(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-512573
(P2024-512573A)
(43)公表日　令和6年3月19日(2024.3.19)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	４Ｂ０６５
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00 ＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ｃ０７Ｋ	*14/705 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/705	４Ｃ０８４
Ｃ０７Ｋ	*16/12 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/12	４Ｃ０８５
Ｃ０７Ｋ	*16/32 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/32	４Ｃ０８６

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全63頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-558552(P2023-558552)
(86)(22)出願日　令和4年3月22日(2022.3.22)
(85)翻訳文提出日　令和5年10月30日(2023.10.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/021352
(87)国際公開番号　WO2022/204151
(87)国際公開日　令和4年9月29日(2022.9.29)
(31)優先権主張番号　63/164,995
(32)優先日　令和3年3月23日(2021.3.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　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　100099759
弁理士　青木 篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋 真二
(74)代理人　100117019
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　カスタム抗原誘導性転写制御のための合成膜間タンパク質分解受容体

(57)【要約】
本開示は、概して、とりわけ、リガンド依存的に転写制御を調節するように操作された新規クラスの受容体に関する。特に、新規受容体は、異種移送停止配列及びγ－セクレターゼ切断可能な膜貫通ドメインを含有する。本開示はまた、このような受容体を産生するのに有用な組成物及び方法、それをコードする核酸、核酸で遺伝子改変された宿主細胞、並びに細胞の活性を調節するための方法及び／又は癌などの様々な疾患の治療のための方法を提供する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｎ末端からＣ末端に向かって、
ａ）選択されたリガンドに対する結合親和性を有する細胞外結合ドメイン（ＥＣＤ）と、
ｂ）連結配列と、
ｃ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）であって、１型膜貫通受容体の膜貫通ドメインに対して少なくとも約８０％の配列同一性を有し、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、ＴＭＤと、
ｄ）転写制御因子を含む細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と、を含むキメラポリペプチドであって、前記選択されたリガンドの前記細胞外結合ドメインへの結合が、前記転写制御因子と前記連結配列との間の前記リガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導し、
前記キメラポリペプチドが、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を含まない、キメラポリペプチド。
【請求項２】
前記ＴＭＤと前記ＩＣＤとの間に位置する移送停止配列（ＳＴＳ）を更に含み、前記ＳＴＳが、前記ＴＭＤに対して異種である、請求項１に記載のキメラポリペプチド。
【請求項３】
前記ＴＭＤが、１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、γ－セクレターゼ切断部位を含む、請求項１又は２に記載のキメラポリペプチド。
【請求項４】
前記ＴＭＤが、１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも９０％の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、γ－セクレターゼ切断部位を含む、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。
【請求項５】
前記ＴＭＤが、１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも９５％の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、γ－セクレターゼ切断部位を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項６】
前記１型膜貫通受容体が、ＣＬＳＴＮ１、ＣＬＳＴＮ２、ＡＰＬＰ１、ＡＰＬＰ２、ＬＲＰ８、ＡＰＰ、ＢＴＣ、ＴＧＢＲ３、ＳＰＮ、ＣＤ４４、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＸＣＬ１６、ＣＸ３ＣＬ１、ＤＣＣ、ＤＬＬ１、ＤＳＧ２、ＤＡＧ１、ＣＤＨ１、ＥＰＣＡＭ、ＥＰＨＡ４、ＥＰＨＢ２、ＥＦＮＢ１、ＥＦＮＢ２、ＥｒｂＢ４、ＧＨＲ、ＨＬＡ－Ａ、ＩＦＮＡＲ２、ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１Ｒ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＮＳＲ、ＥＲＮ１、ＥＲＮ２、ＪＡＧ２、ＫＣＮＥ１、ＫＣＮＥ２、ＫＣＮＥ３、ＫＣＮＥ４、ＫＬ、ＣＨＬ１、ＰＴＰＲＦ、ＳＣＮ１Ｂ、ＳＣＮ３Ｂ、ＮＰＲ３、ＮＧＦＲ、ＰＬＸＤＣ２、ＰＡＭ、ＡＧＥＲ、ＲＯＢＯ１、ＳＯＲＣＳ３、ＳＯＲＣＳ１、ＳＯＲＬ１、ＳＯＲＴ１、ＳＤＣ１、ＳＤＣ２、ＴＹＲ、ＴＹＲＰ１、ＤＣＴ、ＶＡＳＮ、ＦＬＴ１、ＣＤＨ５、ＰＫＨＤ１、ＮＥＣＴＩＮ１、ＰＣＤＨＧＣ３、ＮＲＧ１、ＬＲＰ１Ｂ、ＣＤＨ２、ＮＲＧ２、ＰＴＰＲＫ、ＳＣＮ２Ｂ、Ｎｒａｄｄ、及びＰＴＰＲＭからなる群から選択され、γ－セクレターゼ切断部位を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項７】
前記１型膜貫通受容体が、ＡＰＰ、ＣＬＳＴＮ１、ＣＬＳＴＮ２、ＥＰＣＡＭ、ＫＣＮＥ３、ＮＥＣＴＩＮ１、ＰＣＤＨＧＣ３、及びＰＴＰＲＦである、請求項６に記載のキメラポリペプチド。
【請求項８】
前記ＳＴＳが、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＸＣＬ１６、ＤＡＧ１、ＧＨＲ、ＰＴＰＲＦ、ＡＧＥＲ、ＫＬ、ＮＲＧ１、ＬＲＰ１Ｂ、Ｊａｇ２、ＥＰＣＡＭ、ＫＣＮＥ３、ＣＤＨ２、ＮＲＧ２、ＰＴＰＲＫ、ＢＴＣ、ＥＰＨＡ３、ＩＬ１Ｒ２、ＰＴＰＲＦ、又はＰＴＰＲＭ由来の

ＳＴＳ配列に対して少なくとも７０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項９】
前記ＳＴＳが、ＣＳＦ１Ｒ、ＤＡＧ１、ＡＧＥＲ、ＮＲＧ１、ＫＣＮＥ３、ＰＴＰＲＦ、又はＰＴＰＲＭ由来のＳＴＳ配列に対して少なくとも７０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項８に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１０】
前記細胞外ドメインが、細胞の表面上のリガンドに結合することができる抗原結合部分を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１１】
前記細胞が、病原性細胞である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１２】
前記リガンドが、タンパク質又は炭水化物を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１３】
前記リガンドが、ＣＤ１、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｄ、ＣＤ１ｅ、ＣＤ２、ＣＤ３ｄ、ＣＤ３ｅ、ＣＤ３ｇ、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ８ａ、ＣＤ８ｂ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ４８、ＣＤ５２、ＣＤ５９、ＣＤ６６、ＣＤ７０、ＣＤ７１、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９Ｂ、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ＣＤ９４、ＣＤ９５、ＣＤ１３４、ＣＤ１４０（ＰＤＧＦＲ４）、ＣＤ１５２、ＣＤ１５４、ＣＤ１５８、ＣＤ１７８、ＣＤ１８１（ＣＸＣＲ１）、ＣＤ１８２（ＣＸＣＲ２）、ＣＤ１８３（ＣＸＣＲ３）、ＣＤ２１０、ＣＤ２４６、ＣＤ２５２、ＣＤ２５３、ＣＤ２６１、ＣＤ２６２、ＣＤ２７３（ＰＤ－Ｌ２）、ＣＤ２７４（ＰＤ－Ｌ１）、ＣＤ２７６（Ｂ７Ｈ３）、ＣＤ２７９、ＣＤ２９５、ＣＤ３３９（ＪＡＧ１）、ＣＤ３４０（ＨＥＲ２）、ＥＧＦＲ、ＦＧＦＲ２、ＣＥＡ、ＡＦＰ、ＣＡ１２５、ＭＵＣ－１、及びＭＡＧＥ、アルカリホスファターゼ、胎盤様２（ＡＬＰＰＬ２）、Ｂ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、増強緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、及びシグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）からなる群から選択される、請求項１～１２のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１４】
前記リガンドが、細胞表面受容体、接着タンパク質、インテグリン、ムチン、レクチン、腫瘍関連抗原、及び腫瘍特異的抗原から選択される、請求項１～１３のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１５】
前記リガンドが、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的関連抗原である、請求項１～１４のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１６】
前記細胞外結合ドメインが、受容体のリガンド結合部分を含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１７】
前記抗原結合部分が、抗体、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、又はミニボディ、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、又はその機能的断片からなる群から選択される、請求項１０～１６のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１８】
前記抗原結合部分が、ｓｃＦｖを含む、請求項１７に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１９】
前記抗原結合部分が、ＣＤ１９、Ｂ７Ｈ３（ＣＤ２７６）、ＢＣＭＡ（ＣＤ２６９）、

ＡＬＰＰＬ２、ＣＤ１２３、ＣＤ１７１、ＣＤ１７９ａ、ＣＤ２０、ＣＤ２１３Ａ２、ＣＤ２２、ＣＤ２４、ＣＤ２４６、ＣＤ２７２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ４４ｖ６、ＣＤ４６、ＣＤ７１、ＣＤ９７、ＣＥＡ、ＣＬＤＮ６、ＣＬＥＣＬ１、ＣＳ－１、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＬＦ２Ｍ、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、エフリンＢ２、ＦＡＰ、ＦＬＴ３、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＭ３、ＧＰＲＣ５Ｄ、ＨＥＲ２（ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ）、ＩＧＬＬ１、ＩＬ－１１Ｒａ、ＫＩＴ（ＣＤ１１７）、ＭＵＣ１、ＮＣＡＭ、ＰＡＰ、ＰＤＧＦＲ－β、ＰＲＳＳ２１、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、ＳＩＲＰα、ＳＳＥＡ－４、ＴＡＧ７２、ＴＥＭ１／ＣＤ２４８、ＴＥＭ７Ｒ、ＴＳＨＲ、ＶＥＧＦＲ２、ＡＬＰＩ、シトルリン化ビメンチン、ｃＭｅｔ、及びＡｘｌからなる群から選択される腫瘍関連抗原である、請求項１０～１８のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２０】

前記腫瘍関連抗原が、ＣＤ１９、ＣＥＡ、ＨＥＲ２、ＭＵＣ１、ＣＤ２０、ＢＣＭＡ、ＡＬＰＰＬ２、又はＥＧＦＲである、請求項１９に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２１】

前記腫瘍関連抗原が、ＣＤ１９である、請求項２０に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２２】

前記リガンド誘導性タンパク質分解切断部位が、γ－セクレターゼ切断部位である、請求項１～２１のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２３】

前記転写制御因子が、転写活性化因子又は転写抑制因子を含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２４】

前記ＩＣＤが、核局在化配列と、Ｇａｌ４－ＶＰ１６、Ｇａｌ４－ＶＰ６４、ｔｅｔＲ－ＶＰ６４、ＺＦＨＤ１－ＶＰ６４、Ｇａｌ４－ＫＲＡＢ、及びＨＡＰ１－ＶＰ１６から選択される転写制御因子配列とを含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２５】

シグナル配列、検出可能な標識、腫瘍特異的切断部位、疾患特異的切断部位、又はこれらの組み合わせを更に含む、請求項１～２４のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２６】

前記ＳＴＳが、配列番号８５～１５６、及び１７３に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２～２５のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２７】

前記ＳＴＳが、配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２～２５のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２８】

前記ヒンジドメインが、分子間ジスルフィド結合を介して前記キメラポリペプチドのオリゴマー形成を促進することができる、請求項１～２７のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項２９】

前記連結配列が、ＣＤ８αヒンジドメイン、ＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ１５２ヒンジドメイン、ＰＤ－１ヒンジドメイン、ＣＴＬＡ４ヒンジドメイン、ＯＸ４０ヒンジドメイン、ＩｇＧ１ヒンジドメイン、ＩｇＧ２ヒンジドメイン、ＩｇＧ３ヒンジドメイン、及びＩｇＧ４ヒンジドメインに由来するヒンジドメイン、又はそれらのいずれかの機能的変異体に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～２８のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項３０】

前記ヒンジドメインが、ＣＤ８αヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来する、請求項２９に記載のキメラポリペプチド。
【請求項３１】
前記ヒンジドメインが、配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項３０に記載のキメラポリペプチド。
【請求項３２】
前記ＴＭＤが、配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２のいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～３１のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項３３】
前記ＴＭＤが、配列番号１～２、６、２０、４３、３９、５４、及び６４のいずれか１つに対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項３２に記載のキメラポリペプチド。
【請求項３４】
前記ＴＭＤが、配列番号１～２、６、２０、４３、３９、５４、及び６４のいずれか１つに対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～３３のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項３５】
前記ＴＭＤが、配列番号１～２、６、２０、４３、３９、５４、及び６４のいずれか１つに対して実質的に同一のアミノ酸配列を含む、請求項３４に記載のキメラポリペプチド。
【請求項３６】
ａ）前記連結配列が、配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
ｂ）前記ＴＭＤが、配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２のいずれか１つに対して少なくとも約８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
ｃ）前記ＳＴＳが、配列番号８５～１５６、及び１７３に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～３５のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。
【請求項３７】
請求項１～３６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ヌクレオチド配列を含む、組換え核酸。
【請求項３８】
前記ヌクレオチド配列が、発現カセット又は発現ベクターに組み込まれている、請求項３７に記載の組換え核酸。
【請求項３９】
前記発現ベクターが、ウイルスベクターである、請求項３８に記載の組換え核酸。
【請求項４０】
前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、又はレトロウイルスベクターである。請求項３９に記載の組換え核酸。
【請求項４１】
前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、請求項４０に記載の組換え核酸。
【請求項４２】
ａ）請求項１～３６のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド、及び／又は
ｂ）請求項３７～４１のいずれか一項に記載の組換え核酸を含む、組換え細胞。
【請求項４３】
前記細胞が、哺乳動物細胞である、請求項４２に記載の組換え細胞。

【請求項４４】
前記哺乳動物細胞が、免疫細胞、ニューロン、上皮細胞、内皮細胞、又は幹細胞である、請求項４３に記載の組換え細胞。
【請求項４５】
前記免疫細胞が、Ｂ細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、好塩基球、好酸球、好中球、樹状細胞、マクロファージ、制御性Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、又は他のＴ細胞である、請求項４４に記載の組換え細胞。
【請求項４６】
ａ）請求項１～３６のいずれか一項に記載の第２のキメラポリペプチド、及び／又は
ｂ）請求項３７～４１のいずれか一項に記載の第２の核酸、を更に含み、
前記第１のキメラポリペプチド及び前記第２のキメラポリペプチドが、同じ配列を有しておらず、かつ／又は前記第１の核酸若しくは前記第２の核酸が、同じ配列を有していない、請求項４２～４５のいずれか一項に記載の組換え細胞。
【請求項４７】
前記キメラポリペプチドが、前記第２のキメラポリペプチドの発現及び／又は活性を調節する、請求項４６に記載の組換え細胞。
【請求項４８】
プロモーターに作動可能に連結された対象のタンパク質をコードする発現カセットを更に含み、前記タンパク質の発現が、前記キメラ受容体によってコードされる前記転写制御因子によって調節されている、請求項４２～４７のいずれか一項に記載の組換え細胞。
【請求項４９】
前記対象のタンパク質が、前記細胞に対して異種である、請求項４８に記載の組換え細胞。
【請求項５０】
前記プロモーターが、ＧＡＬ４である、請求項４８又は４９に記載の組換え細胞。
【請求項５１】
前記対象のタンパク質が、サイトカイン、細胞毒素、ケモカイン、免疫調節物質、アポトーシス促進因子、抗アポトーシス因子、ホルモン、分化因子、脱分化因子、免疫細胞受容体、又はレポーターである、請求項４８又は５０に記載の組換え細胞。
【請求項５２】
請求項４２～５１のいずれか一項に記載の組換え細胞、及び培養培地を含む、細胞培養物。
【請求項５３】
薬学的に許容される担体と、以下の：
ａ）請求項３７～４１のいずれか一項に記載の組換え核酸、又は
ｂ）請求項４２～５１のいずれか一項に記載の組換え細胞のうちの１つ以上と、を含む、医薬組成物。
【請求項５４】
前記組成物が、請求項３７～４１のいずれか一項に記載の組換え核酸と、薬学的に許容される担体とを含む、請求項５３に記載の医薬組成物。
【請求項５５】
前記組換え核酸が、ウイルスカプシド又は脂質ナノ粒子に封入されている、請求項５４に記載の医薬組成物。
【請求項５６】
細胞の活性を調節するための方法であって、
ａ）請求項４２～５１のいずれか一項に記載の組換え細胞を提供することと、
ｂ）前記組換え細胞を前記選択されたリガンドと接触させることと、を含み、前記選択されたリガンドの前記細胞外結合ドメインへの結合が、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位の切断を誘導し、前記転写制御因子を放出し、前記放出された転写制御因子が、前記組換え細胞の活性を調節する、方法。

【請求項５７】
前記接触が、インビボ、エクスビボ、又はインビトロで行われる、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記細胞の活性が、前記細胞の選択された遺伝子の発現、前記細胞の増殖、前記細胞のアポトーシス、前記細胞の非アポトーシス死、前記細胞の分化、前記細胞の脱分化、前記細胞の遊走、前記細胞からの分子の分泌、前記細胞の細胞接着、及び前記細胞の細胞溶解活性からなる群から選択される、請求項５６又は５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記放出された転写制御因子が、前記細胞の遺伝子産物の発現を調節する、請求項５６～５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記放出された転写制御因子が、異種遺伝子産物の発現を調節する、請求項５６～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
前記細胞の前記遺伝子産物が、ケモカイン、ケモカイン受容体、キメラ抗原受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、分化因子、成長因子、成長因子受容体、ホルモン、代謝酵素、病原体由来タンパク質、増殖誘導因子、受容体、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ、部位特異的ヌクレアーゼ、Ｔ細胞受容体、毒素、毒素由来タンパク質、転写制御因子、転写活性化因子、転写抑制因子、翻訳制御因子、翻訳活性化因子、翻訳抑制因子、活性化免疫受容体、抗体、アポトーシス阻害剤、アポトーシス誘導因子、操作されたＴ細胞受容体、免疫活性化因子、免疫阻害剤、及び阻害免疫受容体からなる群から選択される、請求項５９又は６０に記載の方法。
【請求項６２】
前記放出された転写制御因子が、前記細胞の分化を調節し、前記細胞が、免疫細胞、幹細胞、始原細胞、又は前駆細胞である、請求項５６～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
個体における標的細胞の活性を阻害する方法であって、有効数の請求項４２～５１のいずれか一項に記載の組換え細胞を前記個体に投与することを含み、前記組換え細胞が、前記個体における前記標的細胞の活性を阻害する、方法。
【請求項６４】
前記標的細胞が、急性骨髄腫白血病細胞、未分化リンパ腫細胞、星状細胞腫細胞、Ｂ細胞癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、上衣腫細胞、食道癌細胞、膠芽腫細胞、グリオーマ細胞、平滑筋肉腫細胞、脂肪肉腫細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、マントル細胞リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、神経芽細胞腫細胞、非小細胞肺癌細胞、乏突起神経膠腫細胞、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、末梢Ｔ細胞リンパ腫細胞、腎癌細胞、肉腫細胞、胃癌細胞、癌細胞、中皮腫細胞、又は肉腫細胞である、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記標的細胞が、病原性細胞である、請求項６３に記載の方法。
【請求項６６】
疾患の治療を必要とする個体におけるそれを行うための方法であって、有効数の請求項４２～５１のいずれか一項に記載の組換え細胞を含む第１の療法を前記個体に施すことを含み、前記組換え細胞が、前記個体における前記疾患を治療する、方法。
【請求項６７】
第２の療法を前記個体に施すことを更に含む、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記第２の療法が、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、又は毒素療法からなる群から選択される、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記第１の療法及び前記第２の療法が、同じ組成物で又は別個の組成物で一緒に施され

る、請求項６６～６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０】
前記第１の療法及び前記第２の療法が、同時に施される、請求項６７～６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１】
前記第１の療法及び前記第２の療法が、連続的に施される、請求項６７又は６８に記載の方法。
【請求項７２】
前記第１の療法が、前記第２の療法の前に施される、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
前記第１の療法が、前記第２の療法の後に施される、請求項７１に記載の方法。
【請求項７４】
前記第１の療法及び前記第２の療法が、交代で施される、請求項７１に記載の方法。
【請求項７５】
細胞の活性を調節するか、標的癌細胞を阻害するか、又は疾患の治療を必要とする個体においてそれを行うための系であって、前記系が、以下の：
ａ）請求項１～３６のいずれか一項に記載のキメラポリペプチドと、
ｂ）請求項３７～４１のいずれか一項に記載の組換え核酸と、
ｃ）請求項４２～５１のいずれか一項に記載の組換え細胞と、
ｄ）請求項５３～５５のいずれか一項に記載の医薬組成物と、のうちの１つ以上を含む、系。
【請求項７６】
請求項４２～５１のいずれか一項に記載の組換え細胞を作製するための方法であって、
ａ）タンパク質発現が可能な細胞を提供することと、
ｂ）前記提供された細胞を、請求項３７～４１のいずれか一項に記載の組換え核酸と接触させることと、を含む、方法。
【請求項７７】
前記細胞が、ヒト対象から得られた試料に対して行われる白血球アフェレーシスによって得られ、前記細胞が、エクスビボで接触させられる、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記組換え核酸が、ウイルスカプシド又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に封入されている、請求項７６に記載の方法。
【請求項７９】
疾患の治療のための、以下の：
ａ）請求項１～３６のいずれか一項に記載のキメラポリペプチドと、
ｂ）請求項３７～４１のいずれか一項に記載の組換え核酸と、
ｃ）請求項４２～５１のいずれか一項に記載の組換え細胞と、
ｄ）請求項５３～５５のいずれか一項に記載の組成物と、のうちの１つ以上の使用。
【請求項８０】
前記疾患が、癌である、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
疾患の治療用医薬の製造のための、請求項１～８０のいずれか一項に記載の本発明の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
連邦政府支援の研究開発に関する記述
本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された交付番号ＯＤ０２５７５１の下で政府の支援を受けて行われたものである。政府は、本発明について一定の権利を有する。
【０００２】

関連出願の相互参照

本出願は、２０２１年３月２３日に出願された米国仮特許出願第６３／１６４，９９５号の優先権を主張するものであり、その開示は、任意の図面を含め、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００３】

配列表の組み込み

本出願は、配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。「０４８５３６－６９６００１ＷＯ＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｌｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」という名称の添付の配列表テキストファイルは、２０２２年３月１８日に作成されたものであり、３０７ＫＢである。

【０００４】

本開示は、概して、細胞表面リガンドに結合し、選択可能な特異性及び活性を有する新規合成細胞受容体に関する。本開示はまた、このような受容体を産生するのに有用な組成物及び方法、それをコードする核酸、核酸で遺伝子改変された宿主細胞、並びに細胞の活性を調節するための方法及び／又は癌などの様々な疾患の治療のための方法を提供する。

【背景技術】

【０００５】

ヒトにおける操作された細胞療法の開発を制限する重要な問題は、治療遺伝子発現及び操作された細胞活性を制御する能力である。例えば、第１世代のキメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ）は、必要な場合にＣＡＲ－Ｔ活性を調節又は停止することができず、他の問題としては、オフターゲット活性及びオフ腫瘍／オンターゲット活性（すなわち、ＣＡＲ－Ｔ標的抗原が腫瘍の外側の正常細胞上にも確認される）が挙げられる。これらの問題に対する１つの可能な解決策は、遺伝子発現及び／又は細胞挙動を改変することができる合成受容体を使用することである。既存の合成Ｎｏｔｃｈ（ＳｙｎＮｏｔｃｈ）受容体は、ユーザ定義の細胞表面に提示されたリガンドに結合することができ、これにより、受容体のタンパク質分解切断を誘発し、細胞においてカスタム転写プログラムを誘導する転写制御因子を放出する。加えて、既存のＳｙｎＮｏｔｃｈ受容体の中には、受容体の誘導切断に必要であると考えられるＮｏｔｃｈ制御領域（ＮＲＲ）を必要としないものもある。

【０００６】

本開示は、とりわけ、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を必要としない新規クラスの合成受容体を含む新規キメラポリペプチドを提供する。

【発明の概要】

【０００７】

本開示は、Ｎｏｔｃｈ受容体からの配列を必要としない合成キメラポリペプチド（例えば、キメラ受容体）を記載する。特に、系統的な工学的努力により、（１）ＡＤＡＭプロテアーゼ切断可能な細胞外ドメイン（例えば、ＣＤ８由来のヒンジドメイン）、（２）γ－セクレターゼ切断可能な膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）、及び（３）合成制御的膜間タンパク質分解受容体（ＳｙｎＲＩＰＲ）を合理的に構築するための移送停止配列（stop-transfer-sequence）を利用できることが示された。以下により詳細に記載されるように、これらの受容体は、様々な治療的に関連する細胞型を疾患部位に標的化し、制御された様式及び局在化された様式で細胞の治療活性を制御するために使用することができる。これらの受容体は、細胞が疾患部位を感知する場合、抗体、サイトカイン、毒素、及びアジュバントなどの治療剤を局所的に産生するように、誘導性転写プログラムに連結させることができる。受容体は、細胞工学のための非常に用途が広くプログラム可能なプラットフォームであり、本質的に、任意の遺伝的にコード可能な治療薬の産生は、これらの受容体によって制御することができる。

【０００８】

本開示のいくつかの実施形態において、異種ＳＴＳ及びＴＭＤ配列を含めることによって媒介される様々なシグナル特性を示す合成キメラ受容体が提供される。活性化Ｔ細胞において発現される場合にＴ細胞活性化の程度に感受性である受容体を含むこれらの受容体

