

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7456638号
(P7456638)

(45)発行日 令和6年3月27日(2024.3.27)

(24)登録日 令和6年3月18日(2024.3.18)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10 Z N A
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28
請求項の数 38 (全116頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-507503(P2021-507503)	(73)特許権者	521000758
(86)(22)出願日	令和1年8月14日(2019.8.14)		ソティオ, リミティド ライアビリティ
(65)公表番号	特表2021-534740(P2021-534740		カンパニー
	A)		アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0
(43)公表日	令和3年12月16日(2021.12.16)		2 1 1 4, ボストン, カナル ストリート
(86)国際出願番号	PCT/US2019/046550		1 8 0, スイート 3 0 0
(87)国際公開番号	WO2020/037066	(74)代理人	100099759
(87)国際公開日	令和2年2月20日(2020.2.20)		弁理士 青木 篤
審査請求日	令和4年8月12日(2022.8.12)	(74)代理人	100123582
(31)優先権主張番号	62/718,579		弁理士 三橋 真二
(32)優先日	平成30年8月14日(2018.8.14)	(74)代理人	100117019
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 渡辺 陽一
	米国(US)	(74)代理人	100141977
(31)優先権主張番号	62/718,491		弁理士 中島 勝
(32)優先日	平成30年8月14日(2018.8.14)	(74)代理人	100150810
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 クレブス回路を調節するトランス代謝分子と組み合わせたキメラ抗原受容体ポリペプチド、及び、それらの治療的使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子操作した造血細胞であって、同じタイプのネイティブ造血細胞と比較して、調節を施したクレブス回路を有する、前記造血細胞であって、以下：

(i) グルタミン酸 - オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (G O T) であるクレブス回路調節ポリペプチド；および

(i i) キメラ受容体ポリペプチドであって、以下：

(a) 細胞外標的結合ドメイン；

(b) 膜貫通ドメイン；及び、

(c) 細胞質シグナル伝達ドメイン、

を含む、キメラ受容体ポリペプチド

を発現する、または、過剰に発現する；

前記 G O T が、外来核酸によってコードされる、遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 2】

前記 G O T が、 G O T 1 または G O T 2 である、請求項 1 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 3】

前記クレブス回路調節ポリペプチドが、 G O T 2 である、請求項 1 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞であって、前記キメラ受容体ポリペプチドが、

(1) (a) が細胞外 F c 結合ドメインである、抗体結合 T 細胞受容体 (A C T R) ポリペプチド ; または

(2) (a) が細胞外抗原結合ドメインである、キメラ受容体抗原 (C A R) ポリペプチド

である、遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞であって、前記キメラ受容体ポリペプチドが、以下の特徴 :

(i) 少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む ;

(i i) 共刺激シグナル伝達ドメインを含まない ; および

(i i i) 前記細胞質シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシンをベースとした活性化モチーフ (I T A M) を含む

の 1 つ以上を含む C A R ポリペプチドである、遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 6】

前記 C A R ポリペプチドが、(a) の C 末端と、(b) の N 末端に位置するヒンジドメインをさらに含む ; 及び / または、前記キメラ受容体ポリペプチドが、その N 末端に、シグナルペプチドをさらに含む、請求項 5 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 7】

前記キメラ受容体ポリペプチドが、C A R ポリペプチドであり、(a) の前記細胞外標的結合ドメインが、抗原結合ドメインであり、かつ、前記抗原結合ドメインが、腫瘍抗原、病原性抗原、または、自己抗原に特異的な免疫細胞に結合する一本鎖抗体フラグメント (s c F v) である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 8】

前記抗原結合ドメインが、血液腫瘍または固形腫瘍と関連している前記腫瘍抗原に結合する、請求項 7 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 9】

前記血液腫瘍と関連している前記腫瘍抗原を、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、カップパ鎖、C D 3 0、C D 1 2 3、C D 3 3、L e Y、C D 1 3 8、C D 5、B C M A、C D 7、C D 4 0、及び、I L - 1 R A P からなる群から選択する ; または

前記固形腫瘍と関連している前記腫瘍抗原を、G D 2、G P C 3、F O L R、H E R 2、E p h A 2、E F G R V I I I、I L 1 3 R A 2、V E G F R 2、R O R 1、N K G 2 D、E p C A M、C E A、メソテリン、M U C 1、C L D N 1 8 . 2、C D 1 7 1、C D 1 3 3、P S C A、c M E T、E G F R、P S M A、F A P、C D 7 0、M U C 1 6、L 1 - C A M、及び、C A I X からなる群から選択する、

請求項 8 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 1 0】

前記膜貫通ドメインを、C D 8、C D 8、4 - 1 B B、C D 2 8、C D 3 4、C D 4、F c R I、C D 1 6 A、O X 4 0、C D 3、C D 3、C D 3、C D 3、T C R、C D 3 2、C D 6 4、V E G F R 2、F A S、及び、F G F R 2 B からなる群から選択する膜タンパク質のものである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 1 1】

前記 C A R ポリペプチドが、4 - 1 B B、C D 2 8、C D 2 8_{LL} G G バリエント、O X 4 0、I C O S、C D 2 7、G I T R、I C O S、H V E M、T I M 1、L F A 1、及び、C D 2 からなる群から選択する共刺激分子のものである前記少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む、請求項 5 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 1 2】

前記 C A R ポリペプチドが、2 つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む、請求項 5 ~ 9

10

20

30

40

50

および 11 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 13】

前記共刺激シグナル伝達ドメインの内の一方が、CD28 共刺激シグナル伝達ドメインであり；及び、他方の共刺激シグナル伝達ドメインを、4-1BB 共刺激シグナル伝達ドメイン、OX40 共刺激シグナル伝達ドメイン、CD27 共刺激シグナル伝達ドメイン、及び、ICOS 共刺激シグナル伝達ドメインからなる群から選択する；または

前記 2 つの共刺激シグナル伝達ドメインが、(i) 4-1BB、及び、CD28；または、(ii) 4-1BB、及び、CD28_{LL} GG バリエーションである、請求項 12 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 14】

前記(c)の細胞質シグナル伝達ドメインが、CD3 またはFcR1 の細胞質ドメインである、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 15】

前記CARポリペプチドは、(i) CD28 膜貫通ドメイン、CD28 ヒンジドメイン、または、これらの組み合わせと組み合わせたCD28 共刺激ドメイン、または、(ii) CD8 膜貫通ドメイン、CD8 ヒンジドメイン、または、これらの組み合わせと組み合わせた4-1BB 共刺激ドメインを含む、請求項 5 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 16】

前記CARポリペプチドが、配列番号 104 または 105 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 17】

前記造血細胞が、造血幹細胞、または、免疫細胞である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 18】

前記造血細胞が、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、または、T細胞である免疫細胞である、請求項 17 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 19】

前記免疫細胞が、内在性T細胞受容体、内在性主要組織適合遺伝子複合体、内在性ベータ2-ミクログロブリン、または、これらの組み合わせの発現を、阻害または制限したT細胞である、請求項 18 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 20】

前記造血細胞は、核酸または核酸セットを含み、それらは、以下の両方：
(A) 前記クレブス回路調節ポリペプチドをコードする第1のヌクレオチド配列；及び、
(B) 前記キメラ受容体ポリペプチドをコードする第2のヌクレオチド配列、を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 21】

前記造血細胞が、前記第1のヌクレオチド配列と、前記第2のヌクレオチド配列の両方を含む前記核酸を含む、請求項 20 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 22】

前記核酸は、前記第1のヌクレオチド配列と、前記第2のヌクレオチド配列との間に位置する第3のヌクレオチド配列をさらに含み、前記第3のヌクレオチド配列が、リボソームスキッピング部位、配列内リボソーム進入部位(IRES)、または、第2のプロモーターをコードする、請求項 21 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 23】

第3のヌクレオチド配列は、P2Aペプチドであるリボソームスキッピング部位をコードする、請求項 22 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

【請求項 24】

前記核酸、または、前記核酸セットが、ウイルスベクターである、ベクター、または、ベクターのセットの内部に含まれる、請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞と、医薬として許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項 26】

対象において標的抗原を発現する標的細胞を阻害することにおける使用のための遺伝子操作した造血細胞を含む医薬組成物であって、

前記遺伝子操作した造血細胞が、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作した造血細胞を含み；

前記遺伝子操作した造血細胞が、標的抗原に特異的な細胞外抗原結合ドメインを含む C A R ポリペプチドを発現し；及び

前記標的抗原が、腫瘍抗原、病原性抗原、または、自己抗原に特異的な免疫細胞である、前記医薬組成物。

【請求項 27】

前記標的抗原を発現する前記細胞の内の少なくとも一部が、低グルコース環境に置かれている、請求項 26 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 28】

前記遺伝子操作した造血細胞が、自家である、請求項 26 または 27 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 29】

前記遺伝子操作した造血細胞を、エキスビボで活性化している、増殖している、または、その両方を行っている、請求項 28 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 30】

前記対象が、がんを患うヒト患者であり、かつ、前記標的抗原が、腫瘍抗原である、請求項 26 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 31】

前記がんを、B 細胞由来のがん、乳癌、胃癌、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺癌、皮膚癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、白血病、中皮腫、脾臓癌、頭頸部癌、網膜芽細胞腫、神経膠腫、膠芽細胞腫、肝臓癌、及び、甲状腺癌からなる群から選択する、請求項 30 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 32】

前記 B 細胞由来のがんを、B 細胞系急性リンパ芽球性白血病、B 細胞性慢性リンパ性白血病、及び、B 細胞性非ホジキンリンパ腫からなる群から選択する、請求項 31 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 33】

以下の両方：

(A) 請求項 1 または 4 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のキメラ受容体ポリペプチドをコードする第 1 のヌクレオチド配列；及び、

(B) 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のクレブス回路調節ポリペプチドをコードする第 2 のヌクレオチド配列、

を含む、核酸または核酸セットであって、

前記コードされたキメラ受容体ポリペプチドおよびクレブス回路調節ポリペプチドが発現される造血細胞集団に導入される、前記核酸または前記核酸セット。

【請求項 34】

前記核酸または前記核酸セットが、RNA 分子、または、RNA 分子のセットである、請求項 33 に記載の核酸または核酸セット。

【請求項 35】

前記核酸が、前記第 1 のヌクレオチド配列と前記第 2 のヌクレオチド配列の両方を含み、かつ、前記核酸が、前記第 1 のヌクレオチド配列と前記第 2 のヌクレオチド配列との間に位置する第 3 のヌクレオチド配列をさらに含み、前記第 3 のヌクレオチド配列は、リボソームスキッピング部位、配列内リボソーム進入部位 (IRES)、または、第 2 のプロ

10

20

30

40

50

モーターをコードする、請求項 33 または 34 に記載の核酸または核酸セット。

【請求項 36】

前記リボソームスキッピング部位が、P2A ペプチドである、請求項 35 に記載の核酸または核酸セット。

【請求項 37】

前記核酸または前記核酸セットが、ベクター、または、ベクターのセットの内部に含まれる、請求項 33 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の核酸または核酸セット。

【請求項 38】

前記ベクター、または、ベクターのセットが、1 つ以上のウイルスベクターを含む、請求項 37 に記載の核酸または核酸セット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018 年 8 月 14 日に提出した米国仮出願第 62 / 718 , 491 号、及び、2018 年 8 月 14 日に提出した米国仮出願第 62 / 718 , 579 号の出願日の利益を主張する。先行出願のそれぞれの全内容を、参照により、本明細書の一部を構成するものとして援用する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍細胞を攻撃しつつ正常組織を温存する免疫応答を誘発するために、細胞をベースとした治療法などの免疫療法が用いられている。がん免疫療法は、薬剤耐性の遺伝子と細胞メカニズムを回避して、腫瘍細胞を標的としつつ正常組織を温存するその潜在能力ゆえに、様々なタイプのがんを治療するための有望な選択肢となっている。

【0003】

細胞をベースとした治療法は、がん細胞に偏った反応を示す細胞傷害性 T 細胞を含み得る。Eshhar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993; 90 (2): 720 - 724; Geiger et al., J Immunol. 1999; 162 (10): 5931 - 5939; Brentjens et al., Nat. Med. 2003; 9 (3): 279 - 286; Cooper et al., Blood. 2003; 101 (4): 1637 - 1644; 及び Imai et al., Leukemia. 2004; 18: 676 - 684。ある手法は、1 つ以上の T 細胞活性化シグナル伝達ドメインに融合した抗原結合ドメインを有するキメラ受容体を発現させることである。抗原結合ドメインを介してがん抗原が結合すると、T 細胞が活性化して、細胞傷害を誘発する。キメラ受容体を発現する自己 T リンパ球を注入する最近の臨床試験での結果は、それらの臨床的可能性について、説得力のある証拠を示した。Pule et al., Nat. Med. 2008; 14 (11): 1264 - 1270; Porter et al., N Engl J Med; 2011; 25; 365 (8): 725 - 733; Brentjens et al., Blood. 2011; 118 (18): 4817 - 4828; Till et al., Blood. 2012; 119 (17): 3940 - 3950; Kochenderfer et al., Blood. 2012; 119 (12): 2709 - 2720; 及び Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013; 5 (177): 177ra138。

【0004】

別の手法は、造血細胞（例えば、造血幹細胞や、NK 細胞または T 細胞などの免疫細胞）において、抗体結合 T 細胞受容体 (ACTR) タンパク質を発現させることであり、ACTR タンパク質は、細胞外 Fc 結合ドメインを有む。ACTR 発現造血細胞（例えば、ACTR 発現 T 細胞、別名、「ACTR T 細胞」）を、抗がん抗体と一緒に、対象に対して投与すると、それらは、抗体の Fc ドメインとがん細胞との結合によって、抗体が標的とするがん細胞に対する毒性を増強し得る。Kudo et al., Cancer R

10

20

30

40

50

research (2014) 74:93-103。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

細胞をベースとした免疫療法は、有望であるとはいえ、悪性腫瘍細胞と非形質転換細胞との間の相互作用によって生じた細胞環境である腫瘍内微小環境（TME）の特定の特性が引き起こす課題に直面している。それ故に、TMEの見地から、細胞をベースとした免疫療法の効果を向上させるための戦略を開発することが極めて重要である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示は、細胞をベースとした免疫療法での使用のためのものであり、免疫細胞などの造血細胞でのクレブス回路の調節を改善させる戦略の開発に基づいており、免疫細胞として、抗体結合T細胞受容体（ACTR）ポリペプチド、または、キメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチドなどのキメラ受容体ポリペプチドを発現するものがある。クレブス回路の調節は、造血細胞（例えば、造血幹細胞（HSC）、または、T細胞もしくはナチュラルキラー細胞などの免疫細胞）において、1つ以上のクレブス回路調節ポリペプチド、例えば、本明細書に記載したポリペプチドを発現（例えば、過剰発現）させて、達成し得る。そのような遺伝子操作した免疫細胞は、例えば、低グルコース環境、低アミノ酸環境、低pH環境、及び/または、低酸素環境（例えば、腫瘍内微小環境）において、調節した（例えば、改善した）クレブス回路反応を有するものと考えられる。そのような遺伝子操作した免疫細胞は、調節したエピジェネティック状態（例えば、アセチル化状態）、及び/または、調節したレベルの免疫抑制代謝産物（例えば、キヌレニン）をも有し得る。それ故に、1つ以上のクレブス回路調節ポリペプチドとキメラ受容体ポリペプチドを共発現するHSCや免疫細胞などの造血細胞は、（例えば、任意に、治療抗体の存在下で、低グルコース、低アミノ酸、低pH、及び/または、低酸素条件などの腫瘍内微小環境下で）優れた生理活性、例えば、細胞増殖性、活性化（例えば、サイトカイン生産、例えば、IL-2、または、IFNの生産の増大）、細胞傷害性、及び/または、インビボ抗腫瘍活性を示す。

【0007】

したがって、本明細書では、特に、例えば、低グルコース、低アミノ酸、低pH、及び/または、低酸素条件で、同じタイプのネイティブ免疫細胞に関して調節したクレブス回路を有する、改変した（例えば、遺伝子改変した）造血細胞（例えば、造血幹細胞や、T細胞またはナチュラルキラー細胞などの免疫細胞）を提供する。改変した免疫細胞は、クレブス回路調節ポリペプチドを発現し得る、または、過剰に発現し得る。

【0008】

一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチドを、クレブス回路の反応を触媒する酵素とし得る。例として、IDH1またはIDH2などのイソクエン酸デヒドロゲナーゼ（IDH）、MDH1またはMDH2などのリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）、または、ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ（PHGDH）があるが、これらに限定されない。その他の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチドは、クレブス回路代謝産物を基質として使用する酵素である。例として、GOT1またはGOT2などのグルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）（別名、アスパラギン酸トランスアミナーゼ、または、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）、または、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ1（PCK1）があるが、これらに限定されない。なおその他の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチドは、前駆体を、クレブス回路代謝産物に変換する酵素である。例として、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ（PSAT1）、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH1）、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ1（GPT1）、または、グルタミナーゼ（GLS）があるが、これらに限定されない。

【0009】

10

20

30

40

50

改変免疫細胞は、キメラ受容体ポリペプチドをさらに発現し得るものであり、キメラ受容体ポリペプチドは、(a)細胞外標的結合ドメイン；(b)膜貫通ドメイン；及び、(c)細胞質シグナル伝達ドメイン（例えば、免疫受容体チロシンをベースとした活性化モチーフ（ITAM）を含む細胞質ドメイン）を含み得る。一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドは、細胞外Fc結合ドメイン(a)を含む抗体結合T細胞受容体(ACTR)である。その他の実施形態では、キメラ受容体は、細胞外抗原結合ドメイン(a)を含むキメラ抗原受容体(CAR)である。一部の事例では、(c)は、キメラ受容体ポリペプチドのC末端に位置している。一部の事例では、キメラポリペプチドは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含み得る。その他の事例では、キメラ受容体ポリペプチドは、共刺激シグナル伝達ドメインを含み得ない。

10

【0010】

本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチド（例えば、ACTRポリペプチド、または、CARポリペプチド）のいずれかは、(a)のC末端であり、かつ、(b)のN末端である位置にあるヒンジドメインをさらに含み得る。その他の事例では、キメラ受容体ポリペプチドは、あらゆるヒンジドメインを含み得ない。なおも別の事例では、キメラ受容体ポリペプチド、例えば、ACTRポリペプチドは、非CD16A受容体に由来するヒンジドメインを含み得ない。あるいは、または、加えて、キメラ受容体ポリペプチドは、そのN末端に、シグナルペプチドをさらに含む。

【0011】

一部の実施形態では、本明細書で開示したキメラ受容体ポリペプチドは、Fc結合ドメイン(a)を含むACTRポリペプチドとし得る。一部の事例では、(a)のFc結合ドメインは、Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメイン、例えば、Fcガンマ受容体、Fcアルファ受容体、または、Fcイプシロン受容体の細胞外リガンド結合ドメインとすることができる。特定の事例では、Fc結合ドメインは、CD16A（例えば、F158CD16A、または、V158CD16A）、CD32A、または、CD64Aの細胞外リガンド結合ドメインである。その他の事例では、(a)のFc結合ドメインは、免疫グロブリンのFc部分に結合する抗体フラグメントとすることができる。例えば、抗体フラグメントは、一本鎖可変フラグメント(ScFv)、単ドメイン抗体、（例えばナノボディ）とすることができる。加えて、(a)のFc結合ドメインは、免疫グロブリンのFc部分、または、そのFc結合フラグメントに結合する天然タンパク質とすることができる。例えば、Fc結合ドメインは、プロテインAもしくはプロテインG、または、そのFc結合フラグメントとすることができる。さらなる事例では、(a)のFc結合ドメインは、免疫グロブリンのFc部分に結合する合成ポリペプチドとすることができる。例として、Kunitzペプチド、SMIP、アビマー、アフィボディ、DARPin、または、アンチカリンがあるが、これらに限定されない。

20

30

【0012】

一部の実施形態では、本明細書で開示したキメラ受容体ポリペプチドは、細胞外抗原結合ドメイン(a)を含むCARポリペプチドとすることができる。一部の事例では、(a)の細胞外抗原結合ドメインは、腫瘍抗原、病原性抗原、または、自己抗原に特異的な免疫細胞に結合する一本鎖抗体フラグメントである。特定の事例では、腫瘍抗原は、血液腫瘍と関連している。例として、CD19、CD20、CD22、カッパ鎖、CD30、CD123、CD33、LeY、CD138、CD5、BCMA、CD7、CD40、及び、IL-1RAPがあるが、これらに限定されない。特定の事例では、腫瘍抗原は、固形腫瘍と関連している。例として、GD2、GPC3、FOLR（例えば、FOLR1、または、FOLR2）、HER2、EphA2、EFGFRII、IL13RA2、VEGFR2、ROR1、NKG2D、EpCAM、CEA、メソテリン、MUC1、CLDN18.2、CD171、CD133、PSCA、cMET、EGFR、PSMA、FAP、CD70、MUC16、L1-CAM、B7H3、及び、CAIXがあるが、これらに限定されない。特定の事例では、病原性抗原は、細菌抗原、ウイルス抗原、または、真菌抗原、例えば、本明細書に記載したものである。

40

50

【0013】

一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチド（例えば、ACTR、または、CARポリペプチド）のいずれかにおける（b）の膜貫通ドメインは、1回貫通型膜タンパク質、例えば、CD8、CD8、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16A、OX40、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、及び、FGFR2Bのものとすることができる。あるいは、（b）の膜貫通ドメインを、非天然疎水性タンパク質セグメントとすることができる。

【0014】

一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチド（例えば、ACTR、または、CARポリペプチド）の少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインは、適応可能であれば、4-1BB、CD28、CD28_{LL} GGバリエーション、OX40、ICOS、CD27、GITR、ICOS、HVEM、TIM1、LFA1、及び、CD2とすることができる共刺激分子のものとすることができる。一部の事例では、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28共刺激シグナル伝達ドメイン、または、4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインである。一部の事例では、ACTRポリペプチドは、2つの共刺激シグナル伝達ドメインを含み得る。一部の事例では、共刺激シグナル伝達ドメインの内的一方は、CD28共刺激シグナル伝達ドメインであり；他方の共刺激ドメインは、4-1BB共刺激シグナル伝達ドメイン、OX40共刺激シグナル伝達ドメイン、CD27共刺激シグナル伝達ドメイン、または、ICOS共刺激シグナル伝達ドメインとすることができる。具体例として、CD28、及び、4-1BB；または、CD28_{LL} GGバリエーション、及び、4-1BBがあるが、これらに限定されない。あるいは、いずれのキメラ受容体ポリペプチドも、共刺激シグナル伝達ドメインを含み得ない。

【0015】

一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチド（例えば、ACTR、または、CARポリペプチド）のいずれかでの（c）の細胞質シグナル伝達ドメインを、CD3またはFcR1の細胞質ドメインとすることができる。

【0016】

一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラポリペプチド（例えば、ACTR、または、CARポリペプチド）のいずれかでのヒンジドメインは、適応可能であれば、CD28、CD16A、CD8、または、IgGのものとするすることができる。その他の事例では、ヒンジドメインは、非天然ペプチドである。例えば、非天然ペプチドを、延長型組換えポリペプチド（XTEN）または（Gly₄Ser）_nポリペプチドとすることができる。式中、nは、3～12であり、3と12の整数を含む。一部の事例では、ヒンジドメインは、最大60アミノ酸残基を含有し得る短いセグメントである。

【0017】

特定の事例では、本明細書に記載したACTRポリペプチドは、（i）CD28共刺激ドメイン；及び、（ii）CD28膜貫通ドメイン、CD28ヒンジドメイン、または、これらの組み合わせを含み得る。例えば、ACTRポリペプチドは、表3に示す構成要素（a）～（e）を含む。特定の事例では、ACTRポリペプチドは、配列番号1～80から選択するアミノ酸配列を含む。

【0018】

特定の事例では、本明細書に記載したCARポリペプチドは、（i）CD28共刺激ドメイン、または、4-1BB共刺激ドメイン、及び、（ii）CD28膜貫通ドメイン、CD28ヒンジドメイン、または、これらの組み合わせを含み得る。さらなる特定の事例では、本明細書に記載したCARポリペプチドは、（i）CD28共刺激ドメイン、または、4-1BB共刺激ドメイン、（ii）CD8膜貫通ドメイン、CD8ヒンジドメイン、または、これらの組み合わせを含み得る。例えば、CARポリペプチドは、配列番号104及び105から選択するアミノ酸配列を含み得る。

【0019】

10

20

30

40

50

クレブス回路調節ポリペプチド、及び、任意にキメラ受容体ポリペプチドを発現する本明細書に記載した造血細胞を、造血幹細胞、または、その子孫とし得る。一部の実施形態では、造血細胞は、ナチュラルキラー細胞、単球/マクロファージ、好中球、好酸球、または、T細胞などの免疫細胞とし得る。免疫細胞を、末梢血単核球(PBMC)、造血幹細胞(HSC)、または、人工多能性幹細胞(iPSC)に由来したものとすることができ、一部の事例では、免疫細胞は、内在性T細胞受容体、内在性主要組織適合遺伝子複合体、内在性ベータ2-ミクログロブリン、または、これらの組み合わせの発現を、阻害または制限しているT細胞である。

【0020】

本明細書に記載した造血細胞(例えば、HSC、または、免疫細胞)のいずれかは、集合的に:(a)クレブス回路調節ポリペプチドをコードする第1のヌクレオチド配列;及び、任意の(b)キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドをコードする第2のヌクレオチド配列を含む、核酸または核酸セットを含み得る。核酸または核酸セットは、RNA分子、または、RNA分子のセットである。一部の事例では、免疫細胞は、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列の両方を含んだ核酸を含む。一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチドのコード配列は、CARポリペプチドのコード配列の上流にある。一部の実施形態では、CARポリペプチドのコード配列は、クレブス回路調節ポリペプチドのコード配列の上流にある。このような核酸は、第1のヌクレオチド配列と、第2のヌクレオチド配列との間に位置する第3のヌクレオチド配列をさらに含み得るものであり、第3のヌクレオチド配列は、リボソームスキッピング部位(例えば、P2Aペプチド)、配列内リボソーム進入部位(IRES)、または、第2のプロモーターをコードする。

【0021】

一部の事例では、核酸または核酸セットは、発現ベクター、または、発現ベクターのセット(例えば、レンチウイルスベクター、または、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクター)とすることができるベクター、または、ベクターのセットの内部にある。核酸セット、または、ベクターセットとは、関係のあるポリペプチド(すなわち、クレブス回路調節ポリペプチドとCARポリペプチド)の内の1つをそれぞれがコードする、2つ以上の核酸分子の群、または、2つ以上のベクターの群のことを意味する。また、本明細書に記載したいずれの核酸も、本開示の範囲内である。

【0022】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載した免疫細胞のいずれかと、医薬として許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

【0023】

さらに、本明細書では、対象における標的抗原を発現する細胞を阻害する(例えば、そのような細胞の個数を抑制する、細胞増殖を阻害する、及び/または、細胞の活性を抑制する)方法を提供しており、この方法は、クレブス回路調節ポリペプチドとCARポリペプチドを共発現し得る、本明細書に記載した免疫細胞の集団を、それを必要とする対象に対して投与することを含む。対象(例えば、がんを患っているヒト患者などのヒト患者)は、抗がん療法(例えば、抗がん剤)を受けたことがあり得る、または、受け得る。一部の事例では、標的抗原を発現する細胞の少なくとも一部は、低グルコース環境、低アミノ酸(例えば、低グルタミン)環境、低pH環境、及び/または、低酸素環境、例えば、腫瘍内微小環境に置かれている。

【0024】

一部の事例では、免疫細胞は、自家である。その他の事例では、免疫細胞は、同種異系である。本明細書に記載した方法のいずれかにおいて、免疫細胞は、エキスピボで、活性化する、増殖する、または、その両方を実施することができる。一部の事例では、免疫細胞は、抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2、フィトヘマグルチニン、及び、改変人工刺激細胞または粒子の内の1つ以上の存在下で活性化するT細胞を含む。その他の事例では、免疫細胞は、4-1BBリガンド、抗4-1BB抗体、IL-15、抗IL-15

受容体抗体、IL-2、IL-12、IL-21、及び、K562細胞、改変人工刺激細胞または粒子の内の1つ以上の存在下で活性化するナチュラルキラー細胞を含む。

【0025】

一部の事例では、本明細書に記載した方法で治療する対象を、がん、例えば、癌腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、及び、白血病を患うヒト患者とし得る。さらなる例示的な標的がんとして、B細胞由来のがん、乳癌、胃癌、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺癌、皮膚癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、白血病、中皮腫、脾臓癌、頭頸部癌、網膜芽細胞腫、神経膠腫、膠芽細胞腫、肝臓癌、及び、甲状腺癌があるが、これらに限定されない。例示的なB細胞由来のがんは、B細胞系急性リンパ芽球性白血病、B細胞性慢性リンパ性白血病、及び、B細胞性非ホジキンリンパ腫からなる群から選択する。

10

【0026】

がんまたは感染性障害などの標的疾患または障害の治療を目的とした、クレブス回路調節ポリペプチドとCARポリペプチドを共発現する本明細書に記載した遺伝子操作した免疫細胞の使用、ならびに、目的とする医学的治療のための医薬品を製造するためのその使用も、本開示の範囲内である。

【0027】

本開示の1つ以上の実施形態の詳細を以下に説明する。本開示のその他の特徴または利点は、幾つかの実施形態の詳細な記載から、そして、添付した特許請求の範囲からも、明らかになるであろう。

【0028】

以下の図面は、本明細書の一部を構成するものであり、かつ、本開示の特定の態様をさらに実証するために含めたものであり、本明細書で提供した特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせ、これら図面の内の1つ以上を参照することで、それら態様の理解を深めることができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】GPC3を発現するJHH7またはHe p3B標的細胞と、様々な濃度のグルコースの存在下で、GPC3を標的とするCAR（配列番号104）、または、「模倣物」非形質導入T細胞を発現するT細胞の増殖を示す図である。CAR-T細胞の増殖は、グルコース濃度の関数として変化する。

30

【図2】A及びBは、GPC3が発現するJHH7標的細胞の存在下で、GPC3を標的とするCAR（配列番号104）を発現するT細胞、または、GPC3を標的とするCARとGOT1（配列番号87）を共発現するT細胞の増殖を示す図である。A：1.25 mMグルコース。B：10 mMグルコース。CAR-Tだけを発現する細胞と比較して、GOT1を共発現するCAR-T細胞では、1.25 mMと10 mMの両方のグルコースでの増殖が旺盛である。

【図3】A及びBは、GPC3が発現するJHH7標的細胞の存在下で、GPC3を標的とするCAR（配列番号104）を発現するT細胞、または、GPC3を標的とするCARとGOT2（配列番号88）を共発現するT細胞の増殖を示す図である。A：1.25 mMグルコース。B：10 mMグルコース。CAR-Tだけを発現する細胞と比較して、GOT2を共発現するCAR-T細胞では、1.25 mMと10 mMの両方のグルコースでの増殖が旺盛である。

40

【図4】GPC3を標的とするCARを発現するT細胞と、GPC3を標的とするCAR（配列番号104）とGOT2（配列番号88）を共発現するT細胞のJHH7異種移植片腫瘍阻害活性を示すチャートである。

【図5】GPC3を標的とするCARを発現するT細胞と、GPC3を標的とするCAR（配列番号104）とGOT2（配列番号88）を共発現するT細胞のNCI-H446異種移植片腫瘍阻害活性を示すチャートである。

【図6】GPC3を標的とするCARを発現するT細胞と、GPC3を標的とするCAR（配列番号104）とGOT2（配列番号88）を共発現するT細胞のHe p3B異種移

50

植片腫瘍阻害活性を示すチャートである。

【図 7】GPC3 を標的とする CAR を発現する T 細胞と、GPC3 を標的とする CAR (配列番号 104) と GOT2 (配列番号 88) を共発現する T 細胞で処理をした Hep3B 異種移植腫瘍を担持するマウス由来の T 細胞の末梢血液計数を示すチャートである。

【図 8】A 及び B は、抗 GPC3 CAR と GOT2 を共発現する T 細胞でのタンパク質発現、及び、アミノトランスフェラーゼ活性を示す。A : CAR だけを発現する T 細胞と比較して、抗 GPC3 CAR (配列番号 104) と GOT2 (配列番号 88) を共発現する T 細胞での GOT2 の発現の高まりを実証するウエスタンブロット。T 細胞を、Hep3B GPC3 発現腫瘍細胞で、4 日間、活性化した。プロットを、ローディングコントロールのために、それぞれ、抗ヒト GOT2 抗体、または、抗ヒト GAPDH で染色した。B : 抗 GPC3 CAR と GOT2 を共発現する T 細胞は、CAR だけを発現する T 細胞と比較して、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 酵素活性の高まりを示す。T 細胞を、Hep3B GPC3 発現腫瘍細胞で、8 日間、活性化し、そして、市販の Aspartate Aminotransferase Activity Assay (Abcam) を使用して、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ酵素活性を測定した。

【図 9】A 及び B は、GOT2 (配列番号 88) と、抗 GPC3 CAR (配列番号 104) または ACTR (配列番号 1) を共発現する T 細胞が、CAR または ACTR だけを発現する T 細胞と比較して、旺盛な増殖を示す図である。A : CAR T 細胞は、Hep3B GPC3 発現腫瘍細胞で、6 日間、活性化した。CD3+ T 細胞の細胞分裂の尺度として細胞内セルトレースバイオレット希釈を使用するフローサイトメトリーで、増殖を評価した。; B : ACTR T 細胞を、HepG2 GPC3 発現腫瘍細胞と、抗 GPC3 抗体 (GC33、1 µg/ml) で、3 日間、活性化した。CD3+ T 細胞のフローサイトメトリー細胞数で、増殖を評価した。結果は、親構築物と比較して、GOT2 共発現構築物について表している。

【図 10】A ~ C は、GOT2 (配列番号 88) と、抗 GPC3 CAR (配列番号 104) または ACTR (配列番号 1、及び、配列番号 57) を共発現する T 細胞が、CAR または ACTR だけを発現する T 細胞と比較して、IL-17A の生産が増えている、ことを示す図である。A : GPC3 - CAR (配列番号 104)。B : ACTR (配列番号 1)。C : ACTR (配列番号 57)。T 細胞を、GPC3 を発現する HepG2 細胞で、24 時間、活性化し、ACTR 共培養物に抗 GPC3 抗体を添加して、MSD アッセイを使用して、上清での IL-17A を測定した。CAR または ACTR だけを発現する T 細胞と比較して、IL-17A の生産の改善が、構築物のタイプ (CAR、または、ACTR) と、一次共刺激ドメイン (4-1BB、または、CD28) とは無関係に、GOT2 を共発現する構築物で認められた。

【図 11】A ~ C は、GOT2 (配列番号 88) と、抗 GPC3 CAR (配列番号 104) または ACTR (配列番号 1、及び、配列番号 57) を共発現する T 細胞が、CAR または ACTR だけを発現する T 細胞と比較して、CD4+ 多機能性が促された、ことを示す図である。A : GPC3 - CAR (配列番号 104)。B : ACTR (配列番号 1)。C : ACTR (配列番号 57)。ACTR 共培養物に抗 GPC3 抗体を添加して、タンパク質輸送阻害剤 Brefeldin A と Monensin との存在下で、T 細胞を、37 °C、5% CO₂ で、6 時間、GPC3 を発現する HepG2 細胞と一緒にインキュベートした。細胞を固定し、そして、IFN-γ、IL-2、TNF-α、及び、IL-17A に関する細胞内染色を、フローサイトメトリーで評価した。キメラ受容体タイプ (CAR、または、ACTR)、及び、一次共刺激ドメイン (4-1BB、または、CD28) に関係なく、CAR または ACTR だけを発現する細胞と比較して、GOT2 と、ACTR または CAR を共発現する T 細胞では、1 つ、2 つ、または、3 つ超のサイトカインを同時に生産する CD4+ T 細胞の頻度が大きいことが認められた。

【図 12】A ~ C は、GOT2 (配列番号 88) と、抗 GPC3 CAR (配列番号 104) または ACTR (配列番号 1、及び、配列番号 57) を共発現する T 細胞では、CA

10

20

30

40

50

RまたはACTRだけを発現するT細胞と比較して、分化があまり進んでいないナイーブ様のCD8⁺ T細胞の集団が多い。A:GPC3-CAR(配列番号104)。B:ACTR(配列番号1)。C:ACTR(配列番号57)。11名の健康なドナーから得たCAR(配列番号104)T細胞、及び、2名の健康なドナーから得たACTR T細胞(4-1BB一次共刺激ドメイン、配列番号1;CD28一次共刺激ドメイン、配列番号57)を、表面マーカーのパネルを染色し、そして、フローサイトメトリーで、ナイーブ様表現型マーカーを分析した。細胞を、CD8⁺/CAR⁺(CAR)、または、CD8⁺/CD16⁺(ACTR⁺)で分別した。マーカーCD27、CD45RO、及び、CD62Lに関してはポジティブに染色し、かつ、CD45RAに関してはネガティブに染色する、これらの集団のサブセットは、キメラ受容体タイプ(CAR、または、ACTR)及び、一次共刺激ドメイン(4-1BB、または、CD28)に関係なく、CARまたはACTRだけを発現する細胞と比較して、GOT2と、ACTRまたはCARを共発現するT細胞に富んでいた。

10

【図13】GOT2(配列番号88)と抗GPC3 CAR(配列番号104)を共発現するT細胞が、CARだけを発現するT細胞と比較して、分化の進んでいない(若い)CD8⁺ T細胞表現型を実証した、ことを示す図である。11名の健康なドナーから得たCAR T細胞を、表面マーカーのパネルに関して染色を行い、そして、フローサイトメトリーで分析した。細胞を、CD8⁺/CAR⁺で分別した。染色をしたCD27+CD45RO⁺、CD27+RO⁻、CD27+CD45RA⁺、または、CD27+CD45RA⁻集団は、分化の度が小さな表現型を示す。これらのサブセットは、CARだけを発現するT細胞と比較して、GOT2を共発現するCAR T細胞に富んでいた。

20

【図14】GOT2(配列番号88)と抗GPC3 CAR(配列番号104)を共発現するT細胞が、長時間抗原刺激と、低酸素の下で、CARだけを発現するT細胞と比較して、増殖面で有利であることを実証した、ことを示す図である。CAR T細胞を、Hep3B GPC3を発現する腫瘍細胞で、3日間、活性化し;次いで、低酸素の追加ストレスの有無に関する長時間抗原刺激の腫瘍内微小環境ストレスを模倣するために、正常酸素(20%酸素)、または、低酸素(1.5%)条件下で、3日間、新鮮な標的細胞で再刺激した。次いで、細胞分裂の尺度として、細胞内セルトレースバイオレット希釈を使用して、CD3⁺ T細胞のフローサイトメトリーで増殖を評価し、そして、平均蛍光の逆数をプロットした。

30

【図15】GOT2(配列番号88)と抗GPC3 CAR(配列番号104)を共発現するT細胞が、制限グルコース下で、CARだけを発現するT細胞と比較して、増殖面で有利であることを実証した、ことを示す図である。CAR T細胞を、10mMまたは1.25mMのグルコースの存在下で、7日間、HepG2 GPC3発現腫瘍細胞で活性化した。次いで、細胞分裂の尺度として、細胞内セルトレースバイオレット希釈を使用して、CD3⁺ T細胞のフローサイトメトリーで増殖を評価し、そして、平均蛍光の逆数をプロットした。次いで、細胞分裂の尺度として、細胞内セルトレースバイオレット希釈を使用するフローサイトメトリーで増殖を評価し、そして、平均蛍光の逆数を、プロットした。GOT2を発現するCARは、両方のグルコース条件下で、増殖面で有利であった。

40

【図16】GOT2(配列番号88)とACTR(配列番号57)を共発現するT細胞が、ACTRだけを発現するT細胞と比較して、T細胞阻害剤キヌレニンの存在下で、増殖が旺盛であることを実証した、ことを示す図である。

【図17】A~Cは、GOT2(配列番号88)と抗GPC3 CAR(配列番号104)を共発現するT細胞が、CARだけを発現するT細胞と比較して、腫瘍での活性化が高まったことを実証した、ことを示す図である。A:CD69。B:CD25。C:ICOS。CARとGOT2を共発現するT細胞は、CARだけを発現するT細胞と比較して、活性化マーカーの発現の高まりを示した。

【図18】A及びBは、GOT2(配列番号88)と抗GPC3 CAR(配列番号104)を共発現するT細胞が、CARだけを発現するT細胞と比較して、腫瘍における消耗に対する耐性が大きくなったことを実証した、ことを示す図である。A:CD4⁺ T細胞

50

サブセット。B：CD8+T細胞サブセット。

【図19】A～Dは、GOT2を共発現するCARが、GPC3を発現する腫瘍での消耗に対して抵抗を示すことを表した図である；CARの活性化は、腫瘍対抗原ネガティブ脾臓に特異的である。A：6日目、CD4+T細胞サブセット。B：6日目、CD8+T細胞サブセット。C：13日目、CD4+T細胞サブセット。D：13日目、CD8+T細胞サブセット。

【図20】A及びBは、GOT2（配列番号88）と抗GPC3 CAR（配列番号104）を共発現するT細胞が、CARだけを発現するT細胞と比較して、インビボで腫瘍に対して曝露した後に認められる有意な機能を実証した、ことを示す図である。A：IL-17A。B：IFN。

