも1つの抗体由来抗原-結合ドメインと、リガンド-受容体結合対の少なくとも1つの受容体またはリガンド結合ドメインとを含む、態様39~43のいずれかに記載の宿主細胞。

45. 免疫細胞の表面上に発現される前記タンパク質は、CD3である、態様40~4 50

4 のいずれかに記載の宿主細胞。

【 0 3 3 2 】

4 6 . 免疫細胞の表面上に発現される前記タンパク質は、ナチュラルキラーグループ 2 D (N K G 2 D) 受容体である、態様 4 0 ~ 4 4 のいずれかに記載の宿主細胞。

4 7 . 前記標的分子は、がん抗原である、態様 3 9 ~ 4 6 のいずれかに記載の宿主細胞。

4 8 . 前記標的分子は、組織特異的分子である、態様 3 9 ~ 4 6 のいずれかに記載の宿主細胞。

4 9 . 前記標的分子は、器官特異的分子である、態様 3 9 ~ 4 6 のいずれかに記載の宿主細胞。

5 0 . 前記標的分子は、細胞型特異的分子である、態様 3 9 ~ 4 6 のいずれかに記載の宿主細胞。 10

【 0 3 3 3 】

5 1 . 対象の新生物を治療する方法であって、

前記対象に、態様 3 9 ~ 5 0 のいずれかに記載の有効量の宿主細胞を投与することを含み、

前記新生物が、前記標的分子及びがん抗原を発現する、
方法。

5 2 . 宿主細胞であって、

a) キメラポリペプチドをコードする核酸であって、前記キメラポリペプチドが、N 末端から C 末端まで共有結合で、 20

i) がん細胞の表面上に存在する標的分子に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、

i i) 1 つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能な N o t c h レセプターポリペプチドと、

i i i) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを有し、前記キメラポリペプチドをコードする核酸、及び、

b) 前記転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結した抗 F c キメラ抗原受容体 (C A R) をコードする核酸を含み、

前記標的分子への前記特異的結合メンバーの結合が、前記 1 つ以上のタンパク質分解切断部位での前記 N o t c h レセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより前記細胞内ドメインを放出し、前記転写制御要素を活性化し、前記抗 F c C A R を発現させる、宿主細胞。 30

5 3 . 前記標的分子は、がん抗原である、態様 5 2 に記載の宿主細胞。

5 4 . 前記標的分子は、組織特異的分子である、態様 5 2 に記載の宿主細胞。

5 5 . 前記標的分子は、器官特異的分子である、態様 5 2 に記載の宿主細胞。

【 0 3 3 4 】

5 6 . 前記標的分子は、細胞型特異的分子である、態様 5 2 に記載の宿主細胞。

5 7 . 前記宿主細胞は、がん細胞の表面上に存在するがん抗原に特異的な抗体をコードし、かつ前記抗 F c C A R によって結合される F c 領域を含む核酸を更に含む、態様 5 2 ~ 5 6 のいずれかに記載の宿主細胞。 40

5 8 . 前記抗体をコードする前記核酸が、前記転写制御要素に作動可能に連結される、態様 5 7 に記載の宿主細胞。

5 9 . 対象の新生物を治療する方法であって、

前記対象に、態様 5 2 ~ 5 8 のいずれかに記載の有効量の宿主細胞を投与することを含み、

前記新生物が、前記標的分子を発現する、
方法。

6 0 . 前記対象に、がん細胞の表面上に存在するがん抗原に特異的であり、かつ前記抗 F c C A R によって結合される F c 領域を含む抗体を投与することを更に含む、態様 5 9 に記載の方法。 50

【0335】

- 6 1 . 宿主細胞であって、
 a) キメラポリペプチドをコードする核酸であって、前記キメラポリペプチドが、N末端からC末端まで共有結合で、
 i) がん細胞の表面上に存在する標的分子に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、
 i i) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なNotchレセプターポリペプチドと、
 i i i) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを有し、前記キメラポリペプチドをコードする核酸、及び、
 b) 前記転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結した自然免疫応答誘導因子をコードする核酸を含み、
 前記標的分子への前記特異的結合メンバーの結合が、前記1つ以上のタンパク質分解切断部位での前記Notchレセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより前記細胞内ドメインを放出し、前記転写制御要素を活性化し、前記自然免疫応答誘導因子を発現させる、
 宿主細胞。
- 6 2 . 前記標的分子は、組織特異的分子である、態様6 1に記載の宿主細胞。
 6 3 . 前記標的分子は、器官特異的分子である、態様6 1に記載の宿主細胞。
 6 4 . 前記標的分子は、細胞型特異的分子である、態様6 1に記載の宿主細胞。
 6 5 . 前記標的分子は、がん抗原である、態様6 1に記載の宿主細胞。
- 【0336】
 6 6 . 前記自然免疫応答誘導因子は、細菌タンパク質またはその断片である、態様6 1～6 5のいずれかに記載の宿主細胞。
 6 7 . 前記自然免疫応答誘導因子は、ウイルスタンパク質またはその断片である、態様6 1～6 5のいずれかに記載の宿主細胞。
 6 8 . 前記自然免疫応答誘導因子は、真菌タンパク質またはその断片である、態様6 1～6 5のいずれかに記載の宿主細胞。
 6 9 . 前記自然免疫応答誘導因子は、哺乳動物寄生虫によって発現されるタンパク質またはその断片である、態様6 1～6 8のいずれかに記載の宿主細胞。
 7 0 . 前記哺乳動物寄生虫は、ヒト寄生虫である、態様6 9に記載の宿主細胞。
- 【0337】
 7 1 . 対象の領域内で局所自然免疫応答を誘導する方法であって、
 前記対象に、態様6 1～7 0のいずれかに記載の有効量の宿主細胞を投与することを含み、
 前記領域が、前記標的分子を発現する、
 方法。
 7 2 . 前記対象の前記領域は、新生物を含む、態様7 1に記載の方法。
 7 3 . 宿主細胞であって、
 a) キメラポリペプチドをコードする核酸であって、前記キメラポリペプチドが、N末端からC末端まで共有結合で、
 i) がん細胞の表面上に存在する標的分子に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインと、
 i i) 1つ以上のタンパク質分解切断部位を含む、タンパク質分解により切断可能なNotchレセプターポリペプチドと、
 i i i) 転写活性化因子を含む、細胞内ドメインとを有し、前記キメラポリペプチドをコードする核酸、及び、
 b) 前記転写活性化因子に応答性の転写制御要素に作動可能に連結した免疫抑制因子をコードする核酸を含み、
 前記標的分子への前記特異的結合メンバーの結合が、前記1つ以上のタンパク質分解切

10

20

30

40

50

断部位での前記 N o t c h レセプターポリペプチドの切断を誘導し、それにより前記細胞内ドメインを放出し、前記転写制御要素を活性化し、前記免疫抑制因子を発現させる、宿主細胞。

7 4 . 前記標的分子は、組織特異的分子である、態様 7 3 に記載の宿主細胞。

7 5 . 前記標的分子は、器官特異的分子である、態様 7 3 に記載の宿主細胞。

【 0 3 3 8 】

7 6 . 前記標的分子は、細胞型特異的分子である、態様 7 3 に記載の宿主細胞。

7 7 . 前記標的分子は、自己抗原である、態様 7 3 に記載の宿主細胞。

7 8 . 前記免疫抑制因は、免疫抑制サイトカインである、態様 7 3 ~ 7 7 のいずれかに記載の宿主細胞。

7 9 . 前記免疫抑制サイトカインは、I L - 1 0 である、態様 7 8 に記載の宿主細胞。

8 0 . 前記免疫抑制因子は、細胞間シグナリング免疫抑制リガンドである、態様 7 3 ~ 7 7 のいずれかに記載の宿主細胞。

【 0 3 3 9 】

8 1 . 前記細胞間シグナリング免疫抑制リガンドは、P D - L 1 である、態様 8 0 に記載の宿主細胞。

8 2 . 対象における免疫応答を抑制する方法であって、

前記対象に、態様 7 3 ~ 8 1 のいずれかに記載の有効量の宿主細胞を投与することを含み、

前記対象が、前記標的分子を発現する、
方法。

8 3 . 前記対象は、自己免疫疾患を有する、態様 8 2 に記載の方法。

8 4 . 不均一腫瘍を殺傷する方法であって、

殺傷抗原を発現する第 1 の細胞ならびに前記殺傷抗原及び感作抗原を発現する第 2 の細胞を含む不均一腫瘍を、操作された免疫細胞と接触させることを含み、

前記操作された免疫細胞は、

前記感作抗原に特異的に結合する、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドと、

前記殺傷抗原に特異的に結合する治療ポリペプチドをコードする核酸配列と、

前記タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドに応答性である核酸に作動可能に連結した転写制御要素とを含み、

前記感作抗原への前記タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドの結合が、前記転写制御要素を活性化して、前記殺傷抗原への結合時に前記不均一腫瘍の前記第 1 及び第 2 の細胞を殺傷する前記治療ポリペプチドの発現を誘導する、
方法。

8 5 . 前記治療ポリペプチドは、キメラ抗原受容体 (C A R) である、態様 8 4 に記載の方法。

【 0 3 4 0 】

8 6 . 前記治療ポリペプチドは、T 細胞受容体 (T C R) である、態様 8 4 に記載の方法。

8 7 . 前記治療ポリペプチドは、治療抗体である、態様 8 4 に記載の方法。

8 8 . 前記治療ポリペプチドは、キメラ二重特異的結合メンバーである、態様 8 4 に記載の方法。

8 9 . 前記感作抗原または前記殺傷抗原のうちの少なくとも 1 つは、M H C との関連で提示される細胞内抗原である、態様 8 4 ~ 8 8 のいずれかに記載の方法。