は、様々な感受性を提供する。いくつかの実施形態は、Ｔ細胞において発現される場合、Ｔ細胞が活性化されていない場合のリガンド誘導性シグナルレベルと比較して、Ｔ細胞が活性化されている場合により高いリガンド誘導性シグナルレベルを示す。

【０００９】

いくつかの実施形態において、本開示は、とりわけ、少なくとも１つのγ－セクレターゼ部位を含む非Ｎｏｔｃｈ膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）を含有する新規クラスのキメラ受容体を提供する。ＴＭＤ切断の調節は、本明細書に開示されるキメラ受容体の活性の最適化及び／又は改善を促進し、その結果、細胞活性の調節及び／又は疾患の治療において特に有用であり得ると考えられる。いくつかの実施形態において、本開示のキメラ受容体は、本明細書に開示されるキメラ受容体が広範囲の所望の特徴を有することを可能にする非Ｎｏｔｃｈ　ＳＴＳ配列を含む。例えば、本明細書に記載されるようにＳＴＳを改変し、異なる膜近傍ドメインを選択することによって、異なるノイズレベル（すなわち、選択された標的リガンドの非存在下での受容体活性化の基底レベル）、異なるシグナルレベル（すなわち、選択された標的リガンドの存在下で得られる発現レベル）、及び異なるシグナル：ノイズ比を有する受容体を産生することができる。

【００１０】

一態様において、Ｎ末端からＣ末端に向かって、（ａ）選択されたリガンドに対する結合親和性を有する細胞外結合ドメインと、（ｂ）連結配列と、（ｃ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）であって、１型膜貫通受容体の膜貫通ドメインに対して少なくとも約８０％の配列同一性を有し、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、ＴＭＤと、（ｄ）転写制御因子を含む細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と、を含むキメラポリペプチドであって、選択されたリガンドの細胞外結合ドメインへの結合が、転写制御因子と連結配列との間のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導し、キメラポリペプチドが、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を含まない、キメラポリペプチドが本明細書で提供される。

【００１１】

本明細書で提供されるキメラポリペプチドの非限定的な例示的実施形態は、以下の特徴のうちの１つ以上を含む：いくつかの実施形態において、キメラポリペプチドは、ＴＭＤとＩＣＤとの間に移送停止配列（ＳＴＳ）を更に含み、いくつかの実施形態において、ＴＭＤは、１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、γ－セクレターゼ切断部位を含み、いくつかの実施形態において、ＴＭＤは、１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも９０％の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、γ－セクレターゼ切断部位を含み、いくつかの実施形態において、ＴＭＤは、１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも９５％の配列同一性を有するポリペプチド配列を含み、γ－セクレターゼ切断部位を含む。いくつかの実施形態において、１型膜貫通受容体は、ＣＬＳＴＮ１、ＣＬＳＴＮ２、ＡＰＬＰ１、ＡＰＬＰ２、ＬＲＰ８、ＡＰＰ、ＢＴＣ、ＴＧＢＲ３、ＳＰＮ、ＣＤ４４、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＸＣＬ１６、ＣＸ３ＣＬ１、ＤＣＣ、ＤＬＬ１、ＤＳＧ２、ＤＡＧ１、ＣＤＨ１、ＥＰＣＡＭ、ＥＰＨＡ４、ＥＰＨＢ２、ＥＦＮＢ１、ＥＦＮＢ２、ＥｒｂＢ４、ＧＨＲ、ＨＬＡ－Ａ、ＩＦＮＡＲ２、ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１Ｒ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＮＳＲ、ＥＲＮ１、ＥＲＮ２、ＪＡＧ２、ＫＣＮＥ１、ＫＣＮＥ２、ＫＣＮＥ３、ＫＣＮＥ４、ＫＬ、ＣＨＬ１、ＰＴＰＲＦ、ＳＣＮ１Ｂ、ＳＣＮ３Ｂ、ＮＰＲ３、ＮＧＦＲ、ＰＬＸＤＣ２、ＰＡＭ、ＡＧＥＲ、ＲＯＢＯ１、ＳＯＲＣＳ３、ＳＯＲＣＳ１、ＳＯＲＬ１、ＳＯＲＴ１、ＳＤＣ１、ＳＤＣ２、ＴＹＲ、ＴＹＲＰ１、ＤＣＴ、ＶＡＳＮ、ＦＬＴ１、ＣＤＨ５、ＰＫＨＤ１、ＮＥＣＴＩＮ１、ＰＣＤＨＧＣ３、ＮＲＧ１、ＬＲＰ１Ｂ、ＣＤＨ２、ＮＲＧ２、ＰＴＰＲＫ、ＳＣＮ２Ｂ、Ｎｒａｄｄ、及びＰＴＰＲＭからなる群から選択され、γ－セクレターゼ切断部位を含む。いくつかの実施形態において、１型膜貫通受容体は、ＡＰＰ、ＣＬＳＴＮ１、ＣＬＳＴＮ２、ＥＰＣＡＭ、ＫＣＮＥ３、ＮＥＣＴＩＮ１、ＰＣＤＨＧＣ３、及びＰＴＰＲＦである。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるキメラポリペプチドは、移送停止配列（ＳＴＳ）を含み、ＳＴＳは、ＴＭＤに対して異種である。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＸＣＬ１

６、ＤＡＧ１、ＧＨＲ、ＰＴＰＲＦ、ＡＧＥＲ、ＫＬ、ＮＲＧ１、ＬＲＰ１Ｂ、Ｊａｇ２、ＥＰＣＡＭ、ＫＣＮＥ３、ＣＤＨ２、ＮＲＧ２、ＰＴＰＲＫ、ＢＴＣ、ＥＰＨＡ３、ＩＬ１Ｒ２、ＰＴＰＲＦ、又はＰＴＰＲＭ由来のＳＴＳ配列に対して少なくとも７０％の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、ＣＳＦ１Ｒ、ＤＡＧ１、ＡＧＥＲ、ＮＲＧ１、ＫＣＮＥ３、ＰＴＰＲＦ、又はＰＴＰＲＭ由来のＳＴＳ配列に対して少なくとも７０％の配列同一性を有する配列を含む。

【００１２】

いくつかの実施形態において、細胞外ドメインは、細胞の表面上のリガンドに結合することができる抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態において、細胞は、病原性細胞である。いくつかの実施形態において、リガンドは、タンパク質又は炭水化物を含む。いくつかの実施形態において、リガンドは、ＣＤ１、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｄ、ＣＤ１ｅ、ＣＤ２、ＣＤ３ｄ、ＣＤ３ｅ、ＣＤ３ｇ、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ８ａ、ＣＤ８ｂ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ４８、ＣＤ５２、ＣＤ５９、ＣＤ６６、ＣＤ７０、ＣＤ７１、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９Ｂ、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ＣＤ９４、ＣＤ９５、ＣＤ１３４、ＣＤ１４０（ＰＤＧＦＲ４）、ＣＤ１５２、ＣＤ１５４、ＣＤ１５８、ＣＤ１７８、ＣＤ１８１（ＣＸＣＲ１）、ＣＤ１８２（ＣＸＣＲ２）、ＣＤ１８３（ＣＸＣＲ３）、ＣＤ２１０、ＣＤ２４６、ＣＤ２５２、ＣＤ２５３、ＣＤ２６１、ＣＤ２６２、ＣＤ２７３（ＰＤ－Ｌ２）、ＣＤ２７４（ＰＤ－Ｌ１）、ＣＤ２７６（Ｂ７Ｈ３）、ＣＤ２７９、ＣＤ２９５、ＣＤ３３９（ＪＡＧ１）、ＣＤ３４０（ＨＥＲ２）、ＥＧＦＲ、ＦＧＦＲ２、ＣＥＡ、ＡＦＰ、ＣＡ１２５、ＭＵＣ－１、ＭＡＧＥ、ＢＣＭＡ（ＣＤ２６９）、ＡＬＰＰＬ２、ＧＦＰ、ｅＧＦＰ、及びＳＩＲＰαからなる群から選択される。

【００１３】

いくつかの実施形態において、リガンドは、ＣＤ１、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｄ、ＣＤ１ｅ、ＣＤ２、ＣＤ３ｄ、ＣＤ３ｅ、ＣＤ３ｇ、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ８ａ、ＣＤ８ｂ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ４８、ＣＤ５２、ＣＤ５９、ＣＤ６６、ＣＤ７０、ＣＤ７１、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９Ｂ、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ＣＤ９４、ＣＤ９５、ＣＤ１３４、ＣＤ１４０（ＰＤＧＦＲ４）、ＣＤ１５２、ＣＤ１５４、ＣＤ１５８、ＣＤ１７８、ＣＤ１８１（ＣＸＣＲ１）、ＣＤ１８２（ＣＸＣＲ２）、ＣＤ１８３（ＣＸＣＲ３）、ＣＤ２１０、ＣＤ２４６、ＣＤ２５２、ＣＤ２５３、ＣＤ２６１、ＣＤ２６２、ＣＤ２７３（ＰＤ－Ｌ２）、ＣＤ２７４（ＰＤ－Ｌ１）、ＣＤ２７６（Ｂ７Ｈ３）、ＣＤ２７９、ＣＤ２９５、ＣＤ３３９（ＪＡＧ１）、ＣＤ３４０（ＨＥＲ２）、ＥＧＦＲ、ＦＧＦＲ２、ＣＥＡ、ＡＦＰ、ＣＡ１２５、ＭＵＣ－１、及びＭＡＧＥ、アルカリホスファターゼ、胎盤様２（ＡＬＰＰＬ２）、Ｂ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、増強緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、及びシグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）からなる群から選択される。

【００１４】

いくつかの実施形態において、リガンドは、細胞表面受容体、接着タンパク質、インテグリン、ムチン、レクチン、腫瘍関連抗原、及び腫瘍特異的抗原から選択される。いくつかの実施形態において、リガンドは、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的関連抗原である。いくつかの実施形態において、細胞外結合ドメインは、受容体のリガンド結合部分を含む。いくつかの実施形態において、抗原結合部分は、抗体、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、又はミニボディ、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、又はその機能的断片からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、抗原結合部分は、ｓｃＦｖを含む。

【００１５】

いくつかの実施形態において、抗原結合部分は、ＣＤ１９、Ｂ７Ｈ３（ＣＤ２７６）、

ＢＣＭＡ（ＣＤ２６９）、ＡＬＰＰＬ２、ＣＤ１２３、ＣＤ１７１、ＣＤ１７９ａ、ＣＤ２０、ＣＤ２１３Ａ２、ＣＤ２２、ＣＤ２４、ＣＤ２４６、ＣＤ２７２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ４４ｖ６、ＣＤ４６、ＣＤ７１、ＣＤ９７、ＣＥＡ、ＣＬＤＮ６、ＣＬＥＣＬ１、ＣＳ－１、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＬＦ２Ｍ、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、エフリンＢ２、ＦＡＰ、ＦＬＴ３、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＭ３、ＧＰＲＣ５Ｄ、ＨＥＲ２（ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ）、ＩＧＬＬ１、ＩＬ－１１Ｒａ、ＫＩＴ（ＣＤ１１７）、ＭＵＣ１、ＮＣＡＭ、ＰＡＰ、ＰＤＧＦＲ－β、ＰＲＳＳ２１、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、ＳＩＲＰα、ＳＳＥＡ－４、ＴＡＧ７２、ＴＥＭ１／ＣＤ２４８、ＴＥＭ７Ｒ、ＴＳＨＲ、ＶＥＧＦＲ２、ＡＬＰＩ、シトルリン化ビメンチン、ｃＭｅｔ、及びＡｘｌからなる群から選択される腫瘍関連抗原である。いくつかの実施形態において、腫瘍関連抗原は、ＣＤ１９、ＣＥＡ、ＨＥＲ２、ＭＵＣ１、ＣＤ２０、ＢＣＭＡ、ＡＬＰＰＬ２、又はＥＧＦＲである。いくつかの実施形態において、腫瘍関連抗原は、ＣＤ１９である。

【００１６】

いくつかの実施形態において、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位は、γ－セクレターゼ切断部位である。いくつかの実施形態において、転写制御因子は、転写活性化因子又は転写抑制因子を含む。いくつかの実施形態において、ＩＣＤは、核局在化配列と、Ｇａｌ４－ＶＰ１６、Ｇａｌ４－ＶＰ６４、ｔｅｔＲ－ＶＰ６４、ＺＦＨＤ１－ＶＰ６４、Ｇａｌ４－ＫＲＡＢ、及びＨＡＰ１－ＶＰ１６から選択される転写制御因子配列とを含む。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドは、シグナル配列、検出可能な標識、腫瘍特異的切断部位、疾患特異的切断部位、又はこれらの組み合わせを更に含む。

【００１７】

いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドは、配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、又は１５６に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するＳＴＳを含む。

【００１８】

いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、分子間ジスルフィド結合を介してキメラポリペプチドのオリゴマー形成を促進することができる。いくつかの実施形態において、連結配列は、ＣＤ８αヒンジドメイン、ＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ１５２ヒンジドメイン、ＰＤ－１ヒンジドメイン、ＣＴＬＡ４ヒンジドメイン、ＯＸ４０ヒンジドメイン、ＩｇＧ１ヒンジドメイン、ＩｇＧ２ヒンジドメイン、ＩｇＧ３ヒンジドメイン、及びＩｇＧ４ヒンジドメインに由来するヒンジドメイン、又はそれらのいずれかの機能的変異体に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＣＤ８αヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来する。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００１９】

いくつかの実施形態において、ＴＭＤは、配列番号１～２、６、２０、４３、３９、５４、及び６４のいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ＴＭＤは、配列番号１～２、６、２０、４３、３９、５４、及び６４のいずれか１つに対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ＴＭＤは、配列番号１～２、６、２０、４３、３９、５４、及び６４のいずれか１つに対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ＴＭＤは、配列番号１～２、６、２０、４３、３９、５４、及び６４のいずれか１つに対して実質的に同一のアミノ酸配列を含む。

【００２０】

いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドは、（ａ）配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結配列と、（ｂ）配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９

２のいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＴＭＤと、（ｃ）配列番号８５～１５６及び１７３に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＳＴＳと、を含む。

【００２１】

別の態様において、本明細書に開示される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、核酸が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列は、発現カセット又は発現ベクターに組み込まれている。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、又はレトロウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。

【００２２】

別の態様において、（ａ）本明細書に開示されるキメラポリペプチド及び／又は（ｂ）本明細書に開示される組換え核酸を含む、組換え細胞が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、哺乳動物細胞は、免疫細胞、ニューロン、上皮細胞、内皮細胞、又は幹細胞である。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、Ｂ細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、好塩基球、好酸球、好中球、樹状細胞、マクロファージ、制御性Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、又は他のＴ細胞である。いくつかの実施形態において、組換え細胞は、（ａ）本明細書に開示される第２のキメラポリペプチド、及び／又は（ｂ）本明細書に開示される第２の核酸を更に含み、第１のキメラポリペプチド及び第２のキメラポリペプチドは、同じ配列を有しておらず、かつ／又は第１の核酸若しくは第２の核酸は、同じ配列を有していない。いくつかの実施形態において、キメラポリペプチドは、第２のキメラポリペプチドの発現及び／又は活性を調節する。

【００２３】

いくつかの実施形態において、本開示の組換え細胞は、プロモーターに作動可能に連結された対象のタンパク質をコードする発現カセットを更に含み、タンパク質の発現は、キメラ受容体によってコードされる転写制御因子によって調節されている。いくつかの実施形態において、対象のタンパク質は、細胞に対して異種である。いくつかの実施形態において、プロモーターは、ＧＡＬ４である。いくつかの実施形態において、対象のタンパク質は、サイトカイン、細胞毒素、ケモカイン、免疫調節物質、アポトーシス促進因子、抗アポトーシス因子、ホルモン、分化因子、脱分化因子、免疫細胞受容体、又はレポーターである。

【００２４】

別の態様において、本明細書に開示される少なくとも１つの組換え細胞及び培養培地を含む、細胞培養物が本明細書で更に提供される。

【００２５】

更に別の態様において、薬学的に許容される担体と、以下の（ａ）本明細書に開示される組換え核酸、又は（ｂ）本明細書に開示される組換え細胞のうちの１つ以上と、を含む、医薬組成物が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、開示される医薬組成物は、本明細書に開示される組換え核酸と、薬学的に許容される担体とを含む。いくつかの実施形態において、組換え核酸は、ウイルスカプシド、又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に封入されている。

【００２６】

別の態様において、細胞の活性を調節するための方法であって、（ａ）本開示の組換え細胞を提供することと、（ｂ）組換え細胞を選択されたリガンドと接触させることとを含み、選択されたリガンドの細胞外結合ドメインへの結合が、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位の切断を誘導し、転写制御因子を放出し、放出された転写制御因子が、組換え細胞の活性を調節する、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、接触は、インビボ、エクスビボ、又はインビトロで行われる。いくつかの実施形態において

、細胞の活性は、細胞の選択された遺伝子の発現、細胞の増殖、細胞のアポトーシス、細胞の非アポトーシス死、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、細胞の細胞接着、及び細胞の細胞溶解活性からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、放出された転写制御因子は、細胞の遺伝子産物の発現を調節する。いくつかの実施形態において、放出された転写制御因子は、異種遺伝子産物の発現を調節する。いくつかの実施形態において、細胞の遺伝子産物は、ケモカイン、ケモカイン受容体、キメラ抗原受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、分化因子、成長因子、成長因子受容体、ホルモン、代謝酵素、病原体由来タンパク質、増殖誘導因子、受容体、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ、部位特異的ヌクレアーゼ、Ｔ細胞受容体、毒素、毒素由来タンパク質、転写制御因子、転写活性化因子、転写抑制因子、翻訳制御因子、翻訳活性化因子、翻訳抑制因子、活性化免疫受容体、抗体、アポトーシス阻害剤、アポトーシス誘導因子、操作されたＴ細胞受容体、免疫活性化因子、免疫阻害剤、及び阻害免疫受容体からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、放出された転写制御因子は、細胞の分化を調節し、細胞は、免疫細胞、幹細胞、始原細胞、又は前駆細胞である。

【００２７】

別の態様は、個体における標的細胞の活性を阻害するための方法であって、有効数の本開示の組換え細胞を個体に投与することを含み、組換え細胞が、個体における標的細胞の活性を阻害する、方法に関する。いくつかの実施形態において、標的細胞は、急性骨髄腫白血病細胞、未分化リンパ腫細胞、星状細胞腫細胞、Ｂ細胞癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、上衣腫細胞、食道癌細胞、膠芽腫細胞、グリオーマ細胞、平滑筋肉腫細胞、脂肪肉腫細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、マントル細胞リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、神経芽細胞腫細胞、非小細胞肺癌細胞、乏突起神経膠腫細胞、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、末梢Ｔ細胞リンパ腫細胞、腎癌細胞、肉腫細胞、胃癌細胞、癌細胞、中皮腫細胞、又は肉腫細胞である。いくつかの実施形態において、標的細胞は、病原性細胞である。

【００２８】

別の態様において、個体における疾患を治療するための方法であって、有効数の本開示の組換え細胞を個体に投与する工程を含み、組換え細胞が、個体における疾患を治療する、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、本開示の治療方法は、第２の療法を個体に施すことを更に含む。いくつかの実施形態において、第２の療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、又は毒素療法からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第１の療法及び第２の療法は、同じ組成物で又は別個の組成物で一緒に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法及び第２の療法は、同時に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法及び第２の療法は、連続的に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法は、第２の療法の前に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法は、第２の療法の後に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法及び第２の療法は、交代で施される。

【００２９】

別の態様において、細胞の活性を調節するか、標的細胞の活性を調節するか、又は疾患の治療を必要とする個体においてそれを行うための系であって、この系が、本開示のキメラポリペプチド、本開示のポリヌクレオチド、本開示の組換え細胞、又は本開示の医薬組成物のうちの１つ以上を含む、系が、本明細書で提供される。

【００３０】

別の態様において、本開示の組換え細胞を作製するための方法であって、（ａ）タンパク質発現が可能な細胞を提供することと、（ｂ）提供された細胞を本開示の組換え核酸と接触させることとを含む、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、細胞は、ヒト対象又は患者から得られた試料に対して行われる白血球アフェレーシスによって得られ、細胞は、エクスビボで接触させられる。いくつかの実施形態において、組換え核酸は、ウイルスカプシド、又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に封入されている。

【００３１】

別の態様において、疾患の治療のための、本開示のキメラポリペプチド、本開示のポリ

ヌクレオチド、本開示の組換え細胞、又は本開示の医薬組成物のうちの１つ以上の使用が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、疾患は、癌である。

【００３２】

別の態様において、疾患の治療用医薬の製造における、本開示のキメラポリペプチド、本開示のポリヌクレオチド、本開示の組換え細胞、又は本開示の医薬組成物のうちの１つ以上の使用が本明細書で提供される。

【００３３】

前述の概要は、例示的なものにすぎず、決して限定することを意図するものではない。本明細書に記載される例示的な実施形態及び特徴に加えて、本開示の更なる態様、実施形態、目的及び特徴は、図面及び詳細な説明及び特許請求の範囲から完全に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００３４】

【図１Ａ】本開示のいくつかの非限定的な実施形態による、例示的な非Ｎｏｔｃｈ合成制御的膜内タンパク質分解受容体（ＳｙｎＲＩＰＲ又はＳＮＩＰＲ）の実験設計及び試験を概略的に示す。ＣＬＳＴＮ２コアの周りの例示的な非Ｎｏｔｃｈ　ＳＮＩＰＲのモジュールアセンブリを概略的に示す。

【図１Ｂ】本開示のいくつかの非限定的な実施形態による、例示的な非Ｎｏｔｃｈ合成制御的膜内タンパク質分解受容体（ＳｙｎＲＩＰＲ又はＳＮＩＰＲ）の実験設計及び試験を概略的に示す。ＪＭＤベースのＳＮＩＰＲ調整実験の結果を概略的に要約する。これらの実験において、参照受容体は、切断されたＣＤ８α細胞外ドメイン（ＥＣＤ）、ヒトＮｏｔｃｈ１の膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）、及びＮｏｔｃｈ１由来のＣ末端膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）から構成される最適化されたＣＤ８α　Ｎｏｔｃｈ受容体（HingeNotch）であった。この抗ＣＤ１９　ＨｉｎｇｅＮｏｔｃｈを発現するＴ細胞は、ＣＤ１９＋Ｋ５６２供与（sender）細胞の存在下において応答エレメントを活性化することができた。この活性化は、共発現された抗ＡＬＰＰＬ２　ＣＡＲが活性化され、Ｔ細胞活性化刺激を提供する場合にブーストされた。これらの例示的なＳｙｎＲＩＰＲの各々において、細胞外結合ドメインは、選択されたリガンドに対する結合親和性を有する一本鎖抗原結合性断片（ｓｃＦｖ）（本実施例ではＢリンパ球抗原ＣＤ１９）を含む。図１Ｂ～１Ｃに示されるように、ＣＬＳＴＮ２　ＴＭＤ及びＣＬＳＴＮ２　ＪＭＤを使用した非Ｎｏｔｃｈ　ＳｙｎＲＩＰＲのアセンブリは、不活性受容体をもたらすが、ＣＬＳＴＮ２　ＪＭＤを、ＫＣＮＥ３又はＰＴＰＲＦ由来のＪＭＤなどのより高性能のＪＭＤで置き換えると、受容体機能を回復させることができる。

【図１Ｃ】本開示のいくつかの非限定的な実施形態による、例示的な非Ｎｏｔｃｈ合成制御的膜内タンパク質分解受容体（ＳｙｎＲＩＰＲ又はＳＮＩＰＲ）の実験設計及び試験を概略的に示す。ＪＭＤベースのＳＮＩＰＲ調整実験の結果を概略的に要約する。これらの実験において、参照受容体は、切断されたＣＤ８α細胞外ドメイン（ＥＣＤ）、ヒトＮｏｔｃｈ１の膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）、及びＮｏｔｃｈ１由来のＣ末端膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）から構成される最適化されたＣＤ８α　Ｎｏｔｃｈ受容体（HingeNotch）であった。この抗ＣＤ１９　ＨｉｎｇｅＮｏｔｃｈを発現するＴ細胞は、ＣＤ１９＋Ｋ５６２供与（sender）細胞の存在下において応答エレメントを活性化することができた。この活性化は、共発現された抗ＡＬＰＰＬ２　ＣＡＲが活性化され、Ｔ細胞活性化刺激を提供する場合にブーストされた。これらの例示的なＳｙｎＲＩＰＲの各々において、細胞外結合ドメインは、選択されたリガンドに対する結合親和性を有する一本鎖抗原結合性断片（ｓｃＦｖ）（本実施例ではＢリンパ球抗原ＣＤ１９）を含む。図１Ｂ～１Ｃに示されるように、ＣＬＳＴＮ２　ＴＭＤ及びＣＬＳＴＮ２　ＪＭＤを使用した非Ｎｏｔｃｈ　ＳｙｎＲＩＰＲのアセンブリは、不活性受容体をもたらすが、ＣＬＳＴＮ２　ＪＭＤを、ＫＣＮＥ３又はＰＴＰＲＦ由来のＪＭＤなどのより高性能のＪＭＤで置き換えると、受容体機能を回復させることができる。