10

【発明を実施するための形態】

【0030】

腫瘍内微小環境は、低グルコース、低アミノ酸、低pH、及び/または、低酸素条件などの特定の特性を有しており、それらの一部は、エフェクターT細胞などのエフェクター免疫細胞の活性を制限し得る。本開示は、少なくとも一部は、エフェクター免疫細胞でクレブス回路反応を調節する（例えば、高める）ことで、腫瘍内微小環境におけるエフェクター免疫細胞活性を高めるための様々な手法の開発に基づいており、それにより、それらの増殖性、及び、生物活性が高まる。クレブス回路は、クレブス回路酵素（例えば、天然酵素、または、その機能的同等物）の発現レベル、そのような酵素の活性化状態、クレブス回路代謝産物を基質として使用する酵素の発現レベル、及び/または、前駆体をクレブス回路代謝産物に変換する酵素の発現レベルや活性などの様々な要素によって調節することができる。

20

【0031】

本明細書に開示した研究は、予想外にも、GOT1またはGOT2などのクレブス回路調節ポリペプチドと、T細胞などの免疫細胞におけるCAR（例えば、4-1BB共刺激ドメインを有するもの）またはACTR（例えば、4-1BB、または、CD28共刺激ドメインを有するもの）の共発現は、CARまたはACTRだけを発現する免疫細胞と比較して、インビトロ及びインビボの両方で優れた特徴を示した。例えば、GOT1またはGOT2と、CARまたはACTRの共発現は、特に、固形腫瘍内微小環境条件下（例えば、低酸素、低グルコース条件、及び、TME阻害剤の存在）で、T細胞の増殖/増加、及び、T細胞機能強化を招いた。例えば、GOT2の共発現は、抑制性受容体（例えば、PD1）の長期発現の耐性に寄与し、そして、腫瘍内微小環境でT細胞機能を維持した。さらに、GOT1またはGOT2と、CARまたはACTRとの共発現は、抗腫瘍効果を高めた。

30

【0032】

したがって、本開示は、クレブス回路調節活性が高い改変した（例えば、遺伝子操作した）造血細胞（例えば、HSC、または、免疫細胞）を提供する。免疫細胞でのクレブス回路の改変は、あらゆる適切な手法によって達成することができる。例えば、改変した免疫細胞は、1つ以上のクレブス回路調節因子を発現し得るものであり、この調節因子は、クレブス回路に直接的に関与する因子（例えば、クレブス回路の1つ以上の反応を触媒する酵素）、または、クレブス回路酵素の発現レベル、活性、及び/または、分解の1つ以上に影響を及ぼすことで、クレブス回路を間接的に調節する因子のいずれかである、あらゆるタイプの分子とすることができる。一部の実施形態では、クレブス回路調節因子を、本明細書に記載したようなクレブス回路調節ポリペプチドとすることができ、このポリペプチドは、それらのネイティブ対応物と比較して、発現する免疫細胞において、クレブス回路調節を強化する。その他の実施形態では、クレブス回路調節因子は、クレブス回路の1つ以上の反応を触媒する1つ以上の酵素の発現を調節する核酸（例えば、マイクロRNAや、siRNAまたはshRNAなどの干渉RNA、または、アンチセンス核酸）とすることができる。さらなる実施形態では、クレブス回路調節因子は、1つ以上のクレブス回路酵素の発現を調節する転写因子とし得る。

40

50

【 0 0 3 3 】

そのような遺伝子操作した免疫細胞は、キメラ受容体ポリペプチド、例えば、抗体結合 T 細胞受容体 (A C T R) ポリペプチド、または、キメラ抗原受容体 (C A R) ポリペプチドをさらに発現し得る。また、本明細書では、対象 (例えば、ヒトがん患者) の免疫細胞の増殖を改善する、及び/または、例えば、A D C C を介して、標的細胞 (例えば、標的がん細胞) を阻害または抑制するために、任意に (例えば、免疫細胞が、A C T R ポリペプチドを発現する場合は) F c 含有剤を併用して、遺伝子操作した免疫細胞を使用することも提供する。また、本開示は、記載した遺伝子操作した免疫細胞を含む、医薬組成物及びキットも提供する。

【 0 0 3 4 】

クレブス回路調節ポリペプチドを発現 (例えば、過剰発現) する本明細書に記載した遺伝子操作した免疫細胞は、少なくとも、以下の点で有利となり得る。クレブス回路調節ポリペプチドの発現は、T 細胞の代謝活性を高める。それ故に、遺伝子操作した免疫細胞は、クレブス回路調節ポリペプチドを発現 (または、過剰発現) しない免疫細胞と比較して、腫瘍内微小環境 (例えば、低グルコース、低アミノ酸、低 pH、及び/または、低酸素環境において、良好な増殖性を示し、サイトカインの生産性に優れており、優れた抗腫瘍細胞傷害を示し、免疫抑制代謝産物が少なく、及び/または、T 細胞生存率が高く、ひいては、サイトカインの生産性、生存率、細胞傷害性、及び/または、抗腫瘍活性を改善し得る。

【 0 0 3 5 】

I. クレブス回路調節ポリペプチド

本明細書で使用するクレブス回路調節ポリペプチドは、グルコース、アミノ酸、及び/または、脂肪酸を処理するための代謝経路などの様々な代謝経路と繋がっているクレブス回路を調節する、あらゆるポリペプチドのことを指す。クレブス回路、別名、クエン酸回路、及び、トリカルボン酸 (T C A) 回路は、解糖系で生成したアセチル C o A をオキサロ酢酸に付加してクエン酸を形成する、ことから始まる代謝経路である。そのようなポリペプチドは、クレブス回路での 1 つ以上の可逆的酵素反応を、そこから生成する代謝産物を調節するために、その他の方向に対して、一方の方向が有利になるように調節し得る。ある代謝源からクレブス回路への供給が増え、別の経路の上流代謝産物に対して方向転換を迫り得る。例えば、クレブス回路調節ポリペプチドは、アラニンを、解糖経路に向けて方向転換させ、例えば、P S A T 1 を介して、T C A、及び/または、セリン合成経路のための - ケト - グルタル酸 (K G) を増やして、ミトコンドリア、及び/または、細胞質における T C A 回路を促す; グルコースを、T C A 回路から外して、P S A T 1 または P S P H を介して、セリンを生成し得る。

【 0 0 3 6 】

加えて、クレブス回路調節ポリペプチドは、ミトコンドリア、及び/または、細胞質におけるクレブス回路活性を高め得る。クレブス回路調節ポリペプチドは、乳酸などの阻害性代謝産物をピルビン酸に変換して、クレブス回路活性も高め得る。そのようなあらゆるクレブス回路調節ポリペプチドは、あらゆる適切な種 (例えば、ヒトなどの哺乳動物) のものとし得るものであり、本明細書に記載した組成物及び方法での使用を企図し得る。

【 0 0 3 7 】

あるいは、クレブス回路代謝産物ポリペプチドは、活性化したクレブス回路調節ポリペプチド (例えば、リン酸化模倣物) を模倣するように変異した分子とし得る、または、変異をして、クレブス回路の活性を調節するように、その細胞内輸送 (例えば、ミトコンドリアへの輸送) に影響を及ぼし得る。あるいは、内因性クレブス回路ポリペプチドについては、例えば、転写因子またはマイクロ RNA を発現して、または、ポリペプチドの安定性または分解を調節して、例えば、ポリペプチドの分解を媒介する因子、例えば、ユビキチン/プロテアソーム経路の一部である E 3 リガーゼを調節して、内因性クレブス回路ポリペプチドの発現を調節し得る。加えて、内因性クレブス回路ポリペプチドについては、例えば、所望の細胞内区画、例えば、ミトコンドリアへの輸送を増やすポリペプチドを発

10

20

30

40

50

現することで、内因性クレブス回路ポリペプチドの輸送を調節し得る。さらに、クレブス回路調節ポリペプチドについては、腫瘍内微小環境に高レベルで認められており、かつ、免疫細胞の活性を阻害または制限する基質を、もはや阻害効果を有さない分子へと酵素的に変換して、免疫細胞機能を改善するポリペプチドとし得る。

【 0 0 3 8 】

クレブス回路調節ポリペプチドは、クレブス回路における反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド、例えば、クレブス回路反応を触媒する天然酵素、または、同じクレブス回路反応を触媒するその機能的変異体 / 相同体とし得る。例として、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (I D H 、 I D H 1 または I D H 2 など) 、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (M D H 、 M D H 1 または M D H 2 など) 、または、ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (P H G D H) があるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 3 9 】

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (I D H) とは、イソクエン酸の酸化的脱炭酸を触媒して、 α -ケトグルタル酸と CO_2 を生成する、あらゆるポリペプチド (酵素) のことを指す。リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (M D H) とは、 NAD^+ から NADH への還元を使用して、リンゴ酸からオキサロ酢酸への酸化を触媒する、あらゆるポリペプチド (酵素) のことを指す。ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (P H G D H) とは、 NAD^+ から NADH への還元を使用して、3 - ホスホ - D - グリセリン酸を、3 - ホスホノオキシビルビン酸に変換し、そして、2 - ヒドロジグルタル酸を、2 - オキサグルタル酸に変換する反応を触媒する、あらゆるポリペプチド (酵素) のことを指す。例示的な I D H 、 M D H 、 及び、P H G D H のアミノ酸配列を、以下に示す：

20

【 0 0 4 0 】

I D H 1 (配列番号 8 1)

MSKKISGGSVVEMQGDDEMTRIIWELIKEKLIFPYVELDLHSYDLGIENRDATNDQVTKDA
AEAIAKKHNVGKCATITPDEKRVVEEFKLLKQMWKSPNGTIRNIIIGGTVFREAIICKNIPRLV
SGWVKPIIIGRHAYGDQYRATDFVVPGPVKVEITYTPSDGTQKVITYLVHNFEEGGGVAM
GMYNQDKSIEDFAHSSFQMALSKGWPLYLSTKNTILKKYDGRFKDIFQEIYDKQYKSQFE
AQKIWYEHRLIDDMVAQAMKSEGGFIWACKNYDGDVQSDSVAQGYGSLGMMTSLVLCVP
DGKTVEAEAAHGTVTRHYRMYQKGQETSTNPIASIFAWTRGLAHRKLDNNKELAFFAN
ALEEVSITETIEAGFMTKDLAACIKGLPNVQRSDYLNTFEFMDKLGLENLKIKLAQAKL

30

【 0 0 4 1 】

I D H 2 (配列番号 8 2)

MAGYLRVVRSLCRASGSRPAWAPAALTAPTSQEQPRRHYADKRIKVAKPVVEMDGDDEM
TRIIWQFIKEKLILPHVDIQLKYFDLGLPNRDQTDQVTIDSALATQKYSVAVKCATITPD
EARVEEFKLLKMWKSPNGTIRNIIIGGTVFREPIICKNIPRLVPGWTKPITIGRHAHGDQYK
ATDFVADRAGTFKMFVTPKDGSGVKEWEVYNFPAGGVGMGMYNTDESISGFAHSCFQY
AIQKKWPLYMSTKNTILKAYDGRFKDIFQEIFDKHYKTDGDKNKIWEHRLIDDMVAQV
LKSSGGFVWACKNYDGDVQSDILAQGGFSLGLMTSVLVCPDGKTIEAEAAHGTVTRHYR
EHQKGRPTSTNPIASIFAWTRGLEHRGKLDGNQDLIRFAQMLEKVCVETVESGAMTKDL
AGCIHGLSNVKLNEHFLNTTDFLDTIKSNLDRALGRQ

40

【 0 0 4 2 】

M D H 1 (配列番号 8 3)

MSEPIRVLVLTGAAGQIAYSLLYSIGNGSVFGKDQPIILVLLDITPMMGVLDGVLMEQLQDC
ALPLLKDVIATDKEDVAFKDLDAVLVGSMPRREGMERKDLLKANVKIFKSQGAALDKYA
KKSVMKVVVGNPANTNCLTASKSAPSIPKENFSLTRLDHNRKAQIALKLGVTANDVKN
VIIWGNHSSTQYPDVNHAKVKLQGKEVGVYEALKDDSWLKGEFVTTVQQRGAAVIKARK
LSSAMSAAKAICDHVRDIWFGTPEGEFVSMGVISDGNISYGVPPDILLYSFPVVIKNKTWK
VEGLPINDFSREKMDLTAKELTEEKESAFEFLSSA

【 0 0 4 3 】

M D H 2 (配列番号 8 4)

50

MLSALARPASAAALRRSFSTSAQNNAKVAVLGASGGIGQPLSLLLKNSPLVSRLTLYDIAHT
PGVAADLSHIETKAAVKGYLGPEQLPDCLKGCDVVVIPAGVPRKPGMTRDDLFTNATIV
ATLTAACAQHCPEAMICVIANPVNSTIPITAEVFKKHGVYNPNKIFGVTTLDIVRANTFVA
ELKGLDPA RVNVPVIGGHAGKTIIP LISQCTPKVDFPQDQLTALTGRIQEAGTEVVKAKAG
AGSATLSMAYAGARFVFSLV DAMNGKEGVVECSFVKSQETECTYFSTPLLLGKKGIEKNL
GIGKVSSFEEKMISDAIPELKASIKKGEDFVKTLK

【 0 0 4 4 】

P H G D H (配列番号 8 5)

MAFANLRKVLISDSLDPCCRKILQDGGQLQVVEKQNLSKEELIAELQDCEGLIVRSATKVTA
DVINAAEKLQVVGRAGTGVDNVDLEAATRKGILVMNTPNGNSLSAAELTCGMIMCLARQ
IPQATASMKGDKWERKKFMGTENGKTLGILGLGRIGREVATRMQSFGMKITIGYDPIISP
EVSASFGVQQLPLEEIWPLCDFITVHTPLLPSTTGLLNDNTFAQCKKGVRV VNCARGGIV
DEGALLRALQSGQCAGAAALDVFTTEPPRDRALVDHENVISCPHLGASTKEAQSRCGEEIA
VQFVDMVKGKSLTG VVNAQALTSAFSPHTKPWIGLAEALGTL MRAWAGSPKGTIQVITQ
GTSLKNAGNCLSPAVIVGLLKEASKQADVNLVNAKLLVKEAGLNVTTTSHSPAAPGEQGF
ECLLAVALAGAPYQAVGLVQGTTPVLQGLNGAVFRPEVPLRRDLPLLLFRTQTSDPAML
PTMIGLLAEAGVRLLSYQTSLSVSDGETWHVMGISSLLPSLEAWKQHVTEAFQFHF

【 0 0 4 5 】

また、クレブス回路調節ポリペプチドは、クレブス回路代謝産物を基質として使用するポリペプチド、例えば、グルタミン - オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT 、 GOT 1 や GOT 2 など) 、または、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 1 (PCK 1) とし得る。グルタミン酸 - オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) 、別名、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) とは、可逆反応を触媒して、アスパラギン酸とグルタミン酸との間で - アミノ基を転移する、ピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性酵素のことを指す。一部の事例では、GOT は、GOT 1 及び GOT 2 として、それぞれ、細胞質、及び、ミトコンドリア内膜の形態で存在している。GOT 1 や GOT 2 以外にも、様々な PLP - 依存性酵素が、GOT として公知であり、これらも、クレブス回路調節ポリペプチドであり、例えば、アミノトランスフェラーゼ、トリプトファンシンターゼ、アラニンラセマーゼ、D - アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、及び、グリコーゲンホスホリラーゼがある。これらの酵素はすべて、本開示の範囲内にある。ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 1 (PCK 1) とは、オキサロ酢酸を、ホスホエノールピルビン酸と二酸化炭素に変換する、あらゆるポリペプチド (酵素) のことを指す。例示的な GOT 、及び、PCK 1 のアミノ酸配列を、以下に示す：

【 0 0 4 6 】

P C K 1 (配列番号 8 6)

MPPQLQNGNLNSAKVVQGSLSLDPQAVREFLENNAE LCQPDHIHICDGSEEENGRLLGQ
MEEEGILRRLKKYDNCWLALTDPRDVARIESTVIVTQEQRDTVPIPKTGLSQLGRWMSE
EDFEKAFNARFP GCMKGR TMYVIPFSMGPLGSPLSKIGIELTDS PYVVASMRIMTRMGTP
VLEAVGDGEFVKCLHSVGCPLPLQKPLVNNWPCNPELT LIAHLPDRREIISFGSGYGGNS
LLGKKCFALRMASRLAKEEGWLA EHMLILGITNPEGEKKYLAAAFPSACGKTNLAMMNP
SLPGWKVECVGDDIAWMKFDAQGHLRAINPENGFFGVAPGTSVKTNPN AIKTIQKNTIFT
NVAETSDGGVYWE GIDEPLASGV TITSWKNKEWSSEDGEPCAHPNSR FCTPASQCPIIDA
AWESPEGVPIEGII FGRRPAGVPLVYEALSWQHGVFVGAAMRSEATAAAEHKGKIIMHD
PFAMRPFPGYNFGKYLAHWLSMAQH PAAKLPKIFHVNWFRKDKEGKFLWPGFGENSRV
LEWMFN RIDGKASTKLTPIGYIPKEDALNLKGLGHINMMELFSISKEFWEKEVEDIEKYLE
DQVNADLPCEIEREILALKQRISQM

【 0 0 4 7 】

G O T 1 (配列番号 8 7)

MAPPSVFAEVPQAQPVLVFKLTADFREDPDPRKVN LGVGAYRTDDCHPWVLPVVKKVE
QKIANDNSLNHEYLPILGLAEFRSCASRLALGDDSPALKEKRVGGVQSLGGTGALRIGADF

LARWYNGTNNKNTPVYVSSPTWENHNAVFSAAAGFKDIRSYRYWDAEKRGDLQGFLLND
LENAPEFSIVVLHACAHNPTGIDPTPEQWKQIASVMKHRFLFPFFDSAYQGFASGNLERD
AWAIRYFVSEGEFFCAQSFSKNFGLYNERVGNLTVVGKEPESILQVLSQMEKIVRITWSN
PPAQGARIVASTLSNPELFEEWTGNVKTMA DRILTM RSELRARLEALKTPGTWNHITDQI
GMFSFTGLNPKQVEYLVNEKHIIYLLPSGRINVSGLTTKNLDYVATSIHEAVTKIQ

【 0 0 4 8 】

G O T 2 (配列番号 8 8)

MALLHSGRVLPGLIAAAFHPGLAAAASARASSWWTHVEMGPPDPILGVTEAFKRDTNSKK
MNLGVGAYRDDNGKPYVLP SVRKAE AQIAAKNLDKEYLPIGGLAEFCKASAELALGENSE
VLKSGRFVTVQTISGTGALRIGASFLQRFFKF SRDVF LPKPTWGNHTPIFRDAGMQLQGY
RYYDPKTCGFDFGTGAVEDISKIPEQSVLLLHACAHNPTGVDPRPEQWKEIATVVKRNL F
AFFDMAYQGFASGDGDKDAWAVRHFIEQG INVCLCQSYAKNMGLYGERVGAFTMVCKD
ADEAKRVESQLKILIRPMYSNPPLNGARIAAAAILNTPDLRKQWLQEVKVMADRIIGMRTQ
LVSNLKKEGSTHNWQHITDQIGMFCFTGLKPEQVERLIKEFSIYMTKDGRISVAGVTSSN
VGYLAAHAIHQVTK

【 0 0 4 9 】

加えて、クレブス回路調節ポリペプチドは、前駆体をクレブス回路代謝産物に変換する酵素、例えば、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ (P S A T 1)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (G D H 1 ; 別名、 G L U D 1)、グルタミン酸 - ピルビン酸トランスアミナーゼ 1 (G P T 1)、または、グルタミナーゼ (G L S) とし得る。ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ (P S A T 1) とは、3 - ホスホヒドロキシピルビン酸からホスホセリンへの可逆的変換、及び、3 - ヒドロキシ - 2 - オキソ - 4 - ホスホノオキシブタノエートからホスホヒドロキシスレオニンへの可逆的変換を触媒する、あらゆるポリペプチド (酵素) のことを指す。P S A T 1 は、2 - オキソグルタル酸と、O - ホスホ - L - セリンを生成する。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (G D H 1) とは、グルタミン酸を、
- ケトグルタル酸に、または、その逆に変換する、あらゆるポリペプチド (酵素) のことを指す。G D H 1 は、グルタミン酸を、2 - オキソグルタル酸 (アルファ - ケトグルタル酸) に変換する。グルタメート - ピルビン酸トランスアミナーゼ 1 (G P T 1) とは、アラニンと 2 - オキソグルタル酸との間の可逆的アミノ基転移を触媒して、ピルビン酸とグルタミン酸を生成する、あらゆるポリペプチド (酵素) のことを指す。グルタミナーゼ (G L S) とは、グルタミンからグルタメートを生成する、あらゆるポリペプチド (酵素) のことを指す。例示的な P S A T 1、G D H 1、G P T 1、及び、G L S のアミノ酸配列を、以下に示す：

【 0 0 5 0 】

G P T 1 (配列番号 8 9)

MASSTGDRSQAVRHGLRAKVLTL DGMNPRVRRVEYAVRGPIVQRALELEQELRQGVKKP
FTEVIRANIGDAQAMGQRPITFLRQVLALCVNPDLLSSPNFPDDAKKRAERILQACGGHS
LGAYSVSSGIQLIREDVARYIERRDGGIPADPNNVFLSTGASDAIVTVLKL LVAGEGHTRT
GVLIPQYPLYSATLAELGAVQVDYYLDEERAWALDVAELHRALGQARDHCRPRALCVI
NPGNPTGQVQTRECIEAVIRFAFEERLFL LADEVYQDNVYAAGSQFHSFKKVL MEMGPP
YAGQQELASFHSTSKGYMGECGFRGGYVEVVNMDAAVQQQMLKLMSVRLCPPVPGQAL
LDLVVSPPAPTDPSFAQFQAEKQAVLAELA AAKAKLTEQVFNEAPGISCNPVQGAMYSFPR
VQLPPRAVERAQELGLAPDMFFCLRLLEETGICVVP GSGFGQREGTYHFRMTILPPLEKL
RLLLEKLSRFHAKFTLEYS

【 0 0 5 1 】

G L S (配列番号 9 0)

MMRLRGSGMLRDLLLRSPAGVSATLRR AQPLVTLCRRPRGGGRPAAGPAAAAARLHPWW
GGGGWPAEPLARGLSSSPSEILQELGKGSTHPQPGVSPPAAPAGPKDGPGETDAFGNS
EGKELVASGENKIKQGLLPSLEDLLFYTIAEGQE KIPVHKFITALKSTGLRTSDPRLKECMD
MLRLTLQTTSDGVMLDKDLFKKCVQSNIVLLTQAFRRKFVIPDFMSFTSHIDELYESAKK

10

20

30

40

50

QSGGKVADYIPQLAKFSPDLWGVSVCTVDGQRHSTGDTKVPFCLQSCVKPLKYAIAVND
LGTEYVHRYVGKEPSGLRFNKLFLNEDDKPHNPMVNAGAIVVTSLIKQGVNNAEKFDYV
MQFLNKMAGNEYVGFSNATFQSERESGDRNFAIGYYLKEKKCFPEGTDMVGILDFYFQLC
SIEVTCESASVMAATLANGGFCPITGERVLSPEAVRNTLSLMHSCGMYDFSGQFAFHVGL
PAKSGVAGGILLVVPNVMMGMCWSPPLDKMGNSVKGIHFCHDLVSLCNFHNNDNLRHF
AKKLDPRREGGDQRVKSVINLLFAAYTGDVSALRRFALSAMDMEQRDYDSRTALHVAAA
EGHVEVVKFLLACKVNPFPKDRWNNTPMDEALHFGHHDVFKILQEYQVQYTPQGDSD
NGKENQTVHKNLDGLL

【 0 0 5 2 】

P S A T 1 (配列番号 9 1)

10

MDAPRQVVNFPGGPAKLPHSVLLEIQKELLDYKGVGISVLEMSHRSSDFAKIINNNTENLV
RELLAVPDNYKVIFLQGGGCGQFSAPVPLNLIGLKAGRCADYVVTGAWSAKAAEEAKKFGT
INIVHPKLGSYTKIPDPSTWNLNPDASYVYYCANETVHGVEFDFIPDVKGAVLVCDMSSN
FLSKPVDVSKFGVIFAGAQKNVGSAGVTVVIVRDDLGFALRECPVLEYKVQAGNSSLY
NTPPCFSIYVMGLVLEWIKNNGGAAAMEKLSSIKSQTIYEIIDNSQGFFYVCPVEPQNRSK
MNIPFRIGNAKGDDALEKRFLDKALELNMLSLKGHRVGGIRASLYNAVTTIEDVQKLAAP
MKKFLEMHQL

【 0 0 5 3 】

G D H 1 (配列番号 9 2)

20

MTYKCAVVDVPFGGAKAGVKINPKNYTDNELEKITRRFTMELAKKGFIPGIDVPAPDMS
TGEREMSWIADTYASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEAS
YMSILGMTPGFGDKTFVVQGFNGVGLHSMRYLHRFGAKCIAVGESDGSIWNPDGIDPKE
LEDFKLQHGSILGFPAKPYEGSILEADCILIPAASEKQLTKSNAPRVKAKIIAEGANGPT
TPEADKIFLERNIMVIPDLNAGGVTVSIFYEWLKNLNHVSYGRLTFKYERDSNYHLLMS
VQESLERKFGKHGGTIPIVPTAEFQDRISGASEKDIVHSGLAYTMERSARQIMRTAMKYN
LGLDLRTAAYVNAIEKVFKVYNEAGVTFT

【 0 0 5 4 】

クレブス回路調節ポリペプチドは、好適な種に由来する天然ポリペプチド、例えば、哺乳動物クレブス回路調節ポリペプチド、例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類に由来するクレブス回路調節ポリペプチドなどとし得る。このような天然ポリペプチドは、当該技術分野で公知であり、例えば、一般に利用可能な遺伝子データベース、例えば、GenBankを検索するためのクエリとして、上記アミノ酸配列のいずれかを使用して得ることができる。本開示に使用するクレブス回路調節ポリペプチドは、上記した例示的なタンパク質のいずれかと、少なくとも85%（例えば、90%、95%、97%、98%、99%、または、それ以上）の配列同一性を共有し得る。

30

【 0 0 5 5 】

2つのアミノ酸配列の「パーセント同一性」は、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993において一部変更された、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990のアルゴリズムを用いて測定する。このようなアルゴリズムは、Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990のNBLASTプログラム、及び、XBLASTプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を使用して、BLASTタンパク質検索を実施して、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。2つの配列間にギャップが存在する場合、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997に記載されているように、Gapped BLASTを利用することができる。BLASTプログラム、及び、Gapped BLASTプログラムを利用する場合、対応するプログラム（例えば、XBLAST及びNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。

40

50

【0056】

一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチドは、ポリペプチドを、所望の細胞内区画に輸送するために、細胞内区画局在化シグナル伝達ペプチド（例えば、ミトコンドリア局在化シグナル伝達ペプチド）にコンジュゲートし得る。例えば、GOT2ポリペプチドは、ミトコンドリア局在化シグナル伝達ペプチドを含むことで、宿主免疫細胞のミトコンドリアへの輸送を可能ならしめる。

【0057】

あるいは、クレブス回路調節ポリペプチドを、ネイティブ同等物の機能的バリエーションとし得る。このような機能的バリエーションは、ネイティブ同等物の機能的ドメイン（複数可）の外側に1つ以上の変異を含み得る。ネイティブクレブス回路調節ポリペプチドの機能的ドメインは、当該技術分野で公知のものとし得る、または、そのアミノ酸配列に基づいて予測することができる。機能的ドメイン（複数可）の外側の変異が、タンパク質の生物学的活性に実質的に影響を及ぼすことは予測し得ない。一部の事例では、機能的バリエーションは、ネイティブ同等物と比較して、クレブス回路の高度の調節を示し得る。あるいは、機能的バリエーションは、ネイティブ同等物と比較して、クレブス回路の調節を難しくし得る。

【0058】

クレブス回路調節ポリペプチドの機能的バリエーションは、野生型ポリペプチドの機能的バリエーションとし得るものであり、このものは、ネイティブ対応物と比較して、1つ以上の突然変異を含み、そして、ネイティブ対応物と実質的に同じ生物学的活性を保持し得る。一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチドの機能的バリエーションは、ネイティブ対応物と比較して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または、それ以上の突然変異を含む。

【0059】

例えば、GOTの機能的バリエーションは、ネイティブ対応物と比較して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または、それ以上の突然変異を含み得る。一部の実施形態では、GOTの機能的バリエーションは、配列番号88の位置159（例えば、K159Q）のリジン残基の突然変異を含む。一部の実施形態では、GOTの機能的バリエーションは、配列番号88の185位（例えば、K185Q）のリジン残基の突然変異を含む。一部の実施形態では、GOTの機能的バリエーションは、配列番号88の位置404（例えば、K404Q）のリジン残基の突然変異を含む。一部の実施形態では、GOTの機能的バリエーションは、配列番号88の位置159（例えば、K159Q）と位置185（例えば、K185Q）のリジン残基の突然変異を含む。一部の実施形態では、GOTの機能的バリエーションは、配列番号88の位置185（例えば、K185Q）と位置404（例えば、K404Q）のリジン残基の突然変異を含む。一部の実施形態では、GOTの機能的バリエーションは、配列番号88の位置159（例えば、K159Q）と位置404（例えば、K404Q）のリジン残基の突然変異を含む。一部の実施形態では、GOTの機能的バリエーションは、配列番号88の位置159（例えば、K159Q）、位置185（例えば、K185Q）、及び、位置404（例えば、K404Q）のリジン残基の突然変異を含む。Yang et al., The EMBO Journal (2015) 34: 1100 - 1125を参照されたい、この文献での関連する開示は、本明細書に記載の目的及び趣旨に関して、参照により、本明細書で援用する。

【0060】

一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチドの機能的バリエーションは、ネイティブ対応物と比較して変化し得る1つ以上の生物学的特性（例えば、改変状態、触媒活性、細胞位置、及び/または、結合パートナー）を示し得る。クレブス回路調節ポリペプチドの機能的バリエーションの例として、クレブス回路での反応を触媒する酵素の機能的バリエーション（例えば、IDH、MDH、または、PHGDHの機能的バリエーション）、クレブス回路代謝産物を基質として使用する酵素の機能的バリエーション（例えば、GOT、または、PCK1の機能的バリエーション）、及び、前駆体をクレブス回路代謝産物に変換する酵素の機能

10

20

30

40

50

的バリエーション（例えば、P S A T 1、G D H 1、G P T 1、または、G L S の機能的バリエーション）があるが、これらに限定されない。

【0061】

あるいは、または、加えて、機能的バリエーションは、ネイティブ同等物における1つ以上の位置（例えば、最大20の位置、最大15の位置、最大10の位置、最大で5、4、3、2、1の位置（複数可））に、保存的変異（複数可）を含有し得る。本明細書で使用する「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸置換が生じたタンパク質において、相対的な電荷またはサイズの特徴を変化させないアミノ酸置換のことを意味する。当業者に公知のポリペプチド配列を変化させる方法、例えば、このような方法を集めた参考文献、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, または Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York に記載されている方法などに従って、バリエーションを調製することができる。アミノ酸の保存的置換としては、以下のグループ、(a) M、I、L、V、(b) F、Y、W、(c) K、R、H、(d) A、G、(e) S、T、(f) Q、N、及び、(g) E、D の中のアミノ酸内で生じた置換がある。

【0062】

II. キメラ受容体ポリペプチド

本明細書で使用するキメラ受容体ポリペプチドとは、宿主細胞の表面上で発現することができる非天然分子のことを意味する。キメラ受容体ポリペプチドは、関係する抗原（例えば、がんなどの疾患に関連する抗原、または、病原体に関連する抗原；本明細書の説明を参照されたい）を標的とすることができる細胞外標的結合ドメインを含む。細胞外標的結合ドメインは（例えば、本明細書で開示したCARポリペプチドでの細胞外抗原結合ドメイン）、関係する抗原に直接結合することができる。あるいは、細胞外標的結合ドメインは、中間物、例えば、抗体などのFc含有薬を介して、関係する抗原に結合することができる。キメラ受容体ポリペプチドは、膜貫通ドメイン、ヒンジドメイン、細胞質シグナル伝達ドメイン、1つ以上の共刺激ドメイン、細胞質シグナル伝達ドメイン、または、これらの組み合わせをさらに含み得る。一部の事例では、キメラ受容体ポリペプチドは、共刺激ドメインを含み得ない。キメラ受容体ポリペプチドは、宿主細胞上で発現する際に、標的抗原に対して直接的または間接的に結合するために、細胞外標的結合ドメインが細胞外に位置するように構成されている。任意の共刺激シグナル伝達ドメインは、活性化、及び/または、エフェクターシグナル伝達を誘発するために、細胞質内に位置し得る。

【0063】

一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、細胞外標的結合ドメインのC末端であり、かつ、膜貫通ドメインのN末端である位置にあり得るヒンジドメインをさらに含み得る。ヒンジは、任意の好適な長さのものとし得る。その他の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、ヒンジドメインを全く有し得ない。さらにその他の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、短いヒンジドメイン（例えば、最大25アミノ酸残基を含む）を有し得る。

【0064】

一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、N末端からC末端にかけて、細胞外標的結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び、細胞質シグナル伝達ドメインを含み得る。一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、N末端からC末端にかけて、細胞外標的結合ドメイン、膜貫通ドメイン、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメイン、及び、細胞質シグナル伝達ドメインを含む。その他の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、N末端からC末端にかけて、細胞外標的結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質シグナル伝達ドメイン、及び

、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0065】

一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドを、抗体結合T細胞受容体（ACTR）ポリペプチドとすることができる。本明細書で使用するACTRポリペプチド（別名、ACTR構築物）とは、宿主細胞の表面上で発現することができる非天然分子のことを意味し、そして、免疫グロブリンのFc部分との結合親和性、及び、それに対する特異性を有する細胞外ドメイン（「Fc結合部」または「Fc結合ドメイン」）、膜貫通ドメイン、及び、細胞質シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載したACTRポリペプチドは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含み得る。

10

【0066】

その他の実施形態では、本明細書で開示したキメラ受容体ポリペプチドを、キメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチドとし得る。本明細書で使用するCARポリペプチド（別名、CAR構築物）とは、宿主細胞の表面上で発現することができる非天然分子のことを意味し、そして、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び、細胞質シグナル伝達ドメインを含む。本明細書に記載したCARポリペプチドは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含み得る。

【0067】

細胞外抗原結合ドメインは、医学的症状（例えば、疾患）と関連する天然抗原を含む標的抗原に対して特異的に結合する、あらゆるペプチドもしくはポリペプチド、または、疾患関連抗原を標的とする治療薬にコンジュゲートした抗原部分に対して特異的に結合する、あらゆるペプチドもしくはポリペプチドとし得る。

20

【0068】

一部の実施形態では、本明細書に記載したCARポリペプチドは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含み得る。CARポリペプチドは、宿主細胞上で発現する際に、標的分子及び細胞質シグナル伝達ドメインに結合するために、細胞外抗原結合ドメインが、細胞外に位置するように構成されている。任意の共刺激シグナル伝達ドメインは、活性化、及び/または、エフェクターシグナル伝達を誘発するために、細胞質内に位置し得る。

【0069】

本明細書で使用する語句「タンパク質X膜貫通ドメイン」（例えば、CD8膜貫通ドメイン）とは、所定のタンパク質の任意の部分、すなわち、膜内において熱力学的に安定な膜貫通タンパク質Xのことを意味する。

30

【0070】

本明細書で使用する語句「タンパク質X細胞質シグナル伝達ドメイン」、例えば、CD3細胞質シグナル伝達ドメインとは、細胞の内部、すなわち、細胞小器官と相互作用し、当該技術分野で公知の一次シグナルを中継することで、免疫細胞の増殖及び/または活性化をもたらすことができる、タンパク質（タンパク質X）の任意の部分のことを意味する。本明細書に記載した細胞質シグナル伝達ドメインは、免疫細胞を完全に活性化させるための二次シグナルを中継する共刺激シグナル伝達ドメインとは異なる。

40

【0071】

本明細書で使用する語句「タンパク質X共刺激シグナル伝達ドメイン」、例えば、CD28共刺激シグナル伝達ドメインとは、共刺激シグナル（二次シグナル）を、免疫細胞（例えば、T細胞など）に伝達して、免疫細胞の完全な活性化をもたらすことができる、所与の共刺激タンパク質（タンパク質X、例えば、CD28、4-1BB、OX40、CD27、または、ICOSなど）の部分のことを意味する。

【0072】

A．細胞外標的結合ドメイン

本明細書で開示したキメラ受容体ポリペプチドは、直接的結合または（抗体などの中間物を介した）間接的結合のいずれかで、関係する抗原（例えば、本明細書に記載した抗原

50

)を標的とする細胞外ドメインを含む。キメラ受容体ポリペプチドを、Fc結合ドメインを含むACTRポリペプチドとし得る。あるいは、キメラ受容体ポリペプチドを、細胞外抗原結合ドメインを含むCARポリペプチドとし得る。

【0073】

Fc結合ドメイン

本明細書に記載したACTRポリペプチドは、Fc結合ドメイン、すなわち、好適な哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、または、サル)の免疫グロブリン(例えば、IgG、IgA、IgM、または、IgE)のFc部分に結合することができるFc結合ドメインである細胞外ドメインを含む。好適なFc結合ドメインは、哺乳動物Fc受容体などの天然タンパク質、または、ある特定の細菌タンパク質(例えば、プロテインA、プロテインG)に由来し得る。加えて、Fc結合ドメインを、本明細書に記載した抗体のいずれかのFc部分に対して、大きな親和性と特異性をもってして、特異的に結合するように改変した合成ポリペプチドとし得る。例えば、このようなFc結合ドメインは、免疫グロブリンのFc部分に特異的に結合する抗体、または、その抗原結合フラグメントとすることができる。例として、一本鎖可変フラグメント(scFv)、ドメイン抗体、または、単一ドメイン抗体(例えば、ナノボディ)があるが、これらに限定されない。あるいは、Fc結合ドメインを、Fcに対する結合活性を使用してペプチドコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングして同定し得る、Kunitzドメイン、小モジュール免疫治療薬(SMIP)、アドネクチン、アビマー、アフィボディ、DARPin、または、アンチカリンなどのFc部分に対して特異的に結合する合成ペプチドとすることができる。

10

20

【0074】

一部の実施形態では、Fc結合ドメインは、哺乳動物Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインである。本明細書で使用する「Fc受容体」は、数多くの免疫細胞(B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、好中球、肥満細胞、及び、好酸球など)の表面上に発現し、そして、抗体のFcドメインに対する結合特異性を示す細胞表面結合受容体である。Fc受容体は、一般的には、抗体のFc(結晶性フラグメント)部分に対する結合特異性を有する少なくとも2つの免疫グロブリン(Ig)様ドメインで構成される。一部の事例では、抗体のFc部分にFc受容体が結合すると、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)作用を誘発し得る。本明細書に記載したACTRポリペプチドを構築するために使用するFc受容体は、野生型同等物と比較して、Fcに対する大きな親和性または低い親和性を有し得る、天然の遺伝子多型バリエーション(例えば、CD16 V158バリエーション)とし得る。あるいは、Fc受容体は、Ig分子のFc部分に対する結合親和性を変化させる1つ以上の変異(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または、10の変異を含む最大10アミノ酸残基置換)を有する、野生型同等物の機能的バリエーションとし得る。一部の事例では、変異は、Fc受容体のグリコシル化パターンを改変させて、Fcに対する結合親和性を改変させ得る。

30

【0075】

本明細書に記載した方法または構築物のいずれかに用い得る、Fc受容体細胞外ドメイン(例えば、Kim et al., J. Mol. Evol. 53:1-9, 2001を参照されたい)での数多くの例示的な遺伝子多型を、以下の表に列挙する。

40

【表 1】

表 1. Fc 受容体における例示的な遺伝子多型

アミノ酸番号	19	48	65	89	105	130	134	141	142	158
FCR10	R	S	D	I	D	G	F	Y	T	V
P08637	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	F
S76824	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	V
J04162	R	N	D	V	D	D	F	H	I	V
M31936	S	S	N	I	D	D	F	H	I	V
M24854	S	S	N	I	E	D	S	H	I	V
X07934	R	S	N	I	D	D	F	H	I	V
X14356 (FcγRII)	N	N	N	S	E	S	S	S	I	I
M31932 (FcγRI)	S	T	N	R	E	A	F	T	I	G
X06948 (FcαεI)	R	S	E	S	Q	S	E	S	I	V

10

【 0 0 7 6 】

Fc 受容体は、それが結合可能な抗体のアイソタイプに基づいて分類する。例えば、Fc ガンマ受容体 (Fc R) は、一般的には、Ig G 抗体、例えば、1 つ以上のそのサブタイプ (すなわち、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4) などに結合する；Fc アルファ受容体 (Fc R) は、一般的には、Ig A 抗体に結合する；及び、Fc イプシロン受容体 (Fc R) は、一般的には、Ig E 抗体に結合する。一部の実施形態では、Fc 受容体は、Fc ガンマ受容体、Fc アルファ受容体、または、Fc イプシロン受容体である。Fc ガンマ受容体の例として、CD 6 4 A、CD 6 4 B、CD 6 4 C、CD 3 2 A、CD 3 2 B、CD 1 6 A、及び、CD 1 6 B があるが、これらに限定されない。Fc アルファ受容体の例は、Fc R 1 / CD 8 9 である。Fc イプシロン受容体の例として、Fc R I と、Fc R I I / CD 2 3 があるが、これらに限定されない。本明細書に記載した A C T R ポリペプチドの構築のために使用する例示的な Fc 受容体、及び、対応する Fc ドメインに対するそれらの結合活性を、以下の表に列挙する。

