

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7295795号
(P7295795)

(45)発行日 令和5年6月21日(2023.6.21)

(24)登録日 令和5年6月13日(2023.6.13)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/62 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/62	Z Z N A
C 1 2 N	15/24 (2006.01)		C 1 2 N	15/24	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)		C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/54 (2006.01)		C 0 7 K	14/54	

請求項の数 37 (全95頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-504812(P2019-504812)

(86)(22)出願日 平成29年7月28日(2017.7.28)

(65)公表番号 特表2019-531704(P2019-531704
A)

(43)公表日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/044549

(87)国際公開番号 WO2018/023093

(87)国際公開日 平成30年2月1日(2018.2.1)

審査請求日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(31)優先権主張番号 62/369,017

(32)優先日 平成28年7月29日(2016.7.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

(73)特許権者 516316897

ジュノー セラピューティクス インコーポレイテッド

アメリカ合衆国 98109 ワシントン
州 シアトル デクスター アベニュー ノ
ース 400 スイート 1200

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫調節ポリペプチドならびに関連する組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

- a) IL-12のp35サブユニットを含む第1のペプチド；
- b) IL-12のp40サブユニットを含む第2のペプチド；および
- c) 該第1のペプチドと該第2のペプチドを接続している連結領域であって、該連結領域は、ペプチド結合モチーフである標的化部分を含み、ここで、該標的化部分は5～50個のアミノ酸であり、かつ、腫瘍抗原と結合する、連結領域を含む、免疫調節ポリペプチド。

【請求項2】

前記p35サブユニットがSEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列を含む、および／または、前記p40サブユニットがSEQ ID NO:11に示されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載の免疫調節ポリペプチド。

10

【請求項3】

前記連結領域が、前記標的化部分を前記p35サブユニットまたは前記p40サブユニットと繋いでいる少なくとも1つのポリペプチドリンカーをさらに含む、請求項1記載の免疫調節ポリペプチド。

【請求項4】

前記ポリペプチドリンカーが、アミノ酸を2～20個含む、請求項3記載の免疫調節ポリペプチド。

【請求項5】

20

前記ポリペプチドリソナーが、配列GGGGS(n) [配列中、nは、1～5である] (SEQ ID NO:29)を含む、請求項3記載の免疫調節ポリペプチド。

【請求項6】

前記ポリペプチドリソナーが、SEQ ID NO:7～9のいずれかに示される配列を含む、請求項3記載の免疫調節ポリペプチド。

【請求項7】

前記腫瘍抗原が、肝細胞増殖因子(HGF)、肝細胞増殖因子受容体(HGFR)、ヘパリン、VEGF、VEGF-A、VEGFR2、VEGFR3、HER2、PD-1、テネイシン-C、CTLA-4、LAG3、PD-L1、EGFR、EPCAM、RANKL、NG2プロテオグリカン、CD20、CD52、CD19、CD3、CD30、IL-6、CD38、SLAMF7、GD2、CD13、CD274、CD279、CD40L、およびCD47からなる群より選択される、請求項1～6のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチド。

10

【請求項8】

前記標的化部分が、ヘパリン結合ペプチド、肝細胞増殖因子(HGF)結合ペプチド、VEGF結合ペプチド、VEGFR結合ペプチド、VEGFR3結合ペプチド、NGRモチーフ、RGDモチーフ、NG2プロテオグリカン結合ペプチド、EPCAM結合ペプチド、HER2結合ペプチド、EGFR結合ペプチドからなる群より選択される、請求項1～7のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチド。

20

【請求項9】

前記標的化部分が、SEQ ID NO:13～16、26～28、108～118のいずれかに示される配列を含む、請求項8記載の免疫調節ポリペプチド。

【請求項10】

前記標的化部分が、ヘパリン結合ペプチド、肝細胞増殖因子結合ペプチド、または、上皮細胞増殖因子受容体結合ペプチドである、請求項1～9のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチド。

【請求項11】

前記標的化部分が、ヘパリン結合ペプチドである、請求項1～10のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチド。

【請求項12】

前記ヘパリン結合ペプチド(HBP)が、フィブロネクチンもしくはBMP4に由来し、かつ/またはウシ由来である、請求項11記載の免疫調節ポリペプチド。

30

【請求項13】

前記標的化部分が、HGF結合ペプチドまたはEGFR結合ペプチド(EGFRBP)を含む、請求項1～10のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチド。

【請求項14】

前記免疫調節ポリペプチドが、SEQ ID NO:13～16のいずれかに示される配列を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチド。

【請求項15】

前記腫瘍抗原を発現していない細胞に対するその結合性と比較して増大した、前記腫瘍抗原を発現している標的細胞に対する結合性を示す、請求項1～14のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチド。

40

【請求項16】

請求項1～15のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項17】

シグナル配列をさらに含み、前記シグナル配列が、CD33由来のシグナルペプチドをコードする、請求項16記載のポリヌクレオチド。

【請求項18】

前記免疫調節ポリペプチドの発現を制御するために機能的に連結されている少なくとも1つのプロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターをさらに含む、請求項

50

16または請求項17記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、T細胞活性化因子である、かつ／または

前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、1つまたは複数のT細胞転写因子に対する結合部位を含有し、前記1つまたは複数のT細胞転写因子が、活性化T細胞核内因子 (NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2、および／またはNF-Bである、

請求項18記載のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件の存在下で活性であり、前記腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件が、低酸素、低グルコース、酸性pH、または酸化ストレスより選択される、

前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、放射線によって、または熱によって誘導可能である、または

前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、薬物誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターである、請求項18記載のポリヌクレオチド。

【請求項 21】

前記免疫調節ポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、組換え受容体をコードする第2の核酸配列とを含む、請求項16～20のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項 22】

前記組換え受容体が、キメラ抗原受容体 (CAR) であるかまたはそれを含む、請求項21記載のポリヌクレオチド。

【請求項 23】

前記ポリヌクレオチドが、前記第1の核酸配列と前記第2の核酸配列との間に配列内リボソーム進入部位 (IRES) または連結ペプチドをコードする核酸配列をさらに含み、該連結ペプチドが、翻訳中または翻訳後に該第1の核酸配列の翻訳産物と該第2の核酸配列の翻訳産物を分離する、請求項21または請求項22記載のポリヌクレオチド。

【請求項 24】

前記連結ペプチドが、自己切断型ペプチド、またはリボソームスキッピングを引き起こすペプチド、任意でT2Aペプチドを含む、請求項23記載のポリヌクレオチド。

【請求項 25】

請求項16～24のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 26】

請求項1～15のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチド、請求項16～24のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項25記載のベクターを含む、操作された細胞。

【請求項 27】

前記免疫調節ポリペプチドを分泌する、請求項26記載の操作された細胞。

【請求項 28】

組換え受容体をさらに含む、請求項26または請求項27記載の操作された細胞。

【請求項 29】

前記組換え受容体が、機能性非TCR抗原受容体またはトランスジェニックTCRである、請求項28記載の操作された細胞。

【請求項 30】

前記組換え受容体が、キメラ抗原受容体 (CAR) である、請求項28または請求項29記載の操作された細胞。

【請求項 31】

T細胞である、請求項26～30のいずれか一項記載の操作された細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

請求項1～15のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチドを含む組成物。

【請求項 3 3】

請求項26～31のいずれか一項記載の操作された細胞を含む組成物。

【請求項 3 4】

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項32または請求項33記載の組成物。

【請求項 3 5】

対象における疾患または障害を治療するための医薬の製造における、請求項1～15のいずれか一項記載の免疫調節ポリペプチド、請求項26～30のいずれか一項記載の操作された細胞、または請求項32～34のいずれか一項記載の組成物の使用。

10

【請求項 3 6】

前記操作された細胞が、前記疾患または状態に関連する抗原と特異的に結合する組換え受容体を発現する、請求項35記載の使用。

【請求項 3 7】

前記疾患または障害が、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは障害、または感染性疾患である、請求項35または請求項36記載の使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願の相互参照**

20

本出願は、「IMMUNOMODULATORY POLYPEPTIDES AND RELATED COMPOSITIONS AND METHODS」という表題で2016年7月29日に出願された米国仮出願第62/369,017号の優先権を主張し、この仮出願の内容は、その全体が参照により組み入れられる。

【0 0 0 2】**配列表の参照による組み入れ**

本出願は、電子形式の配列表と共に出願されている。配列表は、2017年7月27日に作成された、サイズが139キロバイトの735042004240seqlist.txtという名称のファイルとして提供される。配列表の電子形式の情報は、その全体で参照により組み入れられる。

【0 0 0 3】

30

分野

いくつかの局面において、本開示は、標的分子と結合する標的化部分を含有する連結領域により接続された第1および第2のペプチド（例えば、サイトカインまたはケモカインの第1および第2のサブユニット）を含有する免疫調節ポリペプチドに関する。いくつかの局面において、本開示はさらに、免疫調節ポリペプチドを含む操作された細胞および組成物ならびにそれらを対象に投与する方法に関する。いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドを含有するように操作された細胞（例えば、T細胞）は、抗原と特異的に結合する遺伝的に操作された組換え受容体（例えば、キメラ抗原受容体（CAR））をさらに含有する。いくつかの態様において、ポリペプチド、操作された細胞、および方法の特徴は、サイトカインもしくはケモカイン療法の有害作用を軽減すること、または細胞療法の活性、効力、および／もしくは持続性を増大させることなどによって、疾患または状態（例えば、がん）の改善された治療を提供する。

40

【背景技術】**【0 0 0 4】****背景**

がんまたは腫瘍などの疾患または状態の治療のための様々な戦略（サイトカインまたはケモカインの投与を含む）が利用可能である。さらに、キメラ抗原受容体（CAR）などの遺伝的に操作された組換え受容体を発現するように免疫細胞を操作し、当該細胞を含有する組成物を対象に投与する戦略が利用可能である。例えば、サイトカインまたはケモカイン投与の有害作用を減少させること、操作された細胞の持続性および／もしくは生存を改

50

善すること、または対象に投与したときのそのような治療法の免疫原性を低下させることによる、治療の効力を増大させるための改善された戦略が必要である。そのような必要性を満たす組成物、細胞、および方法が提供される。

【発明の概要】

【0005】

概要

第1のペプチド；第2のペプチド；ならびに第1のペプチドと第2のペプチドを接続している連結領域であって、標的分子と結合する標的化部分を含有する連結領域を含有する免疫調節ポリペプチドが、本明細書に提供される。いくつかの態様において、第1および第2のペプチドのうちの少なくとも1つは、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはサイトカインもしくはケモカインの機能的部分である。

10

【0006】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1のペプチドは、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはサイトカインもしくはケモカインの機能的部分である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、第2のペプチドは、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはサイトカインもしくはケモカインの機能的部分である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1および第2のペプチドの両方は独立して、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはサイトカインもしくはケモカインの機能的部分である。

20

【0007】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1のペプチドおよび第2のペプチドは、同じサイトカインもしくはケモカイン、またはその機能的部分、または同じサイトカインもしくはケモカインの同じサブユニットである。任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1および第2のペプチドは、異なるサイトカインもしくはケモカイン、またはその機能的部分、または同じもしくは異なるサイトカインもしくはケモカインの異なるサブユニットである。任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1のペプチドは、サイトカインまたはケモカインの第1のサブユニットであり、第2のペプチドは、サイトカインまたはケモカインの第2のサブユニットである。

30

【0008】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、サイトカインまたはケモカインは、単量体である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1および / または第2のペプチドは独立して、多量体タンパク質であるサイトカインまたはケモカインのサブユニットを含有する。

【0009】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1または第2のペプチドは、タグまたは標識である。

【0010】

サイトカインもしくはケモカインの第1のサブユニットまたはその機能的部分を含有する第1のペプチド；サイトカインもしくはケモカインの第2のサブユニットまたはその機能的部分を含有する第2のペプチド；ならびに第1のペプチドと第2のペプチドを接続している連結領域であって、標的分子と結合する標的化部分を含有する連結領域を含有する免疫調節ポリペプチドが、本明細書に提供される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、サイトカインもしくはケモカインは、ホモ二量体またはヘテロ二量体である。

40

【0011】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、連結領域は、標的化部分を第1または第2のペプチドと繋いでいる少なくとも1つのポリペプチドリンクをさらに含有する。

【0012】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、サイトカインもしくはケモカインまたはそ

50

のサブユニットもしくは機能的部分は、IL-12、IL-15、IL-2、IL-18、GM-CSF、IL-7、IL-21、IFN_α、IFN_γ、IFN_β、IL-17、IL-23、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-27、エリスロポエチン、G-CSF、成長ホルモン、プロラクチン、オンコスタチンM、および白血病抑制因子またはそのサブユニットもしくは機能的部分からなる群より選択される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1または第2のペプチドは独立して、IL-12、IL-23、IL-27、およびIL-35より選択されるサイトカインもしくはケモカインのサブユニットまたはその機能的部分を含有する。

【 0 0 1 3 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、第1または第2のペプチドは独立して、IL-12のサブユニットまたはその機能的部分である。いくつかの態様において、第1のペプチドは、IL-12 p35サブユニットもしくはIL-12 p40サブユニットまたはその機能的部分を含有し、第2のペプチドは、IL-12 p35サブユニットおよびIL-12 p40サブユニットの他方またはその機能的部分を含有する。

【 0 0 1 4 】

IL-12のp35サブユニットまたはその機能的部分を含有する第1のペプチド；IL-12のp40サブユニットまたはその機能的部分を含有する第2のペプチド；ならびに第1のペプチドと第2のペプチドを接続している連結領域であって、標的分子と結合する標的化部分を含有する連結領域を含有する免疫調節ポリペプチドが、本明細書に提供される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、p35サブユニットは、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含有し、かつ／またはp40サブユニットは、SEQ ID NO:11に示されるアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含有する。

【 0 0 1 5 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、連結領域は、標的化部分をp35サブユニットまたはp40サブユニットと繋いでいる少なくとも1つのポリペプチドリンカーをさらに含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ポリペプチドリンカーは、アミノ酸を約2～約20個含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ポリペプチドリンカーは、配列GGGGS(n) [配列中、nは1～5である] (SEQ ID NO:29) を含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ポリペプチドリンカーは、SEQ ID NO:7～9のいずれかに示される配列を含有する。

[0 0 1 6]

任意のそのような態様のいくつかにおいて、連結領域は、2つのポリペプチドリンカーを含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、第1のポリペプチドリンカーと第2のポリペプチドリンカーとの間に含有される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的分子は、疾患または障害に関連する。いくつかの局面において、疾患または障害は、感染性疾患もしくは障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、または腫瘍もしくはがんである。

(0 0 1 7)

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的分子は、腫瘍に関連するか、または腫瘍上に存在する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的分子は腫瘍抗原である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的分子は、肝細胞増殖因子（HGF）、ヘパリン、VEGF、VEGF-A、VEGFR2、VEGFR3、HER2、PD-1、テネイシン-C、CTLA-4、LAG3、PD-L1、EGFR、EPCAM、RANKL、NG2プロテオグリカン、CD20、CD52、CD19、CD3、CD30、IL-6、CD38、SLAMF7、GD2、CD13、CD274、CD279、CD40L、およびCD47からなる群より選択される。

〔 0 0 1 8 〕

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、アミノ酸を約3～約300個、約3～約100個、約3～約20個、約6～約20個、または約10個含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、標的分子との結合に関して、 $\text{約}0.5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以下、 $\text{約}1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以下、 $\text{約}2 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以下、 $\text{約}3 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以下、 $\text{約}4 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以下である。

sec^{-1} 以下、約 $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以下、約 $1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以下、約 $1.5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以下、約 $2 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以下、約 $3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以下、約 $4 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以下、約 $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以下、約 $1 \times 10^{-2} \text{ sec}$ 以下、または約 $5 \times 10^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 以下である k_{off} 速度を示す。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的分子に対する標的化部分の解離定数 (K_D) は、100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19nM、18nM、17nM、16nM、15nM、14nM、13nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、もしくは1nM、または概ねそれらの値、またはそれらの値未満、または概ねそれらの値未満であり、例えば1nMまたは約1nMと15nMまたは約15nMとの間、例えば5nMまたは約5nMと10nMまたは約10nMとの間である。

【0019】

10

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、抗体または抗体フラグメントであるかまたはそれを含有する。いくつかの局面において、抗体フラグメントは、単鎖フラグメントである。いくつかの態様において、抗体フラグメントは、重鎖可変領域を含有する単一ドメイン抗体である。いくつかの局面において、抗体フラグメントは、可動性リンカーによって連結された抗体可変領域を含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、抗体フラグメントは、scFvを含有する。

【0020】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、トラスツズマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、アテゾリズマブ、ベバシズマブ、パニツムマブ、セツキシマブ、ネシツムマブ、デノスマブ、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、オビヌツズマブ、アレムツズマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、シリツキシマブ、イピリムマブ、ダラツムマブ、エロツズマブ、ジヌツキシマブ、カツマキソマブからなる群より選択される抗体の可変重 (V_H) 鎖および / または可変軽 (V_L) 鎖を含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、抗EPCAM抗体の V_H 鎖および / または V_L 鎖を含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、SEQ ID NO:17、24、もしくは25に示される配列、またはSEQ ID NO:17、24、もしくは25と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含有し、かつ標的分子と結合する。

20

【0021】

30

任意のそのような態様のいくつかにおいて、免疫調節ポリペプチドは、SEQ ID NO:6に示される配列、または当該配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含有する。

【0022】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、ペプチド結合モチーフであるか、またはそれを含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、ヘパリン結合ペプチドである。いくつかの局面において、ヘパリン結合ペプチド (HBP) は、フィブロネクチンもしくはBMP4に由来し、かつ / またはウシ由来である。

【0023】

40

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、肝細胞増殖因子 (HGF) 結合ペプチド、VEGF結合ペプチド、VEGF-A結合ペプチド、VEGFR2結合ペプチド、EPCA M結合ペプチド、HER2結合ペプチド、PD-1結合ペプチド、テネイシン-C結合ペプチド、CTLA-4結合ペプチド、LAG3結合ペプチド、PD-L1結合ペプチド、EGFR結合ペプチド、RANKL結合ペプチド、CD20結合ペプチド、CD52結合ペプチド、CD19結合ペプチド、CD3結合ペプチド、CD30結合ペプチド、IL-6結合ペプチド、CD38結合ペプチド、SLAMF 7結合ペプチド、GD2結合ペプチド、CD274結合ペプチド、CD279結合ペプチド、CD40 L結合ペプチド、およびCD47結合ペプチドからなる群より選択される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、HGF結合ペプチドまたはEGFR結合ペプチド (EGFRBP) を含有する。

【0024】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的化部分は、SEQ ID NO:13、14、15、16、26、27、もしくは28のいずれかに示される配列、または当該配列と少なくとも9

50

5%の配列同一性を有する配列を含有し、かつ標的分子と結合する。

【0025】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、免疫調節ポリペプチドは、SEQ ID NO:1～5のいずれかに示される配列、または当該配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含有する。

【0026】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、免疫調節ポリペプチドは、連結領域を含有しない組換えIL-12と比較して増大した、IL-12Rを介して刺激する活性を示す。任意のそのような態様のいくつかにおいて、免疫調節ポリペプチドは、標的分子を発現していない細胞に対する免疫調節ポリペプチドの結合性と比較して、標的分子を発現している標的細胞に対する増大した結合性を示す。いくつかの態様において、活性および／または結合性の増大は、1.2倍よりも大きい、1.5倍よりも大きい、2.0倍よりも大きい、3.0倍よりも大きい、4.0倍よりも大きい、5.0倍よりも大きい、または10.0倍よりも大きい増大である。いくつかの態様において、増大した活性および／または結合性は、サブユニット間にポリペプチドリンクターを含有するが標的化部分を含有しない基準免疫調節ポリペプチドによって示されるものよりも大きい。

10

【0027】

上記態様のいずれか1つに記載の免疫調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、本明細書に提供される。いくつかの局面において、当該ポリヌクレオチドは、シグナル配列をさらに含有する。いくつかの例において、当該シグナル配列は、CD33由来のシグナルペプチドをコードする。いくつかの局面において、当該シグナルペプチドは、SEQ ID NO:18に示される配列、または当該配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含有する。

20

【0028】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ポリヌクレオチドは、免疫調節ポリペプチドの発現を制御するために機能的に連結されている少なくとも1つのプロモーターをさらに含有する。いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドの発現は、誘導性または条件的である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ポリヌクレオチドは、条件的プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターをさらに含有する。いくつかの局面において、条件的プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターは、誘導性プロモーター、エンハンサー、もしくはトランスアクチベーター、または抑制性プロモーター、エンハンサー、もしくはトランスアクチベーターである。

30

【0029】

いくつかの態様において、プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターは、T細胞活性化因子である。例えば、プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターは、1つまたは複数のT細胞転写因子に対する結合部位を含有する。いくつかの態様において、プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターは、活性化T細胞核内因子(NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2、および／またはNF-Bに対する結合部位を含有する。

【0030】

40

いくつかの態様において、プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターの活性化は、条件的、任意で誘導性のプロモーター、エンハンサー、もしくはトランスアクチベーター、または抑制性のプロモーター、エンハンサーもしくはトランスアクチベーターである。

【0031】

いくつかの態様において、プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターは、腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件の存在下で活性である。腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件は、低酸素、低グルコース、酸性pH、および／または酸化ストレスより選択することができる。

【0032】

50

いくつかの態様において、腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件は、低酸素である。そのような態様のいくつかにおいて、ポリヌクレオチドは、プロモーターに機能的に連結されており、プロモーターは、HIF-1-アルファ応答性プロモーターである。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに機能的に連結されており、プロモーターは、1つまたは複数の低酸素応答エレメントを含有する。例示的な低酸素応答エレメントは、配列5'-(A/G)CGT(G/C)(G/C)-3'を含有する。そのような態様において、プロモーターは、エリスロポエチン(Epo)、VEGF-A、ホスホグリセリン酸キナーゼ1(P-GK1)、乳酸デヒドロゲナーゼA(LDH A)、アルドラーゼA(ALDA)、またはグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)プロモーターであることができる。プロモーターは、SEQ ID NO:85~90のいずれかに示される配列を有することができる。

10

【0033】

いくつかの態様において、腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件は、低グルコースである。そのような態様のいくつかにおいて、ポリヌクレオチドは、GRP78またはヘキソキナーゼIIプロモーターであるプロモーターに機能的に連結されている。

【0034】

いくつかの態様において、プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターは、放射線によって、熱によって、または薬物の存在下で誘導可能である。

【0035】

いくつかの態様において、プロモーターは、放射線誘導性プロモーターである。例示的な放射線誘導性プロモーターは、CArGエレメントまたはCC(A+Tリッチ)₆GGモチーフを含有することができる。いくつかの態様において、放射線誘導性プロモーターは、EGR-1、Waf-1、RecA、もしくはcIAP2プロモーターであるか、またはSEQ ID NO 92~95に示される配列を有するプロモーターなどの合成プロモーターである。

20

【0036】

いくつかの態様において、プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターは、熱誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターである。そのような態様のいくつかにおいて、熱誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターは、熱ショックエレメント(HSE)を含有する。いくつかの態様において、熱誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターは、HSP70BプロモーターまたはGadd153プロモーターなどの熱ショックプロモーター(HSP)である。

30

【0037】

いくつかの態様において、プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターは、薬物誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターである。いくつかの例において、誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターは、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列、ガラクトースオペレーター配列、ドキシサイクリンオペレーター配列、ラバマイシンオペレーター配列、タモキシフェンオペレーター配列、もしくはホルモン応答性オペレーター配列、またはそれらの類似体を含有する。いくつかの態様において、誘導性プロモーターは、テトラサイクリン応答エレメント(TRE)を含有する。いくつかの態様において、薬物誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレベーターは、多剤耐性(mdri)遺伝子プロモーターを含有する。

40

【0038】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ポリヌクレオチドは、単一の核酸配列を含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、ポリヌクレオチドは、免疫調節ポリペプチドをコードする第1の核酸配列、および組換え受容体をコードする第2の核酸配列を含有する。いくつかの局面において、組換え受容体は、キメラ抗原受容体(CAR)であるかまたはそれを含有する。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、免疫調節ポリペプチドおよび/または組換え受容体の発現を制御するために機能的に連結されている少なくとも1つのプロモーターをさらに含有する。

50

【 0 0 3 9 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、ポリヌクレオチドは、翻訳後に第1および第2の核酸配列の翻訳産物を産出するために第1の核酸配列と第2の核酸配列との間に配列内リボソーム進入部位(IRES)をさらに含有する。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、第1の核酸配列と第2の核酸配列との間に連結ペプチドをコードする核酸配列を含有し、その場合、連結ペプチドは、翻訳中または翻訳後に第1および第2の核酸配列の翻訳産物を分離する。いくつかの局面において、連結ペプチドは、自己切断型ペプチド、またはリボソームスキッピングを引き起こすペプチド、任意でT2Aペプチドを含有する。

具現されるポリヌクレオチドのいずれかは、CpGモチーフを除去するために最適化されていることができ、かつ／またはコドン最適化されていることができる。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、ヒトコドンに最適化されている。

【 0 0 4 0 】

上記態様のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを含有するベクターが、本明細書に提供される。いくつかの態様において、ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの局面において、ベクターはレトロウイルスベクターである。いくつかの例において、ベクターは、レンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターである。

【 0 0 4 1 】

上記態様のいずれか1つに記載の免疫調節ポリペプチドを含有する操作された細胞が、本明細書に提供される。任意のそのような態様のいくつかにおいて、上記態様のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを含有する操作された細胞が提供される。いくつかの態様において、操作された細胞は、上記態様のいずれか1つに記載のベクターを含有する。

【 0 0 4 2 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、操作された細胞は、免疫調節ポリペプチドを分泌する。いくつかの態様において、操作された細胞は、組換え受容体をさらに含有する。いくつかの例において、組換え受容体は、疾患または障害に関連する標的抗原と結合する。いくつかの局面において、疾患または障害は、感染性疾患もしくは障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、または腫瘍もしくはがんである。いくつかの態様において、標的抗原は、腫瘍抗原である。

【 0 0 4 3 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、標的抗原は、ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソセリン、CEA、B型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎児型アセチルコリンe受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カッパ軽鎖、ルイスY、L1-細胞接着分子、MAGE-A1、メソセリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、腫瘍胎児抗原、TAG72、VEGF-R2、がん胎児抗原(CEA)、前立腺特異抗原、PSMA、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1(WT-1)、およびサイクリンA1(CCNA1)からなる群より選択される。いくつかの態様において、標的化部分は、ヒトのものであるか、またはヒトタンパク質由来である。

【 0 0 4 4 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、免疫調節タンパク質は、それが投与される対象において免疫原性がなく、かつ／または免疫応答を誘導しない。

【 0 0 4 5 】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、組換え受容体は、機能性非TCR抗原受容体またはトランスジェニックTCRである。いくつかの態様において、組換え受容体は、キメラ抗原受容体(CAR)である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、組換え受容体は、抗原結合ドメインを含有する細胞外部分を含有する。いくつかの例において、抗原結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントであるかまたはそれを含有する。いくつかの局面において、抗体フラグメントは、単鎖フラグメントである。いくつかの態様において

10

20

30

40

50

、フラグメントは、可動性リンカーによって連結された抗体可変領域を含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、フラグメントは、scFvを含有する。

【0046】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、組換え受容体は、細胞内シグナル伝達領域を含有する。いくつかの局面において、細胞内シグナル伝達領域は、T細胞において一次活性化シグナルを誘導することができ、T細胞受容体（TCR）構成成分であり、かつ／または免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を含有する。いくつかの例において、細胞内シグナル伝達領域は、CD3-ゼータ（CD3 ζ ）鎖の細胞内シグナル伝達ドメインもしくはそのシグナル伝達部分であるか、またはそれを含有する。

【0047】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、操作された細胞は、細胞外部分および細胞内シグナル伝達領域を繋いでいる膜貫通ドメインをさらに含有する。いくつかの態様において、細胞内領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、組換え受容体は、共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含有する。いくつかの例において、共刺激シグナル伝達ドメインは、T細胞共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分を含有する。いくつかの局面において、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、4-1BB、もしくはICOSの細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分を含有する。いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達領域との間にある。

【0048】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、操作された細胞は、T細胞である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、操作された細胞は、CD8 $^{+}$ T細胞またはCD4 $^{+}$ T細胞である。

【0049】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、操作された細胞は、操作されていない細胞と比較して、または組換え受容体を含有するが免疫調節ポリペプチドを含有しない細胞と比較して、増大した持続性および／または生存を示す。任意のそのような態様のいくつかにおいて、操作された細胞は、連結領域を含有しない組換えIL-12と比較して増大した（高い）、IL-12Rを介して刺激する活性を示す。いくつかの態様において、基準IL-12は、連結領域を含有しないか、またはSEQ ID NO 7～9に示される配列のいずれかからなる連結領域を含有する。

【0050】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、操作された細胞は、標的分子を発現していない細胞に対する免疫調節ポリペプチドの結合性と比較して増大した（高い）、標的分子を発現している標的細胞に対する結合性を示す、免疫調節ポリペプチドを分泌する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、操作された細胞は、標的分子を発現していない細胞の死滅と比較して増大した（多くの）、標的分子を発現している標的細胞の死滅をもたらす。任意のそのような態様のいくつかにおいて、増大した持続性、活性、結合性、および／または死滅は、サブユニット間にポリペプチドリンクーを含有するが標的化部分を含有しない免疫調節ポリペプチドを発現または分泌している基準の操作された細胞によってもたらされるものよりも多大である。

【0051】

上記態様のいずれか1つに記載の免疫調節ポリペプチドを含有する組成物が、本明細書に提供される。上記態様のいずれか1つに記載の操作された細胞を含有する組成物が、本明細書に提供される。いくつかの態様において、組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含有する。

【0052】

上記態様のいずれか1つに記載の免疫調節ポリペプチド、上記態様のいずれか1つに記載の操作された細胞、または上記態様のいずれか1つに記載の組成物を、疾患または障害を有する対象に投与することを含む治療方法が、本明細書に提供される。いくつかの例にお

10

20

30

40

50

いて、免疫調節ポリペプチドは、疾患または障害に関連する細胞が発現する標的分子と特異的に結合する。いくつかの局面において、操作された細胞は、疾患または状態に関連する抗原と特異的に結合する組換え受容体を発現する。いくつかの態様において、疾患または障害は、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは障害、または感染性疾患である。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】組換えヒトIL-12 (rHuIL-12)、scIL-12、またはHBP標的化部分 (IL-12HBP) もしくはEGFR標的化部分 (IL-12EGFR) のいずれかを含有する免疫調節ポリペプチドで刺激した後のPHA芽球におけるインターフェロンガンマ (IFN- γ) の分泌を示す。

【図2】様々なエフェクター：標的細胞比にて細胞を被験IL-12免疫調節タンパク質で刺激した後の総細胞数における変化倍率を示す。

10

【図3】様々なエフェクター：標的細胞比にて細胞を被験IL-12免疫調節タンパク質で刺激した後の細胞の死滅指数を示す。

【図4】表面プラズモン共鳴法によって評価したIL-12免疫調節タンパク質の結合親和性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0054】

詳細な説明

標的分子と結合する標的化部分を含有する連結領域によって接続された第1および第2のペプチドを含有する免疫調節ポリペプチドを含む免疫調節ポリペプチドが、本明細書に提供される。いくつかの態様において、第1および第2のペプチドは独立して、第1および第2のサイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはサイトカインもしくはケモカインの機能的部分である。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、標的分子と結合する標的化部分を含有する連結領域によって接続されている、サイトカインまたはケモカインの第1のサブユニットおよび第2のサブユニットを含有する。いくつかの態様において、サイトカインはIL-12であり、免疫調節ポリペプチドは、標的分子と結合する標的化部分を含有する連結領域によって繋がった、IL-12のp35サブユニットおよびp40サブユニットを含有する。いくつかの態様において、標的分子は、罹患環境（例えば腫瘍微小環境）において（例えば、罹患微小環境または腫瘍微小環境に存在する細胞上において）過剰発現する分子または当該環境に特異的な分子である。免疫調節ポリペプチドを含有する組成物および操作された細胞、ならびにそのような組成物および細胞を投与する方法も提供される。

20

【0055】

サイトカインおよびケモカインなどの様々なペプチドの投与は、がんなどの疾患および状態を治療するのに有効であることができる。しかし、ある特定のそのような治療（例えば、天然または未改变サイトカインの全身投与を含む治療）は、望まれない作用（例えば、疾患または状態の細胞または組織（例えば、腫瘍細胞）以外の部位での分子の活性から生じるもの）を伴う可能性がある。そのように、現行の方法は、完全には満足するものでない場合があり、効力および安全性の改善が望ましい。

30

【0056】

いくつかの態様において、本明細書に提供される免疫調節ポリペプチドは、疾患または状態に関連する細胞が発現する標的分子と特異的に結合する。したがって、いくつかの場合において、免疫調節ポリペプチドは、公知の標的分子を発現する組織および細胞（例えば、腫瘍細胞）に標的化される。いくつかの場合において、標的分子を含有する細胞への免疫調節ポリペプチドの標的化は、リンカーまたは標的化部分を含有しないサイトカインまたはケモカイン（例えば、組換えヒトサイトカインまたはケモカイン）などのペプチドを用いた処置と比較して、より少ない望まれない転帰、またはより望ましい転帰に関連する。

40

【0057】

いくつかの局面において、提供される態様は、基準処置レジメンまたは組成物と比較し

50

て、例えば、サイトカインまたはサイトカインの腫瘍局在用に一般的に設計されたその関連型もしくは未改変型の細胞ベースまたは局所送達ベースの投与と比較して、匹敵する安全性および改善された効力を示す。いくつかの点で、提供される態様は、サイトカイン分子のネイティブ型または未改変型の全身投与と比較して、向上した安全性プロファイルを有する全身投与を含む。

【 0 0 5 8 】

いくつかの局面において、サイトカインは、インターロイキン12 (IL-12) である。IL-12は、典型的には自然免疫および細胞性免疫のメディエーターである。いくつかの状況において、IL-12は、抗腫瘍活性および抗転移活性をもたらす。一般的に、IL-12は、T細胞およびNK細胞に作用する。IL-12の機能には、Tヘルパー1型 (Th1) 免疫応答のプライミングおよびNK細胞によるIFN- γ の分泌が含まれる。典型的には、IL-12は、ナイーブT細胞が、抗原と最初に遭遇したときに、活性化後に大量のIFN- γ を産生することができるTh1細胞集団へと分化することによって、Th1応答を生成する。いくつかの状況において、IL-12は、特異的抗原に応答して分化したTh1細胞がIFN- γ を最大限に分泌するための共刺激として作用する。IL-12は、いくつかの状況では、以前に曝露された抗原と相互作用している休止メモリーT細胞集団からのIFN- γ 産生Th1細胞の発生を刺激する。したがって、いくつかの局面において、IL-12は、免疫エフェクター機能を促進または媒介して、抗腫瘍免疫応答（養子細胞療法における細胞投与に関連するものを含む）を増強することができる。