【００３５】

【図２－１】調節可能な転写アウトプットを有するＳｙｎＲＩＰＲのモジュールアセンブリを含む、本明細書に記載されるキメラポリペプチド及び非Ｎｏｔｃｈ　ＳｙｎＲＩＰＲに配置することができるＴＭＤ及びＪＭＤ／ＳＴＳのスクリーニングの実験設計を示す。これらの実験において、Ｎｏｔｃｈ１　ＪＭＤ（ＳＴＳ）はＴＭＤ選択のために一定に保たれ、他方、Ｎｏｔｃｈ１　ＴＭＤは、ＪＭＤ（ＳＴＳ）選択のために一定に保たれた。高性能「ＳｙｎＲＩＰＲ→ＢＦＰ発現」回路を発現するＴ細胞を、供与細胞と４８時間共インキュベートした。フローサイトメトリーを使用し、ＢＦＰ出力を測定した。

【図２－２】調節可能な転写アウトプットを有するＳｙｎＲＩＰＲのモジュールアセンブリを含む、本明細書に記載されるキメラポリペプチド及び非Ｎｏｔｃｈ　ＳｙｎＲＩＰＲに配置することができるＴＭＤ及びＪＭＤ／ＳＴＳのスクリーニングの実験設計を示す。これらの実験において、Ｎｏｔｃｈ１　ＪＭＤ（ＳＴＳ）はＴＭＤ選択のために一定に保たれ、他方、Ｎｏｔｃｈ１　ＴＭＤは、ＪＭＤ（ＳＴＳ）選択のために一定に保たれた。高性能「ＳｙｎＲＩＰＲ→ＢＦＰ発現」回路を発現するＴ細胞を、供与細胞と４８時間共インキュベートした。フローサイトメトリーを使用し、ＢＦＰ出力を測定した。

【発明を実施するための形態】

【００３６】

本開示は、概して、とりわけ、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を必要としない新規クラスの合成受容体を含む新規キメラポリペプチドに関する。特に、以下により詳細に記載されるように、系統的な工学的努力により、（１）ＡＤＡＭプロテアーゼ切断可能な細胞外ドメイン（例えば、ＣＤ８由来のヒンジドメイン）、（２）γ－セクレターゼ切断可能な膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）、及び（３）合成制御的膜間タンパク質分解受容体（ＳｙｎＲＩＰＲ）を合理的に構築するための移送停止配列（stop-transfer-sequence）を利用できることが示された。したがって、これらの受容体は天然には存在しない。以下に記載されるように、本開示のキメラポリペプチドは、合成ポリペプチドであり得、又は所望の特性及び／若しくは改善された特性、例えば、転写の調節を提供するように操作、設計、若しくは改変され得る。

【００３７】

以下により詳細に記載されるように、これらの受容体は、様々な治療的に関連する細胞型を疾患部位に標的化し、制御された様式及び局在化された様式で細胞の治療活性を制御するために使用することができる。これらの受容体は、細胞が疾患部位を感知する場合、抗体、サイトカイン、毒素、及びアジュバントなどの治療剤を局所的に産生するように、誘導性転写プログラムに連結させることができる。受容体は、細胞工学のための非常に用途が広くプログラム可能なプラットフォームであり、本質的に、任意の遺伝的にコード可能な治療薬の産生は、これらの受容体によって制御することができる。したがって、本明細書に記載されるＳｙｎＲＩＰＲは、癌、自己免疫、又は損傷組織の再生のための細胞療法のいずれかにおいて潜在的に使用することができる。加えて、これらの受容体は、サイズがコンパクトである。本明細書に提供されるキメラ受容体をコードするポリヌクレオチドは、既存のＳｙｎＮｏｔｃｈコードポリヌクレオチドよりも小さく作製することができ、これにより、容量がより制限されるが別様により望ましい特徴を有するベクターの使用、又はそうでなければベクターの容量に関連するサイズの制約から除外される追加の要素の包含が可能になる。本明細書に記載される実験データは、進歩した工学的努力により、ここで、科学者が、Ｎｏｔｃｈ受容体のように機能するが、Ｎｏｔｃｈタンパク質と配列を共有しない受容体を合理的に設計することを可能にしたことを示している。

【００３８】

いくつかの実施形態において、本開示は、少なくとも１つのγ－セクレターゼ部位を含む非Ｎｏｔｃｈ膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）を含有する新規クラスのキメラ受容体を提供する。以下により詳細に記載されるように、ＴＭＤの切断は、これらの合成受容体によって媒介されるシグナル伝達における必須の工程である。特定の理論に拘束されるものではないが、ＴＭＤ切断の調節は、本明細書に開示される受容体の最適化及び／又は改善を促進し、その結果、細胞活性の調節、例えば、選択された生合成経路の活性化若しくは阻害、

及び／又は疾患の治療において特に有用であり得ると考えられる。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される受容体は、標的細胞表面に提示されたリガンドに結合し、これにより、受容体のタンパク質分解切断及び細胞においてカスタム転写プログラムを調節する転写制御因子の放出を誘発する。

【００３９】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるキメラ受容体はまた、本開示の新規合成キメラ受容体が広範囲の所望の特徴を有することを可能にする非Ｎｏｔｃｈ　ＳＴＳ配列を含む。例えば、ＳＴＳを改変し、異なる膜近傍ドメインを選択することによって、異なるノイズレベル（すなわち、選択された標的リガンドの非存在下での受容体活性化の基準レベル）、異なるシグナルレベル（すなわち、選択された標的リガンドの存在下で得られる発現レベル）、及び異なるシグナル：ノイズ比を有する受容体を産生することができる。

【００４０】

これまで、全ての機能的ＳｙｎＮｏｔｃｈ受容体は、Ｎｏｔｃｈファミリーメンバーに由来する配列を含んでいた。以下により詳細に記載されるように、モジュラー受容体アセンブリアプローチの汎用性を実証するために、実験は、Ｎｏｔｃｈ配列を完全に欠いた受容体成分に基づいて基礎からリガンド活性化受容体を操作するように設計された。全ての受容体が高レベルで発現したが、それ以外の活性型アルカデイン－ガンマ（ＣＳＴＬＮ２）ＴＭＤは、同族であるが不活性なＳＴＳ／ＪＭＤ配列で機能しないことが観察された。驚くべきことに、ＣＳＴＬＮ２　ＪＭＤをＫＣＮＥ３（ＲＳＲＫＶＤＫＲ、配列番号１４６）又はＰＴＰＲＦ（ＫＲＫＲＴＨ、配列番号１０８）からより活性の高いものに置き換えることによって、受容体シグナル伝達が回復することが観察され、元のＣＬＳＴＮ２　ＪＭＤが機能的に制限されていることが示唆された。本明細書に記載される実験結果は、機能的部分のセットから新たな機能的合成制御的膜内タンパク質分解受容体を構築する能力を示し、その結果、受容体アセンブリの合成生物学的アプローチが、Ｎｏｔｃｈ受容体のように機能する受容体を生成することができるが、それらの活性において合理的にカスタマイズされ得ることを例証する。

【００４１】

本開示はまた、このような受容体を産生するのに有用な組成物及び方法、それをコードする核酸、核酸で遺伝子改変された宿主細胞、並びに細胞の活性を調節するための方法及び／又は癌などの様々な疾患の治療のための方法を提供する。

【００４２】

以下の詳細な説明では、本明細書の一部を形成する添付の図面を参照する。図面において、文脈上別段の指示がない限り、同様の記号は概して同様の構成要素を特定する。詳細な説明、図面、及び特許請求の範囲に記載される例示的な代替形態は、限定することを意味するものではない。本明細書に提示される主題の趣旨又は範囲から逸脱することなく、他の代替形態が使用されてもよく、他の変更が行われてもよい。本明細書で全般的に説明され、図に示される態様は、多種多様な異なる構成で配置、置換、組み合わせ、及び設計することができ、それらの全てが明示的に企図され、本出願の一部をなすことが容易に理解されよう。

【００４３】

定義

単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その（ｔｈｅ）」は、文脈上明らかに別段の定めがない限り、複数の指示対象を含む。例えば、用語「細胞（ａ ｃｅｌｌ）」は、その混合物を含む１つ以上の細胞を含む。「Ａ及び／又はＢ」は、本明細書では、「Ａ」、「Ｂ」、「Ａ又はＢ」、及び「Ａ及びＢ」の全ての選択肢を含むものとして使用される。

【００４４】

用語「投与」及び「投与する／施す」は、本明細書で互換的に使用される場合、静脈内、動脈内、脳内、髄腔内、筋肉内、腹腔内、皮下、筋肉内、及びこれらの組み合わせを含

むがこれらに限定されない投与経路による組成物又は製剤の送達を指す。この用語には、医療専門家による投与及び自己投与が含まれるが、これらに限定されない。

【００４５】

用語「「宿主細胞」及び「組換え細胞」は、本明細書で互換的に使用される。このような用語、並びに「細胞」、「細胞培養物」、「細胞株」は、特定の対象細胞又は細胞株だけでなく、移入の数に関係なく、このような細胞又は細胞株の子孫又は潜在的子孫も指すことが理解される。全ての子孫が親細胞と厳密に同一であるわけではないことを理解する必要がある。これは、変異（例えば、意図的な変異又は意図しない変異）又は環境の影響のいずれかにより、特定の改変が後継世代で発生する場合があるため、このような子孫が実際には親細胞と同一ではない場合があるが、子孫が元の細胞又は細胞株と同じ機能を保持する限り、本明細書に使用する用語の範囲になお含まれる。

【００４６】

本明細書で使用される場合、用語「構築物」は、発現カセット、プラスミド、コスミド、ウイルス、自律複製ポリヌクレオチド分子、ファージ、又は１つ以上の核酸配列が機能的に作動可能な様式で、例えば、作動可能に連結されている核酸分子を含む、ゲノム統合若しくは自律複製のいずれかが可能な、任意の供給源に由来する、線状若しくは環状、一本鎖若しくは二本鎖、ＤＮＡ若しくはＲＮＡポリヌクレオチド分子などの任意の組換え核酸分子を意味することを意図するものである。

【００４７】

用語「作動可能に連結された」は、本明細書で使用される場合、２つ以上の要素、例えば、ポリペプチド配列又はポリヌクレオチド配列の間の物理的又は機能的連結を示し、それらがそれらの意図された様式で作動することを可能にする。

【００４８】

用語「異種」は、核酸構築物又はキメラポリペプチドにおいて、互いに作動可能に連結された又はそうでなければ接合されている核酸配列又はアミノ酸配列であって、天然では互いに作動可能に連結されていないか又は隣接していない、核酸配列又はアミノ酸配列を指す。

【００４９】

２つ以上の核酸又はタンパク質の文脈において本明細書で使用される用語「同一性パーセント」は、以下に記載されるデフォルトパラメータを有するＢＬＡＳＴ若しくはＢＬＡＳＴ２．０配列比較アルゴリズムを使用して、又は手動アラインメント及び目視検査によって測定される場合、同じであるか、又は同じであるヌクレオチド若しくはアミノ酸の特定のパーセンテージを有する２つ以上の配列又は部分配列（比較ウィンドウ又は指定領域にわたって最大一致のために比較及びアライメントされた場合、特定領域にわたって、例えば、約６０％の配列同一性、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はそれ以上の同一性）を指す。例えば、ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴのＮＣＢＩウェブサイトを参照されたい。この定義はまた、試験配列の相補体を指すか、又はそれに適用され得る。この定義はまた、欠失及び／又は付加を有する配列、並びに置換を有する配列を含む。配列同一性は、長さが少なくとも約２０アミノ酸若しくはヌクレオチドである領域にわたって、又は長さが１０～１００アミノ酸若しくはヌクレオチドである領域にわたって、又は所与の配列の全長にわたって計算することができる。配列同一性は、ＧＣＳプログラムパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ（１９８４）１２：３８７），ＢＬＡＳＴＰ，ＢＬＡＳＴＮ，ＦＡＳＴＡ（Ａｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ（１９９０）２１５：４０３）などの公開された技術及び広く利用可能なコンピュータプログラムを使用して計算することができる。配列同一性は、ｔｈｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ ａｔ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ（１７１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎｕｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，

Ｗｉｓ．５３７０５）などの配列分析ソフトウェアを使用してそのデフォルトパラメータにより測定することができる。

【００５０】

用語「組換え」は、細胞、核酸、タンパク質、又はベクターに関して使用される場合、細胞、核酸、タンパク質、又はベクターが、ヒトの介入によって改変又は産生されていること、例えば、実験室的方法によって改変されていること、又は実験室的方法の結果であることを示す。したがって、例えば、組換え細胞、タンパク質、及び核酸には、実験室的方法によって産生された細胞、タンパク質、及び核酸が含まれる。組換えタンパク質は、タンパク質の天然（非組換え又は野生型）形態内に確認されないアミノ酸残基を含み得、又は改変された、例えば、標識されたアミノ酸残基を含み得る。組換えという用語は、ペプチド、タンパク質、又は核酸配列に対する任意の改変を含み得る。このような改変は、以下：１つ以上のアミノ酸、デオキシリボヌクレオチド、又はリボヌクレオチドを含む、ペプチド、タンパク質、又は核酸配列の任意の化学改変、ペプチド又はタンパク質における１つ以上のアミノ酸の付加、欠失、及び／又は置換、融合タンパク質、例えば、抗体断片を含む融合タンパク質の作製、並びに核酸配列における１つ以上の核酸の付加、欠失、及び／又は置換を含み得る。用語「組換え」は、細胞に関して使用される場合、天然に存在する細胞を含むことを意図せず、操作／改変されていない場合に細胞中に存在しないポリペプチド又は核酸を含むか又は発現するように操作／改変された細胞を包含する。

【００５１】

本明細書で使用される場合、特に指定がない限り、薬剤の「治療有効量」は、健康上の状態若しくは疾患、例えば癌の治療若しくは管理において治療的利益を提供するのに、又は状態若しくは疾患に関連する１つ以上の症状を遅延若しくは最小化するのに十分な量又は数である。治療薬の治療有効量又は治療有効数は、状態又は疾患の治療又は管理において治療的利益を提供する、単独又は他の治療薬と組み合わせた治療薬の量又は数を意味する。用語「「治療有効量」は、全体的な治療を改善する、状態若しくは疾患の症状若しくは原因を軽減若しくは回避する、又は別の治療薬の治療有効性を増強する量を包含し得る。「有効量」の例は、疾患の症状又は複数の症状の治療、予防、又は低減に寄与するのに十分な量であり、これは「治療有効量」とも呼ばれ得る。症状の「低減」とは、症状の重症度若しくは頻度が減少すること、又は症状が消失することを意味する。「治療有効量」を含む治療薬の正確な量又は数は、治療の目的によって異なり、当業者であれば公知の技術を用いて確認できるであろう（例えば、Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ（Ｖｏｌｓ．１－３，２０１０）；Ｌｌｏｙｄ，Ｔｈｅ Ａｒｔ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｉｎｇ（２０１６）；Ｐｉｃｋａｒ，Ｄｏｓａｇｅ Ｃａｌｃｕｌａｔｉｏｎｓ（２０１２）；及びＲｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２２ ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１２，Ｇｅｎｎａｒｏ，Ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ）を参照されたい）。

【００５２】

本明細書で使用される場合、「対象」又は「個体」には、ヒト（例えば、ヒト個体）及び非ヒト動物などの動物が含まれる。いくつかの実施形態において、「対象」又は「個体」は、医師の管理下にある患者であり得る。したがって、個体は、対象疾患（例えば、癌）及び／又はその疾患の１つ以上の症状を有するか、それを有するリスクがあるか、又はそれを有する疑いがあるヒト患者又は個体であり得る。また、対象は、診断時又はそれ以降に対象状態のリスクがあると診断された個体であり得る。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物、例えば、げっ歯類、例えば、マウス、及び非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などを含む。

【００５３】

値の範囲が提供される場合、文脈上明確に別段の指示がない限り、下限値の単位の１０分の１までの、その範囲の上限と下限の間の各介在値、及びその述べられた範囲内の他の

述べられた値又は介在する値は、本開示内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及び下限は、独立してより小さい範囲に含まれる場合があり、記載された範囲において特に除外された制限を条件として、本開示内に包含されるものでもある。記載された範囲が限界の一方又は両方を含む場合、それらの含まれる限界のいずれか又は両方を除外する範囲も本開示に含まれる。

【００５４】

特定の範囲は、「約」という用語が先行する数値で本明細書に提示される。本明細書では、「約」という用語は、それが先行する正確な数、並びにその用語が先行する数に近いか、又は近似する数に対する文字通りの支持を提供するために使用される。ある数が具体的に列挙された数字に近いか近似しているかを判断する際、近い又は近似する未列挙の数字は、それが提示される文脈において、具体的に列挙された数字と実質的に同等のものを提供する数字であり得る。近似の程度が文脈から明らかでない場合、「約」は、提供された値を含む全ての場合において、提供された値のプラス若しくはマイナス１０％以内であること、又は最も近い有効数字に四捨五入されたことを意味する。いくつかの実施形態において、「約」という用語は、指定された値±１０％まで、±５％まで、又は±１％までを示す。

【００５５】

本明細書に記載される本開示の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む（comprising）」、「からなる（consisting）」、及び「から本質的になる（consisting essentially of）」を含むことが理解される。本明細書で使用される場合、「含む（comprising）」は、「含む（including）」、「含有する（containing）」、又は「によって特徴付けられる（characterized by）」と同義であり、包括的又はオープンエンドであり、追加の列挙されていない要素又は方法の工程を除外しない。本明細書で使用される場合、「からなる（consisting of）」は、特許請求される組成物又は方法において指定されていない任意の要素、工程、又は成分を除外する。本明細書で使用される場合、「から本質的になる（consisting essentially of）」は、特許請求される組成物又は方法の基本的及び新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない材料又は工程を除外しない。特に組成物の構成要素の説明又は方法の工程の説明における、用語「含む（comprising）」の本明細書における列挙はいずれも、列挙された構成要素又は工程から本質的になる、及びそれらからなる組成物及び方法を包含するものと理解される。

【００５６】

見出し、例えば、（ａ）、（ｂ）、（ｉ）等は、単に明細書及び特許請求の範囲を読みやすくするために提示されている。本明細書又は特許請求の範囲における見出しの使用は、工程又は要素がアルファベット順若しくは数字順に、又はそれらが提示された順序で実行されることを要件とするものではない。

【００５７】

本明細書に開示される全ての範囲はまた、ありとあらゆる可能な部分範囲及びそれらの部分範囲の組み合わせを包含する。任意の列挙された範囲は、同じ範囲が少なくとも等しい半分、３分の１、４分の１、５分の１、１０分の１などに分けられることを十分に説明し、可能にするものとして認識され得る。非限定的な例として、本明細書で論じられる各範囲は、下位３分の１、中位３分の１、上位３分の１などに容易に分けることができる。また、当業者によって理解されるように、「まで」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」などの全ての言語は、列挙された数を含み、上述のように、部分範囲に後で分けられ得る範囲を指す。最後に、当業者によって理解されるように、範囲は各々の個々のメンバーを含む。したがって、例えば、１～３個の項目を有するグループは、１、２、又は３個の項目を有するグループを指す。同様に、１～５個の項目を有するグループは、１、２、３、４、又は５個の項目を有するグループを指し、以下同様である。

【００５８】

明確にするために、別々の実施形態の文脈で説明されている本開示の特定の特徴は、単一の実施形態において組み合わせて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔にす

るために、単一の実施形態の文脈で説明されている本開示の様々な特徴も、別々に、又は任意の適切な下位組み合わせで提供され得る。本開示に関連する実施形態の全ての組み合わせは、本開示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明示的に開示されている場合と同様に、本明細書に開示される。加えて、様々な実施形態及びその要素の全ての下位組み合わせもまた、本開示によって具体的に包含され、ありとあらゆるこのような下位組み合わせが、本明細書において個々に明示的に開示されている場合と同様に、本明細書において開示される。

【００５９】

本開示の組成物

以下により詳細に記載されるように、本開示は、既存の合成受容体に対して複数の優位性を有する、リガンド依存的に転写制御を調節するように操作された新しいクラスのキメラポリペプチド受容体を提供する。特に、本開示のいくつかの実施形態は、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を必要としない、合成受容体を提供する。いくつかの実施形態において、異種ＴＭＤの包含は、様々な改善された発現特性を有する新規合成受容体を提供し、したがって、細胞操作者に利用可能な利用可能な受容体の範囲を拡大する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される合成受容体は、新規合成受容体が広範囲の所望の特徴を有することを可能にする、非Ｎｏｔｃｈ　ＳＴＳ配列も含む。加えて、上述のように、これらの新規合成受容体はサイズがコンパクトであり、その結果、これらの合成受容体をコードするポリヌクレオチドは、既存のＳｙｎＮｏｔｃｈコードポリヌクレオチドよりも小さく作製され得、これにより、容量がより制限されるが、別様により望ましい特徴を有するベクターの使用、又はそうでなければベクターの容量に関連するサイズの制約から除外される追加の要素の包含が可能になる。

【００６０】

以下に示すように、一連の機能的部分から新たな機能的合成制御的膜内タンパク質分解受容体を構築する能力は、受容体アセンブリの合成生物学的アプローチが、Ｎｏｔｃｈ受容体などの天然に存在する受容体のように機能する受容体を生成することができるが、それらの活性において合理的にカスタマイズされ得ることを示す。

【００６１】

当業者は、本明細書に開示されるキメラポリペプチド受容体が、ある特定の細胞及び環境の状況下で増幅された活性化を促進することを理解するであろう。受容体活性に対するこのタイプのフィードバックは、操作された細胞による治療ペイロードの発現を増強及び調整するために利用することができる新しい特徴である。本明細書の実施例に記載されるように、キメラポリペプチド受容体は、初代ヒトＴ細胞において試験され、検証された。特定の理論に拘束されるものではないが、これらの新規受容体は、他の哺乳動物細胞において同様の性能を示すと考えられる。加えて、当業者は、本開示を検討すると、本明細書に開示される合成受容体が、腫瘍の識別及び排除の増強のために様々な免疫細胞型に、又は自己免疫及び組織再生の調節可能な制御のために操作された細胞に操作され得ることを理解するであろう。したがって、本明細書に開示されるキメラ受容体の１つ以上を発現するように操作された免疫細胞などの操作された細胞もまた、本開示の範囲内である。

【００６２】

キメラポリペプチド

一態様において、リガンド依存的に転写制御を調節するように操作された様々な新規の天然に存在しないキメラポリペプチドが本明細書で提供される。これらの新規受容体は、概して、（１）γ－セクレターゼ切断可能な膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）、及び（２）移送停止配列を含む。異種ＳＴＳ及びＴＭＤ配列の包含は、本明細書に開示される新規キメラ受容体の最適化及び／又は改善を促進し、その結果、細胞活性の調節及び／又は疾患の治療において有用である。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される受容体は、標的細胞表面に提示されたリガンドに結合し、受容体のタンパク質分解切断を誘発し、細胞におけるカスタム転写プログラムを調節する転写制御因子を放出する。

【００６３】

いくつかの実施形態において、Ｎ末端からＣ末端に向かって、（ａ）選択されたリガンドに対する結合親和性を有する細胞外結合ドメインと、（ｂ）連結配列と、（ｃ）ＴＭＤであって、１型膜貫通受容体の膜貫通ドメインに対して少なくとも約８０％の配列同一性を有し、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、ＴＭＤと、（ｄ）転写制御因子を含むＩＣＤと、を含むキメラポリペプチドであって、選択されたリガンドの細胞外結合ドメインへの結合が、転写制御因子と連結配列との間のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導し、キメラポリペプチドが、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を含まない、キメラポリペプチドが、本明細書で提供される。

【００６４】

細胞外ドメイン（ＥＣＤ）

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるキメラポリペプチド及びキメラ受容体（例えば、ＳｙｎＲＩＰＲ）のＥＣＤは、１つ以上の標的リガンドに対する結合親和性を有する。原理的に、本明細書で提供されるキメラポリペプチドによって標的化され得る適切なリガンドに関して、特定の制限は存在しない。いくつかの実施形態において、標的リガンドは、細胞表面リガンドである。適切な細胞表面リガンドの非限定的な例としては、細胞表面受容体、接着タンパク質、表面結合された炭水化物、脂質、糖脂質、リポタンパク質、及びリポ多糖、インテグリン、ムチン、並びにレクチンが挙げられる。いくつかの実施形態において、リガンドは、タンパク質である。いくつかの実施形態において、リガンドは、炭水化物である。

【００６５】

いくつかの実施形態において、細胞外ドメインは、受容体のリガンド結合部分を含む。いくつかの実施形態において、細胞外ドメインは、１つ以上の標的抗原に結合する抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態において、ＥＣＤは、細胞の表面上の１つ以上の抗原（例えば、細胞表面抗原）に結合することができる抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態において、抗原結合部分は、抗体又はその機能的抗原結合断片の１つ以上の抗原結合決定基を含む。本開示を読んだ当業者は、用語「「その機能的断片」又は「その機能的変異体」が、断片又は変異体が由来した野生型分子と共通の生物学的活性を有する分子を指すことを容易に理解するであろう。例えば、抗体の機能的断片又は機能的変異体は、機能的断片又は機能的変異体が由来する抗体と同じエピトープに結合する同じ能力を本質的に保持するものである。例えば、細胞表面受容体のエピトープに結合することができる抗体は、Ｎ末端及び／又はＣ末端で切断されてもよく、そのエピトープ結合活性の保持は、当業者に公知のアッセイを使用して評価されてもよい。いくつかの実施形態において、抗原結合部分は、抗体、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、又はミニボディ、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、及び単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、又はその機能的断片からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、抗原結合部分は、ｓｃＦｖを含む。