20

30

40

50

【表 2】

表 2. 例示的な Fc 受容体

受容体名称	主な抗体リガンド	リガンドに対する親和性
FcγRI (CD 64)	IgG1 及び IgG3	高 (Kd 約 10^{-9} M)
FcγRIIA (CD32)	IgG	低 (Kd $> 10^{-7}$ M)
FcγRIIB1 (CD32)	IgG	低 (Kd $> 10^{-7}$ M)
FcγRIIB2 (CD32)	IgG	低 (Kd $> 10^{-7}$ M)
FcγRIIIA (CD16a)	IgG	低 (Kd $> 10^{-6}$ M)
FcγRIIIB (CD16b)	IgG	低 (Kd $> 10^{-6}$ M)
FcεRI	IgE	高 (Kd 約 10^{-10} M)
FcεRII (CD23)	IgE	低 (Kd $> 10^{-7}$ M)
FcαRI (CD89)	IgA	低 (Kd $> 10^{-6}$ M)
Fcα/μR	IgA 及び IgM	IgMに対して高く、IgAに対して中程度
FcRn	IgG	

【0077】

本明細書に記載したACTRポリペプチドでの使用のためのFc受容体のリガンド結合ドメインの選択は、当業者に自明である。例えば、選択は、Fc受容体の結合が望まれる抗体のアイソタイプ、及び、結合相互作用の所望の親和性などの因子に依存し得る。

【0078】

あらゆるCARポリペプチドの細胞外抗原結合ドメイン。一部の事例では、Fc結合ドメインは、Fcに対する親和性を調節し得る天然の多型を導入し得るCD16の細胞外リガンド結合ドメインである。一部の事例では、Fc結合ドメインは、158位に多型（例えば、バリン、または、フェニルアラニン）を導入したCD16の細胞外リガンド結合ドメインである。一部の実施形態では、Fc結合ドメインは、そのグリコシル化状態と、Fcに対するその親和性を改変させる条件下で生産する。

【0079】

F158残基及びV158残基を、太字及び下線（シグナルペプチドはイタリック体）で強調表示して、ヒトCD16A F158バリエント、及び、ヒトCD16A V158バリエントのアミノ酸配列を以下に記載する。

CD16A F158（配列番号93）：

MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNS

TQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPR
WVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYF
CRGLEGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVK
TNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK
C D 1 6 A V 1 5 8 (配列番号 9 4) :
MWQLLLPTALLLVVSAGMRTE~~D~~LPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNST
QWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVF
KEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGS
KNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRD
WKDHKFKWRKDPQDK

10

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態では、F c 結合ドメインは、I g G 抗体のサブセットに対してA C T R ポリペプチドを特異的にする修飾を導入したC D 1 6 の細胞外リガンド結合ドメインである。例えば、I g G サブタイプ（例えば、I g G 1）に対する親和性を高める、または、抑制する変異を導入し得る。

【 0 0 8 1 】

本明細書に記載したあらゆるF c 結合ドメインは、治療抗体のF c 部分に対する好適な結合親和性を有し得る。本明細書で使用する「結合親和性」とは、見かけの結合定数、すなわち、 K_A のことを意味する。 K_A は、解離定数である K_D の逆数である。本明細書に記載したA C T R ポリペプチドのF c 受容体ドメインの細胞外リガンド結合ドメインは、抗体のF c 部分に対して、少なくとも 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M、または、それ以下の結合親和性 K_d を有し得る。一部の実施形態では、F c 結合ドメインは、別の抗体、抗体のアイソタイプ（複数可）、または、そのサブタイプ（複数可）に対するF c 結合ドメインの結合親和性と比較して、抗体、抗体のアイソタイプ（複数可）、または、そのサブタイプ（複数可）に対する高い結合親和性を有する。一部の実施形態では、F c 受容体の細胞外リガンド結合ドメインは、別の抗体、抗体のアイソタイプ（複数可）、または、そのサブタイプ（複数可）に対するF c 受容体の細胞外リガンド結合ドメインの結合性と比較して、抗体、抗体のアイソタイプ（複数可）、または、そのサブタイプ（複数可）に対する特異性を有する。

20

【 0 0 8 2 】

当該技術分野で公知のその他のF c 結合ドメインも、本明細書に記載したA C T R 構築物に使用することができ、それらとしては、例えば、W O 2 0 1 5 0 5 8 0 1 8 A 1、及び、P C T 出願第 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 1 5 9 9 9 号に記載のものがあり、これら文献のそれぞれでの関連する開示は、本明細書に記載の目的及び趣旨に関して、参照により、本明細書で援用する。

30

【 0 0 8 3 】

細胞外抗原結合ドメイン

本明細書に記載したC A R ポリペプチドは、C A R ポリペプチドを発現する免疫細胞の特異性を改めて転換する細胞外抗原結合ドメインを含む。本明細書で使用する「細胞外抗原結合ドメイン」とは、医学的症状（例えば、疾患）と関連する天然抗原であり得る関係する標的抗原に対する結合特異性を有するペプチドもしくはポリペプチド、または、疾患関連抗原を標的とする治療薬にコンジュゲートした抗原部分に対する結合特異性を有するペプチドもしくはポリペプチドのことを意味する。本明細書に記載した細胞外抗原結合ドメインは、F c 受容体の細胞外ドメインを含んでおらず、免疫グロブリンのF c 部分に結合し得ない。F c フラグメントに結合しない細胞外ドメインとは、二者間の結合活性が通常のアッセイを用いて検出可能ではない、または、バックグラウンドだけ、もしくは、生物学的に有意ではない結合活性が、一般的なアッセイを使用して検出されることを意味する。

40

【 0 0 8 4 】

一部の事例では、本明細書に記載したあらゆるC A R ポリペプチドの細胞外抗原結合ド

50

メインは、細胞表面抗原（例えば、腫瘍抗原）に結合することができるペプチドもしくはポリペプチド、または、主要組織適合遺伝子複合体と複合体を形成して抗原提示細胞の細胞表面上に提示される抗原（または、そのフラグメント）に結合することができるペプチドもしくはポリペプチドである。このような細胞外抗原結合ドメインは、標的細胞表面抗原に対して高い結合親和性で結合する抗体に由来し得る一本鎖抗体フラグメント（s c F v）とし得る。例示的な細胞表面標的抗原、及び、それらに結合する例示的な抗体を以下の表 3 に列挙する。

【表 3 - 1】

表 3. 例示的な細胞表面標的抗原、及び、それらに結合する例示的な抗体

例示的な標的抗原	例示的な抗体	例示的な標的抗原	例示的な抗体及び F c 融合薬
CD 1 3 7 (4-1 B B)	ウトミルマブ	CD 7 4	ミラツズマブ
栄養膜糖タンパク質 (5 T 4)	ナプツモマブエスタフェナトクス	H L A-D R	I M M U-1 1 4
アデノシン A 2 a 受容体 (A 2 a R)	抗 A 2 a R m A b s	H s p 7 0	m i-T U M E X t x
A I k-1 タンパク質キナーゼ (A C V R L 1)	アスクリンバクマブ	H s p 9 0	Z S G-1 0 2
A D A M-1 0 (A D A M 1 0)	8 C 7	I C A M-1	B I-5 0 5
T A C E (A D A M 1 7)	M E D I-3 6 2 2	誘導性 T 細胞共刺激因子 (I C O S)	G S K-3 3 5 9 6 0 9
A D A M-2 8 (A D A M 2 8)	G F C-2 0 1	免疫グロブリンカッパ (I g カッパ)	K a p p a m A b
CD 1 5 6 ; 免疫グロブリン G 1 ; 免疫グロブリン G 2 (A D A M 8)	M A B-1 0 3 1	免疫グロブリン抗原 (I g ラムダ)	L a m b d a m A b
A D A M-9 (A D A M 9)	A E X-6 0 0 3	I L-6 受容体 (I L-6 R)	トシリズマブ
前方勾配タンパク質 2 ホモログ (A G R 2)	アグツズマブ	I L-7 受容体 (I L-7 R)	抗 I L 7 R m A b s
未分化リンパ腫キナーゼ (A L K)	K T N-0 1 2 5	I L-1 3 受容体アルファ 1 サブユニット (I L 1 3 R A 1)	A S L A N-0 0 4
アンジオポエチンリガンド-2 (A n g-2) ; 血管内皮増殖因子-A (V E G F-A)	バヌシズマブ	I L-1 3 受容体アルファ 2 サブユニット (I L 1 3 R A 2)	抗 I L 1 3 R A 2 m A b s
ラクトアドヘリン (抗イディオタイプ)	T r i A b (1 1 D 1 0)	I L-1 受容体アクセサリータンパク質 (I L 1 R A P)	C A N-0 4

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

腫瘍壊死因子リガ ンド13 (APR IL)	B I O N - 1 3 0 1	I L - 2 受容体ベ ータ (I L 2 R ベ ータ)	M i k b e t a 1
アスパラギン酸ペ ータヒドロキシラ ーゼ (A S P H)	P A N - 6 2 2	免疫グロブリン様 ドメイン受容体2 (I L D R 2)	B A Y - 1 9 0 5 2 5 4
A x I チロシンキ ナーゼ (A X L)	B A - 3 0 1 1	インテグリンアル ファーX / ベータ ー1 (インテグリン a 1 0 b 1)	抗インテグリン a 1 0 b 1 m A b s
C D 2 7 6 抗原 (B 7 - H 3)	B V D m 2 7 6 ; h u 8 H 9	インテグリンアル ファー3 / ベータ ー1 (インテグリン a 3 b 1)	B C m A b - 1
V - セットドメイ ン含有T細胞活性 化阻害因子1 (V T C N 1 ; B 7 - H 4 とも)	F P A - 1 5 0	インテグリンアル ファー6 / ベータ ー4 (インテグリン a 6 b 4)	9 0 Y - I T G A 6 B 4
B細胞活性化因 子 ; (B A F F ; T N F S F 1 3 B 及びC D 2 5 7 と も)	ブリシビモド	インテグリンアル ファー9 (インテ グリン a 9)	G N D - 0 0 1
B細胞活性化因 子 ; (B A F F - R ; T N F S F 1 3 C 及びC D 2 6 8 とも)	V A Y 7 3 6	C D 4 9 b (イン テグリンアルファ 2)	バテリズマブ
BAG分子シャペ ロン制御因子3 (B A G 3)	抗B A G 3 m A b s	C D 4 9 c (イン テグリンアルファ 3)	抗C D 4 9 c m A b s
バシジン (B S G ; C D 1 4 7)	c H A b 1 8	C D 4 9 d ; (イン テグリンアルファ 4)	抗C D 4 9 d m A b s
B細胞成熟抗原 (B C M A ; T N F R S F 1 7 と も)	S E A - B C M A	C D 5 1	アピツズマブ
A D P リボシルシ クラーゼー2 (B S T 1)	O X - 0 0 1	C D 2 9 (インテ グリンベータ1)	O S - 2 9 6 6
B及びTリンパ球 アテニューエーター (B T L A)	4 0 E 4	C D 6 1 (インテ グリンベータ3)	抗C D 6 1 m A b s
補体C 5 a 受容体 (C 5 a R)	ニュートラズマブ	J a g g e d - 1	抗J a g g e d - 1 m A b s

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

CACNA2D1 カルシウムチャネル サブユニット (CACNA2D1)	抗CACNA2D1 mAbs	腎臓関連抗原1 (KAAG1)	AB-3A4
炭酸脱水酵素-I X (CAIX)	G250	カリウムチャネル サブファミリーK メンバー9 (KCNK9)	Y-4
カルレチキュリン (CALR)	抗CALR mAbs	KIR2DL1/2L3	リリルマブ
カベオリン1 (CAV1)	抗CAV1 mAbs	チロシン-タンパク質 キナーゼキット (KIT)	CDX-0158
炭酸脱水酵素-X II (CAXII)	177Lu-6A10-Fab; 抗 CAXII mAbs	L1CAM	抗L1CAM mAbs
CCR2ケモカイン受容体 (CCR2)	プロザリズマブ	細胞死受容体5 (DR5)	APO MAB
CCR3ケモカイン受容体 (CCR3)	抗CCR3 mAbs	CD223 (LAG3)	レラトリマブ
CCR4ケモカイン受容体 (CCR4)	モガムリズマブ	ルイスY	hu3S193; MB311
CCR5ケモカイン受容体 (CCR5)	PRO140; CCR5 mAb004	亜鉛輸送体SLC39A6 (LIV1)	SGN-LIV1
CCR7ケモカイン受容体 (CCR7)	抗CCR7 mAbs	リシルオキシダーゼ様 タンパク質2 (LOXL2)	AB-0023
CCR9ケモカイン受容体 (CCR9)	抗CCR9 mAbs	ロイシンリッチリピート 含有タンパク質15 (LRR C15)	ABBV-085
インターロイキン-3受容体 アルファ (IL3RA; CD123)	CSL362; KHK2823	ロイシンリッチリピート 含有タンパク質32 (LRR C32)	ARGX-115
アミノペプチダーゼN (CD13)	MI-130110	リンパ球抗原75 (LY75)	MEN-1309
プロミニン1 (CD133)	抗CD133 mAbs	Ly6/PLAURドメイン 含有タンパク質3 (LYPD3)	BAY-1129980

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

シンデカン-1 (CD138)	インダツキシマブ ラブタンシン	黒色腫関連抗原 (MHCが提示す るMAGEペプチ ド)	LxC-002
CD160	ELB-021	マトリプターゼ (ST14)	抗ST14 m Abs
活性化白血球細胞 接着分子 (CD1 66)	CX-2009	MICA/B	IPH4301
Bリンパ球抗原C D19	MOR208	MIF/HLA- A2 (MHCが提 示するMIFペプ チド)	RL21A
Bリンパ球抗原C D20	リツキシマブ、オ ビヌツズマブ、オ カラツズマブ	抗ミューラーホル モンII (MHR 2)	GM-102
膜糖タンパク質O X2CD200	サマリズマブ	MMP1/HLA (MHC1が提示 するMMP1ペプ チド)	抗MMP1/H LA mAbs
CD22	エブラツズマブ	メタロプロテアー ゼ-9 (MMP 9)	アンデカリキシ マブ
免疫グロブリンイ ブシロンFc受容 体II (CD2 3)	ルミリキシマブ	メソテリン (MS LN)	MORAb-0 09
シグナル伝達物質 CD24	抗CD24 mAb s	ムチン1 (MUC 1)	Pankom Ab-GE X
IL-2受容体アル ファサブユニット CD25	90Y-ダクリズ マブ	ムチン13 (MU C13)	抗MUC13 mAbs
CD27	バルリルマブ	エンドムチン (M UC14)	抗MUC14 mAbs
CD28	セラリズマブ	ムチン16 (MU C16)	ソフィツズマブ
CD3	ムロモナブ-CD 3 (OKT3)	細胞表面糖タンパ ク質MUC18 (CD146)	AA98
CD30	ブレンツキシマブ ベドチン	ムチン5AC (M UC5AC)	エンシツキシマ ブ
免疫グロブリンガ ンマFc受容体I IB (CD32 B)	BI-1206	N-グリコリルG M3 (NeuGc GM3)	99mTc-標 識14F7

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

CD 3 3	リンツズマブ	ナトリウム依存性リン酸輸送タンパク質 2 B (SLC 3 4 A 2)	XMT-1 5 3 6
CD 3 7	オトレルツズマブ	ヌクレオリン (NCL)	抗ヌクレオリン mAbs
ADP リボシルシクラーゼ-1 (CD 3 8)	ダラツムマブ	ネクチン-4	エンホルツマブベドチン
CD 3 9	OREG-1 0 3	ニューロフィブロミン (NF 1)	抗ニューロフィブロミン mAbs
CD 4	IT-1 2 0 8	NGcGM3 ガングリオシド	ラコツモマブ
CD 4 0	ルカツムマブ	NKG2 A	モナリズマブ
CD 4 3	ロイコツキシマブ	非-POUドメイン含有オクタマー結合タンパク質 (NONO)	PAT-LM 1
CD 4 4	RG 7 3 5 6	ノッチ-1	ブロンチクツズマブ
CD 4 5	1 3 1 I-BC 8	CD 7 3	オレクルマブ
膜補因子タンパク質 (CD 4 6)	Aug mAb	ネトリン-1 (NTN 1)	NP-1 3 7
CD 4	Hu 5 F 9-G 4	OX-4 0	PF-0 4 5 1 8 6 0 0
CD 5 2	アレムツズマブ	P 2 X プリン受容体 7 (P 2 RX 7)	BIL-0 1 0 t
CD 5 5	PAT-SC 1	FGF 受容体 (panFGFR)	MM-1 6 1
神経細胞接着分子 1 ; (CD 5 6)	IMGN-9 0 1	インテグリン (panインテグリン)	NOD 2 0 1
T-細胞分化抗原 CD 6	イトリズマブ	P-カドヘリン、カドヘリン-3 (CDH 3) とともに	PCA-0 6 2
CD 7 0	SGN-7 0	プログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1)	ペンブロリズマブ
CD 7 9 b	ポラツズマブベドチン	プログラム細胞死リガンド 1 (PD-L 1)	アベルマブ、Euchloe H 1 2
CD 8	抗 CD 8 mAbs	プログラム細胞死リガンド 2 (PD-L 2)	rHlgM 1 2 B 7

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

CD80	ガリキシマブ	PDGF受容体アルファ (PDGFR A)	オララツムマブ
CD98	IGN-523	胎盤特異的タンパク質1 (PLAC1)	抗PLAC1 mAbs
CD99	NV-103	PR1/HLA (MHCにおけるPR1ペプチド)	抗PR1/HLA mAbs
カドヘリン-1 (CDH1)	抗CDH1 mAbs	プロラクチン受容体PRLR	ABBV-176
カドヘリン-17 (CDH17)	抗CDH17 mAbs	ホスファチジルセリン	抗ホスファチジルセリン mAbs
カドヘリン19 (CDH19)	抗CDH19 mAbs	前立腺幹細胞抗原 (PSCA)	抗PSCA mAbs
カドヘリン-6 (CDH6)	HKT-288	グルタミン酸カルボキシペプチダーゼII (PSMA)	ATL-101
CD66a (CEACAM1)	CM-24	副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTH-rP)	CAL
CD66e (CEACAM5)	IMMU-130	チロシン-タンパク質キナーゼ様7 (PTK7)	コフェツズマブペリドチン
CD66c ; CD66e (CEACAM5/6)	NEO-201	タンパク質チロシンホスファターゼIVA3 (PTP4A3)	PRL3-ズマブ
クローディン18 (クローディン18.2)	IMAB362	ポリオウイルス受容体関連免疫グロブリンドメイン含有 (PVRIG)	COM-701
クローディン6	IMAB027	核因子カッパーBリガンドの受容体活性化因子 (RANKL)	デノスマブ
SLAMファミリーメンバー7 (CS1)	エロツズマブ	Receptor of originenants (RON)	抗RON mAbs

10

20

30

40

【表 3 - 7】

コロニー刺激因子 -1 受容体 (CS F1R)	カビラリズマブ	チロシン-タンパ ク質キナーゼ膜貫 通受容体ROR1 (ROR1) ; N TRKR1とも	シルムツズマブ
細胞傷害性T-リ ンパ球タンパク質 -4 (CTLA 4)	イピルムマブ	チロシン-タンパ ク質キナーゼ膜貫 通受容体ROR2 (ROR2) ; N TRKR2とも	BA-3021
コクサッキーウイ ルス及びアデノウ イルス受容体 (C XADR)	抗CXADR m Abs	R-スポンジン- 3 (RSPO3)	ロスマンツズマ ブ
CXCR2ケモカ イン受容体	抗CXCR2 m Abs	スフィンゴシン- 1-リン酸受容体 3 (S1PR3)	EDD7H9
CXCR3ケモカ イン受容体	抗CXCR3 m Abs	白血病の表面抗原 (SAIL)	IGN-786
CXCR4ケモカ イン受容体	ウロクブルマブ	セマフォリン-4 D (SEMA4 D)	VX-15
CXCR5ケモカ イン受容体	STI-B030 X	糖鎖抗原19-9 (CA19-9)	MVT-107 5
CXCR7ケモカ イン受容体	抗CXCR7 m Abs	SialylTnH omson新規抗 原 (STn)	抗STn mA bs
DCLK1	抗DCLK1 m Abs	シアル酸結合Ig -様レクチン8 (Siglec- 8)	AK-002
Dickkopf 関連タンパク質1 (DKK1)	BHQ-880	シアル酸結合Ig -様レクチン9 (Siglec- 9)	抗Siglec -9 mAbs
DLK1	ADCT-701	シグナル調節タン パク質アルファ (SIRPA)	OSE-172
デルター様タンパ ク質リガンド3 (DLL3)	SC16LD6. 5	CD48 ; SLA Mファミリーメン バー2 (SLAM F2) ととも	SGN-CD4 8A

10

20

30

40

50

【表 3 - 8】

デルター様タンパク質リガンド4 (DLL4) ; VEGF (VEGF)	ナビシキシズマブ	CD352 ; SLAMファミリーメンバー6 (SLAMF6)	SGN-CD352A
ジペプチジルペプチダーゼ4 (DPP4), (CD26とも)	YSCMA	中性アミノ酸輸送体B0 (SLC1A5)	KM-8094
細胞死受容体-3 (DR3)	PTX-35	ソマトスタチン2受容体 (SSTR2)	X mAb-18087
TRAIL-1受容体 (DR4)	HuYON007 MultYbody	スタビリン1 (STAB1)	FP-1305
TRAIL-1受容体 ; TRAIL-2受容体 (DR4 / DR5)	DR4 / DR5 サロボディ	金属還元酵素 (STEAP1)	89Zr-DFO-MSTP2109A
TRAIL-2受容体 (DR5)	DS-8273	サバイビン	抗サバイビン mAbs
EGF様タンパク質6 (EGFL6)	抗EGFL6 mAbs	TAG-72	90Y-IDE C-159
上皮増殖因子受容体 (EGFR)	セツキシマブ、Sym004、ニモツズマブ	T細胞受容体 (TCR)	抗TCR mAbs
上皮増殖因子受容体vIII (EGFRvIII)	ABT-806	エンドシアリン (TEM1)	オンツキシズマブ
上皮膜タンパク質2 (EMP2)	ONCR-201	炭疽毒素受容体1 (ANTXR1) ; TEM8とも	抗TEM8 mAbs
エンドグリン	カロツキシマブ	組織因子 (TF)	MORAb-066
エクトヌクレオチドピロホスファターゼ / ホスホジエステラーゼファミリーメンバー3 (ENPP3)	AGS-16C3F	トランスフォーミング増殖因子、ベータ受容体II TGF-ベータII型 (TGFB2)	抗TGFB2 mAbs
プロスタグランジンE ₂ 受容体2 (PTGER2)	抗PTGER2 mAbs	Thomsen-Friedenreich抗原	JAA-F11

10

20

30

40

50

【表 3 - 9】

プロスタグランジンE ₂ 受容体4 (PTGER4)	抗PTGER4 mAbs	Ig及びITIMドメインを有するT細胞免疫受容体 (TIGIT)	BMS-986207
EpCAM	オボルツズマブモナトックス	A型肝炎ウイルス細胞受容体1 (HAVCR1); TIM-1とも	CDX-014
エフリンA型受容体2 (EphA2)	MEDI-547	A型肝炎ウイルス細胞受容体2 (HAVCR2); TIM-3とも	MBG453
エフリンA型受容体3 (EphA3)	KB004	Toll様受容体2 (TLR-2)	OPN-305
線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)	F19	Toll様受容体4 (TLR-4)	抗TLR4 mAbs
CD95 (FAS)	アスネルセプト	膜貫通4L6ファミリーメンバー1 (TM4SF1)	抗TM4SF1 mAbs
Fc受容体様タンパク質5 (FCRL5)	RG-6160	腫瘍壊死因子受容体2 (TNFR2)	抗TNFR2 mAbs
FGF受容体1 (FGFR1)	FP-1039	CD71	抗CD71 mAbs
FGF受容体2b (FGFR2b)	FPA-144	骨髄細胞上で発現する誘発受容体1 (TREM1)	抗TREM1 mAbs
FGF受容体3 (FGFR3)	B-701	腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質2 (Trop-2)	DS-1062
fms-様チロシンキナーゼ3 (FLT3)	Flysyn	TWEAK受容体 (TWEAKR)	MRT-101
葉酸受容体アルファ (FOLR1)	ファルレツズマブ; IMG N853; KHK2805	チロシン-タンパク質キナーゼ受容体TYRO3 (TYRO3)	ELB-031
葉酸受容体ベータ (FOLR2)	抗FOLRベータ mAbs	ウロキナーゼ受容体 (uPAR)	MNPR-101

10

20

30

40

50

【表 3 - 10】

フリズルドー 1 ; フリズルドー 2 ; フリズルドー 5 ; フリズルドー 7 ; フリズルドー 8 ; (F Z D 1 , 2 , 5 , 7 , 8)	パンチクツマブ	VEGF-2 (V EGFR2)	ラムシルマブ
フォリスタチン- 様タンパク質 1 (FSTL1)	抗 FSTL1 m Abs	ビメンチン	ブリツムマブ
フコシル-GM1	BMS-9860 12	T細胞活性化のV ードメインIg抑 制因子 (VIST A)	JNJ-616 10588
フリズルドー 10 (FZD10)	OTSA-101	インテグリンアル ファー 4 / ベータ -1	ナタリズマブ
GCSF-R (C D114 及び CS FR3 と)	CSL324	免疫グロブリンイ オタ鎖 (VPRE B1)	抗 VPREB1 mAbs
ガレクチン 3 結合 タンパク質 (LG ALS3)	MP-1959	ウィルス腫瘍タ ンパク質 (WT1 / HLA) ; MH C が提示する WT 1 ペプチド	ESK1
グアニル酸シクラ ーゼ 2C (GUC Y2C)	TAK-164	グリピカン-3 (GPC3)	コドリツズマブ
GD2	ジヌツキシマブ	膜貫通糖タンパク 質 NMB (GPN MB)	CDX-011
GD3	PF-06688 992	ロイシンリッチリ ピート含有 G-タ ンパク質結合受容 体 5 (LGR5)	BNC-101
グルコシルチコイ ド誘導 TNFR -関連タンパク質 (GITR)	BMS-9861 56	G-タンパク質結 合受容体ファミリ ー C グループ 5 メ ンバー D (GPR C5D)	JNJ-644 07564
グルコシルチコイ ド誘導 TNFR -関連タンパク質 リガンド (GIT RL)	EU-102	フェリチン	Ferrita rgP

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 1】

プレメラノサイト タンパク質 (PM EL)	抗PME L m A b s	E r b b 2 チロシ ンキナーゼ (HE R 2)	トラスツズマ ブ、ペルツズマ ブ、マルゲツキ シマブ
細胞表面 A 3 3 抗 原 (G P A 3 3)	抗G P A 3 3 m A b s	E r b b 3 チロシ ンキナーゼ (HE R 3)	パトリツマブ
グリピカン-1 (G P C 1)	M I L - 3 8	グロボ H	O B I - 8 8 8

10

【 0 0 8 5】

細胞外抗原結合ドメインは、関係する標的抗原に応じて、表 1 に列挙した抗体のいずれかに由来する抗原結合フラグメント（例えば、s c F v）を含み得る。

【 0 0 8 6】

その他の実施形態では、本明細書に記載した C A R ポリペプチドのいずれかの細胞外抗原結合ドメインは、細菌抗原、ウイルス抗原、または、真菌抗原などの病原性抗原に特異的なものとし得る。一部の例を、以下に示す：インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ、ヘマグルチニン、もしくは、M 2 タンパク質、ヒト呼吸器合胞体ウイルス (R S V) F 糖タンパク質もしくは G 糖タンパク質、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 g B、g C、g D、もしくは、g E、C h l a m y d i a M O M P もしくは P o r B タンパク質、デング熱ウイルスコアタンパク質、マトリックスタンパク質、もしくは、糖タンパク質 E、麻疹ウイルスヘマグルチニン、単純ヘルペスウイルス I I 型糖タンパク質 g B、ポリオウイルス I V P 1、H I V 1 のエンベロープ糖タンパク質、B 型肝炎コア抗原もしくは表面抗原、ジフテリア毒素、S t r e p t o c o c c u s 2 4 M エピトープ、G o n o c o c c a l p i l i n、仮性狂犬病ウイルス g 5 0 (g p D)、仮性狂犬病ウイルス I I (g p B)、仮性狂犬病ウイルス I I I (g p C)、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質 H、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質 E、伝染性胃腸炎糖タンパク質 1 9 5、伝染性胃腸炎マトリックスタンパク質、または、ヒト C 型肝炎ウイルス糖タンパク質 E 1 もしくは E 2。

20

【 0 0 8 7】

加えて、本明細書に記載した C A R ポリペプチドの細胞外抗原結合ドメインは、疾患または障害と関連する抗原（例えば、本明細書に記載した腫瘍抗原または病原性抗原）を標的とする治療薬にコンジュゲートしたタグに対して特異的なものとし得る。一部の事例では、治療薬にコンジュゲートしたタグは、抗原性のものとしてすることができ、C A R ポリペプチドの細胞外抗原結合ドメインは、抗原性タグに対する高い結合親和性と、特異性を有する抗体の抗原結合フラグメント（例えば、s c F v）とすることができる。例示的な抗原性タグとして、ビオチン、アビジン、蛍光分子（例えば、G F P、Y R P、ルシフェラーゼ、または、R F P）、M y c、F l a g、H i s（例えば、6 x H i s などのポリ H i s）、H A（ヘマグルチニン）、G S T、M B P（マルトース結合タンパク質）、K L H（キーホールリンペットヘモシアニン）、t r x、T 7、H S V、V S V（例えば、V S V - G）、G l u - G l u、V 5、e - タグ、S - タグ、K T 3、E 2、A u 1、A u 5、及び/または、チオレドキシンがあるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 8 8】

その他の事例では、治療薬にコンジュゲートしたタグは、リガンド - 受容体ペアのメンバーであり、細胞外抗原結合ドメインは、タグに結合するリガンド - 受容体ペアのその他のメンバーまたはそのフラグメントを含む。例えば、治療薬にコンジュゲートしたタグを、ビオチンとすることができ、C A R ポリペプチドの細胞外抗原結合ドメインは、アビジンのビオチン結合フラグメントを含み得る。例えば、U r b a n s k a e t a l . , 2 0 1 2 , L o h m u e l l e r e t a l . , 2 0 1 8 を参照されたい。その他の例とし

40

50

て、細胞外抗原結合ドメインが、タンパク質タグ、例えば、FITC (Tamada et al., 2012, Kim et al., 2015; Cao et al., 2016; 及び、Ma et al., 2016)、PNE (Rodgers et al., 2016)、La-SS-B (Cartellieri et al., 2016)、ビオチン (Lohmullular et al., 2017)、及び、ロイシン-ジッパー (Choe et al., 2018) などに特異的な scFv フラグメントである抗タグ CAR がある。本明細書に記載した CAR ポリペプチドに使用する抗原結合ドメインの選択は、当業者に自明である。例えば、選択は、標的抗原のタイプ、及び、結合相互作用の所望の親和性などの因子に依存し得る。

【0089】

本明細書に記載した CAR ポリペプチドのいずれかの細胞外抗原結合ドメインは、標的抗原 (例えば、本明細書に記載した標的の内のいずれか 1 つ)、または、その抗原性エпитープに対する好適な結合親和性を有し得る。本明細書で使用する「結合親和性」とは、見かけの結合定数すなわち K_A のことを意味する。 K_A は、解離定数 (K_D) の逆数である。本明細書に記載した CAR ポリペプチドに使用する細胞外抗原結合ドメインは、標的抗原または抗原性エпитープに対して、少なくとも 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M、または、それ以下の結合親和性 (K_D) を有し得る。強い結合親和性は、低い K_D に対応している。第 2 の抗原と比較した、第 1 の抗原に対する細胞外抗原結合ドメインの大きな親和性の結合は、第 2 の抗原に結合するための K_A (または、数値の K_D) と比較して、第 1 の抗原に結合するためのより大きな K_A (または、小さな数値の K_D) で示し得る。このような事例では、細胞外抗原結合ドメインは、第 2 の抗原 (例えば、二次構造での同一の第 1 のタンパク質、もしくは、その模倣体; または、第 2 のタンパク質) と比較して、第 1 の抗原 (例えば、一次構造での第 1 のタンパク質、もしくは、その模倣体) に対して特異性を有する。結合親和性の (例えば、特異性、または、その他の比較での) 差異は、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000、または、 10^5 倍とすることができる。

【0090】

結合親和性 (または、結合特異性) は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ELISA、表面プラズモン共鳴、または、分光法 (例えば、蛍光アッセイを用いたもの) などの様々な方法を使用して測定することができる。結合親和性を評価するための例示的な条件は、HBS-P 緩衝剤 (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、0.005% (v/v) Surfactant P20) 中である。これらの技術を使用して、標的タンパク質濃度に応じた、結合した結合タンパク質の濃度を測定することができる。結合した結合タンパク質の ([結合した]) 濃度は、一般的に、以下の方程式で、遊離標的タンパク質の濃度 ([遊離]) と関連している:

$$[\text{結合した}] = [\text{遊離}] / (K_d + [\text{遊離}])$$

【0091】

しかしながら、例えば、ELISA または FACS 解析などの方法を使用して測定した、 K_A に比例する親和性の定量的測定値を得ることが時に十分であり、それにより、比較のために、例えば、大きな親和性が、例えば、2 倍を超えるか否かを測定するために、例えば、機能アッセイ、例えば、インビトロまたはインビボアッセイでの活性を使用して、親和性の定性的な測定値を得ること、または、親和性の推定を得ることができるので、 K_A の正確な測定を実施することが常に必要というわけではない。

【0092】

B. 膜貫通ドメイン

本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチド (例えば、ACTR ポリペプチド、または、CAR ポリペプチド) の膜貫通ドメインは、当該技術分野で公知のあらゆる形態とすることができる。本明細書で使用する「膜貫通ドメイン」とは、細胞膜内、好ましくは、真核細胞膜内において熱力学的に安定なあらゆるタンパク質構造のことを意味する。本明

10

20

30

40

50

細書で使用するキメラ受容体ポリペプチドでの使用に適応する膜貫通ドメインは、天然タンパク質から取得し得る。あるいは、膜貫通ドメインは、合成の非天然タンパク質セグメント、例えば、細胞膜内において熱力学的に安定な疎水性タンパク質セグメントとすることができる。

【0093】

膜貫通ドメインは、膜貫通ドメインの三次元構造に基づいて分類される。例えば、膜貫通ドメインは、アルファヘリックス、2つ以上のアルファヘリックスの複合体、ベータ-バレル、または、細胞のリン脂質二重層を貫通するあらゆるその他の安定構造を形成し得る。さらに、膜貫通ドメインは、さらに、または、あるいは、膜貫通ドメインが膜を貫通して通過する回数、及び、タンパク質の配向を含む、膜貫通ドメインのトポロジーに基づいて分類し得る。例えば、1回貫通型膜タンパク質は、細胞膜を1回貫通し、複数回貫通型膜タンパク質は、細胞膜を少なくとも2回（例えば、2、3、4、5、6、7、または、それ以上の回数）貫通する。

10

【0094】

膜タンパク質は、その末端のトポロジー、及び、細胞の内外に対する膜貫通セグメント（複数可）のトポロジーに応じて、I型、II型、または、III型と定義し得る。I型膜タンパク質は、1回膜貫通領域を有し、そして、タンパク質のN末端が細胞の脂質二重層の細胞外側上に存在し、かつ、タンパク質のC末端が細胞質側上に存在するように配向している。II型膜タンパク質も、1回膜貫通領域を有しており、そして、タンパク質のC末端が、細胞の脂質二重層の細胞外側上に存在し、かつ、タンパク質のN末端が、細胞質側上に存在するように配向している。III型膜タンパク質は、複数の膜貫通セグメントを有しており、そして、膜貫通セグメントの数、ならびに、N末端及びC末端の位置に基づいてさらに分類し得る。

20

【0095】

一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドの膜貫通ドメインは、I型1回貫通型膜タンパク質に由来する。1回貫通型膜タンパク質として、CD8、CD8、4-1BB/CD137、CD27、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16、OX40/CD134、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、TCR、TCR、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS、及び、FGFR2B、があるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、次に示す：CD8、CD8、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16、OX40/CD134、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、及び、FGFR2Bから選択される膜タンパク質に由来する。一部の事例では、膜貫通ドメインは、CD8のものである（例えば、膜貫通ドメインは、CD8のものである）。一部の事例では、膜貫通ドメインは、4-1BB/CD137のものである。その他の事例では、膜貫通ドメインは、CD28のものである。一部の事例では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、あらゆる非CD16A受容体に由来するヒンジドメインを含み得ない。一部の事例では、このようなキメラ受容体ポリペプチドは、ヒンジドメインを含み得ない。あるいは、または、加えて、そのようなキメラ受容体ポリペプチドは、本明細書に記載したような2つ以上の共刺激領域を含み得る。その他の事例では、膜貫通ドメインは、CD34のものである。なおもその他の事例では、膜貫通ドメインは、ヒトCD8に由来しない。一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドの膜貫通ドメインは、1回貫通型アルファヘリックスである。

30

40

【0096】

複数回貫通型膜タンパク質に由来する膜貫通ドメインも、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドでの使用に適応し得る。複数回貫通型膜タンパク質は、複合アルファヘリックス構造（例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、または、それ以上のアルファヘリックス）、または、ベータシート構造を含み得る。複数回貫通型膜タンパク質のN

50

末端及びC末端は、脂質二重層の相対する側に存在することが好ましく、例えば、タンパク質のN末端は、脂質二重層の細胞質側に存在し、かつ、タンパク質のC末端は、細胞外側に存在する。複数回貫通型膜タンパク質に由来する1つのヘリックス貫通部、または、複数のヘリックス貫通部のいずれかを、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドの構築のために使用することができる。

【0097】

本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドに使用する膜貫通ドメインは、合成非天然タンパク質セグメントの少なくとも一部も含み得る。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、合成非天然アルファヘリックス、または、ベータシートである。一部の実施形態では、タンパク質セグメントは、少なくとも約20アミノ酸、例えば、少なくとも18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、または、それ以上のアミノ酸である。合成膜貫通ドメインの例は、当該技術分野、例えば、米国特許第7,052,906B1号、及び、PCT公開第WO2000/032776A2号において公知であり、それぞれの文献での関連する開示は、参照により、本明細書で援用する。

10

【0098】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、システイン残基を含まない。一部の実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、1つのシステイン残基を含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、2つのシステイン残基を含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、3つ以上（例えば、3、4、5、または、それ以上）のシステイン残基を含む。

20

【0099】

膜貫通ドメインは、膜貫通領域と、膜貫通ドメインのC末端側に位置する細胞質領域とを含み得る。膜貫通ドメインの細胞質領域は、3つ以上のアミノ酸を含み得るものであり、そして、一部の実施形態では、脂質二重層内において膜貫通ドメインが配向することを補助する。一部の実施形態では、1つ以上のシステイン残基が、膜貫通ドメインの膜貫通領域内に存在している。一部の実施形態では、1つ以上のシステイン残基が、膜貫通ドメインの細胞質領域内に存在している。一部の実施形態では、膜貫通ドメインの細胞質領域は、正に荷電したアミノ酸を含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインの細胞質領域は、アミノ酸アルギニン、セリン、及び、リジンを含む。

30

【0100】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインの膜貫通領域は、疎水性アミノ酸残基を含む。一部の実施形態では、膜貫通領域は、主として、疎水性アミノ酸残基、例えば、アラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、または、バリンなどを含む。一部の実施形態では、膜貫通領域は、疎水性である。一部の実施形態では、膜貫通領域は、ポリ-ロイシン-アラニン配列を含む。

【0101】

タンパク質またはタンパク質セグメントの疎水性指標、疎水特性、または、親水特性は、例えば、Kyte及びDoolittleの疎水性指標解析を含む、当該技術分野で公知のあらゆる方法を使用して、評価することができる。

40

【0102】

C. 共刺激シグナル伝達ドメイン

数多くの免疫細胞は、細胞の増殖、分化、及び、生存を促すことに加えて、細胞のエフェクター機能を活性化するために、抗原特異的シグナルの刺激の他に、共刺激を必要としている。一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチド、例えば、本明細書に記載したACTRまたはCARポリペプチドなどは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む。特定の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドは、CD28共刺激シグナル伝達ドメイン、または、4-1BB(CD137)共刺激シグナル伝達ドメインを含み得る。本明細書で使用する用語「共刺激シグナル伝達ドメイン」とは、細胞内でシグナル伝達を媒介して、エフェクター機能などの免疫応答（二次シグナル）を誘導する共刺激シグ

50

ナル伝達タンパク質の少なくとも1つのフラグメントのことを意味する。当該技術分野で公知のとおり、T細胞などの免疫細胞の活性化は、2つのシグナル：(1) T細胞受容体(TCR)と、抗原提示細胞が提示する抗原ペプチド/MHC複合体との結合によって誘発され、一般的には、このTCR複合体の構成要素であるCD3によって駆動される抗原特異的シグナル(一次シグナル)；及び、(ii) 共刺激受容体と、そのリガンドとの間の相互作用によって誘発される共刺激シグナル(二次シグナル)を必要とすることが多い。共刺激受容体は、TCR誘発シグナル伝達の他に、共刺激シグナル(二次シグナル)を伝達し、そして、T細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、または、好酸球などの免疫細胞が介在する反応を調節する。