9 0 . 前記感作抗原及び前記殺傷抗原の両方は、M H C との関連で提示される細胞内抗原である、態様 8 4 ~ 8 9 のいずれかに記載の方法。

【 実施例 】

【 0 3 4 1 】

以下の実施例は、本発明の作製及び使用方法についての完全な開示及び説明を当業者に

10

20

30

40

50

提供するように提示され、本発明者らが自身の発明と見なすものの範囲を限定するようには意図されておらず、それらは、以下の実験が全てまたは唯一の実行される実験であることを表すようにも意図されない。使用される数値（例えば、量、温度など）に関する正確さを確実にする努力がなされているが、いくつかの実験誤差及び偏差が計上されるはずである。別途示されない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧または大気圧付近である。標準的な略語が使用されてもよく、例えば、 b_p は塩基対（複数可）、 k_b はキロベース（複数可）、 p_1 はピコリットル（複数可）、 s または $s_e c$ は秒（複数可）、 $m_i n$ は分（複数可）、 h または h_r は時間（複数可）、 a_a はアミノ酸（複数可）、 k_b はキロベース（複数可）、 b_p は塩基対（複数可）、 n_t はヌクレオチド（複数可）、 $i.m.$ は筋肉内（に）、 $i.p.$ は腹腔内（に）、 $s.c.$ は皮下（に）などである。

【0342】

実施例 1：ペプチド - 主要組織適合複合体（ペプチド - MHC）誘導シグナリング。

切断可能なキメラ $N_{\alpha}t_{\beta}c_{\gamma}h$ ポリペプチドによるペプチド - MHC の認識を通して、細胞シグナリングに影響を与える能力を調査した。図 1 に示されるように、「送信細胞」の細胞内抗原のペプチド - MHC に特異的に結合する特異的結合メンバーを含む、細胞外ドメインに連結した切断可能な $N_{\alpha}t_{\beta}c_{\gamma}h$ ポリペプチドを含むキメラポリペプチドを設計した。「受信細胞」によって発現されるキメラポリペプチドの細胞外ドメインは、「送信細胞」のペプチド - MHC に結合する。そのような結合時に、切断可能な $N_{\alpha}t_{\beta}c_{\gamma}h$ ポリペプチドは切断されて、例えば、解放された細胞内ドメインに応答性のプロモーターに作動可能に連結した導入遺伝子（例えば、図 1 の「X」）の発現を含む、細胞内プロセスに影響を与える得る細胞内部分を放出する。

【0343】

代表例として、ウィルムス腫瘍タンパク質 1 (WT1) ペプチド - MHC に結合する細胞外ドメインと、解放時に青色蛍光タンパク質 (BFP) に作動可能に連結した上流活性化配列 (UAS) に結合して、この系を CD8 受信細胞内に操作導入した場合に活性化レポーターとして機能する GAL4 転写活性化因子細胞内ドメインとを有する、キメラポリペプチドを設計した。図 2 は、ペプチド - MHC 陰性 (WT1-) または陽性 (WT1+) T2 送信細胞のいずれかに接触した場合に BFP レポーターを発現する受信細胞の相対レベルを実証する。図 3 は、標的 WT1 細胞内抗原発現の有無に関わらず HLA-A2 を発現する T2 細胞の存在下でアッセイした受信 CD8+T 細胞応答の定量化を提供する。図 2 及び図 3 に見るように、T 細胞応答は、提示される細胞内抗原の存在に高度に特異的であり、かつそれに依存している。

【0344】

図 4 に実証されるように、受信細胞応答はまた、提示される細胞内抗原の量にも依存している。異なる量の WT1 ペプチド - MHC (10 μM, 1 μM、及び 100 nM) を発現するように T2 送信細胞を操作し、各集団について受信細胞応答をアッセイした。レポーター発現には WT1 ペプチド - MHC 発現レベルとの相関が見られ、これは用量に依存した活性化を示した。

【0345】

加えて、T2 細胞を発現する無関係の細胞内抗原ペプチド - MHC (NY-ESO1 ペプチド) の存在下でアッセイした場合、レポーター活性化は陰性対照 (DMSO) に類似しており、これは活性化が抗原特異的であることを更に示した。標的細胞内抗原 WT1 ペプチド - MHC または無関係の細胞内抗原 NY-ESO1 ペプチド - MHC のいずれかの 3 つの異なる濃度にわたって、受信細胞内では WT1 に応答して抗原濃度に依存したレポーター活性化が見られたが、CD8+T 細胞内及び CD4+T 細胞内の両方では NY-ESO1 に応答してそれは見られなかった（図 5）。

【0346】

実施例 2：二重細胞内抗原に依存した T 細胞活性化。

操作された T 細胞活性化が標的細胞上の 2 つの細胞内抗原の提示に依存するように、二

10

20

30

40

50

重細胞内抗原 AND ゲートを設計した。具体的には、図 6 に提示される代表例として、系を設計し、T 細胞内に操作導入し、ここで、抗 HLA - A2 / NY - ESO1 TCR の発現が抗 HLA - A2 / WT1 s c F v s y n N o t c h の解放された細胞内ドメインによって誘導される。NY - ESO1 のみを発現する T2 標的細胞を提示した場合、抗 HLA - A2 / NY - ESO1 TCR の発現は誘導されず、T 細胞活性化は発生しない。しかしながら、NY - ESO1 及び WT1 の両方を発現する T2 標的細胞を提示した場合、抗 HLA - A2 / WT1 s c F v s y n N o t c h への WT1 ペプチド - MHC の結合は、N o t c h ポリペプチドの切断を誘導し、抗 HLA - A2 / NY - ESO1 TCR の発現を推進する UAS に結合する GAL4 転写活性化因子を放出する。標的細胞上の NY - ESO1 ペプチド - MHC への発現される抗 HLA - A2 / NY - ESO1 TCR の結合は、例えば、CD69 及び / または細胞傷害性アッセイを使用して検出される T 細胞の活性化を引き起す。

【 0 3 4 7 】

そのような系における T 細胞活性化を、いずれかの抗原または両方の抗原を発現する T2 標的細胞を使用して試験した。図 7 に見るように、操作された T 細胞を二重抗原 (HLA - A2 / NY - ESO1 及び HLA - A2 / WT1) T2 標的細胞に接触させた場合には、CD69 発現を使用して測定される頑強な活性化が見られた。しかしながら、操作された T 細胞を 2 つの細胞内抗原のうちの一方のみ (HLA - A2 / NY - ESO1 または HLA - A2 / WT1) を発現する T2 細胞に接触させた場合には、陰性対照 (DMSO) と同様に、活性化の不在が見られた。操作された T 細胞に T2 標的細胞を発現する二重抗原または単一抗原のいずれかを提示した場合には、T2 細胞殺傷に対する対応する結果が見られた (図 8)。これらの結果は、両方の標的細胞内抗原を発現する標的細胞のみに応答して操作された T 細胞を活性化する上での、二重細胞内抗原 AND ゲートの機能性及びその特異性を実証する。

【 0 3 4 8 】

このアプローチの万能性を更に実証するために、追加の二重抗原 AND ゲートを設計し、表面標的抗原及び細胞内標的抗原の両方を発現する細胞の標的化を試験した。具体的には、図 9 及び図 10 に提示される代表的な実施例として、系を設計し、T 細胞内に操作導入し、ここで、抗 HLA - A2 / NY - ESO1 TCR の発現が抗表面化発現 GFP s y n N o t c h の解放された細胞内ドメインによって誘導される。NY - ESO1 のみを発現する T2 標的細胞を提示した場合、抗 HLA - A2 / NY - ESO1 TCR の発現は誘導されず、T 細胞活性化は発生しない。しかしながら、NY - ESO1 及び GFP の両方を発現する T2 標的細胞を提示した場合、抗 GFP s y n N o t c h への表面発現 GFP の結合は、N o t c h ポリペプチドの切断を誘導し、抗 HLA - A2 / NY - ESO1 TCR の発現を推進する UAS に結合する GAL4 転写活性化因子を放出する。標的細胞上の NY - ESO1 ペプチド - MHC への発現される抗 HLA - A2 / NY - ESO1 TCR の結合は、T 細胞の活性化を引き起す。

【 0 3 4 9 】

CD69 発現 (図 11)、T 細胞増殖 (図 12)、T2 標的細胞殺傷 (図 13)、及び A375 標的細胞殺傷 (図 14) を使用して、二重抗原回路を発現する、操作された CD4+ 及び CD8+ T 細胞の活性化をアッセイした。各アッセイにおいて、T 細胞活性化及び下流効果 (標的細胞殺傷など) は、標的細胞による両方の標的抗原の発現に依存しており、これは、(例えば、図 15 に一般に図示される) 細胞内抗原の組み合わせを使用するか、または表面発現抗原の応答性構成要素を 1 つ以上の細胞内抗原認識要素と組み合わせるかに関わらず、二重抗原 s y n N o t c h AND ゲートの頑強な特異性を実証する。

【 0 3 5 0 】

このアプローチの万能性を更に実証するために、追加の二重抗原 AND ゲートを設計し、表面標的抗原、及び NY - ESO1 以外の細胞内標的抗原の両方を発現する細胞の標的化を試験した。具体的には、図 39 に模式的に示されるように、系を設計し、T 細胞内に操作導入し、ここで、抗 HLA - A2 / Mart1 の発現が抗表面化発現 GFP s y n

10

20

30

40

50

Notchの解放された細胞内ドメインによって誘導される。Mart1のみを発現するT2標的細胞を提示した場合、抗HLA-A2/Mart1 TCRの発現は誘導されず、T細胞活性化は発生しない。しかしながら、Mart1及びGFPの両方を発現するT2標的細胞を提示した場合、抗GFP synNotchへの表面発現GFPの結合は、Notchポリペプチドの切断を誘導し、抗HLA-A2/Mart1 TCRの発現を推進するUASに結合するGAL4転写活性化因子を放出する。標的細胞上のMart1ペプチド-MHCへの発現される抗HLA-A2/Mart1 TCRの結合は、T細胞の活性化を引き起こす。ジャーカットT細胞株を、この二重抗原回路を発現するように操作し、CD69発現を使用して、T細胞の活性化をアッセイした。図40に提示されるように、このアッセイの結果は、CD69上方制御によって測定されるT細胞活性化が、標的細胞による両方の標的抗原の発現に依存していることを示し、これは、pMHC抗原を標的化する二重抗原synNotch ANDゲートの頑強な特異性を更に実証する。