【００６６】

抗原結合部分は、天然に存在するアミノ酸配列を含み得、又は所望の及び／若しくは改善された特性、例えば、結合親和性を提供するように操作、設計、若しくは改変され得る。概して、標的抗原（例えば、ＣＤ１９抗原）に対する抗原結合部分、例えば、抗体の結合親和性は、Ｆｒａｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ（１９７９）１６：１０１－０６によって記載されているスキャッチャード法によって計算することができる。いくつかの実施形態において、結合親和性は、抗原／抗体解離速度によって測定される。いくつかの実施形態において、結合親和性は、競合ラジオイムノアッセイによって測定される。いくつかの実施形態において、結合親和性は、ＥＬＩＳＡによって測定される。いくつかの実施形態において、抗体親和性は、フローサイトメトリーによって測定される。抗原（例えば、ＣＤ１９）に「選択的に結合する」抗体は、高い親和性で抗原に結合し、他の無関係な抗原に有意に結合しない抗原結合部分である。

【００６７】

当業者は、本開示のキメラポリペプチド又はＳｙｎＲＩＰＲを発現するように遺伝子改

変された細胞の所望の局在又は機能に基づいて、細胞外ドメインを選択することができる。例えば、細胞外ドメインは、受容体発現細胞をエストロゲン依存性乳癌細胞に標的化するように選択することができる。いくつかの実施形態において、開示されるキメラポリペプチド受容体（例えば、ＳｙｎＲＩＰＲ）の細胞外ドメインは、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）又は腫瘍特異的抗原（ＴＳＡ）に結合することができる。ＴＡＡは、例えば、腫瘍細胞上及び正常細胞の亜集団上、又は多くの正常細胞上に存在するが、腫瘍細胞上よりもはるかに低い濃度で存在するタンパク質などの分子を含む。例としては、ＣＥＡ、ＡＦＰ、ＨＥＲ２、ＣＴＡＧ１Ｂ及びＭＡＧＥＡ１が挙げられるが、これらに限定されない。対照的に、ＴＳＡは、概して、腫瘍細胞上に存在するが正常細胞上では発現されない、例えばタンパク質などの分子を含む。例としては、発癌ウイルス抗原及び変異タンパク質（ネオ抗原としても知られる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００６８】

いくつかの場合において、抗原結合部分は、腫瘍細胞によって発現される抗原、すなわち、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原に存在するエピトープに特異的である。腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原は、例えば、乳癌細胞、Ｂ細胞リンパ腫、膵臓癌、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、非ホジキンリンパ腫（Ｂ－ＮＨＬ）細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、中皮腫細胞、メラノーマ細胞、慢性リンパ球性白血病細胞、急性リンパ球性白血病細胞、神経芽細胞腫細胞、神経膠腫、神経膠芽腫、結腸直腸癌細胞などに関連する抗原であり得る。腫瘍関連抗原は、非癌性細胞によっても発現され得ることも理解されるであろう。いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、組織特異的抗原に存在するエピトープに特異的である。いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、疾患関連抗原に存在するエピトープに特異的である。

【００６９】

概して、本明細書に開示されるキメラポリペプチド受容体によって標的化され得る適切な表面抗原に関して、特定の制限は存在しない。適切な標的抗原の非限定的な例としては、ＣＤ１９、Ｂ７Ｈ３（ＣＤ２７６）、ＢＣＭＡ（ＣＤ２６９）、アルカリホスファターゼ、胎盤様２（ＡＬＰＰＬ２）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、増強緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、シグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）、ＣＤ１２３、ＣＤ１７１、ＣＤ１７９ａ、ＣＤ２０、ＣＤ２１３Ａ２、ＣＤ２２、ＣＤ２４、ＣＤ２４６、ＣＤ２７２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ４４ｖ６、ＣＤ４６、ＣＤ７１、ＣＤ９７、ＣＥＡ、ＣＬＤＮ６、ＣＬＥＣＬ１、ＣＳ－１、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＬＦ２Ｍ、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、エフリンＢ２、ＦＡＰ、ＦＬＴ３、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＭ３、ＧＰＲＣ５Ｄ、ＨＥＲ２（ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ）、ＩＧＬＬ１、ＩＬ－１１Ｒａ、ＫＩＴ（ＣＤ１１７）、ＭＵＣ１、ＮＣＡＭ、ＰＡＰ、ＰＤＧＦＲ－β、ＰＲＳＳ２１、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、ＳＳＥＡ－４、ＴＡＧ７２、ＴＥＭ１／ＣＤ２４８、ＴＥＭ７Ｒ、ＴＳＨＲ、ＶＥＧＦＲ２、ＡＬＰＩ、シトルリン化ビメンチン、ｃＭｅｔ、及びＡｘｌが挙げられる。

【００７０】

いくつかの実施形態において、標的抗原は、ＣＤ１９、Ｂ７Ｈ３（ＣＤ２７６）、ＢＣＭＡ（ＣＤ２６９）、ＣＤ１２３、ＣＤ１７１、ＣＤ１７９ａ、ＣＤ２０、ＣＤ２１３Ａ２、ＣＤ２２、ＣＤ２４、ＣＤ２４６、ＣＤ２７２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ４４ｖ６、ＣＤ４６、ＣＤ７１、ＣＤ９７、ＣＥＡ、ＣＬＤＮ６、ＣＬＥＣＬ１、ＣＳ－１、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＬＦ２Ｍ、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、エフリンＢ２、ＦＡＰ、ＦＬＴ３、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＭ３、ＧＰＲＣ５Ｄ、ＨＥＲ２（ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ）、ＩＧＬＬ１、ＩＬ－１１Ｒａ、ＫＩＴ（ＣＤ１１７）、ＭＵＣ１、ＮＣＡＭ、ＰＡＰ、ＰＤＧＦＲ－β、ＰＲＳＳ２１、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、ＳＳＥＡ－４、ＴＡＧ７２、ＴＥＭ１／ＣＤ２４８、ＴＥＭ７Ｒ、ＴＳＨＲ、ＶＥＧＦＲ２、ＡＬＰＩ、シトルリン化ビメンチン、ｃＭｅｔ、Ａｘｌ、ＧＰＣ２、ヒト上皮増殖因子受容体２（Ｈｅｒ２／ｎｅｕ）、ＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３）、ＩＬ－１３Ｒα１、ＩＬ－１３Ｒα２、α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、癌抗原－１２５（ＣＡ

－１２５）、ＣＡ１９－９、カルレチニン、ＭＵＣ－１、上膜タンパク質（ＥＭＡ）、上皮性腫瘍抗原（ＥＴＡ）、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原（ＭＡＧＥ）、ＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ１２３、ＣＤ９３、ＣＤ９９、ＣＤ１１７、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維性酸性タンパク（ＧＦＡＰ）、肉眼的嚢胞病流体タンパク（ＧＣＤＦＰ－１５）、ＡＬＫ、ＤＬＫ１、ＦＡＰ、ＮＹ－ＥＳＯ、ＷＴ１、ＨＭＢ－４５抗原、タンパク質メラン－Ａ（Ｔリンパ球によって認識されるメラノーマ抗原、ＭＡＲＴ－１）、ｍｙｏ－Ｄ１、筋肉特異的アクチン（ＭＳＡ）、神経フィラメント、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィジン、サイログロブリン、甲状腺転写因子－１、ＡＯＣ３（ＶＡＰ－１）、ＣＡＭ－３００１、ＣＣＬ１１（エオタキシン－１）、ＣＤ１２５、ＣＤ１４７（ベイシジン）、ＣＤ１５４（ＣＤ４０Ｌ）、ＣＤ２、ＣＤ２０、ＣＤ２３（ＩｇＥ受容体）、ＣＤ２５（ＩＬ－２受容体の鎖）、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩｇＥ、ＩｇＥ　Ｆｃ領域、ＩＬ－１、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７、ＩＬ－１７Ａ、ＩＬ－２２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－６受容体、インテグリンα４、インテグリンα４β７、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１α）、ミオスタチン、ＯＸ－４０、ｓｃｌｅｒｏｓｃｉｎ、ＳＯＳＴ、ＴＧＦβ１、ＴＮＦ－α、ＶＥＧＦ－Ａ、ピルビン酸キナーゼイソ酵素Ｍ２型（腫瘍Ｍ２－ＰＫ）、ＣＤ２０、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ３、ＴＲＢＣ１、ＴＲＢＣ２、ＣＤ３８、ＣＤ１２３、ＣＤ９３、ＣＤ３４、ＣＤ１ａ、ＳＬＡＭＦ７／ＣＳ１、ＦＬＴ３、ＣＤ３３、ＣＤ１２３、ＴＡＬＬＡ－１、ＣＳＰＧ４、ＤＬＬ３、カッパ軽鎖、ラムダ軽鎖、ＣＤ１６／ＦｃγＲＩＩＩ、ＣＤ６４、ＦＩＴＣ、ＣＤ２２、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ７０、ＧＤ２（ガングリオシドＧ２）、ＧＤ３、ＥＧＦＲｖＩＩＩ（上皮増殖因子変異体ＩＩＩ）、ＥＧＦＲ及びそのイソ変異体、ＴＥＭ－８、精子タンパク質１７（Ｓｐ１７）、並びにメソテリンから選択される。

【００７１】

適切な抗原の更なる非限定的な例としては、ＰＡＰ（前立腺酸性ホスファターゼ）、前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ）、プロステイン、ＮＫＧ２Ｄ、ＴＡＲＰ（Ｔ細胞受容体γ代替リーディングフレームタンパク質）、Ｔｒｐ－ｐ８、ＳＴＥＡＰ１（前立腺１の６回膜貫通上皮抗原）、異常なｒａｓタンパク質、異常なｐ５３タンパク質、インテグリンβ３（ＣＤ６１）、ガラクチン、Ｋ－Ｒａｓ（Ｖ－Ｋｉ－ｒａｓ２　Ｋｉｒｓｔｅｎラット肉腫ウイルス癌遺伝子）、Ｒａｌ－Ｂ、ＧＰＣ２、ＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３）、又はＩＬ－１３Ｒαが挙げられる。いくつかの実施形態において、抗原は、ＡＬＰＰＬ２である。いくつかの実施形態において、抗原は、ＢＣＭＡである。いくつかの実施形態において、ＥＣＤの抗原結合部分は、ＧＦＰ及びｅＧＦＰなどのレポータータンパク質に特異的である。このような抗原結合部分の非限定的な例としては、ＬａＧ１７抗ＧＦＰナノボディが挙げられる。いくつかの実施形態において、ＥＣＤの抗原結合部分は、抗ＢＣＭＡ完全ヒト化　ＶＨドメイン（ＦＨＶＨ）を含む。いくつかの実施形態において、抗原は、シグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）である。

【００７２】

本明細書に開示されるキメラポリペプチド受容体に好適であり得る追加の抗原としては、ＧＰＣ２、ヒト上皮成長因子受容体２（Ｈｅｒ２／ｎｅｕ）、ＣＤ２７６（Ｂ７－Ｈ３）、ＩＬ－１３Ｒα１、ＩＬ－１３Ｒα２、α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、癌抗原－１２５（ＣＡ－１２５）、ＣＡ１９－９、カルレチニン、ＭＵＣ－１、上皮膜タンパク質（ＥＭＡ）、上皮性腫瘍抗原（ＥＴＡ）が挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な標的抗原としては、チロシナーゼ、黒色腫関連抗原（ＭＡＧＥ）、ＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ１２３、ＣＤ９３、ＣＤ９９、ＣＤ１１７、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）、肉眼的嚢胞病流体タンパク質（ＧＣＤＦＰ－１５）、ＡＬＫ、ＤＬＫ１、ＦＡＰ、ＮＹ－ＥＳＯ、ＷＴ１、ＨＭＢ－４５抗原、タンパク質メラン－Ａ（Ｔリンパ球によって認識される黒色腫抗原、ＭＡＲＴ－１）、ｍｙｏ－Ｄ１、筋肉特異的アクチン（ＭＳＡ）、神経フィラメント、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプ

トフィジン、サイログロブリン、甲状腺転写因子－１が挙げられるが、これらに限定されない。

【００７３】

追加の適切な抗原としては、ＡＯＣ３（ＶＡＰ－１）、ＣＡＭ－３００１、ＣＣＬ１１（エオタキシン－１）、ＣＤ１２５、ＣＤ１４７（ベイシジン）、ＣＤ１５４（ＣＤ４０Ｌ）、ＣＤ２、ＣＤ２０、ＣＤ２３（ＩｇＥ受容体）、ＣＤ２５（ヘテロ二量体ＩＬ－２受容体の１つのサブユニット）、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＩＦＮα、ＩＦＮγ、ＩｇＥ、ＩｇＥ　Ｆｃ領域、ＩＬ－１、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７、ＩＬ－１７Ａ、ＩＬ－２２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－６受容体、インテグリンα４、インテグリンα４β７、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１α）、ミオスタチン、ＯＸ－４０、ｓｃｌｅｒｏｓｃｉｎ、ＳＯＳＴ、ＴＧＦβ１、ＴＮＦα及びＶＥＧＦ－Ａなどの炎症性疾患に関連するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７４】

本明細書に開示されるキメラポリペプチド及びＳｙｎＲＩＰＲに適した更なる抗原としては、ピルビン酸キナーゼイソ酵素Ｍ２型（腫瘍Ｍ２－ＰＫ）、ＣＤ２０、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ３、ＴＲＢＣ１、ＴＲＢＣ２、ＢＣＭＡ、ＣＤ３８、ＣＤ１２３、ＣＤ９３、ＣＤ３４、ＣＤ１ａ、ＳＬＡＭＦ７／ＣＳ１、ＦＬＴ３、ＣＤ３３、ＣＤ１２３、ＴＡＬＬＡ－１、ＣＳＰＧ４、ＤＬＬ３、カッパ軽鎖、ラムダ軽鎖、ＣＤ１６／ＦｃγＲＩＩＩ、ＣＤ６４、ＦＩＴＣ、ＣＤ２２、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ７０、ＧＤ２（ガングリオシドＧ２）、ＧＤ３、ＥＧＦＲｖＩＩＩ（上皮増殖因子変異体ＩＩＩ）、ＥＧＦＲ及びそのイソ変異体、ＴＥＭ－８、精子タンパク質１７（Ｓｐ１７）、メソテリンが挙げられるが、これらに限定されない。適切な抗原の更なる非限定的な例としては、ＰＡＰ（前立腺酸性ホスファターゼ）、前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ）、プロステイン、ＮＫＧ２Ｄ、ＴＡＲＰ（Ｔ細胞受容体γ代替リーディングフレームタンパク質）、Ｔｒｐ－ｐ８、ＳＴＥＡＰ１（前立腺－１の６回膜貫通上皮抗原）、異常なｒａｓタンパク質、異常なｐ５３タンパク質、インテグリンβ３（ＣＤ６１）、ガラクチン、Ｋ－Ｒａｓ（Ｖ－Ｋｉ－ｒａｓ２Ｋｉｒｓｔｅｎラット肉腫ウイルス癌遺伝子）、及びＲａｌ－Ｂが挙げられる。いつかの実施形態において、抗原は、ＡＬＰＰＬ２である。いくつかの実施形態において、抗原は、ＢＣＭＡである。いくつかの実施形態において、ＥＣＤの抗原結合部分は、ＧＦＰ及びｅＧＦＰなどのレポータータンパク質に特異的である。このような抗原結合部分の非限定的な例としては、ＬａＧ１７抗ＧＦＰナノボディが挙げられる。いくつかの実施形態において、ＥＣＤの抗原結合部分は、抗ＢＣＭＡ完全ヒト化ＶＨドメイン（ＦＨＶＨ）を含む。いくつかの実施形態において、抗原は、シグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）である。

【００７５】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるキメラポリペプチド及びキメラ受容体による標的化に適した抗原は、病原体に由来するリガンドを含む。例えば、抗原は、ＨＥＲ２陽性乳癌細胞によって産生されるＨＥＲ２であり得る。いくつかの実施形態において、抗原は、Ｂ細胞白血病で発現されるＣＤ１９であり得る。いくつかの実施形態において、抗原は、多形性膠芽腫（ＧＢＭ）で発現されるが、健康なＣＮＳ組織ではるかに少なくしか発現されないＥＧＦＲであり得る。いくつかの実施形態において、抗原は、成人における癌、例えば、結腸癌に関連するＣＥＡであり得る。

【００７６】

いくつかの実施形態において、細胞外ドメインの抗原結合部分は、細胞表面標的に特異的であり、細胞表面標的の非限定的な例としては、ＣＤ１９、ＣＤ３０、Ｈｅｒ２、ＣＤ２２、ＥＮＰＰ３、ＥＧＦＲ、ＣＤ２０、ＣＤ５２、ＣＤ１１α、及びαインテグリンが挙げられる。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるキメラポリペプチド及びＳｙｎＲＩＰＲは、ＣＤ１９、ＣＥＡ、ＨＥＲ２、ＭＵＣ１、ＣＤ２０、又はＥＧＦＲに結合する抗原結合部分を有する細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるキメラポリペプチド及びＳｙｎＲＩＰＲは、ＣＤ１９に結合する抗

原結合部分を含む細胞外ドメインを含む。

【００７７】

連結配列

上記のように、本開示のキメラポリペプチド及び受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン（ＥＣＤ）とＴＭＤとの間に配置された連結配列を含む。

【００７８】

いくつかの実施形態において、キメラ受容体の連結配列は、ポリペプチドヒンジドメインに対して少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する。特定の理論に拘束されるものではないが、本明細書に開示されるキメラポリペプチド及びＳｙｎＲＩＰＲのヒンジドメインは、キメラポリペプチド及びＳｙｎＲＩＰＲの柔軟性及び剛性を制御することを含むいくつかの機能を果たすことができ、その結果、抗原結合及びシグナル変換に影響を及ぼすことができる。ヒンジドメインの長さを調節して、ＳｙｎＲＩＰＲの、ＳｙｎＲＩＰＲと標的細胞との間の空隙にある抗原に到達する能力を増強することができる。ヒンジドメインはまた、二量体化を媒介するように調整され得る。適切なヒンジドメインを選択する際に注意を払うべきである。例えば、より短いヒンジドメインは、より剛性が高く、標的抗原に結合されるとシグナル伝達においてより効果的になることがあるが、より膜近位であるか又はそうでなければ特に拘束された標的に到達しないことがある。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、分子間ジスルフィド結合を介してキメラポリペプチドのオリゴマー形成を促進することができる。これらの例において、本明細書に開示されるキメラポリペプチド及びＳｙｎＲＩＰＲ内で、ヒンジドメインは、概して、ＥＣＤとＴＭＤとの間に配置された柔軟性オリゴ又はポリペプチドコネクタ領域を含む。したがって、ヒンジドメインは、ＥＣＤとＴＭＤとの間に柔軟性を提供し、オリゴマー複合体を形成するための２つ以上のキメラポリペプチド単量体間の分子間ジスルフィド結合のための部位も提供する。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、本明細書に開示されるキメラポリペプチドの二量体形成を促進するモチーフを含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、本明細書に開示されるキメラポリペプチドの三量体形成を促進するモチーフを含む（例えば、ＯＸ４０に由来するヒンジドメイン）。

【００７９】

本開示の組成物及び方法に適したヒンジポリペプチド配列は、天然に存在するヒンジポリペプチド配列（例えば、天然に存在する免疫グロブリン由来のもの）であり得る。あるいは、ヒンジポリペプチド配列は、天然に存在するヒンジポリペプチド配列に対応する合成配列であり得、又は完全に合成のヒンジ配列であり得、又は所望の特性及び／若しくは改善された特性、例えば、転写を調節する特性を提供するように操作、設計、若しくは改変され得る。適切なヒンジポリペプチド配列としては、ＩｇＡ、ＩｇＤ、及びＩｇＧサブクラス（ＩｇＧ１ヒンジドメイン、ＩｇＧ２ヒンジドメイン、ＩｇＧ３ヒンジドメイン、及びＩｇＧ４ヒンジドメインなど）に由来するもの、又はその機能的変異体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ヒンジポリペプチド配列は、１つ以上のＣＸＸＣモチーフを含有する。いくつかの実施形態において、ヒンジポリペプチド配列は、１つ以上のＣＰＰＣモチーフを含有する。この点に関する追加の情報は、例えば、Ｖｉｄａｒｓｓｏｎ　Ｇ．ｅｔ　ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｏｃｔｏｂｅｒ　２０，２０１４による最近の総説（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に見出すことができる。

【００８０】

したがって、いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＩｇＧ１ヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＩｇＧ２ヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＩｇＧ３ヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＩｇＧ４ヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジ

ドメインは、ＩｇＡヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＩｇＤヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。

【００８１】

本明細書に開示される組成物及び方法に適切な追加のヒンジポリペプチド配列としては、ＣＤ８αヒンジドメイン、ＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ１５２ヒンジドメイン、ＰＤ－１ヒンジドメイン、ＣＴＬＡ４ヒンジドメイン、ＯＸ４０ヒンジドメイン、ＦｃγＲＩＩαヒンジドメイン、及びその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＣＤ８αヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＣＤ２８ヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＯＸ４０ヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＩｇＧ４ヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来するヒンジポリペプチド配列を含む。

【００８２】

原理的に、ヒンジドメインの長さ及び／又はアミノ酸組成には、それが柔軟性及びオリゴマー化のための能力を付与する以外、特に制限はない。しかしながら、本開示のキメラポリペプチドの所望の活性を達成するために、ヒンジポリペプチド配列の長さ及びアミノ酸組成を最適化して、ＥＣＤ及びＴＭＤの互いに対する、並びにキメラポリペプチド単量体の互いに対する配向及び／又は近接性を変化させることができることを、当業者は容易に理解するであろう。いくつかの実施形態において、約１～１００個のアミノ酸残基（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個などのアミノ酸残基）を含む任意の一本鎖ペプチドを、ヒンジドメインとして使用することができる。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、約５～５０、約１０～６０、約２０～７０、約３０～８０、約４０～９０、約５０～１００、約６０～８０、約７０～１００、約３０～６０、約２０～８０、約３０～９０個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、約１～１０、約５～１５、約１０～２０、約１５～２５、約２０～４０、約３０～５０、約４０～６０、約５０～７０個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、約４０～７０、約５０～８０、約６０～８０、約７０～９０、又は約８０～１００個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、約１～１０、約５～１５、約１０～２０、約１５～２５個のアミノ酸残基を含む。

【００８３】

いくつかの実施形態において、連結配列は、ＣＤ８αヒンジドメイン、ＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ１５２ヒンジドメイン、ＰＤ－１ヒンジドメイン、ＣＴＬＡ４ヒンジドメイン、ＯＸ４０ヒンジドメイン、ＩｇＧ１ヒンジドメイン、ＩｇＧ２ヒンジドメイン、ＩｇＧ３ヒンジドメイン、及びＩｇＧ４ヒンジドメインに由来するヒンジドメイン、又はそれらのいずれかの機能的変異体に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００８４】

いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＣＤ８αヒンジドメイン又はその機能的変異体に由来する。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００８５】

いくつかの実施形態において、連結配列は、配列表の配列番号１５７～１６１に記載の配列に対して少なくとも約８０％の配列同一性、例えば、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれ

からなる。いくつかの実施形態において、連結配列は、配列番号１５７～１６１に記載の配列に対して少なくとも約８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態において、連結配列は、配列番号１５７～１６１に記載の配列に対して少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態において、連結配列は、配列番号１５７～１６１に記載の配列に対して少なくとも約９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態において、連結配列は、配列番号１５７～１６１に記載の配列に対して約１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態において、連結配列は、配列番号１５７～１６１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなり、配列番号１５７～１６１のいずれか１つにおける１、２、３、４、若しくは５個のアミノ酸残基が、異なるアミノ酸残基によって置換されている。

【００８６】

いくつかの実施形態において、ＲＯＢＯ（Ｒｏｕｎｄａｂｏｕｔ）細胞表面受容体の１つ以上のドメインは、本開示のキメラ受容体の連結配列に組み込まれている。ＲＯＢＯ受容体は、ＡＤＡＭ１０　ＭＭＰ及びγ－セクレターゼによる受容体の細胞外部分のリガンド誘導性切断に続いて核転写因子ドメインを放出する。しかしながら、ＲＯＢＯは、ＬＩＮ／Ｎｏｔｃｈドメイン、ＥＧＦ様反復、又はＨＤドメインを含まない。更に、ＲＯＢＯの一次リガンドは、可溶性タンパク質（ＳＬＩＴ）である。哺乳動物は、４つのＲＯＢＯ受容体を有する。ＲＯＢＯ１～３は、５つの免疫グロブリン様（Ｉｇ）ドメイン、３つのフィブロネクチン（Ｆｎ）反復、及び細胞内ドメインに連結された膜貫通ドメインを有する。ＲＯＢＯ４は、２つのＩｇドメイン及び２つのＦｎドメインのみを有する。この点に関する追加の情報は、例えば、Ｈ．Ｂｌｏｃｋｕｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ（２０１６）１４３：３０３７－４４（参照により明細書に組み込まれる）に見出すことができる。

【００８７】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるキメラ受容体の連結配列は、ＲＯＢＯ受容体に由来する少なくとも１つのフィブロネクチン（Ｆｎ）反復を含む。開示されるキメラ受容体の連結配列は、１、２、３、４、又は５つのＦｎ反復を含有することができる。いくつかの実施形態において、キメラ受容体の連結配列は、約１～約５つのＦｎ反復、約１～約３つのＦｎ反復、又は約２～約３つのＦｎ反復を含む。いくつかの実施形態において、キメラ受容体の連結配列は、少なくとも１つのフィブロネクチン反復を含むＲＯＢＯ１　ＪＭＤに対して少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する。