【0103】

宿主細胞(例えば、免疫細胞)での共刺激シグナル伝達ドメインの活性化は、細胞のサイトカインの生産及び分泌、貪食性、増殖、分化、生存、及び/または、細胞傷害を改善または抑制し得る。あらゆる共刺激分子の共刺激シグナル伝達ドメインは、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドでの使用に適応し得る。共刺激シグナル伝達ドメインのタイプ(複数可)は、キメラ受容体ポリペプチドが発現し得る免疫細胞のタイプ(例えば、T細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、または、好酸球)、及び、所望の免疫エフェクター機能(例えば、ADCC)などの因子に基づいて選択される。キメラ受容体ポリペプチドに使用する共刺激シグナル伝達ドメインの例として、B7/CD28ファミリーのメンバー(例えば、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC、及び、PDCD6)；TNFスーパーファミリーのメンバー(例えば、4-1BB/TNFRSF9/CD137、4-1BBリガンド/TNFSF9、BAFF/BLYS/TNFSF13B、BAFFR/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27リガンド/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30リガンド/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40リガンド/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITRリガンド/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、リンフォトキシン-アルファ/TNF-ベータ、OX40/TNFRSF4、OX40リガンド/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF-アルファ、及び、TNFRII/TNFRSF1B)；SLAMファミリーのメンバー(例えば、2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6、及び、SLAM/CD150)；ならびに、あらゆるその他の共刺激分子、例えば、CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLAクラスI、HLA-DR、イカロス、インテグリンアルファ4/CD49d、インテグリンアルファ4ベータ1、インテグリンアルファ4ベータ7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、デクチン-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLPR、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、及び、NKG2Cなどの共刺激タンパク質の細胞質シグナル伝達ドメインがあるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1(CD11a)、もしくは、CD2、または、それらのあらゆるバリエーションのものである。

【0104】

本明細書に記載した共刺激シグナル伝達ドメインのいずれかのバリエーションもまた本開示の範囲内であり、その結果、共刺激シグナル伝達ドメインは、免疫細胞の免疫応答を調節

10

20

30

40

50

することができる。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、野生型同等物と比較して、最大10（例えば、1、2、3、4、5、または、8）のアミノ酸残基の変異、例えば、アミノ酸置換、欠失、または、付加などを含む。1つ以上のアミノ酸変異（例えば、アミノ酸置換、欠失、または、付加）を含むこのような共刺激シグナル伝達ドメインを、バリエーションと称し得る。

【0105】

共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸残基の変異は、変異を含まない共刺激シグナル伝達ドメインと比較して、シグナル伝達の改善、及び、免疫応答の刺激の改善をもたらし得る。共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸残基の変異は、変異を含まない共刺激シグナル伝達ドメインと比較して、シグナル伝達の抑制、及び、免疫応答の刺激抑制をもたらし得る。例えば、天然CD28アミノ酸配列の残基186及び187の変異は、キメラ受容体ポリペプチドの共刺激ドメインによる共刺激活性の改善、及び、免疫応答の誘導をもたらし得る。一部の実施形態では、変異は、CD28共刺激ドメインのグリシン残基を有する186位と187位のそれぞれでのリジンの置換であり、CD28_{LL} GGバリエーションと称する。ドメインの共刺激活性を改善または抑制し得る、共刺激シグナル伝達ドメインにて生成可能な別の変異は、当業者に自明である。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、4-1BB、CD28、OX40、または、CD28_{LL} GGバリエーションのものである。

10

【0106】

一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドは、単一の共刺激ドメイン、例えば、CD27共刺激ドメイン、CD28共刺激ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、ICOS共刺激ドメイン、または、OX40共刺激ドメインなどを含有し得る。

20

【0107】

一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドは、2つ以上（例えば、2、3、または、それ以上）の共刺激シグナル伝達ドメインを含み得る。一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドは、2つ以上の同一の共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、CD28の共刺激シグナル伝達ドメインの2つの複製を含む。一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドは、異なる共刺激タンパク質に由来する2つ以上の共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載した任意の2つ以上の共刺激タンパク質などを含む。共刺激シグナル伝達ドメインのタイプ（複数可）の選択は、キメラ受容体ポリペプチドと共に使用する宿主細胞のタイプ（例えば、T細胞、または、NK細胞）、及び、所望の免疫エフェクター機能などの因子に基づき得る。一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドは、2つの共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、CD28の共刺激シグナル伝達ドメインの2つの複製を含む。一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチドは、異なる共刺激受容体に由来する2つ以上の共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載した任意の2つ以上の共刺激受容体など、例えば、CD28と4-1BB、CD28とCD27、CD28とICOS、CD28_{LL} GGバリエーションと4-1BB、CD28とOX40、または、CD28_{LL} GGバリエーションとOX40を含み得る。一部の実施形態では、2つの共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28と4-1BBである。一部の実施形態では、2つの共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28_{LL} GGバリエーションと4-1BBである。一部の実施形態では、2つの共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28とOX40である。一部の実施形態では、2つの共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28_{LL} GGバリエーションとOX40である。一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、CD28とICOSLの組み合わせを含有し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、CD28とCD27の組み合わせを含有し得る。特定の実施形態では、4-1BB共刺激ドメインは、CD28またはCD28_{LL} GGバリエーション共刺激シグナル伝達ドメインのN末端側に位置している。

30

40

【0108】

一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドは、共刺激シグナル伝達ドメインを含まない。

50

【 0 1 0 9 】

D . 細胞質シグナル伝達ドメイン

あらゆる細胞質シグナル伝達ドメインを使用して、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチド（例えば、A C T R、または、C A Rポリペプチド）を作製することができる。このような細胞質ドメインは、免疫細胞の増殖、及び/または、活性化をもたらす細胞シグナル伝達（一次シグナル伝達）の誘発に關与するあらゆるシグナル伝達ドメインとし得る。本明細書に記載した細胞質シグナル伝達ドメインは、免疫細胞を完全に活性化させるための共刺激または二次シグナルを中継することが当該技術分野で公知である共刺激シグナル伝達ドメインではない。

【 0 1 1 0 】

本明細書に記載した細胞質ドメインは、免疫受容体チロシンをベースとした活性化モチーフ（I T A M）ドメイン（例えば、少なくとも1つのI T A Mドメイン、少なくとも2つのI T A Mドメイン、または、少なくとも3つのI T A Mドメイン）を含み得る、または、I T A Mを含み得ない。本明細書で使用する「I T A M」は、一般的には、数多くの免疫細胞で発現するシグナル伝達分子の尾部に存在している保存タンパク質モチーフである。このモチーフは、6 ~ 8 個のアミノ酸で隔てられたアミノ酸配列Y x x L / I の2つのリピートを含み得るものであり、式中、それぞれのxは、独立して、あらゆるアミノ酸であり、保存モチーフY x x L / I x (6 ~ 8) Y x x L / I をもたらす。シグナル伝達分子内のI T A Mは、シグナル伝達分子の活性化に続いて、I T A Mでのチロシン残基のリン酸化が少なくとも部分的に介在する細胞内のシグナル伝達において重要である。I T A Mは、シグナル伝達経路のその他のタンパク質のためのドッキング部位としても機能し得る。

【 0 1 1 1 】

一部の事例では、細胞質シグナル伝達ドメインは、C D 3 またはF c R 1 のものである。その他の事例では、細胞質シグナル伝達ドメインは、ヒトC D 3 に由来しない。なおもその他の事例では、細胞質シグナル伝達ドメインは、同一キメラ受容体ポリペプチドの細胞外F c 結合ドメインがC D 1 6 Aに由来する場合、F c 受容体に由来しない。

【 0 1 1 2 】

ある特定の実施形態では、相加効果または相乗効果のために、幾つかのシグナル伝達ドメインと一緒に融合することができる。有用な別のシグナル伝達ドメインとして、T C Rゼータ鎖、C D 2 8、O X 4 0 / C D 1 3 4、4 - 1 B B / C D 1 3 7、F c R I y、I C O S / C D 2 7 8、I L 2 R - ベータ / C D 1 2 2、I L - 2 R - ガンマ / C D 1 3 2、及び、C D 4 0 の内の1つ以上の一部または全てがあるが、これらに限定されない。

【 0 1 1 3 】

その他の実施形態では、本明細書に記載した細胞質シグナル伝達ドメインは、I T A Mモチーフを含まない。例として、J a k / S T A T、T o l l - インターロイキン受容体（T I R）、及び、チロシンキナーゼの細胞質シグナル伝達ドメインがあるが、これらに限定されない。

【 0 1 1 4 】

E . ヒンジドメイン

一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチド、例えば、本明細書に記載したA C T RまたはC A Rポリペプチドなどは、細胞外リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置するヒンジドメインをさらに含む。ヒンジドメインは、タンパク質の2つのドメインの間に通常は存在するアミノ酸セグメントであり、タンパク質を柔軟にして、ドメインの一方または両方の互いに関する移動を可能ならしめる。キメラ受容体ポリペプチドの膜貫通ドメインに関して、細胞外リガンド結合ドメインのこのような柔軟性及び移動を可能とするあらゆるアミノ酸配列を、使用することができる。

【 0 1 1 5 】

ヒンジドメインを取り込むための当該技術分野で公知のヒンジドメインのあらゆるタンパク質は、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドでの使用に適応する。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、天然タンパク質のヒンジドメインの少なくとも一部であ

10

20

30

40

50

り、そして、キメラ受容体ポリペプチドに柔軟性を付与する。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、CD8である。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、CD8のヒンジドメインの一部、例えば、CD8のヒンジドメインの少なくとも15個（例えば、20、25、30、35、または、40個）の連続アミノ酸を含有するフラグメントである。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、CD28のものである。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、CD28のヒンジドメインの一部であり、例えば、CD28のヒンジドメインの少なくとも15個（例えば、20、25、30、35、または、40個）の連続したアミノ酸を含有するフラグメントである。ヒンジドメイン、及び/または、膜貫通ドメインは、N末端部分、C末端部分、または、その両方において、さらなるアミノ酸（例えば、15 aa、10 - aa、8 - aa、6 - aa、または、4 - aa）に連結し得る。例えば、Ying et al., Nature Medicine, 25(6): 947 - 953 (2019) に、それらの例が認められる。

10

【0116】

一部の実施形態では、ヒンジドメインは、CD16A受容体のもの、例えば、CD16A受容体の最大40（例えば、20、25、30、35、または、40）の連続アミノ酸から構成し得る、CD16A受容体のヒンジドメイン全体、または、その一部である。このようなキメラ受容体ポリペプチド（例えば、ACTRポリペプチド）は、異なる受容体（非CD16A受容体）に由来するヒンジドメインを含有し得ない。

【0117】

抗体、例えば、IgG、IgA、IgM、IgE、または、IgD抗体などのヒンジドメインも、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドでの使用に適応する。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、抗体の定常ドメインCH1及びCH2を連結しているヒンジドメインである。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、抗体のものであり、かつ、抗体のヒンジドメインと、抗体の1つ以上の定常領域を含む。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、抗体のヒンジドメインと、抗体のCH3定常領域を含む。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、抗体のヒンジドメイン、ならびに、抗体のCH2定常領域及びCH3定常領域を含む。一部の実施形態では、抗体は、IgG、IgA、IgM、IgE、または、IgD抗体である。一部の実施形態では、抗体は、IgG抗体である。一部の実施形態では、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、または、IgG4抗体である。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、IgG1抗体のヒンジ領域、ならびに、CH2定常領域及びCH3定常領域を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、IgG1抗体のヒンジ領域と、CH3定常領域を含む。

20

30

【0118】

非天然ペプチドは、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドのためのヒンジドメインとしても使用し得る。一部の実施形態では、細胞外標的結合ドメインのC末端と、膜貫通ドメインのN末端との間のヒンジドメインは、ペプチドリンカー、例えば、(Gly_xSer)_nリンカーなどであり、式中、x及びnは、独立して、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または、それ以上などの3～12の整数とすることができる。一部の実施形態では、ヒンジドメインは(Gly₄Ser)_n（配列番号95）であり、式中、nは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または、60などの3～60の整数とすることができる。特定の実施形態では、nは、60超の整数とすることができる。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、(Gly₄Ser)₃（配列番号96）である。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、(Gly₄Ser)₆（配列番号97）である。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、(Gly₄Ser)₉（配列番号98）である。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、(Gly₄Ser)₁₂（配列番号99）である。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、(Gly₄Ser)₁₅（配列番号100）である。一部の実施形態では、ヒンジド

40

50

メインは、(Gly₄Ser)₃₀(配列番号101)である。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、(Gly₄Ser)₄₅(配列番号102)である。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、(Gly₄Ser)₆₀(配列番号103)である。

【0119】

その他の実施形態では、ヒンジドメインは、様々な長さの親水性残基(例えば、10~80アミノ酸残基)で構成される非構造的なポリペプチドである延長型組換えポリペプチド(XTEN)である。XTENペプチドのアミノ酸配列は、当業者に自明であり、例えば、米国特許第8,673,860号に認めることができ、その文献での関連する開示は、参照により、本明細書で援用する。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、XTENペプチドであり、60アミノ酸を含む。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、XTENペプチドであり、30アミノ酸を含む。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、XTENペプチドであり、45アミノ酸を含む。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、XTENペプチドであり、15アミノ酸を含む。

10

【0120】

本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドを作り出すために使用するあらゆるヒンジドメインは、最大250アミノ酸残基を含有し得る。一部の事例では、キメラ受容体ポリペプチドは、例えば、150~250アミノ酸残基(例えば、150~180アミノ酸残基、180~200アミノ酸残基、または、200~250アミノ酸残基)を含有する、比較的長いヒンジドメインを含有し得る。その他の事例では、キメラ受容体ポリペプチドは、60~150アミノ酸残基(例えば、60~80、80~100、100~120、または、120~150アミノ酸残基)を含有し得る中程度のサイズのヒンジドメインを含有し得る。あるいは、キメラ受容体ポリペプチドは、60未満のアミノ酸残基(例えば、1~30アミノ酸、または、31~60アミノ酸)を含有し得る短いヒンジドメインを含有し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチド(例えば、ACTRポリペプチド)は、ヒンジドメインを含有しない、または、非CD16A受容体に由来するヒンジドメインを含有しない。

20

【0121】

F. シグナルペプチド

一部の実施形態では、キメラ受容体ポリペプチド(例えば、ACTR、または、CARポリペプチド)は、ポリペプチドのN末端に、シグナルペプチド(シグナル配列としても公知である)も含み得る。一般的に、シグナル配列は、ポリペプチドを細胞内の所望の部位へと仕向けるペプチド配列である。一部の実施形態では、シグナル配列は、キメラ受容体ポリペプチドを細胞の分泌経路に仕向け、そして、キメラ受容体ポリペプチドの脂質二重層への組み込みと、アンカリングを可能ならしめる。本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドでの使用に適応可能な天然タンパク質のシグナル配列または合成非天然シグナル配列を含むシグナル配列は、当業者に自明である。一部の実施形態では、シグナル配列はCD8に由来する。一部の実施形態では、シグナル配列は、CD28に由来する。その他の実施形態では、シグナル配列は、マウスカッパ鎖に由来する。なおその他の実施形態では、シグナル配列は、CD16に由来する。

30

【0122】

G. ACTRポリペプチドの例

本明細書に記載した方法及び組成物と共に使用するための例示的なACTR構築物は、例えば、本明細書及び図面で認め得るものであり、または、PCT特許公開第WO2016040441A1号、第WO2017/161333号、及び、PCT出願第PCT/US2018/015999号で認め得るものであり、これらの文献の各々は、この目的に関して、参照により、本明細書で援用する。本明細書に記載したACTRポリペプチドは、IgG分子のFc部分に対する結合親和性と特異性とを有するCD16A細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び、CD3細胞質シグナル伝達ドメインを含み得る。一部の実施形態では、ACTRポリペプチドは、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含み得るものであり、その内の1つを、CD28共刺激シグナル伝達ドメイン、または

40

50

、 4 - 1 B B 共刺激シグナル伝達ドメインとし得る。A C T R ポリペプチドは、宿主細胞上で発現する際に、標的分子及び C D 3 細胞質シグナル伝達ドメインに結合するために、細胞外リガンド結合ドメインが細胞外に位置するように構成されている。共刺激シグナル伝達ドメインは、活性化、及び/または、エフェクターシグナル伝達を誘発するために、細胞質内に位置し得る。

【 0 1 2 3 】

一部の実施形態では、本明細書に記載した A C T R ポリペプチドは、N末端からC末端に向けて、C D 1 6 A 細胞外ドメインなどの F c 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、任意の1つ以上の共刺激ドメイン（例えば、C D 2 8 共刺激ドメイン、4 - 1 B B 共刺激シグナル伝達ドメイン、O X 4 0 共刺激シグナル伝達ドメイン、C D 2 7 共刺激シグナル伝達ドメイン、または、I C O S 共刺激シグナル伝達ドメイン）、及び、C D 3 細胞質シグナル伝達ドメインを含み得る。

10

【 0 1 2 4 】

あるいは、または、加えて、本明細書に記載した A C T R ポリペプチドは、互いに連結し得る、または、細胞質シグナル伝達ドメインで隔て得る、2つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含有し得る。A C T R ポリペプチドにおいて、細胞外 F c 結合部、膜貫通ドメイン、任意の共刺激シグナル伝達ドメイン（複数可）、及び、細胞質シグナル伝達ドメインは、直接的に、または、ペプチドリinkerを介して、互いに連結し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載した A C T R ポリペプチドのいずれかは、N末端にシグナル配列を含み得る。

20

【 0 1 2 5 】

本明細書に記載した例示的な A C T R ポリペプチドを、表 4 に記載する。これらの例示的な構築物は、任意の共刺激ドメイン、及び、細胞質シグナル伝達ドメインの位置を交換することができ、また、N末端からC末端に向けて、シグナル配列、F c 結合ドメイン（例えば、F c 受容体の細胞外ドメイン）、ヒンジドメイン、及び、膜貫通部を有する。

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4 : A C T R ポリペプチドの例示的な構成要素。

例示的な A A 配列 (配列番 号)	シグナ ル配列	Fc 受容体の 細胞外ドメイ ン	ヒンジ ドメイ ン	膜貫通ドメイ ン	共刺激ド メイン	細胞質 シグナ ル伝達 ドメイ ン
1	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
2	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	4-1BB (CD13 7)	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
3	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	CD28	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
4	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	CD34	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
5	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	設計した疎水 性 TM ドメイ ン	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
6	C D 8 α	CD32A	C D 8 α	C D 8 α	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
7	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	CD28	CD3 ζ
8	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	OX40 (CD 134)	CD3 ζ
9	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	CD28 + 4-1BB	CD3 ζ
10	C D 8 α	CD16A-V158	無	C D 8 α	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
11	C D 8 α	CD16A-V158	XTEN	C D 8 α	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
12	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	CD28 LL → GG 変 異	CD3 ζ
13	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	CD28 LL → GG 変 異 + 4-1BB	CD3 ζ
14	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	CD4	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
15	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	CD4	CD28 LL → GG 変 異 + 4-1BB	CD3 ζ
16	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	Fc ϵ RI γ	4-1BB (C D137)	CD3 ζ

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

17	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	設計した疎水性 TM ドメイン、二量体化と予測	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
18	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	CD 8 β	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
19	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	C16 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
20	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	OX40 (CD134)	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
21	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	CD3 ζ	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
22	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	CD3 ε	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
23	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	CD3 γ	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
24	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	CD3 δ	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
25	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	TCR- α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
26	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	CD32	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
27	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	CD64	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
28	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	VEGFR2	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
29	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	FAS	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
30	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8 α	FGFR2B	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
31	CD 8 α	CD16A-F158	CD 8 α	CD 8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
32	CD 8 α	CD64A	CD 8 α	CD 8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
33	CD 8 α	CD16A-V158	IgG1 (ヒンジ-CH2-CH3)	CD 8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
34	CD 8 α	CD16A-V158	IgG1 (ヒンジ-CH3)	CD 8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
35	CD 8 α	CD16A-V158	IgG1 (ヒンジ)	CD 8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

36	CD8 α	CD16A-V158	CD8-アルファフラグメント 1 (30 アミノ酸)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
37	CD8 α	CD16A-V158	CD8-アルファフラグメント 2 (15 アミノ酸)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
38	CD8 α	CD16A-V158	(Gly4Ser)x3 (60 アミノ酸)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
39	CD8 α	CD16A-V158	(Gly4Ser)x6 (45 アミノ酸)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
40	CD8 α	CD16A-V158	(Gly4Ser)x9 (30 アミノ酸)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
41	CD8 α	CD16A-V158	(Gly4Ser)x12 (15 アミノ酸)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
42	CD8 α	CD16A-V158	XTEN (60 アミノ酸)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
43	CD8 α	CD16A-V158	XTEN (30 アミノ酸)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
44	CD8 α	CD16A-V158	XTEN (15 アミノ酸)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

45	CD28	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
46	マウス カップ 鎖	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
47	CD16	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	4-1BB (C D137)	CD3 ζ
48	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	ICOS	CD3 ζ
49	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	CD27	CD3 ζ
50	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	GITR	CD3 ζ
51	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	HVEM	CD3 ζ
52	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	TIM1	CD3 ζ
53	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	LFA1 (CD 11a)	CD3 ζ
54	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	CD2	CD3 ζ
55	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	F c ϵ R 1 γ	4-1BB (C D137)	F c ϵ R 1 γ
56	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8 α	C D 8 α	4-1BB (C D137)	F c ϵ R 1 γ
57	C D 8 α	CD16A-V158	CD28 (例え ば、39 aa)	CD28	CD28	CD3 ζ
58	C D 8 α	CD16A-V158	無	C D 8	CD28	CD3 ζ
59	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8	C D 8	CD28 + C D27	CD3 ζ
60	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8	C D 8	CD28 + 0 X40	CD3 ζ
61	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8	C D 8	4-1BB + CD28	CD3 ζ
62	C D 8 α	CD16A-V158	CD28	CD28	CD28 + 4 -1BB	CD3 ζ
63	C D 8 α	CD16A-V158	CD28	CD28	4-1BB	CD3 ζ
64	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8	C D 8	CD27	CD3 ζ
65	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8	C D 8	CD28	CD3 ζ
66	C D 8 α	CD16A-V158	C D 8	C D 8	ICOS	CD3 ζ

10

20

30

40

【表 4 - 5】

67	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8	CD 8	OX40	CD3 ζ
68	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8	CD 8	CD28 及 ζ ICOS	CD3 ζ
69	CD 8 α	CD16A-V158	無	CD 8	4-1BB	CD3 ζ
70	CD 8 α	CD16A-V158	無	CD 8	CD27	CD3 ζ
71	CD 8 α	CD16A-V158	無	CD 8	ICOS	CD3 ζ
72	CD 8 α	CD16A-V158	無	CD 8	OX40	CD3 ζ
73	CD 8 α	CD16A-V158	無	CD 8 + 4aa	4-1BB	CD3 ζ
74	CD 8 α	CD16A-V158	無	CD 8 + 4aa	CD28	CD3 ζ
75	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8	CD28	CD28	CD3 ζ
76	CD 8 α	CD16A-V158	CD28 (26aa)	CD28	CD28	CD3 ζ
77	CD 8 α	CD16A-V158	CD28 (16aa)	CD28	CD28	CD3 ζ
78	CD 8 α	CD16A-V158	無	CD28	CD28	CD3 ζ
79	CD 8 α	CD16A-V158	CD 8	CD 8	41BB	CD3 ζ
80	CD 8 α	CD16A-V158	CD28 (39 a a)	CD 8	CD28	CD3 ζ

【 0 1 2 6 】

例示的な A C T R ポリペプチドのアミノ酸配列を、以下に記載する（シグナル配列は、イタリック体）。

配列番号 1：

【化 1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQ
ASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNG
KGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPA
PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP
VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 2：

10

20

30

40

50

【化 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFFLTFRFSVVKRG
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR

配列番号 3 :

【化 3】

10

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR

配列番号 4 :

【化 4】

20

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLIALVTSGALLAVLGITGYFLMNRKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 5 :

【化 5】

30

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLAALLALLAALLALLAALLARSKKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 6 :

【化 6】

40

MALPVTALLLPLALLLHAARPQAAAPPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLIPT
HTQPSYRFKANNDSDGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLTQPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTF
FQNGKSQKFSHLDPTFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTITVQVPSMGSSSPMGTTTPAPRPPTP
APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 7 :

50

【化 7】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSR
LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

配列番号 8 :

【化 8】

10

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCALYLLR
RDQRLPPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 9 :

【化 9】

20

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSR
LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE
GGCELVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 10 :

【化 10】

30

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELVRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 11 :

【化 11】

40

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGG
PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 12 :

【化 1 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSVITLYCRSKRSR
GGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

配列番号 1 3 :

【化 1 3】

10

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSVITLYCRSKRSR
GGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 1 4 :

【化 1 4】

20

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAGLLLFIFGLGIFFCVRKRGRK
KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

配列番号 1 5 :

【化 1 5】

30

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAGLLLFIFGLGIFFCVRRSKRS
RGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 1 6 :

【化 1 6】

40

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 1 7 :

50

【化 1 7】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLLLLLGVLAGVLATLAALLARSKKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 1 8 :

【化 1 8】

10

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 1 9 :

【化 1 9】

20

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVSFCLVMVLLFAVDTGlyFSVKTNKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 2 0 :

【化 2 0】

30

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVAAI LGLGLVLGGLGPLAILLALYKGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 2 1 :

【化 2 1】

40

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 2 2 :

【化 2 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDA
LHMOALPPR

配列番号 2 3 :

【化 2 3】

10

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 2 4 :

【化 2 4】

20

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETKRGRK
KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

配列番号 2 5 :

【化 2 5】

30

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVI GFRI LLLKVAGFNLLMTLRLWKRGRKKL
LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

配列番号 2 6 :

【化 2 6】

40

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDII VAVVIATAVA AIVAAVVALIYCRKKRGR
KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

配列番号 2 7 :

50

【化 2 7】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVLFLAVGIMFLVNTVLWVTIRKEKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

配列番号 2 8 :

【化 2 8】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIIILVGTAVIAMFFWLLLVIILRTKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

10

配列番号 2 9 :

【化 2 9】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLGWLCLLLLPIPLIVWVKRKKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 3 0 :

【化 3 0】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIAIYICIGVFLIACMVVTVILCRMKKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

30

配列番号 3 1 :

【化 3 1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

40

配列番号 3 2 :

【化 3 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTS
TPSYRITSASVNDSGEYRCQRLSGRSDPIQLEIHRGWLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYY
RNGKAFKFFHWNSTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTL
SCETKLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLG
LQLPTPVWFHIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 3 3 :

【化 3 3】

10

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQEPK
SCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE
EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 3 4 :

【化 3 4】

20

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQEPK
SCDKTHTCPGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

配列番号 3 5 :

【化 3 5】

30

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQEPK
SCDKTHTCPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG
CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 3 6 :

【化 3 6】

40

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 3 7 :

50

【化 3 7】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 3 8 :

【化 3 8】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGG
GSGGGGSGGGGSIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 3 9 :

【化 3 9】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT
QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 4 0 :

【化 4 0】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 4 1 :

【化 4 1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
NELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

40

配列番号 4 2 :

【化 4 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGG
PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
NELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

50

配列番号 4 3 :

【化 4 3】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGG
PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 4 4 :

【化 4 4】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGG
PAGSPTSTEEGTIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 4 5 :

【化 4 5】

MLRLLALNLFPSIQVTGGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQ
ASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

20

配列番号 4 6 :

【化 4 6】

METDTLLLVLLLLWVPGSTGDGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

30

配列番号 4 7 :

【化 4 7】

MWQLLLPTALLLVVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQAS
SYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

40

配列番号 4 8 :

【化 4 8】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCCWLTKK
KYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

50

配列番号 4 9 :

【化 4 9】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQRRKYR
SNKGESPEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR

配列番号 5 0 :

【化 5 0】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQLGLHI
WQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWVRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGL
LSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 5 1 :

【化 5 1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCCVKRRK
PRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSTGRSPNHRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 5 2 :

【化 5 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKYFFK
KEVQQLSVSFSSLQIKALQNAVEKEVQAEDNIYIENSLYATDRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR

30

配列番号 5 3 :

【化 5 3】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCYKVGFF
KRNLKEKMEAGRGVNGIPAEDSEQLASGQEAGDPGCLKPLHEKDSSESGGKDRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

配列番号 5 4 :

50

【化 5 4】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRKKQR
SRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPAATSQHPPPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPP
APSGTQVHQKGPPLPRPRVQPKPPHGAENSLSPSSNRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

配列番号 5 5 :

10

【化 5 5】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDPQLCYILDAILFLYGIVLTLTYCRLKIQVR
KAAITSYEKSDGVYTGSTRNQETIYETLKHEKPPQKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCEL

配列番号 5 6 :

【化 5 6】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGSTRNQETIYETLK
HEKPPQ

20

配列番号 5 7 :

【化 5 7】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEV
MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 5 8 :

【化 5 8】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA
PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

配列番号 5 9 :

【化 5 9】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSR
LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSQRRKYSNKGESPEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQE
DYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

50

配列番号 6 0 :

【化 6 0】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSR
LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRRDQRLPPDAHKKPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMOALPPR

配列番号 6 1 :

【化 6 1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRCRFPEEEEGGCELRKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF
AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 6 2 :

【化 6 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEV
MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRCRFPEEEEGGC
ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 6 3 :

【化 6 3】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEV
MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKGGRKKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R

30

配列番号 6 4 :

【化 6 4】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQRRKYR
SNKGESVPEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR

40

配列番号 6 5 :

50

【化 6 5】

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYS PEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSR
LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

配列番号 6 6 :

【化 6 6】

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYS PEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKKYSS
SVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 6 7 :

【化 6 7】

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYS PEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRL
PPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 6 8 :

【化 6 8】

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYS PEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSR
LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVK
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 6 9 :

【化 6 9】

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYS PEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

配列番号 7 0 :

【化 7 0】

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYS PEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQRRKYRSNKGESVPEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPRVK
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 7 1 :

50

【化 7 1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 7 2 :

【化 7 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQ
QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 7 3 :

【化 7 3】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQFAC
DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 7 4 :

【化 7 4】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQFAC
DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSR
SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 7 5 :

【化 7 5】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII FWVRSK
RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

40

配列番号 7 6 :

【化 7 6】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQKSN
GTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGP
TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 7 7 :

50

【化 7 7】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQGKH
LCPSPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP
PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 7 8 :

【化 7 8】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQFWV
LVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 7 9 :

【化 7 9】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

20

配列番号 8 0 :

【化 8 0】

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQ
ASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEVMYPPPYLDN
EKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR
KHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

【0 1 2 7】

H . C A R ポリペプチドの例

本明細書に記載した方法、及び、組成物と共に使用する例示的な C A R ポリペプチドは、例えば、本明細書及び図面に認め得る、または、当該技術分野で公知の C A R ポリペプチドである。本明細書に記載した C A R ポリペプチドは、関係する抗原（例えば、上の表 3 に列挙した抗原）、膜貫通ドメイン、及び、C D 3 細胞質シグナル伝達ドメインに対する結合親和性と特異性を有する一本鎖抗体フラグメント（s c F v）を含む細胞外ドメインを含み得る。一部の実施形態では、C A R ポリペプチドは、1 つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含み得るものであり、その内の 1 つは、C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメイン、または、4 - 1 B B 共刺激シグナル伝達ドメインとし得る。C A R ポリペプチドは、宿主細胞上で発現する際に、標的分子と C D 3 細胞質シグナル伝達ドメインに結合するために、細胞外抗原結合ドメインが細胞外に位置するように構成されている。共刺激シグナル伝達ドメインは、活性化、及び / または、エフェクターシグナル伝達を誘発するために、細胞質内に位置し得る。

40

【0 1 2 8】

一部の実施形態では、本明細書に記載した C A R ポリペプチドは、N 末端から C 末端にかけて、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、任意の 1 つ以上の共刺激ドメイン（例えば、C D 2 8 共刺激ドメイン、4 - 1 B B 共刺激シグナル伝達ドメイン、O X 4 0 共

50

刺激シグナル伝達ドメイン、C D 2 7 共刺激シグナル伝達ドメイン、または、I C O S 共刺激シグナル伝達ドメイン)、及び、C D 3 細胞質シグナル伝達ドメインを含み得る。

【 0 1 2 9 】

あるいは、または、加えて、本明細書に記載したC A Rポリペプチドは、互いに連結し得るものであり、または、細胞質シグナル伝達ドメインで隔て得る2つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含有し得る。C A Rポリペプチドにおける、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、任意の共刺激シグナル伝達ドメイン(複数可)、及び、細胞質シグナル伝達ドメインは、直接的に、または、ペプチドリinkerを介して、互いに連結し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載したあらゆるC A Rポリペプチドは、N末端にシグナル配列を含み得る。

【 0 1 3 0 】

本明細書に記載した例示的なC A Rポリペプチドを、表5に記載する。これらの例示的な構築物は、任意の共刺激ドメイン、及び、細胞質シグナル伝達ドメインの位置を交換することができ、また、N末端からC末端に向けて、シグナル配列、抗原結合ドメイン(例えば、腫瘍抗原、または、病原性抗原などの抗原を標的とするs c F vフラグメント)、ヒンジドメイン、及び膜貫通部を有する。

【表5】

表5:C A Rポリペプチドの例示的な構成要素。

シグナル配列	細胞外ドメイン(抗原結合部)	ヒンジドメイン	膜貫通ドメイン	共刺激ドメイン	細胞質シグナル伝達ドメイン
C D 8 α	scFv(例えば、抗GPC3 scFv)	C D 8	C D 8	4-1BB	CD3 ζ
C D 8 α	scFv(例えば、抗GPC3 scFv)	CD28	CD28	CD28	CD3 ζ

【 0 1 3 1 】

例示的なC A Rポリペプチドのアミノ酸配列を、以下に記載する(シグナル配列は、イタリック体)。

配列番号104:

【化81】

*MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVM*TQSPLSLPVT**P**GEPASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGV**P**DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNT**H**VPPTFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKV**S**CKASGYTF**T**DYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPK**T**GD**T**AYSQKFKGRVTLTADKSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFY**S**YTYWGQGT**L**TVSSTTTPAPRPPT**P**APT**I**ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS**L**VITLYCKRGRKKLLYIFKQ**P**FMRPVQ**T**TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ**Q**GQNQLYNELN**L**GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN**P**QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号105:

【化82】

*MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVM*TQSPLSLPVT**P**GEPASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGV**P**DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNT**H**VPPTFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKV**S**CKASGYTF**T**DYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPK**T**GD**T**AYSQKFKGRVTLTADKSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFY**S**YTYWGQGT**L**TVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGT**I**IHVKGKHLCP**S**PLFP**G**PSKPFWVLVVVGVLACYSLLVT**V**AF**I**IFWVRSKR**S**RL**L**HS**D**YMNMT**P**RR**R**PG**P**TRKH**Y**Q**P**YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ**Q**GQNQLYNELN**L**GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN**P**QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

30

40

50

【 0 1 3 2 】

ⅠⅠⅠ．クレブス回路調節ポリペプチドと、任意のキメラ受容体ポリペプチドを発現する造血細胞

本明細書では、本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチドの1つ以上を発現する遺伝子操作した宿主細胞（例えば、HSCなどの造血細胞、及び、免疫細胞、例えば、T細胞またはNK細胞）を提供する。遺伝子操作した宿主細胞は、本明細書に記載した通り、キメラ受容体ポリペプチド（例えば、ACTR発現細胞、例えば、ACTR T細胞、または、CAR発現細胞、例えば、CAR T細胞）をさらに発現し得る。一部の実施形態では、宿主細胞は、造血細胞、または、その子孫である。一部の実施形態では、造血細胞を、造血幹細胞とすることができる。その他の実施形態では、宿主細胞は、T細胞またはNK細胞などの免疫細胞である。一部の実施形態では、免疫細胞は、T細胞である。一部の実施形態では、免疫細胞は、NK細胞である。その他の実施形態では、免疫細胞は、確立した細胞株、例えば、NK-92細胞とすることができる。

10

【 0 1 3 3 】

一部の実施形態では、HSCまたは免疫細胞（例えば、T細胞、または、NK細胞）などの遺伝子操作した造血細胞は、本明細書に開示したようなCAR構築物のいずれかと、クレブス回路調節ポリペプチド（例えば、GOT1またはGOT2）などのクレブス回路調節剤のいずれかを共発現し得る。一部の実施形態では、CAR構築物は、4-1BBまたはCD28由来の共刺激ドメインを含み得るものであり、かつ、クレブス回路調節ポリペプチドは、GOT1またはGOT2である。CAR構築物は、CD8またはCD28に由来するヒンジ及び膜貫通ドメインをさらに含み得る。

20

【 0 1 3 4 】

その他の実施形態では、HSCまたは免疫細胞（例えば、T細胞、または、NK細胞）などの遺伝子操作した造血細胞は、本明細書に開示したようなACTR構築物のいずれかと、クレブス回路調節ポリペプチド（例えば、GOT1またはGOT2）などのクレブス回路調節剤のいずれかを共発現し得る。一部の実施形態では、ACTR構築物は、4-1BBまたはCD28由来の共刺激ドメインを含み得るものであり、かつ、クレブス回路調節ポリペプチドは、GOT1またはGOT2である。ACTR構築物は、CD8またはCD28由来のヒンジ及び膜貫通ドメインをさらに含み得る。

30

【 0 1 3 5 】

あるいは、本明細書で開示した遺伝子操作した宿主細胞は、キメラ受容体ポリペプチドを何ら発現し得ない。一部の実施形態では、本明細書で開示した1つ以上のクレブス回路調節ポリペプチドを過剰発現し得る遺伝子操作した免疫細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）に由来し得る。クレブス回路調節ポリペプチドの過剰発現は、腫瘍内微小環境において、抗腫瘍活性またはTILを改善し得る。あるいは、または、加えて、遺伝子操作した免疫細胞は、遺伝子操作したT細胞受容体をさらに有し得るT細胞とし得る。TIL、及び/または、遺伝子操作したTCRは、ペプチド-MHC複合体を標的とし得るペプチドは、病原体、腫瘍抗原、または、自己抗原に由来し得る。一部の例を、以下の表6に記載する。

【 0 1 3 6 】

また、ACTR T細胞と共に使用する本明細書で開示したCAR構築物または抗体のいずれかは、このようなペプチド/MHC複体内のペプチドのいずれかを標的とし得る。

40

【表 6】

表 6. 例示的なペプチド-MHC 標的

標的	適応症
NY-ESO-1	肉腫、MM
MAGE-A10	NSCLC、膀胱、HNSCC
MAGE-A4	肉腫、その他
PMEL	黒色腫
WT-1	卵巣
AFP	HCC
HPV-16 E6	子宮頸部
HPV-16 E7	子宮頸部

10

【0137】

一部の実施形態では、宿主細胞は、免疫細胞、例えば、T細胞またはNK細胞などである。一部の実施形態では、免疫細胞は、T細胞である。例えば、T細胞は、CD4+ヘルパー細胞、または、CD8+細胞傷害性細胞、または、これらの組み合わせとすることができる。あるいは、または、加えて、T細胞は、抑制性T細胞、例えば、T_{reg}細胞などとすることができる。一部の実施形態では、免疫細胞は、NK細胞である。その他の実施形態では、免疫細胞は、樹立した細胞株、例えば、NK-92細胞とすることができる。一部の事例では、免疫細胞は、当該技術分野で公知の異なるタイプのT細胞及び/またはNK細胞の混合物とすることができる。例えば、免疫細胞は、好適なドナー（例えば、ヒト患者）から単離した免疫細胞の集団とすることができる。以下の開示内容を、参照されたい。

20

【0138】

一部の事例では、宿主細胞に導入するクレブス回路調節ポリペプチドは、宿主細胞の内在性タンパク質と同一である。クレブス回路調節ポリペプチドのコード配列のさらなる複製を宿主細胞に導入することで、ネイティブ同等物と比較して、ポリペプチドの発現レベルを改善（すなわち、過剰発現）し得る。一部の事例では、宿主細胞に導入するクレブス回路調節ポリペプチドは、宿主細胞に対して異種、すなわち、宿主細胞には存在しない、または、宿主細胞では発現しない。このような異種クレブス回路調節ポリペプチドは、宿主細胞では本来発現しない天然タンパク質（例えば、異なる種に由来するもの）とし得る。あるいは、異種クレブス回路調節ポリペプチドは、ネイティブタンパク質のバリエーション、例えば、本明細書に記載したネイティブタンパク質のバリエーションなど、とし得る。一部の事例では、外来（すなわち、宿主細胞に内在していない）複製のコード核酸は、染色体外に存在し得る。その他の事例では、外来複製のコード配列は、宿主細胞の染色体に組み込み得るものであり、そして、内在性遺伝子の天然の遺伝子座とは異なる位置に配置し得る。

30

【0139】

そのような遺伝子操作した宿主細胞は、解糖速度を高める能力を有しており、そして、例えば、環境からグルコースを取り込む能力を改善し得る。したがって、これらの遺伝子操作した宿主細胞は、例えば、腫瘍内微小環境において、低グルコース、低アミノ酸、低pH、及び/または、低酸素条件下で、より旺盛な増殖、及び/または、生物活性を示し得る。遺伝子操作した細胞は、本明細書で開示したキメラ受容体ポリペプチドを発現する場合、直接的に（例えば、CAR発現免疫細胞によって）、または、Fc含有治療薬、例えば、抗腫瘍抗体などを介して（例えば、ACTR発現免疫細胞によって）のいずれかで、標的細胞を認識して、それらを阻害することができる。低グルコース、低アミノ酸、低pH、及び/または、低酸素環境（例えば、腫瘍内微小環境）において想定される増殖性を高める率、生物活性、及び/または、生存率を考慮すると、T細胞及びNK細胞などの

40

50

遺伝子操作した細胞は、クレブス回路調節ポリペプチドを発現しない、または、より低レベル、もしくは、より低活性の形態のクレブス回路調節ポリペプチドを発現する、キメラ受容体発現 T 細胞と比較して、より高い治療効果を示すものと予測し得る。