【 0 0 5 9 】

しかし、いくつかの場合において、多数の他のサイトカインと同様に、ネイティブな組換えヒトIL-12の全身投与を含むある特定の研究が全身毒性などの毒性を伴うことが観察されている。いくつかの場合において、がん患者における臨床試験は、有望な治療活性を明らかにしたが、典型的には全身投与されたネイティブな組換えヒトIL-12は副作用を有する可能性があることを示した (Lasek et al. (2014) *Cancer Immunol. Immunother.*, 63:419-435)。いくつかの局面において、そのような組換えIL-12のそのような特定の種類の投与は、米国国立がん研究所グループ毒性規準スケール (National Cancer Institute Groups Toxicity Criteria Scale) (Creekmore et al. (eds): *Biologic Therapy of Cancer*. Philadelphia, PA, Lippincott, 1991, p. 76) に従って評価されるグレード3またはグレード4の毒性を招く可能性がある。いくつかの場合において、毒性の臨床症状は、例えば、疲労、呼吸困難、口内炎、アシドーシス、または消化管出血のうちの1つまたは複数を含む可能性がある。いくつかの場合において、検査室有害事象は、白血球減少症、好中球減少症、高ビリルビン血症、AST上昇、ALT上昇、血小板減少症、クレアチニン上昇、またはアルカリホスファターゼ上昇のうちの1つまたは複数を含む可能性がある。潜在的有害作用の存在または不在を評価および判定するためのアッセイは、公知である（例えば、Leonard et al. (1997) *Blood*, 90:2541-2548を参照されたい）。しかし、IL-12の局所（例えば腫瘍部位）投与および/またはIL-12を自然に分泌するもしくは例えれば腫瘍標的化して分泌するように操作されたT細胞などの細胞の導入のような、様々な他の送達ルートおよび改変構築物が、安全であり、有毒な転帰またはそのリスクがほとんどまたは全くないことに関連することが観察されている。いくつかの例では、例えばキメラ抗原受容体を発現しており、分泌される（例えば、単鎖ヘテロ二量体形式の）組換えIL-12または外因性IL-12も発現している、操作T細胞が、有望な結果を有すると報告されている (Pegram et al. (2012) *Blood*, 119:4133-4141)。

【 0 0 6 0 】

いくつかの態様において、IL-12免疫調節ポリペプチドなどの提供される免疫調節ポリペプチドは、投与されると、組換えヒトIL-12の全身投与などの投与を含む他の種類の治療法などの他の処置と比較して、低下した毒性（例えば、低下した全身毒性）をもたらし得る。いくつかの態様において、そのような免疫調節ポリペプチドを発現している、提供される細胞は、患者に投与されると、組換えヒトIL-12を発現している細胞の投与を含む他の種類の治療法などの他の処置と比較して、低下した毒性（例えば、低下した全身毒性

10

20

30

40

50

)をもたらし得る。いくつかの態様において、本明細書において以下に記載する1つまたは複数の誘導性または条件依存的プロモーターおよび／または調節エレメントの組み入れなどによって、組換えIL-12または外因性IL-12を産出するポリヌクレオチドを、その発現が誘導性または条件依存的になるように改変することによって、提供される細胞に起因する毒性は低下またはさらに低下される。例えば、放射線、熱、または薬物もしくは小分子などの外因性作用物質を投与するとIL-12の発現が生じ、その他の場合では発現しないよう、1つまたは複数の誘導性プロモーターを採用するようにポリヌクレオチドを改変することができる。他の例では、発現が特定の微小環境(例えば、腫瘍微小環境(例えば低酸素条件))でのみ起こるように、組換えまたは外因性IL-12の発現を制限することができる。組換えIL-12が身体の標的化領域のみおよび／または特定の条件下でのみ発現するようなIL-12の発現調節は、IL-12発現細胞投与の毒性を緩和することができる。

10

【0061】

いくつかの態様において、対象は、標的化部分を含有する、提供される免疫調節ポリペプチド、またはそのような免疫調節ポリペプチドを発現もしくは分泌している細胞、例えば標的化部分を含有する、提供されるIL-12免疫調節ポリペプチドを投与すると、重度の毒性またはグレード3以上のIL-12関連毒性を示さないか、または投与された対象の平均として示さない。いくつかの局面において、対象は、他の方法と比較して、同じもしくは低下した毒性またはその欠如、および増大した効力(例えば、本明細書提供のIL-12の免疫調節効果における増大)を示す。

20

【0062】

いくつかの場合において、免疫調節ポリペプチドの構造は、標的化部分が標的分子と、例えば標的細胞の表面で結合すると、第1および第2のペプチド(例えば、サイトカインまたはケモカインのサブユニット)が標的細胞から離れる方向を向くような構造である。いくつかのそのような場合において、サイトカインまたはケモカインのサブユニットは、免疫細胞などの隣接する非標的細胞の方を向く。いくつかの態様において、そのような方向付けは、サイトカインまたはケモカインが標的細胞上のその受容体と結合するのを止めさせる場合がある。いくつかの局面において、そのような方向付けは、サイトカインまたはケモカインが免疫細胞(例えば、T細胞)上のその受容体と結合するのを促進する場合がある。いくつかの例において、そのような方向付けは、標的細胞から離れる方向を向くように設計されていないか、または標的細胞の方を向くように設計された他の免疫調節ポリペプチドと比較して、増強されたT細胞刺激をもたらし得る。いくつかの場合において、連結領域の構造、例えば、構成成分の順序およびサイズは、標的細胞への標的化部分の結合を促進する一方で、隣接する非標的細胞への第1および第2のペプチド(例えば、第1および第2のサイトカインまたはサイトカインのサブユニット)の結合を促進するために、例えばサブユニットが標的細胞から離れる方向を向くように設計されている。

30

【0063】

いくつかの局面において、標的化部分は、一方または両方のペプチド(例えば、一方または両方のサブユニット)と接続される。いくつかの態様において、標的化部分は、第1のペプチドと第2のペプチドとの間(例えば、サイトカインまたはケモカイン(例えばIL-12)の第1のサブユニットと第2のサブユニットとの間)に形成される。いくつかの態様において、標的化部分は、直接または間接的に(例えば、1つまたは複数のリンクを介して)接続される。いくつかの例において、連結領域は、標的化部分を第1または第2のペプチド(例えば、サイトカインまたはケモカインの第1または第2のサブユニット)に繋いでいる少なくとも1つのポリペプチドリンクをさらに含有する。いくつかの場合において、連結領域は、2つ以上のポリペプチドリンクを含有する。例えば、いくつかの局面において、第1のペプチド(例えば、第1のサブユニット)は、第1のポリペプチドリンクと結び付いており、第1のポリペプチドリンクは、標的化部分の第1の端部と結び付いており、第2のポリペプチドリンクは、標的化部分の第2の端部および第2のペプチド(例えば、第2のサブユニット)と結び付いている。したがって、いくつかの状況では、標的化部分は、2つ以上のポリペプチドリンクの間に隣接し、ポリペプチドリンクは、

40

50

標的化部分を一方または両方のペプチド（例えば、サイトカインまたはケモカインのサブユニット）と結び付ける。いくつかの態様において、連結領域の構成成分のそのような順序は、ペプチド（例えば、サイトカインまたはケモカインのサブユニット）が標的細胞から離れる方向を向くのを促進する。

【0064】

いくつかの局面において、連結領域のサイズ、例えば長さは、第1および第2のペプチド（例えば、サイトカインもしくはケモカインサブユニット）が、所望の方向を向くようなサイズである。いくつかの態様において、連結領域は、アミノ酸400個以下、300個以下、250個以下、200個以下、150個以下、100個以下、50個以下、40個以下、30個以下、25個以下、20個以下、15個以下、10個以下、または5個以下である。いくつかの局面において、連結領域の長さは、アミノ酸約200個～400個、アミノ酸約100個～200個、またはアミノ酸約5個～50個、例えばアミノ酸約10個～50個、アミノ酸10個～40個、アミノ酸10個～30個、アミノ酸10個～20個、アミノ酸20個～50個、アミノ酸20個～40個、アミノ酸20個～30個、アミノ酸30個～50個、またはアミノ酸30～40個である。

10

【0065】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドをコードする核酸分子は、誘導性、条件的、または活性化誘導性プロモーターまたはエンハンサーなどのプロモーターに機能的に連結されている。いくつかの態様において、プロモーターまたはエンハンサーは、免疫調節ポリペプチドの発現を制御する。したがって、いくつかの状況では、免疫調節ポリペプチドは、プロモーターまたはエンハンサーが活性な場合にのみ本質的に発現する。例えば、いくつかの場合において、条件的プロモーターは、分子もしくは化合物の同時投与によって活性化される場合がある、または分子もしくは化合物と同時投与後に下方調節される場合がある。

20

【0066】

いくつかの局面において、免疫調節ポリペプチドの発現は、T細胞活性化因子などによる、もたらされる免疫細胞（例えば、T細胞）の活性化の存在下で生じる。例えば、いくつかの例において、プロモーター、エンハンサー、もしくは他の応答エレメント、またはその部分は、転写因子によって認識されて、活性がT細胞活性化により通常作動される遺伝子の発現を駆動する。いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、活性がT細胞活性化により作動される転写因子の調節ドメインまたは領域（例えば、プロモーター、エンハンサーまたは他の応答エレメント）であることができる。いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、T細胞活性化、TCRシグナル伝達のシグナル強度、および/またはTCRシグナル伝達の質のうちの1つまたは複数に応答する。

30

【0067】

いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、T細胞転写因子に対する結合部位を含有し、それにより、T細胞転写因子の下流の活性に関連するプロモーター、エンハンサーもしくは応答エレメントなどの調節エレメントであることができる。いくつかの態様において、転写因子は、活性化T細胞核内因子（NFAT）、C/EBP、STAT1、STAT2、またはNFBである。例えば、いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、応答エレメントまたは活性化T細胞核内因子（NFAT）、C/EBP、STAT1、STAT2、およびNFBによって認識される応答エレメントを含有する。いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、調節エレメントまたは1つもしくは2つの、いくつかの場合において3つ以上の独特な転写因子によって認識されるもしくはそれに応答する調節エレメントを含有することができる。

40

【0068】

免疫調節ポリペプチドの発現がそのような条件的、誘導性、または活性化誘導性プロモーターまたはエンハンサーによって制御されるいくつかの局面において、免疫調節ポリペプチドの効力は、組換えヒトサイトカインもしくはケモカインまたはそのようなプロモーターもしくはエンハンサーに機能的に連結されていない免疫調節ポリペプチドと比較して改善されている。いくつかの局面において、そのようなプロモーターまたはエンハンサーに機能的に連結されている免疫調節ポリペプチドの毒性を示す潜在的副作用または転帰の

50

リスクは、組換えヒトサイトカインもしくはケモカインまたはそのようなプロモーターもしくはエンハンサーに機能的に連結されない免疫調節ポリペプチドと比較して低下している。いくつかの局面において、効力は、比較的増大する。例えば、いくつかの場合において、発現が誘導的または条件的に制御される、提供される免疫調節ポリペプチドは、非標的組織においては発現が減少しているかまたは発現しない場合があるが、標的組織の近傍で活性化することができる。いくつかの態様において、活性化誘導性プロモーターに機能的に連結されている、提供される免疫調節ポリペプチドをコードする核酸分子は、非標的組織においては発現が減少しているかまたは発現しない場合があるが、免疫応答が誘発された標的組織の近傍で活性化することができる。そのようなアプローチは、他の組成物および方法と比較して、望まれない転帰の可能性の低下または効力の増大をもたらす場合がある。

10

【0069】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドは、第1または第2のペプチドによって認識される受容体（例えば、サイトカインまたはケモカイン受容体）を刺激する活性を示す。いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドが受容体を刺激する活性は、標的化部分を含有しない免疫調節タンパク質（例えば、連結領域を含まない組換えサイトカインまたはケモカイン）と比較して増大している（高い）。いくつかの局面において、免疫調節ポリペプチドは、標的分子を発現していない細胞に対する結合性と比較して増大した（高い）、標的分子を発現している標的細胞に対する結合性を示す。いくつかの局面において、増大した活性および／または結合性は、サブユニット間にポリペプチドリンクを含有するが標的化部分を含有しない基準免疫調節ポリペプチドによってもたらされるものよりも大きい。そのような局面のいずれかでは、増大は、1.2倍よりも大きい、1.5倍よりも大きい、2.0倍よりも大きい、3.0倍よりも大きい、4.0倍よりも大きい、5.0倍よりも大きい、または10.0倍よりも大きい増大である。

20

【0070】

いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、免疫原性がない。いくつかの場合において、免疫調節ポリペプチドは、それが投与される対象において免疫応答を誘導しない。いくつかの場合において、免疫調節ポリペプチドは、より大きい標的化部分と繋がった、および／またはより大きい連結領域を介して接続されたポリペプチド分子（例えば、サイトカインまたはケモカイン）よりも免疫原性が低い。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質または免疫調節タンパク質を発現している細胞が投与される対象は、それぞれ、そのような他の代替分子の投与またはそのような他の代替分子を発現している細胞の投与と比較して、免疫調節タンパク質に対して免疫応答を示さないか、または低下した免疫応答もしくは特定の種類もしくは程度の免疫応答を示す。低下した免疫応答の種類は、検出可能な免疫応答、液性免疫応答、および／または細胞媒介性免疫応答であり得る。

30

【0071】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドは、所望の抗原（例えば腫瘍抗原）に対する特異性を提供するリガンド結合ドメイン（例えば、抗体または抗体フラグメント）を、一次活性化シグナルを提供するT細胞活性化ドメインなどの活性化細胞内ドメイン部分と組み合わせた、キメラ抗原受容体（CAR）などの組換え受容体をコードする細胞上にまたはその細胞と組み合わせて提供される。いくつかの態様において、提供される免疫調節ポリペプチドおよび組換え受容体は、免疫細胞において遺伝的に操作されると、T細胞刺激および／または活性化をモジュレートし、それにより、養子細胞療法における使用のためなどの、インビボでの増大した寿命、生存、および／または持続性を有する遺伝的に操作された細胞を生じることができる。

40

【0072】

したがって、本明細書に記載のものなどの免疫調節ポリペプチドおよび／または操作された組換え受容体を含有する細胞などの細胞も提供される。いくつかの態様において、細胞は、改変IL-12ポリペプチドなどのサイトカインなどの免疫調節ペプチドを分泌することができるか、または分泌するように設計されている。ポリペプチドを分泌するように細

50

胞を操作するための方法は、例えば、Pegram et al. (2012) Blood, 119:4133-4141 ; 米国特許出願公開第20160045551号および同第20100178276号に記載されている。

【0073】

いくつかの態様において、操作された細胞は、標的分子を発現していない細胞に対する結合性と比較して増大した（高い）、標的分子を発現している標的細胞に対する結合性を示す、免疫調節ポリペプチドであって、かつ／または、その他の点で免疫調節ポリペプチドと同じもしくは実質的に同じもしくは類似であるが、改変を含有せず、単鎖分子ではなく、リンカーを含まず、ヘテロ二量体型単鎖分子ではなく、かつ／もしくは標的化部分を有しないサイトカイン（例えば、IL-12）を発現している細胞と比較して増大した（高い）、標的細胞に対する結合性および／もしくは効力を示す、免疫調節ポリペプチドを分泌する。いくつかの局面において、操作された細胞は、標的分子を発現していない細胞の死滅と比較して増大した（多くの）、標的分子を発現している標的細胞の死滅をもたらす。

【0074】

いくつかの場合において、免疫調節ポリペプチドおよび組換え受容体を細胞に発現させて、遺伝的に操作されたT細胞を產生させることができ、このT細胞は、対象に投与されたときに、免疫調節タンパク質を発現または分泌しない基準細胞組成物と比較して、改善された1つまたは複数の性質を示す。いくつかの例において、増大した持続性、活性、結合性、および／または死滅は、免疫調節ポリペプチドを発現していない、またはサブユニット間にポリペプチドリンクを含むが標的化部分を含まない免疫調節ポリペプチドを発現もしくは分泌している、操作された細胞を含む基準組成物によってもたらされるものよりも多大である。したがって、いくつかの場合において、基準組成物を投与された細胞と比較して、改善しているまたは増大しているまたは大きいことができる、投与された遺伝的に操作された細胞の1つまたは複数の性質には、低下した免疫原性、増大した活性化、ならびに増大した生存および／または持続性が含まれる。

【0075】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドおよび組換え受容体を含有する操作された細胞は、操作されていない細胞と比較して、または組換え受容体を含むが免疫調節ポリペプチドを含まない細胞と比較して、増大した持続性および／または生存を示す。いくつかの態様において、持続性が増大した、遺伝的に操作された細胞は、それが投与された対象においてより良好な効力を示す。いくつかの局面において、投与された細胞の持続性は、少なくとも約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、またはより大きく増大する。

【0076】

いくつかの態様において、投与された細胞の持続性の度合いまたは程度は、対象への投与後に検出または定量することができる。例えば、いくつかの局面において、定量PCR（qPCR）を使用して、対象の血液または血清または器官または組織（例えば罹患部位）において組換え受容体を発現している細胞（例えばCAR発現細胞）の量が評価される。いくつかの局面において、持続性は、DNA 1マイクログラムあたりの受容体（例えばCAR）をコードするDNAもしくはプラスミドのコピー数として、あるいは試料（例えば、血液もしくは血清）1マイクロリットルあたり、または試料1マイクロリットルあたりの末梢血単核細胞（PBMC）もしくは白血球もしくはT細胞の総数あたりの、受容体発現細胞（例えばCAR発現細胞）の数として、定量される。いくつかの態様において、一般的に受容体に特異的な抗体を使用する、受容体発現細胞を検出するフローサイトメトリー・アッセイも行うことができる。細胞ベースのアッセイを使用して、疾患もしくは状態の細胞または受容体によって認識される抗原を発現している細胞と結合し、かつ／またはそれを中和し、かつ／またはそれに対する応答（例えば、細胞傷害性応答）を誘導することができる細胞などの機能性細胞の数または割合（%）が検出される場合もある。そのような態様のいずれかにおいて、組換え受容体（例えば、CAR発現細胞）に関連する別のマーカーの発現の程度またはレベルを使用して、投与された細胞を対象における内因性細胞と区別することができる。

10

20

30

40

50

【0077】

がんの治療における養子療法に使用するためなどの、免疫調節ポリペプチドおよび免疫調節ポリペプチドを含有または分泌する操作された細胞の方法および使用も提供される。さらに、免疫調節ポリペプチドおよび細胞を操作、調製、および産生させるための方法、免疫調節ポリペプチドおよび細胞を含有する組成物、ならびに組成物または細胞を含有する、およびそれを使用、產生、および投与するためのキットおよびデバイスが提供される。操作された細胞を産生させるための方法、化合物、および組成物も提供される。免疫調節ポリペプチドおよび / または遺伝的に操作された組換え受容体をコードする構築物などの核酸（例えば、ウイルスベクター）ならびに形質導入などによりそのような核酸を細胞に導入するための方法が提供される。免疫調節ポリペプチドおよび操作された細胞を含有する組成物、ならびに、細胞および組成物を養子細胞療法などのために対象に投与するための方法、キット、およびデバイスも提供される。いくつかの局面において、細胞は、対象から単離され、操作され、同じ対象に投与される。他の局面において、それらは、ある対象から単離され、操作され、別の対象に投与される。

10

【0078】

I. 免疫調節ポリペプチド

いくつかの態様において、第1のペプチド、第2のペプチド、ならびに第1のペプチドと第2のペプチドを接続する連結領域を含有するものなどの免疫調節ポリペプチドが提供される。いくつかの態様において、第1および第2のペプチドは、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはそのサイトカインもしくはケモカインの機能的部分であることができる、またはそれに由来する。いくつかの態様において、第1のペプチドは、サイトカインもしくはケモカインの第1のサブユニットまたはその機能的部分であり、第2のペプチドは、サイトカインもしくはケモカインの第2のサブユニットまたはその機能的部分であり、それらは、第1および第2のサブユニットを接続する連結領域によって連結されている。いくつかの態様において、用語「機能的部分」は、その同族受容体と結合してそれらのシグナルを伝達し、免疫調節活性をもたらすことができる、サイトカインもしくはケモカインまたはサイトカインもしくはケモカインのサブユニットの十分な部分を意味し得る。機能的部分は、典型的には、シグナルペプチドを欠如する完全長成熟配列のように、完全長配列の少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれより多くを含有する。いくつかの態様において、提供される免疫調節ポリペプチドまたはそのようなペプチドを含有する細胞は、基準ポリペプチドと比較して増大または減少した、同族受容体の活性または応答を刺激または抑制する活性を示し、その場合、基準ポリペプチドは、連結領域を含有しない組換えタンパク質などのポリペプチドであるか、または基準ポリペプチドは、連結領域を含有するが標的化部分を含有しない組換えタンパク質である。いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドは、基準ポリペプチドと比較して、1つまたは複数の同族受容体に対する増大した親和性を示し、1つまたは複数の同族受容体を介して刺激する増大した活性を示す。他の態様において、免疫調節ポリペプチドは、基準ポリペプチドと比較して減少した、1つまたは複数の同族受容体に対する親和性、および当該1つまたは複数の同族受容体を介した刺激を示す。いくつかの態様において、免疫調節受容体は、基準ポリペプチドと比較して増大または減少した、同族受容体に対する結合親和性を示すことによって、活性をモジュレートする。

20

【0079】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドは、 10^{-5} M以下の K_D （すなわち、特定の結合相互作用の平衡解離定数、単位M；二分子相互作用を仮定してこの会合反応についての結合速度 [k_{on} または k_a] に対する解離速度 [k_{off} または k_d] の比に等しい）の標的分子に対する結合親和性を示す。例えば、平衡解離定数 K_D は、約 10^{-5} M～約 10^{-15} M、例えば約 10^{-6} M～約 10^{-12} M、約 10^{-7} M～約 10^{-11} M、約 10^{-6} M～約 10^{-8} M、または約 10^{-7} M～約 10^{-8} Mの範囲である。いくつかの態様において、標的分子への標的化部分の K_D は、100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19nM、18nM、17nM、16nM、1

30

40

50

5nM、14nM、13nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.5nM、もしくは0.1nM、または概ねそれらの値、またはそれらの値未満、または概ねそれらの値未満であり、例えば0.1nMまたは約0.1nMと15nMまたは約15nMとの間、例えば1nMまたは約1nMと10nMまたは約10nMとの間である。いくつかの態様において、標的分子への標的化部分のK_Dは、1nM、100ピコモル濃度(pM)、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM、もしくは1pM、または概ねそれらの値、またはそれらの値未満、または概ねそれらの値未満であり、例えば10pMまたは約10pMと100pMまたは約100pMとの間、例えば25pMまたは約25pMと75pMまたは約75pMとの間である。

【0080】

10

いくつかの局面において、増大した活性および／または結合性は、サブユニット間にポリペプチドリンクターを含有するが標的化部分を含有しない基準免疫調節ポリペプチドによつてもたらされる活性および／または結合性よりも大きいまたは小さい。いくつかのそのような局面において、増大は、1.2倍よりも大きい、1.5倍よりも大きい、2.0倍よりも大きい、3.0倍よりも大きい、4.0倍よりも大きい、5.0倍よりも大きい、または10.0倍よりも大きい増大である。

【0081】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドは、疾患または障害に関連する細胞が発現する標的分子と特異的または優先的に結合する。いくつかの場合において、連結領域は、標的分子と結合する標的化部分を含有する。いくつかの例において、連結領域は、標的化部分を第1または第2のサブユニットに繋いでいる少なくとも1つのポリペプチドリンクターをさらに含有する。

20

【0082】

A. サイトカイン／ケモカイン

いくつかの態様において、サイトカインもしくはケモカインまたはそのサブユニットもしくは機能的部分は、T細胞、NK細胞、マクロファージ、樹状細胞、または他の免疫細胞などの免疫細胞上の受容体と結合するサイトカインまたはケモカインである。いくつかの態様において、免疫細胞は、CD4⁺またはCD8⁺ T細胞などのT細胞である。

【0083】

30

いくつかの態様において、第1もしくは第2のサイトカインもしくはケモカインまたはサイトカインもしくはケモカインの第1もしくは第2のサブユニットまたはその機能的部分は独立して、IL-12、IL-15、IL-2、IL-18、GM-CSF、IL-7、IL-21、IFN_γ、IFN_α、IFN_β、IL-17、IL-23、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-27、エリスロポエチン、G-CSF、成長ホルモン、プロラクチン、オンコスタチンM、白血病抑制因子、IL-22、およびIL-10、またはそれらのサブユニットもしくは機能的部分より選択される。いくつかの態様において、それはヒトなどの哺乳動物のものである。提供される免疫調節タンパク質の例示的なサイトカインおよびケモカインの非限定的な例は、表1に示されている。いくつかの態様において、第1および第2のサイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはその機能的部分などの第1および第2のペプチドは、シグナルペプチドまたはプロペプチドを含有しない。

40

【0084】

いくつかの態様において、第1もしくは第2のサイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはその機能的部分などの第1または第2のペプチドは独立して、SEQ ID NO:10、11、および30～69のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:10、11、および30～69のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはより大きい配列同一性を示すアミノ酸配列を含有する。

【0085】

(表1) 例示的なサイトカインおよびケモカインの配列

50

名称	配列	UniProt ID	SEQ ID NO.
IL-12 アルファ (p35), IL-35 アルファ	RNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLE FYPCTSEEIDHEDITDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKT MNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	P29459	10
IL-12 ベータ(p40)	IWEKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITW TLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSG RFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAA EESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPKNLQL KPLKNSRQEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTCVQVQGKS KREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWS EWASVPCS	P29460	11
IL-15	<u>GIHV</u> FILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVAMKCFLLELQVISLESQGDASIHD VENLILANNNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSF VHIVQMFINTS	P40933	30
IL-2	APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLQAQSKNF HLRPRDLISNINVIVELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFCQSIISTLT	P60568	31
IL-18	<u>MAAE</u> PVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDYFG KLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTSDCRDNA PRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFK EMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSPVGHDNMQMFESSIONYEGYF LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED	Q14116	32

10

20

30

40

50

GM-CSF	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNET VEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKKGPLT MMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPF DCWEPVQE	P04141	33
IL-7	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEF NFFKRHICDANEKGFMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDL HLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEEN KSLKEQKKLNLDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTEH	P13232	34
IL-21	QQQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNVNDLVPEFLPAPEDVE TNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIINVSIKKLKRKPP STNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMI HQHLSSRTHGSEDS	Q9HBE4	35
IFN アルファ-1/13	CDLPETHSLNRRTLMLLAQMRSRISPSSCLMDRHDFGFP QEEFDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTKDSSAAWDE DLLDKFYTELQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSI LAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLST NLQERLRRKE	P01562	36
IFN アルファ-2	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTKDSSAAWDET LLDKFYTELQQLNDLEACVIQGVGVETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKE	P01563	37
IFN アルファ-4	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMGRISHFSCLKDRHDFGP EEFDGHQFQKAQAIISVLHEMIQQTFNLFTEDSSAAWEQ SLLEKFSTELQQLNDLEACVIQEVGVETPLMNEDSILA VRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNL QKRLRRKD	P05014	38
IFN アルファ-5	LGCDLPQTHSLSNRRTLMIMAQMGRISPFSCLKDRHDFG FPQEEFDGNQFQKAQAIISVLHEMIQQTFNLFTKDSSAT WDETLLDKFYTELQQLNDLEACMMQEVGVETPLMN VDSILTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFS LSANLQERLRRKE	P01569	39
IFN アルファ-6	SLDCDLPQTHSLGHRRRTMMLLAQMRRRISLFCLKDRHDF RFPQEEFDGNQFQKAEAISVLHEVIQQTFNLFTKDSSVA WDERLLDKLYTELQQLNDLEACVMQEVVGGTPLMN EDSILAVRKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFS SSRNLQERLRRKE	P05013	40
IFN アルファ-7	CDLPQTHSLRNRRALILLAQMGRISPFSCLKDRHEFRP EEFDGHQFQKTQAIISVLHEMIQQTFNLFTEDSSAAWEQ SLLEKFSTELQQLNDLEACVIQEVGVETPLMNEDFILA VRKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSFSTNL KKGLRRKD	P01567	41
IFN アルファ-8	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMRRRISPFCLKDRHDFEF EEFDDKQFQKAQAIISVLHEMIQQTFNLFTKDSSAALDET LLDEFYIELDQQLNDLESCVMQEVGVIIESPLMYEDSILA RKYFQRITLYLTEKKYSSCAWEVVRAEIMRSFSLSINLQK RLKSKE	P32881	42

10

20

30

40

50

IFN アルファ-10	CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCLKDRHDFRIPQEEDGNQFQKAQAIISVLHEMIQQTFNLFSTEDSSAAWEQSLEKFSTELYQQLNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILA VRKYFQRITLYLIERKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQ KRLRRKD	P01566	43
IFN アルファ-14	CNLSQTHSLNNRRTLMLMAQMRRISPFSCLKDRHDFEFPQEEFDGNQFQKAQAIISVLHEMMQQTFNLFSTKNSSAAWDETLLEKFYIELFQQMNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILA VAKKYFQRITLYLMGKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQNKRLRRKD	P01570	44
IFN アルファ-16	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMGRISHFSCLKDRYDFGFPQEVDGNQFQKAQAIASFHEMIQQTFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYIELFQQLNDLEACVTQEVGVEEIALMNEDSILA VRKYFQRITLYLTMGKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSFSTNLQKGLRRKD	P05015	45
IFN アルファ-17	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMGRISPFSCLKDRHDFGLPQEEDGNQFQKTQAISVLHEMIQQTFNLFSTEDSSAAWEQSLEKFSTELYQQLNNEACVIQEVGMEETPLMNEDSILA VRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSFSTNLQKILRRKD	P01571	46
IFN アルファ-21	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMGRISPFSCLKDRHDFGFPQEEDGNQFQKAQAIISVLHEMIQQTFNLFSTKDSSATWEQSLEKFSTELNQQLNDLEACVIQEVGVEETPLMNVDSILA VKKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSKIFQERLRRKE	P01568	47
IFN ベータ-1	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEKQLQQFKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMS SLHLKRYYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN	P01574	48
IFN ガンマ	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSVDADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIIQKSVENTIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNTYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFRGRRASQ	P01579	49
IL-17A	GITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLIHNRTNTNPKRS SDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLCINA DGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPCNSRLEKILVSV GCTCVTPVHHVA	Q16552	50
IL-17F	RKIPKVGHFFFQKPESCPPVPGGSMKLDIGIINENQRVSM SRNIESRSTSPWNYTWTWDPNRYPSEVVQAQCRLNGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQGCSVSFQLEKVLV TVGCTCVTPVIIHVQ	Q96PD4	51
IL-23 アルファ(p19)	RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDL REEGDEETTNNDVPHIQCQGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQ GLIFYEKLLGSDIFTGEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLQ PEGHHWETQQIPSLSPSQWPQRLLLRFKILRSLQAFVAVA ARVFAHGAATLSP	Q9NPF7	52

10

20

30

40

50

IL-3	APMTQTTPLKTSWVNCNSNMIDEIITHLKQPPLPLDFNNLNGEDQDILMENNLRPNLEAFNRAVKSLQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRKLTFLKTLENAQAQQTTLAIF	P08700	53
IL-4	HKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS	P05112	54
IL-5	IPTEIPTSALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPHKNHQLCTEEIFQGIGTLESQTVQGGTVERLFKNLNSLIKYYIDGQKKKGEEERRRVNQFLDYLQEFLGVMNTEWIIES	P05113	55
IL-6	VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM	P05231	56
IL-9	QGCPTLAGILDINFLINKMQEDPASKCHCSANVTSCCLGIPSDNCTRPFCSERLSQMTNTMQTRYPLIFSRVKKSVELKNNKCPYFSCEQPCNQTTAGNALTFLKSLLEIFQKEKMRGMRGKI	P15248	57
IL-11	PGPPPGRPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLLADTRQLAAQLRDKFPADGDHNLDLSPTLAMSAGALGALQLPGVLTRLRADLLSYLRHVQWLRRAGGSSLKTLPELGTQLARLDRLRLQLLMSRLALPQPPPDPAPPAPPSSAWGGIRAAHAILGGLHLLDWAVRGLLLKTRL	P20809	58
IL-13	LTCLGGFASPGVPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVGCSIAEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGRFN	P35225	59
IL-27 アルファ(p28)	FPRPPGRPQLSQELRREFTVSLHLLARKLLSEVRGQAHRAFAESHLPGVNLYLLPLGEQLPDVSLTFQAWRRLSDPERLCFISTTLQPFHALLGGLTQGRWTNMERMQLWAMRLDLRDLQRHLRFQVLAAGFNLPEEEEEEEERKGLLPGALGSALQGPAQVSWPQLLSTYRLLHSLELVLSRAVRELLLLSKAGHSVWPLGFPTLSPQP	Q8NEV9	60
IL-27 ベータ(EBI3), IL-35ベータ	RKGPPAALTLPRVQCRASRYPIAVDCSWTLPPAPNSTSPVSIATYRLGMAARGHSWPCLQQPTSTSCTIDVQLFSMAPYVLNVTAHPWGSSSFVPFITEHIKPDPPEGVRLSPLAERQLQVQWEPPGSWPFPEIFSLKYWIRYKRQGAARFHRVGPIEATSFILRAVRPRARYYVVAQDLTDYGELSDWSLPATATMSLGK	Q14213	61
エリスロポエチン	APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVVDKAWSGLRSLLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR	P01588	62

10

20

30

40

50

G-CSF	ATPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSEC ATYKLCHEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQLQLAGCLS QLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLTLQLDVADFATT IWQQMEELEMAPALQPTQGAMPAFASAFQRARRAGGVLV ASHLQSFLEVSYRVLRLAQP	P09919	63
成長ホルモン	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQ KYSFLQNQPTSLCFSEIPTSNREETQQKSNELLRISLLL IQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEG IQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKN YGLLYCFCRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF	P01241	64
プロラクチン	LPICPGGAARCVTLDLFDRAVVLSHYIHNLSEMSEF DKRYTHGRGFITKAISCHTSSLATPEDKEQAQQMNQKD FLSLIVSILRSWNEPLYHLVTEVRGMQEAAPEAILSKAVEIE EQTKRLLEGMEILSVQVHPETKENEIYPVWSGLPSLQMA DEESRLSAYYNLLHCLRRDSHKIDNYLKLLKCRIHNNNC	P01236	65
オンコスタチンM	AAIGSCSKERYVLLGQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQQ LDVPKLREHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATL GCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARP ILGLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGAQPPTPTPAS DAFQRKLEGCRFLHGYYHRFMHSVGRVFSKGESPNSR RHSPHQALRKGVRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR	P13725	66
白血病抑制因子	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANAL FILYYTAQGEFPFPNNLDKLCGPNTDFPPFHANGTEKAK LVELYRIVVYLGTSLGNITRDQKILNPSALSLHSKLNATA DILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVDVTYGPDTSGKDVFQ KKKLGCGLLGKYKQIIAVLAQAF	P15018	67
IL-22	APISSHCRLLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDV RLIGEKLFHGVMSMERCYLMQVLFNFTLEEVLFQSDRF QPYMQUEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKD TVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI	Q9GZX6	68
IL-10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQ KDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGQALSEMIQFYLEEVMP QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRRCHRFPLCENK SKAVEQVKNAFNKLQEKGIFYKAMSEFDIFINYIEAYMTM KIRN	P22301	69