【００８８】

いくつかの実施形態において、キメラ受容体の連結配列は、長さが約４～約４０個のアミノ酸残基（例えば、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個、又はそれ以上のアミノ酸残基）のポリペプチド配列を有する。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドの所望の活性を達成するために、連結配列の長さ及びアミノ酸組成を最適化して、ＥＣＤ及びＴＭＤの互いに対する配向及び／又は近接性を変化させることができる。いくつかの実施形態において、キメラ受容体の連結配列は、長さが約４～約４０、約５～約３０、約１０～約２０、約１０～約３０、約１０～約４０、約５～約２０、約５～約４０、又は約２０～約４０個のアミノ酸残基のポリペプチド配列を有する。

【００８９】

膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）

上記のように、本開示のキメラ受容体は、膜貫通ドメインであって、１型膜貫通受容体のＴＭＤに対して少なくとも約８０％の配列同一性を有し、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、膜貫通ドメインを含む。

【００９０】

本明細書に開示される組成物及び方法に適したタンパク質分解切断部位の例としては、

コラゲナーゼ－１、－２、及び－３（ＭＭＰ－１、－８、及び－１３）、ゼラチナーゼＡ及びＢ（ＭＭＰ－２及び－９）、ストロメライシン１、２、及び３（ＭＭＰ－３、－１０、及び－１１）、マトリライシン（ＭＭＰ－７）、並びに膜メタロプロテイナーゼ（ＭＴ１－ＭＭＰ及びＭＴ２－ＭＭＰ）から選択されるマトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）のメタロプロテイナーゼ切断部位が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ＭＭＰ－９の切断配列は、Ｐｒｏ－Ｘ－Ｘ－Ｈｙ（Ｘは、任意的な残基：Ｈｙ、疎水性残基、例えば、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｖａｌ、Ｍｅｔ、及びＰｒｏを表す）（配列番号１６５）、例えば、Ｐｒｏ－Ｘ－Ｘ－Ｈｙ－（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）（配列番号１６６）、例えば、Ｐｒｏ－Ｌｅｕ／Ｇｌｎ－Ｇｌｙ－Ｍｅｔ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ（配列番号１６７）又はＰｒｏ－Ｌｅｕ／Ｇｌｎ－Ｇｌｙ－Ｍｅｔ－Ｔｈｒ（配列番号１６８）である。適切なプロテアーゼ切断部位の別の例は、プラスミノーゲン活性化因子切断部位、例えば、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）又は組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）切断部位である。適切なプロテアーゼ切断部位の別の例は、プロラクチン切断部位である。ｕＰＡ及びｔＰＡの切断配列の具体例としては、Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ（配列番号１６９）を含む配列が挙げられる。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含まれ得るプロテアーゼ切断部位の別の例は、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位、例えば、Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｎ－Ｓｅｒ（配列番号１７０）であり、プロテアーゼは、グルタミンとセリンとの間を切断する。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含まれ得るプロテアーゼ切断部位の別の例は、エンテロキナーゼ切断部位、例えば、Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ｌｙｓ（配列番号１７１）であり、切断は、リジン残基の後で起こる。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含まれ得るプロテアーゼ切断部位の別の例は、トロンビン切断部位、例えば、Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（配列番号１７２）である。プロテアーゼ切断部位を含む追加の適切なリンカーとしては、以下のプロテアーゼ：ｐｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ（商標）プロテアーゼ（ヒトライノウイルス３Ｃプロテアーゼ及びグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼを含む融合タンパク質）、トロンビン、カテプシンＢ、エプスタイン－バーウイルスプロテアーゼ、ＭＭＰ－３（ストロメリシン）、ＭＭＰ－７（マトリリシン）、ＭＭＰ－９、サーモリシン様ＭＭＰ、マトリックスメタロプロテイナーゼ２（ＭＭＰ－２）、カテプシンＬ、カテプシンＤ、マトリックスメタロプロテイナーゼ１（ＭＭＰ－１）、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子、膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＴ－ＭＭＰ）、ストロメライシン３（又はＭＭＰ－１１）、サーモリシン、線維芽細胞コラゲナーゼ及びストロメライシン－１、マトリックスメタロプロテイナーゼ１３（コラゲナーゼ－３）、組織型プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）、ヒト前立腺特異的抗原、カリクレイン（ｈＫ３）、好中球エラスターゼ、及びカルパイン（カルシウム活性化中性プロテアーゼ）によって切断可能な配列が挙げられる。受容体が発現される宿主に対してネイティブではないプロテアーゼ（例えば、ＴＥＶ）は、更なる制御機構として使用することができ、プロテアーゼが発現されるか、又は他の方法で提供されるまで、本開示のＳｙｎＲＩＰＲの活性化が低減される。更に、プロテアーゼは、腫瘍関連又は疾患関連（正常組織よりも有意に高い程度で発現される）であり得、独立した制御機構として機能し得る。例えば、いくつかのマトリックスメタロプロテアーゼは、特定の癌タイプにおいて高度に発現される。

【００９１】

概して、本明細書に開示されるキメラ受容体に適したＴＭＤは、少なくとも１つのγ－セクレターゼ切断部位を含む１型膜貫通受容体の任意の膜貫通ドメインであり得る。γ－セクレターゼ複合体及びアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）を含むその基質タンパク質の構造及び機能の詳細な説明は、例えば、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ Ｃｅｌｌ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ（２０１４）による最近の総説に見出すことができる。１型膜貫通受容体由来の非限定的な適切なＴＭＤとしては、ＣＬＳＴＮ１、ＣＬＳＴＮ２、ＡＰＬＰ１、ＡＰＬＰ２、ＬＲＰ８、ＡＰＰ、ＢＴＣ、ＴＧＢＲ３、ＳＰＮ、ＣＤ４４、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＸＣＬ１６、ＣＸ３ＣＬ１、ＤＣＣ、ＤＬＬ１、ＤＳＧ２、ＤＡＧ１

、ＣＤＨ１、ＥＰＣＡＭ、ＥＰＨＡ４、ＥＰＨＢ２、ＥＦＮＢ１、ＥＦＮＢ２、ＥｒｂＢ４、ＧＨＲ、ＨＬＡ－Ａ、及びＩＦＮＡＲ２由来のものが挙げられ、ＴＭＤは、少なくとも１つのγ－セクレターゼ切断部位を含む。本明細書に記載される組成物及び方法に適した追加のＴＭＤとしては、１型膜貫通受容体ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１Ｒ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＮＳＲ、ＥＲＮ１、ＥＲＮ２、ＪＡＧ２、ＫＣＮＥ１、ＫＣＮＥ２、ＫＣＮＥ３、ＫＣＮＥ４、ＫＬ、ＣＨＬ１、ＰＴＰＲＦ、ＳＣＮ１Ｂ、ＳＣＮ３Ｂ、ＮＰＲ３、ＮＧＦＲ、ＰＬＸＤＣ２、ＰＡＭ、ＡＧＥＲ、ＲＯＢＯ１、ＳＯＲＣＳ３、ＳＯＲＣＳ１、ＳＯＲＬ１、ＳＯＲＴ１、ＳＤＣ１、ＳＤＣ２、ＳＰＮ、ＴＹＲ、ＴＹＲＰ１、ＤＣＴ、ＶＡＳＮ、ＦＬＴ１、ＣＤＨ５、ＰＫＨＤ１、ＮＥＣＴＩＮ１、ＰＣＤＨＧＣ３、ＮＲＧ１、ＬＲＰ１Ｂ、ＣＤＨ２、ＮＲＧ２、ＰＴＰＲＫ、ＳＣＮ２Ｂ、Ｎｒａｄｄ、及びＰＴＰＲＭ由来の膜貫通ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチド又はＳｙｎＲＩＰＲのＴＭＤは、ＡＰＰ、ＣＬＳＴＮ１、ＣＬＳＴＮ２、ＥＰＣＡＭ、ＫＣＮＥ３、ＮＥＣＴＩＮ１、ＰＣＤＨＧＣ３、及びＰＴＰＲＦのＴＭＤに由来するＴＭＤである。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチド又はＳｙｎＲＩＰＲのＴＭＤは、カルシンテニンファミリーのメンバー、例えば、アルカデインアルファ及びアルカデインガンマのＴＭＤに由来するＴＭＤである。

【００９２】

したがって、いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、γ－セクレターゼ切断部位を含む１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも約７０％の配列同一性を有するポリペプチド配列に対して少なくとも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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、γ－セクレターゼ切断部位を含む１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも７０％の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、γ－セクレターゼ切断部位を含む１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも約８０％の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、γ－セクレターゼ切断部位を含む１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも約９０％の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、γ－セクレターゼ切断部位を含む１型膜貫通受容体由来の膜貫通ドメインに対して少なくとも約９５％の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、１型膜貫通受容体は、ＣＬＳＴＮ１、ＣＬＳＴＮ２、ＡＰＬＰ１、ＡＰＬＰ２、ＬＲＰ８、ＡＰＰ、ＢＴＣ、ＴＧＢＲ３、ＳＰＮ、ＣＤ４４、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＸＣＬ１６、ＣＸ３ＣＬ１、ＤＣＣ、ＤＬＬ１、ＤＳＧ２、ＤＡＧ１、ＣＤＨ１、ＥＰＣＡＭ、ＥＰＨＡ４、ＥＰＨＢ２、ＥＦＮＢ１、ＥＦＮＢ２、ＥｒｂＢ４、ＧＨＲ、ＨＬＡ－Ａ、ＩＦＮＡＲ２、ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１Ｒ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＮＳＲ、ＥＲＮ１、ＥＲＮ２、ＪＡＧ２、ＫＣＮＥ１、ＫＣＮＥ２、ＫＣＮＥ３、ＫＣＮＥ４、ＫＬ、ＣＨＬ１、ＰＴＰＲＦ、ＳＣＮ１Ｂ、ＳＣＮ３Ｂ、ＮＰＲ３、ＮＧＦＲ、ＰＬＸＤＣ２、ＰＡＭ、ＡＧＥＲ、ＲＯＢＯ１、ＳＯＲＣＳ３、ＳＯＲＣＳ１、ＳＯＲＬ１、ＳＯＲＴ１、ＳＤＣ１、ＳＤＣ２、ＴＹＲ、ＴＹＲＰ１、ＤＣＴ、ＶＡＳＮ、ＦＬＴ１、ＣＤＨ５、ＰＫＨＤ１、ＮＥＣＴＩＮ１、ＰＣＤＨＧＣ３、ＮＲＧ１、ＬＲＰ１Ｂ、ＣＤＨ２、ＮＲＧ２、ＰＴＰＲＫ、ＳＣＮ２Ｂ、Ｎｒａｄｄ、及びＰＴＰＲＭからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ＴＭＤは、配列表の配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２のいずれか１つに対して少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、又は少なくとも約９９％の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号１～８８に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するア

ミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２に対して約１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５及び１９０～１９２のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列中の１、２、３、４又は５個のアミノ酸残基が、異なるアミノ酸残基によって置換されている。

【００９３】

いくつかの実施形態において、ＴＭＤ内のアミノ酸置換は、ＴＭＤの「ＧＶ」モチーフ内の１つ以上の置換を含む。いくつかの実施形態において、このような置換のうちの少なくとも１つは、アラニンへの置換を含む。例えば、配列ＩＡＴＶＶＩＩＩＳＶＣＭＬＶＦＶＶＡＭＧＶＹ（配列番号２）、並びに配列番号１、６、２０、４３、３９、５４、及び６４に記載の配列のいずれか１つの、１、２、３、４、５個又はそれ以上のアミノ酸残基は、異なるアミノ酸によって置換され得る。いくつかの実施形態において、配列番号２内の「ＧＶ」モチーフの１８位及び／又は１９位のアミノ酸残基は、異なるアミノ酸残基によって置換されている。いくつかの実施形態において、配列番号２の２０位のグリシン残基は、異なるアミノ酸残基によって置換されている。いくつかの実施形態において、配列番号２の２１位のバリン残基は、異なるアミノ酸残基によって置換されている。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号２０の１８位に対応する位置に変異（例えば、Ｇ１８Ａ変異）を有する配列番号２に対応する配列を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号５７の２１位に対応する位置に変異（例えば、Ｖ１９Ａ変異）を有する配列番号２に対応する配列を有するアミノ酸配列を含む。

【００９４】

移送停止配列（ＳＴＳ）

いくつかの実施形態において、本開示のキメラ受容体は、基本的にＴＭＤとＩＣＤとの間に位置する高荷電ドメインである、移送停止配列（ＳＴＳ）を含む。特定の理論に拘束されるものではないが、ＴＭＤとＩＣＤとの間に配置されたこのような高荷電ドメインは、ＩＣＤが膜に入るのを防止する。原理的に、ＳＴＳの長さ及び／又はアミノ酸組成に対する特定の制限はない。いくつかの実施形態において、約１～約４０個のアミノ酸残基（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個、又はそれ以上のアミノ酸残基）を含む任意的一本鎖ペプチドを、ＳＴＳとして使用することができる。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、約１～１５、約５～２０、約８～２５、約１０～３０、約１２～３５、約１４～４０、約５～４０、約１０～３５、約１５～３０、約２０～２５、約２０～４０、約１０～３０、約４～２０、又は約５～２５個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、約１～１０、約５～１２、約６～１４、約７～１８、約８～２０、約９～２２、約１０～２４、又は約１１～２６個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、約４～１０個の残基、例えば、４、５、６、７、８、９、又は１０個のアミノ酸残基を含む。

【００９５】

いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、１型受容体のＳＴＳドメインに対して少なくとも約８０％の配列同一性、例えば、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は９９％の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、１型受容体のＳＴＳドメインに対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＸＣＬ１６、ＤＡＧ１、ＧＨＲ、ＰＴＰＲＦ、ＡＧＥＲ、ＫＬ、ＮＲＧ１、ＬＲＰ１Ｂ、Ｊａｇ２、ＥＰＣＡＭ、ＫＣＮＥ３、ＣＤＨ２、ＮＲＧ２、ＰＴＰＲＫ、ＢＴＣ、ＥＰＨＡ３、ＩＬ１Ｒ２、ＰＴＰＲＦ、又はＰＴＰＲＭ由来のＳＴＳ配列に対して少なくとも７０％の配列同一性、例えば、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は９９％の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、ＣＳＦ１Ｒ、ＤＡＧ１、ＡＧＥＲ、ＮＲＧ１、ＫＣＮＥ３、ＰＴＰＲＦ、又はＰＴＰＲＭ由来のＳＴＳ配列に対して少なくとも７０％の配列同一性、例えば、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は９９％の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、最初の４個の残基中にＬｙｓ（Ｋ）又はＡｒｇ（Ｒ）のみを含む配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、１、２、３、４、５個、又はそれ以上の塩基性残基を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、５、４、３、２、１、又は０個の芳香族残基又は疎水性及び／若しくは大きな側鎖を有する残基を含む。

【００９６】

いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、配列表の配列番号８５～１５６及び１７３に対して少なくとも８０％の配列同一性、例えば、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は９９％の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６に対して少なくとも１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、配列番号１４６に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、配列番号１０８に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６のいずれか１つのアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列中の１、２、３、４又は５個のアミノ酸残基が、異なるアミノ酸残基によって置換されている。

【００９７】

細胞内ドメイン（ＩＣＤ）

本開示のキメラ受容体は、転写制御因子を含む細胞内ドメイン（ＩＣＤ）を更に含む。転写制御因子は、プロモーター駆動ＤＮＡ配列の転写を活性化又は抑制するように作用する生化学的要素である。本開示の組成物及び方法に適した転写制御因子は、天然に存在する転写制御因子であり得、又は所望の特性及び／若しくは改善された特性、例えば、転写の調節を提供するように操作、設計、若しくは改変され得る。いくつかの実施形態において、転写制御因子は、細胞の分化に関与する１つ以上の遺伝子の発現を直接制御する。いくつかの実施形態において、転写制御因子は、第２の転写因子の発現を調節することによって、細胞の分化に関与する１つ以上の遺伝子の発現を間接的に調節し、その結果、細胞の分化に関与する１つ以上の遺伝子の発現を調節する。転写制御因子が転写活性化因子又は転写抑制因子であり得ることは、当業者によって理解されるであろう。いくつかの実施形態において、転写制御因子は、転写抑制因子である。いくつかの実施形態において、転写制御因子は、転写活性化因子である。いくつかの実施形態において、転写制御因子は、核局在化シグナルを更に含むことができる。いくつかの実施形態において、転写制御因子は、Ｇａｌ４－ＶＰ１６、Ｇａｌ４－ＶＰ６４、ｔｅｔＲ－ＶＰ６４、ＺＦＨＤ１－ＶＰ６４、Ｇａｌ４－ＫＲＡＢ、及びＨＡＰ１－ＶＰ１６から選択される。いくつかの実施形態において、転写制御因子は、Ｇａｌ４－ＶＰ６４である。

【００９８】

追加のドメイン

いくつかの実施形態において、ＴＭＤのＮ末端に位置する細胞外ドメインは、追加のドメイン、例えば、ＣＤ８αシグナルなどの膜局在シグナル、ｍｙｃタグ又はｈｉｓタグな

どの検出可能なマーカーを更に含むことができる。いくつかの実施形態において、キメラ受容体は、１つ以上の追加の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、キメラ受容体は、追加のタンパク質分解切断部位を含まない。いくつかの実施形態において、キメラ受容体は、１つ以上のグリコシル化部位を更に含む。いくつかの実施形態において、キメラ受容体は、グリコシル化部位を含まない。いくつかの実施形態において、キメラ受容体は、分子間ジスルフィド結合を介してキメラポリペプチドのオリゴマー化を促進するためのヒンジドメインを含まない。

【００９９】

いくつかの実施形態において、キメラ受容体は、高度に保存されたＲＯＢＯ細胞表面受容体の要素を更に含む。いくつかの実施形態において、開示されるキメラ受容体は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、（ａ）選択されたリガンドに対する結合親和性を有する細胞外リガンド結合ドメイン、（ｂ）フィブロネクチン反復を含むＲＯＢＯドメイン、（ｃ）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ＴＭＤ、及び（ｄ）転写制御因子を含むＩＣＤを含み、選択されたリガンドの細胞外結合ドメインへの結合が、ＴＭＤにおけるリガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導し、キメラポリペプチドが、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を含まない。

【０１００】

いくつかの実施形態において、キメラ受容体は、キメラ受容体のオリゴマー化、例えば、二量体化、三量体化、又はより高次の多量体を促進するために、細胞外オリゴマー化ドメイン（例えば、ヒンジドメイン）を更に含む。いくつかの実施形態において、開示されるキメラ受容体は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、（ａ）選択されたリガンドに対する結合親和性を有する細胞外リガンド結合ドメイン、（ｂ）ヒンジドメイン、（ｃ）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ＴＭＤ、及び（ｄ）転写制御因子を含むＩＣＤを含み、選択されたリガンドの細胞外結合ドメインへの結合が、ＴＭＤにおけるリガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導し、キメラポリペプチドが、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を含まない。

【０１０１】

いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、分子間ジスルフィド結合を介してキメラポリペプチドのオリゴマー形成を促進することができるポリペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるキメラ受容体は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、（ａ）選択されたリガンドに対する結合親和性を有する細胞外リガンド結合ドメイン、（ｂ）分子間ジスルフィド結合を介してキメラポリペプチドのオリゴマー形成を促進することができるヒンジドメイン、（ｃ）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ＴＭＤ、及び（ｄ）転写制御因子を含むＩＣＤを含み、選択されたリガンドの細胞外結合ドメインへの結合が、ＴＭＤにおけるリガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導し、キメラポリペプチドが、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を含まない。

【０１０２】

本開示のキメラ受容体は、概ね、長さが約１００アミノ酸（ａａ）～約１０００ａａ、例えば、約１００ａａ～約２００ａａ、約１５０ａａ～約２５０ａａ、約２００ａａ～約３００ａａ、約２５０ａａ～約３５０ａａ、約３００ａａ～約４００ａａ、約３５０ａａ～約４５０ａａ、約４００ａａ～約５００ａａであるキメラポリペプチドを含む、任意の長さのキメラポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態において、開示されるキメラポリペプチドは、概ね、長さが約４００ａａ～約４５０ａａ、約４５０ａａ～約５００ａａ、約５００ａａ～約５５０ａａ、約５５０ａａ～約６００ａａ、約６００ａａ～約６５０ａａ、約６５０ａａ～約７００ａａ、約７００ａａ～約７５０ａａ、約７５０ａａ～約８００ａａ、約８００ａａ～約８５０ａａ、約８５０ａａ～約９００ａａ、約９００ａａ～約９５０ａａ、又は約９５０ａａ～約１０００ａａである。いくつかの場合において、本開示のキメラポリペプチドは、約３００ａａ～約４００ａａの長さを有する。いくつかの場合において、本開示のキメラポリペプチドは、３００ａａ～３５０ａａの長さを有す

る。いくつかの場合において、本開示のキメラポリペプチドは、３００ａａ～３２５ａａの長さを有する。いくつかの場合において、本開示のキメラポリペプチドは、３５０ａａ～４００ａａの長さを有する。いくつかの場合において、本開示のキメラポリペプチドは、７５０ａａ～８５０ａａの長さを有する。

【０１０３】

いくつかの実施形態において、本開示のキメラ受容体は、（ａ）細胞外リガンド結合ドメイン、（ｂ）配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも約８０％、９０％、９５％、９６％、９７、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結配列と、（ｃ）配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２のいずれか１つに対して少なくとも約８０％、９０％、９５％、９６％、９７、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＴＭＤと、（ｄ）配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６のいずれか１つに対して少なくとも約８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＳＴＳと、（ｅ）転写制御因子を含むＩＣＤと、を含む。いくつかの実施形態において、本開示のキメラ受容体は、（ａ）配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結配列と、（ｂ）配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２のいずれか１つに対して少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＴＭＤと、（ｃ）配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６のいずれか１つに対して少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＳＴＳと、を含む。いくつかの実施形態において、本開示のキメラ受容体は、（ａ）配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも約９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結配列と、（ｂ）配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２のいずれか１つに対して少なくとも約９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメインと、（ｃ）配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６のいずれか１つに対して少なくとも約９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＳＴＳと、を含む。

【０１０４】

いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドは、本明細書に開示されるキメラ受容体、例えば、表１に記載されるものに対して少なくとも約８０％、９０％、９５％、９６％、９７、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。したがって、いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドは、配列表中の配列番号１９７～２４８からなる群から選択される配列に対して少なくとも約８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドは、配列番号１９７～２４８からなる群から選択される配列に対して少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドは、配列番号１９７～２４８からなる群から選択される配列に対して少なくとも約９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドは、配列番号１９７～２４８からなる群から選択される配列に対して少なくとも約１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドは、配列番号１９７～２４８からなる群から選択される配列に対して少なくとも約１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列中の１、２、３、４又は５個のアミノ酸残基が、異なるアミノ酸残基によって置換されている。

【０１０５】

核酸分子

一態様において、本開示のいくつかの実施形態は、発現カセットを含む、本開示のキメラポリペプチド及びＮｏｔｃｈ受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、並びに例えば、宿主細胞における受容体のインビボ発現を指示する制御配列などの異種核酸

配列に作動可能に連結されたこれらの核酸分子を含む、発現ベクターに関する。

【０１０６】

本開示の核酸分子は、概ね、約５Ｋｂ～約５０Ｋｂ、例えば、約５Ｋｂ～約４０Ｋｂ、約５Ｋｂ～約３０Ｋｂ、約５Ｋｂ～約２０Ｋｂ、又は約１０Ｋｂ～約５０Ｋｂ、例えば、約１５Ｋｂ～３０Ｋｂ、約２０Ｋｂ～約５０Ｋｂ、約２０Ｋｂ～約４０Ｋｂ、約５Ｋｂ～約２５Ｋｂ、又は約３０Ｋｂ～約５０Ｋｂである核酸分子を含む、任意の長さの核酸分子であり得る。

【０１０７】

いくつかの実施形態において、核酸分子は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、（ａ）選択されたリガンドに対する結合親和性を有する細胞外リガンド結合ドメインと、（ｂ）連結配列であって、（ｉ）ポリペプチドヒンジドメインに対して少なくとも約８０％の配列同一性、又は（ｉｉ）少なくとも１つのフィブロネクチン（Ｆｎ）反復を含むＲＯＢＯ１ＪＭＤに対して少なくとも約８０％の配列同一性を有する、連結配列と、（ｃ）ＴＭＤであって、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、１型膜貫通受容体の膜貫通ドメインに対して少なくとも約８０％の配列同一性を有する、ＴＭＤと、（ｄ）転写制御因子を含むＩＣＤと、を含むキメラ受容体をコードするヌクレオチド配列を含み、選択されたリガンドの細胞外結合ドメインへの結合が、転写制御因子と連結配列との間のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断を誘導し、キメラポリペプチドが、Ｎｏｔｃｈ受容体由来の配列を含まない。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列は、発現カセット又は発現ベクターに組み込まれている。発現カセットは、概して、コード配列と、インビボ及び／又はエクスビボでのレシピエント細胞内におけるコード配列の適切な転写及び／又は翻訳を指示するのに十分な制御情報とを含有する遺伝物質の構築物を含むことが理解されるであろう。概して、発現カセットは、所望の宿主細胞若しくは組織への標的化のためのベクターに、及び／又は個体に挿入することができる。したがって、いくつかの実施形態において、本開示の発現カセットは、インビボでカセットの発現を誘導するのに十分な発現制御エレメント（要素）に作動可能に連結された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。いくつかの実施形態において、発現制御エレメントは、プロモーター及び／又はエンハンサー、並びに任意選択的に、コード配列の転写及び／又は翻訳に影響を及ぼすことができる他の核酸配列のいずれか又は組み合わせを含む。