【 0 1 4 0 】

免疫細胞の集団は、あらゆる供給源、例えば、末梢血単核球 (P B M C)、骨髓、または、脾臓、リンパ節、胸腺、幹細胞、もしくは、腫瘍組織などの組織などから得ることができる。あるいは、免疫細胞集団は、幹細胞、例えば、造血幹細胞、及び、人工多能性幹細胞 (i P S C) に由来し得る。望ましいタイプの宿主細胞を得るのに好適な供給源は、当業者に自明である。一部の実施形態では、免疫細胞の集団は、本明細書に記載した治療を必要とする患者 (例えば、ヒト患者) から採取し得る P B M C に由来する。細胞を刺激分子と共培養して得た細胞の集団内で、望ましいタイプの宿主細胞 (例えば、T 細胞、NK 細胞、または、T 細胞及び NK 細胞) を増殖し得る。例として、T 細胞を増殖させるために、抗 C D 3 抗体及び抗 C D 2 8 抗体を使用し得るが、これらに限定されない。

10

【 0 1 4 1 】

本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチドのいずれか、及び、任意のキメラ受容体ポリペプチドを発現する免疫細胞を構築するために、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドの安定発現または一過性発現のための発現ベクターを、本明細書に記載した通常の方法を用いて作製し、そして、免疫宿主細胞に導入し得る。例えば、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸を、1つまたは2つの好適な発現ベクター、例えば、好適なプロモーターと機能的に連結したウイルスベクターなどにクローニングし得る。一部の事例では、キメラ受容体ポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドのためのコード配列のそれぞれは、2つの別々の核酸分子上にあり、そして、2つの別々のベクターにクローニングすることができ、それらのベクターを、同時または連続的に好適な宿主細胞に導入し得る。あるいは、キメラ受容体ポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドのためのコード配列は、1つの核酸分子上にあり、そして、1つのベクターにクローニングし得る。キメラ受容体ポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドのためのコード配列は、2つのポリペプチドの発現を、異なるプロモーターで制御させるために、2つの異なるプロモーターと機能的に連結し得る。あるいは、キメラ受容体ポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドのためのコード配列は、2つのポリペプチドの発現を、単一のプロモーターで制御させるために、1つのプロモーターと機能的に連結し得る。2つの別々のポリペプチドを、単一の m R N A 分子から翻訳させるために、2つのポリペプチドのためのコード配列の間に好適な配列を挿入し得る。このような配列、例えば、I R E S またはリボソームスキッピング部位は、当該技術分野で公知である。さらなる説明を、以下に記載する。

20

30

【 0 1 4 2 】

適切な条件下で、核酸及びベクター (複数可) を、制限酵素と接触させて、それぞれの分子上に、それらが互いに対を形成し、かつ、リガーゼと連結することができる、相補末端を生成し得る。あるいは、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸の末端に、合成核酸リンカーをライゲートすることができる。合成リンカーは、ベクター内の特定の制限部位に対応する核酸配列を含有し得る。発現ベクター/プラスミド/ウイルスベクターの選択は、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現させるための宿主細胞のタイプに依存するが、真核細胞における導入及び複製に好適でなくてはならない。

40

【 0 1 4 3 】

本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現させるために、様々なプロモーターを使用することができ、同プロモーターとして、サイトメガロウイルス (C M V) 中間初期プロモーター、ウイルス L T R、例えば、R o u s s a a r c o m a ウイルス L T R、H I V - L T R、H T L V - 1 L T R、シミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) 初期プロモーター、ヒト E F 1 - アルファプロモ

50

ーター、または、単純ヘルペス tk ウイルスプロモーターがあるが、これらに限定されない。クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現させるためのさらなるプロモーターとして、免疫細胞内のあらゆる構成的に活性なプロモーターがある。あるいは、免疫細胞内でその発現を調節可能ならしめるために、あらゆる調節性プロモーターを使用し得る。

【0144】

加えて、ベクターは、例えば、次のもの：宿主細胞内の安定的または一過性形質転換体を選択するための選択マーカー遺伝子、例えば、ネオマイシン遺伝子、または、カナマイシン遺伝子；高レベルの転写を行うためのヒト CMV の前初期遺伝子に由来するエンハンサー/プロモーター配列；ヒト EF1 - アルファ遺伝子由来のイントロン配列、mRNA 安定性のための SV40 に由来する転写終了シグナル、及び、RNA プロセッシングシグナル；適切なエピソーム複製のための SV40 ポリオーマウイルス複製起点、及び、ColE1；配列内リボソーム結合部位 (IRES)、汎用性マルチクローニング部位；センス及びアンチセンス RNA のインビトロ転写のための T7 及び SP6 RNA プロモーター；ベクターを有する細胞を誘発時に死滅させる「自殺スイッチ」または「自殺遺伝子」（例えば、HSV チミジンキナーゼ、または、誘導性カスパーゼ、例えば、iCasp9 など）、ならびに、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドの発現を評価するためのレポーター遺伝子の一部または全てを含有し得る。

【0145】

ある特定の実施形態では、このようなベクターは、自殺遺伝子をも含む。本明細書で使用する用語「自殺遺伝子」とは、その自殺遺伝子を発現する細胞を死滅させる遺伝子のことを意味する。自殺遺伝子は、その遺伝子を細胞が発現する際に、作用物質、例えば、薬物への感受性を付与する遺伝子とすることができ、細胞が作用物質と接触または曝露すると、細胞の死滅が始まる。自殺遺伝子は、当該技術分野で公知であり（例えば、Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004 を参照されたい）、例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV) チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、シトシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、ニトロレダクターゼ、及び、カスパーゼ、例えば、カスパーゼ 8 などがある。

【0146】

好適なベクター、及び、導入遺伝子を含有するベクターを生産するための方法は、当該技術分野で公知であり、かつ、利用可能である。クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現させるためのベクターの調製の例は、例えば、US 2014/0106449 に認められており、本明細書の一部を構成するものとして、参照により、その全内容を援用する。

【0147】

本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸配列を含むベクターのいずれもが、本開示の範囲内である。このようなベクター、または、そこに含まれるクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードする配列を、あらゆる好適な方法によって、宿主細胞、例えば、宿主免疫細胞などに導入し得る。ベクターを免疫細胞に導入するための方法は、当該技術分野で公知であり、DNA エレクトロポレーション、RNA エレクトロポレーション、リボソームなどの試薬を用いたトランスフェクション、または、ウイルス形質導入（例えば、レンチウイルス形質導入などのレトロウイルス形質導入）がある。

【0148】

一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現させるためのベクターは、ウイルス形質導入（例えば、レンチウイルス、または、ガンマ - レトロウイルス形質導入などのレトロウイルス形質導入）によって、

宿主細胞に導入する。導入を行うための例示的なウイルス法として、組換えレトロウイルス（例えば、PCT公開第WO90/07936号；第WO94/03622号；第WO93/25698号；第WO93/25234号；第WO93/11230号；第WO93/10218号；及び、第WO91/02805号；米国特許第5,219,740号、及び、第4,777,127号；英国特許第2,200,651号；及び、欧州特許第0345242号を参照されたい）、アルファウイルスをベースとしたベクター、及び、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター（例えば、PCT公開第WO94/12649号、第WO93/03769号；第WO93/19191号；第WO94/28938号；第WO95/11984号；及び、第WO95/00655号を参照されたい）があるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドの発現のためのベクターは、レトロウイルスである。一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドの発現のためのベクターは、レンチウイルスである。

【0149】

レトロウイルス形質導入について記載している参照文献の例として、Anderson et al., 米国特許第5,399,346号；Mann et al., Cell 33:153(1983)；Temin et al., 米国特許第4,650,764号；Temin et al., 米国特許第4,980,289号；Markowitz et al., J. Virol. 62:1120(1988)；Temin et al., 米国特許第5,124,263；1995年3月16日に公開されたDougherty et al. による国際特許公開第WO95/07358号；及び、Kuo et al., Blood 82:845(1993)がある。国際特許公開第WO95/07358号は、初代Bリンパ球の高効率形質導入について記載している。本明細書に記載した目的及び趣旨に関して、参照により、本明細書で援用するWO2016/040441A1も参照されたい。

【0150】

ウイルスベクターを使用して、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードするベクターを宿主細胞に導入する例では、免疫細胞を感染させてベクターを担持することができるウイルス粒子は、当該技術分野で公知のあらゆる方法、例えば、PCT出願第WO1991/002805A2号、第WO1998/009271A1号、及び、米国特許6,194,191に認められる方法で生産し得る。ウイルス粒子を、細胞培養上清から回収して、単離及び/または精製してから、それらウイルス粒子を、免疫細胞と接触させ得る。

【0151】

一部の実施形態では、本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドのいずれかをコードするRNA分子を、通常の方法（例えば、インビトロ転写）で調製してから、周知の方法、例えば、Rabinovich et al., Human Gene Therapy 17:1027-1035により、好適な宿主細胞、例えば、本明細書に記載した宿主細胞に導入し得る。

【0152】

一部の事例では、クレブス回路調節ポリペプチドをコードする核酸、及び、好適なキメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸は、別々の発現ベクターにクローニングし得るものであり、それらの発現ベクターを、同時または連続的に好適な宿主細胞に導入し得る。例えば、クレブス回路調節ポリペプチドの発現のための発現ベクター（または、RNA分子）は、まず、宿主細胞に導入し得るものであり、そして、クレブス回路調節ポリペプチドを発現するトランスフェクションした宿主細胞を、インビトロで単離及び培養し得る。次に、好適なキメラ受容体ポリペプチドの発現のための発現ベクター（または、RNA分子）は、クレブス回路調節ポリペプチドを発現する宿主細胞に導入し得るものであり、両方のポリペプチドを発現するトランスフェクションした細胞を単離し得る。別の例では、クレブス回路調節ポリペプチドと、キメラ受容体ポリペプチドの発現のためのそれぞれの発現

ベクター（または、RNA分子）は、宿主細胞に同時に導入し得るものであり、両方のポリペプチドを発現するトランスフェクションした宿主細胞を、通常の方法で単離し得る。

【0153】

その他の事例では、クレブス回路調節ポリペプチドをコードする核酸、及び、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸は、同一の発現ベクターにクローニングし得る。キメラ受容体ポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドの発現のためのポリヌクレオチド（このようなポリヌクレオチドを、少なくとも1つの調節エレメントと機能的に連結しているベクターなど）も、本開示の範囲内である。本開示の有用なベクターの例として、ウイルスベクター、例えば、ガンマレトロウイルスベクター、及び、レンチウイルスベクター、及び、アデノ随伴ウイルスベクター（AAVベクター）などのレトロウイルスベクターがあるが、これらに限定されない。

10

【0154】

一部の事例では、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸（複数可）を、トランスポゾンを通じて、宿主細胞に導入し得る。一部の事例では、例えば、CRISPR、TALEN、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、または、メガヌクレアーゼなどの遺伝子編集を介して、コード核酸（複数可）を、宿主細胞に導入し得る。

【0155】

一部の事例では、本明細書に記載した核酸は、2つのコード配列を含み得るものであり、一方は、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドをコードし、他方は、クレブス回路を調節することができるポリペプチド（すなわち、クレブス回路調節ポリペプチド）をコードする。本明細書に記載した2つのコード配列を含む核酸は、2つのコード配列がコードするポリペプチドが独立した（かつ、物理的に離間している）ポリペプチドとして発現できるように構成し得る。この目的を達成するために、本明細書に記載した核酸は、第1のコード配列と第2のコード配列との間に位置する第3のヌクレオチド配列を含有し得る。この第3のヌクレオチド配列は、例えば、リボソームスキッピング部位をコードし得る。リボソームスキッピング部位は、正常なペプチド結合形成を阻害する配列である。このメカニズムにより、1つのメッセンジャーRNAに由来する別のオープンリーディングフレームが翻訳される。この第3のヌクレオチド配列は、例えば、P2Aペプチド、T2Aペプチド、または、F2Aペプチドをコードし得る（例えば、Kim et al., PLoS One, 2011; 6(4): e18556を参照されたい）。例として、例示的なP2Aペプチドは、ATNFSLLKQAGDVEENPGP 配列番号106のアミノ酸配列を有し得るが、これに限定されない。

20

30

【0156】

別の実施形態では、第3のヌクレオチド配列は、配列内リボソーム進入部位（IRES）をコードし得る。IRESは、末端非依存的な翻訳開始を可能とし、1つのメッセンジャーRNAに由来する別のオープンリーディングフレームの翻訳もまた可能とするRNAエレメントである。あるいは、第3のヌクレオチド配列は、第2のポリペプチドの発現を制御する第2のプロモーターをコードし得る。また、第3のヌクレオチド配列は、2つ以上のリボソームスキッピング配列、IRES配列、別のプロモーター配列、または、これらの組み合わせをコードし得る。

40

【0157】

また、核酸は、別のコード配列（第4のコード配列、及び、第5のコード配列などがあるが、これらに限定されない）を含み得るものであり、そして、別のコード配列がコードするポリペプチドが、さらに独立しており、かつ、物理的に離間しているポリペプチドとして発現するように構成し得る。この目的のために、別のコード配列を、1つ以上のリボソームスキッピング配列、IRES配列、または、別のプロモーター配列をコードする1つ以上のヌクレオチド配列によって、その他のコード配列から離間させ得る。

【0158】

一部の事例では、核酸（例えば、本明細書に記載した発現ベクター、または、RNA分

50

子)は、クレブス回路調節ポリペプチド(例えば、本明細書に記載したもの)と、好適なキメラ受容体ポリペプチドの両方のためのコード配列を含み得るものであり、それら2つのコード配列は、任意の順番で、P2Aペプチドをコードする第3のヌクレオチド配列(例えば、A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P、配列番号106)で隔てられている。その結果、このような核酸から、2つの別々のポリペプチド、クレブス回路調節ポリペプチド、それに、キメラ受容体を生成することができ、P2A部分A T N F S L L K Q A G D V E E N P G(配列番号107)を、上流のポリペプチド(上流のコード配列でコードしたもの)に連結し、そして、P2Aペプチドに由来する残基Pを、下流のポリペプチド(下流のコード配列でコードしたもの)に連結する。一部の事例では、キメラ受容体ポリペプチドは、上流のポリペプチドであり、そして、クレブス回路調節ポリペプチドは、下流のポリペプチドである。その他の事例では、クレブス回路調節ポリペプチドは、上流のポリペプチドであり、そして、キメラ受容体ポリペプチドは、下流のポリペプチドである。

10

【0159】

一部の事例では、核酸(例えば、本明細書に記載した発現ベクター、または、RNA分子)は、クレブス回路調節ポリペプチド(例えば、本明細書に記載したもの)と、適切なA C T Rポリペプチドの両方のためのコード配列であって、任意の順序で、P2Aペプチドをコードする第3のヌクレオチド配列(例えば、A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P; 配列番号106)で隔てられている2つのコード配列を含み得る。結果として、2つの別個のポリペプチドである、クレブス回路調節ポリペプチドと、A C T R)は、そのような核酸から生産することができ、P2A部分A T N F S L L K Q A G D V E E N P G(配列番号107)を、(上流コード配列でコードしている)上流ポリペプチドに連結しており、また、P2Aペプチド由来の残基Pを、(下流のコード配列でコードしている)下流のポリペプチドに連結している。一部の事例では、A C T Rポリペプチドは、上流のポリペプチドであり、かつ、クレブス回路調節ポリペプチドは、下流のポリペプチドである。その他の事例では、クレブス回路調節ポリペプチドは、上流のポリペプチドあり、かつ、A C T Rポリペプチドは、下流のポリペプチドである。

20

【0160】

一部の事例では、上記した核酸は、2つのセグメントのコード配列の間、例えば、上流のポリペプチドと、P2Aペプチドとの間のリンカー(例えば、G S Gリンカー)をさらにコードし得る。

30

【0161】

特定の事例では、本明細書に記載した核酸は、核酸をトランスフェクションする宿主細胞内で、2つの別々のポリペプチドを発現するように構成している：(i)N末端からC末端にかけて、好適なC A R(例えば、配列番号104、または、配列番号105)、ペプチドリンカー(例えば、G S Gリンカー)、及び、P2Aペプチドに由来するA T N F S L L K Q A G D V E E N P G(配列番号107)セグメントを含有する第1のポリペプチド、及び、(ii)N末端からC末端にかけて、P2Aペプチドに由来するP残基、及び、クレブス回路調節ポリペプチド(例えば、配列番号81~92のいずれか)を含有する第2のポリペプチド。

40

【0162】

特定の事例では、本明細書に記載した核酸は、核酸をトランスフェクションする宿主細胞内で、2つの別々のポリペプチドを発現するように構成している：(i)N末端からC末端にかけて、好適なA C T R(例えば、本明細書に記載した配列番号1~80のいずれか、例えば、配列番号1、または、配列番号57)、ペプチドリンカー(例えば、G S Gリンカー)、及び、P2Aペプチドに由来するA T N F S L L K Q A G D V E E N P G(配列番号107)セグメントを含有する第1のポリペプチド；及び、(ii)N末端からC末端にかけて、P2Aペプチドに由来するP残基、及び、クレブス回路調節ポリペプチド(例えば、配列番号81~92のいずれか)を含有する第2のポリペプチド。

【0163】

50

一部の事例では、関係するさらなるポリペプチドも、宿主免疫細胞に導入し得る。

【0164】

本明細書で提供するクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドのいずれかをコードするベクター、または、キメラ受容体ポリペプチド、及び/または、クレブス回路調節ポリペプチドをコードする核酸（例えば、RNA分子）を、宿主細胞に導入した後に、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドの発現を可能にする条件下で、それらの細胞を培養し得る。クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸を、調節性プロモーターで調節する例では、調節性プロモーターを活性化する条件下で、宿主細胞を培養し得る。一部の実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターであり、かつ、免疫細胞を、誘導性分子の存在下、または、誘導性分子を生産する条件下で培養する。クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドの発現の有無を確認することは、当業者に自明のことであり、そして、あらゆる公知の方法、例えば、定量的逆転写酵素PCR（qRT-PCR）を用いた、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードするmRNAの検出、または、ウエスタンブロット法、蛍光顕微鏡、及び、フローサイトメトリーなどの方法を使用した、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドの検出によって評価し得る。

10

【0165】

あるいは、免疫細胞を対象に対して投与した後に、キメラ受容体ポリペプチドの発現を、インビボで起こし得る。本明細書で使用する用語「対象」は、あらゆる哺乳動物、例えば、ヒト、サル、マウス、ウサギ、または、家畜哺乳動物などを意味する。例えば、対象を、霊長類とし得る。好ましい実施形態では、対象は、ヒトである。

20

【0166】

あるいは、本明細書で開示した免疫細胞のいずれかでのクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドの発現は、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードするRNA分子を導入して達成することができる。このようなRNA分子は、インビトロ転写または化学合成によって、調製することができる。その後、例えば、エレクトロポレーションを使用して、好適な宿主細胞、例えば、免疫細胞（例えば、T細胞、NK細胞、または、T細胞とNK細胞の両方）などに、それらRNA分子を導入し得る。例えば、Rabinovich et al., Human Gene Therapy, 17: 1027-1035 及びWO/2013/040557に記載されている方法に従って、RNA分子を合成し、そして、宿主免疫細胞に導入することができる。

30

【0167】

特定の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを含むベクター（複数可）、または、RNA分子（複数可）を、インビボで、宿主細胞または免疫細胞に導入し得る。本明細書に記載した1つ以上のクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、1つ以上のキメラ受容体ポリペプチドをコードするベクターまたはRNA分子を、対象に対して直接に投与（例えば、静脈内投与）して、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを含む宿主細胞をインビボで生産して、この導入を達成し得るが、この手法に限定されない。

40

【0168】

本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドのいずれかを発現する宿主細胞を調製するための方法は、宿主細胞をエクスピボで活性化させることも含み得る。宿主細胞の活性化とは、宿主細胞を刺激して、その細胞が、エフェクター機能を発揮し得る活性化状態にさせる、ことを意味する。宿主細胞を活性化させる方法は、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現させるために使用する宿主細胞のタイプに依存している。T細胞は、1つ以上の分子、例えば、抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2、フィトヘマグルチニン、

50

改変した人工刺激細胞もしくは粒子、または、これらの組み合わせなど、これらに限定されない分子の存在下で、エキスピボで活性化し得る。改変した人工刺激細胞は、当該技術分野で公知の人工抗原提示細胞とし得る。例えば、Neal et al., J. Immunol. Res. Ther. 2017, 2(1): 68-79 及び Turtle et al., Cancer J. 2010, 16(4): 374-381 を参照されたい、これら文献のそれぞれでの関連する開示は、本明細書に記載の目的及び趣旨に関して、参照により、本明細書で援用する。

【0169】

その他の事例では、1つ以上の分子、例えば、4-1BB リガンド、抗 4-1BB 抗体、IL-15、抗 IL-15 受容体抗体、IL-2、IL12、IL-21、K562 細胞、及び/または、改変した人工刺激細胞または粒子などの存在下で、NK 細胞をエキスピボで活性化し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドのいずれかを発現する宿主細胞 (ACTR-/CAR-、及び/または、クレブス回路調節ポリペプチドを発現する細胞) を、エキスピボで活性化してから、対象に対して投与する。宿主細胞での活性化の有無を確認することは当業者に自明であり、細胞の活性化、サイトカインの発現または分泌、及び、細胞の形態と関連する 1 つ以上の細胞表面マーカーの発現の評価を含み得る。

【0170】

本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドのいずれかを発現する宿主細胞を調製するための方法は、宿主細胞を、エキスピボで増殖させることを含み得る。宿主細胞を増殖させることは、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現する細胞の個数を増やす、例えば、宿主細胞を増殖させる、または、宿主細胞を刺激して増殖させる、あらゆる方法を含み得る。宿主細胞の増殖を刺激する方法は、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現させるために使用する宿主細胞のタイプに依存しており、そして、それらは、当業者に自明である。一部の実施形態では、本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドのいずれかを発現する宿主細胞をエキスピボで増殖させてから、対象に対して投与する。

【0171】

一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現する宿主細胞を、エキスピボで増殖及び活性化させてから、それらの細胞を、対象に対して投与する。宿主細胞の活性化と増殖を使用して、ウイルスベクターをゲノムに導入し、そして、本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドをコードする遺伝子を発現し得る。mRNA エレクトロポレーションを使用する場合、活性化細胞において実施すると、エレクトロポレーションがより効果的になり得るが、活性化、及び/または、増殖は必須にはなり得ない。一部の事例では、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドは、好適な宿主細胞において、一過的 (例えば、3 ~ 5 日間) に発現する。一過性発現は、潜在的な毒性がある場合には有利になり得るものであり、そして、臨床試験の初期段階で発生し得る副作用に有用となる。

【0172】

クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドを発現する宿主細胞のいずれかを、医薬として許容可能な担体と混合して医薬組成物を形成し得るが、その医薬組成物も、本開示の範囲内である。

【0173】

本開示の組成物と共に用いられる語句「医薬として許容可能な」とは、哺乳動物 (例えば、ヒト) に対して投与する際に、生理学的に忍容性があり、通常は、有害反応を引き起こさない、そのような組成物の分子要素、及び、その他の成分のことを意味する。好ましくは、本明細書で使用する用語「医薬として許容可能な」とは、連邦政府または州政府の監督機関により承認されていること、または、哺乳動物、より詳細には、ヒトにおける使

10

20

30

40

50

用のために、米国薬局方またはその他の一般に認められた薬局方に記載されている、ことを意味する。「許容可能である」とは、担体が、組成物の活性成分（例えば、核酸、ペクター、細胞、または、治療抗体）と相溶性があり、組成物（複数可）を投与する対象に負の影響を及ぼさない、ことを意味する。本方法で使用する医薬組成物のいずれかは、凍結乾燥組成物、または、水溶液の形態の医薬として許容可能な担体、賦形剤、または、安定化剤を含み得る。

【0174】

緩衝剤などの医薬として許容可能な担体は、当該技術分野で公知であり、リン酸、クエン酸、及び、その他の有機酸；アスコルビン酸、及び、メチオニンなどの酸化防止剤；防腐剤；低分子量ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または、免疫グロブリン；アミノ酸；疎水性ポリマー；単糖；二糖；ならびに、その他の炭水化物；金属錯体；及び／または、非イオン性界面活性剤を含み得る。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hooverを参照されたい。

10

【0175】

本開示の医薬組成物は、治療を行う特定の適応症のために、必要に応じて、活性化化合物、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有する1つ以上のさらなる活性化化合物も含み得る。考え得る別の活性化化合物として、例えば、IL-2に加えて、当該技術分野で公知であり、かつ、以下の併用療法の説明で示したような様々な作用物質があるが、これらに限定されない。

20

【0176】

IV. 本明細書に記載した遺伝子操作した造血細胞を使用する免疫療法

本明細書に開示した遺伝子操作した造血細胞（例えば、造血幹細胞、免疫細胞、例えば、NK細胞、または、T細胞）は、様々な障害、例えば、がん、感染性疾患、及び、自己免疫疾患に対する免疫療法で使用し得る。

【0177】

(a) ACTRポリペプチドを発現する遺伝子操作した造血細胞と、Fc含有治療薬との併用免疫療法

本開示の例示的なACTRポリペプチドは、Tリンパ球に対して抗体依存性細胞傷害（ADCC）能を付与し、そして、NK細胞でのADCCを増強する。細胞に結合した抗体が受容体に結合すると、その受容体は、T細胞の活性化、持続的な増殖、及び、結合細胞に対する特異的な細胞傷害を誘発する。

30

【0178】

IgのFc部分に対するCD16の親和性の度合いは、ADCCの重要な決定因子であり、それ故に、抗体免疫療法に対する臨床効果の重要な決定因子である。Igに対して大きな結合親和性を示し、F158遺伝子多型を有するCD16と比較して、優れたADCCを介在する、V158遺伝子多型を有するCD16を、一例として選択した。F158受容体は、V158受容体と比較して、T細胞増殖と、ADCCの誘導において、低い潜在能を示すが、F158受容体は、V158受容体と比較して、より低いインビボ毒性を示し得るので、一部の臨床状況において有用なものである。

40

【0179】

免疫細胞においてACTRポリペプチドと共発現させるクレブス回路調節ポリペプチドは、低グルコース、低アミノ、低pH、及び／または、低酸素環境で、細胞を効果的に増殖、及び／または、機能させることで、細胞をベースとした免疫療法、例えば、T細胞療法またはNK細胞療法などにおいて役立つ。抗体誘導細胞傷害は、抗体投与を単に停止することで、必要であれば、いつでも停止させることができる。mRNAエレクトロポレーションを使用して、クレブス回路調節ポリペプチド、及び／または、ACTRポリペプチドを一過的に発現させて、あらゆる潜在的な自己免疫反応を制限することで、臨床的安全性を、さらに向上することができる。

50

【 0 1 8 0 】

それ故に、ある実施形態では、本開示は、抗体をベースとしたがんの免疫療法を必要とする対象において、その効果を改善する方法を提供しており、対象は、抗原発現細胞に結合可能な治療抗体などのFc含有治療薬を用いた治療を受ける。Fc含有治療薬は、Fc部分、例えば、改変免疫細胞上に発現したACTRのFc結合部分（例えば、ヒトCD16Aの細胞外ドメイン）が認識して結合することができる、ヒトまたはヒト化Fc部分を含有している。

【 0 1 8 1 】

本明細書に記載した方法は、治療有効量の抗体、及び、治療有効量の遺伝子操作した宿主細胞、例えば、本開示のクレブス回路調節ポリペプチド、及び、ACTRポリペプチドを共発現する造血細胞、例えば、免疫細胞（例えば、Tリンパ球、または、NK細胞）などを対象に導入すること、を含み得る。対象（例えば、ヒト患者、例えば、ヒトがん患者など）は、標的抗原に特異的なFc含有治療薬を用いた治療を受けたことがある、または、受けている。標的抗原として、腫瘍抗原、病原性抗原（例えば、細菌、または、ウイルスのもの）、または、異常細胞上の抗原、例えば、本明細書に記載したものなど、疾患または症状と関連しているあらゆる分子とし得るが、これらに限定されない。

【 0 1 8 2 】

本明細書で示した疾患症状のいずれかと関連する範囲での本開示の文脈において、用語「治療する」、「治療」などとは、このような症状と関連する少なくとも1つの症候を、軽減もしくは改善すること、または、このような症状の進行を、遅延もしくは逆転させる、ことを意味する。また、本開示の趣旨の範囲内において、用語「治療する」とは、発症（すなわち、疾患の臨床発現前の段階）を、阻止、遅延させること、及び/または、疾患が進行もしくは悪化するリスクを低下させる、ことを意味する。例えば、がんに関連した用語「治療する」とは、患者の腫瘍負荷を制限もしくは低下させること、または、転移を予防、遅延、もしくは、阻害することなど、を意味し得る。

【 0 1 8 3 】

本明細書で使用する用量または量に使用する用語「治療的に有効」とは、化合物または医薬組成物を、必要としている対象に、それを投与する際に、所望の活性をもたらすのに十分な化合物または医薬組成物の量のことを意味する。活性成分の組み合わせ（例えば、抗体を含む第1の医薬組成物、及び、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、抗体結合T細胞受容体（ACTR）構築物を発現するTリンパ球またはNK細胞の集団を含む第2の医薬組成物）を投与する場合、組み合わせの有効量が、個別に投与する場合に有効となり得る各成分の量を含んでいても、または、含んでいなくともよい、ことに留意されたい。本開示の文脈の範囲内において、用語「治療的に有効」とは、本開示の方法で治療する障害の少なくとも1つの症候の発現を遅延させる、本開示の方法で治療する障害の少なくとも1つの症候の進行を阻止する、本開示の方法で治療する障害の少なくとも1つの症候を軽減または緩和するのに十分な化合物または医薬組成物の量のことを意味する。

【 0 1 8 4 】

本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び、ACTRポリペプチドを発現する宿主細胞（例えば、造血細胞、例えば、免疫細胞、例えば、T細胞、及び、NK細胞など）は、対象におけるADCCを強める、及び/または、抗体をベースとした免疫療法の効果を改善する、及び/または、低グルコース環境での免疫細胞の成長、及び/または、増殖を改善させる上で有用である。一部の実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば、ヒト、サル、マウス、ウサギ、または、家畜哺乳動物などである。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、対象は、ヒトがん患者である。一部の実施形態では、対象は、本明細書に記載した治療抗体のいずれかを使用した治療を受けたことがある、または、受けている。

【 0 1 8 5 】

本明細書に記載した方法を実施するために、本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチド、及び、ACTRポリペプチドのいずれかを発現する有効量の宿主細胞、例えば

10

20

30

40

50

、免疫細胞（例えば、NK細胞、及び／または、Tリンパ球）、及び、有効量の抗体、または、それらの組成物を、好適な経路、例えば、静脈内投与などで、治療を必要とする対象に対して投与し得る。本明細書で使用する有効量とは、投与をすると、対象に治療効果を付与する、それぞれの因子（例えば、クレブス回路調節ポリペプチド、ACTRポリペプチドを発現するNK細胞、及び／または、Tリンパ球、抗体、または、それらの組成物）の量のことを意味する。本明細書に記載した細胞または組成物の量での治療効果の達成の有無を確認することは、当業者に自明である。当業者が認識しているように、治療する個々の症状、症状の重症度、個々の患者の特徴、例えば、年齢、身体的状態、大きさ、ジェンダー、性別、及び、体重など、治療期間、併用療法（ある場合）の性質、個々の投与経路、ならびに、医療従事者の知見及び専門知識の範囲内の類似因子に応じて、有効量は変化する。一部の実施形態では、有効量は、対象における症候を緩和、軽減、改善、向上、抑制する、または、対象におけるあらゆる疾患または障害の進行を遅延させる。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、治療を必要とする対象は、ヒトがん患者である。一部の実施形態では、治療を必要とする対象は、1つ以上の病原性感染症（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、及び／または、真菌感染症）を患っている。

10

【0186】

あらゆるがん、または、あらゆる病原体を治療するために、本開示の方法を使用し得る。本開示の方法を用いて治療することができるがんの具体例として、例えば、リンパ腫、乳癌、胃癌、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺癌、皮膚癌、前立腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、白血病、中皮腫、膵臓癌、頭頸部癌、網膜芽細胞腫、神経膠腫、膠芽細胞腫、甲状腺癌、肝細胞癌、食道癌、及び、子宮頸癌があるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、がんは、固形腫瘍とし得る。

20

【0187】

また、本開示の方法は、細菌感染、ウイルス感染、または、真菌感染が引き起こし得る感染性疾患を治療するために使用し得る。このような例にあっては、病原性抗原（例えば、感染症を引き起こす細菌、ウイルス、または、真菌と関連する抗原）を標的とするFc含有治療薬（例えば、抗体）と共に、遺伝子操作した免疫細胞を使用し得る。病原性抗原の具体例として、細菌抗原、ウイルス抗原、及び／または、真菌抗原があるが、これらに限定されない。一部の例を、次に示す：インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ、ヘマグルチニン、もしくは、M2タンパク質、ヒト呼吸器合胞体ウイルス（RSV）F糖タンパク質、もしくは、G糖タンパク質、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質gB、gC、gD、もしくは、gE、Chlamydia MOMP、もしくは、PorBタンパク質、 Dengue熱ウイルスコアタンパク質、マトリックスタンパク質、もしくは、糖タンパク質E、麻疹ウイルスヘマグルチニン、単純ヘルペスウイルスII型糖タンパク質gB、ポリオウイルスI VP1、HIV 1のエンベロープ糖タンパク質、B型肝炎コア抗原または表面抗原、ジフテリア毒素、Streptococcus 24M エピトープ、Gonococcal pilin、仮性狂犬病ウイルスgp50（gpD）、仮性狂犬病ウイルスI（gpB）、仮性狂犬病ウイルスIII（gpC）、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質H、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質E、伝染性胃腸炎糖タンパク質195、伝染性胃腸炎マトリックスタンパク質、または、ヒトC型肝炎ウイルス糖タンパク質E1もしくはE2。

30

40

【0188】

一部の実施形態では、ADCC活性を、少なくとも20%、及び／または、少なくとも2倍増強させる、例えば、ADCCを、50%、80%、100%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、または、それ以上に増強する上で有効な量で、免疫細胞を対象に対して投与する。

【0189】

Fc含有治療薬が結合する抗原を発現する細胞を標的とするために、免疫細胞を、治療抗体などのFc含有治療薬と共に同時投与する。一部の実施形態では、2つ以上のFc含有治療薬、例えば、2つ以上の抗体などが、免疫細胞と共に使用し得る。抗体をベースと

50

した免疫療法を使用して、免疫療法が有効と考えられる対象でのあらゆる疾患または障害の症候を、治療、緩和、または、抑制し得る。

【 0 1 9 0 】

抗体（複数形で同義で用いる）は、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を介して、標的、例えば、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどに対して特異的に結合することができる免疫グロブリン分子である。本明細書で使用する用語「抗体」は、インタクト（すなわち、全長）なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のみならず、Fc領域、その変異体を含むその抗原結合フラグメント、抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、ディアボディ、単ドメイン抗体（例えば、ナノボディ）、直鎖状抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ならびに、所定の特異性の抗原認識部位と、Fc領域を含む免疫グロブリン分子のあらゆるその他の修飾形態、例えば、抗体のグリコシル化変異体、抗体のアミノ酸配列変異体、及び、共有結合修飾抗体なども含む。抗体として、あらゆるクラスの抗体、例えば、IgD、IgE、IgG、IgA、または、IgM（または、そのサブクラス）などがあり、そして、抗体は、ある特定のクラスのものである必要はない。抗体の重鎖の定常ドメインの抗体アミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを、異なるクラスに割り当てることができる。5つの主なクラスの免疫グロブリン、IgA、IgD、IgE、IgG、及び、IgMが存在しており、そして、これらの内の幾つかを、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及び、IgA2へとさらに分類することができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及び、ミューと呼ばれている。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造と、三次元構造は、公知である。本開示で使用する抗体は、共に使用するACTR-、及び/または、クレブス回路調節を改善するポリペプチド発現免疫細胞が認識することができるFc領域を含有している。Fc領域は、ヒトFc領域、または、ヒト化Fc領域とし得る。

【 0 1 9 1 】

本明細書に記載した抗体のいずれかは、モノクローナル、または、ポリクローナルのいずれかとすることができる。「モノクローナル抗体」とは、均質な抗体集団のことを意味しており、そして、「ポリクローナル抗体」とは、不均質な抗体集団のことを意味する。これら2つの用語は、抗体の供給源、または、抗体を作り出す方法を限定するものではない。

【 0 1 9 2 】

ある例では、本明細書に記載した方法に使用する抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有する、特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、または、その抗原結合フラグメントである、非ヒト（例えば、マウス）抗体の形態のことを意味する。大抵の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）に由来する残基が、所望の特異性、親和性、及び、性能を有するマウス、ラット、または、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のCDRに由来する残基に置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。一部の事例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、導入したCDR配列またはフレームワーク配列にも存在していないが、抗体性能をさらに改良し、及び、最適化するために含ませる残基を含み得る。一般的に、ヒト化抗体は、全て、または、ほぼ全てのCDR領域が、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応しており、そして、全て、または、ほぼ全てのFR領域が、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である、少なくとも1つの、通常は、2つの可変ドメインのほぼ全てを含む。また、ヒト化抗体は、至適には、免疫グロブリン定常領域、または、ドメイン（Fc）、一般的には、ヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域、または、ドメイン（Fc）の少なくとも一部を含む。抗体は、WO 99 / 5 8 5 7 2 に記載されているように修飾したFc領域を有し得る。本明細書で用いる抗体は、グリコシル化（例えば、フコシル化）、または、

アフコシル化し得る。ヒト化抗体のその他の形態は、当初の抗体を基準として変化させた1つ以上(1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ)のCDRを有しており、それらは、当初の抗体の1つ以上のCDR「に由来する」1つ以上のCDRとも称されている。また、ヒト化抗体は、親和性成熟を伴い得る。

【0193】

別の例では、本明細書に記載した抗体は、ヒト抗体に由来する重鎖定常領域、及び、軽鎖定常領域を含み得るキメラ抗体である。キメラ抗体とは、第1の種に由来する可変領域または可変領域の一部、及び、第2の種に由来する定常領域を有する抗体のことを意味する。一般的に、これらのキメラ抗体において、軽鎖と重鎖の両方の可変領域は、1つの哺乳動物(例えば、非ヒト哺乳動物、例えば、マウス、ウサギ、及び、ラット)に由来する抗体の可変領域を模倣している一方で、定常部分は、別の哺乳動物、例えば、ヒトなどに由来する抗体の配列に相同である。一部の実施形態では、可変領域、及び/または、定常領域において、アミノ酸修飾を行うことができる。

10

【0194】

本明細書で開示したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、ACTRポリペプチドのいずれかを発現する造血細胞、例えば、免疫細胞(例えば、Tリンパ球、及び/または、NK細胞)を、Fc含有抗体を用いた治療を受けた、または、受けている対象に対して投与し得る。例えば、免疫細胞を、抗体と同時にヒト対象に対して投与し得る。あるいは、免疫細胞を、抗体をベースとした免疫療法の最中に、ヒト対象に対して投与し得る。一部の事例では、免疫細胞と抗体を、少なくとも4時間の間隔をあけて、例えば、少なくとも12時間の間隔をあけて、少なくとも1日間の間隔をあけて、少なくとも3日間の間隔をあけて、少なくとも1週間の間隔をあけて、少なくとも2週間の間隔をあけて、または、少なくとも1ヶ月間の間隔をあけて、ヒト対象に対して投与し得る。

20

【0195】

一部の実施形態では、本明細書に記載した抗体は、対応する標的抗原、または、そのエピトープに対して特異的に結合する。抗原またはエピトープに「特異的に結合する」抗体は、当該技術分野で十分に理解されている用語である。分子が、別の標的との反応と比較して、より頻繁に、より速やかに、より長時間にわたって、及び/または、より大きな親和性で、特定の標的抗原と反応する場合、その分子は「特異的結合」を示す、と呼ばれる。抗体が、その他の物質との結合と比較して、より大きな親和性で、結合力で、より速やかに、及び/または、より長時間にわたって結合する場合、その抗体は、標的抗原またはエピトープに対して「特異的に結合する」。例えば、抗原、または、その中の抗原性エピトープに対して特異的に(または、優先的に)結合する抗体は、その他の抗原、または、その同一抗原の中のその他のエピトープとの結合と比較して、より大きな親和性で、親和力で、より速やかに、及び/または、より長時間にわたって、この標的抗原と結合する抗体である。例えば、第1の標的抗原に対して特異的に結合する抗体が、第2の標的抗原に対して特異的または優先的に結合し得る、または、し得ないということも、この定義から理解できる。それ故に、「特異的結合」または「優先的結合」は、必ずしも排他的結合を(含み得るが)必要とはしていない。一部の事例では、標的抗原、または、そのエピトープに「特異的に結合する」抗体は、その他の抗原、または、その同一抗原の中のその他のエピトープに結合し得ない。

30

40

【0196】

一部の実施形態では、本明細書に記載した抗体は、本明細書で開示した標的抗原(例えば、本明細書に記載した標的の内のいずれか1つ)、または、その抗原性エピトープに対する好適な結合親和性を有する。本明細書に記載した免疫療法の方法に使用する抗体は、関係する標的抗原、または、その中の特定の領域、もしくは、抗原性エピトープに結合(例えば、特異的に結合)し得る。関係する例示的な標的抗原、及び、それらに特異的な例示的な抗体を、前出の表3に記載する。

【0197】

(b) CARポリペプチドを発現する遺伝子操作した造血細胞の免疫療法

50

クレブス回路調節ポリペプチドと、C A Rポリペプチドを共発現する本明細書に記載した遺伝子操作した造血細胞（例えば、造血幹細胞、T細胞またはナチュラルキラー細胞などの免疫細胞）は、C A Rポリペプチドが標的とする抗原を発現する異常細胞を、直接的または間接的に（例えば、C A Rポリペプチドが結合するタグにコンジュゲートした治療薬を介して）阻害する、T細胞療法やNK細胞療法などの免疫療法において使用することができる。免疫細胞においてC A Rポリペプチドと共発現するクレブス回路調節ポリペプチドは、細胞が、低グルコース、低アミノ酸、低pH、及び/または、低酸素環境、例えば、腫瘍内微小環境において、効果的に増殖すること、及び/または、機能することを可能ならしめて、細胞をベースとした免疫療法を促す。mRNAエレクトロポレーションを使用して、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、C A Rポリペプチドを一時的に発現させて、潜在的な非腫瘍特異的反応を制限することで、臨床的安全性を、さらに高め得る。