【0351】

実施例3：キメラ二重特異的結合メンバーの特異的な局所送達。

代表的な2構成要素系を使用して、キメラ二重特異的結合メンバーの特異的な局所発現を誘導するためのsynNotchの使用をアッセイした。具体的には、図16に示されるように、抗GFP synNotchを使用して、操作されたT細胞内で抗CD19/抗CD3二重特異性T細胞エンゲイジャー(BiTE)(ブリナツモマブ)の発現を推進した。誘導因子標的細胞の表面上に発現されるGFPへの結合時、抗GFP synNotchは、抗CD19/抗CD3 BiTEをコードする配列に作動可能に連結したUASに結合するGAL4転写活性化因子を放出する。BiTEの発現は、標的細胞で発現されるCD19及びT細胞で発現されるCD3の二重結合、ならびにT細胞活性化をもたらす。

【0352】

CD69発現を使用して、CD4+T細胞活性化をアッセイした。抗GFP-GAL4 synNotchを発現し、かつGAL4応答性UASに作動可能に連結した抗CD19/抗CD3 BiTEをコードする配列を有するCD4+T細胞を、CD19のみ、GFPのみ、またはCD19及びGFPの両方を発現するインデューサー細胞と接触させた。CD19及びGFPの両方を発現するインデューサー細胞を使用した場合にのみ、有意なT細胞活性化が見られた(図17)。これらのインピトロ結果は、synNotch開閉型回路を使用して、キメラ二重特異的結合メンバーの負荷量を効果的かつ特異的に発現させ、これを使用して細胞応答(例えば、T細胞活性化など)を制御することができることを実証する。

【0353】

代表例として、腫瘍局所化-CD19/-CD3 BiTE産生のモデルを使用して、キメラ二重特異的結合メンバーのsynNotch開閉型発現の使用をインビボで更に調査した(図18)。マウスの左側腹部に感作抗原陰性(GFP-)標的抗原陽性(CD19+)腫瘍細胞を、右側腹部に二重陽性(GFP+/CD19+)腫瘍細胞を皮下注射した。腫瘍が確立した後、-CD19/-CD3二重特異性T細胞エンゲイジャー(BiTE)発現を制御する-GFP synNotch T細胞(CD4+及びCD8+)をマウスに注射した。示した時点で腫瘍を収集して、カリパス測定によって腫瘍負荷を分析した。

【0354】

記載のモデルにおいて、-CD19/-CD3 BiTEの腫瘍局所化産生は、感作抗原に依存した様式で腫瘍負荷を効果的に低減することが見られた(図19)。図18に関して上記のように、左側腹部腫瘍及び右側腹部腫瘍の腫瘍体積を測定した。治療経過にわたって、感作抗原(GFP)及びBiTE標的化抗原(CD19)の両方を発現する腫瘍(GFP+/CD19+腫瘍)では腫瘍体積は低減した。比較して、BiTE標的化抗原は発現するが感作抗原は発現しない右側腹部腫瘍(CD19+腫瘍)では腫瘍体積は低減しなかった。これらの結果は、BiTE負荷量の空間特異的な標的化を推進して、イ

ンビボで腫瘍体積を効果的に低減するための、2抗原T細胞ANDゲートの効果的な使用を実証する。-GFP-synNotchは、組織特異的、器官特異的、または細胞型特異的T細胞感作のために、内在発現または異種発現される任意の他の抗原を効果的に標的化する任意の他のSynNotchで置き換えることができる。

【0355】

実施例4：自然免疫応答の特異的誘導。

代表的なモデル系を使用して、自然免疫応答を特異的及び/または局所的に誘導するためのsynNotchの使用を調査した。具体的には、図20に示されるように、表面発現GFPに特異的なsynNotchを使用して、操作されたT細胞内でフラグリン(F1iC)をコードする核酸配列に作動可能に連結したレポーターの発現を推進する系を考案した。T細胞からのフラグリン負荷量の分泌は、インデューサー細胞の表面上に存在するsynNotch結合GFPに依存している。自然免疫応答誘導を検出及び測定するために、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)レポーターを使用し、ここで、Tol1様受容体5(TLR5)レポーター細胞の表面上でのTLR5へのフラグリンの結合はSEAPの発現を推進し、これは自然免疫応答活性の定量化を可能にする。

【0356】

上記の系で操作されたT細胞を、TLR5レポーター細胞の存在下で培養した。表面発現GFP+インデューサー細胞を使用して、GFP刺激の有無に関わらず650nmでの吸光度によって、TLRレポーター細胞SEAP活性を測定した。図21に提示されるこのアッセイの結果は、自然免疫応答がGFPに依存した様式で特異的に活性化されることを示した。この実施例は、抗原に依存したsynNotchポリペプチドを使用して自然免疫応答誘導ポリペプチドの発現を推進することにより、synNotchを使用して、自然免疫応答を特異的及び/または局所的に誘導することができることを実証する。

【0357】

実施例5：不均一腫瘍の治療。

図22に示される多構成要素戦略を開発して、不均一腫瘍を認識するようにT細胞をプログラミングした。(1)腫瘍に特異的であるが全ての腫瘍細胞内には存在しない腫瘍特異的抗原を使用して、不均一腫瘍内に存在する感作細胞を認識するように、(2)全ての腫瘍細胞内に存在するが腫瘍特異的ではない腫瘍関連抗原を使用して、不均一腫瘍付近の細胞を殺傷するように、T細胞をプログラミングした。

【0358】

代表的なモデル系を使用して、不均一腫瘍を治療するためのsynNotch系の使用を調査した。具体的には、図23に示されるように、GFP感作抗原に特異的な「感作」synNotchレセプター及びCD19に特異的な「殺傷」CARを產生するようにT細胞を操作した。synNotch感作受容体がGFP感作抗原に結合する場合、synNotchの解放された細胞内ドメインがCD19特異的殺傷CARの発現を推進し、CD19の存在時に細胞殺傷をもたらすように、系を設計した。

【0359】

図24に示されるように、CD19は発現するがGFP感作抗原は発現しない標的細胞の集団を、操作されたT細胞で治療した場合、標的細胞の殺傷は観察されなかった。二重発現するCD19+/GFP+標的細胞及びCD19+/GFP-標的細胞を含む細胞の不均一集団を、操作されたT細胞で治療した場合、CD19+/GFP+標的細胞及びCD19+/GFP-標的細胞の両方の殺傷が観察された。この結果は、不均一集団におけるGFP抗原の存在が一般に操作されたT細胞をCD19特異的殺傷に感作すること、及び操作されたT細胞による細胞殺傷が感作抗原を発現する細胞に限定されないことを実証した。

【0360】

様々な比率のGFP/CD19+標的細胞対CD19+のみ標的細胞を有する集団を使用して、不均一腫瘍細胞殺傷のこの効果を更に定量化した。抗GFP-synNotch抗CD19CAR-T細胞または非形質導入陰性対照T細胞のいずれかで不均一集団を

10

20

30

40

50

治療し、24時間及び72時間に時点を取得した（図25）。非形質導入細胞で治療した場合、いずれの集団においても細胞殺傷は観察されなかった。しかしながら、抗GFP-synNotch 抗CD19 CAR T細胞で治療した後、全ての集団において24時間の実質的な細胞殺傷が観察され、72時間後までに全ての標的細胞が除去された。

【0361】

これらの結果は、腫瘍不均一性の程度または感作抗原の相対的存在量／欠乏に関わらず、そのような感作殺傷synNotch開閉型系を使用して、不均一腫瘍の特異的かつ効果的な腫瘍細胞殺傷が達成されることを実証する。換言すると、不均一腫瘍が含有する感作抗原発現細胞が高パーセンテージであるか低パーセンテージであるかに関わらず、記載の系は効果的かつ特異的である。

10

【0362】

1:3の感作対標的の不均一混合物中の、感作集団及び非感作（「標的」）集団に対する系の殺傷効果がより高い時間分解能を、図26に提示する。上記のように、治療の72時間後までに両集団の全ての細胞が除去された。

【0363】

図27に見るように、感作細胞対非感作標的細胞の比率が1:19ほど低い場合でさえ、CD19+非感作抗原標的細胞は、図26に見られる時間動力学に類似した時間動力学で効果的に殺傷される。72時間後までに、元来の標的細胞の集団の10%未満が残っていた。合わせて、これらの結果は、腫瘍内でのsynNotch感作抗原を発現する細胞の相対的提示に関わらず、synNotch開閉型腫瘍細胞殺傷系が異種腫瘍の特異的な治療に効果的であることを実証する。

20

【0364】

実施例6：免疫抑制剤の制御された発現。

がん免疫療法において免疫応答を推進することに加えて、がん療法以外での有用な機能についても、タンパク質分解により切断可能なキメラポリペプチドを調査した。例示的なsynNotchを使用して調査した1つの用途は、例えば、自己免疫設定における免疫抑制であった。細胞接触型阻害を推進するサイトカインIL-10及びT細胞阻害リガンドPD-L1などのパラクリン阻害シグナルの同時産生を推進する、synNotch T細胞を操作した（図28）。

30

【0365】

CD19刺激を使用してアッセイされるように、抗CD19synNotchレセプターは、CD19+K562での刺激に応答して、両方の抑制物質（PD-L1及びIL-10）を推進することができた（図29）。この実施例、及び非天然合成T細胞応答を制御するsynNotchレセプターT細胞の他の実施例は、治療細胞の有効性を増強するか、または組織もしくは疾患環境を再プログラミングして、恒常性及び天然機能を回復することができる、多種多様な治療物質を産生する、synNotch操作された細胞の広く多様な用途を強調する。