【０１０９】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列は、発現ベクターに組み込まれている。用語「ベクター」は、概して、宿主細胞間の移動のために設計された組換えポリヌクレオチド構築物を指し、形質転換の目的、例えば、宿主細胞への異種ＤＮＡの導入のために使用され得ることが当業者によって理解されるであろう。したがって、いくつかの実施形態において、ベクターは、挿入されたセグメントの複製をもたらすために別のＤＮＡセグメントが挿入され得る、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどのレプリコンであり得る。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、組み込み型ベクターであり得る。

【０１１０】

いくつかの実施形態において、発現ベクターは、ウイルスベクターであり得る。当業者によって理解されるように、用語「ウイルスベクター」は、核酸分子の移入若しくは細胞のゲノムへの組み込みを全般に促進するウイルス由来核酸エレメントを含む核酸分子（例えば、トランスファープラスミド）、又は核酸移入を媒介するウイルス粒子のいずれかを指すために広く使用される。ウイルス粒子は、概して、様々なウイルス成分を含み、核酸に加えて宿主細胞成分も含むこともある。ウイルスベクターという用語は、核酸を細胞に導入することができるウイルス若しくはウイルス粒子、又は導入された核酸自体のいずれかを指すことができる。ウイルスベクター及びトランスファープラスミドは、主にウイルスに由来する構造的及び／又は機能的遺伝要素を含む。用語「レトロウイルスベクター」は、主にレトロウイルスに由来する構造的及び機能的遺伝要素又はその一部分を含有する

、ウイルスベクター又はプラスミドを指す。用語「レンチウイルスベクター」は、主にレンチウイルスに由来するＬＴＲを含む、構造的及び機能的遺伝要素又はその一部分を含有する、ウイルスベクター又はプラスミドを指す。いくつかの実施形態において、本開示のキメラ受容体をコードする核酸分子は、１つ以上のレンチウイルスベクター構築物に組み込むことができる。いくつかの実施形態において、本開示のキメラ受容体をコードする核酸分子は、単一のレンチウイルスベクター構築物に組み込むことができる。いくつかの実施形態において、本開示のキメラ受容体をコードする核酸分子は、２、３、４、５つ、又はそれ以上のレンチウイルスベクター構築物に組み込むことができる。

【０１１１】

いくつかの実施形態において、組換え核酸は、本明細書に開示されるキメラ受容体に対して少なくとも約８０％、９０％、９５％、９６％、９７、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、核酸分子は、（ａ）配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも約８０％、９０％、９５％、９６％、９７、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結配列と、（ｂ）配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２のいずれか１つに対して少なくとも約８０％、９０％、９５％、９６％、９７、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメインと、（ｃ）配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６のいずれか１つに対して少なくとも約８０％、９０％、９５％、９６％、９７、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＳＴＳと、を含むキメラポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、核酸分子は、（ａ）配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結配列と、（ｂ）配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２のいずれか１つに対して少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメインと、（ｃ）配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６のいずれか１つに対して少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＳＴＳと、を含むキメラポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、核酸分子は、（ａ）配列番号１５７～１６１のいずれか１つに対して少なくとも約９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む連結配列と、（ｂ）配列番号１～８４、１７８、１８２～１８５、及び１９０～１９２のいずれか１つに対して少なくとも約９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメインと、（ｃ）配列番号８９、９２、１０８、１１５、１３８、１４６、及び１５６のいずれか１つに対して少なくとも約９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＳＴＳと、を含むキメラポリペプチドをコードする。

【０１１２】

キメラ受容体をコードする核酸配列は、対象の宿主細胞における発現のために最適化することができる。例えば、配列のＧ－Ｃ含量は、宿主細胞において発現される既知の遺伝子を参照することによって計算される場合、所与の細胞宿主について平均のレベルに調節され得る。コドン最適化のための方法は、当該技術分野で知られている。本明細書に開示されるキメラ受容体のコード配列内のコドン使用頻度は、コード配列内のコドンの約１％、約５％、約１０％、約２５％、約５０％、約７５％、又は最大１００％が特定の宿主細胞における発現に最適化されるように、宿主細胞における発現を増強するように最適化することができる。

【０１１３】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、本明細書に開示されるキメラ受容体をコードする組換え核酸分子を含む、ベクター又は発現カセットに関する。発現カセットは、概して、コード配列と、インビボ及び／又はエクスビボでのレシピエント細胞内におけるコード配列の適切な転写及び／又は翻訳を指示するのに十分な制御情報とを含有する。発現カセットは、所望の宿主細胞への標的化のためのベクターに、及び／又は個体に挿入することができる。発現カセットは、１つ以上の核酸配列が機能的に作動可能な様式で連結

されている、すなわち、作動可能に連結されている核酸分子を含む、ゲノム統合又は自律複製が可能な、任意の供給源に由来する、線状又は環状、一本鎖又は二本鎖、ＤＮＡ又はＲＮＡポリヌクレオチドとして、プラスミド、コスミド、ウイルス、自律複製ポリヌクレオチド分子、又はバクテリオファージに挿入することができる。

【０１１４】

本明細書に開示される任意のキメラ受容体をコードする核酸分子の１つ以上を含有する、ベクター、プラスミド、又はウイルスも本明細書で提供される。核酸分子は、例えば、ベクターで形質転換／形質導入された細胞において、それらの発現を指示することができるベクター内に含まれ得る。真核細胞及び原核細胞で使用するのに適したベクターは、当該分野で公知であり、そして市販されているか、又は当業者によって容易に調製される。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，＆Ｒｕｓｓｅｌｌ，Ｄ．Ｗ．（２０１２）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（４ｔｈ ｅｄ．）．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，＆ Ｒｕｓｓｅｌ，Ｄ．Ｗ．（２００１）．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ ｅｄ．）．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（ｊｏｉｎｔｌｙ ｒｅｆｅｒｒｅｄ ｔｏ ｈｅｒｅｉｎ ａｓ”Ｓａｍｂｒｏｏｋ”）；Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．（１９８７）．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ：Ｗｉｌｅｙ（２０１４年までの付録を含む）；Ｂｏｌｌａｇ，Ｄ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ：Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ；Ｈｕａｎｇ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．（２００５）．Ｎｏｎｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ．Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ｋａｐｌｉｔｔ，Ｍ．Ｇ．ｅｔ ａｌ．（１９９５）．Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ｌｅｆｋｏｖｉｔｓ，Ｉ．（１９９７）．Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍａｎｕａｌ：ｔｈｅ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｓｏｕｒｃｅｂｏｏｋ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ．Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ｄｏｙｌｅ，Ａ．ｅｔ ａｌ．（１９９８）．Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ：Ｗｉｌｅｙ；Ｍｕｌｌｉｓ，Ｋ．Ｂ．，Ｆｅｒｒｅ，Ｆ．＆ Ｇｉｂｂｓ，Ｒ．（１９９４）．ＰＣＲ：ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ．Ｂｏｓｔｏｎ：Ｂｉｒｋｈａｕｓｅｒ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ；Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ，Ｅ．Ａ．（２０１４）．Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ ｅｄ．）．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ；Ｂｅａｕｃａｇｅ，Ｓ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．（２０００）．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ：Ｗｉｌｅｙ，（２０１４年までの付録を含む）；及びＭａｋｒｉｄｅｓ，Ｓ．Ｃ．（２００３）．Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ．Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，ＮＬ：Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｂ．Ｖ．を参照されたく、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０１１５】

ＤＮＡベクターは、従来の形質転換又はトランスフェクション技術によって真核細胞に導入することができる。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするための適切な方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（２０１２、前出）及び他の標準的な分子生物学実験マニュアルで見出すことができ、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形

質導入、スクレープローディング、バリスティック導入、ヌクレオポレーション、流体力学的ショック、及び感染がある。

【０１１６】

本開示において使用することができるウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルス、サルウイルス４０（ＳＶ４０）、及びウシパピローマウイルスベクターが挙げられる（例えば、Ｇｌｕｚｍａｎ（Ｅｄ．），Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ，ＣＳＨ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．を参照されたい）。例えば、本明細書に開示されるキメラ受容体は、哺乳動物細胞（例えば、ＣＯＳ細胞、ＮＩＨ ３Ｔ３細胞、又はＨｅＬａ細胞）などの真核宿主において産生することができる。これらの細胞は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖａ）を含む多くの供給元から入手可能である。発現系を選択する際には、構成要素が互いに適合するように注意する必要がある。当業者であれば、このような判断が可能である。更に、発現系を選択する際にガイダンスが必要とされる場合、当業者は、Ｐ．Ｊｏｎｅｓ，「Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ，２００９）を参考にすることができる。

【０１１７】

提供される核酸分子は、天然に存在する配列、又は天然に存在する配列とは異なるが、遺伝子コードの縮重のために同じ遺伝子産物をコードする配列を含有し得る。これらの核酸分子は、ＲＮＡ若しくはＤＮＡ（例えば、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、又はホスホルアミダイトベースの合成によって産生されるものなどの合成ＤＮＡ）、又はこれらの種類の核酸内のヌクレオチドの組み合わせ若しくは改変からなり得る。加えて、核酸分子は、二本鎖又は一本鎖（例えば、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかを含む）であり得る。

【０１１８】

核酸分子は、ポリペプチド（例えば、抗体）をコードする配列に限定されない。また、コード配列（例えば、キメラ受容体のコード配列）の上流又は下流に位置する非コード配列の一部又は全部を含めることもできる。分子生物学の当業者は、核酸分子を単離するための日常的な手順に精通している。例えば、核酸分子は、ゲノムＤＮＡを制限エンドヌクレアーゼで処理することによって、又はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって生成することができる。核酸分子がリボ核酸（ＲＮＡ）である場合、転写物は、例えば、インビトロ転写によって産生され得る。

【０１１９】

組換え細胞及び細胞培養物

本開示の核酸を、ヒトＴリンパ球などの宿主細胞に導入して、核酸分子を含有する組換え細胞を産生することができる。したがって、本開示のいくつかの実施形態は、組換え細胞を作製するための方法であって、（ａ）タンパク質発現が可能な細胞を提供する工程と、（ｂ）提供された細胞を本明細書に記載される組換え核酸のいずれかと接触させる工程と、を含む、方法に関する。

【０１２０】

本開示の核酸分子の細胞への導入は、ウイルス感染、トランスフェクション、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）媒介トランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、リポソーム媒介トランスフェクション、パーティクルガン技術、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介核酸送達などによって達成することができる。

【０１２１】

したがって、いくつかの実施形態において、核酸分子は、当該分野で公知のウイルス送達ビヒクル又は非ウイルス送達ビヒクルによって細胞に送達される。例えば、核酸分子は

、宿主ゲノム中に安定に組み込まれ得、又はエピソーム的に複製され得、又は安定な若しくは一過性発現のためのミニサークル発現ベクターとして組換え宿主細胞に存在し得る。したがって、本明細書に開示されるいくつかの実施形態において、核酸分子は、エピソーム単位として組換え宿主細胞中で維持及び複製される。いくつかの実施形態において、核酸分子は、組換え細胞のゲノムに安定に組み込まれている。安定な組み込みは、古典的なランダムゲノム組換え技術を使用して、又はガイドＲＮＡ指向性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ゲノム編集、若しくはＮｇＡｇｏ（Ｎａｔｒｏｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｒｅｇｏｒｙｉ Ａｒｇｏｎａｕｔｅ）を使用したＤＮＡガイドエンドヌクレアーゼゲノム編集、若しくはＴＡＬＥＮゲノム編集（転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ）などのより正確なゲノム編集技術を用いて完了することができる。いくつかの実施形態において、核酸分子は、安定な又は一過性発現のためのミニサークル発現ベクターとして組換え宿主細胞に存在する。

【０１２２】

核酸分子は、ウイルスカプシド又は脂質ナノ粒子に封入され得る。例えば、細胞への核酸の導入は、ウイルス形質導入によって達成され得る。非限定的な例において、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、ウイルス形質導入を介して標的細胞に核酸を送達するように操作され得る非エンベロープウイルスである。いくつかのＡＡＶ血清型が記載されており、公知の血清型の全てが、複数の多様な組織型の細胞に感染し得る。ＡＡＶは、毒性を示すことなく、インビボで広範な種及び組織に形質導入することができ、比較的穏やかな自然免疫応答及び適応免疫応答を生じさせる。

【０１２３】

レンチウイルス系もまた、ウイルス形質導入による核酸送達及び遺伝子療法に適している。レンチウイルスベクターは、遺伝子送達ビヒクルとしていくつかの魅力的な特性を提供し、これには以下が含まれる：（ｉ）宿主ゲノムへの安定なベクターの組み込みによる持続的な遺伝子送達、（ｉｉ）分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染する能力、（ｉｉｉ）重要な遺伝子及び細胞療法の標的細胞型を含む広範な組織向性、（ｉｖ）ベクター形質導入後にウイルスタンパク質を発現しないこと、（ｖ）ポリシストロン性配列又はイントロン含有配列などの複雑な遺伝要素を送達する能力、（ｖｉ）潜在的により安全な組み込み部位プロファイル、並びに（ｖｉｉ）ベクター操作及び産生のための比較的容易な系。

【０１２４】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、例えば、本明細書に記載されるキメラ受容体をコードする核酸配列を含むベクター、ウイルス由来発現ベクター又は宿主細胞のゲノムの一部分に相同な核酸配列を更に含む相同組換えのためのベクターのいずれかを用いて、遺伝子操作され得る（例えば、形質導入され得る、形質転換され得る、又はトランスフェクトされ得る）。宿主細胞は、形質転換されていない細胞又は１つ以上の核酸分子ですでにトランスフェクトされている細胞のいずれかであり得る。

【０１２５】

いくつかの実施形態において、組換え細胞は、原核細胞又は真核細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、インビボで形質転換される。いくつかの実施形態において、細胞は、エクスビボで形質転換される。いくつかの実施形態において、細胞は、インビトロで形質転換される。いくつかの実施形態において、組換え細胞は、真核細胞である。いくつかの実施形態において、組換え細胞は、動物細胞である。いくつかの実施形態において、動物細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、動物細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、非ヒト霊長類細胞である。いくつかの実施形態において、哺乳動物細胞は、免疫細胞、ニューロン、上皮細胞、及び内皮細胞、又は幹細胞である。いくつかの実施形態において、組換え細胞は、免疫系細胞、例えば、リンパ球（例えば、Ｔ細胞又はＮＫ細胞）、又は樹状細胞である。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、Ｂ細胞、単球、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好塩基球、好酸球、好中球、樹状細胞、マクロファージ、制御性Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、又は他のＴ細胞である。いくつかの実施形態において、免疫系細胞は、Ｔリンパ

球である。

【０１２６】

いくつかの実施形態において、細胞は、幹細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、造血幹細胞である。細胞のいくつかの実施形態において、細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態において、細胞は、前駆Ｔ細胞又は制御性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、ＣＤ３４＋、ＣＤ８＋、又はＣＤ４＋細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、セントラルメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞、エフェクターメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞、及びバルクＣＤ８＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ８＋Ｔ細胞傷害性リンパ球細胞である。細胞のいくつかの実施形態において、細胞は、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞、セントラルメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞、エフェクターメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞、及びバルクＣＤ４＋Ｔ細胞からなる群から選択されるＣＤ４＋Ｔヘルパーリンパ球細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、ヒト対象から得られた試料に対して行われる白血球アフェレーシスによって得られ得る。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、組換え細胞は、本明細書に開示される第２の核酸分子を更に含み、第１の核酸分子及び第２の核酸分子は、同じ配列を有していない。いくつかの実施形態において、組換え細胞は、本明細書に開示される第２のキメラポリペプチドを更に含み、第１のキメラポリペプチド及び第２のキメラポリペプチドは、同じ配列を有していない。いくつかの実施形態において、第１のキメラポリペプチドは、第２のキメラポリペプチドの発現及び／又は活性を調節する。

【０１２８】

いくつかの実施形態において、組換え細胞は、プロモーターに作動可能に連結された対象のタンパク質をコードする発現カセットを更に含み、対象のタンパク質の発現は、キメラ受容体によってコードされる転写制御因子によって調節される。いくつかの実施形態において、対象のタンパク質は、組換え細胞に対して異種である。原理的に、キメラ受容体によってコードされる転写制御因子による発現の調節を標的とするタンパク質を選択することに関して、特に制限はない。本明細書に開示される組成物及び方法による制御に適したタンパク質の非限定的な例としては、サイトカイン、細胞毒素、ケモカイン、免疫調節物質、アポトーシス促進因子、抗アポトーシス因子、ホルモン、分化因子、脱分化因子、免疫細胞受容体、又はレポーター遺伝子が挙げられる。いくつかの実施形態において、免疫細胞受容体は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）である。ＴＣＲは、概して、ＴＣＲのα－鎖、ＴＣＲのβ－鎖、ＴＣＲのγ－鎖、ＴＣＲのδ－鎖、又はこれらの組み合わせなどの２つのポリペプチド（例えば、ポリペプチド鎖）を含む。このようなＴＣＲのポリペプチド鎖は、当技術分野において公知である。いくつかの実施形態において、免疫細胞受容体は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む。ＣＡＲ設計、Ｔ細胞における送達及び発現、並びに臨床グレードのＣＡＲ－Ｔ細胞集団の製造のための方法は、当該分野において公知である。例えば、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ（２０１２）１８（１０）：２７８０－９０を参照されたい（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態において、対象のタンパク質をコードする発現カセットは、本開示のキメラ受容体をコードする同じ核酸分子に組み込まれている。いくつかの実施形態において、対象のタンパク質をコードする発現カセットは、本開示のキメラ受容体をコードする核酸分子とは別個の第２の発現ベクターに組み込まれている。

【０１２９】

別の態様において、本明細書に開示される少なくとも１つの組換え細胞、及び培養培地を含む、様々な細胞培養物が本明細書で提供される。概して、培養培地は、本明細書に記載される細胞培養に適した培養培地のいずれか１つであり得る。多種多様な上記宿主細胞及び種を形質転換するための技術は、当該分野で公知であり、技術文献及び科学文献に記載されている。したがって、本明細書に開示される少なくとも１つの組換え細胞を含む、細胞培養物もまた、本出願の範囲内である。細胞培養物を生成及び維持するために適切な

方法及び系は、当該分野で公知である。

【０１３０】

医薬組成物

いくつかの実施形態において、本開示の核酸及び組換え細胞は、医薬組成物を含む組成物に組み込むことができる。このような組成物は、概して、核酸、及び／又は組換え細胞、並びに薬学的に許容される賦形剤、例えば、担体を含む。

【０１３１】

注射用途に好適な医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）又は分散液、及び滅菌注射溶液又は分散液の即時調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与の場合、適切な担体としては、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．）、又はリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）が挙げられる。全ての場合において、組成物は無菌である必要があり、シリンジによって投与され得る程度に流動的である必要がある。これは、製造及び貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌及び真菌などの微生物の夾雑作用から保護する必要がある。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、及び界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウムの使用によって、維持することができる。微生物の作用は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどによって防止することができる。多くの場合、概して、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、及び／又は塩化ナトリウムを組成物中に含める。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中に含めることによってもたらすことができる。

【０１３２】

滅菌注射溶液は、必要量の活性化合物を、必要に応じて上記に列挙した成分の１つ又は組み合わせと共に適切な溶媒中に組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。概して、分散液は、塩基性分散媒及び上記に列挙したものからの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製の方法は、真空乾燥及び凍結乾燥であり、活性成分及び任意の更なる所望の成分の粉末が、その予め滅菌濾過された溶液から得られる。

【０１３３】

いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチド及びＳｙｎＲＩＰＲはまた、ＭｃＣａｆｆｒｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ（２００２）４１８：６８９３）、Ｘｉａ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（２００２）２０：１００６－１０）、又はＰｕｔｎａｍ（Ａｍ　Ｊ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｙｓｔ　Ｐｈａｒｍ（１９９６）５３：１５１－６０，ｅｒｒａｔｕｍ　ａｔ　Ａｍ　Ｊ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｙｓｔ　Ｐｈａｒｍ（１９９６）５３：３２５）に記載されている方法を含むが、これらに限定されない当技術分野で公知の方法を使用して、トランスフェクション又は感染によって投与され得る。

【０１３４】

本開示の方法

本明細書に記載される治療用組成物、例えば、核酸、組換え細胞、及び医薬組成物のいずれか１つ以上の投与を使用して、癌及び慢性感染症などの疾患を有する個体を治療することができる。いくつかの実施形態において、核酸、組換え細胞、及び医薬組成物は、チェックポイント阻害に関連する１つ以上の自己免疫障害若しくは疾患を有するか、それを有する疑いがあるか、又はそれを発症するリスクが高い可能性がある個体を治療する方法において使用するための治療用組成物に組み込まれる。例示的な自己免疫障害及び疾患としては、セリアック病、１型糖尿病、グレーブス病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、乾癬

、関節リウマチ、及び全身性エリテマトーデスを挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１３５】

したがって、一態様において、個体における標的細胞の活性を阻害するための方法であって、本明細書で提供される核酸、組換え細胞、及び医薬組成物のうちの１つ以上を含む第１の療法を個体に施す工程を含み、第１の療法が、標的細胞の活性を阻害する、方法が本明細書で提供される。例えば、標的細胞の活性は、その増殖が低減される場合、その病理学的又は病原性挙動が低減される場合、それが破壊又は殺傷される場合などに阻害され得る。阻害は、少なくとも約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、又は約９５％の測定量の低減を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、有効数の本明細書に開示される組換え細胞を個体に投与することを含み、組換え細胞が、個体における標的細胞を阻害する。概して、開示される方法の標的細胞は、例えば、急性骨髄腫白血病細胞、未分化リンパ腫細胞、星状細胞腫細胞、Ｂ細胞癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、上衣腫細胞、食道癌細胞、膠芽腫細胞、グリオーマ細胞、平滑筋肉腫細胞、脂肪肉腫細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、マントル細胞リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、神経芽細胞腫細胞、非小細胞肺癌細胞、乏突起神経膠腫細胞、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、末梢Ｔ細胞リンパ腫細胞、腎癌細胞、肉腫細胞、胃癌細胞、癌細胞、中皮腫細胞、又は肉腫細胞などの任意の細胞であり得る。いくつかの実施形態において、標的細胞は、病原性細胞である。

【０１３６】

別の態様において、疾患の治療を必要とする個体においてそれを行う方法であって、本明細書で提供されるキメラポリペプチド、ＳｙｎＲＩＰＲ、核酸、組換え細胞、又は医薬組成物のうちの１つ以上を含む第１の療法を個体に施す工程を含み、第１の療法が、個体における疾患を治療する、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、有効数の本明細書で提供される組換え細胞を含む第１の療法を個体に施すことを含み、組換え細胞が、疾患を治療する。

【０１３７】

別の態様において、疾患の治療における補助を必要とする個体においてそれを行うための方法であって、本明細書に開示される１つ以上の組換え核酸、組換え細胞、又は医薬組成物を含む第１の療法を個体に施す工程と、第２の療法を個体に施す工程とを含み、第１及び第２の療法が一緒に、個体における疾患を治療する、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、有効数の本明細書に開示される組換え細胞を含む第１の療法を個体に施すことを含み、組換え細胞が、疾患を治療する。

【０１３８】

組換え細胞の個体への投与

いくつかの実施形態において、本方法は、有効量又は有効数の本開示の組換え細胞を、このような方法を必要とする個体に投与することを伴う。この投与工程は、当該分野で公知の任意の移入方法を使用して達成することができる。例えば、本開示の組換え細胞は、静脈内注入によって個体の血流に直接注射され得、又は別様に個体に投与され得る。

【０１３９】

「投与する」、「導入する」及び「移植する」という用語は、本明細書において互換的に使用され、本明細書で提供されるキメラ受容体を発現する組換え細胞を個体に送達する方法を指す。いくつかの実施形態において、本方法は、所望の効果が生じるように、導入された細胞の所望の部位での少なくとも部分的な局在化をもたらす投与の方法又は投与の経路によって、組換え細胞を個体に投与することを含む。組換え細胞又はそれらの分化した子孫は、投与された細胞又は細胞の構成要素の少なくとも一部分が生存したままである個体の所望の位置に送達する、任意の適切な経路によって投与することができる。個体への投与後の細胞の生存期間は、数時間、例えば、２４時間という短いものから、数日、数年、又は更に個体の一生にわたる長期生着までであり得る。