10

【0198】

本明細書に記載した方法は、クレブス回路調節ポリペプチドと、本開示のC A Rポリペプチドを共発現する造血細胞、例えば、免疫細胞（例えば、Tリンパ球、または、NK細胞）などの遺伝子操作した宿主細胞の治療有効量を、対象に導入することを含み得る。対象（例えば、ヒトがん患者などのヒト患者）は、抗がん剤または感染防止剤など、これらに限定されない、抗がん療法または抗感染療法を使用した、さらなる治療を受けた、または、受け得る。C A Rは、あらゆる標的抗原に結合し得る抗原結合ドメインを有する。そのような標的抗原は、疾患または病態に関連するあらゆる分子とし得るものであり、腫瘍抗原、病原性抗原（例えば、細菌、真菌、または、ウイルス）、または、本明細書で説明する異常細胞に存在する抗原があるが、これらに限定されない。

20

【0199】

本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチドと、C A Rポリペプチドを発現する宿主細胞（例えば、造血細胞、例えば、T細胞、及び、NK細胞などの免疫細胞）は、標的抗原を発現する細胞を阻害する、及び/または、低グルコース環境、低アミノ酸環境、低pH環境、及び/または、低酸素環境、例えば、腫瘍内微小環境における免疫細胞の成長、及び/または、増殖を改善する上で有用である。一部の実施形態では、対象は、ヒト、サル、マウス、ウサギ、または、家畜哺乳動物などの哺乳動物である。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、対象は、ヒトがん患者である。一部の実施形態では、対象は、本明細書に記載した治療用抗体のいずれかを使用して、さらなる治療を受けた、または、受けている。

30

【0200】

本明細書に記載した方法を実施するために、有効量の造血細胞、例えば、本明細書に記載したクレブス回路調節ポリペプチドと、C A Rポリペプチドのいずれかを発現する免疫細胞（NK細胞、及び/または、Tリンパ球）、または、それらの組成物を、静脈内投与などの適切な経路を介して、治療を必要とする対象に対して投与し得る。本明細書で使用する有効量とは、投与すると、対象に治療効果を与える、それぞれの作用物質（例えば、クレブス回路調節ポリペプチド、C A Rポリペプチド、または、それらの組成物を発現するNK細胞、及び/または、Tリンパ球）の量のことを指す。本明細書に記載した細胞または組成物の量での治療効果の達成の有無の決定は、当業者に自明である。当業者が認識しているように、治療する個々の症状、症状の重症度、個々の患者の特徴、例えば、年齢、身体的状態、大きさ、ジェンダー、性別、及び、体重など、治療期間、併用療法（ある場合）の性質、個々の投与経路、ならびに、医療従事者の知見及び専門知識の範囲内の類似因子に応じて、有効量は変化する。一部の実施形態では、有効量は、対象における症候を緩和、軽減、改善、向上、抑制する、または、対象におけるあらゆる疾患または障害の進行を遅延させる。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、治療を必要とする対象は、ヒトがん患者である。一部の実施形態では、治療を必要とする対象は、1つ以上の病原性感染症（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、及び/または、真菌感染症）を患っている。

40

50

【 0 2 0 1 】

あらゆるがん、または、あらゆる病原体を治療するために、本開示の方法を使用し得る。本開示の方法を用いて治療することができるがんの具体例として、例えば、リンパ腫、乳癌、胃癌、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺癌、皮膚癌、前立腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、白血病、中皮腫、膵臓癌、頭頸部癌、網膜芽細胞腫、神経膠腫、膠芽細胞腫、甲状腺癌、肝細胞癌、食道癌、及び、子宮頸癌があるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、がんは、固形腫瘍とし得る。

【 0 2 0 2 】

また、本開示の方法は、細菌感染、ウイルス感染、または、真菌感染が引き起こし得る感染性疾患を治療するために使用し得る。このような例においては、病原性抗原（例えば、感染症を引き起こす細菌、ウイルス、または、真菌と関連する抗原）に特異的な C A R ポリペプチドを発現する遺伝子操作した免疫細胞を使用して、感染細胞を排除することができる。病原性抗原の具体的な例として、細菌抗原、ウイルス抗原、及び／または、真菌抗原があるが、これらに限定されない。

10

【 0 2 0 3 】

一部の実施形態では、免疫細胞は、標的抗原を発現する細胞を、少なくとも 2 0 %、及び／または、少なくとも 2 倍を阻害する有効量で、例えば、標的抗原を発現する細胞を、5 0 %、8 0 %、1 0 0 %、2 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、5 0 倍、1 0 0 倍、または、それ以上を阻害する有効量で、対象に投与する。

【 0 2 0 4 】

さらなる治療薬（例えば、抗体をベースとした免疫療法薬）を使用して、対象において治療薬が有用であると考えられる、あらゆる疾患または障害の症状を、治療、緩和、または、軽減し得る。

20

【 0 2 0 5 】

抗体をベースとした免疫療法の効果は、当該技術分野で公知の任意の方法を用いて評価することができ、そして、熟練した医療従事者には自明である。例えば、抗体をベースとした免疫療法の効果は、対象の生存率、あるいは、対象または組織もしくはそれらの試料における、腫瘍負荷量またはがん負荷量で評価し得る。一部の実施形態では、免疫細胞は、クレブス回路調節ポリペプチド、及び／または、C A R ポリペプチドを発現する免疫細胞の非不在下での効果と比較して、抗体をベースとした免疫療法の効果を、少なくとも 2 0 %、及び／または、少なくとも 2 倍改善する、例えば、抗体をベースとした免疫療法の効果を、5 0 %、8 0 %、1 0 0 %、2 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、5 0 倍、1 0 0 倍、または、それ以上に改善する有効量を、治療を必要とする対象に対して投与する。

30

【 0 2 0 6 】

本明細書に記載した組成物または方法のいずれかにおいて、免疫細胞（例えば、N K 細胞、及び／または、T 細胞）は、対象に対して自家のものとし得る、すなわち、免疫細胞を、治療を必要とする対象から得て、クレブス回路調節ポリペプチド、及び／または、C A R ポリペプチドを発現するように遺伝子操作を行い、次いで、同一対象に対して投与し得る。ある特定の実施形態では、対象に再導入する前に、自家免疫細胞（例えば、T リンパ球、または、N K 細胞）を、エキスビゴで、活性化、及び／または、増殖させる。対象への自家細胞の投与は、非自家細胞の投与と比較して、宿主細胞の拒絶反応の抑制をもたらし得る。

40

【 0 2 0 7 】

あるいは、宿主細胞は、同種異系細胞である、すなわち、細胞を第 1 の対象から得て、クレブス回路調節ポリペプチド、及び／または、キメラ受容体ポリペプチド（例えば、A C T R ポリペプチド、または、C A R ポリペプチド）を発現するように遺伝子操作を行い、そして、第 1 の対象とは異なるが、同一の種である第 2 の対象に対して投与する。例えば、同種異系免疫細胞は、ヒトドナーに由来しており、そして、ドナーとは異なるヒトレシピエントに対して投与し得る。特定の実施形態では、T リンパ球は、内在性 T 細胞受容体の発現を阻害または制限している同種異系 T リンパ球である。ある特定の実施形態では

50

、対象に導入する前に、同種異系Ｔリンパ球を、エキスピボで、活性化、及び／または、増殖させる。例えば、抗ＣＤ３／ＣＤ２８、ＩＬ－２、フィトヘマグルチニン、改変した人工刺激細胞もしくは粒子、または、これらの組み合わせの存在下で、当該技術分野で公知のあらゆる方法を使用して、Ｔリンパ球を活性化する。

【０２０８】

例えば、ＣＤ１３７リガンドタンパク質、ＣＤ１３７抗体、ＩＬ－１５タンパク質、ＩＬ－１５受容体抗体、ＩＬ－２タンパク質、ＩＬ－１２タンパク質、ＩＬ－２１タンパク質、及び、Ｋ５６２細胞株、及び／または、改変した人工刺激細胞または粒子からなる群から選択する１つ以上の作用物質の存在下で、当該技術分野で公知の方法を使用して、ＮＫ細胞を活性化することができる。ＮＫ細胞を増殖させるための有効な方法の記載について、例えば、米国特許第７，４３５，５９６号、及び、第８，０２６，０９７号を参照されたい。例えば、主要組織適合遺伝子複合体Ⅰ及び／またはⅡ分子を欠いており、または、不十分に発現しており、かつ、膜結合ＩＬ－１５及び４－１ＢＢリガンド（ＣＤ１３７Ｌ）を発現するように遺伝子改変した細胞に曝露することで、本開示の組成物または方法に使用するＮＫ細胞を優先的に増殖し得る。このような細胞株として、Ｋ５６２〔ＡＴＣＣ，ＣＣＬ ２４３；Ｌｏｚｚｉｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ４５（３）：３２１－３３４（１９７５）；Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ １８：４２１－４３１（１９７６）〕、及び、ウィルムス腫瘍細胞株ＨＦＷＴ（Ｆｅｈｎｉｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ ｒｅｖ ｉｍｍｕｎｏｌ ２０（３－４）：５０３－５３４（２００１）；Ｈａｒａｄａ ｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ ｈｅｍａｔｏｌ ３２（７）：６１４－６２１（２００４））、子宮内膜腫瘍細胞株ＨＨＵＡ、黒色腫細胞株ＨＭＶ－ⅠⅠ、肝芽細胞腫細胞株ＨｕＨ－６、肺小細胞癌細胞株Ｌｕ－１３０及びＬｕ－１３４－Ａ、神経芽細胞腫細胞株ＮＢ １９及びＮ１３６９、精巣に由来する胎児性がん細胞株ＮＥＣ １４、子宮頸部癌細胞株ＴＣＯ－２、ならびに、骨髄に転移した神経芽細胞腫細胞株ＴＮＢ １〔Ｈａｒａｄａ，ｅｔ ａｌ．，Ｊｐｎ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ｒｅｓ ９３：３１３－３１９（２００２）〕があるが、必ずしもこれらに限定されない。使用する細胞株は、ＭＨＣⅠ分子とＭＨＣⅡ分子の両方を欠いている、または、不十分に発現していることが好ましく、例えば、Ｋ５６２細胞株、及び、ＨＦＷＴ細胞株などである。細胞株の代わりに、固体支持体を使用し得る。このような支持体は、好ましくは、その表面上に、ＮＫ細胞に結合し、そして、一次活性化イベント、及び／または、増殖性応答を誘導することができる少なくとも１つの分子、または、このような影響を及ぼす分子に結合させることで、足場として機能することができる少なくとも１つの分子を結合させておく必要がある。支持体は、その表面に、ＣＤ１３７リガンドタンパク質、ＣＤ１３７抗体、ＩＬ－１５タンパク質、または、ＩＬ－１５受容体抗体を結合させ得る。好ましくは、支持体は、その表面上に結合したＩＬ－１５受容体抗体と、ＣＤ１３７抗体を有する。

【０２０９】

記載した組成物または方法のある実施形態では、Ｔリンパ球、ＮＫ細胞、または、Ｔリンパ球及びＮＫ細胞の対象への導入（または、再導入）に続いて、治療有効量のＩＬ－２の対象への投与を行う。

【０２１０】

本開示によれば、治療有効量の免疫細胞、例えば、本開示のクレブス回路調節ポリペプチド、及び／または、ＣＡＲポリペプチドを、体重１キログラムあたり、約 $10^5 \sim 10^{10}$ 、または、それ以上の細胞（細胞／Ｋｇ）の範囲で含む、Ｔリンパ球またはＮＫ細胞などを注入して、患者を治療することができる。患者が耐えることができるほど頻繁かつ多くの回数で、所望の応答が得られるまで注入を繰り返し得る。適切な注入用量やスケジュールは、患者毎に様々であるが、個々の患者用に、治療を行う医師が決定することができる。一般的に、初期用量の約 10^6 細胞／Ｋｇを注入してから、 10^8 以上の細胞／Ｋｇにまで漸増する。注入細胞を増殖させるために、ＩＬ－２を同時投与することができる。ＩＬ－２の量は、身体表面の平方メートルあたり、約 $1 \sim 5 \times 10^6$ 国際単位とすることができる。

10

20

30

40

50

【0211】

用語「約 (about)」または「約 (approximately)」とは、当業者が測定した個々の値が、許容される誤差の範囲内にあることを意味するものであり、その値は、測定または決定の仕方、すなわち、測定システムの制約をある程度は受ける。例えば、「約」とは、当該技術分野での実施にあたって許容される標準偏差内であることを意味し得る。あるいは、「約」とは、所与の値の最大 $\pm 20\%$ 、好ましくは、最大 $\pm 10\%$ 、より好ましくは、最大 $\pm 5\%$ 、及び、さらにより好ましくは最大 $\pm 1\%$ の範囲のことを意味し得る。あるいは、とりわけ、生物学的システムまたはプロセスに関して、この用語は、値の桁内、好ましくは、2倍内であることを意味し得る。本出願及び特許請求の範囲において個々の値を記載する場合、特に断りのない限り、用語「約」とは、暗に、及び、この文脈で、個々の値の許容可能な誤差の範囲内である、ことを意味している。

10

【0212】

本明細書に記載した組成物または方法の効果は、当該技術分野で公知の任意の方法を使用して評価することができ、また、熟練した医療従事者に自明である。例えば、本明細書に記載した組成物または方法の効果は、対象の生存率、あるいは、対象または組織もしくはそれらの試料における、がん負荷量または病原体負荷量で評価し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載した組成物及び方法は、その療法（例えば、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、CARポリペプチドを発現する免疫細胞の投与）の対象における安全性または毒性に基づいて、例えば、対象の総合的な健康状態、及び/または、有害事象または重度の有害事象の存在によって評価し得る。

20

【0213】

(c) その他の免疫療法

一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチド（例えば、GOT、例えば、GOT1またはGOT2）の1つ以上を発現する遺伝子操作した免疫細胞は、異常細胞（例えば、がん細胞、または、病原体感染細胞）に特異的な天然免疫細胞に由来し得る。このような遺伝子操作した免疫細胞（例えば、腫瘍浸潤リンパ球、または、TIL）は、キメラ受容体ポリペプチドを全く共発現し得ないものであり、そして、標的異常細胞、例えば、がん細胞を破壊するために使用し得る。1つ以上のクレブス回路調節ポリペプチドを発現するが、キメラ受容体を発現しない遺伝子操作したTILを、標的腫瘍細胞と、TILに結合することができる二重特異性抗体（BiTE）と共に使用し得る。

30

【0214】

一部の実施形態では、クレブス回路調節ポリペプチド（例えば、GOT、例えば、GOT1またはGOT2）の1つ以上を発現する遺伝子操作した免疫細胞を、 T_{reg} 細胞とし得る。そのような T_{reg} 細胞は、本明細書で開示したキメラ受容体ポリペプチドを共発現する。あるいは、 T_{reg} 細胞は、あらゆるキメラ受容体ポリペプチドを共発現し得るものではなく、そして、意図した療法で使用することができる。

【0215】

V. 併用療法

本開示に記載した組成物及び方法は、がんのその他のタイプの治療法、例えば、化学療法、外科手術、放射線、遺伝子療法など、または、抗感染症療法などと共に使用し得る。本開示の免疫療法と共に、このような治療法を、同時または連続的に（任意の順番で）実施し得る。さらなる治療薬と同時投与する場合には、相加効果または相乗効果によって、それぞれの薬剤の好適な治療有効用量を抑制し得る。

40

【0216】

一部の事例では、本明細書に開示したクレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、キメラ受容体ポリペプチドのいずれかを発現する免疫細胞（例えば、Tリンパ球、及び/または、NK細胞）を、さらなる治療薬（例えば、さらなる抗がん治療剤）で、治療した、または、治療を受けている対象に対して投与し得る。例えば、免疫細胞は、さらなる治療薬と同時に、ヒト対象に対して投与し得る。あるいは、免疫細胞は、さらなる治療薬の投与前に、ヒト対象に対して投与し得る。あるいは、免疫細胞は、さらなる治療薬の投与

50

後に、ヒト対象に対して投与し得る。

【0217】

クレブス回路調節ポリペプチドと、タグに特異的なCARポリペプチドを共発現する遺伝子操作した免疫細胞（例えば、T細胞、または、NK細胞）は、タグに結合した治療薬と併用することができる。腫瘍細胞などの異常細胞に関連する抗原に結合することができる治療薬を介して、そのような遺伝子操作した免疫細胞は、異常細胞と関与して、それらの増殖を阻害することができる。上記の表1に記載した抗体のいずれか、または、表1にも記載されている同じ標的抗原に特異的なその他の抗体は、適切なタグ（例えば、本明細書に記載したもの）にコンジュゲートし、そして、クレブス回路調節ポリペプチドと、タグに特異的なCARポリペプチドを共発現する免疫細胞と併用することができる。

10

【0218】

本開示の治療法は、その他の免疫調節治療法、例えば、治療ワクチン（GVAX、DC系ワクチンなどがあるが、これらに限定されない）、チェックポイント阻害薬（CTLA4、PD1、LAG3、TIM3などをブロックする薬剤があるが、これらに限定されない）、または、活性化剤（41BB、OX40などを強める薬剤があるが、これらに限定されない）などと組み合わせることができる。

【0219】

本開示の免疫療法薬との組み合わせに有用なその他の治療薬の例として：（i）抗血管新生薬（例えば、TNF-470、血小板第4因子、トロンボスポンジン-1、メタロプロテアーゼの組織阻害因子（TIMP1、及び、TIMP2）、プロラクチン（16Kdのフラグメント）、アンジオスタチン（プラスミノゲンの38Kdのフラグメント）、エンドスタチン、bFGF可溶性受容体、トランスフォーミング増殖因子ベータ、インターフェロンアルファ、可溶性KDR受容体、及び、FLT-1受容体、胎盤ポリリフェリン関連タンパク質、ならびに、Carmeliet and Jain（2000）に列挙されているもの）、（ii）VEGFアンタゴニスト、または、VEGF受容体アンタゴニスト、例えば、VEGFまたはVEGFRを阻害することができる、抗VEGF抗体、VEGFバリエーション、可溶性VEGF受容体フラグメント、アプタマー、中和抗VEGFR抗体、VEGFRチロシンキナーゼの阻害剤、及び、これらのあらゆる組み合わせ；及び、（iii）化学療法化合物、例えば、ピリミジン類似体（5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタビン、ゲムシタビン、及び、シタラビン）、プリン類似体、葉酸アンタゴニスト、及び、関連阻害剤（メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、及び、2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン））；ピンカアルカロイド（ピンブラスチン、ピンクリスチン、及び、ピノレルビン）などの天然物を含む抗増殖/有糸分裂阻害剤、微小管破壊剤、例えば、タキサン（パクリタキセル、ドセタキセル）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン、及び、ナベルピンなど、エビジポドフィロトキシン（エトポシド、及び、テニポシド）、DNA損傷剤（アクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン、ブレオマイシン、プスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、サイトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メクロレタミン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソウレア、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテル、テニポシド、トリエチレンチオホスホラミド、及び、エトポシド（VP16））；抗生物質、例えば、ダクチノマイシン（アクチノマイシンD）、ダウノルビシン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、イダルビシン、アントラサイクリン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、及び、マイトマイシンなど；酵素（L-アスパラギンを組織的に代謝し、かつ、細胞自体のアスパラギンを合成する能力を持たない細胞を制限するL-アスパラギナーゼ）；抗血小板薬；抗増殖/抗有糸分裂アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード（メクロレタミン、シクロホスファミド、及び、類似体、メルファラン、クロラムブシル）、エチレンイミン、及び、メチルメラミン（ヘキサメチルメラミン、及び、チオテパ）、アルキルスルホネー

20

30

40

50

ト - ブスルファン、ニトロソウレア (カルムスチン (BCNU)、及び、類似体、ストレプトゾシン)、トラゼネス - ダカルバジン (DTIC) など; 抗増殖 / 抗有糸分裂代謝拮抗薬、例えば、葉酸類似体 (メトトレキサート) など; 白金配位錯体 (シスプラチン、カルボプラチン)、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、ミトタン、アミノグルテチミド; ホルモン、ホルモン類似体 (エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ピカルタミド、ニルタミド)、及び、アロマターゼ阻害薬 (レトロゾール、アナストロゾール); 抗凝固薬 (ヘパリン、合成ヘパリン塩、及び、トロンビンのその他の阻害剤); 線維素溶解薬 (例えば、組織プラスミノゲン活性化因子、ストレプトキナーゼ、及び、ウロキナーゼなど)、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ; 抗遊走剤; 抗分泌薬 (プレフェルディン); 免疫抑制剤 (シクロスポリン、タクロリムス (FK-506)、シロリムス (ラパマイシン)、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル); 抗血管新生化合物 (例えば、TNP-470、ゲニステイン、ベバシズマブ)、及び、増殖因子阻害剤 (例えば、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 阻害剤); アンジオテンシン受容体遮断薬; 一酸化窒素ドナー; アンチセンスオリゴヌクレオチド; 抗体 (トラスツズマブ); 細胞周期阻害剤、及び、分化誘導因子 (トレチノイン); AKT 阻害剤 (例えば、MK-2206 HCl、ペリフォシン (KRX-0401)、GSK690693、イパタセルチブ (GDC-0068)、AZD5363、ユプロセルチブ、アフレルセルチブ、または、トリシリピンなど); mTOR 阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤 (ドキソルビシン (アドリマイシン)、アムサクリン、カンプトテシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エニボシド、エピルビシン、エトボシド、イダルビシン、ミトキサントロン、トポテカン、及び、イリノテカン)、コルチコステロイド (コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、及び、プレドニゾロン); 増殖因子シグナル伝達キナーゼ阻害剤; ミトコンドリア機能不全誘導因子、及び、カスパーゼ活性化因子; 及び、クロマチン破壊剤があるが、これらに限定されない。

10

20

【0220】

別の有用な作用物質の例については、Physician's Desk Reference, 59th edition, (2005), Thomson PDR, Montvale N.J.; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md.; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N.J. も参照されたい。

30

【0221】

さらなる治療薬の投与は、全身投与、ならびに、疾患の部位 (例えば、腫瘍) への直接的な投与など、あらゆる適切な経路で実施することができる。

40

【0222】

一部の実施形態では、この方法は、さらなる治療薬 (例えば、抗体) を、対象に対して、1用量で投与することを含む。一部の実施形態では、この方法は、さらなる治療薬 (例えば、抗体) を、対象に対して、複数の用量 (例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、または、8用量) で投与することを含む。一部の実施形態では、さらなる治療薬 (例えば、抗体) を、対象に対して、複数の用量で投与する、ただし、クレブス回路調節ポリペプチド、及び / または、CAR ポリペプチドを発現する免疫細胞を投与する約1、2、3、4、5、6、または、7日前に、さらなる治療薬 (例えば、抗体) の第1の用量を投与する。一部の実施形態では、さらなる治療薬 (例えば、抗体) の第1の用量を、クレブス回路調節ポリペプチド、及び / または、CAR ポリペプチドを発現する免疫細胞を投与

50

する約 24 ~ 48 時間前に、対象に対して投与する。一部の事例では、さらなる治療薬を、関係する標的抗原に特異的な抗体、例えば、表 1 に記載した抗体、及び、同じ標的に特異的なその他の抗体とし得る。

【0223】

一部の実施形態では、さらなる治療薬（例えば、抗体）を、クレブス回路調節ポリペプチド、及び/または、CARポリペプチドを発現する免疫細胞を投与する前と、その後の約 2 週間ごとに、対象に対して投与する。一部の実施形態では、さらなる治療薬（例えば、抗体）の最初の 2 用量を、約 1 週間（例えば、約 6、7、8、または、9 日）の間隔で投与する。特定の実施形態では、第 3 以降の用量を、約 2 週間ごとに投与する。

【0224】

本明細書に記載した実施形態のいずれにおいても、さらなる治療薬（例えば、抗体）の投与の時期はおおよそそのものであり、そして、前掲の日の前後の 3 日間を含む（例えば、3 週間ごとの投与は、18 日、19 日、20 日、21 日、22 日、23 日、または、24 日での投与を含む）。

【0225】

本明細書に記載した方法の効果は、当該技術分野で公知のあらゆる方法を用いて評価することができ、熟練した医療従事者、及び/または、本明細書に記載した効果から自明である。例えば、抗体をベースとした免疫療法の効果は、対象の生存率、あるいは、対象または組織もしくはその試料における、がん負荷量で評価し得る。一部の実施形態では、抗体をベースとした免疫療法は、その療法の対象における安全性または毒性に基づいて、例えば、対象の総合的な健康状態、及び/または、有害事象または重度の有害事象の存在で評価する。

【0226】

VI. 治療用途用のキット

また、本開示は、本明細書に記載した組成物の使用のためのキットも提供する。例えば、本開示は、異常細胞、例えば、腫瘍細胞の成長の阻害、及び/または、低グルコース環境、低アミノ酸環境、低 pH 環境、及び/または、低酸素環境、例えば、腫瘍内微小環境における免疫細胞の成長、及び/または、増殖の改善での使用のためのキットであって、クレブス回路調節ポリペプチドと、任意にキメラ受容体ポリペプチドを発現する免疫細胞の集団（例えば、インビトロまたはインビボで構築した T リンパ球、または、NK 細胞）を含むキットも提供する。キットは、治療薬、または、免疫細胞上で発現したキメラ受容体ポリペプチドが結合するタグに結合した治療薬（例えば、本明細書に記載したもの）をさらに含み得る。このようなキットは、クレブス回路調節ポリペプチドとキメラ受容体ポリペプチド、例えば、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドと、任意の治療薬、または、タグにコンジュゲートした治療薬を共発現する遺伝子操作した免疫細胞、例えば、本明細書に記載した免疫細胞（例えば、T リンパ球、及び/または、NK 細胞）の集団を含む、1 つ以上の容器を含み得る。

【0227】

一部の実施形態では、本明細書に記載したキットは、インビトロで増殖した、クレブス回路調節ポリペプチド発現免疫細胞とキメラ受容体ポリペプチド発現免疫細胞、ならびに、活性化 T 細胞上に存在する細胞表面抗体に特異的な抗体、例えば、抗 CD5 抗体、抗 CD38 抗体、または、抗 CD7 抗体を含む。クレブス回路調節ポリペプチド発現免疫細胞、及び、キメラ受容体ポリペプチド発現免疫細胞は、当該技術分野で公知であり、または、本明細書で開示したキメラ受容体ポリペプチドのいずれかを発現し得る。

【0228】

あるいは、本明細書に開示したキットは、本明細書に記載した核酸または核酸セットを含み得るものであり、このものは、同じく本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドのいずれか、及び、クレブス回路調節ポリペプチドのいずれかを集合的にコードする。

【0229】

一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載した方法のいずれかでの使用のための

10

20

30

40

50

取扱説明書をさらに含むことができる。備える取扱説明書は、目的の活性を得るために、例えば、対象での標的細胞の成長を阻害する、及び/または、低グルコース環境、低アミノ酸（例えば、低グルタミン環境）環境、低pH環境、及び/または、低酸素環境（例えば、低グルコース、低アミノ酸、低pH、または、低酸素腫瘍内微小環境）における免疫細胞の成長、及び/または、増殖を改善するために、第1及び第2の医薬組成物を対象に対して投与するための説明を含み得る。キットは、対象に関する治療の必要性の有無を判断して、治療に適した対象を選択するための説明をさらに含み得る。一部の実施形態では、取扱説明書は、遺伝子操作した免疫細胞の集団の投与の説明と、タグにコンジュゲートした治療薬の投与に関する任意の説明とを含む。

【0230】

本明細書に記載した免疫細胞と、タグにコンジュゲートした治療薬の任意の使用に関する取扱説明書は、一般的には、意図した治療のための用量、投与スケジュール、及び、投与経路に関する情報を含む。容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、複数回用量パッケージ）、または、単位未満の用量とすることができる。本開示のキットに提供される取扱説明書は、一般的には、ラベルまたは添付文書に記載した取扱説明書である。このラベルまたは添付文書は、医薬組成物が、対象における疾患または障害を治療する、疾患または障害の発症を遅延させる、及び/または、疾患または障害を緩和するために使用されることを示す。

【0231】

本明細書で提供するキットは、好適なパッケージに入れられている。好適なパッケージとして、バイアル、ボトル、瓶、柔軟なパッケージなどがあるが、これらに限定されない。特定の器具、例えば、吸入用器具、経鼻投与用器具、または、注入用器具などと組み合わせて使用するためのパッケージもまた意図している。キットは、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針で貫通可能な栓を有する静脈内溶液バッグ、または、バイアルとし得る）。容器は、滅菌アクセスポートも有し得る。第2の医薬組成物での少なくとも1つの活性剤は、本明細書に記載した抗体である。第1の医薬組成物での少なくとも1つの活性剤は、本明細書に記載したキメラ受容体ポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドを発現する免疫細胞（例えば、Tリンパ球、または、NK細胞）の集団である。

【0232】

キットは、任意に、さらなる構成要素、例えば、緩衝剤、及び、説明情報などを提供し得る。通常、キットは、容器、及び、容器上または容器に結合したラベルまたは添付文書（複数可）を含む。一部の実施形態では、本開示は、上記したキットの内容物を含む製造物品を提供する。

【0233】

一般的な技術

本開示の実施にあつては、特に断りの無い限り、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、及び、免疫学の従来技術を用いるが、それらは当業者に公知である。このような技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed. 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J.

10

20

30

40

50

Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.): Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practice approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988 - 1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); DNA Cloning: A practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985>>); Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984>>); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986>>); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986>>); 及び、B. Perbal, A practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.)などの文献で、十分に説明されている。

【0234】

当業者であれば、さらなる技術思想を加えずとも、上記した説明に基づいて、本開示を最大限に利用できるものと考えられる。それ故に、以下の特定の実施形態は、単なる例示として解釈すべきであり、いかなる意味においても、残余の開示を限定的に捉えるべきはない。本明細書で引用する全ての刊行物は、本明細書に記載の目的及び趣旨に関して、参照により、本明細書で援用する。

【実施例】

【0235】

実施例1：低グルコース環境でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現がT細胞機能に及ぼす影響。

クレブス回路調節ポリペプチド導入遺伝子を、同じT細胞において、ACTRポリペプチドと共発現させる。導入遺伝子は、例えば、PHGDG、PCK1、IDH1、IDH1、MDH1、MDH2、GOT1、GOT2、PSAT1、GDH1、GPT1、または、GLS（例えば、配列番号81～92）である。例えば、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたACTRポリペプチド、及び、グルコース輸入ポリペプチドをコードするウイルスを、T細胞に導入する。T細胞を、IGROV-1細胞などの腫瘍標的細胞、及び、抗FOLR1抗体などの腫瘍標的化抗体と、所与のエフェクター：標的（E：T）の比率で混合する。その後、反応物、異なる開始濃度のグルコース（例えば、0～20mM）で、5%CO₂インキュベーターにおいて、37℃で、一定期間（例えば、6～8日間）培

養する。次に、例えば、サイトカイン生産アッセイ、または、T細胞増殖アッセイ、または、長時間刺激に対する耐性を使用して、T細胞機能を評価する。反応上清からサイトカイン生産（例えば、IL-2、及び/または、IFN-ガンマ）を測定する。増殖実験のために、共培養物を回収してから、抗CD3抗体、及び、生死細胞染料で染色する。フローサイトメトリーを使用して、生CD3陽性細胞の個数を、T細胞増殖の指標として評価する。ACTRポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドも発現するT細胞は、ACTRだけを発現するT細胞と比較して、例えば、改善したサイトカイン生産、または、旺盛な増殖を伴う高度のT細胞機能を示す。この高度の機能は、低グルコース濃度において、さらに顕著であり得る。これらの実験は、T細胞においてクレブス回路調節ポリペプチドを発現させると、T細胞活性にプラスの影響を及ぼすことを実証している。

10

【0236】

実施例2：高濃度の可溶性阻害剤環境でのクレブス回路調節ポリペプチド遺伝子の発現が、T細胞機能に及ぼす影響。

クレブス回路調節ポリペプチド導入遺伝子を、同じT細胞において、ACTRポリペプチドと共発現させる。導入遺伝子は、例えば、PHGDG、PCK1、IDH1、IDH1、MDH1、MDH2、GOT1、GOT2、PSAT1、GDH1、GPT1、または、GLS（例えば、配列番号81～92）である。例えば、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたACTRポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドをコードするウイルスを、T細胞に導入する。形質導入したT細胞を、腫瘍内微小環境に存在する異なる濃度の可溶性阻害剤（例えば、TGFベータ、PGE₂、キヌレニン、及び/または、アデノシン）を含有する培地で、IGROV-1細胞などの腫瘍標的細胞、及び、抗FOLR1抗体などの腫瘍標的化抗体と、所与のエフェクター：標的（E：T）の比率で混合する。その後、反応物を、5%CO₂インキュベーターにおいて、37℃で、一定期間（例えば、6～8日間）培養する。次に、例えば、サイトカイン生産アッセイ、または、T細胞増殖アッセイ、または、長時間刺激に対する耐性を使用して、T細胞機能を評価する。反応上清からサイトカイン生産（例えば、IL-2、及び/または、IFN-ガンマ）を測定する。増殖実験のために、共培養物を回収してから、抗CD3抗体、及び、生死細胞染料で染色する。フローサイトメトリーを使用して、生CD3陽性細胞の個数を、T細胞増殖の指標として評価する。ACTRポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドも発現するT細胞は、ACTRだけを発現するT細胞と比較して、例えば、改善したサイトカイン生産、または、旺盛な増殖を伴う高度のT細胞機能を示す。この高度の機能は、高濃度の可溶性阻害剤において達成し得る。これらの実験は、T細胞においてクレブス回路調節ポリペプチドを発現させると、T細胞活性にプラスの影響を及ぼすことを実証している。

20

30

【0237】

実施例3：免疫抑制細胞が多数存在する環境でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、T細胞機能に及ぼす影響。

クレブス回路調節ポリペプチド導入遺伝子を、同じT細胞において、ACTRポリペプチドと共発現させる。導入遺伝子は、例えば、PHGDG、PCK1、IDH1、IDH1、MDH1、MDH2、GOT1、GOT2、PSAT1、GDH1、GPT1、または、GLS（例えば、配列番号81～92）である。例えば、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたACTRポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドをコードするウイルスを、T細胞に導入する。形質導入したT細胞を、免疫抑制細胞（例えば、骨髄由来の抑制細胞、及び/または、制御性T細胞）の存在下で、IGROV-1細胞などの腫瘍標的細胞、及び、抗FOLR1抗体などの腫瘍標的化抗体と、所与のエフェクター：標的（E：T）の比率で混合する。その後、反応物を、5%CO₂インキュベーターにおいて、37℃で、一定期間（例えば、6～8日間）培養する。次に、例えば、サイトカイン生産アッセイ、または、T細胞増殖アッセイ、または、長時間刺激に対する耐性を使用して、T細胞機能を評価する。反応上清からサイトカイン生産（例えば、IL-2、及び/または、IFN-ガンマ）を測定する。増殖実験のために、共培養物を回収してから、抗CD3

40

50

抗体、及び、生死細胞染料で染色する。フローサイトメトリーを使用して、生CD3陽性細胞の個数を、T細胞増殖の指標として評価する。ACTRポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドも発現するT細胞は、ACTRだけを発現するT細胞と比較して、例えば、改善したサイトカイン生産、または、旺盛な増殖を伴う高度のT細胞機能を示す。この高度の機能は、多量の（例えば、多数の、または、パーセンテージが大きな）免疫抑制細胞の存在下で達成し得る。これらの実験は、T細胞においてクレブス回路調節ポリペプチドを発現させると、T細胞活性にプラスの影響を及ぼすことを実証している。

【0238】

実施例4：腫瘍モデルでのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、T細胞機能に及ぼす影響。

クレブス回路調節ポリペプチド導入遺伝子を、同じT細胞において、ACTRポリペプチドと共発現させる。導入遺伝子は、例えば、PHGDG、PCK1、IDH1、IDH1、MDH1、MDH2、GOT1、GOT2、PSAT1、GDH1、GPT1、または、GLS（例えば、配列番号81～92）である。例えば、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたACTRポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドをコードするウイルスを、T細胞に導入する。形質導入したT細胞を、マウス腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性について評価する。これらの実験のために、腫瘍細胞株、例えば、IGROV-1を、NSG（商標）（NOD scidガンマ、NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ、系統005557）マウスに接種する。続いて、腫瘍標的化抗体、ならびに、ACTRだけを発現するT細胞、または、ACTRとクレブス回路調節ポリペプチドを発現するT細胞を、腫瘍担持マウスに対して投与する。実験期間中にわたって、腫瘍の増殖をモニターする。腫瘍標的化抗体と組み合わせると、ACTRポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドも発現するT細胞は、ACTRポリペプチドだけを発現するT細胞と比較して、抗腫瘍活性が大きい。加えて、腫瘍標的化抗体と組み合わせると、ACTRポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドも発現するT細胞は、ACTRポリペプチドだけを発現するT細胞と比較して、例えば、旺盛な増殖性、改善したT細胞持続性、及び/または、改善したサイトカインの生産性など、高いT細胞活性を示し得る。これらの実験は、ACTR発現T細胞においてクレブス回路調節ポリペプチドを発現させると、インビボにおけるT細胞機能にプラスの影響を及ぼすことを実証している。

【0239】

実施例5：低濃度のグルコース濃度が、T細胞機能に及ぼす影響。

配列番号104の例示的なGPC3を標的とするCAR発現構築物をコードするガンマレトロウイルスを、組換え技術で作製し、そして、初代ヒトT細胞を感染させるために使用して、その細胞表面上にGPC3を標的とするCARポリペプチドを発現する細胞を作製した。次いで、6日間のフローをベースとした増殖アッセイを使用して、GPC3を標的とするCAR発現細胞の機能を試験した。具体的には、200,000個の非形質導入模擬T細胞、または、GPC3を標的とするCAR構築物を発現するT細胞を、50,000個のGPC3+肝細胞癌JHH7腫瘍細胞、または、Hep3B腫瘍細胞のいずれかと共に、4:1（エフェクター細胞/CAR発現T細胞：標的細胞）の比率で培養した。共培養物を、異なる濃度のグルコースの存在下、5%CO₂インキュベーターにおいて、37℃で、6日間インキュベートした。6日間の最後に、共培養物を回収し、そして、抗CD3抗体で染色した。フローサイトメトリーを使用して、CD3陽性細胞の個数を、T細胞増殖の指標として評価した。低濃度のグルコースでは、CAR-T増殖は乏しかった（図1）。これらの実験は、低グルコース環境では、CAR-T細胞増殖活性にマイナスの影響を及ぼし得ることを実証している。

【0240】

実施例6：GPC3を標的とするCAR-T細胞構築物を使用するクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、T細胞機能に及ぼす影響。

例示的なGPC3を標的とするCARポリペプチド発現構築物（配列番号104）をコ

10

20

30

40

50

ードするガンマレトロウイルスを、組換え技術により作製し、そして、初代ヒトT細胞を感染させるために使用して、その細胞表面上にGPC3を標的とするCARポリペプチドを発現する細胞を作製した。加えて、例示的なGPC3を標的とするCARポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチド(GOT1、または、GOT2)(それぞれ、配列番号87及び88)をコードするガンマレトロウイルスを、組換え技術により作製し、そして、初代ヒトT細胞を感染させるために使用して、GPC3標的化ポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドを発現する細胞を作製した。CARポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドの両方をコードする構築物において、2つのポリペプチドのコード配列を、P2Aリボソームスキップ配列で隔てた。発現したバリエーションは、抗GPC3 CAR+ GOT1と、抗GPC3 CAR+ GOT2であった。次いで、6日間のフローをベースとした増殖アッセイを使用して、GPC3を標的とするCAR発現細胞の機能を試験した。具体的には、200,000個の非形質導入模擬T細胞、GPC3を標的とするCARポリペプチドを発現するT細胞、または、GPC3を標的とするCARポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドとを発現するT細胞を、50,000個のGPC3+肝細胞癌JHH7腫瘍細胞と共に、4:1(エフェクター細胞/CAR発現T細胞:標的細胞)の比率で培養した。共培養物を、1.25mMのグルコース(腫瘍相当)、及び、10mMのグルコース(ほぼ末梢血レベル)の存在下で、5%CO₂、37℃で、6日間インキュベートした。6日間の最後に、共培養物を回収して、抗CD3抗体で染色した。

【0241】

フローサイトメトリーを使用し、CD3陽性細胞の個数を、T細胞増殖の指標として評価した。CARポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドも発現するT細胞は、CAR構築物だけを発現するT細胞と比較して、旺盛なT細胞増殖を示した(図2A、2B、3A、及び、3B)。この旺盛な増殖性は、腫瘍相当の低濃度のグルコースでも認められた。これらの実験は、T細胞において、クレブス回路調節ポリペプチドを発現させると、CAR-T細胞増殖活性にプラスの影響を及ぼすことを実証している。