10

20

30

【 0 0 8 6 】

いくつかの態様において、第1または第2のペプチドの少なくとも一方は、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはその機能的部分である。いくつかの態様において、第1または第2のペプチドの他方は、タグまたは他のペプチド部分である。

【 0 0 8 7 】

いくつかの態様において、第1および第2のペプチドの両方が、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはその機能的部分である。いくつかの態様において、サイトカインもしくはケモカインは、単量体である。いくつかの態様において、サイトカインもしくはケモカインは、ホモ二量体またはヘテロ二量体であり、第1または第2のサイトカインは、ホモ二量体またはヘテロ二量体のサブユニットである。いくつかの態様において、第1および第2のペプチドは、同じサイトカインもしくはケモカインまたはその機能的部分であるか、あるいは同じサイトカインまたはケモカインの同じサブユニットである。いくつかの態様において、第1および第2のペプチドは、異なるサイトカインもしくはケモカインまたはその機能的部分であるか、あるいは同じまたは異なるサイトカインまたはケモカインの異なるサブユニットである。

【 0 0 8 8 】

いくつかの態様において、サイトカインまたはケモカインは、第1のペプチドが、サイトカインまたはケモカインの第1のサブユニットであって、第2のペプチドが、サイトカインまたはケモカインの第2のサブユニットである、ホモ二量体またはヘテロ二量体などの

40

50

多量体タンパク質である。いくつかの局面において、標的化部分を含有する連結領域は、ホモ二量体またはヘテロ二量体であるサイトカインまたはケモカインの第1および第2のサブユニットなどの第1および第2のサブユニットと接続している。

【 0 0 8 9 】

いくつかの態様において、サイトカインまたはケモカインは、インターロイキン-12 (IL-12) である。一般的に、IL-12は、ジスルフィド架橋によって共有結合で繋がったp35サブユニットとp40サブユニットを含有するヘテロ二量体サイトカインである。いくつかの態様において、IL-12免疫調節ポリペプチドの第1のサブユニットは、p35もしくはp40またはその機能的部分であり、第2のサブユニットは、p35およびp40の他方またはその機能的部分である。いくつかのそのような場合において、標的化部分を含有する連結領域は、IL-12のp35サブユニットとp40サブユニットを接続または連結する。いくつかの局面において、p35サブユニットは、SEQ ID NO:10に示される配列、またはSEQ ID NO:10と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有する配列を有する。いくつかの局面において、p40サブユニットは、SEQ ID NO:11に示される配列、またはSEQ ID NO:11と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有する配列を有する。

10

【 0 0 9 0 】

いくつかの態様において、サイトカインもしくはケモカインは、インターロイキン-23 (IL-23) である。一般的に、IL-23は、IL-12p40およびIL-23アルファサブユニットを含有するヘテロ二量体サイトカインである。いくつかの態様において、IL-23免疫調節ポリペプチドの第1のサブユニットは、IL-12p40もしくはIL-23アルファまたはその機能的部分であり、第2のサブユニットは、IL-12p40およびIL-23アルファの他方またはその機能的部分である。いくつかのそのような場合において、標的化部分を含有する連結領域は、IL-23のIL-12p40サブユニットとIL-23アルファサブユニットを接続または連結する。いくつかの局面において、IL-23アルファサブユニットは、SEQ ID NO:52に示される配列、またはSEQ ID NO:52と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有する配列を有する。いくつかの局面において、p40サブユニットは、SEQ ID NO:11に示される配列、またはSEQ ID NO:11と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有する配列を有する。

20

【 0 0 9 1 】

いくつかの態様において、サイトカインまたはケモカインは、インターロイキン-27 (IL-27) である。一般的に、IL-27は、IL-27アルファ (p28) およびIL-27ベータ (EBI3) サブユニットを含有するヘテロ二量体サイトカインである。いくつかの態様において、IL-27免疫調節ポリペプチドの第1のサブユニットは、p28もしくはEBI3またはその機能的部分であり、第2のサブユニットは、p28およびEBI3の他方またはその機能的部分である。いくつかのそのような場合において、標的化部分を含有する連結領域は、IL-27のp28サブユニットとEBI3サブユニットを接続または連結する。いくつかの局面において、p28サブユニットは、SEQ ID NO:60に示される配列、またはSEQ ID NO:60と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有する配列を有する。いくつかの局面において、EBI3サブユニットは、SEQ ID NO:61に示される配列、またはSEQ ID NO:61と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有する配列を有する。

30

【 0 0 9 2 】

いくつかの態様において、サイトカインまたはケモカインは、インターロイキン-35 (I

40

50

L-35)である。一般的に、IL-35は、ジスルフィド架橋によって共有結合で繋がったIL-12p35およびIL-27ベータ(EBI3)サブユニットを含有するヘテロ二量体サイトカインである。いくつかの態様において、IL-35免疫調節ポリペプチドの第1のサブユニットは、p35もしくはEBI3またはその機能的部分であり、第2のサブユニットは、p35およびEBI3の他方またはその機能的部分である。いくつかのそのような場合において、標的化部分を含有する連結領域は、IL-35のp35サブユニットとEBI3サブユニットを接続または連結する。いくつかの局面において、p35サブユニットは、SEQ ID NO:10に示される配列、またはSEQ ID NO:10と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有する配列を有する。いくつかの局面において、EBI3サブユニットは、SEQ ID NO:61に示される配列、またはSEQ ID NO:61と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有する配列を有する。

【0093】

いくつかの態様において、サイトカインまたはケモカインは、インターロイキン-15(IL-15)であるかまたはそれを含む。一般的に、IL-15はサイトカインであり、可溶性または膜結合型であり得る。いくつかの態様において、IL-15は単量体であり、他の態様において、IL-15はヘテロ二量体である。いくつかの態様において、IL-15は、IL-15Rと相互作用する。いくつかの態様において、IL-15免疫調節ポリペプチドの第1のサブユニットは、IL-15もしくはIL-15Rまたはその機能的部分であり、第2のサブユニットは、IL-15もしくはIL-15Rの他方またはその機能的部分である。いくつかのそのような場合において、標的化部分を含有する連結領域は、IL-15ペプチドまたはIL-15Rペプチドを接続または連結する。

【0094】

B. 連結領域

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドは、第1のペプチドと第2のペプチド(例えば、第1および第2のサイトカインもしくはケモカイン、またはサイトカインもしくはケモカインの第1および第2のサブユニット、またはその機能的部分)を接続する連結領域を含有する。いくつかの局面において、連結領域は、標的分子と結合する標的化ペプチドなどの標的化部分を含有する。いくつかの態様において、標的化部分は、第1および第2のペプチドのうちの少なくとも1つと、いくつかの場合において、第1および第2のペプチドの両方と、直接接続している。いくつかの態様において、標的化部分は、第1および第2のペプチドのうちの少なくとも1つと、いくつかの場合において、第1および第2のペプチドの両方と、間接的に接続(例えば、リンカーを介して間接的に接続)している。いくつかの場合において、連結領域は、標的化部分を第1および第2のペプチドの一方または両方と接続している1つまたは複数のポリペプチドリンカーをさらに含有する。いくつかの局面において、標的化部分は、第1および第2のペプチドを接続している2つのポリペプチドリンカーに隣接している。

【0095】

いくつかの局面において、免疫調節タンパク質は、第1のペプチド、標的化部分、および第2のペプチドを含む。いくつかの局面において、免疫調節タンパク質は、第1のペプチド、リンカー、標的化部分、および第2のペプチドを含む。いくつかの局面において、免疫調節タンパク質は、第1のペプチド、標的化部分、リンカー、および第2のペプチドを含む。いくつかの局面において、免疫調節タンパク質は、第1のペプチド、リンカー、標的化部分、リンカー、および第2のペプチドを含む。そのような態様のいずれかにおいて、第1および第2のペプチドは、位置を逆にすることができます。

【0096】

いくつかの態様において、連結領域は、最大長を超えない。いくつかの例において、連結領域の最大長は、アミノ酸400個以下、300個以下、250個以下、200個以下、150個以下、100個以下、50個以下、40個以下、30個以下、25個以下、20個以下、15個以下

10

20

30

40

50

、10個以下、もしくは5個以下、または概ねそれらの値以下である。いくつかの態様において、連結領域の長さは、アミノ酸400個を超える。いくつかの局面において、例えば標的化部分および任意で1または2つのリンカーを含む、連結領域の長さは、アミノ酸約5～400個、例えば、アミノ酸約10～400個、アミノ酸10～300個、アミノ酸10～200個、アミノ酸10～100個、アミノ酸10～50個、アミノ酸10～30個、アミノ酸10～20個、アミノ酸20～400個、アミノ酸20～300個、アミノ酸20～200個、アミノ酸20～100個、アミノ酸20～50個、アミノ酸20～30個、アミノ酸30～400個、アミノ酸30～300個、アミノ酸30～200個、アミノ酸30～100個、アミノ酸30～50個、アミノ酸50～400個、アミノ酸50～300個、アミノ酸50～200個、アミノ酸50～100個、アミノ酸100～400個、アミノ酸100～300個、アミノ酸100～200個、アミノ酸200～400個、またはアミノ酸200～300個である。いくつかの態様において、連結領域の長さは、アミノ酸約5～50個、例えば、アミノ酸5～40個、アミノ酸5～30個、アミノ酸5～20個、アミノ酸5～10個、アミノ酸10～50個、アミノ酸10～40個、アミノ酸10～30個、アミノ酸10～20個、アミノ酸20～50個、アミノ酸20～40個、アミノ酸20～30個、アミノ酸30～50個、アミノ酸30～40個、またはアミノ酸40～50個である。

【0097】

1. 標的化部分

いくつかの局面において、連結領域は、細胞表面の標的分子と結合する標的化ペプチドなどの標的化部分を含有する。いくつかの場合において、連結領域は、2つ以上の標的化部分を含有する。いくつかのそのような場合において、2つ以上の標的化部分は、同じまたは異なる場合がある。いくつかの場合において、標的化部分は、ヒトのものであるか、またはヒトタンパク質由来である。いくつかの態様において、標的化部分は、結合ペプチドである。いくつかの態様において、標的化部分は、抗体またはその抗原結合フラグメントである。

【0098】

いくつかの態様において、標的化部分は、タンパク質、糖タンパク質、または脂質である標的分子と結合する。いくつかの態様において、標的分子は、疾患または障害に関連する。いくつかの局面において、疾患または障害は、感染性疾患もしくは障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、または腫瘍もしくはがんである。いくつかの場合において、標的分子は、腫瘍に関連するまたは腫瘍上に存在する。いくつかの局面において、標的分子は腫瘍抗原である。いくつかの態様において、標的分子は、腫瘍細胞などの細胞の表面に発現している。

【0099】

いくつかの態様において、標的分子は、肝細胞増殖因子（HGF）、ヘパリン、VEGF、VEGFR-A、VEGFR2、VEGFR3、HER2、PD-1、テネイシン-C、CTLA-4、LAG3、PD-L1、EGFR、EPCAM、RANKL、NG2プロテオグリカン、CD20、CD52、CD19、CD3、CD30、IL-6、CD38、SLAMF7、GD2、CD13、CD274、CD279、CD40L、およびCD47より選択される。

【0100】

いくつかの局面において、標的化部分は、アミノ酸400個以下、300個以下、250個以下、200個以下、150個以下、100個以下、50個以下、40個以下、30個以下、25個以下、20個以下、15個以下、10個以下、または5個以下の長さを有する。いくつかの局面において、標的化部分の長さは、アミノ酸約5～400個、例えば、アミノ酸約10～400個、アミノ酸10～300個、アミノ酸10～200個、アミノ酸10～100個、アミノ酸10～50個、アミノ酸10～30個、アミノ酸10～20個、アミノ酸20～400個、アミノ酸20～300個、アミノ酸20～200個、アミノ酸20～100個、アミノ酸20～50個、アミノ酸20～30個、アミノ酸30～400個、アミノ酸30～300個、アミノ酸30～200個、アミノ酸30～100個、アミノ酸30～50個、アミノ酸50～400個、アミノ酸50～300個、アミノ酸50～200個、アミノ酸50～100個、アミノ酸100～400個、アミノ酸100～300個、アミノ酸100～200個、アミノ酸200～400個、またはアミノ酸200～300個である。いくつかの態

10

20

30

40

50

様において、連結領域の長さは、アミノ酸約5～50個、例えば、アミノ酸5～40個、アミノ酸5～30個、アミノ酸5～20個、アミノ酸5～10個、アミノ酸10～50個、アミノ酸10～40個、アミノ酸10～30個、アミノ酸10～20個、アミノ酸20～50個、アミノ酸20～40個、アミノ酸20～30個、アミノ酸30～50個、アミノ酸30～40個、またはアミノ酸40～50個である。

【0101】

いくつかの態様において、標的化部分は、いくつかの公知の方法のいずれかによって測定される少なくともある特定の親和性で、標的分子と結合する。いくつかの態様において、親和性は、解離定数 (K_D) または会合定数 (K_A) によって表される。いくつかの態様において、親和性は、EC50によって表される。いくつかの態様において、標的化部分は、標的分子と $10^5 M^{-1}$ 以上の親和性または K_A (すなわち、特定の結合相互作用の平衡会合定数、単位 $1/M$; 二分子相互作用を仮定してこの会合反応についての解離速度 [k_{off} または k_d] に対する結合速度 [k_{on} または k_a] の比に等しい) で結合 (例えば、特異的に結合) する。

10

【0102】

いくつかの態様において、標的化部分は、標的分子に対して $10^{-5} M$ 以下の K_D (すなわち、特定の結合相互作用の平衡解離定数、単位 M ; 二分子相互作用を仮定してこの会合反応についての結合速度 [k_{on} または k_a] に対する解離速度 [k_{off} または k_d] の比に等しい) の結合親和性を示す。例えば、平衡解離定数 K_D は、 $10^{-5} M$ もしくは約 $10^{-5} M \sim 10^{-15} M$ もしくは約 $10^{-15} M$ 、例えば、 $10^{-6} M$ もしくは約 $10^{-6} M \sim 10^{-12} M$ もしくは約 $10^{-12} M$ 、 $10^{-7} M$ もしくは約 $10^{-7} M \sim 10^{-11} M$ もしくは約 $10^{-11} M$ 、 $10^{-6} M$ もしくは約 $10^{-6} M \sim 10^{-8} M$ もしくは約 $10^{-8} M$ 、または $10^{-7} M$ もしくは約 $10^{-7} M \sim 10^{-8} M$ もしくは約 $10^{-8} M$ の範囲である。いくつかの態様において、標的分子に対する標的化部分の K_D は、 $100 nM$ 、 $50 nM$ 、 $40 nM$ 、 $30 nM$ 、 $25 nM$ 、 $20 nM$ 、 $19 nM$ 、 $18 nM$ 、 $17 nM$ 、 $16 nM$ 、 $15 nM$ 、 $14 nM$ 、 $13 nM$ 、 $12 nM$ 、 $11 nM$ 、 $10 nM$ 、 $9 nM$ 、 $8 nM$ 、 $7 nM$ 、 $6 nM$ 、 $5 nM$ 、 $4 nM$ 、 $3 nM$ 、 $2 nM$ 、 $1 nM$ 、または概ねそれらの値、またはそれらの値未満、または概ねそれらの値未満であり、例えば $1 nM$ または約 $1 nM$ と $15 nM$ または約 $15 nM$ との間、例えば $5 nM$ または約 $5 nM$ と $10 nM$ または約 $10 nM$ との間である。いくつかの態様において、標的分子への標的化部分の K_D は、 $1 nM$ 、 100 ピコモル濃度 (pM)、 $90 pM$ 、 $80 pM$ 、 $70 pM$ 、 $60 pM$ 、 $50 pM$ 、 $40 pM$ 、 $30 pM$ 、 $25 pM$ 、 $20 pM$ 、 $15 pM$ 、 $10 pM$ 、もしくは $1 pM$ 、または概ねそれらの値、またはそれらの値未満、または概ねそれらの値未満であり、例えば $10 pM$ または約 $10 pM$ と $100 pM$ または約 $100 pM$ との間、例えば $25 pM$ または約 $25 pM$ と $75 pM$ または約 $75 pM$ との間である。

20

【0103】

結合速度 (会合速度定数 ; k_{on} または k_a ; 単位 $1/M \cdot sec$ または $M^{-1} sec^{-1}$) および解離速度 (解離速度定数 ; k_{off} または k_d ; 単位 $1/s$ または sec^{-1}) は、当技術分野において公知のアッセイ方法のいずれか、例えば表面プラズモン共鳴法 (SPR、例えばBiacore装置を使用) を使用して決定することができる。いくつかの態様において、標的化部分は、サイトカインまたはケモカインがその受容体と結合するよりも高い親和性で標的分子と結合する。

30

【0104】

いくつかの態様において、標的化部分は、標的分子との結合に関して約 $0.5 \times 10^{-4} sec^{-1}$ 以下、約 $1 \times 10^{-4} sec^{-1}$ 以下、約 $2 \times 10^{-4} sec^{-1}$ 以下、約 $3 \times 10^{-4} sec^{-1}$ 以下、約 $4 \times 10^{-4} sec^{-1}$ 以下、約 $5 \times 10^{-4} sec^{-1}$ 以下、約 $1 \times 10^{-3} sec^{-1}$ 以下、約 $1.5 \times 10^{-3} sec^{-1}$ 以下、約 $2 \times 10^{-3} sec^{-1}$ 以下、約 $3 \times 10^{-3} sec^{-1}$ 以下、約 $4 \times 10^{-3} sec^{-1}$ 以下、約 $5 \times 10^{-3} sec^{-1}$ 以下、約 $1 \times 10^{-2} sec$ 以下、または約 $5 \times 10^{-1} sec^{-1}$ 以下の k_{off} 速度を示す。

40

【0105】

いくつかの態様において、標的化部分は、ペプチド結合モチーフであるかそれを含有する。いくつかの局面において、標的化部分は、肝細胞増殖因子 (HGF) 結合ペプチド (HGFBP)、ヘパリン結合ペプチド (HBP) (例えば、BMP4もしくはフィブロネクチ

50

ン)、VEGF結合ペプチド、VEGF-A結合ペプチド、VEGFR(例えば、VEGFR2もしくはVEGFR3)結合ペプチド、EPCAM結合ペプチド、HER2結合ペプチド、PD-1結合ペプチド、テネイシン-C結合ペプチド、CTLA-4結合ペプチド、LAG3結合ペプチド、PD-L1結合ペプチド、EGFR結合ペプチド、RANKL結合ペプチド、CD20結合ペプチド、CD52結合ペプチド、CD19結合ペプチド、CD3結合ペプチド、CD30結合ペプチド、IL-6結合ペプチド、CD38結合ペプチド、SLAMF7結合ペプチド、GD2結合ペプチド、CD274結合ペプチド、CD279結合ペプチド、CD40L結合ペプチド、CD47結合ペプチド、CD13結合ペプチド、NGRモチーフ、RGDモチーフ、またはNG2プロテオグリカン結合ペプチドであるか、またはそれらに由来する。いくつかの場合において、標的化部分は、HGF結合ペプチド(HGFBP)、HBP、またはEGFR結合ペプチド(EGFRBP)であるかまたはそれを含有する。いくつかの例において、ヘパリン結合ペプチド(HBP)は、フィブロネクチンもしくはBMP4に由来し、かつ/またはウシ由来である。そのような結合ペプチドの例は、公知であり、例えば、Tam et al. (2009) Journal of Molecular Biology, 385:79-90; Ahsan et al. (2014) Neoplasia, 16:105-14; Binetruy-Tournaire et al. (2000) EMBO J., 19:1525-1533; Vicari et al. (2011) J. Biol. Chem., 286:13612-25; Andersson et al. (2004) FEBS J., 271: 1219-1226; Abcam Cat. No. ab152112 (Cambridge, MA); Chen et al. (2015) BioMed Research International, Article ID 237969; 米国特許第8,188,220号を参照されたい。標的化部分は、また、選択された標的分子と結合するペプチドとして結合アッセイで同定されるペプチドができる。

【0106】

表2は、標的化部分ができるペプチド結合モチーフの非限定的な例を提供する。いくつかの態様において、標的化部分は、SEQ ID NO:13～16および27～28のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:13～16および27～28のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を示すアミノ酸配列であるかまたはそれを含む。

【0107】

(表2)ペプチド結合性標的化部分

名称	配列	SEQ ID NO.
ヘパリン結合ペプチド、BMP4	RKKNPNCRRH	13
ヘパリン結合ペプチド、フィブロネクチン	KNNQKSEPLIGRKKT	14
HGF 結合ペプチド	VWNWVCFRDVGCDWVL	15
EGFR 結合ペプチド(EGFRBP)	SVDNPHVC	16
EGFR 結合ペプチド	YHWYGYTPQNVI	108
EGFR 結合ペプチド	YRWYGYTPQNVI	109
VEGF 結合ペプチド	ATWLPPR	26
VEGFR 結合ペプチド	ITMQCGIHQGQHPKIRMICEMSF	27
VEGFR 結合ペプチド	ITMQIMRIKPHQGQHIGEMSF	118
VEGFR3 結合ペプチド	PCAIWF	110
VEGFR3 結合ペプチド	WVCSGG	111
ウシ由来ヘパリン結合ペプチド	WQPPRARI	28
NGR モチーフ (例えば、CD13結合ペプチド; 血管新生標的化ペプチド)	NGRN GRN GR	112
RGD モチーフ	RGDRGDRGD	113
NG2 プロテオグリカン結合ペプチド	TAASGVRS MH	114
NG2 プロテオグリカン結合ペプチド	LTL RWVGLMS	115
HER2 結合ペプチド	NKF NKGMRYWGALGGNGKRGIRGYM	116
EPCAM 結合ペプチド	YEVHTYYLD	117

10

20

30

40

50

【0108】

いくつかの局面において、標的化部分は、抗体または抗体フラグメントであるかまたはそれを含む。抗体の中には、記載されている標的化分子と結合することが公知の任意のものを含む、ヒト抗体が挙げられる。

【0109】

本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含み、インタクト抗体および機能性（抗原結合）抗体フラグメントを含み、フラグメント抗原結合（Fab）フラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメント、Fab' フラグメント、Fv フラグメント、組換え IgG (rIgG) フラグメント、抗原と特異的に結合することができる重鎖可変 (V_H) 領域、単鎖可変フラグメント (scFv) を含む単鎖抗体フラグメント、および單一ドメイン抗体（例えば、sdAb、sdFv、ナノボディー）フラグメントを含む。本用語は、細胞内抗体、ペプチボディー、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、およびヘテロコンジュゲート抗体、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体、ダイアボディー (diabody)、トリアボディー (triabody)、およびテトラボディー (tetrabody)、タンデム-ジ-scFv、タンデム-トリ-scFvなどの遺伝的に操作された、および／またはその他の方法で改変された形態の免疫グロブリンを包含する。特に述べない限り、用語「抗体」は、その機能性抗体フラグメントを包含すると理解されるべきである。本用語は、IgG およびそのサブクラス、IgM、IgE、IgA、ならびに IgD を含む任意のクラスまたはサブクラスの抗体を含む、インタクト抗体または完全長抗体も包含する。

10

【0110】

いくつかの態様において、抗体の重鎖および軽鎖は、完全長であることができる、または抗原結合部分 (Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv、もしくは単鎖Fvフラグメント (scFv)) であることができる。他の態様において、抗体重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、および IgE より選ばれ、特に、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、および IgG4、より詳細には IgG1 (例えばヒト IgG1) より選ばれる。別の態様において、抗体軽鎖定常領域は、例えばカッパまたはラムダ、特にカッパより選ばれる。

20

【0111】

提供される抗体の中には、抗体フラグメントが挙げられる。「抗体フラグメント」は、インタクト抗体が結合する抗原と結合する、インタクト抗体の一部を含む、インタクト抗体以外の分子を表す。抗体フラグメントの例には、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、 $F(ab')_2$ ；ダイアボディー；線状抗体；重鎖可変 (V_H) 領域、単鎖抗体分子、例えば scFv および 単一ドメイン V_H 単一抗体；ならびに抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が非限定的に含まれる。特定の態様において、抗体は、scFv などの、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む単鎖抗体フラグメントである。

30

【0112】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体フラグメントなどの抗体に関して使用される場合、抗体の抗原との結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを表す。ネイティブな抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれ V_H および V_L ）は、各ドメインが保存された4つのフレームワーク領域 (FR) および3つのCDRを含んで、一般的に類似の構造を有する。（例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照されたい。単一 V_H または V_L ドメインは、抗原結合特異性を付与するために十分であり得る。さらに、抗原と結合する抗体由来の V_H または V_L ドメインを使用して特定の抗原と結合する抗体を単離して、それぞれ相補的な V_L または V_H ドメインのライブラリーがスクリーニングされる場合がある。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991) を参照されたい。

40

【0113】

単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む抗体フラグメントである。ある特定の態様において、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である。

50

【 0 1 1 4 】

抗体フラグメントは、インタクト抗体のタンパク質分解消化および組換え宿主細胞による産生を非限定的に含む様々な技法によって製造することができる。いくつかの態様において、抗体は、合成リンカー（例えばペプチドリンカー）によって連結された2つ以上の抗体領域もしくは鎖を有する配置などの自然に存在しない配置、および／または天然のインタクト抗体の酵素消化によって產生されない場合がある配置を含むフラグメントなどの、組換え產生されたフラグメントである。いくつかの局面において、抗体フラグメントは、scFvである。

【 0 1 1 5 】

いくつかのそのような局面において、標的化部分は、単鎖フラグメントである抗体フラグメントであるかまたはそれを含む。いくつかの例において、抗体フラグメントは、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:22、またはSEQ ID NO:23に示されるリンカーなどの可動性リンカーによって連結された抗体可変領域を含む。いくつかの例では、抗体フラグメントは、scFvであるかまたはそれを含有する。したがって、いくつかの例において、標的化部分は、可変重（VH）鎖および可変軽（VL）鎖を含有する。いくつかの態様において、標的化部分は、VH鎖であるかまたはそれを含有するが、VL鎖を含有しない。いくつかのそのような局面において、標的化部分は、高親和性（例えば超高親和性）VH鎖であるかまたはそれを含有する。いくつかの態様において、標的化部分は、抗体の可変重（VH）鎖および／または可変軽（VL）鎖であるかまたはそれを含有する。

10

【 0 1 1 6 】

いくつかの態様において、抗体は、抗肝細胞増殖因子（HGF）抗体、抗ヘパリン抗体、および抗VEGF抗体、および抗VEGF-A抗体、抗VEGFR抗体、抗VEGFR2抗体、抗HER2抗体、抗PD-1抗体、抗テネイシン-C抗体、抗CTLA-4、抗LAG3抗体、抗PD-L1抗体、抗EGFR抗体、抗EPCAM抗体、抗RANKL抗体、および抗CD20抗体、抗CD52抗体、抗CD19抗体、抗CD3抗体、抗CD30抗体、抗IL-6抗体、抗CD38抗体、抗SLAMF7抗体、抗GD2抗体、抗CD274抗体、抗CD279抗体、抗CD40L抗体、および抗CD47-抗体、またはそれらの抗原結合フラグメントである。

20

【 0 1 1 7 】

いくつかのそのような場合において、抗体は、トラスツズマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、アテゾリズマブ、ベバシズマブ、パニツムマブ、セツキシマブ、ネシツムマブ、デノスマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、オビヌツズマブ、アレムツズマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、シルツキシマブ、イピリムマブ、ダラツムマブ、エロツズマブ、ジヌツキシマブ、もしくはカツマキソマブのVHおよび／もしくはVL鎖、またはそれらの抗原結合フラグメントであるか、あるいはそれらに由来する。

30

【 0 1 1 8 】

いくつかの例において、標的化部分は、抗EPCAM抗体であるかまたはそれを含有する。いくつかの態様において、標的化部分は、SEQ ID NO:17に示される配列、または当該配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有する配列を含有し、かつ標的分子と結合する。

40

【 0 1 1 9 】**2. ポリペプチドリンカー**

いくつかの態様において、連結領域は、標的化部分を第1または第2のペプチド（例えば、サイトカインまたはケモカインの第1または第2のサブユニット）と繋いでいる少なくとも1つのポリペプチドリンカーをさらに含有する。いくつかの場合において、連結領域は、2つのポリペプチドリンカーを含有する。いくつかのそのような場合において、ポリペプチドリンカーのうちの一方は、第1のペプチド（例えば、サイトカインまたはケモカインの第1のサブユニット）を標的化部分と繋ぎ、他方のポリペプチドリンカーは、第2のペプチド（例えば、サイトカインまたはケモカインの第2のサブユニット）を標的化部分と

50

繋いでいる。したがって、いくつかの場合において、標的化部分は、一緒になって連結領域を形成する第1のポリペプチドリンカーと第2のポリペプチドリンカーとの間に含有されている。

【 0 1 2 0 】

いくつかの態様において、ポリペプチドリンカーは、アミノ酸を約2～約20個、例えば約5～約15個、例えば15個または約15個含有する。いくつかの場合において、ポリペプチドリンカーは、配列GGGGS(n) [配列中、nは、1以上である]を有する。例えば、n=1であるいくつかの例において、ポリペプチドリンカーは、SEQ ID NO:7に示される配列を有する。n=2であるいくつかの場合において、ポリペプチドリンカーは、SEQ ID NO:8に示される配列を有する。n=3であるいくつかの局面において、ポリペプチドリンカーは、SEQ ID NO:9に示される配列を有する。

10

【 0 1 2 1 】

C. 例示的な免疫調節ポリペプチド

いくつかの局面において、免疫調節ポリペプチドは、IL-12ポリペプチドであるかまたはそれを含有する。いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドは、IL-12のp35サブユニット、IL-12のp40サブユニット、およびp35サブユニットとp40サブユニットを接続している連結領域を含有する。いくつかのそのような態様において、連結領域は、標的分子と結合する標的化部分を含有する。

【 0 1 2 2 】

いくつかの例において、連結領域は、標的化部分をp35サブユニットまたはp40サブユニットと繋いでいる少なくとも1つのポリペプチドリンカーをさらに含有する。例えば、いくつかの局面において、p40サブユニットは、標的化部分の第1の端部にも結び付いた第1のポリペプチドリンカーと接続されており、標的化部分の第2の端部は、p35サブユニットの一端にも結び付いた第2のポリペプチドリンカーと接続されている。

20

【 0 1 2 3 】

いくつかの態様において、IL-12免疫調節ポリペプチドは、連結領域を含まない組換えIL-12と比較して増大した（高い）、IL-12Rを介して刺激する活性を示す。いくつかの局面において、免疫調節ポリペプチドは、標的分子を発現していない細胞に対する結合性と比較して増大した（高い）、標的分子を発現している標的細胞に対する結合性を示す。いくつかの態様において、IL-12免疫調節ポリペプチドまたはそのようなペプチドを含有する細胞は、連結領域を含有しない組換えIL-12と比較して増大または減少した（高いまたは低い）、IL-12Rを介して刺激する活性を示す。

30

【 0 1 2 4 】

いくつかの態様において、IL-12免疫調節ポリペプチドは、IL-12Rに対する結合親和性の増大を示す。いくつかの態様において、IL-12免疫調節ポリペプチドは、IL-12Rに対する結合親和性の減少を示す。いくつかの例では、IL-12免疫調節ポリペプチドとIL-12Rとの平衡解離定数K_Dは、10⁻⁵Mもしくは約10⁻⁵M～10⁻¹⁵Mもしくは約10⁻¹⁵M、例えば、10⁻⁶Mもしくは約10⁻⁶M～10⁻¹²Mもしくは約10⁻¹²M、10⁻⁷Mもしくは約10⁻⁷M～10⁻¹¹Mもしくは約10⁻¹¹M、10⁻⁶Mもしくは約10⁻⁶M～10⁻⁸Mもしくは約10⁻⁸M、または10⁻⁷Mもしくは約10⁻⁷M～10⁻⁸Mもしくは約10⁻⁸Mである。いくつかの態様において、IL-12免疫調節ポリペプチドとIL-12RとのK_Dは、100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19nM、18nM、17nM、16nM、15nM、14nM、13nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、または概ねそれらの値、またはそれらの値未満、または概ねそれらの値未満であり、例えば1nMまたは約1nMと15nMまたは約15nMとの間、例えば5nMまたは約5nMと10nMまたは約10nMとの間である。いくつかの態様において、IL-12免疫調節ポリペプチドとIL-12RとのK_Dは、1nM、100ピコモル濃度(pM)、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM、もしくは1pM、または概ねそれらの値、またはそれらの値未満、または概ねそれらの値未満であり、例えば10pMまたは約10pMと100pMまたは約100pMとの間、例えば25pMまたは約25pMと75pMまたは約75pMとの間であ

40

50

る。

【 0 1 2 5 】

いくつかの局面において、増大した活性および / または結合性は、サブユニット間にポリペプチドリンクを含有するが標的化部分を含有しない基準免疫調節ポリペプチドによつてもたらされるものよりも大きい。いくつかのそのような局面において、増大は、1.2倍より大きい、1.5倍より大きい、2.0倍より大きい、3.0倍より大きい、4.0倍より大きい、5.0倍より大きい、または10.0倍より大きい増大である。

【 0 1 2 6 】

いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:10と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp35サブユニット；SEQ ID NO:13に示される標的化部分（HBP BMP4）を含む連結領域；およびSEQ ID NO:11に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:11と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp40サブユニットを含有する。構成成分は、明記された順番またはその逆の順番であることができる。いくつかの態様において、連結領域は、標的化部分のそれぞれの側に、それぞれ独立してSEQ ID NO:29に示される（例えば、SEQ ID NO:7に示される）リンクが位置する、標的化部分を含有する。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:2と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【 0 1 2 7 】

いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:10と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp35サブユニット；SEQ ID NO:14に示される標的化部分（HBP FBN）を含む連結領域；およびSEQ ID NO:11に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:11と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp40サブユニットを含有する。構成成分は、明記された順番またはその逆の順番であることができる。いくつかの態様において、連結領域は、標的化部分のそれぞれの側に、それぞれ独立してSEQ ID NO:29に示される（例えば、SEQ ID NO:7に示される）リンクが位置する、標的化部分を含有する。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:3に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:3と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【 0 1 2 8 】

いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:10と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp35サブユニット；SEQ ID NO:15に示される標的化部分（HGF結合ペプチド）を含む連結領域；およびSEQ ID NO:11に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:11と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp40サブユニットを含有する。構成成分は、明記された順番またはその逆の順番であることができる。いくつかの態様において、連結領域は、標的化部分のそれぞれの側に、それぞれ独立してSEQ ID NO:29に示される（例えば、SEQ ID NO:7に示されるリンク）が位置する、標的化部分を含有する。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:4と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%

30

40

50

%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0129】

いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:10と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp35サブユニット；SEQ ID NO:16に示される標的化部分（EGFRBP）を含む連結領域；およびSEQ ID NO:11に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:11と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp40サブユニットを含有する。構成成分は、明記された順番またはその逆の順番であることができる。いくつかの態様において、連結領域は、標的化部分のそれぞれの側に、それぞれ独立してSEQ ID NO:29に示される（例えば、SEQ ID NO:7に示される）リンカーが位置する、標的化部分を含有する。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:5に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:5と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0130】

いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:10と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp35サブユニット；SEQ ID NO:25に示されるVH鎖および／またはSQE ID NO:24に示されるVL鎖を含む抗EPCAM抗体である標的化部分、例えばSEQ ID NO:17に示されるscFv、またはSEQ ID NO:17、24、および25のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む連結領域；ならびにSEQ ID NO:11に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:11と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を有するp40サブユニットを含有する。構成成分は、明記された順番またはその逆の順番であることができる。いくつかの態様において、連結領域は、標的化部分のそれぞれの側に、それぞれ独立してSEQ ID NO:29に示される（例えば、SEQ ID NO:7に示される）リンカーが位置する、標的化部分を含有する。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:6に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:6と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0131】

II. 組換え受容体

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドは、組換え受容体を発現している操作された細胞と併用され、かつ／またはその細胞においてもしくはその細胞から発現される。

【0132】

したがって、操作された受容体または組換え受容体、およびそのような受容体を発現している細胞が提供される。いくつかの態様において、操作された受容体または組換え受容体は、リガンド結合ドメインまたはその結合フラグメントを含有するものを含むキメラ受容体、例えば機能性非TCR抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）を含み、T細胞受容体（TCR）、例えばトランスジェニックTCR、およびその構成成分も含む。CARなどのキメラ受容体は、一般的に1つまたは複数の細胞内シグナル伝達構成成分と、いくつかの局面においてはリンカーおよび／または膜貫通ドメインを介して繋がった細胞外抗原（またはリガンド）結合ドメインを含む。

【0133】

特定の態様において、組換え受容体（例えば、キメラ受容体）は細胞内シグナル伝達ド

10

20

30

40

50

メインを含有し、細胞内シグナル伝達ドメインには、活性化細胞質シグナル伝達ドメイン（互換的に細胞内シグナル伝達領域とも呼ばれる）、例えば、T細胞において一次活性化シグナルを誘導することができる活性化細胞質（細胞内）ドメイン、例えば、T細胞受容体（TCR）構成成分の細胞質シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3-ゼータ（CD3 ζ ）鎖のゼータ鎖の細胞質シグナル伝達ドメインまたはその機能性変異体もしくはそのシグナル伝達部分）が含まれ、かつ／または免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）が含まれる。

【0134】

いくつかの態様において、キメラ受容体は、リガンド（例えば抗原）抗原と特異的に結合する細胞外リガンド結合ドメインをさらに含有する。いくつかの態様において、キメラ受容体は、抗原と特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインを含有するCARである。いくつかの態様において、抗原などのリガンドは、細胞表面に発現するタンパク質である。いくつかの態様において、CARはTCR様CARであり、抗原は、プロセシングされたペプチド抗原、例えば、TCRのように細胞表面で主要組織適合複合体（MHC）分子との関連で認識される細胞内タンパク質のペプチド抗原である。

10

【0135】

CARおよび組換えTCRを含む例示的な組換え受容体、ならびに受容体を細胞内に操作および導入するための方法には、例えば、国際公開公報第200014257号、同第2013126726号、同第2012/129514号、同第2014031687号、同第2013/166321号、同第2013/071154号、同第2013/123061号、米国特許出願公開第2002131960号、同第2013287748号、同第20130149337号、米国特許第6,451,995号、同第7,446,190号、同第8,252,592号、同第8,339,645号、同第8,398,282号、同第7,446,179号、同第6,410,319号、同第7,070,995号、同第7,265,209号、同第7,354,762号、同第7,446,191号、同第8,324,353号、および同第8,479,118、および欧州特許出願EP2537416に記載された方法、ならびに／またはSadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75によって記載された方法が含まれる。いくつかの態様において、遺伝的に操作された抗原受容体には、米国特許第7,446,190号に記載されたCARおよび国際公開公報第2014055668A1号に記載された抗原受容体が含まれる。いくつかの態様において、構築および免疫細胞への導入または移入のための類似の方法を、提供されたキメラ受容体のために採用することができる。

20

【0136】

いくつかの態様において、キメラ受容体（例えばCAR）などの組換え受容体は、抗原（またはリガンド）と結合する（例えば、特異的に結合する）リガンド結合ドメインを含む。キメラ受容体によって標的化される抗原の中には、養子細胞療法により標的化される疾患、状態、または細胞型に関連して発現される抗原が挙げられる。疾患および状態の中には、血液がん、免疫系のがん、例えばリンパ腫、白血病、および／または骨髄腫、例えばB、T、および骨髓性白血病、リンパ腫、ならびに多発性骨髄腫を含むがんおよび腫瘍を含む、増殖性、腫瘍性、および悪性の疾患および障害が挙げられる。

30

【0137】

いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は、ポリペプチドである。いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は、糖質または他の分子である。いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は、正常または非標的化細胞または組織と比較して、疾患または状態の細胞（例えば、腫瘍または病原性細胞）において選択的に発現または過剰発現する。他の態様において、抗原は、正常細胞上に発現し、かつ／または操作された細胞上に発現する。

40

【0138】

いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は、腫瘍抗原またはがんマーカーである。

【0139】

50

ある特定の態様において、抗原は、 ν 6インテグリン (avb6インテグリン)、B細胞成熟抗原 (BCMA)、B7-H6、炭酸脱水酵素9 (CA9、CAIXまたはG250としても公知)、がん-精巣抗原、がん / 精巣抗原1B (CTAG、NY-ESO-1およびLAG-2としても公知)、がん胎児抗原 (CEA)、サイクリン、サイクリンA2、C-Cモチーフケモカインリガンド1 (CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7 / 8、CD123、CD138、CD171、上皮増殖因子タンパク質 (EGFR)、切断型上皮増殖因子タンパク質 (tEGFR)、III型上皮増殖因子受容体変異 (EGFRvIII)、上皮糖タンパク質2 (EPG-2)、上皮糖タンパク質40 (EPG-40)、エフリンB2、エフリン受容体A2 (EPHa2)、エストロゲン受容体、Fc受容体様5 (FCRL5；Fc受容体相同体5またはFCRH5としても公知)、胎児型アセチルコリン受容体 (胎児AchR)、葉酸結合タンパク質 (FBP)、葉酸受容体アルファ、胎児型アセチルコリン受容体、ガングリオシドGD2、O-アセチル化GD2 (OGD2)、ガングリオシドGD3、糖タンパク質100 (gp100)、Her2 / neu (受容体型チロシンキナーゼerbB2)、Her3 (erb-B3)、Her4 (erb-B4)、erbB二量体、ヒト高分子量-メラノーマ関連抗原 (HMW-MAA)、B型肝炎表面抗原、ヒト白血球抗原A1 (HLA-A1)、ヒト白血球抗原A2 (HLA-A2)、IL-22受容体アルファ (IL-22Ra)、IL-13受容体アルファ2 (IL-13Ra2)、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (kdr)、カッパ軽鎖、L1細胞接着分子 (L1CAM)、L1-CAMのCE7エピトープ、ロイシンリッチリピート含有8ファミリーメンバーA (LRRC8A)、ルイスY、メラノーマ関連抗原 (MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、メソセリン、c-Met、マウスサイトメガロウイルス (CMV)、ムチン1 (MUC1)、MUC16、ナチュラルキラーグループ2メンバー-D (NKG2D) リガンド、メランA (MART-1)、神経細胞接着分子 (NCAM)、腫瘍胎児抗原、メラノーマ優先発現抗原 (PRAME)、プロゲステロン受容体、前立腺特異抗原、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異膜抗原 (PSMA)、受容体型チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (ROR1)、サバイシン、栄養膜糖タンパク質 (TPBG、5T4としても公知)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG72)、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR)、血管内皮増殖因子受容体2 (VEGFR2)、ウィルムス腫瘍1 (WT-1)、病原体特異抗原、もしくはユニバーサルタグ関連抗原、および / またはビオチン化分子、および / またはHIV、HCV、HBVもしくは他の病原体によって発現される分子である。いくつかの態様において、受容体によって標的化される抗原には、いくつかの公知のB細胞マーカーのうちのいずれかなどのB細胞悪性腫瘍に関連する抗原が含まれる。いくつかの態様において、受容体によって標的化される抗原は、CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Igカッパ、Igラムダ、CD79a、CD79b、またはCD30である。

【0140】

いくつかの態様において、抗原は、病原体特異抗原である。いくつかの態様において、抗原は、ウイルス抗原 (例えば、HIV、HCV、HBV等に由来するウイルス抗原)、細菌抗原、および / または寄生虫抗原である。

【0141】

A. リガンド結合ドメイン

いくつかの態様において、組換え受容体 (例えば、抗原受容体) は、リガンド結合ドメイン (例えば、抗原結合ドメイン) を含有する。いくつかの態様において、組換え受容体は、キメラ抗原受容体 (CAR) である。

【0142】

いくつかの態様において、CARは、養子療法によって標的化される特定の細胞型において発現する抗原 (例えば、がんマーカー)、および / または減衰応答を誘導することを意図する抗原 (例えば、正常もしくは非罹患細胞型において発現する抗原) などの、特定の抗原 (またはマーカーもしくはリガンド) に対する特異性を有するように構築される。したがって、CARは、典型的にはその細胞外部分に1つまたは複数の抗原結合分子、例えば、1つもしくは複数の抗原結合フラグメント、ドメイン、もしくは部分、または1つもしくは複数の抗体可変ドメイン、および / または抗体分子を含む。いくつかの態様において、CARは、モノクローナル抗体 (mAb) の可変重 (VH) 鎮および可変軽 (VL) 鎮由来の单

10

20

30

40

50

鎖抗体フラグメント (scFv) などの抗体分子の1つまたは複数の抗原結合部分を含む。

【0143】

本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、それには、インタクト抗体を含むポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびにフラグメント抗原結合 (Fab) フラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメント、Fab' フラグメント、Fv フラグメント、組換え IgG (rIgG) フラグメントを含む機能性 (抗原結合) 抗体フラグメント、抗原と特異的に結合することができる重鎖可変 (V_H) 領域、単鎖可変フラグメント (scFv) を含む単鎖抗体フラグメント、ならびに單一ドメイン抗体 (例えば、sdAb、sdFv、ナノボディー) フラグメントが含まれる。本用語は、遺伝的に操作されたおよび / またはその他の方法で改変された形態の免疫グロブリン、例えば細胞内抗体、ペプチボディー、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、およびヘテロコンジュゲート抗体、多重特異性、例えば二重特異性抗体、ダイアボディー、トリニアボディー、およびテトラボディー、タンデム-ジ-scFv、タンデム-トリ-scFv を包含する。特に述べない限り、用語「抗体」は、その機能性抗体フラグメントを包含すると理解されるべきである。本用語は、IgG およびそのサブクラス、IgM、IgE、IgA、ならびに IgD を含む任意のクラスまたはサブクラスの抗体を含む、インタクト抗体または完全長抗体も包含する。10

【0144】

いくつかの態様において、抗原結合タンパク質、抗体、およびその抗原結合フラグメントは、完全長抗体の抗原を特異的に認識する。いくつかの態様において、抗体の重鎖および軽鎖は、完全長であることができる、または抗原結合部分 (Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv もしくは単鎖 Fv フラグメント (scFv)) であることができる。他の態様において、抗体重鎖定常領域は、例えば IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、および IgE より選ばれ、特に、例えば IgG1、IgG2、IgG3、および IgG4、より詳細には IgG1 (例えば、ヒト IgG1) より選ばれる。別の態様において、抗体軽鎖定常領域は、例えばカッパまたはラムダ、特にカッパより選ばれる。20

【0145】

提供される抗体の中には、抗体フラグメントが挙げられる。「抗体フラグメント」は、インタクト抗体が結合する抗原と結合するインタクト抗体部分を含む、インタクト抗体以外の分子を表す。抗体フラグメントの例には、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、 $F(ab')_2$ ；ダイアボディー；線状抗体；重鎖可変 (V_H) 領域、単鎖抗体分子、例えば scFv および單一ドメイン V_H 単一抗体；ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が非限定的に含まれる。特定の態様において、抗体は、scFv などの、重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む単鎖抗体フラグメントである。30

【0146】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗原への抗体の結合に関する抗体重鎖または軽鎖のドメインを表す。ネイティブな抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン (それぞれ V_H および V_L) は、各ドメインが4つの保存されたフレームワーク領域 (FR) および3つのCDRを含む類似の構造を一般的に有する。例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照されたい。単一の V_H または V_L ドメインは、抗原結合特異性を付与するために十分であり得る。さらに、抗原と結合する抗体由来の V_H または V_L ドメインを使用して特定の抗原と結合する抗体を単離して、それぞれ相補的 V_L または V_H ドメインのライブラリーがスクリーニングされる場合がある。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991) を参照されたい。40

【0147】

單一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む抗体フラグメントである。ある特定の態様において、單一ドメイン抗体は、ヒト單一ドメイン抗体である。いくつかの態様において、CARは、本明細書記載または当技術分野において公知の標的抗原のいずれかなどの、腫瘍細胞またはがん細胞などの標的化される細胞または疾患のがんマーカーまたは細胞表面抗原などの抗原50

と特異的に結合する抗体重鎖ドメインを含む。

【0148】

抗体フラグメントは、インタクト抗体のタンパク質分解消化および組換え宿主細胞による産生を非限定的に含む様々な技法によって製造することができる。いくつかの態様において、抗体は、合成リンカー、例えばペプチドリンカーによって連結された2つ以上の抗体領域もしくは鎖を有する配置などの自然に存在しない配置、および／または天然インタクト抗体の酵素消化によって産生されない場合がある配置を含むフラグメントなどの、組換え産生されたフラグメントである。いくつかの態様において、抗体フラグメントは、scFvである。

【0149】

「ヒト化」抗体は、全てまたは実質的に全てのCDRアミノ酸残基が非ヒトCDR由来であり、全てまたは実質的に全てのFRアミノ酸残基がヒトFR由来である抗体である。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含む場合がある。非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、典型的にはヒトへの免疫原性を低下させるためにヒト化を受けた一方で、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保持している、非ヒト抗体の変異体を表す。いくつかの態様において、例えば抗体特異性または親和性を回復または改善するために、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基が、非ヒト抗体（例えばCDR残基が由来する抗体）からの対応する残基により置換される。

【0150】

いくつかの態様において、CARは、細胞表面に発現しているインタクト抗原などの抗原を特異的に認識する抗体または抗原結合フラグメント（例えばscFv）を含有する。

【0151】

いくつかの態様において、CARは、細胞表面にMHC-ペプチド複合体として提示される腫瘍関連抗原などの細胞内抗原を特異的に認識する、TCR様抗体、例えば抗体または抗原結合フラグメント（例えばscFv）を含有する。いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体を認識する抗体またはその抗原結合部分は、抗原受容体などの組換え受容体の一部として細胞上に発現することができる。抗原受容体の中には、キメラ抗原受容体（CAR）などの機能性非TCR抗原受容体が挙げられる。一般的に、ペプチド-MHC複合体に対してTCR様特異性を示す抗体または抗原結合フラグメントを含有するCARは、TCR様CARと呼ばれる場合もある。

【0152】

「主要組織適合複合体」（MHC）への言及は、いくつかの場合において、細胞機構によってプロセシングされるペプチド抗原を含む、ポリペプチドのペプチド抗原と複合体を形成することができる多形性ペプチド結合部位または結合溝を含有するタンパク質、一般的に糖タンパク質を表す。いくつかの場合において、MHC分子は、TCRまたはTCR様抗体などのT細胞上の抗原受容体によって認識可能なコンフォメーションでの抗原の提示のために、ペプチドとの複合体、すなわちMHC-ペプチド複合体などとして細胞表面にディスプレイされるまたは発現することができる。一般的に、MHCクラスI分子は、膜貫通鎖（いくつかの場合において3つのドメインを有する）および非共有結合的会合2ミクロログロブリンを有するヘテロ二量体である。一般的に、MHCクラスII分子は、どちらも典型的には膜を貫通する2つの膜貫通糖タンパク質、およびから構成される。MHC分子は、抗原結合部位またはペプチド結合部位および適切な抗原受容体による認識に必要な配列を含有するMHCの有効部分を含むことができる。いくつかの態様において、MHCクラスI分子は、ペプチドをサイトソルから出発して細胞表面に送達し、細胞表面でMHC-ペプチド複合体は、一般的にCD8⁺ T細胞、いくつかの場合においてCD4⁺ T細胞などのT細胞によって認識される。いくつかの態様において、MHCクラスII分子は、ペプチドを小胞システムから出発して細胞表面に送達し、細胞表面でそれらの分子は、典型的にはCD4⁺ T細胞によって認識される。一般的に、MHC分子は、マウスにおいてH-2およびヒトにおいてヒト白血球抗原（HLA）と集合的に名付けられる連鎖遺伝子座群によってコードされる。したがって、典型的には、ヒトMHCは、ヒト白血球抗原（HLA）とも呼ぶことができる。

10

20

30

40

50

【0153】

用語「MHC-ペプチド複合体」もしくは「ペプチド-MHC複合体」またはその変形は、一般的に、MHC分子の結合溝または裂隙（cleft）におけるペプチドの非共有結合的相互作用などによるペプチド抗原とMHC分子との複合体または会合を表す。いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体は、細胞表面に存在するまたはディスプレイされる。いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体は、TCR、TCR様CARまたはその抗原結合部分などの抗原受容体によって特異的に認識されることができる。

【0154】

いくつかの態様において、ポリペプチドのペプチド抗原またはエピトープなどのペプチドは、抗原受容体による認識などのためにMHC分子と会合することができる。一般的に、ペプチドは、ポリペプチドまたはタンパク質などの、より長い生体分子のフラグメントに由来するまたはそれに基づく。いくつかの態様において、ペプチドは、典型的には約8～約24アミノ酸長である。いくつかの態様において、ペプチドは、MHCクラスII複合体での認識のために約9～22アミノ酸長を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、MHCクラスI複合体での認識のために約8～13アミノ酸長を有する。いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体などのMHC分子の状況でペプチドが認識されると、TCRまたはTCR様CARなどの抗原受容体は、T細胞増殖、サイトカイン産生、細胞傷害性T細胞応答または他の応答などのT細胞応答を誘導する、T細胞への活性化シグナルを產生またはトリガーする。

10

【0155】

いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体と特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、特異的MHC-ペプチド複合体を含有する免疫原の有効量を宿主に免疫処置することによって產生させることができる。いくつかの場合において、MHC-ペプチド複合体のペプチドは、腫瘍抗原、例えばユニバーサル腫瘍抗原、骨髄腫抗原または下記のような他の抗原などの、MHCと結合することができる抗原のエピトープである。いくつかの態様において、次に、免疫原の有効量が、免疫応答を誘発するために宿主に投与され、その際、免疫原は、MHC分子の結合溝におけるペプチドの三次元提示に対して免疫応答を誘発するために十分な時間、その三次元形態を保持する。次に、宿主から収集した血清がアッセイされ、MHC分子の結合溝におけるペプチドの三次元提示を認識する所望の抗体が產生されているかが判定される。いくつかの態様において、產生された抗体を評価して、抗体がMHC-ペプチド複合体を、MHC分子単独、関心対象のペプチド単独、およびMHCと無関係のペプチドとの複合体から識別することができるかを確認することができる。次に、所望の抗体を単離することができる。

20

【0156】

いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体と特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、ファージ抗体ライブラリーなどの抗体ライブラリーディスプレイ法を採用することによって產生させることができる。いくつかの態様において、例えば、ライブラリーのメンバーが1つまたは複数のCDRの1つまたは複数の残基で変異されている、変異型Fab、scFVまたは他の抗体形態のファージディスプレイライブラリーを生成させることができる。そのような方法の例は、当技術分野において公知である（例えば米国特許出願公開第20020150914号、同第2014/0294841号；およびCohen CJ. et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332を参照されたい）。

30

【0157】**1. T細胞受容体（TCR）**

いくつかの態様において、組換え受容体は、組換えT細胞受容体（TCR）および/または天然のT細胞からクローニングされたTCRを含む。

40

【0158】

いくつかの態様において、T細胞受容体（TCR）は、分子が、MHC受容体と結合した抗原ペプチドと特異的に結合することができるよう、可変 および 鎖（それぞれTCR およびTCR としても公知）もしくは可変 および 鎖（それぞれTCR およびTCR と

50

しても公知)、またはその機能性フラグメントを含有する。いくつかの態様において、TCRは、¹⁰ 型である。典型的には、¹ および² 型で存在するTCRは、一般的に構造が類似しているが、それらを発現しているT細胞は、別個の解剖学的位置または機能を有し得る。TCRは、細胞表面または可溶性形態で見出すことができる。一般的に、TCRは、主要組織適合複合体(MHC)分子と結合した抗原を認識することを一般的に担う、T細胞(またはTリンパ球)表面に見出される。いくつかの態様において、TCRは、定常ドメイン、膜貫通ドメインおよび/または短鎖細胞質尾部も含有することができる(例えば、Jane way et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997を参照されたい)。例えば、いくつかの態様において、TCRの各鎖は、1つのN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、およびC末端に短鎖細胞質尾部を有することができる。いくつかの態様において、TCRは、シグナル伝達の媒介に関するCD3複合体のインバリアントタンパク質と会合している。

【0159】

特に述べない限り、用語「TCR」は、その機能性TCRフラグメントを包含すると理解されるべきである。本用語は、²⁰ 形態または¹ 形態のTCRを含む、インタクトTCRまたは完全長TCRも包含する。したがって、本明細書のために、TCRへの言及は、MHC分子において結合した特異的抗原性ペプチド、すなわちMHC-ペプチド複合体と結合するTCRの抗原結合部分などの任意のTCRまたは機能性フラグメントを含む。互換的に使用できるTCRの「抗原結合部分」または抗原結合フラグメントは、TCRの構造ドメインの一部を含有するが、完全TCRが結合する抗原(例えば、MHC-ペプチド複合体)と結合する分子を表す。いくつかの場合において、抗原結合部分は、一般的に各鎖が3つの相補性決定領域を含有するような、特異的MHC-ペプチド複合体との結合のための結合部位を形成するために十分な、TCRの可変鎖および可変鎖などのTCRの可変ドメインを含有する。

【0160】

いくつかの態様において、TCR鎖の可変ドメインは、会合してループまたは免疫グロブリンと類似の相補性決定領域(CDR)を形成し、それが、抗原認識を付与し、TCR分子の結合部位を形成することによってペプチド特異性を決定し、ペプチド特異性を決定する。典型的には、免疫グロブリンのように、CDRは、フレームワーク領域(FR)により分離されている(例えば、Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988を参照されたく、Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003も参照されたい)。いくつかの態様において、CDR3が、プロセシングされた抗原の認識を担う主要CDRであるが、アルファ鎖のCDR1は、抗原ペプチドのN末端部と相互作用し、一方でベータ鎖のCDR1は、ペプチドのC末端部と相互作用することも示されている。CDR2は、MHC分子を認識すると考えられる。いくつかの態様において、鎖の可変領域は、さらなる超可変(HV4)領域を含有することができる。

【0161】

いくつかの態様において、TCR鎖は、定常ドメインを含有する。例えば、免疫グロブリンのように、TCR鎖(例えば¹鎖、²鎖)の細胞外部部分は、2つの免疫グロブリンドメイン、N末端の可変ドメイン(例えば¹Vまたは²V;典型的にはKabatの付番、Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.に基づくアミノ酸1~116番)、および細胞膜に隣接する1つの定常ドメイン(例えば¹鎖定常ドメインまたは²C鎖、典型的にはKabatに基づくアミノ酸117~259番、²鎖定常ドメインまたは¹C鎖、典型的にはKabatに基づくアミノ酸117~295番)を含有することができる。例えば、いくつかの場合において、2つの鎖によって形成されるTCRの細胞外部部分は、2つの膜近位定常ドメイン、およびCDRを含有する2つの膜遠位可変ドメインを含有する。TCRドメインの定常ドメインは、システイン残基がジスルフィド結合を形成して2つの鎖の間に繋がりを作る短鎖接続配列を含む。いくつかの態様において、TCRは、TCRが定常ドメイン中に2つのジスルフィド結合を含有するように²⁰鎖および¹鎖のそれぞれ

に追加のシステイン残基を有し得る。

【 0 1 6 2 】

いくつかの態様において、TCR鎖は、膜貫通ドメインを含有することができる。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、正に荷電している。いくつかの場合において、TCR鎖は、細胞質尾部を含有する。いくつかの場合において、構造は、TCRをCD3のような他の分子と会合させる。例えば、膜貫通領域を有する定常ドメインを含有するTCRは、細胞膜にタンパク質を繋留させ、CD3シグナル伝達装置または複合体のインバリアントサブユニットと会合することができる。

【 0 1 6 3 】

一般的に、CD3は、哺乳動物において3つの別個の鎖（ 、 、 および ）ならびに鎖を有することができる多タンパク質複合体である。例えば、哺乳動物において本複合体は、CD3 鎖、CD3 鎖、2つのCD3 鎖、およびCD3 鎖のホモ二量体を含有することができる。CD3 、 CD3 、 およびCD3 鎖は、単一免疫グロブリンドメインを含有する免疫グロブリンスーパーファミリーの高度に関連する細胞表面タンパク質である。CD3 、 CD3 、 およびCD3 鎖の膜貫通領域は、負に荷電しており、これは、これらの鎖を正に荷電したT細胞受容体鎖と会合させる特徴である。CD3 、 CD3 、 およびCD3 鎖の細胞内尾部は、それぞれ免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして公知の単一の保存されたモチーフを含有し、一方で、各CD3 鎖は3つを有する。一般的に、ITAMは、TCR複合体のシグナル伝達能に関与する。これらのアクセサリー分子は、負に荷電した膜貫通領域を有し、シグナルをTCRから細胞内に伝播する上で役割を果たす。CD3-および鎖は、TCRと一緒に、T細胞受容体複合体として公知のものを形成する。

10

【 0 1 6 4 】

いくつかの態様において、TCRは、2つの鎖 および （もしくは任意で および ）のヘテロ二量体であり得、またはTCRは、単鎖TCR構築物であり得る。いくつかの態様において、TCRは、1つまたは複数のジスルフィド結合などによって繋がった2つの別々の鎖（ および 鎖または および 鎖）を含有するヘテロ二量体である。

【 0 1 6 5 】

いくつかの態様において、標的抗原（例えばがん抗原）に対するTCRが、同定され、細胞内に導入される。いくつかの態様において、TCRをコードする核酸は、公的に入手可能なTCR DNA配列のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅などによって、多様な供給源から得ることができる。いくつかの態様において、TCRは、T細胞（例えば細胞傷害性T細胞）、T細胞ハイブリドーマまたは他の公的に入手可能な供給源などに由来する細胞などからの、生物学的供給源から得られる。いくつかの態様において、T細胞は、インビオ单離細胞から得ることができる。いくつかの態様において、高親和性T細胞クローニング患者から单離し、TCRを单離することができる。いくつかの態様において、T細胞は、培養T細胞ハイブリドーマまたはクローニングであることができる。いくつかの態様において、標的抗原に対するTCRクローニングは、ヒト免疫系遺伝子（例えば、ヒト白血球抗原系またはHLA）で操作されたトランスジェニックマウスにおいて作製されている。例えば、腫瘍抗原を参照されたい（例えば、Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180およびCohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808を参照されたい。いくつかの態様において、標的抗原に対するTCRを单離するためにファージディスプレイが使用される（例えば、Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395およびLi (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354を参照されたい。いくつかの態様において、TCRまたはその抗原結合部分は、TCRの配列の知識から合成的に作製することができる。

30

【 0 1 6 6 】

いくつかの態様において、T細胞クローニングが得られた後、TCRアルファおよびベータ鎖が单離され、遺伝子発現ベクターにクローニングされる。いくつかの態様において、TCRアルファおよびベータ遺伝子は、両方の鎖が共発現するように、ピコルナウイルス2Aリボソームスキップペプチドを介して繋がっている。いくつかの態様において、TCRの遺伝的移入は、レトロウイルスもしくはレンチウイルスベクターを介して、またはトランスポゾ

40

50

ンを介して達成される（例えば、Baum et al. (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:1748-1757; an Hackett et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:674-683を参照されたい。

【0167】

B. 膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン

いくつかの態様において、CARなどの組換え受容体、例えばその抗体部分は、免疫グロブリン定常領域またはその変異体もしくは改変バージョンの少なくとも一部、例えばヒンジ領域、例えばIgG4ヒンジ領域、および／またはCH1／CLおよび／またはFc領域であるかまたはそれを含み得るスペーサーをさらに含む。いくつかの態様において、定常領域または部分は、ヒトIgG、例えばIgG4またはIgG1のものである。いくつかの局面において、定常領域の部分は、抗原-認識構成成分、例えばscFvと膜貫通ドメインとの間のスペーサー領域として働く。スペーサーは、スペーサーの不在下と比較して増大した、抗原結合後の細胞の応答性を提供する長さであることができる。いくつかの例では、スペーサーは、12アミノ酸長もしくは約12アミノ酸長または12アミノ酸長以下である。例示的なスペーサーには、アミノ酸少なくとも約10～229個、アミノ酸約10～200個、アミノ酸約10～175個、アミノ酸約10～150個、アミノ酸約10～125個、アミノ酸約10～100個、アミノ酸約10～75個、アミノ酸約10～50個、アミノ酸約10～40個、アミノ酸約10～30個、アミノ酸約10～20個、またはアミノ酸約10～15個を有し、記載された範囲の両端の点の間の任意の整数を含むスペーサーが含まれる。いくつかの態様において、スペーサー領域は、アミノ酸約12個以下、アミノ酸約119個以下、またはアミノ酸約229個以下を有する。例示的なスペーサーは、IgG4ヒンジ単独、CH2およびCH3ドメインと繋がったIgG4ヒンジ、またはCH3ドメインと繋がったIgG4ヒンジを含む。例示的なスペーサーには、Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153または国際公開公報第2014031687号に記載されたスペーサーが非限定的に含まれる。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:70に示される配列を有し、SEQ ID NO:71に示される配列によってコードされる。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:72に示される配列を有する。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:73に示される配列を有する。

【0168】

いくつかの態様において、定常領域または部分は、IgDのものである。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:74に示される配列を有する。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:70、72、73および74のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはより大きい配列同一性を示すアミノ酸配列を有する。

【0169】

抗原認識ドメインは、CARの場合、TCR複合体などの抗原受容体複合体を経由する活性化、および／または別の細胞表面受容体を介したシグナル伝達を模倣するシグナル伝達構成成分などの1つまたは複数の細胞内シグナル伝達構成成分と一般的に繋がっている。したがって、いくつかの態様において、抗原結合構成成分（例えば抗体）は、1つまたは複数の膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインと繋がっている。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、細胞外ドメインと融合している。一態様において、受容体、例えばCARにおけるドメインの1つと自然に会合している膜貫通ドメインが使用される。いくつかの例において、膜貫通ドメインは、そのようなドメインと、同じもしくは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとの結合を避けるように選択されて、またはアミノ酸置換によって改変されて、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用が最小限にされる。

【0170】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、天然起源または合成起源のいずれか由来である。起源が天然の場合、いくつかの局面において、ドメインは、任意の膜結合タンパ

10

20

30

40

50

ク質または膜貫通タンパク質由来である。膜貫通領域には、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154由来のものが含まれる（すなわち少なくともその膜貫通領域を含む）。あるいは、いくつかの態様において、膜貫通ドメインは合成である。いくつかの局面において、合成膜貫通ドメインは、ロイシンおよびバリンなどの主に疎水性の残基を含む。いくつかの局面において、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンの3つ組が、合成膜貫通ドメインの各末端に見出される。いくつかの態様において、連鎖（linkage）は、リンカー、スペーサー、および／または膜貫通ドメインによる。

【0171】

10

細胞内シグナル伝達ドメインの中には、天然抗原受容体を経由するシグナル伝達、共刺激受容体と共にそのような受容体を経由するシグナル伝達、および／または共刺激受容体のみを経由するシグナル伝達を模倣または近似するものが挙げられる。いくつかの態様において、短鎖オリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、例えば、グリシンおよびセリンを含有するリンカーなどの2～10アミノ酸長の間のリンカー、例えばグリシン-セリンの2つ組が存在し、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間に連鎖を形成する。

【0172】

受容体、例えばCARは、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達構成成分を一般的に含む。いくつかの態様において、受容体は、T細胞活性化および細胞傷害性を媒介するTCR CD3鎖、例えばCD3ゼータ鎖などのTCR複合体の細胞内構成成分を含む。したがって、いくつかの局面において、CARは、1つまたは複数の細胞シグナル伝達モジュールと繋がっている。いくつかの態様において、細胞シグナル伝達モジュールは、CD3膜貫通ドメイン、CD3細胞内シグナル伝達ドメイン、および／または他のCD膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、受容体、例えばCARは、Fc受容体、CD8、CD4、CD25、またはCD16などの1つまたは複数の追加の分子の一部をさらに含む。例えば、いくつかの局面において、CARは、CD3-ゼータ(CD3-)またはFc受容体とCD8、CD4、CD25またはCD16との間のキメラ分子を含む。

20

【0173】

30

いくつかの態様において、CARのライゲーションを受けて、CARの細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫細胞、例えばCARを発現するように操作されたT細胞の正常なエフェクター機能または応答の少なくとも1つを活性化する。例えば、いくつかの状況では、CARは、細胞溶解活性またはサイトカインもしくは他の因子の分泌などのTヘルパー活性などのT細胞の機能を誘導する。いくつかの態様において、抗原受容体構成成分または共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインの切断型部分は、例えば、それがエフェクター機能シグナルを伝達するならば、インタクトの免疫刺激鎖の代わりに使用される。いくつかの態様において、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体(TCR)の細胞質配列と、いくつかの局面においてまた、自然な状況でそのような受容体と協調して作用して抗原受容体との結合(engagement)後にシグナル伝達を開始する共受容体の細胞質配列、および／またはそのような分子の任意の誘導体もしくは変異体、および／または同じ機能的能力を有する任意の合成配列とを含む。

40

【0174】

天然TCRに関連して、完全活性化は、TCRを経由したシグナル伝達だけでなく、共刺激シグナルも一般的に必要とする。したがって、いくつかの態様において、完全活性化を促進するために、二次または共刺激シグナルを発生するための構成成分もCARに含まれる。他の態様において、CARは、共刺激シグナルを発生するための構成成分を含まない。いくつかの局面において、追加のCARは、同じ細胞において発現し、二次または共刺激シグナルを発生するための構成成分を提供する。

【0175】

T細胞活性化は、いくつかの局面において、TCRを経由する抗原依存性一次活性化を開

50

始する配列（一次細胞質シグナル伝達配列）、および抗原非依存的に作用して、二次または共刺激シグナルを提供する配列（二次細胞質シグナル伝達配列）の2つのクラスの細胞質シグナル伝達配列によって媒介されると記載されている。いくつかの局面において、CARは、そのようなシグナル伝達構成成分の一方または両方を含む。

【0176】

いくつかの局面において、CARは、TCR複合体の一次活性化を調節する一次細胞質シグナル伝達配列を含む。刺激的に作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして公知のシグナル伝達モチーフを含有する場合がある。ITAM含有一次細胞質シグナル伝達配列の例には、TCRまたはCD3ゼータ、FcRガンマまたはFcRベータ由来の配列が含まれる。いくつかの態様において、CARにおける細胞質シグナル伝達分子は、CD3ゼータ由来の細胞質シグナル伝達ドメイン、その部分、または配列を含有する。