【０１４０】
予防的に提供される場合、いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組換え細胞は、治療されるべき疾患又は状態の任意の症状に先立って個体に投与される。したがって、いくつかの実施形態において、組換え幹細胞集団の予防的投与は、疾患又は状態の症状の発生を予防する。
【０１４１】
いくつかの実施形態において治療的に提供される場合、組換え細胞は、疾患又は状態の症状又は徴候の発症時（又は発症後）に、例えば、疾患又は状態の発症時に提供される。
【０１４２】
本明細書に記載される様々な実施形態において使用するために、本明細書に開示される組換え細胞の有効量は、少なくとも$１０^{２}$細胞、少なくとも５×１０^{２}細胞、少なくとも$１０^{３}$細胞、少なくとも５×１０^{３}細胞、少なくとも$１０^{４}$細胞、少なくとも５×１０^{４}細胞、少なくとも$１０^{５}$細胞、少なくとも２×１０^{５}細胞、少なくとも３×１０^{５}細胞、少なくとも４×１０^{５}細胞、少なくとも５×１０^{５}細胞、少なくとも６×１０^{５}細胞、少なくとも７×１０^{５}細胞、少なくとも８×１０^{５}細胞、少なくとも９×１０^{５}細胞、少なくとも１×１０^{６}細胞、少なくとも２×１０^{６}細胞、少なくとも３×１０^{６}細胞、少なくとも４×１０^{６}細胞、少なくとも５×１０^{６}細胞、少なくとも６×１０^{６}細胞、少なくとも７×１０^{６}細胞、少なくとも８×１０^{６}細胞、少なくとも９×１０^{６}細胞、又はその倍数であり得る。組換え細胞は、１つ以上のドナーに由来し得、又は自己供給源（すなわち、治療されるヒト対象）から得られ得る。いくつかの実施形態において、組換え細胞は、それを必要とする個体に投与する前に、培養において増殖される。
【０１４３】
いくつかの実施形態において、方法又は経路による個体への組換え細胞を含む組成物（すなわち、本明細書で提供されるキメラ受容体のいずれかを発現する複数の組換え細胞を含む組成物）を送達することにより、所望の部位における細胞組成物が少なくとも部分的に局在化する。細胞組成物は、個体において有効な治療をもたらす任意の適切な経路によって投与することができ、例えば、投与は、送達された組成物の少なくとも一部分、例えば、少なくとも１×１０^{４}個の細胞が一定期間、所望の部位に送達される、個体における所望の部位への送達をもたらす。投与様式としては、注射、注入、点滴注入などが挙げられる。「注射」には、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、心室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経皮気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内、及び胸骨内の注射及び注入が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、経路は静脈内である。細胞の送達のために、注射又は注入による投与を行うことができる。
【０１４４】
いくつかの実施形態において、組換え細胞は全身的に投与され、言い換えれば、組換え細胞の集団は、それが代わりに個体の循環系に入り、ひいては代謝及び他の同様のプロセスに供されるように、標的部位、組織、又は器官に直接以外に投与される。
【０１４５】
疾患又は状態の治療のための、組成物による治療の有効性は、熟練した臨床医によって判定することができる。しかしながら、当業者であれば、疾患の徴候又は症状又はマーカーのいずれか１つ又は全てが改善又は寛解される場合、治療が有効な治療であるとみなされることを理解するであろう。有効性は、入院又は医学的介入の必要性により評価された場合、個体が悪化し得ない（例えば、疾患の進行が停止するか、又は少なくとも遅くなる）ことによっても測定できる。これらの兆しを測定する方法は、当業者に知られており、かつ／又は本明細書に記載されている。治療には、個体又は動物（いくつかの非限定的な例としては、ヒト又は哺乳動物が挙げられる）における疾患の任意の治療が含まれ、また、（１）疾患進行を阻害すること、例えば、症状の進行を停止すること若しくは遅らせること；又は（２）疾患を緩和すること、例えば、症状の退縮を引き起こすこと；及び（３）症状の発症を予防すること若しくはその可能性を低減することが含まれる。

【０１４６】
上述のように、治療有効量は、疾患を有するか、それを有する疑いがあるか、又はそのリスクがあるものなどの個体に投与したときに、特定の効果を促進するのに十分な治療用組成物の量を含む。いくつかの実施形態において、有効量は、疾患の症状の発症を予防若しくは遅延させる、疾患の症状の経過を変化させる（例えば、限定されないが、疾患の症状の進行を遅らせる）、又は疾患の症状を逆転させるのに十分な量を含む。任意の所与の場合について、適切な有効量は、日常的な実験を用いて当業者によって判断され得ることが理解される。
【０１４７】
疾患の治療のための開示される治療用組成物を含む治療の有効性は、熟練した臨床医によって判定することができる。しかしながら、疾患の徴候又は症状の少なくともいずれか１つ又は全てが改善又は寛解される場合、治療は有効であるとみなされる。有効性は、入院又は医学的介入の必要性により評価された場合、個体が悪化し得ない（例えば、疾患の進行が停止するか、又は少なくとも遅くなる）ことによっても測定できる。これらの兆しを測定する方法は、当業者に知られており、かつ／又は本明細書に記載されている。治療には、個体又は動物（いくつかの非限定的な例としては、ヒト又は哺乳動物が挙げられる）における疾患の任意の治療が含まれ、また、（１）疾患を阻害すること、例えば、症状の進行を停止すること若しくは遅らせること；（２）疾患を緩和すること、例えば、症状の退縮を引き起こすこと；又は（３）症状の発症を予防すること若しくはその可能性を低減することが含まれる。
【０１４８】
いくつかの実施形態において、個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。いくつかの実施形態において、個体は、細胞表面リガンド又は抗原によって媒介される細胞シグナル伝達の阻害に関連する疾患を有するか、又はそれを有することが疑われる。本開示の組成物及び方法によって治療されるのに適した疾患としては、癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、及び感染性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、疾患は、癌又は慢性感染症である。
【０１４９】
ＣＡＲ設計、Ｔ細胞における送達及び発現、並びに臨床グレードのＣＡＲ－Ｔ細胞集団の製造のための方法は、当該分野で公知である。例えば、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ（２０１２）１８（１０）：２７８０－９０を参照されたい（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。例えば、操作されたＣＡＲは、キメラ抗原受容体をコードする核酸配列を標的細胞ゲノムに効率的かつ安定に組み込むレトロウイルスを使用して、細胞、例えば、Ｔ細胞に導入され得る。例示的な方法を、以下の実施例４及び７に記載する。
【０１５０】
当該分野において公知の他の方法は、レンチウイルス形質導入、トランスポゾンベースの系、直接ＲＮＡトランスフェクション、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系（例えば、適切なＣａｓタンパク質を使用するＩ型、ＩＩ型、又はＩＩＩ型系）を含むが、これらに限定されない。
【０１５１】
いくつかの実施形態において、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターを送達のために使用することができる。送達されるべきポリヌクレオチド、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能を含むパッケージングされるＡＡＶゲノムが細胞に提供される、ｒＡＡＶ粒子を産生するための技術は、当該分野で標準的である。ｒＡＡＶの産生は、以下の成分が単一細胞（本明細書ではパッケージング細胞と称される）内に存在することを必要とする：ｒＡＡＶゲノム、及びヘルパーウイルス機能とは別の（例えば、ｒＡＡＶゲノム内にはない）ｒＡＡＶゲノム、ＡＡＶ ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子。ＡＡＶ ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型由来であり得、ｒＡＡＶゲノムＩＴＲとは異なるＡＡＶ血清型（ＡＡＶ血清型ＡＡＶ－１、ＡＡＶ－

２、ＡＡＶ－３、ＡＡＶ－４、ＡＡＶ－５、ＡＡＶ－６、ＡＡＶ－７、ＡＡＶ－８、ＡＡＶ－９、ＡＡＶ－１０、ＡＡＶ－１１、ＡＡＶ－１２、ＡＡＶ－１３及びＡＡＶ　ｒｈ．７４が挙げられるが、これらに限定されない）由来であり得る。偽型ｒＡＡＶの産生は、例えば、国際公開第０１／８３６９２号に開示されている。

【０１５２】

ＣＡＲ－Ｔ細胞は、例えば自己免疫疾患抗原に応答してエクスビボで増殖されてから、治療有効量で対象に再注入することができる。

【０１５３】

投与されるＣＡＲ　Ｔ細胞の正確な量は、対象の年齢、体重、疾患の程度及び状態の個体差を考慮して、医師によって決定することができる。

【０１５４】

Ｔ細胞療法の投与は、特に小児対象（例えば、患者）について、１注入当たりの総細胞数又は体重１キログラム当たりの細胞数によって規定され得る。Ｔ細胞は移植後に複製及び増殖するので、投与された細胞用量は、最終的な定常状態の細胞数とは異なることがある。いくつかの実施形態において、本開示のＣＡＲ　Ｔ細胞を含む医薬組成物は、10^4～10^{10}個の総細胞の投与量で投与され得る。別の実施形態において、本開示のＣＡＲ　Ｔ細胞を含む医薬組成物は、10^3～10^8個の、これらの範囲内の全ての整数値を含む細胞／ｋｇ体重の投与量で投与され得る。

【０１５５】

本開示のＣＡＲ　Ｔ細胞を含む組成物は、これらの投与量で複数回投与され得る。細胞は、当該分野において公知の注入技術を使用することによって投与することができる（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ，（１９８８）３１９：１６７６を参照されたい）。特定の対象に対する最適な投与量及び治療レジメンは、疾患の徴候について対象をモニタリングし、それに応じて治療を調整することによって、当業者によって決定することができる。

【０１５６】

追加療法

上述のように、本明細書に記載される組換え細胞及び医薬組成物は、例えば、化学療法剤又は抗癌剤又は抗癌療法などの１つ以上の追加の治療薬と組み合わせて投与することができる。１つ以上の追加の治療薬「と組み合わせた」投与には、同時（並行）投与及び任意の順序での連続投与が含まれる。いくつかの実施形態において、１つ以上の追加の治療薬、化学療法剤、抗癌剤又は抗癌療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、及び手術からなる群から選択される。「化学療法」及び「抗癌剤」は、本明細書において互換的に使用される。様々なクラスの抗癌剤を使用することができる。非限定的な例としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ポドフィロトキシン、抗体（例えば、モノクローナル又はポリクローナル抗体）、チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、メシル酸イマチニブ（Ｇｌｅｅｖｅｃ（登録商標）又はＧｌｉｖｅｃ（登録商標））、ホルモン治療、可溶性受容体、及び他の抗悪性腫瘍薬が挙げられる。

【０１５７】

したがって、いくつかの実施形態において、本開示の方法は、単一療法（例えば、単剤療法）として、本明細書に開示される組成物を対象に個別に投与することを含む。いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、第２の療法と組み合わせた第１の療法として対象に投与される。いくつかの実施形態において、第２の療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、及び手術からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第１の療法及び第２の療法は、同時に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法は、第２の療法と同時に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法及び第２の療法は、連続的に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法は、第２の療法の前に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法は、第２の療法の後に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法は、第２の療法の前及

び／又は後に施される。いくつかの実施形態において、第１の療法及び第２の療法は、交代で施される。いくつかの実施形態において、第１の療法及び第２の療法は、単一製剤で一緒に施される。

【０１５８】

細胞の活性を調節するための方法

別の態様において、細胞の活性を調節するための様々な方法が本明細書で提供される。本方法は、（ａ）本開示の組換え細胞を提供することと、（ｂ）組換え細胞を選択されたリガンドと接触させることとを含み、選択されたリガンドの細胞外結合ドメインへの結合が、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位の切断を誘導し、転写制御因子を放出し、放出された転写制御因子が、組換え細胞の活性を調節する。本開示を読んだ当業者は、開示された方法がインビボ、エクスビボ、又はインビトロで行われ得ることを理解するであろう。

【０１５９】

本開示の方法を使用して調節され得る細胞の活性としては、細胞の選択された遺伝子の発現、細胞の増殖、細胞のアポトーシス、細胞の非アポトーシス死、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、細胞の細胞接着、及び細胞の細胞溶解活性が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６０】

いくつかの実施形態において、放出された転写制御因子は、細胞の遺伝子産物の発現を調節する。いくつかの実施形態において、放出された転写制御因子は、細胞における異種遺伝子産物の発現を調節する。異種遺伝子産物は、細胞によって通常産生されないものである。例えば、細胞は、異種遺伝子産物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得る。

【０１６１】

いくつかの実施形態において、異種遺伝子産物は、分泌遺伝子産物である。いくつかの実施形態において、異種遺伝子産物は、細胞表面遺伝子産物である。いくつかの場合において、異種遺伝子産物は、細胞質遺伝子産物である。いくつかの実施形態において、放出された転写制御因子は、細胞における２つ以上の異種遺伝子産物の発現を同時に調節する。

【０１６２】

いくつかの実施形態において、細胞の異種遺伝子産物は、ケモカイン、ケモカイン受容体、キメラ抗原受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、分化因子、成長因子、成長因子受容体、ホルモン、代謝酵素、病原体由来タンパク質、増殖誘導因子、受容体、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ、部位特異的ヌクレアーゼ、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、毒素、毒素由来タンパク質、転写制御因子、転写活性化因子、転写抑制因子、翻訳制御因子、翻訳活性化因子、翻訳抑制因子、活性化免疫受容体、抗体、アポトーシス阻害剤、アポトーシス誘導因子、操作されたＴ細胞受容体、免疫活性化因子、免疫阻害剤、及び阻害免疫受容体からなる群から選択される。

【０１６３】

いくつかの実施形態において、放出された転写制御因子は、細胞の分化を調節し、細胞は、免疫細胞、幹細胞、始原細胞、又は前駆細胞である。

【０１６４】

本開示のキメラ受容体は、同一の結合ドメイン及びＩＣＤを使用する場合、標準的なＳｙｎＮｏｔｃｈ受容体よりも高い程度の発現を提供する。いくつかの実施形態において、リガンド／結合ドメイン対及びそれらの親和性に応じて、本開示のＳｙｎＲＩＰＲは、対応するＳｙｎＮｏｔｃｈ受容体よりも約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、又は約５０％高い発現増強を提供することができる。

【０１６５】

更に、本開示のキメラ受容体は、リガンド結合とは独立して、Ｔ細胞活性化の程度に応

答する転写制御を提供することができる。このため、例えば、キメラ受容体リガンドが存在しないにもかかわらず活性化された場合に、Ｔ細胞応答を増強又は抑制することが望ましい場合に、更に柔軟な使用が可能となる。

【０１６６】

システム及びキット

本明細書で提供され記載されるキメラポリペプチド、ＳｙｎＲＩＰＲ、組換え核酸、組換え細胞、又は医薬組成物、並びにそれらを作製及び使用するための指示書を含む、システム及びキットも本明細書で提供される。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるキメラポリペプチド、本明細書に記載されるＳｙｎＲＩＰＲ、本明細書に記載される組換え核酸、本明細書に記載される組換え細胞、又は本明細書に記載される医薬組成物のうちの１つ以上を含む、システム及び／又はキットが本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、本開示のシステム及び／又はキットは、提供されるキメラポリペプチド、ＳｙｎＲＩＰＲ、組換え核酸、組換え細胞、又は医薬組成物のいずれか１つを、個体に投与するために使用される、１つ以上のシリンジ（プレフィルドシリンジを含む）及び／又はカテーテル（プレフィルドシリンジを含む）を更に含む。いくつかの実施形態において、キットは、所望の目的のために、例えば、それを必要とする個体において、細胞の活性を調節するため、標的癌細胞を阻害するため、又は疾患を治療するために、他のキット構成要素と同時に又は連続的に投与することができる１つ以上の追加の治療薬を有し得る。

【０１６７】

上記のシステム及びキットのいずれも、１つ以上の追加の試薬を更に含むことができ、こ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、陽性対照ポリペプチド、キメラ受容体ポリペプチドのインビトロ産生用試薬から選択することができる。

【０１６８】

いくつかの実施形態において、システム又はキットの構成要素は、別々の容器に入れることができる。いくつかの他の実施形態において、システム又はキットの構成要素は、単一容器内で組み合わせることができる。

【０１６９】

いくつかの実施形態において、システム又はキットは、方法を実施するためにキットの構成要素を使用するための指示書を更に含み得る。本方法を実施するための指示書は、概して、適切な記録媒体に記録されている。例えば、指示書は、紙又はプラスチックなどの基材上に印刷することができる。指示書は、パッケージ挿入物としてキット内に、キット又はその構成要素の容器のラベルに（すなわち、パッケージ又はサブパッケージに付随して）などで存在し得る。指示書は、適切なコンピュータ可読記憶媒体、例えば、ＣＤ－ＲＯＭ、ディスケット、フラッシュドライブなどに存在する電子記憶データファイルとして存在することができる。いくつかの例では、実際の指示書はキット内に存在しないが、リモートソースから（例えば、インターネットを介して）指示書を得るための手段が提供され得る。この実施形態の例は、指示書を見ることができ、及び／又は指示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。指示書と同様に、指示書を得るためのこの手段は、適切な基材上に記録することができる。

【０１７０】

本開示で言及された全ての刊行物及び特許出願は、各々の個々の刊行物又は特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されている場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１７１】

本明細書に引用されたいずれの参考文献も先行技術を構成すると認めるものではない。参考文献の考察は、それらの著者が主張することを述べており、本発明者は、引用された文書の正確さ及び妥当性に異議を申し立てる権利を留保する。本明細書では、科学雑誌論文、特許文書、及び教科書を含むいくつかの情報源が言及されているが、この参考文献は

、これらの文書のいずれかが当技術分野における共通の全般知識の一部を形成することを認めるものではないことが明確に理解されるであろう。

【０１７２】

本明細書に示される全般的な方法の考察は、例示目的のみを意図している。他の代替方法及び代替物は、本開示を検討すれば当業者には明らかであり、本出願の趣旨及び範囲内に含まれるものである。

【実施例】

【０１７３】

本開示の実施では、別段の指示がない限り、当業者に周知である分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、及び免疫学の従来技術を用いる。このような技術は、上記で引用された文献に十分に説明されている。

【０１７４】

更なる実施形態は、以下の実施例において更に詳細に開示され、これらは例示のために提供され、本開示又は特許請求の範囲の範囲を限定することを決して意図するものでない。

【０１７５】

実施例１．

キメラ受容体及び応答エレメント構築物の設計及び構築

本実施例は、非Ｎｏｔｃｈ制御的膜内タンパク質分解受容体（ＳｙｎＲＩＰＲ）受容体のファミリーの設計及び構築を記載する。受容体は、ＣＤ１９　ｓｃＦＶ（Ｐｏｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）を、切断されたＣＤ８α（Ｐ０１７３２）ヒンジ領域（Ｔｈｒ１３８～Ｃｙｓ１６４、配列番号１５８）から構成される細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）及び細胞内膜近傍ドメイン（以下に示すＳＴＳ）、並びに転写制御因子に融合させることによって構築された。これらの実験で使用した転写制御因子ＧＡＬ４－ＶＰ６４は、単純ヘルペスタンパク質ＶＰ１６の最小活性化ドメイン（アミノ酸４３７～４４７）の四量体反復からなる活性化ドメインＶＰ６４に融合した酵母ＧＡＬ４転写因子由来のＤＮＡドメインを含んでいた。

【０１７６】

本開示の様々な例示的な受容体についての詳細な情報は、以下の表１に見出すことができる。

【表１－１】

表１．この表は、本開示のキメラ受容体、それらの対応する構成要素、及び配列表に記載の対応する配列識別子の各々についての簡単な説明を提供する。ＥＣＤ：細胞外ドメイン、Ｎ－ＪＭＤ：Ｎ末端膜近傍ドメイン（すなわち、ヒンジドメイン）、ＴＭＤ：膜貫通ドメイン、ＳＴＳ：移送停止配列、ＴＦ：転写因子。

構築物ID	受容体の説明	ECD	N－JMD	TMD	STS	TF	全配列
pIZ343GIVV	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD_GIVVLLSmut－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 176	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 197
pIZ343GIVVa	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD_GIVVSmut－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 177	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 198
pIZ373	抗CD19scFv－IgG4ヒンジ(NoGSLinker)－Notch1TMD－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 175	配列番号 173	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 199
pIZ377	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－CLSTN2TMD－PTPRFSTS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 2	配列番号 108	配列番号 196	配列番号 200
pIZ378	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－CLSTN2TMD－AGERSTS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 2	配列番号 115	配列番号 196	配列番号 201
pIZ379	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－CLSTN2TMD－KCNE3STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 2	配列番号 146	配列番号 196	配列番号 202
pTMD206	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－APPTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 6	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 203
pTMD206GV	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－APPTMD_GVmut－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 178	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 204
pTMD207	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－BTCTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 7	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 205
pTMD213	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－CX3CL1TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 13	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 206
pTMD214	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－DCCTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 14	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 207
pTMD215	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－DLL1TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 15	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 208
pTMD220	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－EPCAMTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 20	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 209
pTMD225	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－ErbB4TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 25	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 210
pTMD244	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－LRP1TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 44	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 211
pTMD247	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－LRP6TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号 174	配列番号 158	配列番号 47	配列番号 193	配列番号 196	配列番号 212

【表１－２】

（表１の続き）

構築物ID	受容体の説明	ECD	N－JMD	TMD	STS	TF	全配列
pTMD253	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－SCN4BTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号53	配列番号193	配列番号196	配列番号213
pTMD254	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－NECTIN1TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号54	配列番号193	配列番号196	配列番号214
pTMD258	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch2TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号179	配列番号193	配列番号196	配列番号215
pTMD259	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch3TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号180	配列番号193	配列番号196	配列番号216
pTMD260	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch4TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号181	配列番号193	配列番号196	配列番号217
pTMD260GV	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch4TMD_GVmut－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号181	配列番号193	配列番号196	配列番号218
pTMD268	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－PCDHGC3TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号64	配列番号193	配列番号196	配列番号219
pTMD270	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－AGERTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号66	配列番号193	配列番号196	配列番号220
pTMD270GVLVS	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－AGERTMD_GVLVSmut－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号182	配列番号193	配列番号196	配列番号221
pTMD270LL	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－AGERTMD_LLmut－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号183	配列番号193	配列番号196	配列番号222
pTMD272	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－PTPRMTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号68	配列番号193	配列番号196	配列番号223
pTMD273	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－ROBO1TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号69	配列番号193	配列番号196	配列番号224
pTMD273GV	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－ROBO1TMD_GVmut－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号69	配列番号193	配列番号196	配列番号225
pTMD273GVLLS	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－ROBO1TMD_GVLVSmut－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号184	配列番号193	配列番号196	配列番号226
pTMD276	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－SORL1TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号72	配列番号193	配列番号196	配列番号227
pTMD277	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－SORT1TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号73	配列番号193	配列番号196	配列番号228
pTMD278	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－SDC1TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号74	配列番号193	配列番号196	配列番号229
pTMD279	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－SDC2TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号75	配列番号193	配列番号196	配列番号230

【表１－３】

（表１の続き）

構築物ID	受容体の説明	ECD	N－JMD	TMD	STS	TF	全配列
pTMD280	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－SDC3TMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号76	配列番号193	配列番号196	配列番号231
pTMD289	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1__DrerioTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号185	配列番号193	配列番号196	配列番号232
pTMD290	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1__DmelanogasterTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号186	配列番号193	配列番号196	配列番号233
pTMD291	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1__XlaevisTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号187	配列番号193	配列番号196	配列番号234
pTMD292	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1__GgallusTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号188	配列番号193	配列番号196	配列番号235
pTMD295	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1__MmusculusTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号189	配列番号193	配列番号196	配列番号236
pTMD297pre	抗CD19scFv－CD8ヒンジ－CD8aTMD－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号157	配列番号190	配列番号193	配列番号196	配列番号237
pTMD297pre_GV	抗CD19scFv－CD8ヒンジ－CD8aTMD_GV－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号157	配列番号191	配列番号193	配列番号196	配列番号238
pTMD297pre_GVLVS	抗CD19scFv－CD8ヒンジ－CD8aTMD_GVLVSmut－Notch1STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号157	配列番号192	配列番号193	配列番号196	配列番号239
pSTS205	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD－CSF1RSTS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号173	配列番号89	配列番号196	配列番号240
pSTS231	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD－AGERSTS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号173	配列番号115	配列番号196	配列番号241
pSTS262	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD－KCNE3STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号173	配列番号146	配列番号196	配列番号242
pSTS263	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD－CDH2STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号173	配列番号147	配列番号196	配列番号243
pSTS266	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD－BTCSTS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号173	配列番号150	配列番号196	配列番号244
pSTS267	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD－EPHA4STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号173	配列番号151	配列番号196	配列番号245
pSTS268	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD－IL1R2STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号173	配列番号101	配列番号196	配列番号246
pSTS274	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD－Notch3STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号173	配列番号194	配列番号196	配列番号247
pIZ364	抗CD19scFv－CD8ヒンジ2－Notch1TMD－Notch4STS－Gal4VP64	配列番号174	配列番号158	配列番号173	配列番号195	配列番号196	配列番号248

【０１７７】

全ての受容体は、膜標的化のためのＮ末端ＣＤ８αシグナルペプチド（ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰ、配列番号１６２）及びα－ｍｙｃ　ＡＦ６４７（Ｃｅｌｌ－Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ番号２２３３）による表面発現の適切な決定のためのｍｙｃタグ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ、配列番号１６３）を含有する。これらの受容体の構築のために、配列表に提供されるアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片を、示されるタンパク質についてのＤＮＡ配列を含有する合成された遺伝子断片又はプラスミドからＰＣＲ増幅し、標準的なクローニング技術（例えば、オーバーハングＰＣＲ、融合ＰＣＲ、及びＩｎ－ｆｕｓｉｏｎクローニング）を使用して、隣接する翻訳開始配列及び翻訳停止配列と共に、以

下に記載される全ての初代Ｔ細胞実験のために、３－ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターを含有する改変されたｐＨＲ’ＳＩＮ：ＣＳＷベクター（Ｋ．Ｔ．Ｒｏｙｂａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ（２０１６）１６７（２）：４１９－３２）にアセンブルした。

【０１７８】

ｐＨＲ’ＳＩＮ：ＣＳＷベクターもまた、応答エレメントプラスミドを産生するように改変された。この目的のために、ＧＡＬ４　ＤＢＤドメインの結合のための５コピーの標的配列（ＧＧＡＧＣＡＣＴＧＴＣＣＴＣＣＧＡＡＣＧ、配列番号１６４）を最小合成ｐｙｂＴＡＴＡプロモーターの５’側にクローニングした。