【0242】

実施例7：低グルコース環境でのクレブス回路調節遺伝子の発現が、T細胞機能に及ぼす影響。

クレブス回路調節導入遺伝子を、同じT細胞において、キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドと共発現させる。導入遺伝子は、例えば、GPT1、GLS、PCK1、GOT1、GOT2、IDH1、IDH2、MDH1、MDH2、PHGDH、PSAT1、または、GDH1(例えば、配列番号81~92)である。例えば、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたCARポリペプチドと、クレブス回路代謝産物ポリペプチドをコードするウイルスを、T細胞に導入する。T細胞を、HepG2細胞などの腫瘍標的細胞と、所与のエフェクター:標的(E:T)の比率で混合する。次いで、反応物を、異なる開始濃度のグルコース(例えば、0~20mM)で、5%CO₂インキュベーターにおいて、37℃で、一定期間(例えば、6~8日間)インキュベートする。次いで、例えば、サイトカイン生産アッセイ、または、T細胞増殖アッセイを使用して、T細胞機能を評価する。反応上清からサイトカイン生産(例えば、IL-2、及び/または、IFN-ガンマ)を測定する。増殖実験のために、共培養物を回収してから、抗CD3抗体、及び、生死細胞染料で染色する。フローサイトメトリーを使用して、生CD3陽性細胞の個数を、T細胞増殖の指標として評価する。

【0243】

CARポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドも発現するT細胞は、CARだけを発現するT細胞と比較して、例えば、サイトカインの生産性が大きく、または、増殖性に優れるなど、高度のT細胞機能を示すものと考えられる。この高度の機能は、低濃度のグルコースにおいて、さらに顕著となり得る。

【0244】

実施例8：高濃度の可溶性阻害剤が存在する環境でのクレブス回路調節遺伝子の発現が、T細胞機能に及ぼす影響。

クレブス回路調節導入遺伝子を、同じT細胞において、キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドと共発現させる。導入遺伝子は、例えば、GPT1、GLS、PCK1、GOT1、GOT2、IDH1、IDH2、MDH1、MDH2、PHGDH、PSAT1、または、GDH1(例えば、配列番号81~92)である。例えば、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたCARポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチドをコードするウイルスを、T細胞に導入する。T細胞を、腫瘍内微小環境に存在する異なる濃度の可溶性阻害剤(例えば、TGF-ベータ、PGE₂、及び/または、アデノシン)を含有する培地で、HepG2細胞などの腫瘍標的細胞と、所与のエフェクター:標的(E:T)の比率で混合する。次いで、反応物を、5%CO₂インキュベーターにおいて、37℃で、一定期間(例えば、6~8日間)インキュベートする。次いで、例えば、サイトカイン生産アッセイ、または、T細胞増殖アッセイを使用して、T細胞機能を評価する。反応上清からサイトカイン生産(例えば、IL-2、及び/または、IFN-ガンマ)を測定する。増殖実験のために、共培養物を回収してから、抗CD3抗体、及び、生死細胞染料で染色する。フローサイトメトリーを使用して、生CD3陽性細胞の個数を、T細胞増殖の指標として評価する。

【0245】

CARポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドも発現するT細胞は、CARだけを発現するT細胞と比較して、例えば、サイトカインの生産性が大きく、または、増殖性に優れるなど、高度のT細胞機能を示すものと考えられる。この高度の機能は、高濃度の可溶性阻害剤で達成し得る。

【0246】

実施例9:数多くの免疫抑制細胞が存在する環境でのクレブス回路調節遺伝子の発現が、T細胞機能に及ぼす影響。

クレブス回路代謝産物入換導入遺伝子を、同じT細胞において、キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドと共発現させる。導入遺伝子は、例えば、GPT1、GLS、PCK1、GOT1、GOT2、IDH1、IDH2、MDH1、MDH2、PHGDH、PSAT1、または、GDH1(例えば、配列番号81~92)である。例えば、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたCARポリペプチドと、クレブス回路代謝産物入換ポリペプチドをコードするウイルスを、T細胞に導入する。形質導入したT細胞を、蛍光標識で目印を付けた免疫抑制細胞(例えば、骨髄由来の抑制細胞、及び/または、制御性T細胞)の存在下で、HepG2細胞などの腫瘍標的細胞と、所与のエフェクター:標的(E:T)の比率で混合する。次いで、反応物を、5%CO₂インキュベーターにおいて、37℃で、一定期間(例えば、3~10日間)インキュベートする。次いで、例えば、サイトカイン生産アッセイ、または、T細胞増殖アッセイを使用して、T細胞機能を評価する。反応上清からサイトカイン生産(例えば、IL-2、及び/または、IFN-ガンマ)を測定する。増殖実験のために、共培養物を回収してから、抗CD3抗体、及び、生死細胞染料で染色する。フローサイトメトリーを使用して、生CD3陽性細胞の個数を、T細胞増殖の指標として評価する。

【0247】

CARポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドも発現するT細胞は、CARだけを発現するT細胞と比較して、例えば、サイトカインの生産性が大きく、または、増殖性に優れるなど、高度のT細胞機能を示すものと考えられる。この高度の機能は、数多くの(例えば、多数の、または、パーセンテージが大きい)免疫抑制細胞の存在下で達成し得る。

【0248】

実施例10:GPC3を標的とするCAR-T発現構築物を使用するマウス腫瘍モデルでのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、T細胞機能に及ぼす影響

クレブス回路調節ポリペプチド(GOT2)(配列番号88)を、同じT細胞において、GPC3を標的とするCAR-Tポリペプチド(配列番号104)と共発現させた。GPC3を標的とするCAR-T発現構築物をコードするガンマレトロウイルスを生成し、

そして、初代ヒトT細胞を感染させるために使用して、その細胞表面にGPC3を標的とするCAR-Tを発現する細胞を生成した。また、T細胞に、P2Aリボソームスキップ配列で隔てられた、抗GPC3 CARポリペプチドと、GOT2をコードするウイルスで形質導入をした。

【0249】

CARで形質導入したT細胞を、マウス腫瘍モデルにおいて、抗腫瘍活性について評価した。これらの実験のために、肝細胞癌腫瘍細胞株、JHH7を、NSG(商標)(NOD scidガンマ、NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tmWj1}/SzJ、系統005557)マウスに接種した。抗GPC3 CAR発現T細胞を使用した治療を、腫瘍体積が、約50mm³に達したときに開始した(接種の8日後)。マウスを、腫瘍体積に基づいて、それぞれ5匹のマウスの治療群に無作為に分け、そして、接種の8日後と15日後に、 5×10^6 個のCAR+T細胞の用量で、GPC3を標的とするCARを発現するT細胞で治療した。総T細胞用量は、各構築物のCAR形質導入効率に基づいて変えた。

10

【0250】

実験期間中、腫瘍体積と体重を、週に2~3回測定した。GOT2を共発現するCAR-T細胞は、GPC3 CAR構築物だけを発現するT細胞と比較して、抗腫瘍効果が大きいことが実証された(図4)。これらの実験は、CAR-T細胞におけるクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、肝細胞癌のマウス異種移植モデルでのCAR-T細胞の抗腫瘍効果にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

【0251】

20

CARで形質導入したT細胞を、マウス腫瘍モデルにおいて、抗腫瘍活性について評価した。これらの実験のために、肝細胞癌腫瘍細胞株、Hep3Bを、NSG(商標)(NOD scidガンマ、NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tmWj1}/SzJ、系統005557)マウスに接種した。抗GPC3 CAR発現T細胞を使用した治療を、腫瘍体積が、約100mm³に達したときに開始した(接種の8日後)。マウスを、腫瘍体積に基づいて、それぞれ5匹のマウスの治療群に無作為に分け、そして、接種して20日後と27日後に、 1×10^6 個のCAR+T細胞の用量で、GPC3を標的とするCARを発現するT細胞で治療した。総T細胞用量は、各構築物のCAR形質導入効率に基づいて変えた。

【0252】

30

実験期間中、腫瘍体積と体重を、週に2~3回測定した。GOT2を共発現するCAR-T細胞は、GPC3 CAR構築物だけを発現するT細胞と比較して、抗腫瘍効果が大きいことが実証された(図6)。これらの実験は、CAR-T細胞におけるクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、肝細胞癌のマウス異種移植モデルでのCAR-T細胞の抗腫瘍効果にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

【0253】

CARで形質導入したT細胞を、マウス腫瘍モデルにおいて、抗腫瘍活性について評価した。これらの実験のために、小細胞肺癌腫瘍細胞株、NCI-H446を、NSG(商標)(NOD scidガンマ、NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tmWj1}/SzJ、系統005557)マウスに接種した。抗GPC3 CAR発現T細胞を使用した治療を、腫瘍体積が、約100mm³に達したときに開始した(接種の18日後)。マウスを、腫瘍体積に基づいて、それぞれ5匹のマウスの治療群に無作為に分け、そして、接種して18日後と25日後に、 5×10^6 個のCAR+T細胞の用量で、GPC3を標的とするCARを発現するT細胞で治療した。総T細胞用量は、各構築物のCAR形質導入効率に基づいて変えた。

40

【0254】

実験期間中、腫瘍体積と体重を、週に2~3回測定した。GOT2を共発現するCAR-T細胞は、GPC3 CAR構築物だけを発現するT細胞と比較して、抗腫瘍効果が大きいことが実証された(図5)。これらの実験は、CAR-T細胞におけるクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、小細胞肺癌のマウス異種移植モデルでのCAR-T細胞の抗

50

腫瘍効果にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

【0255】

実施例11：GPC3を標的とするCAR-T発現構築物を使用するマウス腫瘍モデルでのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、T細胞増殖に及ぼす影響

クレブス回路調節ポリペプチド(GOT2)(配列番号88)を、同じT細胞において、GPC3を標的とするCAR-Tポリペプチド(配列番号104)と共発現させた。GPC3を標的とするCAR-T発現構築物をコードするガンマレトロウイルスを生成し、そして、初代ヒトT細胞を感染させるために使用して、その細胞表面にGPC3を標的とするCAR-Tを発現する細胞を生成した。また、T細胞に、P2Aリボソームスキップ配列で隔てられた抗GPC3 CARポリペプチドと、GOT2をコードするウイルスで形質導入をした。

10

【0256】

CARで形質導入したT細胞を、増殖について、そして、マウス腫瘍モデルで評価した。これらの実験のために、肝細胞癌腫瘍細胞株、Hep3Bを、NSG(商標)(NOD scidガンマ、NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tmWj1}/SzJ、系統005557)マウスに接種した。抗GPC3 CAR発現T細胞を使用した治療を、腫瘍体積が、約100mm³に達したときに開始した(接種の20日後)。マウスを、腫瘍体積に基づいて、それぞれ5匹のマウスの治療群に無作為に分け、そして、接種して20日後と27日後に、1×10⁶個のCAR+T細胞の用量で、GPC3を標的とするCARを発現するT細胞で治療した。総T細胞用量は、各構築物のCAR形質導入効率に基づいて変えた。

20

【0257】

末梢血を採取し、そして、抗CD3、及び、抗CAR抗体で染色した。CD3陽性細胞と、CAR陽性細胞の個数を、T細胞の増殖と、CAR活性の尺度として、フローサイトメトリーで評価した。GOT2を共発現するCAR-T細胞は、GPC3 CAR構築物だけを発現するT細胞と比較して、T細胞の増殖が旺盛になっていた(図7)。これらの実験は、CAR-T細胞におけるクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、肝細胞癌のマウス異種移植モデルでのCAR-T細胞の増殖にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

【0258】

実施例12：T細胞でのクレブス回路調節遺伝子(GOT2)と、GPC3を標的とするCARの共発現は、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ酵素活性を高める

30

例示的なGPC3を標的とするCARポリペプチド発現構築物(配列番号104)をコードするガンマレトロウイルスを、組換え技術を介して生成し、そして、初代ヒトT細胞を感染させるために使用して、その細胞表面にGPC3を標的とするCAR-Tを発現する細胞を生成した。加えて、例示的なGPC3を標的とするCARポリペプチドと、クレブス回路調節ポリペプチド(GOT2)(配列番号88)をコードするガンマレトロウイルスを、組換え技術を介して生成し、そして、初代ヒトT細胞を感染させるために使用して、P2Aリボソームスキップ配列で隔てられた2つのポリペプチドであるGPC3標的化ポリペプチドと、GOT2を発現する細胞を生成した。GOT2の発現は、ウエスタンブロットを使用して確認した。CARを形質導入したT細胞を、エフェクターと標的との比率を4:1として、GPC3+肝細胞癌Hep3B腫瘍細胞と混合し、37℃、5%CO₂で、4日間インキュベートした。インキュベーションした後に、細胞溶解物を、1×10⁶個の細胞から調製し、細胞溶解物を、Bolt LDS 試料緩衝剤(Invitrogen)、それに、100nM DTTと組み合わせ、そして、2つの別々のゲルに泳動させた。次いで、ゲルから得たタンパク質を、ニトロセルロースメンブレンに転写した(BioRadのTransblot turbo transfer pack)。ブロットを、ウサギ抗ヒトGOT2抗体(Origene)を使用して、GOT2発現を一晩プローブし、次いで、HRP結合抗ウサギ抗体を使用してプローブする、または、マウス抗ヒトGAPDH(Biolegend)を使用してGAPDH発現のプローブを行い、そして、HRP結合抗マウスIgG二次抗体でプローブした。GOT2発現は、親のCARと比較して、CAR+GOT2構築物で形質導入したT細胞での発現が強かった(図8A)

40

50

【0259】

形質導入したT細胞を、4：1のエフェクターと標的との比率で、GPC3＋肝細胞癌Hep3B腫瘍細胞と混合し、37℃、5%CO₂で、8日間インキュベートした。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）酵素活性を、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性アッセイキット（Abcam）を、製造業者のプロトコルに従って使用して測定をした。37℃で、1分あたりに生成するグルタミン酸塩の量を測定して、AST活性を計算した。この例では、AST活性は、基質を添加して50分後に計算した。CARポリペプチドに加えて、クレブス回路調節ポリペプチドGOT2を発現するT細胞は、腫瘍細胞による活性化を受けた後に、AST活性が高まることを実証した。（図8B）。これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、T細胞機能にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

10

【0260】

実施例13：T細胞でのクレブス回路調節遺伝子（GOT2）と、GPC3を標的とするCAR、または、ACTRのいずれかとの共発現は、増殖を促す

クレブス回路調節ポリペプチド（GOT2）（配列番号10）を、同じT細胞において、GPC3を標的とするCAR-Tポリペプチド（配列番号1）と共発現させた。T細胞を、CARポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P2Aリボソームスキップ配列で隔てられたCARとGOT2で形質導入した。GPC3を標的とするCARを発現し、かつ、GPC3-CARとGOT2を共発現するT細胞を、セルトレースバイオレットで標識し、細胞タンパク質を蛍光標識し、そして、2：1のエフェクターと標的との比率で、GPC3＋肝細胞癌Hep3B腫瘍細胞と混合した。活性化して6日後に、細胞を抗CD3で染色し、そして、活性化して6日後に、フローサイトメトリーでセルトレースバイオレット希釈を測定して、増殖を測定した。CARとGOT2を共発現するT細胞のCD3＋細胞のセルトレースバイオレット平均蛍光強度の逆数を、CARだけを発現するT細胞の平均逆蛍光強度と比較して表した。CARポリペプチドと組み合わせてGOT2を発現するT細胞は、CARだけを発現するT細胞と比較して、細胞分裂の増加を示した。図9A

20

【0261】

クレブス回路調節ポリペプチド（GOT2）（配列番号10）を、同じT細胞において、ACTRポリペプチド（配列番号1）と共発現させた。T細胞を、ACTRポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P2Aリボソームスキップ配列で隔てられたACTR及びGOT2で形質導入した。ACTRを発現し、かつ、ACTRとGOT2を共発現するT細胞を、2：1のエフェクターと標的との比率で、GPC3＋肝細胞癌HepG2腫瘍細胞、及び、1μg/mLの抗GPC3抗体GC33と混合した（Nakano、Ket al. Anticancer Drugs. 2010 Nov; 21(10): 907-16を参照されたい）。活性化して3日後に、T細胞を、抗CD3で染色してから、フローサイトメトリーで計数をした。ACTRとGOT2を共発現するT細胞のCD3＋細胞の総数を、ACTRだけを発現するT細胞のCD3＋T細胞の総数と比較して表した。ACTRポリペプチドに加えて、GOT2を発現するT細胞は、T細胞の個数を増やすことを実証した。図9B

30

40

【0262】

これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、T細胞増殖にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

【0263】

実施例14：T細胞でのクレブス回路調節遺伝子（GOT2）と、GPC3を標的とするCAR、または、ACTRのいずれかとの共発現は、IL-17Aサイトカイン生産を促す

クレブス回路調節ポリペプチド（GOT2）（配列番号88）を、同じT細胞において、GPC3を標的とするCAR-Tポリペプチド（配列番号104）と共発現させた、または、T細胞において、ACTR-4-1BBポリペプチド（配列番号1）、または、ACTR-CD28ポリペプチド（配列番号57）と共発現させた。これらのT細胞を、C

50

A RまたはA C T Rポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P 2 Aリボソームスキップ配列で隔てたC A RまたはA C T Rと、G O T 2で形質導入した。形質導入したT細胞を、2 : 1のエフェクターと標的との比率で、G P C 3 + 肝細胞癌H e p G 2腫瘍細胞と混合した ; A C T R T細胞を用いた実験では、抗G P C 3抗体G C 3 3 (1 μ g / m L) を加えた。これらの細胞を、5 % C O₂インキュベーターにて、37 °Cで、24時間インキュベートした。インキュベーション後に、100 μ Lの細胞培養上清を回収し、そして、M S D E L I S A (M e s o S c a l e D i s c o v e r y , P a c i f i c B i o L a b s) を、製造業者の指示に従って使用してI L - 17 Aを測定した。I L - 17 A生産を、発現構築物の関数としてプロットしている (図10 A ~ 10 C) 。G O T 2と、C A R (図10 A) またはA C T Rポリペプチド (図10 B ~ 10 C) を共発現するT細胞は、C A RまたはA C T Rだけを発現するT細胞と比較して、I L - 17 Aを生産する能力の改善を示した。これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、I L - 17 Aサイトカイン生産にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

10

【0264】

実施例15 : クレブス回路調節遺伝子 (G O T 2) と、G P C 3を標的とするC A R、または、A C T Rのいずれかとの共発現は、C D 4 + T細胞の多機能性を促す

クレブス回路調節ポリペプチド (G O T 2) (配列番号88) を、同じT細胞において、G P C 3を標的とするC A R - Tポリペプチド (配列番号104) と共発現させた、または、同じT細胞において、4 - 1 B B (配列番号1) 、または、C D 28 (配列番号57) 一次共刺激ドメインのいずれかを含有するA C T Rポリペプチドと共発現させた。これらのT細胞を、C A RまたはA C T Rポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P 2 Aリボソームスキップ配列で隔てたC A RまたはA C T Rと、G O T 2で形質導入した。形質導入したT細胞を、1 : 1のエフェクターと標的との比率で、G P C 3 + 肝細胞癌H e p G 2腫瘍細胞と混合した ; A C T R T細胞を用いた実験では、抗G P C 3抗体G C 3 3 (1 μ g / m L) を加えた。これらの細胞を、タンパク質輸送阻害剤であるブレフェルジンA (5 μ g / m L) とモネンシン (2 μ M) の存在下で、5 % C O₂インキュベーターにて、37 °Cで、6時間インキュベートした。インキュベート後に、共培養物を、C A R及びA C T R T細胞の両方を、抗C D 4及び抗C D 8抗体で染色した ; A C T R T細胞も、抗C D 16抗体で染色した。続いて、これらの細胞を固定し、透過処理し、そして、抗I F N γ、抗I L - 2、抗T N F α、及び、抗I L - 17 A抗体で染色して、細胞内サイトカイン生産を定量した。

20

30

【0265】

複数のサイトカインを生産するC D 4 + T細胞の頻度を、フローサイトメトリーで定量した。C A RまたはA C T Rポリペプチドに加えて、G O T 2を発現するT細胞は、C A RまたはA C T Rだけを発現するT細胞と比較して、1つ、2つ、または、3つ超のサイトカインを同時に生産するC D 4 + T細胞の頻度が高く、G O T 2発現細胞での高度の多機能性を実証している (図11 A ~ 11 C) 。これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、C D 4 + T細胞の多機能性にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

40

【0266】

実施例16 : クレブス回路調節遺伝子 (G O T 2) と、G P C 3を標的とするC A R、または、A C T Rのいずれかとの共発現は、低分化、ナイーブ様表現型のC D 8 + 細胞の頻度を高める

クレブス回路調節ポリペプチド (G O T 2) (配列番号88) を、同じT細胞において、G P C 3を標的とするC A R - Tポリペプチド (配列番号104) と共発現させた、または、同じT細胞において、4 - 1 B B (配列番号1) 、または、C D 28 (配列番号57) 一次共刺激ドメインのいずれかを含有するA C T Rポリペプチドと共発現させた。これらのT細胞を、C A RまたはA C T Rポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P 2 Aリボソームスキップ配列で隔てたC A RまたはA C T Rと、G O T 2で形質導入

50

した。11名の健康なドナー由来のCAR構築物、及び、2名の健康なドナーに関するACTR構築物のT細胞表現型を、フローサイトメトリーで評価した。これらの実験においては、細胞を解凍し、そして、CAR及びACTRを発現するT細胞の両方を、抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗CD45RA、抗CD45RO、抗CD27、及び、抗CD62L抗体で染色した。CAR T細胞も、CARポリペプチドを検出するための組換えGPC3タンパク質で染色し、そして、ACTR T細胞も、ACTRポリペプチドを検出するために抗CD16抗体で染色した。CD27、CD45RA、CD62Lに対して陽性に染色し、かつ、CD45ROに対して陰性に染色したCD8⁺ CAR⁺、または、ACTR⁺ T細胞の頻度は、同族の親と比較して、GOT2も共発現したT細胞において高くなっており、このことは、GOT2発現細胞が、ナイーブさの濃いCD8⁺集団を有することを実証している(図12A~12C)。全体として、GOT2を共発現するCD8⁺ CAR、または、ACTR T細胞の表現型は、親のCARと比較して、分化の進んでいない(若い)表現型(CD27⁺/CD45RO⁺、CD27⁺/CD45RO⁻、CD27⁺/CD45RA⁺、CD27⁺/CD45RA⁻)の表現型マーカーを有する細胞の割合が高いことを示している。(図13)。これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、CD8表現型にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

【0267】

実施例17：T細胞でのクレブス回路調節遺伝子(GOT2)と、GPC3を標的とするCARの共発現は、長時間の抗原刺激、及び、低酸素下での増殖を促す

クレブス回路調節ポリペプチド(GOT2)(配列番号88)を、同じT細胞において、GPC3を標的とするCAR-Tポリペプチド(配列番号104)と共発現させた。これらのT細胞を、CARポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたCARと、GOT2で形質導入した。GPC3を標的とするCARを発現するT細胞と、GPC3-CARとGOT2細胞を共発現するT細胞を、セルトレースバイオレットで標識し、細胞タンパク質を蛍光標識し、そして、2:1のエフェクターと標的との比率で、GPC3+肝細胞癌Hep3B腫瘍細胞と混合した。活性化して3日後に、細胞を洗浄し、そして、2:1のエフェクターと標的の比率で、第2の抗原刺激としての新鮮なGPC3+肝細胞癌Hep3B腫瘍細胞と混合した。細胞を、正常酸素(20%酸素)、または、低酸素(1.5%酸素)条件下で、さらに3日間インキュベートした後に、抗CD3で染色し、フローサイトメトリーで、セルトレースバイオレットの希釈度を測定して増殖を測定して、セルトレースバイオレット平均蛍光強度の逆数(MFI⁻¹)として表した。CARポリペプチドに加えて、GOT2を発現するT細胞は、正常酸素状態と低酸素状態の両方で、長時間の抗原刺激下で増殖の増大を招いており(図14)、腫瘍内微小環境の複数のストレスを模倣した。これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、固形腫瘍内微小環境に存在する好ましくない条件下で増殖させる上で有利であることを実証している。

【0268】

実施例18：T細胞でのクレブス回路調節遺伝子(GOT2)と、GPC3を標的とするCARの共発現は、制限グルコース条件での増殖を促す

クレブス回路調節ポリペプチド(GOT2)(配列番号88)を、同じT細胞において、4-1BB(配列番号104)、または、CD28(配列番号105)共刺激ドメインを含有するGPC3を標的とするCAR-Tポリペプチドと共発現させた。これらのT細胞を、CARポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたCARとGOT2で形質導入した。GPC3を標的とするCAR-Tポリペプチドで形質導入したT細胞を、AlexaFluor 647結合GPC3組換えタンパク質、及び、抗AlexaFluor 647マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)で単離し、そして、RPMI+10%FBSで一晩静置した。次に、形質導入したT細胞を、セルトレースバイオレットで標識し、そして、2:1のエフェクターと標的との比率で、GPC3+肝細胞癌HepG2腫瘍細胞と混合した。共培養物を、腫瘍内微小環境での限られた栄養素の利用可能性を模倣するために、高濃度(10mM)また

は低濃度（1.25 mM）グルコースの存在下でインキュベートした。5% CO₂ インキュベーターにて、37℃で、7日経過した後に、これらの細胞を、抗CD3抗体で染色し、フローサイトメトリーで、セルトレースバイオレットの希釈度を測定して細胞分裂を評価した。

【0269】

GOT2とCARポリペプチドを共発現するT細胞は、セルトレースバイオレット蛍光強度の低下が示す通り、CARだけを発現するT細胞と比較して、10 mMと1.25 mMの両方のグルコースで、旺盛な増殖を示した。セルトレースバイオレット蛍光強度の逆数を、グルコース条件とT細胞タイプの関数としてプロットした（図15）。これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、4-1BBまたはCD28共刺激ドメインを含むCAR-T細胞、及び、高濃度グルコース及び低濃度グルコース条件でのT細胞増殖にプラスの影響を及ぼすことを実証した。

10

【0270】

実施例19：T細胞でのクレブス回路調節遺伝子（GOT2）と、GPC3を標的とするCARの共発現は、T細胞阻害剤キヌレニンの存在下での増殖を促す

クレブス回路調節ポリペプチド（GOT2）（配列番号88）を、同じT細胞において、CD28一次共刺激ドメインを含有するACTRポリペプチド（配列番号57）と共発現させ、そして、機能アッセイにて、ACTRポリペプチドだけを発現するT細胞と比較した。これらのT細胞を、ACTRポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたACTRとGOT2で形質導入した。これらのT細胞を、2:1のエフェクターと標的との比率で、（FOLR+）卵巣癌IGROV-1腫瘍細胞（パラホルムアルデヒドで固定したもの）を発現する葉酸受容体アルファと混合し、抗FOLR抗体（5 µg/mL）を加えた。共培養物を、5% CO₂ インキュベーターにて、37℃で、6日間培養した。インキュベートした後に、細胞の半分を、新しいプレートに移し、BrdU（Millipore Sigma）でパルスし、5% CO₂ インキュベーターにて、37℃で、約16時間インキュベートを行い、そして、EnVisionプレートリーダー（Perkin Elmer）を使用して、製造業者の指示に従って、BrdUの取り込みを分析して、化学発光を検出した。GOT2とACTRを共発現するT細胞は、ACTRだけを発現するT細胞と比較して、キヌレニンの非存在下と存在下の両方で、BrdU取り込みを増やしており、増殖の改善を示した。これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、固形腫瘍内微小環境に認められる抑制性分子の存在下での増殖に利点をもたらすことを実証している。図16。

20

30

【0271】

実施例20：T細胞でのクレブス回路調節遺伝子（GOT2）と、GPC3を標的とするCARの共発現は、GPC3+固形腫瘍異種移植片から単離したT細胞に関する持続的抑制性受容体発現の抑制を招く

クレブス回路調節ポリペプチド（GOT2）（配列番号88）を、同じT細胞において、GPC3を標的とするCAR-Tポリペプチド（配列番号104）と共発現させた。これらのT細胞を、CARポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたCARとGOT2で形質導入した。

40

【0272】

CAR-T細胞のエキスピボ表現型を、マウス腫瘍モデルに注射をした後に評価した。これらの実験のために、GPC3+肝細胞癌腫瘍細胞株、JHH7を、NSG（商標）（NOD scidガンマ、NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tmWj1}/SzJ、系統005557）マウスに接種した。T細胞を使用する治療を、腫瘍体積が、約100 mm³に達したときに開始した（接種の11日後）。マウスを、腫瘍体積に基づいて、それぞれ5匹のマウスの治療群に無作為に分け、そして、接種して11日後に、1×10⁶個のCAR+T細胞の用量で、GPC3を標的とするCARを発現するT細胞、または、GPC3を標的とするCARとGOT2を共発現するT細胞で治療した。

【0273】

50

T細胞を投与して2、7、及び、14日後に、JHH7腫瘍を有するマウスから皮下腫瘍を採取した。腫瘍を、カミソリの刃で細かく切り刻み、そして、ヒト腫瘍解離キット(Miltenyi Biotec)を使用して、37℃で、1時間、酵素消化した。細胞染色のために96ウェルプレートに播種する前に、消化した腫瘍を、70µmのセルストレーナーに通した。

【0274】

皮下腫瘍を発現する確立したJHH7GPC3を担持する免疫不全マウスを、CARとGOT2を共発現するT細胞、または、CARだけを発現するT細胞の 5×10^6 個を単回静脈内注射して治療した。動物のコホートを、2、7、及び、14日目に安楽死させ、そして、T細胞を、手作業、及び、酵素消化で腫瘍から単離した。フローサイトメトリーを行い、そして、CD69、CD25、及び、ICOS活性化分子の平均蛍光強度を、CD4+、及び、CD8+ T細胞サブセットで定量した。T細胞の表現型を、赤血球溶解、及び、細胞染色した後のフローサイトメトリーで評価した。これらの実験に関して、腫瘍から単離した細胞を、抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗PD-1、抗TIM-3、抗CD69、抗CD25、及び、抗ICOS抗体で染色した。CD69、CD25、及び、ICOS活性化分子の平均蛍光強度は、2日目(CD69)、または、7日目(CD25、ICOS)に、腫瘍から単離したCD4+、及び、CD8+ T細胞サブセットで定量を行い、それぞれのT細胞タイプについてプロットした。図17A~17Cに示すように、GOT2と、CARポリペプチドを共発現するT細胞は、CARだけを発現するT細胞と比較して、CD69、CD25、及び、ICOS活性化マーカーの発現を高めたことを実証した。

10

20

【0275】

皮下腫瘍を発現する確立したJHH7GPC3を担持する免疫不全マウスを、CARとGOT2を共発現するT細胞、または、CARだけを発現するT細胞の 5×10^6 個を単回静脈内注射して治療した。動物のコホートを、2、7、及び、14日目に安楽死させ、そして、T細胞を、手作業、及び、酵素消化によって、腫瘍及び脾臓から単離した。フローサイトメトリーを行い、そして、PD-1と、TIM-3抑制分子を共発現するT細胞の頻度を、CD4+、及び、CD8+ T細胞サブセットで定量した。PD-1と、TIM-3抑制分子を共発現するT細胞の頻度を、腫瘍から単離したCD4+及びCD8+ T細胞サブセットで定量し、そして、それぞれのT細胞タイプに関する時点の関数としてプロットした。CARと、GOT2を共発現するT細胞は、CARだけを発現するT細胞と比較して、7日目に同等以上の頻度のPD-1+TIM-3+ T細胞を示したが、14日目には、PD-1+TIM-3+ T細胞の頻度は低かった。図18A~18B。これらの結果は、CARと、GOT2を共発現するT細胞が、CARだけを発現するT細胞と比較して、抑制性受容体の持続的な発現に対して耐性が大きいことを示している。これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、活性化を促し、そして、固形腫瘍内微小環境でのT細胞の持続的な抑制性受容体の発現を制限することを実証している。

30

【0276】

実施例21：T細胞でのクレブス回路調節遺伝子(GOT2)と、GPC3を標的とするCARの共発現は、GPC3+固形腫瘍異種移植片から単離したT細胞に関する持続的抑制性受容体の発現に対する耐性を招く

40

クレブス回路調節ポリペプチド(GOT2)(配列番号88)を、同じT細胞において、GPC3を標的とするCAR-Tポリペプチド(配列番号104)と共発現させた。これらのT細胞を、CARポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたCARとGOT2で形質導入した。

【0277】

CAR T細胞のエキスピボ表現型を、マウス腫瘍モデルに注射をした後に評価した。これらの実験のために、GPC3+肝細胞癌腫瘍細胞株、JHH7を、NSG(商標)(NOD scidガンマ、NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tmWj1}/SzJ、系統

50

005557) マウスに接種した。T細胞を使用する治療を、腫瘍体積が、約80mm³に達したときに開始した(接種の10日後)。マウスを、腫瘍体積に基づいて、それぞれ3匹のマウスの治療群に無作為に分け、そして、接種して11日後に、 5×10^6 個のCAR+T細胞の用量で、GPC3を標的とするCARを発現するT細胞、または、GPC3を標的とするCARとGOT2を共発現するT細胞で治療した。

【0278】

T細胞を投与して1、6、及び、13日後に、JHH7腫瘍を有するマウスから皮下腫瘍及び脾臓組織を採取した。腫瘍を、カミソリの刃で細かく切り刻み、そして、ヒト腫瘍解離キット(Miltenyi Biotec)を使用して、37℃で、1時間、酵素消化した。脾臓は、注射器プランジャーの端部を使用して、機械的に分離した。細胞染色のために96ウェルプレートに播種する前に、消化した腫瘍と脾臓を、70µmのセルストレーナーに通した。

10

【0279】

皮下腫瘍を発現する確立したJHH7GPC3を担持する免疫不全マウスを、CARとGOT2を共発現するT細胞、または、CARだけを発現するT細胞の 5×10^6 個を単回静脈内注射して治療した。動物のコホートを、6、及び、13日目に安楽死させ、そして、T細胞を、手作業、及び、酵素消化で、腫瘍と脾臓から単離した。フローサイトメトリーを行い、そして、PD-1と、TIM-3抑制分子を共発現するT細胞の頻度を、CD4+、及び、CD8+ T細胞サブセットで定量した。

【0280】

20

T細胞の表現型を、赤血球溶解、及び、細胞染色した後のフローサイトメトリーで評価した。これらの実験では、細胞を、抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗PD-1、及び、抗TIM-3抗体で染色した。PD-1と、TIM-3を共発現するT細胞の頻度を、CD4+及びCD8+ T細胞サブセットで定量した。CARと、GOT2を共発現する、CD4+及びCD8+サブセットでのT細胞は、CARだけを発現するT細胞と比較して、6日目に、同等以上の頻度のPD-1+TIM-3+ T細胞を示しており、このことは、活性化を示すものであるが、CARだけを発現するT細胞と比較して、腫瘍内微小環境に長時間曝露(13日目)した後の発現の頻度は小さくなっており、持続的な抑制性受容体の発現に対する耐性を実証した。脾臓から単離したT細胞は、6日目または13日目のいずれでも、PD-1+TIM-3+の発現を示しておらず、GPC3を発現する腫瘍だけに対する特異的な活性化を実証した。図19A~19D。CARと、GOT2を共発現するT細胞は、CARだけを発現するT細胞と比較して、6日目に、PD-1+TIM-3+ T細胞の頻度が高いことを示した。図19A及び18B。一方で、CARと、GOT2を共発現するT細胞は、腫瘍内微小環境に長時間曝露した後に、13日目では、PD-1+TIM-3+ T細胞の頻度が低く、CARだけを発現するT細胞と比較して、持続的な抑制性受容体の発現に対する耐性を示している。図19C及び19D。脾臓から単離したT細胞は、6日目または13日目のいずれかに、PD-1+TIM-3+の発現を示していらず、このことは、GPC3発現腫瘍だけの事例でのT細胞活性化の特異性を実証している。図19A~19D。

30

【0281】

40

これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、固形腫瘍内微小環境で耐性持続的抑制性受容体の発現を招くことを実証している。

【0282】

実施例22：T細胞でのクレブス回路調節遺伝子(GOT2)と、GPC3を標的とするCARの共発現は、インビボで腫瘍内微小環境に曝露した後に持続的なT細胞機能をもたらす

クレブス回路調節ポリペプチド(GOT2)(配列番号88)を、同じT細胞において、GPC3を標的とするCAR-Tポリペプチド(配列番号104)と共発現させた。これらのT細胞を、CARポリペプチドだけをコードするウイルス、または、P2Aリボソームスキップ配列で隔てたCARとGOT2で形質導入した。

50

【0283】

CAR形質導入細胞の機能を、マウス腫瘍モデルで評価した。これらの実験のために、GPC3+肝細胞癌腫瘍細胞株、JHH7を、NSG(商標)(NOD scidガンマ、NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tmWj1}/SzJ、系統005557)マウスに接種した。T細胞を使用する治療を、腫瘍体積が、約80mm³に達したときに開始した(接種の10日後)。マウスを、腫瘍体積に基づいて、それぞれ3匹のマウスの治療群に無作為に分け、そして、接種して11日後に、5×10⁶個のCAR+T細胞の用量で、GPC3を標的とするCARを発現するT細胞で治療した。

【0284】

CARを投与して3日後に、JHH7腫瘍を有するマウスから皮下腫瘍を採取した。腫瘍を、カミソリの刃で細かく切り刻み、そして、ヒト腫瘍解離キット(Miltenyi Biotec)を使用して、37℃で、1時間、酵素消化した。24ウェルプレート(1×10⁶個の細胞/1mL体積)に播種する前に、消化した腫瘍を、70μmのセルストレーナーに通した。5%CO₂インキュベーターにて、37℃で、18時間インキュベートした後に、サイトカイン分析のために細胞上清を回収した。細胞上清でのIFN-γ及びIL-17Aの濃度を、それぞれ、均一系時間分解蛍光アッセイ(Cisbio)、及び、Meso Scale Discovery V-Plexアッセイ技術を使用して決定した。両方のアッセイは、製造業者のプロトコルに従って実行した。

【0285】

GOT2とCARを共発現するT細胞を投与したマウスの腫瘍でのT細胞は、CARだけを発現するT細胞を投与したマウスの腫瘍でのT細胞と比較して、IFN-γとIL-17Aの生産を高めていた。図20A~20B。これらの実験は、T細胞でのクレブス回路調節ポリペプチドの発現が、腫瘍内微小環境でのT細胞機能にプラスの影響を及ぼすことを実証している。

【0286】

その他の実施形態

本明細書において開示する全ての特徴は、あらゆる組み合わせで、組み合わせ得る。本明細書において開示するそれぞれの特徴は、同一、同等、または、類似の目的を満足する代替の特徴で置き換え得る。それ故に、特に断りの無い限り、開示したそれぞれの特徴は、一般的な一連の同等または類似の特徴の例に過ぎない。

【0287】

上記した記載内容から、当業者であれば、本開示の本質的な特徴を容易に見極めることができ、また、本開示の趣旨及び範囲を逸脱せずとも、本開示の様々な変更及び修正を行い、様々な用法及び条件に適合させることができる。それ故に、その他の実施形態もまた、特許請求の範囲内である。

【0288】

等価物

幾つかの発明の実施形態について、本明細書で記載及び説明してきたが、当業者であれば、本明細書に記載した機能を実施するための、及び/または、本明細書に記載した結果及び/または本明細書に記載した利点の1つ以上を得るための、様々なその他の方法及び/または構成を容易に想到するものであり、このような変更形態及び/または修正のそれぞれは、本明細書に記載した本発明の実施形態の範囲内に属するものとみなす。より一般的に言えば、本明細書に記載した全てのパラメーター、寸法、物質、及び、構成が例示的であることを意味しており、実際のパラメーター、寸法、物質、及び/または、構成が、本発明の教示を利用する1つ以上の特定の用途に依存する、ということを当業者であれば容易に理解するであろう。本明細書に記載した特定の発明の実施形態に対する数多くの等価物を当業者は理解しており、または、通常の実験を行うだけで確認することができる。それ故に、上記した実施形態を単なる例示として提供しており、添付した特許請求の範囲及びその等価の範囲内において、具体的に記載したもの、及び、特許請求したもの以外の発明の実施形態を別様に実施することができる、と理解すべきである。本開示の発明の実

施形態は、本明細書に記載した、それぞれ個々の特徴、システム、物品、物質、キット、及び／または、方法に関する。加えて、2つ以上のこのような特徴、システム、物品、物質、キット、及び／または、方法のあらゆる組み合わせは、このような特徴、システム、物品、物質、キット、及び／または、方法が互いに矛盾しない限りは、本開示の本発明の範囲内に含まれる。

【0289】

本明細書で定義及び使用した全ての定義は、辞書の定義、参照により援用する文献における定義、及び／または、定義する用語の通常の意味を超えて優先されるものと理解すべきである。

【0290】

本明細書で開示した全ての参考文献、特許、及び、特許出願は、それぞれが引用している要旨を、参照により、援用するものであって、一部の事例では、その文献の全内容を援用し得る。

【0291】

本明細書、及び、特許請求の範囲で使用する不定冠詞「a」及び「an」は、特に断りが明示されていない限りは、「少なくとも1つ」を意味する、ものと理解すべきである。

【0292】

本明細書、及び、特許請求の範囲で使用する語句「及び／または」は、そのように繋いだ要素、すなわち、一部の事例では、接続的に示す要素、また、その他の事例では、選言的に示す要素の「一方、または、その両方」を意味する、と理解すべきである。同様に、「及び／または」と共に列挙される複数の要素は、すなわち、そのように繋いだ要素の内の「1つ以上」と解釈すべきである。具体的に示したそれら要素との関連の有無に関係なく、節「及び／または」が具体的に示す要素以外のその他の要素を任意に示し得る。それ故に、限定を意図しない例では、「A、及び／または、B」とは、「含む」などのオープンエンド用語と共に使用する場合、ある実施形態では、Aだけ（任意に、B以外の要素を含む）；別の実施形態では、Bだけ（任意に、A以外の要素を含む）；さらに別の実施形態では、AとBの両方（任意に、その他の要素を含む）など、を指す。