10

【0177】

いくつかの態様において、CARは、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、およびICOSなどの共刺激受容体のシグナル伝達ドメインおよび/または膜貫通部分を含む。いくつかの局面において、同じCARが、活性化構成成分および共刺激構成成分の両方を含む。

【0178】

いくつかの態様において、活性化ドメインは、1つのCAR内に含まれ、一方で別の抗原を認識する別のCARによって共刺激構成成分が提供される。いくつかの態様において、CARには、両方とも同じ細胞上に発現する活性化CARまたは刺激CAR、および共刺激CARが含まれる（国際公開公報第2014/055668号参照）。

20

【0179】

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

【0180】

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

30

【0181】

いくつかの態様において、CARまたは他の抗原受容体は、マーカーをさらに含む場合がある、または細胞は、代用マーカーなどのマーカーをさらに発現する場合があり、代用マーカーは、細胞表面受容体の切断バージョン、例えば切断型EGFR（tEGFR）などの受容体を発現させるための細胞の形質導入または操作を確認するために使用され得る。いくつかの局面において、マーカーは、CD34、NGFR、または上皮増殖因子受容体（例えばtEGFR）の全てまたは一部（例えば切断型形態）を含む。いくつかの態様において、マーカーをコードする核酸は、切断可能なリンカー配列、例えばT2Aなどのリンカー配列をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結されている。国際公開公報第2014031687号を参照されたい。いくつかの態様において、T2Aリボソームスイッチにより分離されたCARおよびEGFRtをコードする構築物の導入は、同じ構築物から2種のタンパク質を発現することができ、それにより、EGFRtは、そのような構築物を発現している細胞を検出するためのマーカーとして使用することができる。いくつかの態様において、マーカーおよび任意でリンカー配列は、公開された特許出願である国際公開公報第2014031687号に開示されているいずれかであることができる。例えば、マーカーは、T2A切断可能リンカー配列などのリンカー配列と任意で繋がっている切断型EGFR（tEGFR）であることができる。切断型EGFR（例えばtEGFR）についての例示的なポリペプチドは、SEQ ID NO:75もしくは101に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:75もしくは101と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。例示的なT2

40

50

Aリンカー配列は、SEQ ID NO:76もしくは96に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:76もしくは96と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0182】

いくつかの態様において、マーカーは、T細胞上に自然に見出されない、またはT細胞表面に自然に見出されない分子、例えば細胞表面タンパク質、またはその部分である。

【0183】

いくつかの態様において、分子は、非自己分子、例えば非自己タンパク質、すなわち、細胞が養子移入される宿主の免疫系によって「自己」として認識されないものである。 10

【0184】

いくつかの態様において、マーカーは、治療的機能を果たさず、かつ／または遺伝子操作のための、例えばうまく操作された細胞を選択するためマーカーとして使用すること以外に効果を生じない。他の態様において、マーカーは、治療用分子またはある所望の効果をその他の方法で発揮している分子、例えば養子移入されたまたはリガンドと遭遇したときの細胞の応答を増強および／または減衰させる共刺激または免疫チェックポイント分子などの、細胞がインビボで遭遇するべきリガンドであり得る。

【0185】

いくつかの場合において、CARは、第1、第2、および／または第3世代のCARと呼ばれる。いくつかの局面において、第1世代のCARは、抗原結合時にCD3鎖誘導シグナルをもつぱら提供するCARであり、いくつかの局面において、第2世代のCARは、そのようなシグナルおよびCD28またはCD137などの共刺激受容体からの細胞内シグナル伝達ドメインを含む共刺激シグナルなどの共刺激シグナルを提供するCARであり、いくつかの局面において、第3世代のCARは、いくつかの局面において、異なる共刺激受容体の複数の共刺激ドメインを含むCARである。 20

【0186】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、本明細書記載の抗体またはフラグメントを含有している細胞外部分を含む。いくつかの局面において、キメラ抗原受容体は、本明細書記載の抗体またはフラグメントを含有している細胞外部分および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、抗体またはフラグメントは、scFvまたは単一ドメインV_H抗体を含み、細胞内ドメインはITAMを含有する。いくつかの局面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ(CD3_ζ)鎖のゼータ鎖のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを繋いでいる膜貫通ドメインを含む。 30

【0187】

いくつかの局面において、膜貫通ドメインは、CD28の膜貫通部分を含有する。細胞外ドメインおよび膜貫通は、直接または間接的に繋がっていることができる。いくつかの態様において、細胞外ドメインおよび膜貫通は、本明細書記載のいずれかのなどのスペーサーによって繋がっている。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間などのT細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含有する。いくつかの局面において、T細胞共刺激分子は、CD28または4-1BBである。 40

【0188】

いくつかの態様において、CARは、抗体、例えば抗体フラグメント、CD28またはその機能性変異体の膜貫通部分であるかまたはそれを含有する膜貫通ドメイン、ならびにCD28またはその機能性変異体のシグナル伝達部分およびCD3ゼータまたはその機能性変異体のシグナル伝達部分を含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかの態様において、CARは、抗体、例えば抗体フラグメント、CD28またはその機能性変異体の膜貫通部分であるかまたはそれを含有する膜貫通ドメイン、ならびに4-1BBまたはその機能性変異体のシグナル伝達部分およびCD3ゼータまたはその機能性変異体のシグナル伝達部分を含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかのそのような態様におい 50

て、受容体は、ヒトIg分子などのIg分子の一部、例えばIgヒンジ、例えばIgG4ヒンジを含有するスペーサー、例えばヒンジのみのスペーサーをさらに含む。

【0189】

いくつかの態様において、受容体、例えばCARの膜貫通ドメインは、ヒトCD28またはその変異体の膜貫通ドメイン、例えばヒトCD28の27-アミノ酸膜貫通ドメイン（アクセシション番号P10747.1）であるか、またはSEQ ID NO:77に示されるアミノ酸配列もしくはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を示すアミノ酸配列を含む膜貫通ドメインであり、いくつかの態様において、組換え受容体の膜貫通ドメイン含有部分は、SEQ ID NO:78に示されるアミノ酸配列、またはそれと少なくとももしくは少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0190】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、T細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含有する。いくつかの局面において、T細胞共刺激分子は、CD28または4-1BBである。

【0191】

いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD28またはその機能性変異体もしくは部分の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、例えばその41アミノ酸ドメインおよび／またはネイティブなCD28タンパク質の位置186～187にLLからGGへの置換を有する、そのようなドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:79もしくは80に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:79もしくは80と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を示すアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの態様において、細胞内ドメインは、4-1BBまたはその機能性変異体もしくは部分の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、例えばヒト4-1BBの42アミノ酸細胞質ドメイン（アクセシション番号Q07011.1）またはその機能性変異体もしくは部分、例えばSEQ ID NO:81に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:81と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0192】

いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3ゼータ刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能性変異体、例えばヒトCD3 アイソフォーム3の112AA細胞質ドメイン（アクセシション番号P20963.2）、または米国特許第7,446,190号もしくは同第8,911,993号に記載のCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:82、83もしくは84に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:82、83もしくは84と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きい配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0193】

いくつかの局面において、スペーサーは、IgGのヒンジ領域のみ、例えばIgG4またはIgG1のヒンジのみ、例えばSEQ ID NO:70に示されるヒンジのみのスペーサーを含有する。他の態様において、スペーサーは、CH2および／またはCH3ドメインと繋がったIgヒンジ、例えばIgG4ヒンジである。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:73に示されるような、CH2およびCH3ドメインと繋がったIgヒンジ、例えばIgG4ヒンジである。いくつかの態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:72に示されるような、CH3ドメインとのみ繋がったIgヒンジ、例えばIgG4ヒンジである。いくつかの態様において、スペーサーは、グリシン-セリンリッチ配列または公知の可動性リンクなど他の可動性リンクであるかまたはそれを含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 4 】

例えば、いくつかの態様において、CARは、抗原結合ドメイン、例えばscFv、任意のIg-ヒンジ含有スペーサーなどのスペーサー、CD28膜貫通ドメイン、CD28細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、CARは、抗原結合ドメイン、例えばscFv、任意のIg-ヒンジ含有スペーサーなどのスペーサー、CD28膜貫通ドメイン、CD28細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、そのようなCAR構築物は、例えばCARの下流にT2Aリボソームスキップエレメントおよび／またはtEGFR配列をさらに含む。

【 0 1 9 5 】**III. 核酸、ベクター、および操作された細胞**

免疫調節ペプチドおよび組換え受容体をコードするポリヌクレオチド（核酸分子）、そのようなポリペプチドおよび受容体を発現するように細胞を遺伝的に操作するためのベクター、ならびに免疫調節ポリペプチド、組換え受容体、および遺伝的に操作された細胞を產生させるための方法も提供される。

【 0 1 9 6 】**A. ポリヌクレオチド**

いくつかの態様において、本明細書提供の免疫調節ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、免疫調節ポリペプチドをコードする核酸配列などのシグナル核酸配列を含有する。他の例では、ポリヌクレオチドは、免疫調節ポリペプチドをコードする第1の核酸配列および組換え受容体をコードする第2の核酸配列を含有する。いくつかの局面において、組換え受容体は、キメラ抗原受容体（CAR）であるかまたはそれを含有する。いくつかの局面において、組換え受容体は、T細胞受容体（TCR）、例えばトランスジェニックTCRであるかまたはそれを含有する。

【 0 1 9 7 】

提供されるポリヌクレオチドのいずれかは、CpGモチーフを除去するおよび／または特定の種、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ウシなどの種における翻訳用にコドンを最適化するために改変することができる。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、ヒトコドンの利用のために最適化されている（すなわち、ヒトコドンに最適化されている）。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、CpGモチーフを除去するために改変される。他の態様において、提供されるポリヌクレオチドは、CpGモチーフを除去するために改変されており、コドン最適化されており、例えばヒトコドンに最適化されている。コドン最適化ならびにCpGモチーフの検出および改変の方法は周知である。典型的には、ポリヌクレオチドの最適化は、導入遺伝子の発現を増強し、導入遺伝子の安定性を増大させ、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列を保つ。例示的な免疫調節ポリペプチドをコードする例示的な最適化されたポリヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:102～107に示される。

【 0 1 9 8 】

いくつかの場合において、ポリヌクレオチドは、シグナルペプチドをコードするシグナル配列を含有する。例えば、シグナル配列は、CD33、IL-12p40またはIL-12p35由来のシグナルペプチドをコードする場合がある。いくつかのそのようなCD33、IL-12p40またはIL-12p35シグナルペプチドは、それぞれSEQ ID NO:18、12、もしくは19に示される配列、または当該配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を有し得る。

【 0 1 9 9 】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体をコードするポリヌクレオチドは、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現を制御するように機能的に連結されている少なくとも1つのプロモーターを含有する。いくつかの例では、ポリヌクレオチドは、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現を制御するように機能的に連結されている2、3、またはより多いプロモーターを含有

10

20

30

40

50

する。

【0200】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現は、誘導性または条件的である。したがって、いくつかの局面において、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体をコードするポリヌクレオチドは、条件的プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレオチベーターを含有する。いくつかのそのような局面において、条件的プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレオチベーターは、誘導性プロモーター、エンハンサー、もしくはトランスクレオチベーター、または抑制性プロモーター、エンハンサー、もしくはトランスクレオチベーターである。例えば、いくつかの態様において、誘導性または条件的プロモーターを使用して、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現を、腫瘍微小環境などの特定の微小環境に制限することができる。腫瘍微小環境は、低酸素および低グルコースなどの条件を含む。いくつかの態様において、誘導性または条件的プロモーターは、低酸素、低グルコース、酸性pH、および／または酸化ストレスなどの、腫瘍微小環境における1つまたは複数の条件の存在下で活性である。他の態様において、誘導性または条件的プロモーターによって駆動される発現は、熱、放射線、または薬物などの外因性作用物質への曝露によって調節される。

10

【0201】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現は、低酸素条件に限定される。例えば、低酸素誘導性転写因子-1アルファ (HIF-1アルファ) 媒介性転写は、低酸素条件下で低酸素応答エレメント (HRE) として公知のDNAモチーフと結合する。したがって、HREを使用して、腫瘍などの低酸素領域内で導入遺伝子の発現を特異的に駆動することができる。例えば、共通コア配列5'-(A/G)CGT(G/C)(G/C)-3' を有するHIF-1応答遺伝子からの1つまたは複数の低酸素応答エレメント (HRE) を基本プロモーター（例えば、CMV、SV40、または伸長因子1 (EF-1) プロモーター）などのプロモーターと組み合わせることによって、低酸素誘導性遺伝子発現を産出するプロモーターを構築することができる。例示的なHIF-1応答遺伝子には、エリスロポエチン (Epo) 、VEGF-A、ホスホグリセリン酸キナーゼ1 (PGK1) 、乳酸デヒドロゲナーゼA (LDH A) 、アルドラーゼA (ALDA) およびグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GA PDH) が含まれ、それらのそれぞれのHREは、SEQ ID NO:85～90に示される。

20

【0202】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現は、低グルコース条件に限られる。そのような例では、グルコース応答性プロモーターを使用して、低グルコース条件に曝露された細胞、例えば腫瘍環境に存在する細胞における導入遺伝子の発現を駆動することができる。例示的なグルコース応答性プロモーターには、グルコース調節型タンパク質GRP78プロモーターおよびヘキソキナーゼIIプロモーターが含まれる。

30

【0203】

いくつかの態様において、外因性制御された誘導性プロモーターを使用して、調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現を調節することができる。例えば、放射線誘導性プロモーター、熱誘導性プロモーター、および／または薬物誘導性プロモーターを使用して、例えば標的化された領域における導入遺伝子の発現を選択的に駆動することができる。そのような態様において、導入遺伝子の発現の位置、持続時間、およびレベルを、外因性誘導源の投与によって調節することができる。

40

【0204】

いくつかの態様において、導入遺伝子の発現は、放射線誘導性プロモーターを使用して、放射線治療を適用したときの放射線領域に限定される。原体放射線治療、組織内放射線治療、小線源治療、または放射性同位体の標的化送達などの放射線治療の方法を利用して、放射線-誘導性プロモーターの調節下で免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の局所発現を誘導することができる。イオン化放射線に応答して、細胞は、c-jun、NF P、EGR-1およびp21 (WAF-1) などの多様な遺伝子の転写を活性化する。例示的な放射

50

線-誘導性プロモーターには、EGR-1、Waf-1、RecA、およびcIAP2プロモーターが含まれる。EGR-1プロモーターのCArGエレメントは、共通配列CC(A+Tリッチ)₆GGモチーフ（例えばCCTTATTGG; SEQ ID NO: 91

）を含有し、放射線の曝露に応答して用量依存的発現も付与する。例示的な合成プロモーターは、1、2、4、6、8、10、12、14個、またはより多いCArGエレメントなどの1つまたは複数のCArGエレメントを含有することができる。例示的な合成CArG含有プロモーターは、SEQ ID NO:92～95に示される。放射線誘導性プロモーターが採用される場合、放射線誘導性プロモーターを含有する本明細書提供の構築物を含有する細胞が、本明細書に提供される。10

【0205】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現は、熱誘導性プロモーターによって調節される。高熱に対する細胞応答は、熱ショックタンパク質（HSP）の合成に関連する。したがって、高熱処置後に導入遺伝子の発現を選択的に活性化し、それにより、導入遺伝子の発現の位置、持続期間およびレベルを制御するHS P70BプロモーターなどのHSPプロモーターによって、調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現を調節することができる。いくつかの態様において、熱ショックエレメント（HSE）をHSPプロモーターまたは他のプロモーターに導入して、熱に対する転写応答を増強することができる。Gadd153は、別の例示的な熱誘導性プロモーターである。超音波および電磁場を使用して、HSPプロモーターの調節下で導入遺伝子の発現を刺激することもできる。そのようなシステムにおいて導入遺伝子の発現を生じる、温度ならびに超音波および電磁放射線などの他の外因型のエネルギー移動を経験的に決定することができる。いくつかの態様において、フィードバックループを組み入れて、導入遺伝子の発現を増強することができる（例えば、Emilusen et al., Urol Int. 2001; 67(3):216-223を参照されたい）。20

【0206】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現は、薬物誘導性プロモーターを使用して調節される。例えば、いくつかの場合において、プロモーター、エンハンサー、またはトランスクレッターは、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列、ガラクトースオペレーター配列、ドキシサイクリンオペレーター配列、ラバマイシンオペレーター配列、タモキシフェンオペレーター配列、もしくはホルモン応答性オペレーター配列、またはそれらの類似体を含む。いくつかの例において、誘導性プロモーターは、テトラサイクリン応答エレメント（TRE）を含む。いくつかの態様において、誘導性プロモーターは、タモキシフェンの存在下で遺伝子発現を活性化することができるエストロゲン応答エレメント（ERE）を含む。いくつかの例において、TREなどの薬物誘導性エレメントを、選択されたプロモーターと組み合わせて、ドキシサイクリンなどの薬物の存在下で転写を増強することができる。いくつかの態様において、薬物誘導性プロモーターは小分子誘導性プロモーターである。典型的には、テトラサイクリンオペレーターなどの薬物誘導性オペレーターは、ドキシサイクリンなどの選択された薬物の投与が、その他の場合にはサイレントな導入遺伝子の転写を開始させるアロステリック-オンシステムである。いくつかの態様において、薬物誘導性応答エレメントを含有する多剤耐性（mdr1）遺伝子プロモーターを採用して、導入遺伝子の薬物依存性発現を駆動することができる。所望のレベルの導入遺伝子発現を達成するための薬物またはホルモンの有効用量は、経験的に決定することができ、有効用量を決定する方法は、周知である。30

【0207】

いくつかの局面において、免疫調節ポリペプチドの発現は、T細胞活性化因子などによる、免疫細胞、例えばT細胞の活性化の存在下でもたらされる。例えば、いくつかの例において、プロモーター、エンハンサーもしくは他の応答エレメントまたはその部分が転写40

10

20

30

40

50

因子によって認識されて、通常、T細胞活性化によって活性が作動される遺伝子の発現が駆動される。いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、T細胞活性化によって活性が作動される転写因子の調節ドメインまたは領域（例えばプロモーター、エンハンサーまたは他の応答エレメント）であることができる。いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、T細胞活性化、TCRシグナル伝達のシグナル強度および／またはTCRシグナル伝達の品質のうちの1つまたは複数に応答する。

【0208】

いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、調節エレメント、例えばプロモーター、エンハンサー、またはT細胞転写因子に対する結合部位を含有し、それにより、T細胞転写因子の下流の活性に関連する1つもしくは複数の応答エレメントであることができる。10

いくつかの態様において、転写因子は、活性化T細胞核内因子（NFAT）、C/EBP、STAT1、STAT2、またはNF-Bである。例えば、いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、活性化T細胞核内因子（NFAT）、C/EBP、STAT1、STAT2、およびNF-Bによって認識される1つまたは複数の応答エレメントを含有する。いくつかの態様において、T細胞活性化因子は、1つまたは2つ、いくつかの場合において3つ以上の独特的な転写因子によって認識される、またはそれに応答する、1つまたは複数の調節エレメントを含有することができる。

【0209】

誘導性、条件依存的、および／または細胞特異的プロモーターおよび／または調節エレメントのうちの1つまたは複数を組み合わせて、本明細書提供の免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体の発現を制限および／または感作することができると考えられている。20

【0210】

ポリヌクレオチドが第1および第2の核酸配列を含有する態様などのいくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、第1の核酸配列と第2の核酸配列との間に連結ペプチドをコードする核酸配列をさらに含有する。いくつかのそのような場合において、連結ペプチドは、翻訳中または翻訳後に第1および第2の核酸配列の翻訳産物を分離する。いくつかの局面において、連結ペプチドは、配列内リボソーム進入部位（IRES）、自己切断型ペプチド、またはT2Aペプチドなどのリボソームスキッピングを引き起こすペプチドを含有する。

【0211】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体をコードするポリヌクレオチドは、レトロウイルス形質導入、形質移入、または形質転換などにより培養細胞を含有する組成物に導入される。30

【0212】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチド（核酸分子）は、上記のいずれかのような免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体、例えばキメラ受容体をコードするポリヌクレオチドである。そのような核酸分子を含有するベクターまたは構築物も提供される。いくつかの態様において、ベクターまたは構築物は、ポリペプチドまたは受容体をコードするヌクレオチドに機能的に連結されている1つまたは複数のプロモーターを含有して、その発現を駆動する。いくつかの態様において、プロモーターは、1つまたは1つよりも多い核酸分子に機能的に連結されている。40

【0213】

したがって、本明細書提供のポリヌクレオチドのいずれかを含有するベクターなどのベクターも提供される。いくつかの場合において、ベクターは、レトロウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターである。

【0214】

いくつかの態様において、ベクターまたは構築物は、1つまたは複数の核酸分子の発現を駆動する単一のプロモーターを含有することができる。いくつかの態様において、そのようなプロモーターは、多シストロン性（2シストロン性または3シストロン性、例えば米

10

20

30

40

50

国特許第6,060,273号を参照されたい)であることができる。例えば、いくつかの態様において、転写ユニットは、単一プロモーターからのメッセージによる遺伝子産物(例えば第1および第2の組換え受容体をコードする)を共発現させる、IRES(配列内リボソーム進入部位)を含有する2シストロン性ユニットとして操作することができる。あるいは、いくつかの場合において、単一プロモーターは、単一のオープンリーディングフレーム(ORF)中に、自己切断ペプチド(例えば2A配列)またはプロテアーゼ認識部位(例えばフューリン)をコードする配列によって相互に分離された2つまたは3つの遺伝子(例えば、代謝経路のモジュレーションに関与する分子をコードし、組換え受容体をコードする)を含有するRNAの発現を指示し得る。したがって、ORFは、翻訳中(2Aの場合)または翻訳後のいずれかで、個別のタンパク質にプロセシングされる単一のポリペプチドをコードする。いくつかの場合において、T2Aなどのペプチドは、2AエレメントのC末端のペプチド結合の合成をリボソームにスキップ(リボソームスキッピング)させ、2A配列の末端と下流の次のペプチドとの間の分離をもたらすことができる(例えば、de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004)およびde Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)を参照されたい)。多くの2Aエレメントが、当技術分野において公知である。本明細書開示の方法および核酸に使用することができる2A配列の例には、非限定的に、米国特許出願公開第20070116690号に記載されているような、手足口病ウイルス(F2A、例えばSEQ ID NO:100)、ウマ鼻炎Aウイルス(E2A、例えばSEQ ID NO:99)、ゾセア-アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(T2A、例えばSEQ ID NO:76または96)、およびブタテッシュウイルス-1(P2A、例えばSEQ ID NO:97または98)からの2A配列が含まれる。

【0215】

B. 操作のための細胞および細胞の調製

本明細書記載の免疫調節ポリペプチドおよび/または操作された組換え受容体を含有する細胞などの細胞も提供される。いくつかの態様において、細胞は、免疫調節ペプチドを分泌することができる、または分泌するように設計されている。いくつかの態様において、操作された細胞は、標的分子を発現していない細胞に対する免疫調節ポリペプチドの結合性と比較して増大した(高い)、標的分子を発現している標的細胞に対する結合性を示す、免疫調節ポリペプチドを分泌する。いくつかの局面において、操作された細胞は、標的分子を発現していない細胞の死滅と比較して増大した(多くの)、標的分子を発現している標的細胞の死滅をもたらす。いくつかの例において、増大した持続性、活性、結合性、および/または死滅は、サブユニット間にポリペプチドリンクを含むが、標的化部分を含まない免疫調節ポリペプチドを発現または分泌している基準となる操作された細胞によってもたらされるよりも多大である。

【0216】

そのような細胞の集団、そのような細胞を含有するおよび/または免疫調節ポリペプチドおよび/またはキメラ受容体を発現している細胞が、組成物中の全細胞またはT細胞またはCD8⁺もしくはCD4⁺細胞などのある特定の種類の細胞の少なくとも50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、またはより大きいパーセントを構成するような、そのような細胞を富化された組成物も提供される。組成物の中には、養子細胞療法用のように、投与用の薬学的組成物および製剤が挙げられる。対象(例えば患者)に細胞および組成物を投与する治療法も提供される。

【0217】

したがって、免疫調節ポリペプチドおよび/または組換え受容体(例えばCAR)を発現している、遺伝的に操作された細胞も提供される。当該細胞は、一般的に、哺乳動物細胞などの真核細胞、典型的にはヒト細胞である。いくつかの態様において、細胞は、血液、骨髓、リンパ液、またはリンパ器官由来であり、自然または適応免疫の細胞などの免疫系の細胞、例えば典型的にはT細胞および/またはNK細胞などのリンパ球を含む骨髓系またはリンパ系細胞である。他の例示的な細胞には、人工多能性幹細胞(iPSC)を含む複能性および多能性幹細胞などの幹細胞が含まれる。細胞は、典型的には、対象から直接単離されたおよび/または対象から単離されて凍結された初代細胞などの初代細胞である。いく

10

20

30

40

50

つかの態様において、細胞には、T細胞の1つもしくは複数のサブセットまたは他の細胞型、例えば全T細胞集団、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、およびその亜集団、例えば機能、活性化状態、成熟度、分化能、拡大増殖、再循環、局在、および／または持続能、抗原特異性、抗原受容体の種類、特定の器官もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカインの分泌プロファイル、および／または分化度によって定義される細胞が含まれる。治療される対象に関して、細胞は、同種および／または自己であり得る。方法の中には、オフザシェルフ法が挙げられる。オフザシェルフ技法についてなどのいくつかの局面において、細胞は、多能性および／または複能性であり、例えば人工多能性幹細胞(iPSC)などの幹細胞である。いくつかの態様において、方法は、対象から細胞を単離すること、本明細書記載のようにそれらを調製、加工、培養、および／または操作すること、ならびに凍結保存の前または後にそれらを同じ患者に再導入することを含む。

【0218】

T細胞ならびに／またはCD4⁺および／もしくはCD8⁺ T細胞のサブタイプおよび亜集団の中には、ナイーブT(T_N)細胞、エフェクターT細胞(T_{EFF})、メモリーT細胞およびそのサブタイプ、例えば幹細胞メモリーT(T_{SCM})、中枢性メモリーT(T_{CM})、エフェクターメモリーT(T_{EM})、または終末分化したエフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、未熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT(MAIT)細胞、天然および適応制御性T(T_{reg})細胞、TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞などのヘルパーT細胞、アルファ／ベータT細胞、ならびにデルタ／ガンマT細胞が挙げられる。

【0219】

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

【0220】

いくつかの態様において、細胞は、遺伝子操作を介して導入された1つまたは複数の核酸を含み、それにより、そのような核酸の組換え産物または遺伝的に操作された産物を発現する。いくつかの態様において、核酸は、異種であり、すなわち細胞または細胞から得られた試料中に普通、存在せず、例えば別の生物または細胞から得られた核酸であって、例えば操作されている細胞および／またはそのような細胞が由来する生物に通常見出されない核酸である。いくつかの態様において、核酸は、複数の異なる細胞型からの様々なドメインをコードする核酸のキメラ組み合わせを含む核酸を含む、自然界に見られない核酸などの非天然である。

【0221】

いくつかの態様において、操作された細胞の調製は、1つまたは複数の培養および／または調製段階を含む。免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体、例えば、CARの導入のための細胞は、生物学的試料、例えば対象から得られたまたは対象由来の試料などの試料から単離され得る。いくつかの態様において、細胞が単離される対象は、疾患もしくは状態を有するまたは細胞療法を必要とするまたは細胞療法が投与される対象である。対象は、いくつかの態様において、そのために細胞が単離、処理、および／または操作されている養子細胞療法などの特定の治療的介入を必要とするヒトである。

【0222】

したがって、細胞は、いくつかの態様において初代細胞、例えば初代ヒト細胞である。試料には、対象から直接採取された組織、液体、および他の試料、ならびに分離、遠心分離、遺伝的操作(例えば、ウイルスベクターを用いた形質導入)、洗浄、および／またはインキュベーションなどの1つまたは複数の処理段階の結果として生じる試料が含まれる。生物学的試料は、生物学的起源から直接得られた試料または処理された試料ができる。生物学的試料には、非限定的に、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗などの体液、組織および器官試料が、それらから派生した処理済み試料を含めて含まれる。

10

20

30

40

50

【0223】

いくつかの局面において、細胞が由来するまたは単離される試料は、血液もしくは血液由来試料であるか、またはアフェレーシスもしくは白血球アフェレーシス産物であるかもしくはそれらに由来する。例示的な試料には、全血、末梢血単核細胞（PBMC）、白血球、骨髄、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、腸管関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、他のリンパ系組織、肝臓、肺、胃、小腸、結腸、腎臓、膀胱、乳房、骨、前立腺、子宮頸、精巣、卵巣、扁桃、もしくは他の器官、および／またはそれに由来する細胞が含まれる。細胞療法、例えば養子細胞療法に関連する試料には、自己および同種由来の試料が含まれる。

【0224】

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

【0225】

いくつかの態様において、細胞の単離は、1つまたは複数の調製段階および／または非親和性ベースの細胞分離段階を含む。いくつかの例では、細胞は、1つまたは複数の試薬の存在下で洗浄、遠心分離、および／またはインキュベートされて、例えば望まれない構成成分が除去され、所望の構成成分が富化され、特定の試薬に感受性の細胞が溶解もしくは除去される。いくつかの例では、細胞は、密度、接着性、サイズ、感受性および／または特定の構成成分に対する耐性などの1つまたは複数の性質に基づき分離される。

10

【0226】

いくつかの例では、対象の循環血からの細胞は、例えばアフェレーシスまたは白血球アフェレーシスにより得られる。試料は、いくつかの局面において、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、および／または血小板を含有し、いくつかの局面において、赤血球および血小板以外の細胞を含有する。

20

【0227】

いくつかの態様において、対象から収集された血液細胞は、洗浄されて、例えば血漿画分が除去され、細胞がその後の処理段階のために適切な緩衝液または培地に入れられる。いくつかの態様において、細胞は、リン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄される。いくつかの態様において、洗浄溶液は、カルシウムおよび／またはマグネシウムおよび／または二価陽イオンの多くまたは全てを欠如する。いくつかの局面において、洗浄段階は、製造業者の説明書に従って半自動「フロースル」遠心分離機（例えば、Cobe 2991 cell processor, Baxter）で達成される。いくつかの局面において、洗浄段階は、製造業者の説明書に従ってタンジェント流濾過（TFF）によって達成される。いくつかの態様において、細胞は、洗浄後に例えばCa⁺⁺ / Mg⁺⁺不含PBSなどの多様な生物適合性緩衝液中に再懸濁される。ある特定の態様において、血液細胞試料の構成成分が除去され、細胞が、培養培地中に直接再懸濁される。

30

【0228】

いくつかの態様において、方法は、赤血球を溶解させ、PercollまたはFicoll勾配により遠心分離することによる末梢血からの白血球の調製などの、密度ベースの細胞分離法を含む。

40

【0229】

いくつかの態様において、単離方法は、表面マーカー、例えば表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸などの1つまたは複数の特異的分子の細胞における発現または存在に基づく異なる細胞型の分離を含む。いくつかの態様において、そのようなマーカーに基づく分離のための任意の公知の方法が、使用され得る。いくつかの態様において、分離は、親和性または免疫親和性ベースの分離である。例えば、いくつかの局面において、単離は、1つまたは複数のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの細胞発現または発現レベルに基づく細胞および細胞集団の、例えばそのようなマーカーと特異的に結合する抗体または結合パートナーと一緒にインキュベーションによる分離に一般的に続く、洗浄段階、

50

および抗体または結合パートナーと結合していない細胞からの抗体または結合パートナーと結合した細胞の分離を含む。

【0230】

そのような分離段階は、さらなる使用のために試薬と結合した細胞が保持される正の選択、および／または抗体もしくは結合パートナーと結合しなかった細胞が保持される負の選択に基づくことができる。いくつかの例では、両方の画分がさらなる使用のために保持される。いくつかの局面において、負の選択は、不均一集団における細胞型を特異的に同定する抗体が入手不可能な場合に、特に有用であることができ、その結果、分離は、所望の集団以外の細胞が発現するマーカーに基づいて最良に実施される。

【0231】

分離は、特定のマーカーを発現している特定の細胞集団または細胞の100%富化または除去を招く必要はない。例えば、マーカーを発現している細胞などの、特定の種類の細胞の正の選択または富化は、そのような細胞の数またはパーセンテージを増大させることを表すが、マーカーを発現していない細胞の完全な不在を招く必要はない。同様に、マーカーを発現している細胞などの特定の種類の細胞の負の選択、除去、または枯渇は、そのような細胞の数またはパーセンテージを減少させることを表すが、そのような細胞の全ての完全な除去を招く必要はない。

10

【0232】

いくつかの例では、1つの段階から正または負の選択をされた画分が、その後の正または負の選択などの別の分離段階に供される、複数ラウンドの分離段階が実施される。いくつかの例では、単一の分離段階は、例えば、負の選択のために標的化されたマーカーにそれぞれが特異的な複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、複数のマーカーを同時に発現している細胞を枯渇させることができる。同様に、様々な細胞型において発現する複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞型に同時に正の選択を行うことができる。

20

【0233】

例えば、いくつかの局面において、1つまたは複数の表面マーカーが陽性の細胞またはそれを高レベルで発現している細胞などのT細胞の特異的亜集団、例えばCD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、および／またはCD45RO⁺ T細胞が、正または負の選択技法によって単離される。

30

【0234】

抗CD3 / 抗CD28とコンジュゲートした磁気ビーズ（例えばDYNABEADS（登録商標）M-450 CD3 / CD28 T細胞エキスパンダー）を使用して、例えば、CD3⁺、CD28⁺ T細胞に正の選択を行うことができる。

【0235】

いくつかの態様において、単離は、正の選択による特定の細胞集団の富化、または負の選択による特定の細胞集団の枯渇により実施される。いくつかの態様において、正または負の選択は、それぞれ正または負の選択をされた細胞上に発現する（マーカー⁺）または比較的高いレベルで発現する（マーカー^{high}）1つまたは複数の表面マーカーと特異的に結合する1つもしくは複数の抗体または他の結合剤と共に細胞をインキュベートすることによって成し遂げられる。

40

【0236】

いくつかの態様において、T細胞は、B細胞、单球、または他の白血球などの非T細胞上に発現するCD14などのマーカーの負の選択によって、PBMC試料から分離される。いくつかの局面において、CD4⁺またはCD8⁺選択段階を使用して、CD4⁺ヘルパーT細胞およびCD8⁺細胞傷害性T細胞が分離される。そのようなCD4⁺集団およびCD8⁺集団を、1つまたは複数のナイーブ、メモリー、および／またはエフェクターT細胞亜集団上に発現するまたは比較的高い程度に発現するマーカーについての正または負の選択によって、亜集団にさらに分類することができる。

【0237】

50

いくつかの態様において、CD8⁺細胞は、それぞれの亜集団に関連する表面抗原に基づく正または負の選択などにより、ナイーブ、中枢性メモリー、エフェクターメモリー、および／または中枢性メモリー幹細胞についてさらに富化または枯渇される。いくつかの態様において、中枢性メモリーT(T_{CM})細胞についての富化が、効力を増大させるために、例えば投与後に長期生存、拡大増殖、および／または生着を改善するために実施され、それは、いくつかの局面において、そのような亜集団において特に頑強である。Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701 を参照されたい。いくつかの態様において、T_{CM}を富化されたCD8⁺T細胞およびCD4⁺T細胞を組み合わせることで、効力はさらに増強する。