【0366】

実施例7：野生型親和性TCR及び増強親和性TCRを使用する、二重抗原開閉型サイトカイン分泌。

40

表面抗原開閉型TCR発現のための追加の二重抗原ANDゲートを設計して、標的表面抗原（表面発現GFP）及び細胞内標的抗原（NY-ESO）の両方を発現する細胞の標的化に応答したCD8 T細胞サイトカイン分泌を試験した。具体的には、図33に模式的に提示されるように、抗HLA-A2/NY-ESO1 TCRの発現を制御する抗GFP-synNotchでCD8 T細胞を操作して、表面発現GFP及びHLA-A2/NY-ESO1の両方を発現するT2標的細胞に応答してサイトカインインターフェロンガンマの放出が発生するようにした。この系を、野生型親和性及び親和性増強抗HLA-A2/NY-ESO1 TCRで試験した。

【0367】

図34に示されるように、いずれかのTCRの抗GFP-synNotch開閉型発現

50

を有する CD8 T 細胞は、二重抗原 GFP+ / HLA-A2 / NY-ESO1 + T2 標的細胞の存在下でのみ活性化され、IFN を分泌した。更に、親和性増強 TCR 細胞は、標的細胞結合時に野生型親和性 TCR 細胞と比較して 2 倍近くの IFN を產生したため、(IFN 放出によって測定される) CD8 T 細胞活性化のレベルは、TCR のその標的抗原に対する親和性に依存していた。

【0368】

これらの結果は、野生型親和性 TCR 及び増強親和性 TCR を使用する、二重抗原（表面抗原及び細胞内抗原）開閉型サイトカイン分泌を実証する。このデータはまた、それらの標的抗原に対して異なる親和性を有する TCR の開閉型発現を通して、T 細胞活性化及びサイトカイン分泌のレベルを調節することができるることも示す。

10

【0369】

実施例 8：二重抗原開閉型の CD4 T 細胞サイトカイン分泌。

（図 35 に模式化される）抗 HLA-A2 / NY-ESO1 TCR を制御する抗 HLA-A2 / WT1 synNotch で操作された CD4 T 細胞内で、CD4 T 細胞活性化及びサイトカイン分泌を試験した。図 36 に提示されるデータによって示されるように、抗 HLA-A2 / WT1 synNotch 及び抗 HLA-A2 / NY-ESO1 TCR 発現細胞は、HLA-A2 / WT1 及び HLA-A2 / NY-ESO1 抗原の両方を発現する T2 標的細胞に特異的に応答して高レベルの IFN を放出する。抗 HLA-A2 / WT1 synNotch による HLA-A2 単独の部分的な認識のために、HLA-A2 / NY-ESO1 のみを発現する T2 標的細胞に応答して、幾分低レベルのサイトカイン分泌が見られた。synNotch レセプターにおける複数の異なる抗 HLA-A2 / WT1 scFv の試験は、標的化される特定の WT1 ペプチドに関わらず、抗 HLA-A2 単独の低レベルの測定可能な認識を明らかにした。しかしながら、両方の抗原を発現する標的細胞に応答した細胞活性化及びサイトカイン放出の高レベルの増加は、そのようなバックグラウンドの HLA-A2 の部分的な認識が、二重抗原標的化及び特異性にはっきりとは影響を与えないことを示す。

20

【0370】

実施例 9：臨床的に関連する二重抗原標的化。

臨床的に関連する抗原対を使用する、記載の表面抗原 / pMHC 抗原の AND 開閉型戦略の万能性を更に実証するために、抗 HLA-A2 / NY-ESO1 TCR を制御する抗 HER2 synNotch で CD8 T 細胞及び CD4 T 細胞の両方を操作した。Her2 及び HLA-A2 / NY-ESO1 の同時発現は、乳癌及び神経膠腫を含む様々ながんにおいて見出される。この開閉型 / 標的化戦略の模式的な形態を、図 37 に提示する。

30

【0371】

図 38 に提示される結果に示されるように、操作された CD8 T 細胞及び CD4 T 細胞の両方は、両方の標的抗原 (HER2 及び HLA-A2 / NY-ESO1) を発現する標的 T2 細胞を特異的に殺傷した。2 つの抗原のうちの 1 つのみを発現する対照細胞には、影響がなかった。注目すべきことに、操作された CD4 細胞による二重抗原標的細胞の特異的殺傷は、表面抗原 / pMHC 抗原認識回路が CD8 に依存しない様式で標的殺傷を誘導し得ることを実証した。

40

【0372】

合わせて、この実施例の結果は、操作された二重抗原開閉型 CD8 T 細胞及び / または二重抗原開閉型 CD4 T 細胞を使用して、少なくとも 1 つの細胞内抗原を標的化するものを含む臨床的に関連する抗原対を発現する細胞を、効果的に標的化し、殺傷することができることを実証する。

【0373】

実施例 10：CAR 発現を制御する pMHC 感知 synNotch による二重抗原標的化。

このアプローチの万能性を更に実証するために、CAR を含有する追加の二重抗原 AND ゲートを設計し、表面標的抗原及び細胞内標的抗原の両方を発現する細胞の標的化を試験した。例示的な系を図 41 に示し、ここで、設計され、T 細胞内に操作導入されるよう

50

に、抗Her2 CARの発現は、抗HLA-A2/WT1 synNotchの解放された細胞内ドメインによって誘導される。この回路は、表面抗原特異的CARの発現を制御するpMHC特異的synNotchレセプターの一実施例として機能する。Her2のみを発現するT2標的細胞を提示した場合、抗Her2 CARの発現は誘導されず、T細胞活性化は発生しない。しかしながら、WT1及びHer2の両方を発現するT2標的細胞を提示した場合、抗HLA-A2/WT1 synNotchへの表面-HLA-A2/WT1の結合は、Notchポリペプチドの切断を誘導し、抗Her2 CARの発現を推進するUASに結合するGAL4転写活性化因子を放出する。標的細胞上でのHer2への発現される抗Her2 CARの結合は、T細胞の活性化を引き起こす。この二重抗原回路を発現するように操作されたジャーカットT細胞株の結果として生じる活性化(CD69発現を使用して測定される)を、図42に提示する。このアッセイの結果は、CD69上方制御によって測定されるT細胞活性化(すなわち、CD69上方制御)が、標的細胞による両方の標的抗原の発現に依存していることを示し、これも再び、二重抗原synNotch ANDゲートの頑強な特異性を更に実証する。表面抗原特異的CARの発現を制御するpMHC特異的synNotchレセプターについてのこの実施例はまた、二重抗原synNotch ANDゲートにおいて広い多様性の抗原の組み合わせを用いることができるることも示す。

【0374】

本発明を、その特定の実施形態を参照して説明してきたが、当業者は、本発明の真の主旨及び範囲から逸脱することなく、様々な変更が行われても、同等物が置換されてもよいことを理解されたい。加えて、特定の状況、材料、物質組成、プロセス、プロセスステップ(複数可)を本発明の目的、主旨、及び範囲に適合させるために、多くの修正を行うことができる。全てのそのような修正は、本明細書に添付される特許請求の範囲内であることが意図される。

【0375】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年8月23日出願の米国仮特許出願第62/378,614号の利益を主張し、この出願の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0376】

連邦政府支援の研究に関する声明文

本発明は、国立衛生研究所によって与えられる認可番号R01CA196277の下、政府の支援で行われた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0377】

テキストファイルとして提供される配列表の参照による組み込み

2017年8月22日作製及び365KBのサイズのテキストファイル「UCSF-544WO_SeqList_ST25.txt」として、配列表が本明細書と共に提供される。このテキストファイルの内容の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