【０１７９】

また、応答エレメントプラスミドに含まれるのは、形質導入されたＴ細胞又は単一ベクター実験のためのＳｙｎＲＩＰＲを適切に同定するために蛍光体（ｍＣｉｔｒｉｎｅ又はｍＣｈｅｒｒｙ）の発現をいずれか構成的に駆動するＰＧＫプロモーターである。全ての誘導性キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）ベクターについて、ＣＡＲをＮ末端にＦｌａｇタグでタグ付けし、Ｔ２Ａエレメントを使用してＧＦＰと共誘導した。全ての誘導されたエレメントを、Ｇａｌ４応答エレメントの３’側に位置する多重クローニング中のＢａｍＨＩ部位を介してクローニングした。全ての構築物を、製造業者の指示書に従ってＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）クローニング（Ｔａｋａｒａ番号６３８９５１）を介してクローニングした。

【０１８０】

実施例２

初代ヒトＴ細胞の単離及び培養

本実施例は、その後以下の実施例３に記載される様々な細胞形質導入実験において使用された、初代ヒトＴ細胞の単離及び培養を記載する。

【０１８１】

これらの実験では、初代ＣＤ４＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋Ｔ細胞を、アフェレーシス後の匿名ドナー血液から単離し、ヒトＴ細胞単離キット（ヒトＣＤ４＋濃縮カクテル又はＣＤ８＋濃縮カクテル、ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号１５０６２及び１５０６３）を使用してネガティブ選択によって濃縮した。Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　Ｂｏａｒｄによって承認されたように、Ｂｌｏｏｄ　Ｃｅｎｔｅｒｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｐａｃｉｆｉｃ（Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）から血液を採取した。Ｔ細胞を、２０％ヒトＡＢ血清（Ｖａｌｌｅｙ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｉｎｃ．、番号ＨＰ１０２２）及び１０％ＤＭＳＯを含む増殖培地（ＲＰＭＩ－１６４０、ＵＣＳＦ　細胞培養コア）中で凍結保存した。解凍後、Ｔ細胞を、全ての実験について、３０ユニット／ｍＬのＩＬ－２（ＮＣＩ　ＢＲＢ　Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｒｅｐｏｓｉｔｏｒｙ）を補充した、Ｘ－ＶＩＶＯ（商標）１５（Ｌｏｎｚａ　番号０４－４１８Ｑ）、５％ヒトＡＢ血清及び１０ｍＭ中和Ｎ－アセチルＬ－システイン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　番号Ａ９１６５）を含有するヒトＴ細胞培地中で培養した。

【０１８２】

実施例３

ヒトＴ細胞をレンチウイルスベクターで安定的に形質導入した

本実施例は、ヒトＴ細胞のレンチウイルス形質導入に使用される全般的なプロトコルを記載する。

【０１８３】

概して、水疱性口内炎ウイルスエンベロープＧタンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）で偽型化されたレンチウイルスベクター（汎親和性ベクター）は、Ｌｅｎｔｉ－Ｘ（商標）２９３Ｔ細胞（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　番号１１１３１Ｄ）をｐＨＲ’ＳＩＮ：ＣＳＷ導入遺伝子発現ベクター並びにＭｉｒｕｓ　ＴｒａｎｓＩＴ（登録商標）－Ｌｅｎｔｉ（Ｍｉｒｕｓ、＃ＭＩＲ　６６０６）を使用するウイルスパッケージングプラスミドｐＣＭＶｄＲ８．９１及

びｐＭＤ２．Ｇでトランスフェクションすることによって産生された。概して、初代Ｔ細胞を同日に解凍し、２４時間培養後に、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８抗体が表面に結合したビーズ（Ｈｕｍａｎ　Ｔ－Ａｃｔｉｖａｔｏｒ　ＣＤ３／ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ＃１１１３１Ｄ）を用いて、１：３の細胞：ビーズ比で刺激した。４８時間後、ウイルス上清を回収し、初代Ｔ細胞をウイルスに２４時間曝露した。Ｔ細胞刺激後５日目に、ビーズを除去し、Ｔ細胞を１４日目まで増殖させ、１４日目に休止させてアッセイに使用することができた。Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）ＦＡＣＳＡｒｉａ（商標）ＩＩフローサイトメーターによるアッセイのために、Ｔ細胞を選別した。選別したＴ細胞を、インビボアッセイについては１０日目まで、インビトロアッセイについては１４日目まで増殖させた。

【０１８４】

実施例４

インビトロＳｙｎＲＩＰＲ活性化アッセイ

全てのインビトロＳｙｎＲＩＰＲ活性化アッセイについて、1×10^5個のＴ細胞又はＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を、９６ウェル丸底プレート（ＶＷＲ）中、１：１の比で標的細胞と共培養した。Ｔ細胞を外因的に活性化するために、１００ｎｇ／ｍＬのＰＭＡ（Ｓｉｇｍａ　番号Ｐ１５７５）又はＭＣＡＭ　ＢｉＴＥを共培養物に添加した。共発現されたＡＬＰＰＬ２　ＣＡＲを活性化する場合、ＡＬＰＰＬ２＋Ｋ５６２細胞を、Ｔ細胞と１：１比で共培養物に添加した。ＢＤ　ＦＡＣＳｙｍｐｈｏｎｙ　Ｆｏｒｔｅｓｓａ　Ｘ－５０を使用して、レポーター活性化について示された時点で培養物を分析した。全てのフローサイトメトリー分析は、ＦｌｏｗＪｏソフトウェア（ＢＤ）で行った。

【０１８５】

実施例５

癌細胞株

本実施例は、Ｄａｕｄｉ腫瘍と同等のレベルでＣＤ１９を発現する骨髄性白血病「供与」細胞の生成を記載する。

【０１８６】

使用した癌細胞株は、Ｋ５６２骨髄性白血病細胞（ＡＴＣＣ　番号ＣＣＬ－２４３）及びＤａｕｄｉ　Ｂ細胞リンパ芽球（ＡＴＣＣ　番号ＣＣＬ－２１３）であった。Ｋ５６２細胞をレンチウイルス形質導入して、Ｄａｕｄｉ腫瘍と同等のレベルでヒトＣＤ１９を安定に発現させた。ＣＤ１９レベルは、α－ＣＤ１９　ＡＰＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）番号３０２２１２）で細胞を染色することによって決定した。全ての細胞株は、導入遺伝子の発現について選別された。

【０１８７】

実施例６

スクリーニングのためのレポーターＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞の生成

本実施例は、非Ｎｏｔｃｈ膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）及び／又は移送停止配列（ＳＴＳ）を含有する様々な合成受容体のスクリーニングのために後で使用されるレポーターＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞の生成を記載する。

【０１８８】

これらの実験において、Ｅ６－１　Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞（ＡＴＣＣ　番号ＴＩＢ－１５２）を、以前に記載されたように（Ｋ．Ｔ．Ｒｏｙｂａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１６４：１－１０，２０１６）、誘導性Ｇａｌ４駆動ＢＦＰレポーター遺伝子及び構成的発現ｍＣｉｔｒｉｎｅレポーター遺伝子を有するレポータープラスミドでレンチウイルス形質導入した。レポーター陽性Ｊｕｒｋａｔ細胞を、Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）ＦＡＣＳＡｒｉａ（商標）ＩＩフローサイトメーターを使用してｍＣｉｔｒｉｎｅ陽性発現について選別し、増殖した。

【０１８９】

レンチウイルス粒子を、以前に記載されたように（Ｌ．Ｍｏｒｓｕｔ　ｅｔ　ａｌ．，

Ｃｅｌｌ（２０１６）１６４：７８０－９１）、受容体導入遺伝子発現ベクターを用いて産生した。レポーター陽性Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞の個々の培養物を、改変膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）又は膜近傍ドメイン（ＳＴＳ）を有するｍｙｃタグ付きα－ＣＤ１９ヒトＳｙｎＮｏｔｃｈ１受容体を用いて９６ウェルプレート中でレンチウイルス形質導入した。ウイルス形質導入後、抗ｍｙｃ　ＡＦ６４７（Ｃｅｌｌ－Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　番号２２３３）で染色した後、ＢＤ　ＦＡＣＳｙｍｐｈｏｎｙ　Ｆｏｒｔｅｓｓａ　Ｘ－５０を用いて各Ｊｕｒｋａｔ細胞集団の受容体形質導入効率を測定した。

【０１９０】

実施例７

非Ｎｏｔｃｈ合成制御的膜内タンパク質分解受容体（ＳｙｎＲＩＰＲ）

本実施例は、本明細書に記載される例示的なキメラ非Ｎｏｔｃｈポリペプチドによるインビトロの膜内タンパク質分解の制御を実証するために行われた実験を記載する。

【０１９１】

これらの実験において、参照受容体は、切断されたＣＤ８α細胞外ドメイン（ＥＣＤ）、ヒトＮｏｔｃｈ１の膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）、及びＮｏｔｃｈ１由来のＣ末端膜近傍ドメイン（ＪＭＤ／ＳＴＳ）から構成される最適化されたＣＤ８α　Ｎｏｔｃｈ受容体（ＨｉｎｇｅＮｏｔｃｈ）であった。この抗ＣＤ１９　ＨｉｎｇｅＮｏｔｃｈを発現するＴ細胞は、ＣＤ１９＋Ｋ５６２供与細胞の存在下において応答エレメントを活性化することができた。この活性化は、共発現された抗ＡＬＰＰＬ２　ＣＡＲが活性化され、Ｔ細胞活性化刺激を提供する場合にブーストされた。これらの実験の結果を図１Ａ～１Ｃに概略的に示す。

【０１９２】

全ての受容体が高レベルで発現したが、それ以外の活性型アルカデイン－ガンマ（ＣＳＴＬＮ２）ＴＭＤは、同族であるが不活性なＳＴＳ／ＪＭＤ配列で機能しないことが観察された。特に、Ｎｏｔｃｈ１　ＴＭＤ及びＪＭＤ／ＳＴＳをＣＬＳＴＮ２由来の等価なドメインで置き換えることによって、受容体活性が検出不能であることが観察された。ＣＬＳＴＮ２　ＴＭＤは、前のＴＭＤスクリーニング実験において良好に機能したが（データは示さず）、ＣＬＳＴＮ２　ＪＭＤ／ＳＴＳは、機能しないことが確認された。Ｎｏｔｃｈ１　ＪＭＤを回復させることによって、ＣＬＳＴＮ２　ＴＭＤによる受容体活性が回復することも観察された。

【０１９３】

驚くべきことに、ＣＳＴＬＮ２　ＪＭＤ／ＳＴＳを、ＫＣＮＥ３（ＲＳＲＫＶＤＫＲ、配列番号１４６）又はＰＴＰＲＦ（ＫＲＫＲＴＨ、配列番号１０８）由来のより活性なＪＭＤ／ＳＴＳで置き換えることによって、受容体シグナル伝達が回復することが観察され、例えば、ＣＬＳＴＮ２　ＴＭＤと対になった場合に機能的受容体を産生した。この結果は、元のＣＬＳＴＮ２　ＪＭＤが機能的に制限されていたことを示している。

【０１９４】

要約すると、本実施例に記載の実験結果は、ＣＬＳＴＮ２　ＴＭＤ及びＪＭＤを使用した非Ｎｏｔｃｈ　ＳｙｎＲＩＰＲのアセンブリが不活性受容体をもたらすが、ＣＬＳＴＮ２　ＪＭＤをより高性能のＪＭＤで置き換えた場合に受容体機能が回復したことを実証している。

【０１９５】

上述のように、全ての既存の機能的ＳｙｎＮｏｔｃｈ受容体は、Ｎｏｔｃｈファミリーメンバーに由来する配列を含んでいた。モジュラー受容体アセンブリアプローチの汎用性を実証するために、本実施例に記載される実験は、Ｎｏｔｃｈ配列を完全に欠いた受容体成分に基づいて、基礎からリガンド活性化受容体を操作するように設計された。本明細書に記載される実験結果は、機能的部分のセットから新たな機能的合成制御的膜内タンパク質分解受容体を構築する能力を示し、その結果、受容体アセンブリの合成生物学的アプローチが、Ｎｏｔｃｈ受容体のように機能する受容体を生成することができるが、それらの活性において合理的にカスタマイズされ得ることを例証する。

【０１９６】
実施例８
ＳｙｎＲＩＰＲのモジュール式アセンブリ
本実施例は、合成受容体が、リガンド結合ドメイン、ＥＣＤ、ＴＭＤ、ＪＭＤ、及び転写因子を組み合わせることによってモジュール様式で組み立てる（アセンブルする）ことができることを例示するために実施した実験を記載する。
【０１９７】
これらの実験において、最適化されたＣＤ８αヒンジＥＣＤを、その強固（ロバスト）な発現及びリガンド非依存性シグナル伝達の欠如により、追加の試験のために選択した。以下の実験において、Ｎｏｔｃｈ１　ＪＭＤ（ＳＴＳ）はＴＭＤ選択のために一定に保たれ、他方、Ｎｏｔｃｈ１　ＴＭＤはＪＭＤ（ＳＴＳ）選択のために一定に保たれた。
【０１９８】
ＴＭＤの選択のために、このＣＤ８αヒンジＥＣＤを、抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖ、前のスクリーニングからの様々な高性能ＴＭＤ、Ｎｏｔｃｈ１　ＪＭＤ、及び転写制御因子Ｇａｌ４ＶＰ６４と組み合わせた。これらの受容体を発現するＴ細胞をＣＤ１９＋供与Ｋ５６２細胞と４８時間共インキュベートし、フローサイトメトリーを使用してＢＦＰレポーターの産生を測定した。Ｎｏｔｃｈ１　ＴＭＤ及び２つのＴＭＤミュータントを、それらの低レベルのリガンド非依存性シグナル伝達により選択した。
【０１９９】
ＪＭＤの選択のために、最適化されたＣＤ８αヒンジＥＣＤを、抗ＣＤ１９　ｓｃＦｖ、Ｎｏｔｃｈ１　ＴＭＤ、様々なＪＭＤ、及び転写制御因子Ｇａｌ４ＶＰ６４と対にした。これらの受容体を発現するＴ細胞をＣＤ１９＋供与Ｋ５６２細胞と共インキュベートし、フローサイトメトリーを使用してＢＦＰレポーターの産生を測定した。Ｎｏｔｃｈ１、ＮＲＧ１、及びＮｏｔｃｈ２　ＪＭＤは、シグナル調整を可能にするそれらの可変出力産生レベルにより選択された。
【０２００】
これらの実験では、高性能の「ＳｙｎＲＩＰＲ→ＢＦＰ発現」回路を発現するＴ細胞を、供与細胞と４８時間共インキュベートした。フローサイトメトリーを使用し、ＢＦＰ出力を測定した。これらの実験の結果を図２に概略的に示す。
【０２０１】
要約すると、本明細書に記載される実験は、更なる試験のためにＥＣＤ、ＴＭＤ、及びＪＭＤを選択することによって、臨床翻訳に適した合成制御的膜内タンパク質分解受容体足場を設計し、組み立てることができることを示す。例示的な設計基準には、基底Ｔ細胞条件下及び活性化Ｔ細胞条件下の両方での強固な発現、高いリガンド依存性活性化、及び低いリガンド非依存性活性化が含まれた。１つの例示的なワークフローにおいて、最初に、その強い発現及びリガンドに対する選択的な応答性により、最適化されたＣＤ８α－ヒンジＥＣＤを選択し、高性能のＴＭＤ及びＪＭＤの選択を用いてそれをスクリーニングすることができた。ＳｙｎＲＩＰＲのアセンブリは、総受容体機能に対する各成分のおおよその相加的効果を示唆するので、最適化検索は、一定したＮｏｔｃｈ１相補的成分を有するＴＭＤ及びＪＭＤを通してスクリーニングすることによって簡略化され得る。実験からその強固な活性化とクラス最高レベルのリガンド非依存性シグナル伝達、更に調整可能性のためにミュータントがすぐに利用できることから、Ｎｏｔｃｈ１のＴＭＤを維持すると判断された。このＥＣＤ－ＴＭＤの組み合わせをＪＭＤのパネルに対してスクリーニングし、様々な活性化レベルを有するＳＮＩＰＲ（合成膜内タンパク質分解受容体）のセットを選択した。ＳｙｎＲＩＰＲ発現レベルはＴＭＤとＪＭＤとの間で変化するが、これらの差異は受容体活性化と完全に相関するものではないことが観察され、これはＪＭＤのより多面的な機能を示すと思われる。
【０２０２】
本開示の特定の代替案が開示されているが、様々な修正及び組み合わせが可能であり、添付の特許請求の範囲の正確な趣旨及び範囲内で企図されることを理解されたい。したが

って、本明細書に示される厳密な要約書及び開示に限定する意図はない。

参考文献

David L. Porter, M. D., Bruce L. Levine, Ph. D., Michael Kalos, Ph. D., Adam Bagg, M. D., and Carl H. June, M. D. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. N. Engl J Med. (2011) Aug 25; 365 (8) : 725-33。

Gordon WR et al., The molecular logic of Notch signaling-a structural and biochemical perspective. J. Cell Sci. (2008) 121 : 3109-19。

Gordon WR et al., Mechanical Allostery : Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. Dev Cell (2015) 33 : 729-36。

Haapasalo A1, Kovacs DM. The many substrates of presenilin/γ-secretase. J Alzheimers Dis. (2011) ; 25 (1) : 3-28。

Rosmalen M., Krom M., and Merkx M. Tuning the Flexibility of Glycine-Serine Linkers To Allow Rational. Biochemistry (2017) 56 : 6565-6574。

Morsut L, Roybal KT, Xiong X, Gordley RM, Coyle SM, Thomson M, and Lim WA. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. Cell. (2016) February 11; 164 (4) : 780-91。

Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. BioDrugs. (2017) ; 31 (4) : 317-34。

Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes. Cytotechnology. (2014) ; 66 (6) : 1031-38。

Roybal KT, Jasper Z. Williams, Leonardo Morsut, Levi J. Rupp, Isabel Kolinko, Joseph H. Choe, Whitney J. Walker, Krista A. McNally, and Wendell A. Lim. Engineering T cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors. Cell. (2016) Oct 6; 167 (2) : 419-32。

Samulski and Muzyczka. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. Annu. Rev. Virol. (2014) 1 : 427。

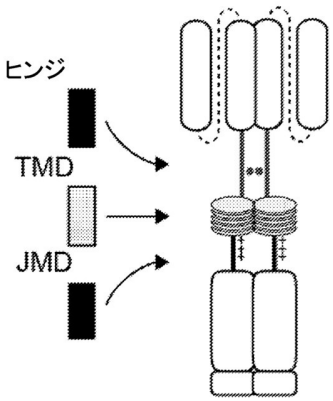
Sakuma, et al. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. Biochem. J. 443 : 603。

Watson D. J., Wolfe J. H. Viral vectors for

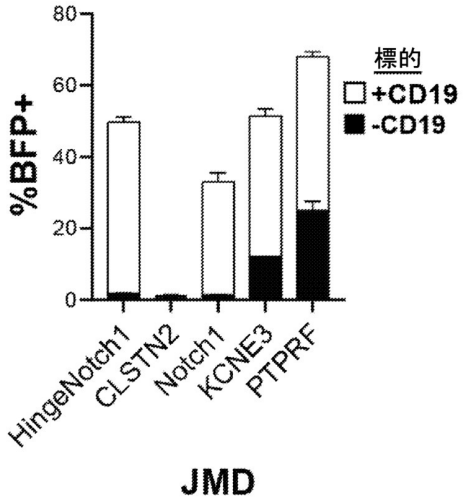
gene therapy：methods and protocols. Totowa, NJ, USA：Humana Press；(2003). pp. 383－404。
Vidarsson G. et al., IgG subclasses and allotypes：from structure to effector functions. Frontiers Immunol. (2014) Oct 20；5：520。
Zhang et al., The γ－secretase complex：from structure to function. Frontiers in Cellular Neuroscience. (2014) December 8：427。

【図面】

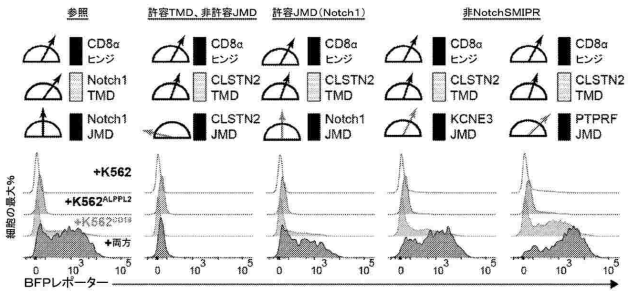
【図１Ａ】



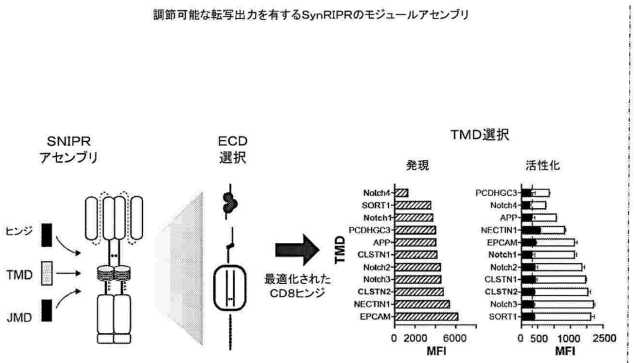
【図１Ｂ】



【図１Ｃ】

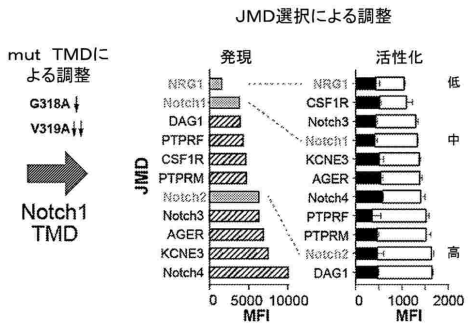


【図２－１】



【図２－２】

調節可能な転写出力を有するSynRIPRのモジュールアセンブリ



（続き）

【配列表】

<u>20245125730000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/21352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C07K 14/705; C07K 16/00; C07K 19/00 (2022.01)
CPC - C07K 14/705; C07K 14/4705; C07K 2317/565; C07K 2319/03; C07K 2319/50; C07K 2319/715

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2019/0202918 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 4 July 2019 (04.07.2019) para [0006], [0213], [0258], claims 1-3.	1-3
Y	SEKI et al. Human ROBO1 is cleaved by metalloproteinases and gamma-secretase and migrates to the nucleus in cancer cells. FEBS Lett. 2 July 2010 Vol 584 No 13 Pages 2909-2915. Especially abstract, pg 2910 fig 1, pg 2912 fig 2B, pg 2914 fig 5.	1-3
Y	US 2002/0199218 A1 (GORING et al.) 26 December 2002 (26.12.2002) para [0237].	2, 3/2
A	US 2018/0346543 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 6 December 2018 (06.12.2018) claim 1.	1

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 June 2022	JUN 29 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/21352

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/21352

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 4-81
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K	*16/30 (2006.01)*	C07K	16/30		4C087
C07K	*16/28 (2006.01)*	C07K	16/28		4H045
C07K	*16/18 (2006.01)*	C07K	16/18		
C12N	*15/62 (2006.01)*	C12N	15/62	Z	
C12N	*15/861 (2006.01)*	C12N	15/861	Z	
C12N	*15/864 (2006.01)*	C12N	15/864	100Z	
C12N	*15/867 (2006.01)*	C12N	15/867	Z	
C12N	*15/86 (2006.01)*	C12N	15/86	Z	
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
A61K	*9/51 (2006.01)*	A61K	9/51		
A61K	*35/76 (2015.01)*	A61K	35/76		
A61K	*48/00 (2006.01)*	A61K	48/00		
A61K	*45/00 (2006.01)*	A61K	45/00		
A61P	*35/00 (2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*43/00 (2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61K	*35/17 (2015.01)*	A61K	35/17		
A61K	*35/15 (2015.01)*	A61K	35/15		
A61K	*35/12 (2015.01)*	A61K	35/12		
A61K	*35/36 (2015.01)*	A61K	35/36		
A61K	*35/761 (2015.01)*	A61K	35/761		
A61K	*31/7088 (2006.01)*	A61K	31/7088		
A61K	*39/395 (2006.01)*	A61K	39/395	E	
		A61K	39/395	D	

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

弁理士　渡辺 陽一

(74)代理人　100141977

弁理士　中島 勝

(74)代理人　100138210

弁理士　池田 達則

(74)代理人　100196977

弁理士　上原 路子

(72)発明者　コール ティー．ロイバル

アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４１４３，サンフランシスコ，シックスティーンス ストリート ６００，スイート エス２７２，シー／オー ユニバーシティ オブ カリフォルニア サンフランシスコ

(72)発明者　アイオウィス チュー

アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４１４３，サンフランシスコ，シックスティーンス ストリート ６００，スイート エス２７２，シー／オー ユニバーシティ オブ カリフォルニア サンフランシスコ

(72)発明者　レイモンド リウ

アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４１４３，サンフランシスコ，シックスティーンス ストリート ６００，スイート エス２７２，シー／オー ユニバーシティ オブ カリフォルニア サンフランシスコ

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C076　AA65 BB13 CC27 EE56 FF31

4C084　AA13 AA19 MA02 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB261 ZB262 ZC751

Fターム（参考） 4C085 AA13 AA16 BB31 BB41 BB43 CC22 DD62 EE01 EE03 GG02
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA05 NA13 NA14 ZB26 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB33 BB34 BB43 BB62 BB65 BC83 MA02 NA05 NA13 NA14 ZB26 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74