【0238】

10

態様において、メモリーT細胞は、CD8⁺末梢血リンパ球のCD62L⁺およびCD62L⁻サブセットの両方に存在する。PBMCは、例えば抗CD8抗体および抗CD62L抗体を使用して、CD62L⁻CD8⁺および／またはCD62L⁺CD8⁺画分について富化または枯渇することができる。

【0239】

20

いくつかの態様において、中枢性メモリーT(T_{CM})細胞の富化は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、および／またはCD127の陽性または高表面発現に基づき、いくつかの局面において、これは、CD45RAおよび／またはグランザイムBを発現または高発現している細胞についての負の選択に基づく。いくつかの局面において、T_{CM}細胞について富化されたCD8⁺集団の単離は、CD4、CD14、CD45RAを発現している細胞の枯渇、およびCD62Lを発現している細胞についての正の選択または富化によって実施される。一局面において、中枢性メモリーT(T_{CM})細胞についての富化は、CD4の発現に基づき選択された細胞の陰性画分から開始して実施され、その画分は、CD14およびCD45RAの発現に基づく負の選択、ならびにCD62Lに基づく正の選択に供される。そのような選択は、いくつかの局面において、同時に実施され、他の局面において、いずれかの順序で順次実施される。いくつかの局面において、CD8⁺細胞集団または亜集団の調製に使用される、同じCD4発現ベースの選択段階も使用されて、CD4⁺細胞集団または亜集団が生成し、それにより、CD4ベースの分離からの陽性画分および陰性画分の両方が保持され、任意で、1つまたは複数のさらなる正または負の選択段階に続いて、方法のその後の段階に使用される。

【0240】

30

特定の例では、PBMCの試料または他の白血球試料は、陰性および陽性の画分の両方が保持されるCD4⁺細胞の選択に供される。次に、陰性画分が、CD14およびCD45RAまたはROR1の発現に基づく負の選択およびCD62LまたはCCR7などの中枢性メモリーT細胞のマーカー特徴に基づく正の選択に供され、正および負の選択は、いずれかの順序で実施される。

【0241】

CD4⁺Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を同定することによって、ナイーブ、中枢性メモリー、およびエフェクター細胞に分類される。CD4⁺リンパ球は、標準法により得ることができる。いくつかの態様において、ナイーブCD4⁺Tリンパ球は、CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T細胞である。いくつかの態様において、中枢性メモリーCD4⁺細胞は、CD62L⁺およびCD45RO⁺である。いくつかの態様において、エフェクターCD4⁺細胞は、CD62L⁻およびCD45RO⁻である。

40

【0242】

一例では、CD4⁺細胞を負の選択によって富化するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。いくつかの態様において、抗体または結合パートナーは、磁気ビーズまたは常磁性ビーズなどの固体支持体またはマトリックスと結合されて、正および／または負の選択のための細胞分離を可能にする。例えば、いくつかの態様において、細胞および細胞集団は、免疫磁気（または親和性磁気）分離技法（Methods in Molecular Medicine, vol. 5 8: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p

50

17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher (著作権) Humana Press Inc., Totowa, NJに総説)を使用して分離または単離される。

【0243】

いくつかの局面において、分離される細胞の試料または組成物は、小型の磁化可能なまたは磁気応答性物質、例えば磁気応答性粒子または微粒子、例えば常磁性ビーズ（例えば、DynabeadsまたはMACSビーズなど）と共にインキュベートされる。磁気応答性物質、例えば粒子は、一般的に、分離することが望ましい、例えば、負または正の選択をすることが望ましい1つもしくは複数の細胞、または細胞集団上に存在する分子、例えば表面マーカーと特異的に結合する結合パートナー、例えば抗体と直接または間接的に結び付いている。

10

【0244】

いくつかの態様において、磁気粒子またはビーズは、抗体または他の結合パートナーなどの特異的結合メンバーと結合した、磁気応答性物質を含む。磁気分離法で使用される多数の周知の磁気応答性物質がある。適切な磁気粒子には、参照により本明細書に組み入れられるMoldayの米国特許第4,452,773号、および欧州特許明細書EP452342Bに記載されている粒子が含まれる。Owenの米国特許第4,795,698号、およびLibertiらの米国特許第5,200,084号に記載されたものなどのコロイドサイズの粒子は、他の例である。

【0245】

磁気粒子またはビーズと結び付けている、抗体もしくは結合パートナー、またはそのような抗体もしくは結合パートナーと特異的に結合する二次抗体もしくは他の試薬などの分子が、試料内の細胞上に存在する場合の細胞表面分子と特異的に結合する条件で、インキュベーションは、一般的に実施される。

20

【0246】

いくつかの局面において、試料が、磁場中に置かれ、磁気応答性または磁化可能な粒子と結び付けられた細胞が、磁石に誘引され、未標識細胞から分離される。正の選択のために、磁石に誘引された細胞が保持され、負の選択のために、誘引されていない細胞（未標識細胞）が保持される。いくつかの局面において、正および負の選択の組み合わせが、同じ選択段階の間に行われ、その段階で陽性および陰性の画分が保持され、さらに処理されるまたはさらなる分離段階に供される。

30

【0247】

ある特定の態様において、磁気応答性粒子は、一次抗体もしくは他の結合パートナー、二次抗体、レクチン、酵素、またはストレプトアビジンでコーティングされる。ある特定の態様において、磁気粒子は、1つまたは複数のマーカーに特異的な一次抗体のコーティングを介して細胞と結び付けられる。ある特定の態様において、ビーズよりもむしろ細胞が一次抗体または結合パートナーで標識され、次に細胞型特異的二次抗体または他の結合パートナー（例えばストレプトアビジン）コーティング磁気粒子が添加される。ある特定の態様において、ストレプトアビジンコーティング磁気粒子は、ビオチン化一次または二次抗体と共に使用される。

【0248】

いくつかの態様において、磁気応答性粒子は、続いてインキュベート、培養および/または操作される細胞に結び付いたままにされ、いくつかの局面において、粒子は、患者への投与のために細胞に結び付いたままにされる。いくつかの態様において、磁化可能なまたは磁気応答性粒子は、細胞から除去される。細胞から磁化可能な粒子を除去するための方法は、公知であり、競合非標識抗体、磁化可能な粒子または切断可能なリンカーとコンジュゲートした抗体などの使用を含む。いくつかの態様において、磁化可能な粒子は、生分解性である。

40

【0249】

いくつかの態様において、親和性ベースの選択は、磁気活性化細胞分取（MACS）（Miltenyi Biotec, Auburn, CA）を介したものである。磁気活性化細胞分取（MACS）システムは、磁化粒子がそれに結び付いた細胞の高純度選択が可能である。ある特定の態様に

50

おいて、MACSは、非標的種および標的種が外部磁場の適用後に連続的に溶出されるモードで動作する。すなわち、磁化粒子に結び付いた細胞は、その場に保たれ、一方で結び付いていない種は溶出される。次に、この最初の溶出段階が完了した後に、磁場中に捕捉され、溶出から阻止された種が溶出および回収することができるような方法で遊離される。ある特定の態様において、非標的細胞が標識され、細胞の不均一集団から枯渇される。

【0250】

ある特定の態様において、単離または分離は、方法の単離、細胞調製、分離、処理、インキュベーション、培養、および／または製剤化段階のうちの1つまたは複数を実施するシステム、デバイス、または装置を使用して実施される。いくつかの局面において、システムを使用して、閉鎖または無菌環境でこれらの段階のうちのそれぞれが実施されて、例えば、過誤、使用者の取扱いおよび／または汚染が最小限にされる。一例では、システムは、国際公開公報第2009/072003号、またはUS20110003380A1に記載されたようなシステムである。

10

【0251】

いくつかの態様において、システムまたは装置は、統合型もしくは内蔵型システムで、および／または自動もしくはプログラム可能なやり方で、単離、処理、操作、および製剤化段階のうちの1つまたは複数、例えば全てを実施する。いくつかの局面において、システムまたは装置は、システムまたは装置と通信するコンピューターおよび／またはコンピュータープログラムを含み、それは、ユーザーが処理、単離、操作、および製剤化段階をプログラム、制御、その結果を評価、および／またはその様々な局面を調整できるようにする。

20

【0252】

いくつかの局面において、分離および／または他の段階は、例えば、閉鎖および無菌システムにおける臨床スケールレベルの細胞の自動分離のためにCliniMACSシステム（Miltenyi Biotec）を使用して実施される。構成部分は、統合型マイクロコンピューター、磁気分離ユニット、蠕動ポンプ、および各種ピンチバルブを含むことができる。統合型コンピューターは、いくつかの局面において、機器の全ての構成部分を制御し、反復手順を標準化された順序で行うようにシステムに指示する。磁気分離ユニットは、いくつかの局面において、可動性常磁性磁石および選択カラム用のホルダーを含む。蠕動ポンプは、配管セット全体にわたり流速を制御し、ピンチバルブと一緒に、システムを通過する緩衝液の制御された流動および細胞の継続的な懸濁を確実にする。

30

【0253】

CliniMACSシステムは、いくつかの局面において、無菌非発熱原性溶液中に供給される抗体カップリング磁化可能粒子を使用する。いくつかの態様において、細胞を磁気粒子で標識した後、細胞を洗浄して過剰の粒子が除去される。次に、細胞調製バッグを配管セットに接続し、それを今度は緩衝液が入ったバッグおよび細胞収集バッグと接続する。配管セットは、プレカラムおよび分離カラムを含む組み立て済み無菌配管からなり、1回だけの使用用である。分離プログラムの開始後、システムは、分離カラム上に細胞試料を自動的に適用する。標識細胞はカラム内に保持され、一方で未標識細胞は一連の洗浄段階により除去される。いくつかの態様において、本明細書記載の方法で使用するための細胞集団は、未標識であり、カラム内に保持されない。いくつかの態様において、本明細書記載の方法で使用するための細胞集団は、標識されており、カラム内に保持される。いくつかの態様において、本明細書記載の方法で使用するための細胞集団は、磁場の除去後にカラムから溶出され、細胞収集バッグ内に収集される。

40

【0254】

ある特定の態様において、分離および／または他の段階は、CliniMACS Prodigyシステム（Miltenyi Biotec）を使用して実施される。CliniMACS Prodigyシステムは、いくつかの局面において、細胞の自動洗浄および遠心分離による分画を可能にする細胞処理ユニティ（unity）を備える。CliniMACS Prodigyシステムは、供給源細胞産物の肉眼的層を識別することにより最適な細胞分画終点を決定する内蔵カメラおよび画像認識ソフト

50

ウェアも含むことができる。例えば、末梢血は、赤血球、白血球および血漿層に自動的に分離され得る。CliniMACS Prodigyシステムは、例えば細胞分化および拡大増殖、抗原負荷、ならびに長期細胞培養などの細胞培養プロトコールを成し遂げる統合型細胞培養チヤンバーも含むことができる。入力ポートは、培地の無菌除去および補充を可能にすることができる、細胞は、統合型顕微鏡を使用してモニタリングすることができる。例えば、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660、Terakura et al. (2012) Blood. 120: 72-82、およびWang et al. (2012) J Immunother. 35(9): 689-701を参照されたい。

【0255】

いくつかの態様において、本明細書記載の細胞集団は、フローサイトメトリーにより収集および富化（または枯渇）され、フローサイトメトリーでは、複数の細胞表面マーカーについて染色された細胞が流体流中で運ばれる。いくつかの態様において、本明細書記載の細胞集団は、分取スケールの（FACS）選別により収集および富化（または枯渇）される。ある特定の態様において、本明細書記載の細胞集団は、FACSベースの検出システムと組み合わせた微小電気機械システム（MEMS）チップの使用により収集および富化（または枯渇）される（例えば、国際公開公報第2010/033140号、Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; およびGodin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376を参照されたい。両方の場合に、細胞を複数のマーカーで標識することができ、詳細が明らかにされたT細胞サブセットを高純度で単離可能になる。

【0256】

いくつかの態様において、抗体または結合パートナーは、1つまたは複数の検出可能マーカーで標識されて、正および／または負の選択のための分離が促進される。例えば、分離は、蛍光標識抗体との結合に基づき得る。いくつかの例では、1つまたは複数の細胞表面マーカーに特異的な抗体または他の結合パートナーの結合に基づく細胞の分離は、例えばフローサイトメトリー検出システムと組み合わせた、分取スケール（FACS）を含む蛍光活性化細胞分取（FACS）および／または微小電気機械システム（MEMS）チップなどにより、流体流中で実施される。そのような方法は、複数のマーカーに基づく正および負の選択を同時に可能にする。

【0257】

いくつかの態様において、調製方法は、単離、インキュベーション、および／または操作の前または後のいずれかに、細胞を凍結、例えば凍結保存するための段階を含む。いくつかの態様において、凍結およびその後の解凍段階は、細胞集団中の顆粒球および、いくらか单球を除去する。いくつかの態様において、例えば血漿および血小板を除去するための洗浄段階の後に、細胞は凍結溶液中に懸濁される。多様な公知の凍結溶液およびパラメーターのいずれかがいくつかの局面において使用され得る。一例は、20% DMSOおよび8%ヒト血清アルブミン（HSA）を含有するPBS、または他の適切な細胞凍結媒を使用することを伴う。次にDMSOおよびHSAの終濃度が、それぞれ10%および4%になるようにこれを培地で1:1希釈する。次に、細胞は、毎分1°の速度で-80°に凍結され、液体窒素保管タンクの気相中に保管される。

【0258】

いくつかの態様において、提供される方法は、育生（cultivation）、インキュベーション、培養、および／または遺伝的操作段階を含む。例えば、いくつかの態様において、枯渇された細胞集団および培養開始組成物をインキュベートおよび／または操作するための方法が提供される。

【0259】

したがって、いくつかの態様において、細胞集団は、培養開始組成物中でインキュベートされる。インキュベーションおよび／または操作は、培養または細胞を育生するためのユニット、チヤンバー、ウェル、カラム、チューブ、配管セット、バルブ、バイアル、培養皿、バッグ、または他の容器などの培養容器中で実施され得る。

【0260】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、細胞は、遺伝的操作の前にまたはそれと一緒にインキュベートおよび／または培養される。インキュベーション段階は、培養、育生、刺激、活性化、および／または繁殖を含むことができる。いくつかの態様において、組成物または細胞は、刺激条件または刺激物質の存在下でインキュベートされる。そのような条件には、抗原暴露を模倣するため、および／または組換え抗原受容体の導入などのために細胞を遺伝的操作のためにプライミングするために、集団中の細胞の増殖、拡大増殖、活性化、および／または生存を誘導するように計画された条件が含まれる。

【0261】

条件は、特定の培地、温度、酸素含量、二酸化炭素含量、時間、作用物質、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオン、ならびに／またはサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、および細胞を活性化するように設計された任意の他の作用物質などの刺激因子のうちの1つまたは複数を含むことができる。

10

【0262】

いくつかの態様において、刺激条件または刺激物質は、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することができる1つまたは複数の作用物質、例えばリガンドを含む。いくつかの局面において、作用物質は、T細胞におけるTCR／CD3細胞内シグナル伝達カスケードを作動または開始させる。そのような作用物質は、TCRに特異的な抗体、例えば抗CD3などの、抗体を含むことができる。いくつかの態様において、刺激条件は、共刺激受容体、例えば抗CD28を刺激することができる1つまたは複数の作用物質、例えばリガンドを含む。いくつかの態様において、そのような作用物質および／またはリガンドは、ビーズなどの固体支持体および／または1種もしくは複数種のサイトカインと結合している場合がある。任意で、拡大増殖方法は、抗CD3および／または抗CD28抗体を（少なくとも濃度約0.5ng/mlで）培養培地に添加する段階をさらに含む場合がある。いくつかの態様において、刺激物質は、IL-2、IL-15および／またはIL-7を含む。いくつかの局面において、IL-2濃度は、少なくとも約10ユニット/mLである。

20

【0263】

いくつかの局面において、インキュベーションは、Riddellらの米国特許第6,040,177号、Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660、Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82、および／またはWang et al. (2012) J Immunother. 35(9): 689-701に記載された技法のような技法に従って実施される。

30

【0264】

いくつかの態様において、T細胞は、非分裂性末梢血単核細胞（PBMC）などの培養開始組成物フィーダー細胞に添加すること（例えば、結果として生じる細胞集団が、拡大培養される初期集団中の各Tリンパ球に対して少なくとも約5、10、20、もしくは40、またはより多くのPBMCフィーダー細胞を含有するように）；および培養物を（例えば、T細胞数をエクスパンドするのに十分な時間）インキュベートすることによってエクスパンドされる。いくつかの局面において、非分裂性フィーダー細胞は、ガンマ線照射されたPBMCフィーダー細胞を含むことができる。いくつかの態様において、PBMCに約3000～3600radの範囲のガンマ線が照射されて細胞分裂が阻止される。いくつかの局面において、T細胞集団の添加前に、フィーダー細胞が培養培地に添加される。

40

【0265】

いくつかの態様において、刺激条件は、ヒトTリンパ球の成長に適切な温度、例えば少なくともセ氏約25度、一般的に少なくとも約30度、一般的にセ氏37度または約37度を含む。任意で、インキュベーションは、非分裂性EBV形質転換リンパ芽球様細胞（LCL）をフィーダー細胞として添加することをさらに含み得る。LCLに、約6000～10,000radの範囲のガンマ線を照射することができる。LCLフィーダー細胞は、いくつかの局面において、少なくとも約10：1のLCLフィーダー細胞対初期Tリンパ球の比などの任意の適切な量で提供される。

【0266】

50

態様において、抗原特異的CD4⁺および/またはCD8⁺T細胞などの抗原特異的T細胞は、ナイーブまたは抗原特異的Tリンパ球を抗原で刺激することによって得られる。例えば、抗原特異的T細胞株またはクローンは、感染した対象からT細胞を単離し、細胞を同じ抗原でインビトロ刺激することによって、サイトメガロウイルス抗原に対して作製することができる。

【0267】

C. 遺伝的操作のためのベクターおよび方法

遺伝的に操作された構成成分、例えば免疫調節ポリペプチドおよび組換え受容体、例えばCARまたはTCRの導入のための様々な方法は、周知であり、提供された方法および組成物を用いて使用され得る。例示的な方法には、ウイルスベクター、例えばレトロウイルスもしくはレンチウイルスベクター、非ウイルスベクターまたはトランスポゾン、例えばSleping Beautyトランスポゾンシステムを介することを含む、ポリペプチドまたは受容体をコードする核酸の移入のための方法が含まれる。遺伝子移入の方法は、形質導入、エレクトロポレーションまたは細胞内への遺伝子移入を招く、他の方法を含むことができる。

10

【0268】

いくつかの態様において、遺伝子移入は、細胞を例えばサイトカインまたは活性化マーカーの発現によって測定されるような増殖、生存、および/または活性化などの応答を誘導する刺激と組み合わせることなどによって細胞を最初に刺激すること、続いて活性化細胞の形質導入を行うこと、ならびに培養において臨床適用に十分な数に拡大増殖することによって達成される。

20

【0269】

いくつかの状況では、対象における毒性に関する因子などの刺激因子（例えばリンホカインまたはサイトカイン）の過剰発現が、対象において望まれない転帰またはより低い効力を潜在的に招く潜在性から保護することが、望ましい場合がある。したがって、いくつかの状況では、操作された細胞は、養子免疫療法において投与したときなどに、細胞をインビボの負の選択に感受性にする遺伝子セグメントを含む。例えればいくつかの局面において、細胞が投与される患者のインビボ状態における変化の結果として該細胞を除去することができるよう、該細胞は操作される。負の選択が可能な表現型は、投与された作用物質、例えば化合物への感受性を付与する遺伝子の挿入に起因し得る。負の選択が可能な遺伝子には、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ（HSV-I TK）遺伝子（Wigler et al., Cell 2:223, 1977）；細胞性ヒポキサンチンホスホリボシリルトランسفエラーゼ（HPRT）遺伝子、細胞性アデニンホスホリボシリルトランسفエラーゼ（APRT）遺伝子、細菌シトシンデアミナーゼが含まれる（Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)）。

30

【0270】

いくつかの態様において、組換え核酸は、例えばシミアンウイルス40（SV40）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）由来のベクターなどの組換え感染性ウイルス粒子を使用して細胞に移入される。いくつかの態様において、組換え核酸は、組換えレンチウイルスベクターまたはガンマ-レトロウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターを使用してT細胞に移入される（例えば、Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557を参照されたい）。

40

【0271】

いくつかの態様において、レトロウイルスベクター、例えばモロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）、骨髄増殖性肉腫ウイルス（MPSV）、マウス胚性幹細胞ウイルス（MESV）、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）、脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）、またはアデノ随伴ウイルス（AAV）由来のレトロウイルスベクターは、長末端反復配列（LTR）を有する。大部分のレトロウイルスベクターは、マウスレトロウイルス由来である。いくつかの態様において、レトロウイルスは、任意のトリまたは哺乳動物細胞起源由来のもの

50

を含む。レトロウイルスは、典型的には、ヒトを含むいくつかの種の宿主細胞に感染することができることを意味するアンホトロピックである。一態様において、発現されるべき遺伝子は、レトロウイルスgag、polおよび／またはenv配列と置き換わる。いくつかの例証となるレトロウイルスシステムは、記載されている（例えば、米国特許第5,219,740号；同第6,207,453号；同第5,219,740号；Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990；Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14；Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852；Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037；およびBoris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* p. 3:102-109。

【0272】

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

【0273】

いくつかの態様において、組換え核酸は、エレクトロポレーションを介してT細胞に移入される（例えば、Chicaybam et al. (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298およびVan Deloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437を参照されたい）。いくつかの態様において、組換え核酸は、遺伝子転位を介してT細胞に移入される（例えばManuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437；Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74；およびHuang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126を参照されたい）。免疫細胞において遺伝物質を導入および発現する他の方法には、リン酸カルシウム形質移入（例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載）、プロトプラスト融合、陽イオン性リポソーム媒介形質移入；タングステン粒子促進微粒子銃（Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)）；およびリン酸ストロンチウムDNA共沈（Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)）が含まれる。

【0274】

組換え産物をコードする核酸の移入のための他のアプローチおよびベクターは、例えば国際公開公報第2014055668号および米国特許第7,446,190号に記載されているものである。

【0275】

いくつかの態様において、細胞（例えば、T細胞）に、拡大増殖の途中または後のいずれかに、例えば、免疫調節ポリペプチド、T細胞受容体（TCR）、またはキメラ抗原受容体（CAR）が形質移入される場合がある。所望のポリペプチドまたは受容体の遺伝子導入のためのこの形質移入は、例えば、任意の適切なレトロウイルスベクターを用いて実施することができる。次に、遺伝的に改変された細胞集団を最初の刺激（例えばCD3 / CD28刺激）から解放し、続いて第2の種類の刺激で、例えば新たに導入された受容体を介して刺激することができる）。この第2の種類の刺激は、ペプチド／MHC分子の形態の抗原刺激、遺伝的に導入された受容体の同族（交差結合）リガンド（例えば、CARの天然リガンド）または新しい受容体のフレームワーク内に（例えば受容体内の定常領域を認識することにより）直接結合する任意のリガンド（抗体など）を含み得る。例えば、Cheadle et al., "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66またはBarrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)を参照されたい。

【0276】

追加の核酸（例えば導入用遺伝子）の中には、移入された細胞の生存度および／または機能を促進することなどにより治療の効力を向上する遺伝子；細胞の選択および／または評価のための遺伝マーカーを提供するため、例えばインビボ生存または局在を評価するための遺伝子；例えばLupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991)；およびR

10

20

30

40

50

Riddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992)に記載されたように、細胞をインビボの負の選択に感受性にすることにより安全性を改善するための遺伝子が挙げられる。正の選択可能な優性マーカーと負の選択可能なマーカーとを融合することから得られる二機能性の選択可能な融合遺伝子の使用について記載しているLuptonらによる公報PCT/US91/08442およびPCT/US94/05601も参照されたい。例えば、Riddellらの米国特許第6,040,177号の14～17欄を参照されたい。

【0277】

IV. 組成物、製剤および投与方法

CARまたはTCRなどのキメラ受容体を含有する組成物、ならびに薬学的組成物および製剤を含めた、操作された細胞を含有する組成物も提供される。抗原を発現する疾患、状態、および障害の治療、または検出、診断、および予後判定方法などにおける組成物の使用方法および使用も提供される。

10

【0278】

A. 組成物／製剤

用語「薬学的製剤」は、その中に含有される活性成分の生物学的活性を有効にさせるような形態の調製物であって、製剤が投与される対象に容認できない毒性である追加の構成成分を含有しない調製物を表す。

【0279】

「薬学的に許容される担体」は、対象に無毒である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を表す。薬学的に許容される担体には、非限定的に、緩衝剤、賦形剤、安定化剤、または保存剤が含まれる。

20

【0280】

いくつかの局面において、担体の選択は、特定の細胞および／または投与方法により部分的に決定される。したがって、多様な適切な製剤がある。例えば、薬学的組成物は、保存剤を含有することができる。適切な保存剤には、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、およびベンザルコニウムクロリドが含まれ得る。いくつかの局面において、2つ以上の保存剤の混合物が使用される。保存剤またはその混合物は、典型的には全組成物の約0.0001重量%～約2重量%の量で存在する。担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載されている。薬学的に許容される担体は、採用された投薬量および濃度でレシピエントに一般的に無毒であり、それには、非限定的にリン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む单糖、二糖、および他の糖質；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに／またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

30

【0281】

いくつかの局面において、緩衝化剤が組成物中に含まれる。適切な緩衝剤には、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに様々な他の酸および塩が含まれる。いくつかの局面において、2つ以上の緩衝剤の混合物が使用される。緩衝化剤またはその混合物は、典型的には全組成物の約0.001重量%～約4重量%の量で存在する。投与可能な薬学的組成物を調製するための方法は、公知である。例示的な方法は、例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams

40

50

& Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)により詳細に記載されている。

【0282】

製剤または組成物は、細胞で、好ましくは、それぞれの活性が相互に有害な影響を与えない細胞に相補的な活性を有する細胞で、治療されている特定の適応、疾患、または状態に有用な1種よりも多い活性成分も含有し得る。そのような活性成分は、意図される目的のために有効な量と組み合わせて適切に存在する。したがって、いくつかの態様において、薬学的組成物は、化学療法剤、例えば、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチニン、シスプラチニン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ピンプラスチニン、ピンクリスチン等の他の薬学的活性薬剤または薬物をさらに含む。いくつかの態様において、細胞または抗体は、塩、例えば薬学的に許容される塩の形態で投与される。適切な薬学的に許容される酸付加塩には、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸、および硫酸などの無機酸、ならびに酒石酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸、安息香酸、グリコール酸、グルコン酸、コハク酸、およびアリールスルホン酸、例えばp-トルエンスルホン酸などの有機酸由来のものが含まれる。

10

【0283】

活性成分は、マイクロカプセル、コロイド状薬物送達システム（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルション中に捕捉され得る。ある特定の態様において、薬学的組成物は、シクロデキストリン封入複合体などの封入複合体として、またはリポソームとして製剤化される。リポソームは、宿主細胞（例えばT細胞またはNK細胞）を特定の組織に標的化するために役立つことができる。例えば、Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980)、および米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、および同第5,019,369号に記載されている方法のような多くの方法が、リポソームを調製するために利用可能である。

20

【0284】

薬学的組成物は、いくつかの局面において、組成物の送達が、処置される部位の感作の前に、かつそれを引き起こす十分な時間で起こるように、時間放出、遅延放出、および徐放送達システムを採用することができる。多くの種類の放出送達システムが利用可能であり、公知である。そのようなシステムは、組成物の反復投与を避け、それにより、対象および医師への利便性を増すことができる。

30

【0285】

薬学的組成物は、いくつかの態様において、疾患または状態を治療または予防するためには有効な量（例えば、治療有効量または予防有効量）の免疫調節ポリペプチドおよび/または操作された細胞を含有する。治療または予防の効力は、いくつかの態様において、処置された対象の定期的評価によりモニタリングされる。数日にわたる、またはより長い反復投与について、状態に応じて、疾患症状の所望の抑制が起こるまで処置は繰り返される。しかし、他の投薬レジメンが有用な場合があり、決定されることができる。所望の投薬量を、組成物の単回ボーラス投与、組成物の複数ボーラス投与、または組成物の連続注入投与により送達することができる。

40

【0286】

免疫調節ポリペプチドおよび/または操作された細胞は、標準投与技法、製剤、および/またはデバイスを使用して投与され得る。組成物の貯蔵および投与のための、製剤ならびにシリングおよびバイアルなどのデバイスが提供される。操作された細胞の投与は、自己または異種であることができる。例えば、免疫応答細胞または前駆細胞を1つの対象から得ることができ、それを同じ対象または異なる適合性の対象に投与することができる。末梢血由来の免疫応答細胞またはその子孫（例えばインビボ、エクスピボまたはインビトロで得られた）を、カテーテル投与を含む局所注射、全身注射、局所注射、静脈内注射、または非経口投与を介して投与することができる。治療用組成物（例えば遺伝的に改変された免疫応答細胞を含有する薬学的組成物）を投与するとき、それは、一般的に注射可能

50

な単位投薬形態（溶液、懸濁物、エマルション）に製剤化される。

【0287】

製剤には、経口、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、鼻腔内、口腔、舌下、または坐剤投与のための製剤が含まれる。いくつかの態様において、細胞集団は、非経口投与される。本明細書に使用される用語「非経口」には、静脈内、筋肉内、皮下、直腸、膀胱、および腹腔内投与が含まれる。いくつかの態様において、細胞集団は、静脈内、腹腔内、または皮下注射による末梢全身送達を使用して対象に投与される。

【0288】

組成物は、いくつかの態様において、いくつかの局面において選択されたpHに緩衝化され得る無菌液体調製物、例えば等張水溶液、懸濁物、エマルション、分散液、または粘性組成物として提供される。液体調製物は、通常、ゲル、他の粘性組成物、および固体組成物よりも調製が容易である。追加的に、液体組成物は、特に注射により投与することが、幾分より便利である。他方、特異的組織とより長い接触期間を提供するために、粘性組成物を妥当な粘度範囲内で製剤化することができる。液体組成物または粘性組成物は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）およびその適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であることができる担体を含むことができる。

10

【0289】

無菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロース等のような適切な担体、希釈剤、または賦形剤との混加物などの溶媒に細胞を混ぜることによって、無菌注射液を調製することができる。組成物は、凍結乾燥することもできる。組成物は、所望の投与経路および調製に応じて、湿潤、分散、または乳化剤（例えばメチルセルロース）、pH緩衝剤、ゲル化または粘度増強添加剤、保存剤、香味剤、着色剤等の補助物質を含有することができる。いくつかの局面において、適切な調製物を調製するために標準的な教科書に助言を求めて良い。

20

【0290】

抗菌保存剤、抗酸化剤、キレート剤、および緩衝剤を含む組成物の安定性および無菌性を強化する様々な添加剤を添加することができる。様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等によって、微生物の作用の防止を確実にすることができる。注射用薬学的剤形の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらすことができる。

30

【0291】

徐放調製物が調製される場合がある。徐放調製物の適切な例には、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、そのマトリックスは、造形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。

【0292】

インビボ投与のために使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば無菌濾過膜を通した濾過によって、容易に達成され得る。

【0293】

40

B. 投与方法

免疫調節ポリペプチド、操作された細胞、および組成物を投与する方法、ならびにがんを含む疾患、状態、および障害を治療または予防するためのそのような免疫調節ポリペプチド、操作された細胞、および組成物の使用が、提供される。いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチド、操作された細胞、および組成物は、例えば養子T細胞療法などの養子細胞療法を介して治療される特定の疾患または状態を有する対象または患者に投与される。いくつかの態様において、提供される細胞および組成物は、疾患または状態を有するまたはそのリスクがある対象などの対象に投与される。いくつかの局面において、方法は、それにより、操作T細胞によって認識される抗原を発現しているがんにおける腫瘍量を減少させることなどによって、疾患または状態を治療する、例えばその1つまたは複数

50

の症状を改善する。

【0294】

養子細胞療法のために操作された細胞を投与する方法は、公知であり、提供される方法および組成物と共に使用され得る。例えば、養子T細胞療法は、例えばGruenbergらの米国特許出願公開第2003/0170238号；Rosenbergの米国特許第4,690,915号；Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)に記載されている。例えばThemeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338を参照されたい。

【0295】

本明細書において使用される「対象」は、ヒトまたは他の動物などの哺乳動物、典型的にはヒトである。いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチド、操作された細胞、または組成物が投与される対象、例えば患者は、哺乳動物、典型的にはヒトなどの霊長類である。いくつかの態様において、霊長類は、サルまたは類人猿である。対象は、雄または雌であることができ、乳期、若期、青期、成年、および老期の対象を含む、任意の適切な齢であることができる。いくつかの態様において、対象は、げっ歯動物などの非霊長類哺乳動物である。

10

【0296】

本明細書において使用される「治療」（および「治療する」または「治療すること」などのその文法的変形）は、疾患もしくは状態もしくは障害、または症状、有害作用もしくは転帰、またはそれに関連する表現型の完全または部分的な改善または軽減を表す。望ましい治療効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接または間接的病理的帰結の縮小、転移の予防、疾患の進行速度の減少、病状の改善または一時的緩和、および寛解または改善した予後が非限定的に含まれる。本用語は、疾患の完全な治癒あるいは任意の症状または全ての症状もしくは転帰に及ぼす効果の完全除去を意味するものではない。

20

【0297】

本明細書に使用される「疾患の発生を遅延させること」は、疾患（がんなどの）発生を延期、妨害、減速、遅延、安定化、抑制、および／または順延することを意味する。この遅延は、病歴および／または処置されている個体に応じて、様々な時間の長さであることができる。当業者に明らかなように、十分または顕著な遅延は、事実上、個体が疾患を発生しない点で予防を包含することができる。例えば、転移の発生などの末期がんが、遅延され得る。

30

【0298】

本明細書に使用される「予防すること」は、疾患素因があり得るが、まだ疾患を有すると診断されていない対象における疾患の発生または再発に関する予防法を提供することを含む。いくつかの態様において、提供される細胞および組成物は、疾患の発生を遅延させるまたは疾患の進行を減速させるために使用される。

【0299】

本明細書に使用される、機能または活性を「抑制する」ことは、関心対象の条件もしくはパラメーターを除き、その他の点で同じ条件と比較したときに、またはその代わりに別の条件と比較して、機能または活性を低減することである。例えば、腫瘍の成長を抑制する細胞は、その細胞が存在しない場合の腫瘍の成長速度と比較して、腫瘍の成長速度を低減する。

40

【0300】

投与に関連して、薬剤、例えば薬学的製剤、細胞、または組成物の「有効量」は、治療または予防結果などの所望の結果を達成するために必要な投薬量／量および期間で有効な量を表す。