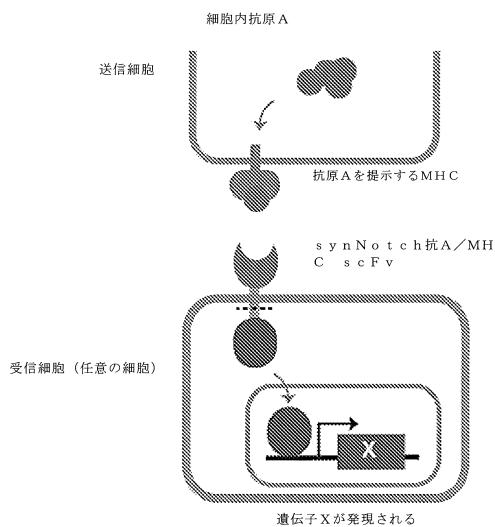
30

40

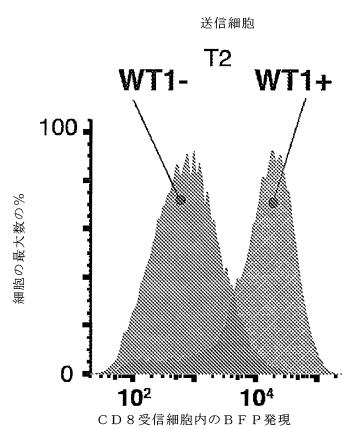
50

【図面】

【図 1】

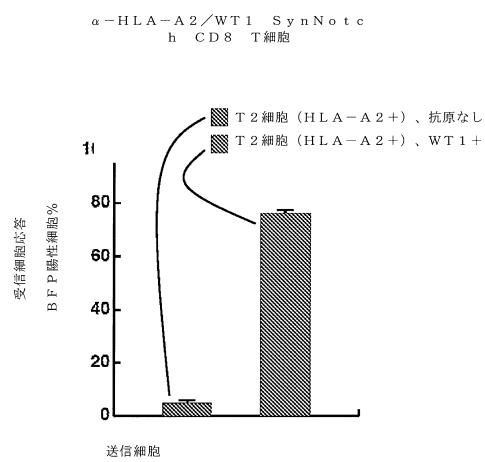


【図 2】

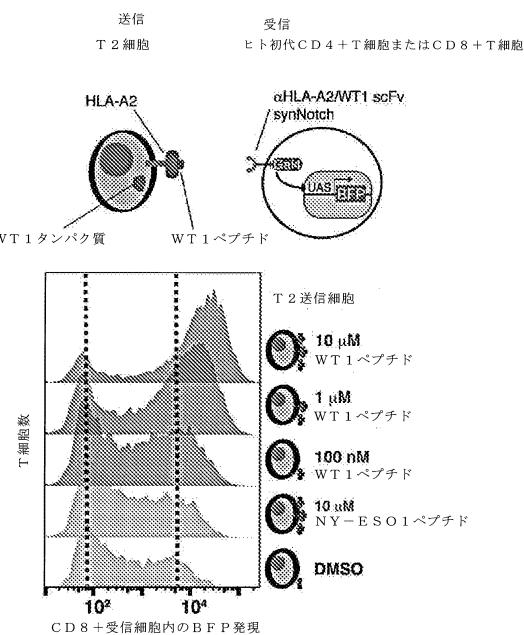


10

【図 3】



【図 4】



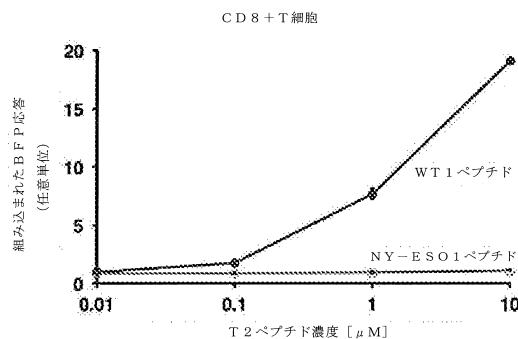
20

30

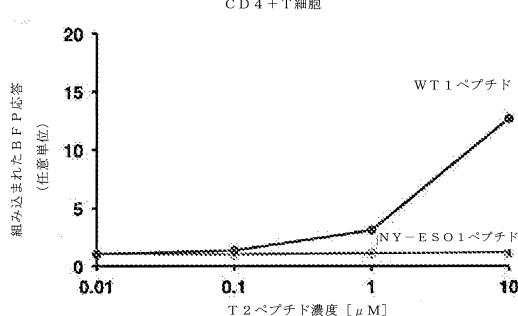
40

50

【図 5】

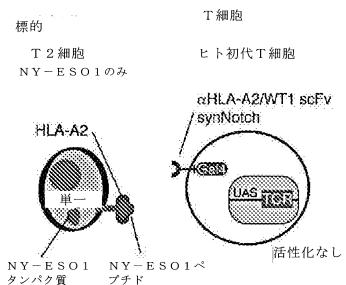
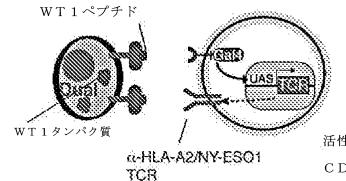