【0293】

本明細書、及び、特許請求の範囲で使用する「または」は、先に定義した「及び／または」と同一の意味を有するものと理解すべきである。例えば、列挙した要素を分ける場合、「または」または「及び／または」とは包括的であり、すなわち、要素の数、または、列挙した要素、及び、列挙していないさらなる任意の要素の内の少なくとも1つを含むが、それらの内の2つ以上もまた含むものと解釈すべきである。反対のことを明確に指し示す用語、例えば、「の内の1つだけ」もしくは「の内の厳密に1つ」など、または、特許請求の範囲で使用する「からなる」に限って、要素の数、または、列挙した要素の内の厳密に1つの要素を含む、ことを意味する。一般的に、本明細書で使用する用語「または」は、「いずれか」、「の内の1つ」、「の内の1つだけ」、または、「の内の厳密に1つ」などの排他的な用語が先行する場合、排他的な選択肢（すなわち、「一方または他方であるが、両方ではない」）を指し示す、と専ら解釈すべきである。「から本質的になる」は、特許請求の範囲で使用する場合、特許法の分野で使用されている、その通常の意味を与えるべきである。

【0294】

本明細書、及び、特許請求の範囲で使用する1つ以上の列挙した要素に関する語句「少なくとも1つ」とは、列挙した要素でのいずれか1つ以上から選択される、少なくとも1つの要素を意味するものと理解すべきであるが、列挙した要素の全ての要素の内の少なくとも1つを必ずしも含む必要はなく、列挙した要素の任意の組み合わせを除外するものでもない。また、この定義は、具体的に示したそれら要素との関連性の有無に関係なく、語句「少なくとも1つ」が指し示す列挙した要素として具体的に示した要素以外の要素を、任意に示し得ることを可能ならしめる。それ故に、限定を意図しない例では、「A及びBの少なくとも1つ」（すなわち、「AまたはBの少なくとも1つ」、すなわち、「A及び

10

20

30

40

50

／またはBの少なくとも1つ」とは、ある実施形態では、Bが存在せず、少なくとも1つ、任意に2つ以上のA（任意に、B以外の要素を含む）；別の実施形態では、Aが存在せず、少なくとも1つ、任意に2つ以上のB（任意に、A以外の要素を含む）；なおも別の実施形態では、少なくとも1つ、任意に2つ以上のA、及び、少なくとも1つ、任意に2つ以上のB（任意に、その他の要素を含む）など、を指す。

【0295】

特に明確な断りが無い限り、2つ以上の工程または行為を含む、本発明で特許請求するあらゆる方法では、本方法の工程または行為の順番は、列挙した本方法の工程または行為の順番に必ずしも限定されない、ことも理解すべきである。

本発明の態様の一部を以下に記載する。

1．遺伝子操作した造血細胞であって、同じタイプのネイティブ造血細胞と比較して、調節を施したクレブス回路を有する、前記造血細胞。

2．前記造血細胞が、(i)クレブス回路調節因子を発現する、または、過剰に発現する、項目1に記載の遺伝子操作した造血細胞。

3．前記クレブス回路調節因子が、クレブス回路調節ポリペプチドである、項目2に記載の遺伝子操作した造血細胞。

4．前記クレブス回路調節ポリペプチドが、(a)前記クレブス回路での反応を触媒する酵素、(b)クレブス回路代謝産物を基質として使用する酵素、または、(c)前駆体を、クレブス回路代謝産物に変換する酵素である、項目3に記載の遺伝子操作した造血細胞。

5．前記クレブス回路調節ポリペプチドが、(a)であり、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)、または、ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ(PGDH)である、項目4に記載の遺伝子操作した造血細胞。

6．前記IDHが、IDH1またはIDH2である、及び／または、前記MDHが、MDH1またはMDH2である、項目5に記載の遺伝子操作した造血細胞。

7．前記クレブス回路調節ポリペプチドが、(b)であり、グルタミン酸 - オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、または、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ1(PCK1)である、項目4に記載の遺伝子操作した造血細胞。

8．前記GOTが、GOT1またはGOT2である、項目7に記載の遺伝子操作した造血細胞。

9．前記クレブス回路調節ポリペプチドが、(c)であり、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ(PSAT1)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH1)、グルタミン酸 - ピルビン酸トランスアミナーゼ1(GPT1)、または、グルタミナーゼ(GLS)である、項目4に記載の遺伝子操作した造血細胞。

10．前記造血細胞が：

(ii)キメラ受容体ポリペプチドをさらに発現するものであり、前記キメラ受容体ポリペプチドは：

(a)細胞外標的結合ドメイン；

(b)膜貫通ドメイン；及び、

(c)細胞質シグナル伝達ドメイン、

を含む、項目1～9のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

11．前記キメラ受容体ポリペプチドは、(a)が細胞外Fc結合ドメインである、抗体結合T細胞受容体(ACTR)ポリペプチドである、項目10に記載の遺伝子操作した造血細胞。

12．前記キメラ受容体ポリペプチドは、(a)が細胞外抗原結合ドメインである、キメラ受容体抗原(CAR)ポリペプチドである、項目10に記載の遺伝子操作した造血細胞。

13．前記キメラ受容体ポリペプチドが、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、項目10～12のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

14．前記キメラ受容体ポリペプチドが、任意に、ACTRポリペプチドであり、共刺激シグナル伝達ドメインを含まない、項目10～12のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

10

20

30

40

50

15．前記細胞質シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシンをベースとした活性化モチーフ（ITAM）を含む、項目10～14のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

16．（c）が、前記キメラ受容体ポリペプチドのC末端に位置している、項目10～15のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

17．前記キメラ受容体ポリペプチドが、（a）のC末端と、（b）のN末端に位置するヒンジドメインをさらに含む、項目10～16のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

18．前記キメラ受容体ポリペプチドが、そのN末端に、シグナルペプチドをさらに含む、項目10～17のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

19．前記キメラ受容体ポリペプチドが、ACTRポリペプチドであり、前記細胞外標的結合ドメイン（a）が、細胞外Fc結合ドメインであり、かつ、前記Fc結合ドメインを：

（A）Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメイン、

（B）免疫グロブリンのFc部分に結合する抗体フラグメント、

（C）免疫グロブリンのFc部分、または、そのFc結合フラグメントに結合する天然タンパク質、及び、

（D）免疫グロブリンのFc部分に結合する合成ポリペプチド、

からなる群から選択する、項目10～18のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

20．前記Fc結合ドメインが、（A）であり、Fcガンマ受容体、Fcアルファ受容体、または、Fcイプシロン受容体の細胞外リガンド結合ドメインである、項目19に記載の遺伝子操作した造血細胞。

21．前記Fc結合ドメインが、CD16A、CD32A、または、CD64Aの細胞外リガンド結合ドメインである、項目20に記載の遺伝子操作した造血細胞。

22．前記Fc結合ドメインが、F158CD16A、または、V158CD16Aの細胞外リガンド結合ドメインである、項目20に記載の遺伝子操作した造血細胞。

23．前記Fc結合ドメインが、（B）であり、一本鎖可変フラグメント（ScFv）、または、単ドメイン抗体である、項目19に記載の遺伝子操作した造血細胞。

24．前記Fc結合ドメインが、（C）であり、プロテインAもしくはプロテインG、または、それらのFc結合フラグメントである、項目19に記載の遺伝子操作した造血細胞。

25．前記Fc結合ドメインが、（D）であり、Kunitzペプチド、SMIP、アビマー、アフィボディ、DARPin、または、アンチカリンである、項目19に記載の遺伝子操作した造血細胞。

26．前記キメラ受容体ポリペプチドが、CARポリペプチドであり、（a）の前記細胞外標的結合ドメインが、抗原結合ドメインであり、かつ、前記抗原結合ドメインが、腫瘍抗原、病原性抗原、または、自己抗原に特異的な免疫細胞に結合する一本鎖抗体フラグメントである、項目10～18のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

27．前記腫瘍抗原が、血液腫瘍に関連している、項目26に記載の遺伝子操作した造血細胞。

28．前記腫瘍抗原を、CD19、CD20、CD22、カッパ鎖、CD30、CD123、CD33、LeY、CD138、CD5、BCMA、CD7、CD40、及び、IL-1RAPからなる群から選択する、項目27に記載の遺伝子操作した造血細胞。

29．前記腫瘍抗原は、固形腫瘍に関連している、項目26に記載の遺伝子操作した造血細胞。

30．前記腫瘍抗原を、GD2、GPC3、FOLR、HER2、EphA2、EGFRV111、IL13RA2、VEGFR2、ROR1、NKG2D、EpCAM、CEA、メソテリン、MUC1、CLDN18.2、CD171、CD133、PSCA、cMET、EGFR、PSMA、FAP、CD70、MUC16、L1-CAM、及び、CAIXからなる群から選択する、項目29に記載の遺伝子操作した造血細胞。

31．前記病原性抗原は、細菌抗原、ウイルス抗原、または、真菌抗原である、項目26に記載の遺伝子操作した造血細胞。

32．前記（b）の膜貫通ドメインが、1回貫通型膜タンパク質のものである、項目10

10

20

30

40

50

～ 31 のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

33．前記膜貫通ドメインを、CD8、CD8、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16A、OX40、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、及び、FGFR2Bからなる群から選択する膜タンパク質のものである、項目32に記載の遺伝子操作した造血細胞。

34．前記(b)の膜貫通ドメインが、非天然疎水性タンパク質セグメントである、項目10～31のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

35．前記少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインが、4-1BB、CD28、CD28LL、GGバリエーション、OX40、ICOS、CD27、GITR、ICOS、HVE、TIM1、LFA1、及び、CD2からなる群から選択する共刺激分子のものである、項目10～13、及び、15～34のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

10

36．前記少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインが、CD28共刺激シグナル伝達ドメイン、または、4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインである、項目35に記載の遺伝子操作した造血細胞。

37．前記キメラ受容体ポリペプチドが、2つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む、項目10～13、及び、15～36のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

38．前記2つの共刺激ドメインが、

(i) CD28、及び、4-1BB；または、

(ii) CD28LL、GGバリエーション、及び、4-1BB

である、項目37に記載の遺伝子操作した造血細胞。

20

39．前記共刺激シグナル伝達ドメインの内の一方が、CD28共刺激シグナル伝達ドメインであり；及び、他方の共刺激ドメインを、4-1BB共刺激シグナル伝達ドメイン、OX40共刺激シグナル伝達ドメイン、CD27共刺激シグナル伝達ドメイン、及び、ICOS共刺激シグナル伝達ドメインからなる群から選択する、項目37に記載の遺伝子操作した造血細胞。

40．前記(c)の細胞質シグナル伝達ドメインが、CD3またはFcR1の細胞質ドメインである、項目10～39のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

41．前記ヒンジドメインが、1～60アミノ酸長である、項目17～40のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

42．前記ヒンジドメインが、CD28、CD16A、CD8、または、IgGのものである、項目17～41のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

30

43．前記ヒンジドメインが、非天然ペプチドである、項目17～42のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

44．前記ヒンジドメインが、延長型組換えポリペプチド(XTEN)または(GlySer)_nポリペプチドであり、nは、3～12の整数であり、3と12の整数を含む、項目43に記載の遺伝子操作した造血細胞。

45．前記キメラ受容体ポリペプチドは、任意に、ACTRポリペプチドであり、あらゆるヒンジドメインを含まない、項目10～16、及び、18～40のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

46．前記キメラ受容体ポリペプチドは、任意に、ACTRポリペプチドであり、あらゆる非CD16A受容体に由来するヒンジドメインを含まない、項目10～44のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

40

47．前記ACTRポリペプチドが、(i) CD28共刺激ドメイン；及び、(ii) CD28膜貫通ドメイン、CD28ヒンジドメイン、または、これらの組み合わせを含む、項目19に記載の遺伝子操作した造血細胞。

48．前記ACTRポリペプチドが、表3に示す構成要素(a)～(e)を含む、項目19に記載の遺伝子操作した造血細胞。

49．前記ACTRポリペプチドが、配列番号1～80から選択するアミノ酸配列を含む、項目19に記載の遺伝子操作した造血細胞。

50．前記キメラ受容体ポリペプチドは、(i) CD28膜貫通ドメイン、CD28ヒン

50

ジドメイン、または、これらの組み合わせと組み合わせた C D 2 8 共刺激ドメイン、または、(i i) C D 8 膜貫通ドメイン、C D 8 ヒンジドメイン、または、これらの組み合わせと組み合わせた 4 - 1 B B 共刺激ドメインを含む、C A R ポリペプチドである、項目 2 6 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

5 1 . 前記 C A R ポリペプチドが、配列番号 1 0 4 または 1 0 5 のアミノ酸配列を含む、項目 2 6 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

5 2 . 前記造血が、造血幹細胞、または、免疫細胞であり、任意に、前記免疫細胞が、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、または、T 細胞である、項目 1 ~ 5 1 のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

5 3 . 前記免疫細胞が、内在性 T 細胞受容体、内在性主要組織適合遺伝子複合体、内在性ベータ 2 - ミクログロブリン、または、これらの組み合わせの発現を、阻害または制限した T 細胞である、項目 5 2 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

5 4 . 前記造血細胞が、末梢血単核球 (P B M C)、造血幹細胞 (H S C)、または、人工多能性幹細胞 (i P S C) に由来する免疫細胞である、項目 1 ~ 5 3 のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

5 5 . 前記造血細胞は、核酸または核酸セットを含み、それらは、集合的に：

(A) 前記クレブス回路調節ポリペプチドをコードする第 1 のヌクレオチド配列；及び、任意に、

(B) 前記キメラ受容体ポリペプチドをコードする第 2 のヌクレオチド配列、

を含む、項目 1 ~ 5 4 のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

5 6 . 前記核酸、または、前記核酸セットが、R N A 分子または R N A 分子のセットである、項目 5 5 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

5 7 . 前記造血細胞が、前記第 1 のヌクレオチド配列と、前記第 2 のヌクレオチド配列の両方を含む前記核酸を含む、項目 5 5 または 5 6 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

5 8 . 前記核酸は、前記第 1 のヌクレオチド配列と、前記第 2 のヌクレオチド配列との間に位置する第 3 のヌクレオチド配列をさらに含み、前記第 3 のヌクレオチド配列が、リボソームスキッピング部位、配列内リボソーム進入部位 (I R E S)、または、第 2 のプロモーターをコードする、項目 5 7 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

5 9 . 第 3 のヌクレオチド配列は、P 2 A ペプチドであるリボソームスキッピング部位をコードする、項目 5 7 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

6 0 . 前記核酸、または、前記核酸セットが、ベクター、または、ベクターのセットの内部に含まれる、項目 5 5 ~ 5 9 のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞。

6 1 . 前記ベクター、または、ベクターのセットが、発現ベクター、または、発現ベクターのセットである、項目 6 0 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

6 2 . 前記ベクター、または、ベクターのセットが、1 つ以上のウイルスベクターを含む、項目 6 0 または 6 1 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

6 3 . 前記 1 つ以上のウイルスベクターが、レトロウイルスベクターであり、任意に、レンチウイルスベクター、または、ガンマレトロウイルスベクターである、項目 6 2 に記載の遺伝子操作した造血細胞。

6 4 . 項目 1 ~ 6 3 のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞と、医薬として許容可能な担体とを含む医薬組成物。

6 5 . 前記遺伝子操作した造血細胞が、A C T R ポリペプチドを発現し、かつ、前記組成物が、F c 含有治療薬をさらに含む、項目 6 4 に記載の医薬組成物。

6 6 . 前記 F c 含有治療薬が、治療抗体、または、F c 融合タンパク質である、項目 6 5 に記載の医薬組成物。

6 7 . 前記 F c 含有治療薬は、標的抗原であって、任意に、腫瘍抗原、病原性抗原、または、自己抗原に特異的な免疫細胞である前記抗原に対して結合する、項目 6 5 または 6 6 に記載の医薬組成物。

6 8 . 前記病原性抗原が、細菌抗原、ウイルス抗原、または、真菌抗原である、項目 6 7 に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

69．前記Fc含有治療薬が、アダリムマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、アレムツズマブ、バシリキシマブ、ベバシズマブ、ベリムマブ、ブレンツキシマブ、カナキヌマブ、セツキシマブ、セルトリズマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、ジヌツキシマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、エブラツズマブ、ゲムツズマブ、ゴリムマブ、h u 1 4 . 1 8 K 3 2 2 A、イブリツモマブ、インフリキシマブ、イピリムマブ、ラベツズマブ、ムロモナブ、ナタリズマブ、オビヌツズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、トシツモマブ、ウステキヌマブ、及び、ベドリズマブからなる群から選択する治療抗体である、項目68に記載の医薬組成物。

70．キットであって：

項目10～63のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞と、医薬として許容可能な担体とを含む第1の医薬組成物；及び

Fc含有治療薬と、医薬として許容可能な担体とを含む第2の医薬組成物、を含む、前記キット。

71．前記Fc含有治療薬が、Fc融合タンパク質、または、治療抗体である、項目70に記載のキット。

72．前記Fc含有治療薬が、標的抗原であって、任意に、腫瘍抗原、病原性抗原、または、自己抗原に特異的な免疫細胞である前記抗原に対して結合する、項目70または71に記載のキット。

73．前記治療抗体を、アダリムマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、アレムツズマブ、バシリキシマブ、ベバシズマブ、ベリムマブ、ブレンツキシマブ、カナキヌマブ、セツキシマブ、セルトリズマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、ジヌツキシマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、エブラツズマブ、ゲムツズマブ、ゴリムマブ、h u 1 4 . 1 8 K 3 2 2 A、イブリツモマブ、インフリキシマブ、イピリムマブ、ラベツズマブ、ムロモナブ、ナタリズマブ、オビヌツズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、トシツモマブ、ウステキヌマブ、及び、ベドリズマブ、からなる群から選択する、項目72に記載のキット。

74．対象において標的抗原を発現する細胞を阻害する方法であって、項目10～63のいずれかに記載の遺伝子操作した造血細胞の集団を、それを必要とする対象に対して投与することを含む、前記方法。

75．前記遺伝子操作した造血細胞が、ACTRポリペプチドを発現し、かつ、前記対象は、標的抗原に特異的なFc含有治療薬を使用する治療を受けた、または、受けている、項目74に記載の方法。

76．前記遺伝子操作した造血細胞は、CARポリペプチドを発現し、標的抗原に特異的な細胞外抗原結合ドメインを含む、項目74に記載の方法。

77．前記標的抗原が、腫瘍抗原、病原性抗原、または、自己抗原に特異的な免疫細胞である、項目75または76に記載の方法。

78．前記病原性抗原が、細菌抗原、ウイルス抗原、または、真菌抗原である、項目77に記載の方法。

79．前記標的抗原を発現する前記細胞の内の少なくとも一部が、低グルコース環境に置かれている、項目75～78のいずれかに記載の方法。

80．前記遺伝子操作した造血細胞が、自家である、項目74～79のいずれかに記載の方法。

81．前記遺伝子操作した造血細胞が、同種異系である、項目74～79のいずれかに記載の方法。

82．前記遺伝子操作した造血細胞を、エキスピボで活性化している、増殖している、または、その両方を行っている、項目74～81のいずれかに記載の方法。

83．前記Fc含有治療薬が、治療抗体、または、Fc融合タンパク質である、項目75、及び、77～80のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

84. 前記Fc含有治療薬を、アダリムマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、アレムツズマブ、バシリキシマブ、ベバシズマブ、ベリムマブ、ブレンツキシマブ、カナキヌマブ、セツキシマブ、セルトリズマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、ジヌツキシマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、エブラツズマブ、ゲムツズマブ、ゴリムマブ、hu14.18K322A、イブリツモマブ、インフリキシマブ、イピリムマブ、ラベツズマブ、ムロモナブ、ナタリズマブ、オビヌツズマブ、オフアツムマブ、オビヌツズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、トシリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、ウステキヌマブ、及び、ベドリズマブからなる群から選択する治療抗体である項目83に記載の方法。

85. 前記対象が、がんを患うヒト患者であり、かつ、前記標的抗原が、腫瘍抗原である、項目74～84のいずれかに記載の方法。

10

86. 前記がんを、癌腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、及び、白血病からなる群から選択する項目85に記載の方法。

87. 前記がんを、B細胞由来のがん、乳癌、胃癌、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺癌、皮膚癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、白血病、中皮腫、脾臓癌、頭頸部癌、網膜芽細胞腫、神経膠腫、膠芽細胞腫、肝臓癌、及び、甲状腺癌からなる群から選択する項目85または86に記載の方法。

88. 前記B細胞由来のがんを、B細胞系急性リンパ芽球性白血病、B細胞性慢性リンパ性白血病、及び、B細胞性非ホジキンリンパ腫からなる群から選択する、項目87に記載の方法。

20

89. 前記遺伝子操作した造血細胞が、抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2、フィトヘマグルチニン、及び、改変人工刺激細胞または粒子の内の1つ以上の存在下で活性化するT細胞を含む、項目74～88のいずれかに記載の方法。

90. 前記遺伝子操作した造血細胞が、4-1BBリガンド、抗4-1BB抗体、IL-15、抗IL-15受容体抗体、IL-2、IL-12、IL-21、K562細胞、及び、改変人工刺激細胞または粒子の内の1つ以上の存在下で活性化するナチュラルキラー細胞を含む、項目74に記載の方法。

91. 核酸または核酸セットであって、それらは、集合的に：

(A) 項目10～51のいずれかに記載の抗体結合T細胞受容体(ACTR)ポリペプチドをコードする第1のヌクレオチド配列；及び、

30

(B) クレブス回路調節ポリペプチドをコードする第2のヌクレオチド配列、を含む、前記核酸または前記核酸セット。

92. 前記クレブス回路調節ポリペプチドを：ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ1(PCK1)、グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)、ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ(PGDH)、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ(PSAT1)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH1)、グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ1(GPT1)、及び、グルタミナーゼ(GLS)からなる群から選択する、項目91に記載の核酸または核酸セット。

93. 前記GOTが、GOT1またはGOT2である、項目92に記載の核酸または核酸セット。

40

94. 前記IDHが、IDH1またはIDH2である、及び/または、前記MDHが、MDH1またはMDH2である、項目92に記載の核酸または核酸セット。

95. 前記核酸または前記核酸セットが、RNA分子、または、RNA分子のセットである、項目89～94のいずれかに記載の核酸または核酸セット。

96. 前記核酸が、前記第1のヌクレオチド配列と前記第2のヌクレオチド配列の両方を含み、かつ、前記核酸が、前記第1のヌクレオチド配列と前記第2のヌクレオチド配列との間に位置する第3のヌクレオチド配列をさらに含み、前記第3のヌクレオチド配列は、リボソームスキッピング部位、配列内リボソーム進入部位(IRES)、または、第2のプロモーターをコードする、項目89～95のいずれかに記載の核酸または核酸セット。

50

９７．前記リボソームスキッピング部位が、Ｐ２Ａペプチドである、項目９６に記載の核酸または核酸セット。

９８．前記核酸または前記核酸セットが、ベクター、または、ベクターのセットの内部に含まれる、項目９１～９７のいずれかに記載の核酸または核酸セット。

９９．前記ベクター、または、ベクターのセットが、発現ベクター、または、発現ベクターのセットである、項目９８に記載の核酸または核酸セット。

１００．前記ベクター、または、ベクターのセットが、１つ以上のウイルスベクターを含む、項目９８または９９に記載の核酸または核酸セット。

１０１．前記１つ以上のウイルスベクターが、レトロウイルスベクターであり、任意に、レンチウイルスベクター、または、ガンマレトロウイルスベクターである、項目１００に記載の核酸または核酸セット。

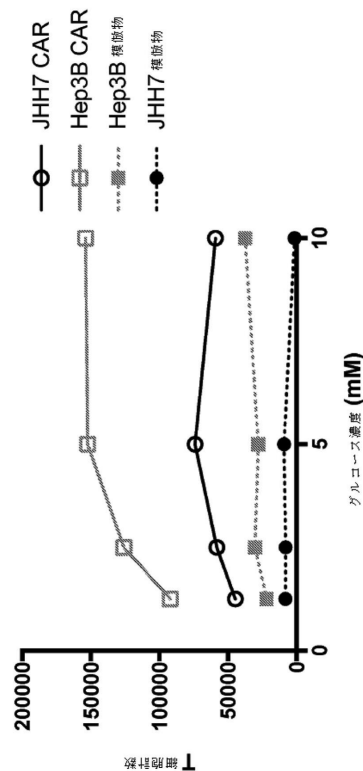
１０２．改変した造血細胞をインビボで生産する方法であって、それを必要とする対象に対して、項目９１～１０１のいずれかに記載の核酸または核酸セットを投与することを含む、前記方法。

１０３．前記対象に対して、標的抗原に対して特異的なＦｃ含有治療薬を投与することをさらに含む、項目１０１に記載の方法。

【図面】

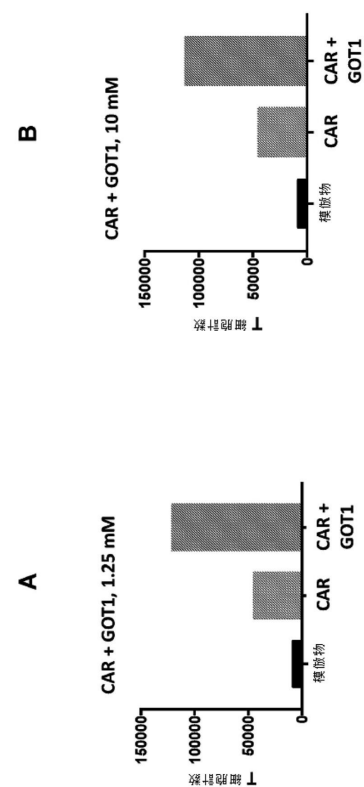
【図 １】

図 1



【図 ２】

図 2



10

20

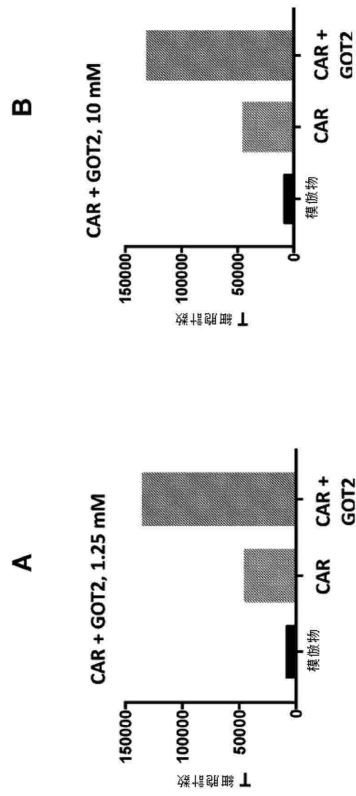
30

40

50

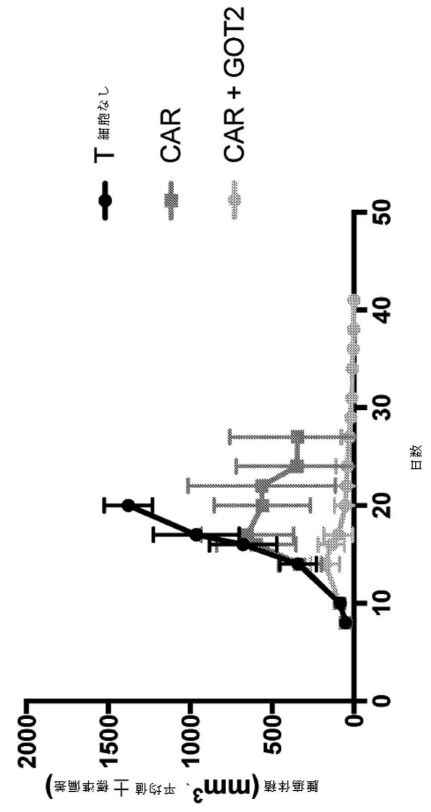
【図 3】

図 3



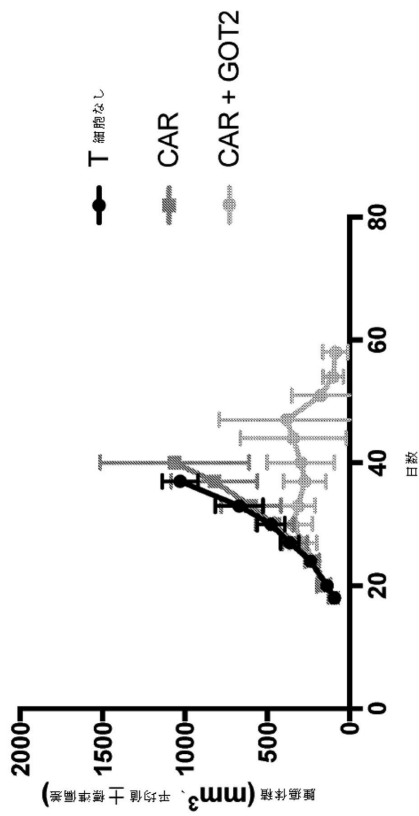
【図 4】

図 4



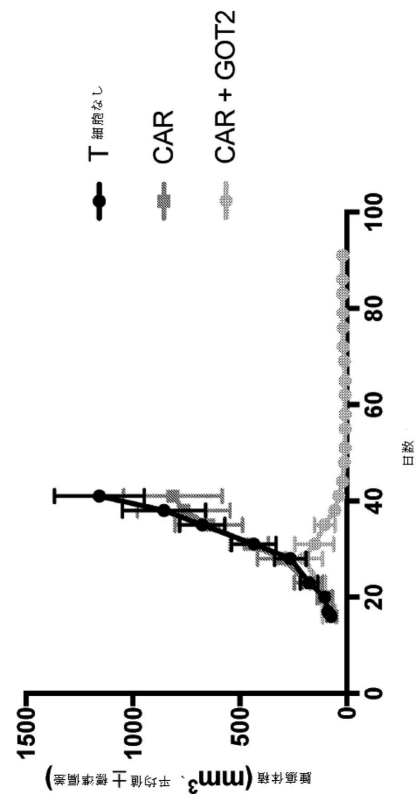
【図 5】

図 5



【図 6】

図 6



10

20

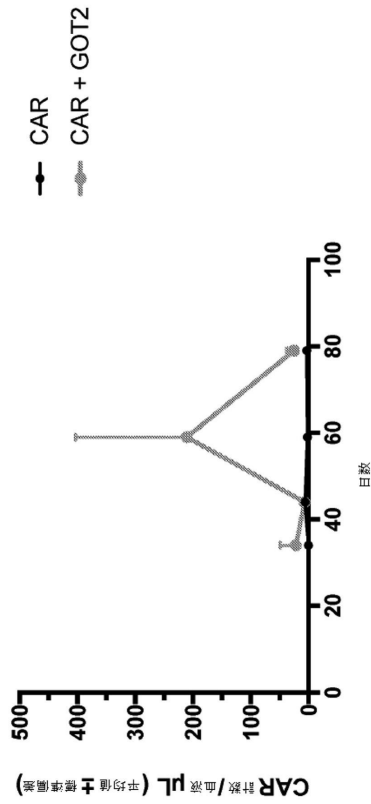
30

40

50

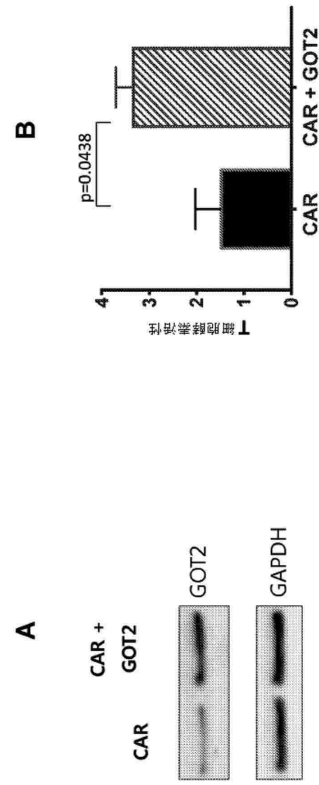
【図 7】

図 7



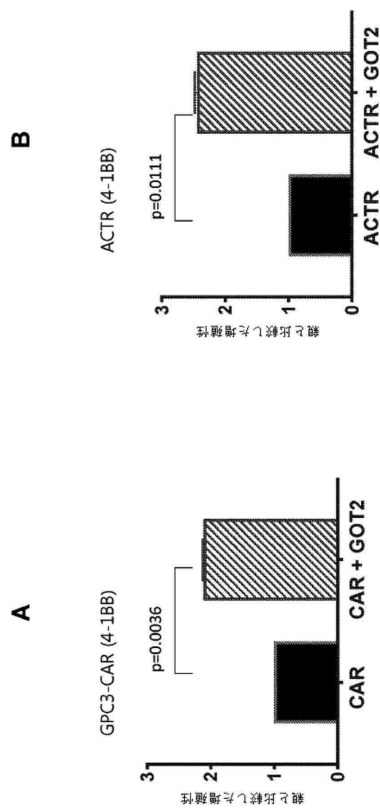
【図 8】

図 8



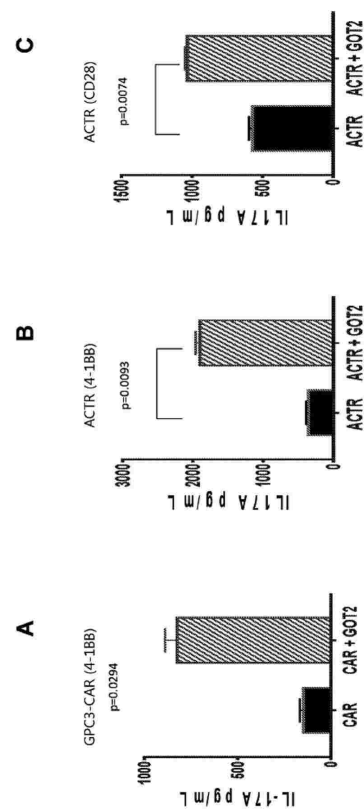
【図 9】

図 9



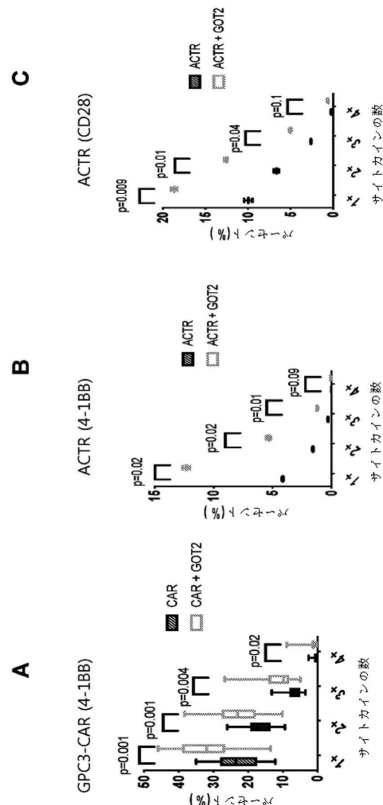
【図 10】

図 10



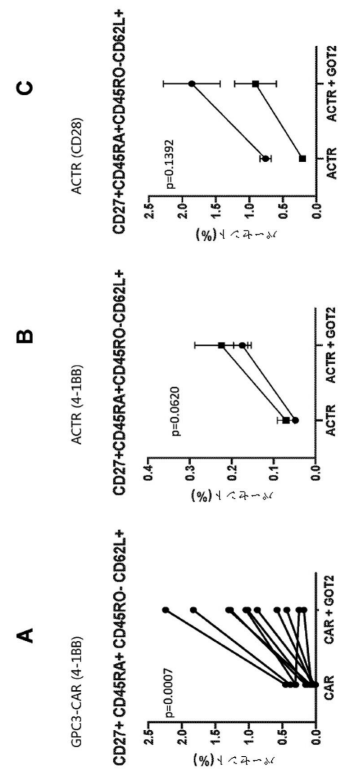
【図 1 1】

図 1 1



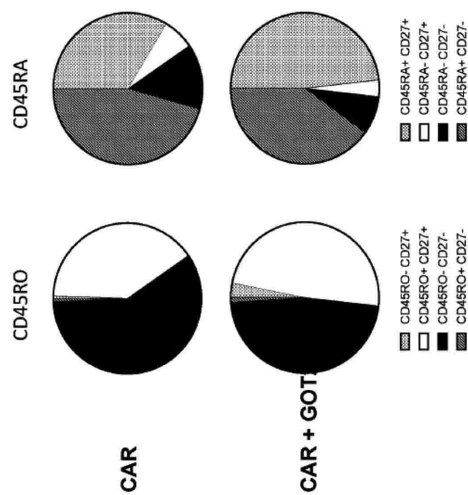
【図 1 2】

図 1 2



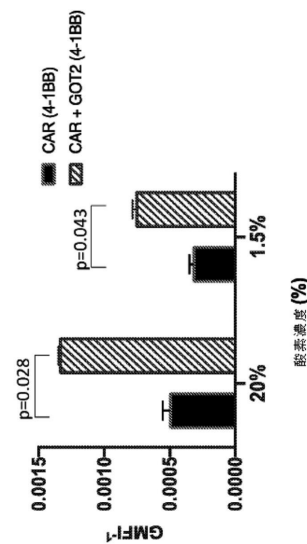
【図 1 3】

図 1 3



【図 1 4】

図 1 4



10

20

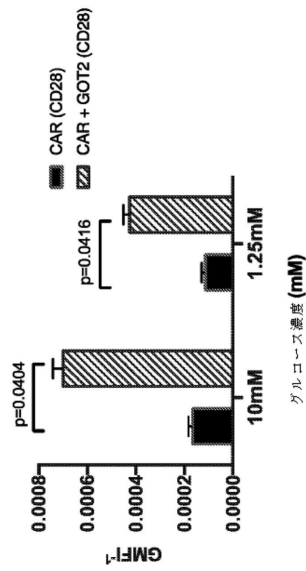
30

40

50

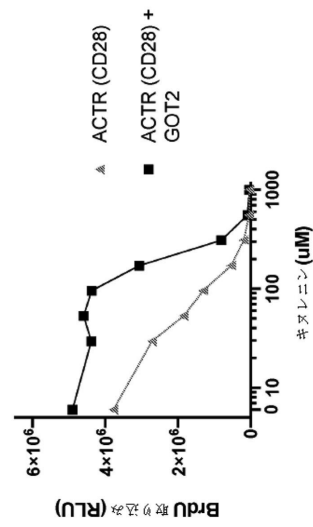
【 図 1 5 】

図 1 5



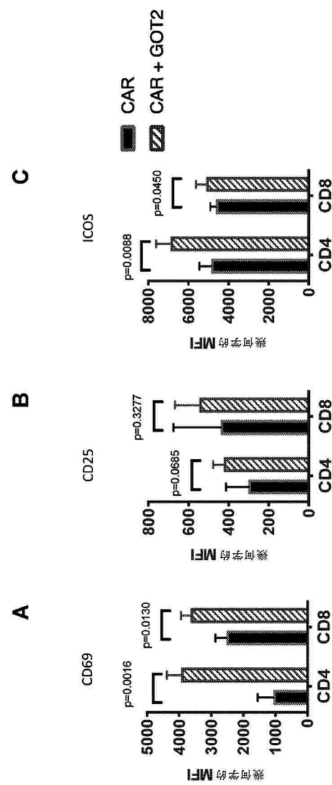
【 図 1 6 】

図 1 6



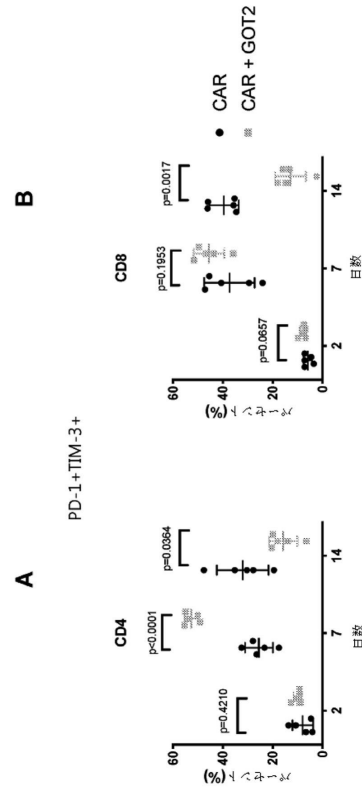
【 図 1 7 】

図 1 7



【 図 1 8 】

図 1 8



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 1 2 N	5/078(2010.01)	C 1 2 N	5/078
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100170852

弁理士 白樫 依子

(72)発明者 キャスリーン マクギネス

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 0 , ケンブリッジ, ケンブリッジ パーク ドライブ
2 0 0 , スイート 3 1 0 0 , シーノオー ユナム セラピューティクス インコーポレイティド

(72)発明者 セス エッテンバーグ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 0 , ケンブリッジ, ケンブリッジ パーク ドライブ
2 0 0 , スイート 3 1 0 0 , シーノオー ユナム セラピューティクス インコーポレイティド

(72)発明者 ルーク バロン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 0 , ケンブリッジ, ケンブリッジ パーク ドライブ
2 0 0 , スイート 3 1 0 0 , シーノオー ユナム セラピューティクス インコーポレイティド

(72)発明者 マイケル フレイ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 0 , ケンブリッジ, ケンブリッジ パーク ドライブ
2 0 0 , スイート 3 1 0 0 , シーノオー ユナム セラピューティクス インコーポレイティド

(72)発明者 チャールズ ウィルソン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 0 , ケンブリッジ, ケンブリッジ パーク ドライブ
2 0 0 , スイート 3 1 0 0 , シーノオー ユナム セラピューティクス インコーポレイティド

(72)発明者 グレゴリー モッツ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 0 , ケンブリッジ, ケンブリッジ パーク ドライブ
2 0 0 , スイート 3 1 0 0 , シーノオー ユナム セラピューティクス インコーポレイティド

審査官 北田 祐介

(56)参考文献 特表 2 0 1 7 - 5 2 9 8 5 1 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 7 4 2 6 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 7 9 7 0 3 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8 , 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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

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

U n i P r o t / G e n e S e q