【0301】

薬剤、例えば薬学的製剤または操作された細胞の「治療有効量」は、疾患、状態、もし

50

くは障害の治療および／または治療の薬物動態もしくは薬力学的效果などのため、所望の治療結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効な量を表す。治療有効量は、対象の病状、年齢、性別、および重量、ならびに投与される免疫調節ポリペプチドまたは操作された細胞などの要因に応じて様々であり得る。いくつかの態様において、提供される方法は、免疫調節ポリペプチド、操作された細胞、または組成物を有効量、例えば治療有効量で投与することを伴う。

【0302】

「予防有効量」は、所望の予防結果を達成するために必要な投薬量および期間の有効量を表す。予防用量は、疾患の前または初期段階で対象に使用されるので、予防有効量は、典型的には治療有効量未満であるが、必ずしもそうではない。

10

【0303】

治療される疾患または状態は、抗原の発現が、疾患状態または障害の原因に関連および／または関与する、例えばそのような疾患、状態、または障害を引き起こす、悪化させる、またはその他の方法で関与する、いずれかであることができる。例示的な疾患および状態は、悪性疾患または細胞の形質転換（例えばがん）、自己免疫もしくは炎症性疾患、または例えば細菌、ウイルスもしくは他の病原体によって引き起こされる感染性疾患に関連する疾患または状態を含むことができる。治療することができる様々な疾患および状態に関連する抗原を含む例示的な抗原は、上に記載されている。特定の態様において、免疫調節ポリペプチドおよび／または組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体またはトランスジエニックTCRは、疾患または状態に関連する抗原と特異的に結合する。

20

【0304】

いくつかの態様において、疾患または状態は、固形腫瘍、リンパ腫、白血病、血液腫瘍、転移性腫瘍、または他のがんもしくは腫瘍型などの腫瘍である。

【0305】

いくつかの態様において、疾患または状態は、非限定的に、ウイルス、レトロウイルス、細菌、および原虫感染、免疫不全症、サイトメガロウイルス（CMV）、エブスタイン-バーウイルス（EBV）、アデノウイルス、BKポリオーマウイルスなどの感染性疾患または状態である。いくつかの態様において、疾患または状態は、関節炎、例えば関節リウマチ（RA）、I型糖尿病、全身性エリテマトーデス（SLE）、炎症性腸疾患、乾癬、強皮症、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病、クローン病、多発性硬化症、喘息、および／または移植片に関連する疾患もしくは状態などの自己免疫または炎症性疾患または状態である。

30

【0306】

いくつかの態様において、疾患または障害に関連する抗原は、オーファンチロシンキナーゼ受容体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソセリン、CEA、およびB型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3、もしくは4、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カッパ軽鎖、ルイスY、L1-細胞接着分子、MAGE-A1、メソセリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、腫瘍胎児抗原、TAG72、VEGF-R2、がん胎児抗原（CEA）、前立腺特異抗原、PSMA、Her2/neu、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、およびMAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1（WT-1）、サイクリンA1（CCNA1）などのサイクリン、および／またはビオチン化分子、および／またはHIV、HCV、HBVもしくは他の病原体によって発現される分子からなる群より選択される。

40

【0307】

提供される方法および使用は、養子細胞療法のための方法および使用を含む。いくつかの態様において、方法は、操作された細胞または該細胞を含有する組成物を、対象、組織、または細胞に、例えば疾患、状態または障害を有する、そのリスクがある、またはその疑いがあるものに投与することを含む。いくつかの態様において、細胞、集団、および組成物は、治療される特定の疾患または状態を有する対象に、例えば、養子T細胞療法など

50

の養子細胞療法を介して投与される。いくつかの態様において、細胞または組成物は、疾患または状態を有するまたはそのリスクがある対象などの対象に、疾患または状態の1つまたは複数の症状を改善するために投与される。

【0308】

いくつかの態様において、細胞療法、例えば養子T細胞療法は、細胞療法を受けるべき対象またはそのような対象由来の試料から細胞が単離される、および／またはその他の方法で調製される、自己移植によって実施される。したがって、いくつかの局面において、細胞は、治療を必要とする対象、例えば患者に由来し、細胞は、単離および処理の後に同じ対象に投与される。

【0309】

いくつかの態様において、細胞療法、例えば養子T細胞療法は、細胞療法を受けるまたは最終的に受ける対象以外の対象、例えば第1の対象から細胞が単離および／またはその他の方法で調製される、同種移植によって実施される。そのような態様において、次に細胞は、同じ種の異なる対象、例えば第2の対象に投与される。いくつかの態様において、第1および第2の対象は、遺伝的に同一である。いくつかの態様において、第1および第2の対象は、遺伝的に類似である。いくつかの態様において、第2の対象は、第1の対象と同じHLAクラスまたはスーパー・タイプを発現する。細胞を任意の適切な手段で投与することができる。投薬および投与は、投与が短時間または慢性であるかどうかに一部依存し得る。様々な投薬計画には、様々な時点にわたる単回または多回投与、ボーラス投与、およびパルス注入が非限定的に含まれる。

10

【0310】

ある特定の態様において、細胞または細胞のサブタイプの個別集団は、細胞約100万～約1000億個の範囲および／または体重1kgあたりのその量の細胞で、例えば細胞100万個～約500億個（例えば細胞約500万個、約2500万個、約5億個、約10億個、約50億個、約200億個、約300億個、約400億個、または前述の値の任意の2つによって定義される範囲）などで、例えば細胞約1000万～約1000億個（例えば約2000万個、約3000万個、約4000万個、約6000万個、約7000万個、約8000万個、約9000万個、約100億個、約250億個、約500億個、約750億個、約900億個、または前述の値の任意の2つによって定義される範囲）で、いくつかの場合において細胞約1億個～約500億個（例えば約1億2000万個、約2億5000万個、約3億5000万個、約4億5000万個、約6億5000万個、約8億個、約9億個、約30億個、約300億個、約450億個）またはこれらの範囲内および／または体重1kgあたりの任意の値で、対象に投与される。投薬量は、疾患もしくは障害および／または患者および／または他の処置に特定の特質に応じて変動し得る。

20

【0311】

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

30

【0312】

いくつかの態様において、細胞は、組み合わせ処置の部分として例えば、別の治療的介入、例えば抗体または操作された細胞または受容体または細胞傷害剤もしくは治療剤などの薬剤と同時にまたは任意の順序で順次に投与される。細胞は、いくつかの態様において、1つもしくは複数の追加の治療剤と共に、または別の治療的介入に関連して、同時にまたは任意の順序で順次に共投与される。いくつかの状況において、細胞は、細胞集団が1つまたは複数の追加の治療剤の効果を増強する、またはその逆のために、十分近い時間、別の治療法と共に投与される。いくつかの態様において、細胞は、1つまたは複数の追加の治療剤の前に投与される。いくつかの態様において、細胞は、1つまたは複数の追加の治療剤の後に投与される。いくつかの態様において、1つまたは複数の追加の薬剤は、例えば持続性を高めるためにIL-2などのサイトカインを含む。いくつかの態様において、方法

40

50

は、化学療法剤の投与を含む。

【0313】

細胞の投与後、操作された細胞集団の生物学的活性が、いくつかの態様において、例えば任意のいくつかの公知の方法により測定される。評価すべきパラメーターは、インビボで例えればイメージングによる、またはエクスビボで例えればELISAもしくはフローサイトメトリーによる、操作もしくは自然T細胞または他の免疫細胞と抗原との特異的結合を含む。ある特定の態様において、操作された細胞が標的細胞を破壊する能力は、例えばKochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)、およびHerman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)に記載されている細胞傷害性アッセイなどの当技術分野において公知の任意の適切な方法を使用して測定することができる。ある特定の態様において、細胞の生物学的活性は、CD107a、IFN γ 、IL-2、およびTNFなどの1つまたは複数のサイトカインの発現および/または分泌をアッセイすることによって測定される。いくつかの局面において、生物学的活性は、腫瘍量または腫瘍負荷における減少などの臨床転帰を評価することによって測定される。

【0314】

ある特定の態様において、操作された細胞は、任意の数の方法でその治療または予防の効力が増大するようにさらに改変される。例えば、集団によって発現される操作CARまたはTCRは、標的化部分と直接的またはリンカーを経由して間接的のいずれかでコンジュゲートされることができる。化合物、例えはCARまたはTCRを標的化部分とコンジュゲートする実施は、当技術分野において公知である。例えば、Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995)、および米国特許第5,087,616号を参照されたい。

【0315】

V. 定義

本明細書に使用される単数形「a」、「an」、および「the」は、状況が明らかに別のこととを指示しない限り、複数の指示対象を含む。例えば、「a」または「an」は、「少なくとも1つ」または「1つもしくは複数」を意味する。本明細書記載の局面および変形は、局面および変形「からなる」および/または「から本質的になる」を含むと理解される。

【0316】

本開示にわたり、請求された主題の様々な局面が、範囲の形式で提示される。範囲の形式での記載は、単に便宜および簡潔さのためであると理解すべきであり、請求された主題の範囲に対する確固たる限定として見なしてはならない。したがって、範囲の記載は、全ての可能な下位範囲およびその範囲内の個別の数値を具体的に開示したと見なすべきである。例えば、値の範囲が提供される場合、その範囲の上限値と下限値との間の各介在値および記載された範囲における任意の他の記載値または介在値が、請求された主題内に含まれることが理解される。これらのより小さな範囲の上限値および下限値は独立して、より小さな範囲の中に含まれ得、また、請求された主題内に含まれるが、記載された範囲における特に除外される任意の限界値に従うことを条件とする。記載された範囲が、これらの限界値の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界値の一方または両方を除外する範囲も、請求された主題に含まれる。これは、範囲の広さに関わらずあてはまる。

【0317】

本明細書において使用される用語「約（または概ね）」は、当業者に容易に分かるそれぞれの値についての通常の誤差範囲を表す。本明細書における値またはパラメーターの「約」への言及は、その値またはパラメーター自体に向けられた態様を含む（および説明する）。例えば、「約X」に言及する説明は、「X」の説明を含む。

【0318】

本明細書において使用される組成物は、細胞を含む、2つ以上の産物、物質、または化合物の任意の混合物を表す。これは、溶液、懸濁物、液体、粉末、ペースト、水性、非水性またはその任意の組み合わせであり得る。

【0319】

本明細書において使用される、細胞または細胞集団が特定のマーカーについて「陽性」

10

20

30

40

50

であるという記載は、細胞上または細胞中に特定のマーカー、典型的には表面マーカーが検出可能に存在することを表す。表面マーカーに言及する場合、該用語は、フローサイトメトリーによって、例えばマーカーと特異的に結合する抗体を用いて染色し、抗体を検出することによって検出される表面発現の存在を表し、その際、染色は、フローサイトメトリーによって、アイソタイプがマッチする対照を用いて同じ手順を実施し、その他は同一の条件で検出された染色を実質的に超えるレベルで、および／または該マーカーについて陽性であることが公知の細胞についてのレベルと実質的に類似のレベルで、および／または該マーカーについて陰性であることが公知の細胞についてのレベルよりも実質的に高いレベルで、検出可能である。

【0320】

本明細書において使用される、ある細胞または細胞集団が特定のマーカーに関して「陰性」であるという記載は、その細胞上またはその細胞中における特定のマーカー（典型的には表面マーカー）が実質的に検出可能には存在しないことを表す。表面マーカーに関する場合、この用語は、フローサイトメトリーによって（例えば、マーカーと特異的に結合する抗体を用いて染色し、当該抗体を検出することによって）検出される表面発現が存在しないことを表し、この場合、染色は、アイソタイプがマッチする対照を他の点では同一な条件下で用いて同じ手順を実施することで検出される染色を実質的に上回るレベルで、および／またはそのマーカーに関して陽性であることがわかっている細胞でのレベルよりも実質的に低いレベルで、および／またはそのマーカーに関して陰性であることがわかっている細胞でのレベルと比較して実質的に類似するレベルでは、フローサイトメトリーによって検出されない。

10

【0321】

本明細書において使用される用語「発現」は、ポリペプチドが、遺伝子などの核酸分子のコード配列に基づき產生される工程を表す。工程は、転写、転写後制御、転写後修飾、翻訳、翻訳後制御、翻訳後修飾、またはその任意の組み合わせを含み得る。

20

【0322】

本明細書において使用される対象は、ヒトおよび他の哺乳動物などの任意の生きた生物を含む。哺乳動物には、ヒト、ならびに農用動物、競技動物、げっ歯動物およびペットを含む非ヒト動物が非限定的に含まれる。

【0323】

30

本明細書において使用される対照は、試験パラメーターで処置されないことを除き試験試料と実質的に同一の試料を表し、または、対照が血漿試料ならば、対照は、関心対象の状態に冒されていない正常志願者からのものであることができる。対照は、内部対照であることもできる。

【0324】

本明細書において使用される「機能的に連結されている」は、適切な分子（例えば、転写活性化因子タンパク質）が調節配列と結合しているときに遺伝子発現を可能にするような、DNA配列（例えば、異種核酸）および調節配列などの構成成分の相互作用を表す。したがって、それは、記載されている構成成分が、それらが意図されたように機能するのを可能にする関係にあることを意味する。

40

【0325】

本明細書において使用される「配列同一パーセント（%）」および「同一パーセント」は、ヌクレオチド配列（基準ヌクレオチド配列）またはアミノ酸配列（基準アミノ酸配列）に関して使用されるとき、配列をアライメントし、ギャップを導入し、必要であれば最大配列同一パーセントを達成した後、候補配列において、基準配列における残基と同一のヌクレオチド残基またはアミノ酸残基のそれぞれのパーセンテージとして定義される。配列同一パーセントを決定するためのアライメントは、当技術分野の技能の範囲内である様々な方法で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者は、比較されている配列の全長にわたる最大アライメントを達成するために

50

必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアライメントするために適切なパラメーターを決定することができる。

【 0 3 2 6 】

本明細書において使用される用語「ベクター」は、それが繋がっている別の核酸を増やすことができる核酸分子を表す。本用語は、自己複製核酸構造としてのベクターおよびそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み入れられたベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが機能的に連結されている核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。ベクターの中には、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

【 0 3 2 7 】

特に定義しない限り、本明細書において使用される全ての専門用語、記号ならびに他の技術的および科学的な用語または術語は、請求された主題が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有することが意図される。場合によっては、一般に理解される意味を有する用語が、明確さおよび／または素早い参照のために本明細書において定義されるが、本明細書におけるそのような定義の包含は、必ずしも当技術分野において一般的に理解されるものとの実質的な差を表すものと解釈されるべきではない。

【 0 3 2 8 】

本出願において参照される特許文書、科学文献、およびデータベースを含めた全ての刊行物は、各個別の刊行物が個別に参照により組み入れられた場合と同程度に、全ての目的のためにそれらの全体で参照により組み入れられる。本明細書において示される定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、出願、公開された出願、および他の刊行物に示されている定義と正反対またはその他の点で矛盾するならば、参照により本明細書に組み入れられる定義よりも、本明細書に示されている定義が優先される。

【 0 3 2 9 】

本明細書において使用されるセクションの見出しあは、単に構成のためであり、説明される主題を限定するものと見なされるべきではない。

【 0 3 3 0 】

VI. 例示的な態様

提供される態様の中に以下が含まれる。

1. a) 第1のペプチド；

b) 第2のペプチド；ならびに

c) 該第1のペプチドと該第2のペプチドを接続している連結領域であって、標的分子と結合する標的化部分を含む、連結領域を含む、免疫調節ポリペプチド。

2. 前記第1および第2のペプチドのうちの少なくとも1つが、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはサイトカインもしくはケモカインの機能的部分である、態様1の免疫調節ポリペプチド。

3. 前記第1のペプチドが、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはサイトカインもしくはケモカインの機能的部分である、態様1または態様2の免疫調節ポリペプチド。

4. 前記第2のペプチドが、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはサイトカインもしくはケモカインの機能的部分である、態様1～3のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

5. 前記第1および第2のペプチドの両方が独立して、サイトカインもしくはケモカイン、サイトカインもしくはケモカインのサブユニット、またはサイトカインもしくはケモカインの機能的部分である、態様1～4のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

6. 前記第1のペプチドおよび第2のペプチドが、同じサイトカインもしくはケモカイン、またはその機能的部分、または同じサイトカインもしくはケモカインの同じサブユニットである、態様1～5のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

7. 前記第1および第2のペプチドが、異なるサイトカインもしくはケモカインまたはそ

10

20

30

40

50

れらの機能的部分、あるいは同じもしくは異なるサイトカインもしくはケモカインの異なるサブユニットである、態様1～5のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

8. 前記第1のペプチドが、サイトカインまたはケモカインの第1のサブユニットであり、前記第2のペプチドが、サイトカインまたはケモカインの第2のサブユニットである、態様1～7のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

9. 前記サイトカインまたはケモカインが単量体である、態様1～7のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

10. 前記第1および／または第2のペプチドが独立して、多量体タンパク質であるサイトカインまたはケモカインのサブユニットを含む、態様1～8のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

11. 前記第1または第2のペプチドが、タグまたは標識である、態様1～4のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

12. a) サイトカインもしくはケモカインの第1のサブユニットまたはその機能的部分を含む、第1のペプチド；

b) サイトカインもしくはケモカインの第2のサブユニットまたはその機能的部分を含む、第2のペプチド；ならびに

c) 第1のペプチドと第2のペプチドを接続している連結領域であって、標的分子と結合する標的化部分を含む、連結領域を含む、免疫調節ポリペプチド。

13. 前記サイトカインまたはケモカインが、ホモ二量体またはヘテロ二量体である、態様1～8、10および12のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

14. 前記連結領域が、前記標的化部分を前記第1または第2のペプチドと繋いでいる少なくとも1つのポリペプチドリンクーをさらに含む、態様1～13のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

15. 前記サイトカインもしくはケモカインまたはそのサブユニットもしくは機能的部分が、IL-12、IL-15、IL-2、IL-18、GM-CSF、IL-7、IL-21、IFN、IFN、IFN、IL-17、IL-23、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-27、エリスロポエチン、G-CSF、成長ホルモン、プロラクチン、オンコスタチンM、および白血病抑制因子、またはそれらのサブユニットもしくは機能的部分からなる群より選択される、態様2～14のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

16. 前記第1または第2のペプチドが独立して、IL-12、IL-23、IL-27およびIL-35より選択されるサイトカインもしくはケモカインのサブユニットまたはそれらの機能的部分を含む、態様1～15のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

17. 前記第1または第2のペプチドが独立して、IL-12のサブユニットまたはその機能的部分である、態様1～7および9～16のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

18. 前記第1のペプチドが、IL-12 p35サブユニットもしくはIL-12 p40サブユニットまたはそれらの機能的部分を含み、前記第2のペプチドが、該IL-12 p35サブユニットおよびIL-12 p40サブユニットの他方またはその機能的部分を含む、態様17の免疫調節ポリペプチド。

19. a) IL-12のp35サブユニットまたはその機能的部分を含む第1のペプチド；

b) IL-12のp40サブユニットまたはその機能的部分を含む第2のペプチド；ならびに

c) 該第1のペプチドと該第2のペプチドを接続している連結領域であって、標的分子と結合する標的化部分を含む、連結領域を含む、免疫調節ポリペプチド。

20. 前記p35サブユニットが、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み、かつ／または前記p40サブユニットが、SEQ ID NO:11に示されるアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、態様18または態様19の免疫調節ペプチド。

21. 前記連結領域が、前記標的化部分を前記p35サブユニットまたは前記p40サブユニットと繋いでいる少なくとも1つのポリペプチドリンクーをさらに含む、態様18～20のい

10

20

30

40

50

ずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

22. 前記ポリペプチドリンカーが、アミノ酸を約2～約20個含む、態様14～18および21のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

23. 前記ポリペプチドリンカーが、配列GGGGS(n) [配列中、nは、1～5である] (SEQ ID NO:29) を含む、態様14～18および21～22のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

24. 前記ポリペプチドリンカーが、SEQ ID NO:7～9のいずれかに示される配列を含む、態様23の免疫調節ポリペプチド。

25. 前記連結領域が、2つのポリペプチドリンカーを含む、態様1～24のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

26. 前記標的化部分が、第1のポリペプチドリンカーと第2のポリペプチドリンカーとの間に含まれる、態様1～25のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

27. 前記標的分子が、疾患または障害に関連する、態様1～26のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

28. 前記疾患または障害が、感染性疾患もしくは障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、または腫瘍もしくはがんである、態様27の免疫調節ポリペプチド。

29. 前記標的分子が、腫瘍に関連するか、または腫瘍上に存在する、態様1～28のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

30. 前記標的分子が、腫瘍抗原である、態様1～29のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

31. 前記標的分子が、肝細胞増殖因子 (HGF)、肝細胞増殖因子受容体 (HGFR)、ヘパリン、VEGF、VEGF-A、VEGFR2、VEGFR3、HER2、PD-1、テネイシン-C、CTLA-4、LAG3、PD-L1、EGFR、EPCAM、RANKL、NG2プロテオグリカン、CD20、CD52、CD19、CD3、CD30、IL-6、CD38、SLAMF7、GD2、CD13、CD274、CD279、CD40L、およびCD47からなる群より選択される、態様1～30のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

32. 前記標的化部分が、アミノ酸を約3～約300個、約3～約100個、約3～約20個、約6～約20個、または約10個含む、態様1～31のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

33. 前記標的化部分が、前記標的分子との結合に関して、 $\text{約}0.5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}2 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}3 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}4 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}1.5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}2 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}4 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 、 $\text{約}5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 以上、 $\text{約}1 \times 10^{-2} \text{ sec}$ 以上、または $\text{約}5 \times 10^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 以上である k_{off} 速度を示す、態様1～32のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

34. 前記標的化部分が、抗体または抗体フラグメントであるかまたはそれを含む、態様1～33のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

35. 前記抗体フラグメントが、単鎖フラグメントである、態様34の免疫調節ポリペプチド。

36. 前記抗体フラグメントが、重鎖可変領域を含む單一ドメイン抗体である、態様34または態様35の免疫調節ポリペプチド。

37. 前記抗体フラグメントが、可動性リンカーによって連結された抗体可変領域を含む、態様34または態様35の免疫調節ポリペプチド。

38. 前記抗体フラグメントが、scFvを含む、態様34～37のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

39. 前記標的化部分が、トラスツズマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、アテゾリズマブ、ベバシズマブ、パニツムマブ、セツキシマブ、ネシツムマブ、デノスマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、オビヌツズマブ、アレムツズマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、シルツキシマブ、イピリムマブ、ダラツムマブ、エロツズマブ、ジヌツキシマブ、カツマキソマブからなる群より選択される抗体の可変重(VH)鎖および/または可変軽(VL)鎖を含む、態様1～38のいずれか一つ

10

20

30

40

50

の免疫調節ポリペプチド。

40. 前記標的化部分が、抗EPCAM抗体のV_H鎖および／またはV_L鎖を含む、態様1～39のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

41. 前記標的化部分が、SEQ ID NO:17、24もしくは25に示される配列、またはSEQ ID NO:17、24もしくは25と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み、かつ前記標的分子と結合する、態様1～40のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

42. SEQ ID NO:6に示される配列、または該配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、態様1～41のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

43. 前記標的化部分が、ペプチド結合モチーフであるかまたはそれを含む、態様1～33のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。 10

44. 前記標的化部分が、ヘパリン結合ペプチドである、態様1～33および43のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

45. 前記ヘパリン結合ペプチド(HBP)が、フィブロネクチンもしくはBMP4に由来し、かつ／またはウシ由来である、態様44の免疫調節ポリペプチド。

46. 前記標的化部分が、肝細胞増殖因子(HGF)結合ペプチド、VEGF結合ペプチド、VEGFR-A結合ペプチド、VEGFR2結合ペプチド、EPCAM結合ペプチド、HER2結合ペプチド、PD-1結合ペプチド、テネイシン-C結合ペプチド、CTLA-4結合ペプチド、LAG3結合ペプチド、PD-L1結合ペプチド、EGFR結合ペプチド、RANKL結合ペプチド、CD20結合ペプチド、CD52結合ペプチド、CD19結合ペプチド、CD3結合ペプチド、CD30結合ペプチド、IL-6結合ペプチド、CD38結合ペプチド、SLAMF7結合ペプチド、GD2結合ペプチド、CD274結合ペプチド、CD279結合ペプチド、CD40L結合ペプチド、およびCD47結合ペプチドからなる群より選択される、態様1～33、および43のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。 20

47. 前記標的化部分が、HGF結合ペプチドまたはEGFR結合ペプチド(EGFRBP)を含む、態様1～33、43および46のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

48. 前記標的化部分が、SEQ ID NO:13、14、15、16、26、27もしくは28のいずれかに示される配列、またはSEQ ID NO:13、14、15、16、26、27もしくは28のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み、かつ前記標的分子と結合する、態様1～33および43～47のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

49. SEQ ID NO:1～5のいずれかに示される配列、またはSEQ ID NO:1～5のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、態様1～33および43～48のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。 30

50. 基準IL-12と比較して増大した、IL-12Rを介して刺激する活性を示す、態様1～49のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

51. 前記基準IL-12が、連結領域を含まないか、またはSEQ ID NO 7～9のうちのいずれか1つに示される配列からなる連結領域を含む、態様50の免疫調節ポリペプチド。

52. 前記標的分子を発現していない細胞に対するその結合性と比較して増大した、前記標的分子を発現している標的細胞に対する結合性を示す、態様1～51のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

53. 前記活性および／または結合性の増大が、1.2倍よりも大きい、1.5倍よりも大きい、2.0倍よりも大きい、3.0倍よりも大きい、4.0倍よりも大きい、5.0倍よりも大きい、または10.0倍よりも大きい増大である、態様50～52のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。 40

54. 前記連結領域を含有しない組換え免疫調節ポリペプチドよりも増大した、減少した、または類似の結合親和性で1つまたは複数の同族受容体と結合する、態様1～53のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

55. 10⁻⁵Mもしくは約10⁻⁵M～10⁻¹⁵Mもしくは約10⁻¹⁵M、10⁻⁶M～10⁻¹²Mもしくは約10⁻¹²M、10⁻⁷Mもしくは約10⁻⁷M～10⁻¹¹Mもしくは約10⁻¹¹M、10⁻⁶Mもしくは約10⁻⁶M～10⁻⁸Mもしくは約10⁻⁸M、または10⁻⁷Mもしくは約10⁻⁷M～10⁻⁸Mもしくは約10⁻⁸Mの範囲の平衡解離定数(K_D)で1つまたは複数の同族受容体と結合する、態様1

10

20

30

40

50

~54のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

56. 100、50、40、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、もしくは0.1nM、または概ねそれらの値、またはそれらの値未満、または概ねそれらの値未満であるか；あるいは

1nM、100ピコモル濃度(pM)、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM、もしくは1pM、または概ねそれらの値、またはそれらの値未満、または概ねそれらの値未満であるK_Dで1つまたは複数の同族受容体と結合する、態様1~54のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド。

57. 態様1~56のいずれか一つの免疫調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

58. シグナル配列をさらに含む、態様57のポリヌクレオチド。

59. 前記シグナル配列が、CD33由来のシグナルペプチドをコードする、態様58のポリヌクレオチド。

60. 前記シグナルペプチドが、SEQ ID NO:18に示される配列、または該配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、態様59のポリヌクレオチド。

61. 前記免疫調節ポリペプチドの発現を制御するために機能的に連結されている少なくとも1つのプロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターをさらに含む、態様57~60のいずれか一つのポリヌクレオチド。

62. 前記免疫調節ポリペプチドの発現が、誘導性または条件的である、態様61のポリヌクレオチド。

63. 前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、T細胞活性化因子である、態様61または62のポリヌクレオチド。

64. 前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、1つまたは複数のT細胞転写因子に対する結合部位を含有する、態様61~63のいずれか一つのポリヌクレオチド。

65. 前記T細胞転写因子が、活性化T細胞核内因子(NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2、および／またはNF-Bである、態様64のポリヌクレオチド。

66. 前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターの活性化が、条件的、任意で誘導性のプロモーター、エンハンサー、もしくはトランスアクチベーター、または抑制性のプロモーター、エンハンサー、もしくはトランスアクチベーターである、態様61または態様62のポリヌクレオチド。

67. 前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件の存在下で活性である、態様61、62、または66のいずれか一つのポリヌクレオチド。

68. 前記腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件が、低酸素、低グルコース、酸性pH、または酸化ストレスより選択される、態様67のポリヌクレオチド。

69. 前記腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件が、低酸素である、態様67または68のポリヌクレオチド。

70. 前記ポリヌクレオチドが、プロモーターに機能的に連結されており、該プロモーターが、HIF-1-アルファ応答性プロモーターである、態様61、62、または66~69のいずれか一つのポリヌクレオチド。

71. 前記ポリヌクレオチドが、プロモーターに機能的に連結されており、該プロモーターが、1つまたは複数の低酸素応答エレメントを含む、態様61、62、または66~70のいずれか一つのポリヌクレオチド。

72. 前記低酸素応答エレメントが、配列5'-(A/G)CGT(G/C)(G/C)-3'を含む、態様71のポリヌクレオチド。

73. 前記プロモーターが、エリスロポエチン(Epo)、VEGF-A、ホスホグリセリン酸キナーゼ1(PGK1)、乳酸デヒドロゲナーゼA(LDH A)、アルドラーゼA(ALDA)またはグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のプロモーターである、態様70~72のいずれか一つのポリヌクレオチド。

74. 前記プロモーターが、SEQ ID NO:85~90のいずれかに示される、態様73のポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチド。

75. 前記腫瘍微小環境に存在する1つまたは複数の条件が、低グルコースである、態様67または68のポリヌクレオチド。

76. GRP78またはヘキソキナーゼIIのプロモーターであるプロモーターに機能的に連結されている、態様61、62、66～68、または75のいずれか一つのポリヌクレオチド。

77. 前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、放射線によって、熱によって、または薬物の存在下で誘導可能である、態様61、62、または66のいずれか一つのポリヌクレオチド。

78. 前記プロモーターが、放射線誘導性プロモーターである、態様77のポリヌクレオチド。 10

79. 前記放射線誘導性プロモーターが、CArGエレメントまたはCC(A+Tリッチ)₆GGモチーフを含む、態様77のポリヌクレオチド。

80. 前記放射線誘導性プロモーターが、EGR-1、Waf-1、RecA、もしくはcIAP2プロモーターまたは合成プロモーターである、態様78または79のポリヌクレオチド。

81. 前記放射線誘導性プロモーターが、SEQ ID NO 92～95に示される配列のいずれかを含む合成プロモーターである、態様78～80のいずれか一つのポリヌクレオチド。

82. 前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、熱誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターである、態様77のポリヌクレオチド。

83. 前記熱誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、熱ショックエレメント(HSE)を含む、態様82のポリヌクレオチド。 20

84. 前記熱誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、熱ショックプロモーター(HSP)である、態様83のポリヌクレオチド。

85. 前記HSPが、HSP70Bプロモーターである、態様84のポリヌクレオチド。

86. 前記熱誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、Gadd153プロモーターである、態様73のポリヌクレオチド。

87. 前記プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、薬物誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターである、態様77のポリヌクレオチド。

88. 前記誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列、ガラクトースオペレーター配列もしくはドキシサイクリンオペレーター配列、ラバマイシンオペレーター配列、タモキシフェンオペレーター配列、もしくはホルモン応答性オペレーター配列、またはそれらの類似体を含む、態様66または態様87のポリヌクレオチド。 30

89. 前記誘導性プロモーターが、テトラサイクリン応答エレメント(TRE)を含む、態様66、87または88のいずれか一つのポリヌクレオチド。

90. 前記薬物誘導性プロモーター、エンハンサー、またはトランスアクチベーターが、多剤耐性(mdr1)遺伝子プロモーターを含む、態様87のポリヌクレオチド。

91. 単一の核酸配列を含む、態様57～90のいずれか一つのポリヌクレオチド。

92. 前記免疫調節ポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、組換え受容体をコードする第2の核酸配列とを含む、態様57～90のいずれか一つのポリヌクレオチド。 40

93. 前記組換え受容体が、キメラ抗原受容体(CAR)であるかまたはそれを含む、態様92のポリヌクレオチド。

94. 前記免疫調節ポリペプチドおよび/または前記組換え受容体の発現を制御するために機能的に連結されている少なくとも1つのプロモーターをさらに含む、態様92または態様93のポリヌクレオチド。

95. 前記ポリヌクレオチドが、前記第1の核酸配列と前記第2の核酸配列との間に配列内リボソーム進入部位(IRES)または連結ペプチドをコードする核酸配列をさらに含み、該連結ペプチドが、翻訳中または翻訳後に該第1および第2の核酸配列の翻訳産物を分離する、態様92～94のいずれか一つのポリヌクレオチド。 50

96. 前記連結ペプチドが、自己切斷型ペプチド、またはリボソームスキッピングを引き起こすペプチド、任意でT2Aペプチドを含む、態様95のポリヌクレオチド。

97. CpGモチーフを除去するために最適化されており、かつ／またはコドン最適化されている、態様57～96のいずれか一つのポリヌクレオチド。

98. ヒトコドンに最適化されている、態様97のポリヌクレオチド。

99. 態様57～98のいずれか一つのポリヌクレオチドを含むベクター。

100. ウイルスベクターである、態様99のベクター。

101. レトロウイルスベクターである、態様99または態様100のベクター。

102. レンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターである、態様99～101のいずれか一つのベクター。

103. 態様1～56のいずれか一つの免疫調節ポリペプチドを含む、操作された細胞。

104. 態様57～98のいずれか一つのポリヌクレオチドを含む、操作された細胞。

105. 態様99～102のいずれか一つのベクターを含む、操作された細胞。

106. 前記免疫調節ポリペプチドを分泌する、態様103～105のいずれか一つの操作された細胞。

107. 組換え受容体をさらに含む、態様103～106のいずれか一つの操作された細胞。

108. 前記組換え受容体が、疾患または障害に関連する標的抗原と結合する、態様107の操作された細胞。

109. 前記疾患または障害が、感染性疾患もしくは障害、自己免疫疾患、炎症性疾患、または腫瘍もしくはがんである、態様108の操作された細胞。

110. 前記標的抗原が、腫瘍抗原である、態様108または態様109の操作された細胞。

111. 前記標的抗原が、ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソセリン、CEA、B型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カッパ軽鎖、ルイスY、L1-細胞接着分子、MAGE-A1、メソセリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、腫瘍胎児抗原、TAG72、VEGF-R2、VEGFR3、がん胎児抗原（CEA）、前立腺特異抗原、PSMA、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1（WT-1）、およびサイクリンA1（CCNA1）からなる群より選択される、態様108～110のいずれか一つの操作された細胞。

112. 前記標的化部分が、ヒトのものであるか、またはヒトタンパク質由来である、態様103～111のいずれか一つの操作された細胞。

113. 前記免疫調節タンパク質が、それが投与される対象において免疫原性がなく、かつ／または免疫応答を誘導しない、態様103～112のいずれか一つの操作された細胞。