CD 8 + T 細胞



CD 4 + T 細胞

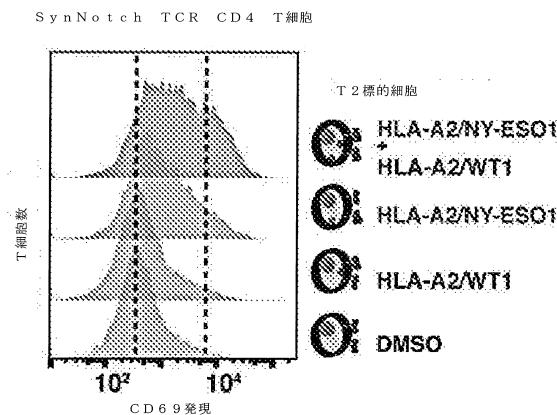
【図 6】

T2 細胞
NY-ESO1のみT2 細胞
NY-ESO1 + WT1WT 1 ペプチド
WT 1 タンパク質α-HLA-A2/NY-ESO1
TCR

活性化

CD 6 9 細胞傷害性

【図 7】

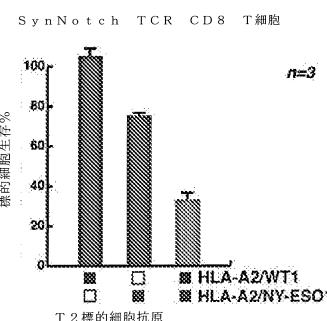


SynNotch TCR CD4 T 細胞

【図 8】

T 2 標的の
細胞

NY-ESO1 + WT1



SynNotch TCR CD8 T 細胞

n=3

10

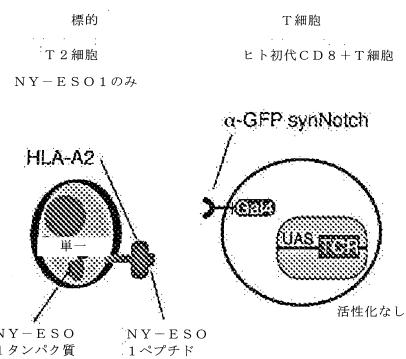
20

30

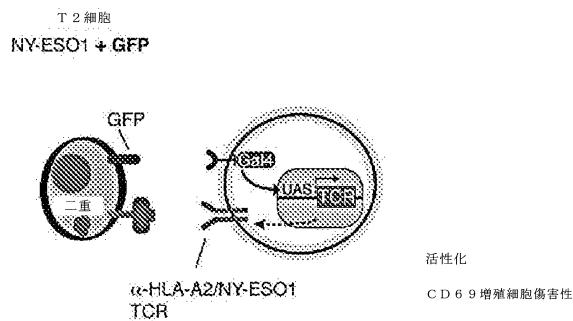
40

50

【図 9】

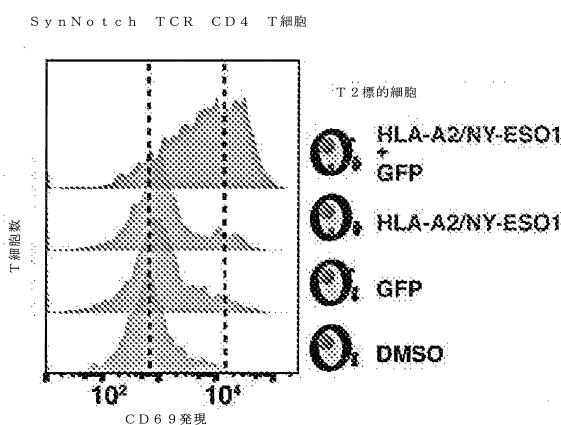


【図 10】

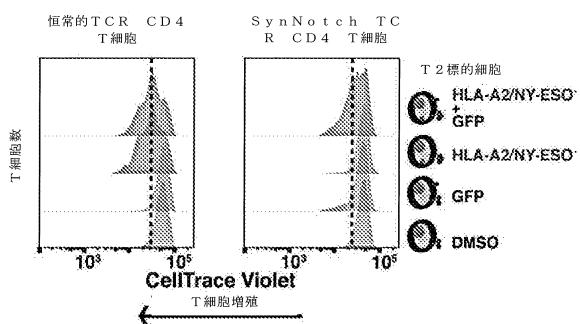


10

【図 11】

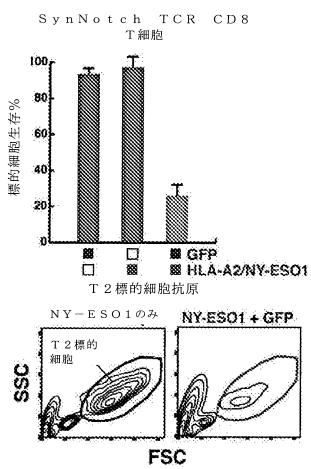


【図 12】

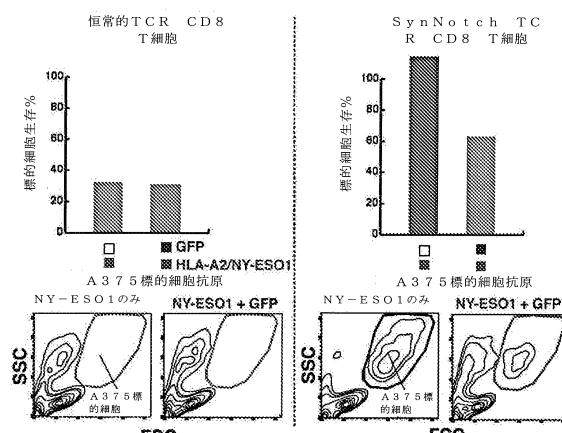


20

【図 13】



【図 14】

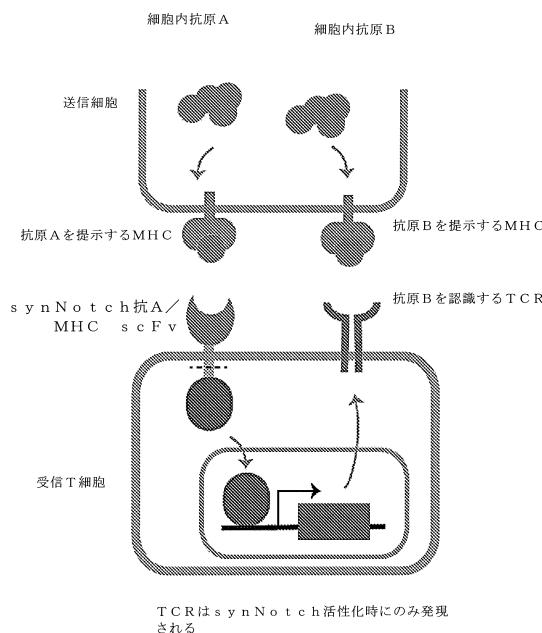


30

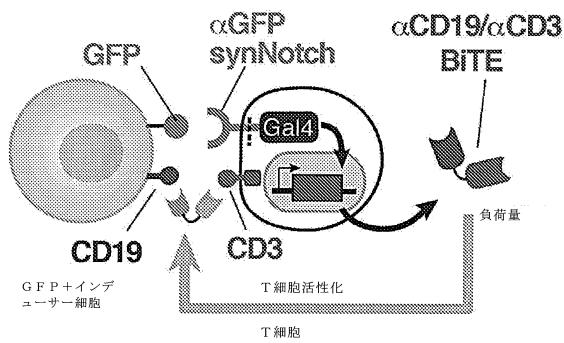
40

50

【図15】

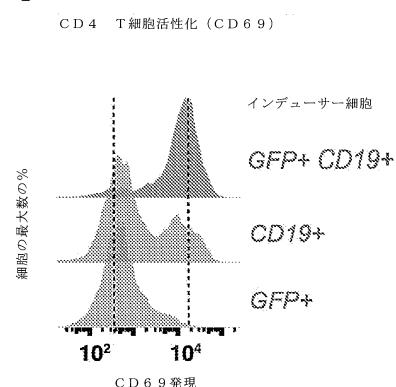


【図16】

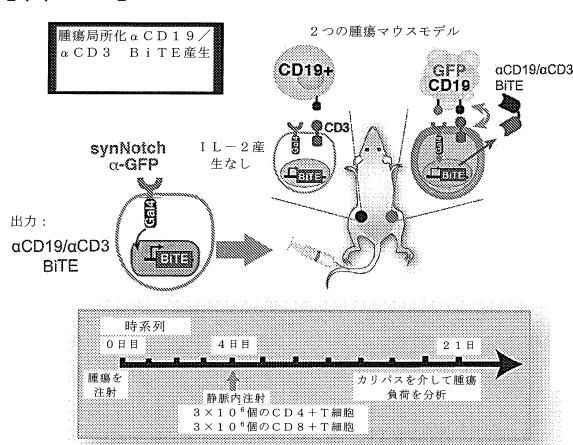


10

【図17】



【図18】



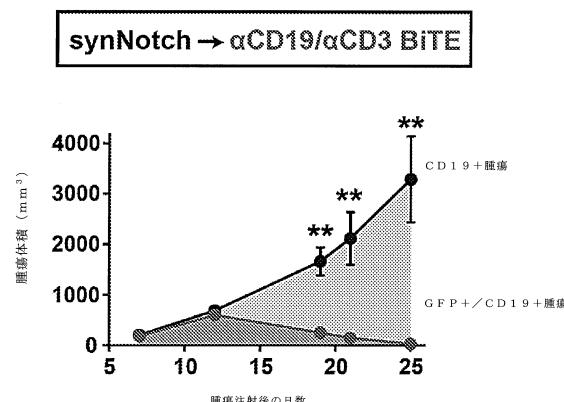
20

30

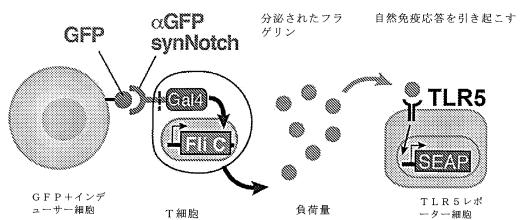
40

50

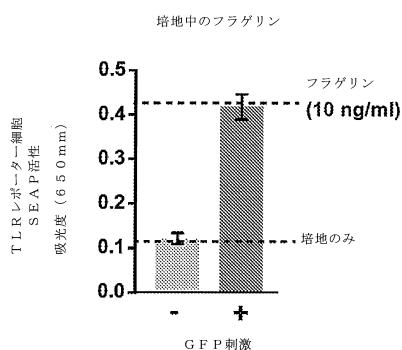
【図 19】



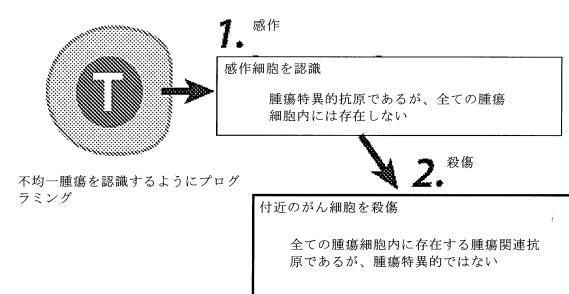
【図 20】



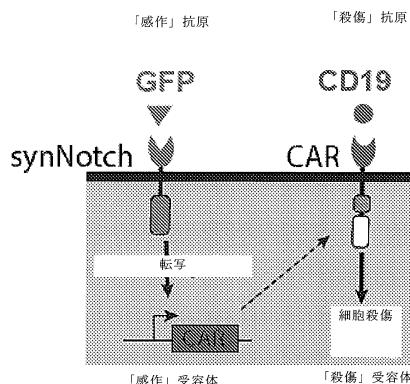
【図 21】



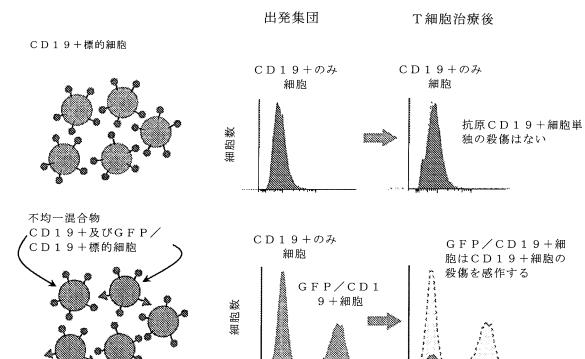
【図 22】



【図 23】



【図 24】



10

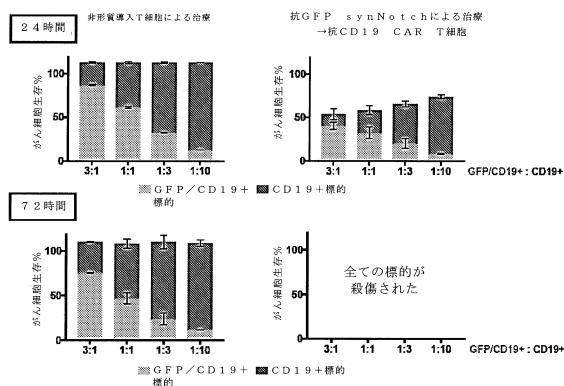
20

30

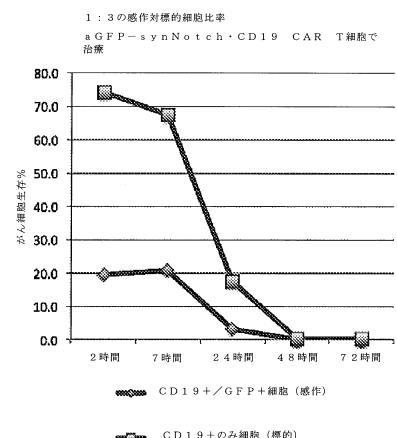
40

50

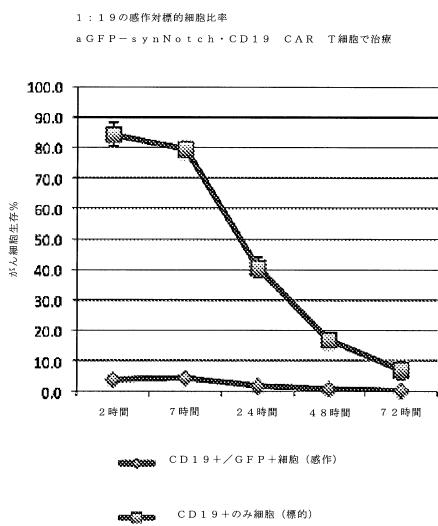
【図 2 5】



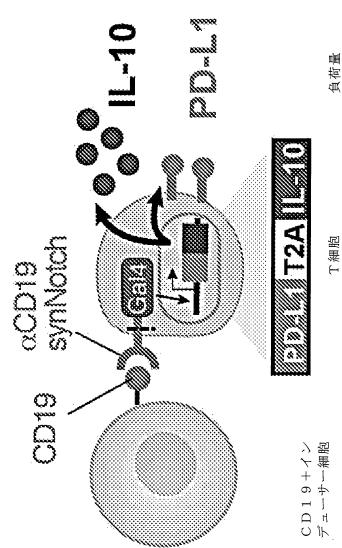
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

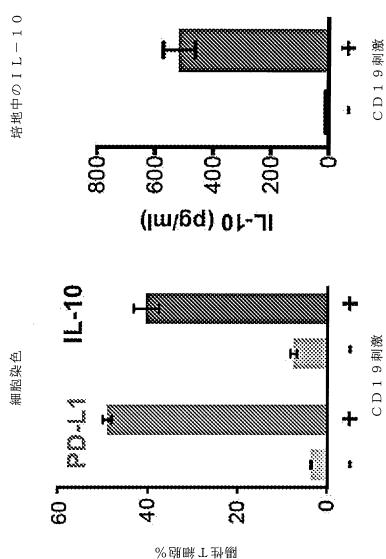
20

30

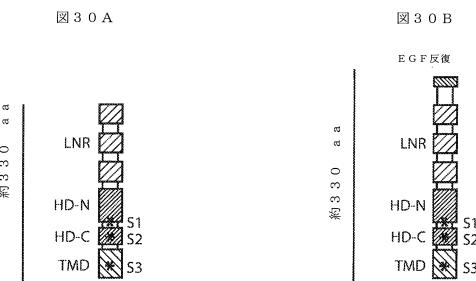
40

50

【図 29】

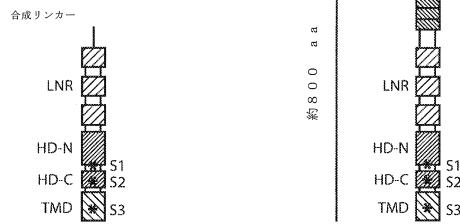


【図 30-1】



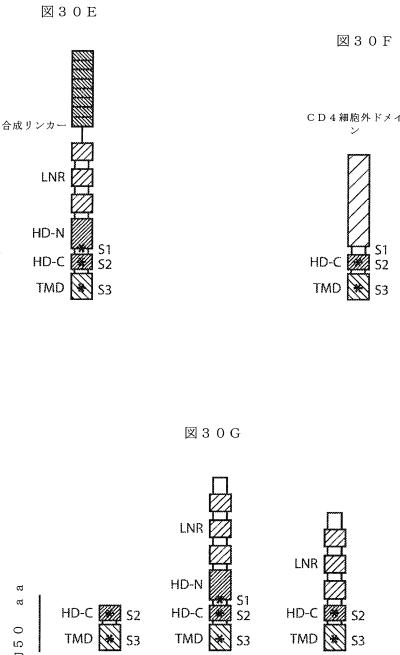
10

図 30 C



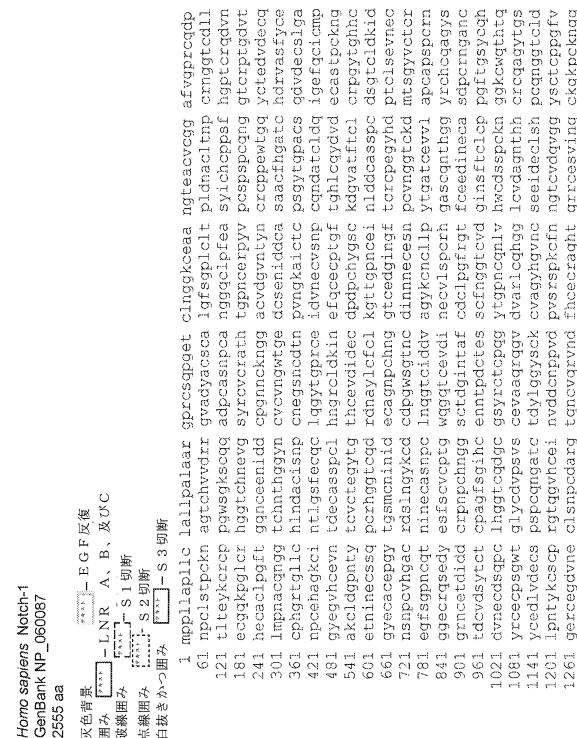
20

【図 30-2】



30

【図 31 A-1】



40

50

【図 31A-2】

FIG. 31A (Continued)

1321	vcavasntar	grikopagf	egatcendart	tcaslrlnq	atcissprp	tcclgftg	tcclgftg	tcclgftg	tcclgftg
1381	peccipass	grikopagf	egatcendart	tcaslrlnq	atcissprp	tcclgftg	tcclgftg	tcclgftg	tcclgftg
1441	peccipass	grikopagf	egatcendart	tcaslrlnq	atcissprp	tcclgftg	tcclgftg	tcclgftg	tcclgftg
1501	Podocleaceae	lpeccgdn	kuvcnernh	acwggydcos	lnfndpckh	sdqhdggn	sdqhdggn	sdqhdggn	sdqhdggn
1561	Podocleaceae	lpeccgdn	kuvcnernh	acwggydcos	lnfndpckh	sdqhdggn	sdqhdggn	sdqhdggn	sdqhdggn
1621	Cahyveria	avilvlyvll	poqilnus	hifrelhyl	htrvynfdr	hggmifoy	hggmifoy	hggmifoy	hggmifoy
1681	gheeslkrp	ikrstgwyat	alrgyalas	slnipyk	psqihmva	aaafvlfy	aaafvlfy	aaafvlfy	aaafvlfy
1741	gcl	ekrkseask	ekrkseask	ekrkseask	ekrkseask	ekrkseask	ekrkseask	ekrkseask	ekrkseask
1801	newgdedlet	kfrfieepvv	lpidddqtdh	rwqeqhld	adlrmamap	sdgkplna	sdgkplna	sdgkplna	sdgkplna
1861	cmndvrgpd	gftplmiasc	eeedapav	sdifypas	hntqfcrda	sdifygasl	sdifygasl	sdifygasl	sdifygasl
1921	alhlaaryst	sdaakrllea	sadanigim	grtpihav	agtrvly	sdifygasl	sdifygasl	sdifygasl	sdifygasl
1981	mnngtpi	laazlvegn	lnavdldgks	alhwaavnn	vdavvlln	sdifygasl	sdifygasl	sdifygasl	sdifygasl
2041	gantdmgnnk	eotpflaarr	egsytavkl	ldhfanrdit	ldhfanrdit	ldhfanrdit	ldhfanrdit	ldhfanrdit	ldhfanrdit
2101	rlleseynlvr	spachgtalg	gptlsplic	spnglynlk	satogkark	ptkglacs	ptkglacs	ptkglacs	ptkglacs
2161	keaklkarr	ksdakgcl	lpsldtch	rzwtqqlh	rzwtqqlh	rzwtqqlh	rzwtqqlh	rzwtqqlh	rzwtqqlh
2221	lshnpmpdt	hignishlyv	akpemaalag	gsrlafoppl	prishlyas	sastvstng	psqglacs	psqglacs	psqglacs
2281	tgannftvga	pasngcsw	plrlgnmva	sympipg	tpgtlsgaa	glhshmngpl	spfogspvp	lnhlgqlhlnv	akpemaalag
2341	hsu1stntls	pilyggad	rlatqphlvq	taqapenq	lqpnqncp	qphlyssaa	prishlyas	grlafetop	grlafetop
2401	ngnigrsfis	gernsgadvp	lqpslslpht	lqpslslpht	lqpslslpht	lqpslslpht	lqpslslpht	aprlstap	aprlstap
2461	sqhnyssspv	datshqlyq	peplfltsps	espdqssps	phnsidse	gisspttmp	gisspttmp	gisspttmp	gisspttmp
2521	sqthipeaf	k							

【図 31B-1】

Mus musculus Notch-1	GenBank NP_032740
2531 aa	
灰色背景	■ - EGF 反復
■ - LNR A, B, 及 C	
被線囲み	■ - S 1 切断
点線囲み	■ - S 2 切断
白抜きかづ囲み	■ - S 3 切断

1	mrpticfll illislskslnq	iqslgllig	rqhchqgpy	ngtntswcr	odctqgyc	61	mrpticfll ltlplalara	glrtspgat	clndrgceva
61	egodvdkcg	adekeyfakd	ymrcfakd	cdinmstcd	prisopnyst	dktrgwy	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
121	svmmngp	gcnmraek	gcnmraek	ldnresek	nsctgnstn	ntlylcv	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
181	pgfplpdc	pdgkgece	ldnresek	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
241	ngsclle	kgeststf	kgeststf	kgeststf	kgeststf	kgeststf	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
301	kgcngnayf	edscnpp	ycdntcgt	edscnpp	edscnpp	edscnpp	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
361	lcedkneci	semclnng	cnvngsdc	dcngcrgk	dcngcrgk	dcngcrgk	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
421	htchspvcg	cnfngfak	ekpofng	vcrdlrlie	isarngkof	isarngkof	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
481	vcpdflgnd	cnvnnckcs	slsnlscd	pnmnrcsd	rohntoyaci	ckfegfsc	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
541	erhdkdalen	pscngvch	hrfscfcd	pscngvch	pscngvch	pscngvch	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
601	■ - LNR A, B, 及 C	■ - EGF 反復	■ - S 1 切断	■ - S 2 切断	■ - S 3 切断		ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
661	krdgccsg	kreplskcr	anmeadfan	avngnacne	elctyndel	psavcpcy	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
721	Lehassan	glodbcn	qcdngd	neatlnth	elctyndel	psavcpcy	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
781	me-ssalrrt	vrqroeeep	lvfngnse	mdrvknnrg	lreqlvts	isrkfek	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
841	niuyvly	gndrkgl	ykdsuuds	isrlakkoj	dsfpiss	gntkrm	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
901	ntfslsnnl	liiagcyl	avvmlgsl	gntrkrm	nsvngpne	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
961	siisqtsll	easydoyair	grnalgqrs	ypqrggng	notglfnt	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
1021	espikltea	aytsaitep	trevnldp	rhntvhw	ansaaeze	dlirealec	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
1081	iaegadtnm	decentapl	tiynsersa	lhqaanrd	lhqaanrd	lhqaanrd	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
1141	gmmymlnst	klkgdneel	rnqntainrr	aymkagdqa	sklvekra	kydrgark	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
1201	dsckykor	lyakavsm	pirvlykrek	gskdkeord	gtpmlang	egrievmyl	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
1261	igqasleav	datdhdar	agnmih	diptopsp	gskdkeord	gtpmlang	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
1321	trpkktsr	skcessnsr	dhthtpp	dgs1spq	hamntthtp	tslyslpey	ngtntswcr	ngtntswcr	ngtntswcr
1381	qteagssef	qpcgcgqng	emwtrasts	ytqngqepmt	rysephayf				

【図3-1D-1】

【図3-1D-2】

3 1 E - 2]

1201 ligavecqr qgffagncel niddcaperpc qngtgcndrv mnffscpcg tngiiceink
1261 ddcckpcachn ngscldrvrg fecvcapqf yarcgdeine clnscpcnag tldcvlgvn
1321 yncrcphm grnrcbrkvf caqscpmgq ncnrcsgnq cncngtqyq nclscpcg
1381 dcldecs onpcacqac edlldcvcl
1441 cpcskwkgkrc diydrvypgw nqgsygsndi yaadlegrar mcdkrctek cncngtcsd
1501 ntvcnlpwa dclnlpwa fngkncne nnaachyndg dcerlkscd
1561 gldfcdarqkch Yadaffodycg mnaesswdq dclngkncne lmnvafefri
1621 qafqfnnsh mrlttrllk dalgdliln wdnyrvpel edtdfrck
1681 qfytvshqt qfytvshqt qfytvshqt qfytvshqt qfytvshqt
1741 anqkytigt1 ilviiialff qmvlstqzkr ahngtwpf frrasgavmr prrdshqgn
1801 rnlhkvamq sggvcdgah wsddesmpl pkqrqsdpsv gvglgnggqy aschtnvsey
1861 eeadcrvwsq gqfhdwqsa lnhdrvdrqg qmvlstqzkr ahngtwpf
1921 dieneststa qvisstllagg aelnaadmkt gkhdwqsa lnhdrvdrqg qmvlstqzkr
1981 dntgrplha avaadangvf qillmrnrat ptilarlar1 egmvedita
2041 dadinaadns qkthalmdrla vntteavnlh dntgrplha avaadangvf qillmrnrat
2101 qkthalmdrla qkthalmdrla rdvasevrlh dntgrplha avaadangvf qillmrnrat
2161 qqqpdltq ptvlsagngq nngnqasgk qsnqtkqka akakliqgs pldqldatgs
2221 lrrksskk tsaaskaaalnq nngnqasgk gvsrppvpo nngnqasgk gvsrppvpo
2281 tsaaskaaalnq nngnqasgk gvsrppvpo nngnqasgk gvsrppvpo
2341 elegsvqvg mgmnlspyd tssmgnma plgngnqasgk gvsrppvpo
2401 agnqshqeqq lsppnqsp physvssial sponaylqsp pakrsplpt sptnqamrh
2461 atqdkfegs nlsnlggnq hggvrgqgq hggvrgqgq hggvrgqgq hggvrgqgq
2521 appnqnsa imtqdkfegs nlsnlggnq hggvrgqgq hggvrgqgq hggvrgqgq
2581 lncfcsopds fnsqmpnps lqssqmpnps stmnspssq hncqsfyqyl tpsscsngq
2641 tpqhlvtqds sytpspesq ghwankse
2701 iyi

FIG. 31D (Continued)

FIG. 31E (Continued)

【図3-1F-1】

【図3-1F-2】

FIG. 31F (Continued)

FIG. 31G (Continued)

【図 3 2】

図 3 2 A

Notch レセプターポリペプチド（「Notch 制御領域」）

白抜きテキスト - L in Notch 反復 (A ~ C)

太字テキスト - ヘテロ二量体化ドメイン (N 及び C)

白抜きかつ下線テキスト - S 1 切断

白抜きかつ下線テキスト - S 2 切断

太字かつ下線テキスト - S 3 切断

囲みテキスト - 膜貫通

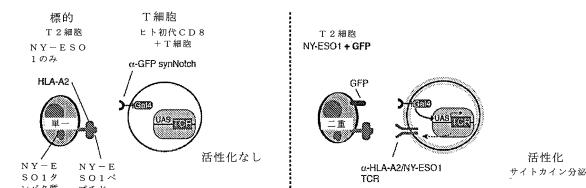
ILDYSFTGGAGGRDIPPPQIEEACELPECQVDAGNKVCNLQCNNHACGWGGDCSILNF
 NDPWKNCTQSLQCVKYFSDGHCDSCQNCNSAGCLFDGFDQCLTEGQCNPLYDQYCKD
 HFDSDGHCDQGNCNSAECEWGLDCAEHVPERLAAGTLVLLPQDQLRNNFSHFLRE
 LSHVLHTNVFVKRDAQQQMIFPYGHHEEELRKHPIKRSTVGVWATSSLLPGTSGGRQR
 RELDPMDIRGSIVYLEIDNRCVQSSSSCFCQSATDVAFLGALASLGSLNIPYKIEAVKS
 EPVEPPLPSQLILMYVAAAFVLLFFVGCGVLLSRKRRRQLCIQKL

図 3 2 B

EGF 反復を有する Notch レセプターポリペプチド（「Notch 制御領域」）

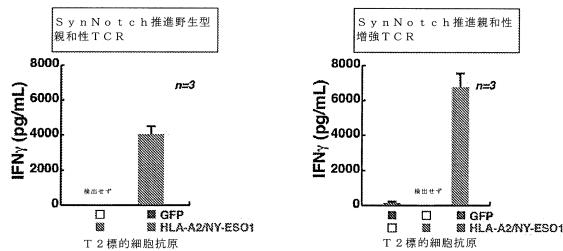
PCVGGSNP CYNQGTCPTSENPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFTGGAGGRDIPPPQIEEA
 CELPECCQV DAGNKVCNLQCNNHACGWGGDCSILNFDPWKNCTQSLQCVKYFSDG
 HCDSQCNCSAGCLFDGFDQCLTEGQCNPLYDQYCKDHSFDGHCDQGCNSAECEWWDG
 LDCAEHVPERLAAGTLVLLPQDQLRNNFSHFLRELSHVLTNVFVKRDAQQQMIF
 PYGGHEEELRKHPIKRSTVGVWATSSLLPGTSGGRQRRELDPMDIRGSIVYLEIDNRCV
 QSSSSCFCQSATDVAFLGALASLGSLNIPYKIEAVKSEPVEPPLPSQLILMYVAAAFVLL
 FVGCGVLLSRKRRRQLCIQKL

【図 3 3】

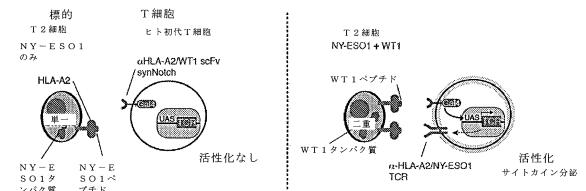


【図 3 4】

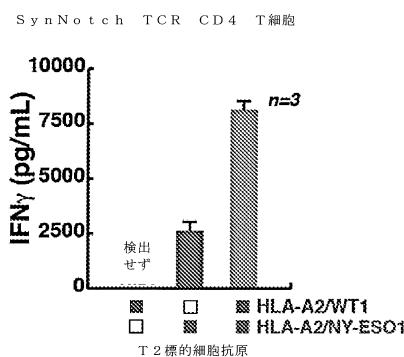
SynNotch TCR CD8 T 細胞



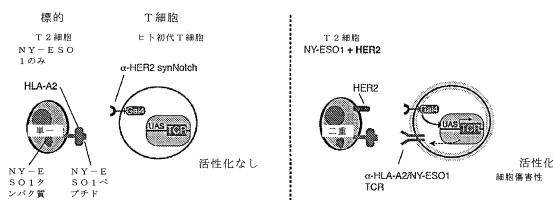
【図 3 5】



【図36】

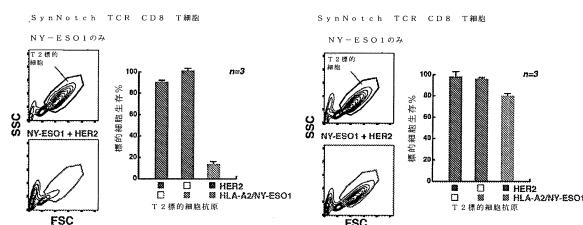


【図37】

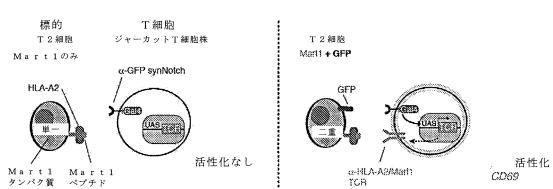


10

【図38】

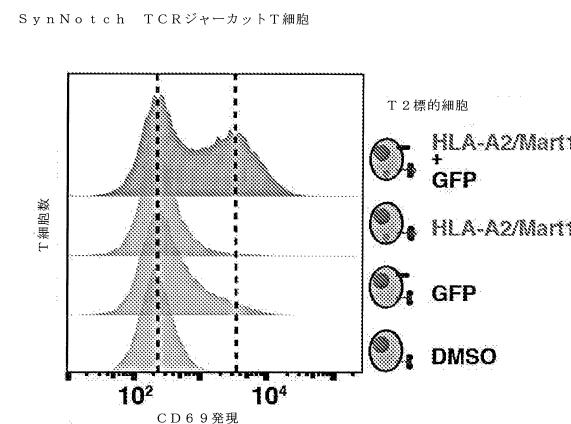


【図39】

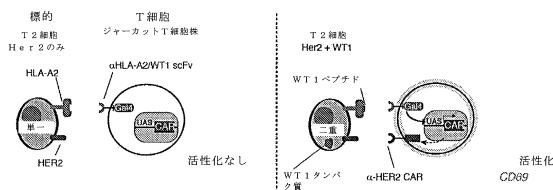


20

【図40】



【図41】



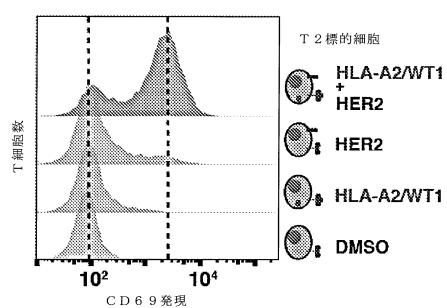
30

40

50

【図 4 2】

SynNotch TCRジャッカットT細胞



10

【配列表】

0007500195000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)
C 1 2 N	15/12 (2006.01)
C 1 2 N	15/62 (2006.01)
C 1 2 P	21/02 (2006.01)
A 6 1 K	38/17 (2006.01)
A 6 1 K	38/19 (2006.01)
A 6 1 K	38/20 (2006.01)
A 6 1 P	37/06
C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	15/62
C 1 2 P	21/02
A 6 1 K	38/17
A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	38/20

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94118 , サン フランシスコ , コリンズ ストリート 149

(72)発明者 ロイバル , コレ ティー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94158 , サン フランシスコ , 16番 ストリート 600

(72)発明者 ウィリアムズ , ジャスパー ゼット .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94158 , サン フランシスコ , 16番 ストリート 600

合議体

審判長 光本 美奈子

審判官 富永 みどり

審判官 原口 美和

(56)参考文献 米国特許出願公開第2016/0081314 (U.S , A1)

国際公開第2016/019300 (WO , A1)

国際公開第2016/093243 (WO , A1)

特開2014-158469 (JP , A)

特表2016-517848 (JP , A)

Cell , 2016 Feb 11 , vol. 164 , no. 4 , pp. 770 - 779

Proc Natl Acad Sci USA , 2008 Dec 23 , vol. 10

5 , no. 51 , pp. 20428 - 204

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

A61K

C12N

C07K

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)