114. 前記組換え受容体が、機能性非TCR抗原受容体またはトランスジェニックTCRである、態様107～113のいずれか一つの操作された細胞。

115. 前記組換え受容体が、キメラ抗原受容体（CAR）である、態様107～114のいずれか一つの操作された細胞。

116. 前記組換え受容体が、抗原結合ドメインを含む細胞外部分を含む、態様107～115のいずれか一つの操作された細胞。

117. 前記抗原結合ドメインが、抗体または抗体フラグメントであるかまたはそれを含む、態様116の操作された細胞。

118. 前記抗体フラグメントが、単鎖フラグメントである、態様117の操作された細胞。

119. 前記フラグメントが、可動性リンカーによって連結された抗体可変領域を含む、態様117または態様118の操作された細胞。

120. 前記フラグメントが、scFvを含む、態様117～119のいずれか一つの操作された細胞。

121. 前記組換え受容体が、細胞内シグナル伝達領域を含む、態様107～120のいずれか一つの操作された細胞。

10

20

30

40

50

122. 前記細胞内シグナル伝達領域が、細胞内シグナル伝達ドメインを含む、態様121の操作された細胞。

123. 前記細胞内シグナル伝達ドメインが、一次シグナル伝達ドメイン、T細胞において一次活性化シグナルを誘導することができるシグナル伝達ドメイン、T細胞受容体（TCR）構成成分のシグナル伝達ドメイン、および／または免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を含むシグナル伝達ドメインであるかまたはそれらを含む、態様122の操作された細胞。

124. 前記細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3鎖の細胞内シグナル伝達ドメイン、任意でCD3-ゼータ（CD3 ζ ）鎖の細胞内シグナル伝達ドメイン、またはそのシグナル伝達部分であるかまたはそれを含む、態様122の操作された細胞。 10

125. 前記細胞外部分と前記細胞内シグナル伝達領域との間に配置された膜貫通ドメインをさらに含む、態様122～124のいずれか一つの操作された細胞。

126. 前記細胞内シグナル伝達領域が、共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、態様122～125のいずれか一つの操作された細胞。

127. 前記共刺激シグナル伝達ドメインが、T細胞共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインまたはそのシグナル伝達部分を含む、態様126の操作された細胞。

128. 前記共刺激シグナル伝達ドメインが、CD28、4-1BB、もしくはICOSの細胞内シグナル伝達ドメイン、またはそのシグナル伝達部分を含む、態様126または態様127の操作された細胞。

129. 前記共刺激シグナル伝達ドメインが、前記膜貫通ドメインと前記細胞内シグナル伝達ドメインとの間にある、態様126～128のいずれか一つの操作された細胞。 20

130. T細胞である、態様103～129のいずれか一つの操作された細胞。

131. CD8 $^{+}$ T細胞またはCD4 $^{+}$ T細胞である、態様103～130のいずれか一つの操作された細胞。

132. 操作されていない細胞と比較して、または組換え受容体を含むが前記免疫調節ポリペプチドを含まない細胞と比較して、増大した持続性および／または生存を示す、態様103～131のいずれか一つの操作された細胞。

133. 基準IL-12と比較して増大した、IL-12Rを介して刺激する活性を示す、態様103～132のいずれか一つの操作された細胞。

134. 前記基準IL-12が、連結領域を含まないか、またはSEQ ID NO 7～9に示される配列のいずれかからなる連結領域を含む、態様133の操作された細胞。 30

135. 前記標的分子を発現していない細胞に対するその結合性と比較して増大した、前記標的分子を発現している標的細胞に対する結合性を示す免疫調節ポリペプチドを分泌する、態様103～134のいずれか一つの操作された細胞。

136. 前記標的分子を発現していない細胞の死滅と比較して増大した、前記標的分子を発現している標的細胞の死滅をもたらす、態様103～135のいずれか一つの操作された細胞。

137. 前記増大した持続性、活性、結合性、および／または死滅が、サブユニット間にポリペプチドリンクターを含むが前記標的化部分を含まない免疫調節ポリペプチドを発現または分泌している基準の操作された細胞によってもたらされるものよりも多大である、態様132～136のいずれか一つの操作された細胞。 40

138. 態様1～56のいずれか一つの免疫調節ポリペプチドを含む組成物。

139. 態様103～137のいずれか一つの操作された細胞を含む組成物。

140. 薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、態様138または態様139の組成物。

141. 態様1～56のいずれか一つの免疫調節ポリペプチド、態様103～137のいずれか一つの操作された細胞、または態様138～140のいずれか一つの組成物を、疾患または障害を有する対象に投与することを含む、治療方法。

142. 前記免疫調節ポリペプチドが、前記疾患または障害に関連する細胞が発現する標的分子と特異的に結合する、態様141の方法。

143. 前記操作された細胞が、前記疾患または状態に関連する抗原と特異的に結合する 50

組換え受容体を発現する、態様141または態様142の治療方法。

144. 前記疾患または障害が、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは障害、または感染性疾患である、態様141～143のいずれか一つの方法。

【実施例】

【0331】

VII. 実施例

以下の実施例は、例証のためだけに含まれるのであって、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0332】

実施例1：IL-12免疫調節ポリペプチドの設計

10

例えば標的分子またはモチーフを発現している細胞において、または当該細胞の近くに、または当該細胞に関して特定の方向に、ポリペプチドを標的化する、局在化させる、または方向付けるのに使用するための、特定の標的分子またはモチーフと特異的に結合する1つまたは複数の標的化部分を含む単鎖IL-12 (scIL-12) 免疫調節ポリペプチドを設計した。標的化部分を含有するポリペプチドリンカーによって、および任意で標的化部分をIL-12のサブユニットと連結する1つまたは複数のG4S(3)ペプチドリンカー (SEQ ID NO:7) によって連結された、IL-12のp35サブユニット (SEQ ID NO:10に示される) およびp40サブユニット (SEQ ID NO:11に示される) をコードする単鎖配列として、構築物を合成した。

【0333】

20

表3は、BMP4のヘパリン結合ペプチド (HBP BMP4 ; SEQ ID NO:13)、フィブロネクチンのヘパリン結合ペプチド (HBP FBN、SEQ ID NO:14)、肝細胞増殖因子結合ペプチド (HGFBP、SEQ ID NO:15)、上皮増殖因子受容体結合ペプチド (EGFRBP ; SEQ ID NO:16)、または抗EPCAM scFv抗体 (SEQ ID NO:17) のいずれかに由来する様々な標的化部分を含有する例示的なIL-12免疫調節ポリペプチドの配列を示す。ポリペプチドリンカーがG4S(3)リンカー (SEQ ID NO:9に示される) のみを含有し、サブユニット同士を連結する標的化部分を含有しない、対照ポリペプチド (scIL-12と呼ぶ) も設計した。細胞で発現させたときに免疫調節タンパク質を分泌するためのCD33由來のN末端シグナル配列

(MPLLLLLPLLWAGALAM, SEQ ID NO:18)

30

をコードする各配列も設計した。いくつかの場合において、C末端に1つまたは複数のタグ (例えば、6×Hisタグ、SEQ ID NO:20；またはStrep-tag (登録商標) II、SEQ ID NO:21) を含ませた。

【0334】

(表3) 例示的なIL-12免疫調節ポリペプチド

40

50

名称	標的化部分	配列	SEQ ID NO.
scIL-12	なし	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLCDTPEEDGITWLQSS EVLSGKTLIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWWLTTISTDLTSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVECQEDSACP AAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPLNLQLKPL KNSRQVEVSWEPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEASVPCSGGGGS GGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQT LEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFIT NGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMVQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	1
scIL-12-HBP BMP4	HBP, BMP4	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLCDTPEEDGITWLQSS EVLSGKTLIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWWLTTISTDLTSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVECQEDSACP AAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPLNLQLKPL KNSRQVEVSWEPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEASVPCSGGGSRK KNPNCRRHGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQ KARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMVQVEFKTMNAK LLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFY KTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	2
scIL-12-HBP FBN	HBP FBN	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLCDTPEEDGITWLQSS EVLSGKTLIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWWLTTISTDLTSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVECQEDSACP AAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPLNLQLKPL KNSRQVEVSWEPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEASVPCSGGGSKN NQKSEPLIGRKKTGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNES CLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMVQVEFKT MNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLE EPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	3
scIL-12-HGFBP	HGFBP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLCDTPEEDGITWLQSS EVLSGKTLIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWWLTTISTDLTSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVECQEDSACP AAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPLNLQLKPL KNSRQVEVSWEPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEASVPCSGGGGS WNWVCFRDVGCDWVLGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLL RAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT	4

10

20

30

40

50

		KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKS SLEEPDFYTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	
scIL-12-EGFRBP	EGFRBP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLLTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACP AAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFRDIKPDPPLNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEASVPCSGGGGSV DNPHVCGGGSRNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVNMLQK ARQTEFYPCTSEEIDHEDITDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	5
scIL-12-抗EPCAM	抗EPCAM	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLLTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACP AAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFRDIKPDPPLNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEASVPCSGGGGSV QLVSGAEVKPGSSVKVSKASGGTFSSY AISVVVRQAPGQQGLE WMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGLLWNYWGQGTLTVTSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARV ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAVVYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTSSLQSEDFAVYYCQQY NNWPPGFTFGPGTKVDIKGGGSRNLPVATPDPMFPCLHHSQN LLRAVNMLQKARQTEFYPCTSEEIDHEDITDKTSTVEACLPLE LTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQ VEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQ KSSLEEPDFYTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	6

10

20

【0335】

実施例2：免疫調節ポリペプチドによるIL-12媒介細胞刺激の評価

IL-12受容体（IL-12R）を発現している細胞からのサイトカインの分泌を刺激する活性について、実施例1に記載した例示的なIL-12免疫調節ポリペプチドであるscIL-12-HBP FBN（SEQ ID NO:3）およびscIL-12-EGFRBP（SEQ ID NO:5）を試験した。対照として、そのリンカーに組み入れられた標的化部分を含有しないscIL-12（SEQ ID NO:1）、または組換えヒトIL-12（rHuIL-12）（R&D Systems）を使用した。

30

【0336】

IL-12受容体（IL-12R）の表面発現をアップレギュレートするために、末梢血単核細胞（PBMC）をフィトヘマグルチニン（PHA）で刺激してPHA芽球を発生させた。漸増する濃度の様々な免疫調節ポリペプチドまたは0～25ng/mLの範囲の濃度の対照でPHA芽球を刺激した。細胞の刺激の24時間後および72時間後に、上清を収集し、ELISAによってインターフェロンガンマ（IFN）またはGM-CSFを測定した。結果を図1に示す。

40

【0337】

図1に示すように、IL-12免疫調節ポリペプチドまたは対照でPHA芽球を刺激した後に、用量依存的なIFN およびGM-CSFの増加が観察された。刺激の24時間後に、試験ポリペプチドscIL-12-HBP FBNおよびscIL-12-EGFRBPで処理されたPHA芽球、ならびにscIL-12対照ポリペプチドで処理されたPHA芽球は、様々な濃度にわたって、rHuIL-12で処理されたPHA芽球と類似のレベルのIFN およびGM-CSFを示した。しかし、刺激の72時間後では、IFN およびGM-CSFのレベルは、rHuIL-12で刺激されたPHA芽球と比較して、各单鎖ポリペプチド（scIL-12-HBP FBN、scIL-12-EGFRBP、またはscIL-12 G4S(3)ポリペプチド）で刺激されたPHA芽球の方が実質的に高かった。結果から、ポリペプチドリンカーによって連結されたp35およびp40サブユニットを含み、任意で標的化部分を含

50

む、単鎖形態のIL-12免疫調節ポリペプチドは、rHuIL-12よりも強力な免疫細胞活性化因子であり得ることが実証された。

【 0 3 3 8 】

実施例3：IL-12免疫調節ポリペプチドで刺激した後のT細胞増殖の評価

3人のヒトドナー対象から免疫親和性に基づいた富化によりT細胞を単離し、各ドナーからの細胞を活性化させ、これに抗CD19 CARをコードするウイルスベクターを形質導入した。CARは、抗CD19 scFv、Ig由来スペーサー、ヒトCD28由来膜貫通ドメイン、ヒト4-1BB由来細胞内シグナル伝達ドメインおよびヒトCD3ゼータ由来シグナル伝達ドメインを含有していた。96ウェルのポリ-D-リシンコーティングプレート中、3つ組で20,000個/ウェルのCD19発現標的細胞（CD19を発現するように形質導入されたK562細胞、K562-CD19）を様々なCAR発現T細胞と共に（様々なエフェクター:標的比（5:1、2.5:1、1:1）で、単独で、または実施例1記載の例示的なscIL-12-HBP FBN（SEQ ID NO:3）免疫調節ポリペプチド（0.5ng/mLまたは5ng/mLのいずれか）の存在下で）インキュベートした。scIL2なしの標的細胞の存在下でのインキュベーションを「未処理」対照として使用した。

【 0 3 3 9 】

刺激後5日目と比較した刺激前の0日目の総細胞数の変化倍率を決定した。図2に示すように、未処理対照細胞と比較して、0.5または5ng/mLのscIL-12-HBP FBNの存在下で処理された細胞において、試験された全てのE:T比で細胞数のより大きな増加が観察されたが、これは、抗原を発現する標的細胞の存在下で免疫調節ポリペプチドが細胞増殖および/または生存を増強できることと一致していた。

【 0 3 4 0 】

実施例4：IL-12免疫調節ポリペプチドに曝露した後のT細胞の殺滅活性

CD19を発現するK562-CD19標的細胞を抗CD19-CAR発現T細胞と共に、実施例3に記載のように5:1、2.5:1、および1:1を含む様々なE:T比で共培養した。0.5または5ng/mLの実施例1に記載のscIL-12-HBP FBN（SEQ ID NO:3）の存在下で共培養物をインキュベートするか、または未処理のままとした。アポトーシス細胞を検出するために共培養物にIncuCyte（商標）蛍光カスパーゼ3/7試薬を添加することによって、0～約110時間の時間経過にわたってリアルタイムで細胞溶解をモニタリングした。経時的な自動画像分析により標的細胞死を定量した。各濃度について経時的な蛍光シグナルの曲線下面積（AUC）を決定した。式：1/AUCを使用して死滅指數を決定した。

【 0 3 4 1 】

図3は、各試験条件についての死滅指數を示す。図3に示すように、scIL-12-HBP FBNポリペプチドの存在下での細胞刺激は、全てのE:T比で、対照である未処理細胞と比較して、T細胞による標的細胞の殺滅を増強した。

【 0 3 4 2 】

実施例5：IL-12受容体（IL-12R_b）への結合

実施例1に記載の例示的な単鎖IL-12（scIL-12）免疫調節ポリペプチドであるscIL-12-G4S（SEQ ID NO:1）、scIL-12-HBP FBN（SEQ ID NO:3）、およびscIL-12-EGFRB P（SEQ ID NO:5）を、IL-12受容体（IL-12R_b）のベータサブユニットへの機能的結合について表面プラズモン共鳴法により試験した。陰性対照としてROR1-FcもIL-12R_bとの結合について評価した。抗hIgG捕捉チップを使用してIL-12R_b-hIgG1 Fc（R&D Systemsから購入）を固定化した。約30nMのscIL-12分子を固定化IL-12R_b上に流して、Biacore表面プラズモン共鳴機器を使用して結合を評価した。結果を図4に示す。結果は、ROR1-Fcではなく、リンカー配列単独（G4S）を含有するscIL-12、または標的化部分を含有するリンカーを含有するscIL-12が、IL-12受容体（IL-12R_b）と機能的に結合することができたことを示す。

【 0 3 4 3 】

実施例6：標的分子発現細胞との結合

実施例1に記載の例示的なscIL-12免疫調節ポリペプチドを検出可能に標識し、scIL-12

10

20

30

40

50

免疫調節ポリペプチドの所与の1つに含有される標的化部分によって個別に結合されることができると示す例の標的分子（ヘパリン、EGFRまたはHGFRを含む）を発現することが公知の（または発現するように操作された）標的細胞と共にインキュベートする。対照として、また、それぞれの標的化部分を含有しない対照scIL-12および／もしくはrhIL-12と共に細胞をインキュベートし、かつ／または標的化部分によって認識される標的分子もしくはそのモチーフを発見しない、もしくはより低いレベルで発見する細胞の存在下で、標的化部分を含有するscIL-12をインキュベートする。

【0344】

フローサイトメトリーまたは必要に応じて他の方法によって結合を評価し、異なる条件の間で比較する。いくつかの局面において、標的化部分を有するscIL-12を含む条件において、対照のうちの1つまたは複数と比較して結合性が増大していることは、標的化部分によって認識される標的分子またはモチーフに対する、操作された単鎖IL-12試薬の特異性を示しており、これは、標的を発見しているまたは優先的に発見しているまたはその疑いがある疾患、状態、または環境におけるscIL-12の有用性をさらに裏付けている。

10

【0345】

本発明は、例えば本発明の様々な局面を例証するために提供される特定の開示された態様の範囲に限定されることを意図しない。記載された組成物および方法の様々な変形は、本明細書における説明および教示から明らかになるであろう。そのような変形は、本開示の真の範囲および精神から逸脱せずに実施され得、本開示の範囲内に入ることが意図される。

20

【0346】

配列

30

40

50

SEQ ID NO.	配列	名称
1	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYF SLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGGSGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLL RAVNMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNES CLNSRETTSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	Sc IL-12 G4S(3) 10
2	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYF SLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGGSRKKNPNCRRHGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHH SQNLLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETTSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFK MNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFY KTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	Sc IL-12 HBP BMP4 20
3	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYF SLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGGSKNNQKSEPLIGRKKTGGGSRNLPVATPDPGMFP CLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACL PLELTKNESCLNSRETTSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEP DFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	Sc IL-12 HBP FBN 30
4	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYF SLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGGSVWNWVCFRDVGCDWVLGGGSRNLPVATPDPGMFP CLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACL PLELTKNESCLNSRETTSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSL EEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	Sc IL-12 HGFBP 40
5	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYF SLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS	Sc IL-12 EGFRBP 50

	WSEWASVPCSGGGGSSVDNPHVCGGGSRNLPVATPDPMFPCLHHSQ NLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITDKTSTVEACPLELTK NESCLNSRETSFTNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFSETVPQKSSLEEPDFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	
6	IWELKKDVVVVELDWYWDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV CGAATLSAERVRGDNKEYEYVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAHLKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPLNLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYF SLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSS WSEWASVPCSGGGGSQVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SVVVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGLLWNYWGQGTLTVVSSKLSGSASAPKLEEGER SEARVETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAVVYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP PGFTFGPGTKVDIKGGGGSRNLPVATPDPMFPCLHHSQNLRAVNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITDKTSTVEACPLELTKNESCLNSRETS FITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQ IFLDQNMLAVIDELMQALNFSETVPQKSSLEEPDFYKTICKLCILLHAFR IRAVTIDRVMSYLNAS	Sc IL-12 抗 EPCAM
7	GGGGS	G4S リンカー
8	GGGGSGGGGS	G4S(2) リンカー
9	GGGGSGGGGSGGGGS	G4S(3) リンカー
10	RNLPVATPDPMFPCLHHSQNLRAVNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHE DITDKTSTVEACPLELTKNESCLNSRETSFTNGSCLASRKTSFMMALC LSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKSSLEEPDFYKTICKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	IL-12 p35 UniProt No. P29459 残基 23-219
11	IWELKKDVVVVELDWYWDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV CGAATLSAERVRGDNKEYEYVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAHLKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPLNLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYF SLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSS WSEWASVPC	IL-12 p40 UniProt No. P29460 残基 23-328
12	MCHQLVISWFLSLVFLASPLVA	IL-12p40 シグナル 配列
13	RKKNPNCRRH	ヘパリン結合 ペプチド、BMP4
14	KNNQKSEPLIGRKKT	ヘパリン結合ペプチド、 フィブロネクチン
15	VWNWVCFRDVGCDWVL	HGF 結合ペプチド
16	SVDNPHVC	EGFRBP
17	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISSVVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCA RGLLWNYWGQGTLTVVSSKLSGSASAPKLEEGERSEARVETTLTQSPAT LSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAVVYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIP ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPGFTFGPGTKVDIK	抗-EPCAM scFv
18	MPLLLLLPLLWAGALAM	CD33 シグナル 配列
19	MCPARSLLLVALVLLDHLSLA	IL-12 p35 シグナル 配列
20	HHHHHH	6x His-タグ
21	WSHPQFEK	Strep-tag(登録商標) II
22	KLSGSASAPKLEEGERSEARV	リンカー

10

20

30

40

50

23	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	リンカー
24	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISSVVVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RGLLWNYWGQGTIVTVSS	抗EPCAM 軽鎖可変 (VL)
25	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAVVYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPPGFTF GP GTKV DIK	抗EPCAM 重鎖可変 (VH)
26	ATWLPPR	VEGF 結合 ペプチド
27	ITMQCGIHQQHPKIRMICEMSF	VEGFR 結合 ペプチド
28	WQPPRARI	ウシ由来ヘパリン 結合ペプチド
29	GGGS(n)	リンカー nは1から5である
30	GIHVILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVH PSCKVTAMKCFLL ELQVISLESGDASIHD TVENLILANNLSNSGNVTES GCKECEELEEKNIKEFLQS FV HIV QMFINTS	IL-15 プロペプチド=アミノ酸 1-19
31	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVNL AQS KNF HLR PRDLISNINV VLELGSE TTFMCEYAD ETAT IVEFLNRWITFCQSI STLT	IL-2
32	MAAEPVEDNCINFVAMK FIDNTLYFIAEDDENLES DYFGKLESKLSVIRN LNDQVLFIDQGNRPLFEDMTSDCRDNAPRTIFIHS MYKDSQPRGM AVTI SVKCEKISTLSCENKIIS FKE MNPPDNIKDTKSDI IFFQR SVP GHDNK MQFE SSSYEGYFL ACEKERDLFKL LKKEDEL GDR SIMFTV QNED	IL-19 プロペプチド=アミノ酸 1-36
33	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRRLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQ EPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMASHYKQHCPPTPETSCATQI ITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE	GM-CSF
34	DCDIEKGDKQYESVLMV SIDQLLDSMKEIGSNCLNN EFNFFKRHIC DAN KEGMFLFRAARKL RQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGR KPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMG TKEH	IL-7
35	QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLK NYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSC FQKAQLKSANTGNERIINVS IKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLTCPSCDSY EKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQH LSSRTHGSE S	IL-21
36	CDLPETHSLDNRR TLMLLAQMSRISPSSCLMDRHD FGFPQEEFDGNQFQ KAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDETL LDK FCTELYQQLNDLEAC VMQEERVG ETPLMNAD SILAVRKYFQR ITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI MRSLSLSTNLQERLRRKE	IFN アルファ-1/13
37	CDLPQT HSLGSRR TLMLLAQMRKISL FSCLKDRHD FGFPQEEFDGNQFQ AETIPV LHEMIQQIFNLFTKDSSAAWDETL LDK FCTELYQQLNDLEAC VQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQR ITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI SFSLSTNLQESLRSKE	IFN アルファ-2
38	CDLPQT HSLGNRR ALILLAQMGRISHFSCLKDRHD FGFPQEEFDGNQFQ AQAISVLHEMIQQTFNLFTKDSSAAWEQS LLEKFSTELYQQLNDLEAC V IQEVGV EETPLMNEDSILAVRKYFQR ITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI SLSFSTNLQKRLRRKD	IFN アルファ-4
39	LGCDLPQT HSLSNRR TLMLIMAQMGRISPFSCLKDRHD FGFPQEEFDGNQFQ QKAQ A ISVLHEMIQQTFNLFTKDSSATWD ETL LDK FCTELYQQLNDLE ACMMQEVGV ETDPLMNVD SILT VRKYFQR ITLYLKEKKYSPCAWEV VRAEIMRSFSLSANLQERLRRKE	IFN アルファ-5
40	SLDCDLPQT HSLGH RRRTMMLLAQMRRISL FSCLKDRHD FRFPQEEFDGN QFQK AEAISVLHEVIQQTFNLFTKDSSAWDERLLDKLYTELYQQLNDL EACVMQE VVWVGGTPLMNEDSILAVRKYFQR ITLYLKEKKYSPCAWEV VRAEIMRSFSSSRN LQERLRRKE	IFN アルファ-6

10

20

30

40

50

41	CDLQPQTHSLRNRRALILLAQMGRISPFSCLKDRHEFRPPEEFDGHQFQKT QAISVLHEMIQQTFNLFSTEDSSAAWEQSLLEKFSTELYQQLNDLEACVI QEVGVEETPLMNEDFILAVRKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVVRAEIMR SFSTNLKKGRLRKD	IFN アルファ-7
42	CDLPQTSHSLGNRRALILLAQMRRISPFSCLKDRHDFEPQEEFDKQFQK AQASVLHEMIQQTFNLFSTKDSSAAALDETLLDEFYIELDQQLNDLESCV MQEVGVIESPLMYEDSILAVRKYFQRITLYLTERKYSPCAWEVVRAEIMR SFSLSTNLQKRLRKD	IFN アルファ-8
43	CDLPQTSHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFQK AQASVLHEMIQQTFNLFSTEDSSAAWEQSLLEKFSTELYQQLNDLEACV IQEVGVEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLTERKYSPCAWEVVRAEIMRS LSFSTNLQKRLRKD	IFN アルファ-10
44	CNLSQTSHSLNNRRTMLMAQMRRISPFSCLKDRHDFEPQEEFDGNQFQ KAQASVLHEMMQQTFLNSTKDSSAAWDETLLDKFYIELFQQLNDLEA CVIQEVGVEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVVRAEI MRSLSFSTNLQKRLRKD	IFN アルファ-14
45	CDLPQTSHSLGNRRALILLAQMGRISHFSCLKDRYDFGFPQEVDGNQFQK AQASAFHEMIQQTFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYIELFQQLNDLEACV TQEVGVEEIALMNEDSILAVRKYFQRITLYLMGKKYSPCAWEVVRAEIM RSFSFSTNLQKGLRKD	IFN アルファ-16
46	CDLPQTSHSLGNRRALILLAQMGRISPFSCLKDRHDFGLPQEEFDGNQFQK TQAISVLHEMIQQTFNLFSTEDSSAAWEQSLLEKFSTELYQQLNNLEACVI QEVGMEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLTERKYSPCAWEVVRAEIMR SLSFSTNLQKILRKD	IFN アルファ-17
47	CDLPQTSHSLGNRRALILLAQMGRISPFSCLKDRHDFGFPQEEFDGNQFQK AQASVLHEMIQQTFNLFSTKDSSATWEQSLLEKFSTELNQQLNDLEACV IQEVGVEETPLMNVDISILAVRKYFQRITLYLTERKYSPCAWEVVRAEIMR SFSLSKIFQERLRRKE	IFN アルファ-21
48	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQNGRLLEYCLKDRMNFIDPEEIKQLQQ FQKEDAALTIEMLNQNIIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLK TVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRV EILRNFYFINRLTGYLRN	IFN ベータ-1
49	QDPYVKEAEKLKYFNAGHSVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQI VSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMVNVFFNSNKKRDDFEKLTNY SVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFRGRRASQ	IFN ガンマ
50	GITIPRNPGENSEDKNPRTVMVNLIHNRRNTNPKRSSDYYNRSTSP WNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVL RREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA	IL-17A
51	RKIPKVGHFFFQKPESCVPVGGSMKLDIGIINENQRVMSRNIESRSTSP WNYTVTWDPNRYPSEVVQAQCRLGGINAQGKEDISMNSVPIQQETLV VRRKHQGCSVSFQLEKVLVTVGCTCVPVIHHVQ	IL-17F
52	RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETTND VPHIQCGDGCDCPQGLRDNQFCLQRHQLIFYEKLGSIFTGEPSLLPD SPVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQWPQRLLLRFKILRSL QAFVAVAARVFAHGAATLSP	IL-23 アルファ(p19)
53	APMTQTTPLKTSWVNCNSMIDEIIHLKQPPLPLDFNNLNGEDQDILME NNLRRPNLEAFNRAVKSLQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHKD GDWNEFRRKLTFLKTLENAQAQQITLSLAIF	IL-3
54	HKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVL RQFYSHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPV KEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS	IL-4
55	IPTEIPTSAVKTALLSTHRTLLIANETLRIPPVHKNHQLCTEEIFQGIG TLESQTVQGGTVERLFKNLSLIKYYIDGQKKCGEERRRVNQFLDYLQEF LGVMNTEWIIES	IL-5
56	VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCES	IL-6

10

20

30

40

50

	SKEALAEENNLLPKMAEKDGCFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQ NRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQ AQNQWLQDMITHLILRSFKEFLQSSLRALRQM	
57	QGCPTLAGILDINFLINKMQEDPASKCHCSANVTSCCLCLGIPSDNCTRPF SERLSQMTNTTMQTRYPLIFSRVKKSVETVLKNNCPYFSCEQPCNQTTA GNALTFKSLLEIFQKEKMRGMRGKI	IL-9
58	PGPPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLLADTRQLAAQLRDKFPADGDHN LDSLPTLAMSAGALGALQLPGVLTRLRADLLSYLRHVQWLRRAGGSSLK TLEPELGLTLQARLDRLRLQ LLMSRLALPQPPPDPAPPAPLAPPSSAWGGIRAAHAILGLHLTLDAVRG LLLLKTRL	IL-11
59	LTCGLGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAG MYCAALESLINVGCSAJEKTQRMLSGFCPHKVSAQQFSSLHVRDTKIEV AQFVKDLLLHLKKLFREGRFN	IL-13
60	FPRPPGRPQLSLQELRREFTVSLHLLARKLSEVRGQAHRAESHLPGVNL YLLPLGEQLPDVSLTFQAWRRRLSDPERLCFISTTLQPFHALLGGLTQGR WTNMERMQLWAMRLDLRDLQRHRLRFQVLAAGFNLPEEEEEEEEEE RKGLLPAGALGSALQGPQAQVSWPQLLSTYRLLHSLELVLSRAVRELLLSK AGHSVWPLGFPTLSPQP	IL-27 アルファ(p28)
61	RKGPPAALTLPVQCRASRYPIAVDCSWTLPPAPNSTPVSFIATYRLGM AARGHSWPCLQQPTSTSCTIDVQLFSMAPYVLNVTAHPWGSSSFV PFITEHIIKPDPEGVRSLPLAERQLQVQWEPPGSWPFPFISLKYWIRYKR QGAARFHRCVGPIEATSFILRAVRPRARYVQVAQDLTDYGELSDWSLP ATATMSLGK	IL-27 ベータ(EB13), IL-35 ベータ
62	APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYA WKRMEVGQQAVEVVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQWEPLQLHVDK AVSGLRSLLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNF LRGKLKLYTGEACRTGDR	エリスロボエチン
63	ATPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECATYKLCHPEE LVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISP ELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQ RRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHQAQ	G-CSF
64	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFTDYQEFEAYIPKEQKYSFLQNPQTS LCFSSEIPTPSNREETQQKSNELLRISLLLIQSWEPEVQFLRSVFANSLVY GASDSNVYDLLKDLEEG IQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKD MDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF	成長ホルモン
65	LPICPGGAARCQVTLRDLFDRAVVLSHYIHNLSEMSEFDKRYTHGRGF ITKAINSCHTSSLATPEDKEQAQQMNQKDFSLIIVSILRSWNEPLYHLVTE VRGMQEAPAEILSKAVEIEEQTKRLLEGMELIVSQVHPEKENEIYPVWS GLPLSLQMADEESERLSAYYNNLLHCLRRDSHKIDNYLKLLCRIIHNNNC	プロラクチン
66	AAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDVPKLREHCR ERPGAFPSEETLRLGLGRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRLPKAQDLER SGLNIEDLEKLQLMARPNILGLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPKAGRGAQSQ PPTPTPASDAFORKLEGCRFLHGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRSRRHS <u>PHQALRKGVRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR</u>	オンコスタチン
67	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEP FPNNLDKLCGPNTDFPPFHANGTEAKLVELYRIVVYLGTSIGNITRDQ KILNPSALSLHSKLNATADILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHDVTYGPDTS GKDVFQKKKLGQCLLGKYKQIAVLAQAF	白血病抑制因子
68	APISSHCRLLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNNTDVRLLIGEKLHFHV SMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFQSDRFPQPYMQEVVVPFLARLSNRLSTC HIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESEGIKAIGELDLLFMSLRNACI	IL-22
69	SPGQGTQSENSTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLK ESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENL	IL-10

10

20

30

40

50

	KTLRLRLRRCHRFLPCENKS KAVEQVKNAFNKLQEKG IYKAMSEFDIFIN YIEAYMTMKIRN	
70	ESKYGPPCPCPCP	スペーサー (IgG4ヒンジ)
71	GAATCTAAGTACGGACC GCCCCTGCCCTTGCCCT	スペーサー (IgG4ヒンジ)
72	ESKYGPPCPCPCPGQREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESENQGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGK	ヒンジ-CH3スペーサー
73	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGK	ヒンジ-CH2-CH3 スペーサー
74	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKEKE KEEQEERETKTPECPHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSD LKDAHLTWVEAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLPRSLWNAG TSVTCTLNHPSPNLLPQRLMALREPAQQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLC EVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQPGSTTFWAWSVLRVPA PPSQPQATYTCVVSHEDSRTLNASRSLEVSYVTDH	IgD-ヒンジ-Fc
75	MLLVLTSLLCELPHPAFLIPRKCVCNGIGIGEFKDLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRT DLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVISGNK NLCYANTINWKLFGTSGQKTKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCW GPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPEFVENSECIQCHPECLPQA MNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSATGMVGALLLLVVALGI GLFM	tEGFR
76	LEGGGEGRGSLLTCGDVVEENPGPR	T2A
77	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (アクセッション番号P10747のアミノ酸153~179)
78	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (アクセッション番号P10747のアミノ酸114~179)
79	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747のアミノ酸180~220)
80	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL ~ GG)
81	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEEDGCSCRFPEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1のアミノ酸214~255)
82	RVKFSRSDADAPAYQQQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3 ゼータ
83	RVKFSRSAEPPAYQQQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3 ゼータ
84	RVKFSRSDADAPAYKQQQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3 ゼータ
85	gcctacgtgcgtcacacagcgctgtcgcac	Epo HRE
86	ccacagtgcatacggtggccaaacaggctcttt	VEGF-A HRE
87	gacgtgacaaacgaaaggccgacgtc	PGK1 HRE
88	acacgtgggtccccgcacgtccgc	LdhA HRE
89	gacgtgactcggaacacat	ALDA HRE
90	gccccacacgtcggtgcgtgccagttgaaac	GAPDH HRE
91	ccttattttgg	例示的なCArG モチーフ

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

	aaactgtgcccagaagagctccctggaggaacctgatttctacaagaccaaaatcaagctgtgcattctgtcace gccttaggateccgcgttcaccatggaccgegtgatgtccatatctgaacgectcaccatcacccatcaccatttgt ccatccacagttgagaagtgataactcgag	
108	YHWYGYTPQNVI	EGFR 結合 ペプチド
109	YRWYGYTPQNVI	EGFR 結合 ペプチド
110	PCAIWF	VEGFR3 結合 ペプチド
111	WVCSGG	VEGFR3 結合 ペプチド
112	NGRNGRNGR	NGR モチーフ
113	RGDRGDRGD	RGD モチーフ
114	TAASGVRSMH	NG2プロテオグリカン 結合ペプチド
115	LTLRWVGLMS	NG2プロテオグリカン 結合ペプチド
116	NKFNKGMRYW GALGGNGKRGIRGYM	HER2 結合 ペプチド
117	YEVHTYYLD	EPCAM 結合 ペプチド
118	ITMQIMRIKPHQQHIGEMSF	VEGFR 結合 ペプチド

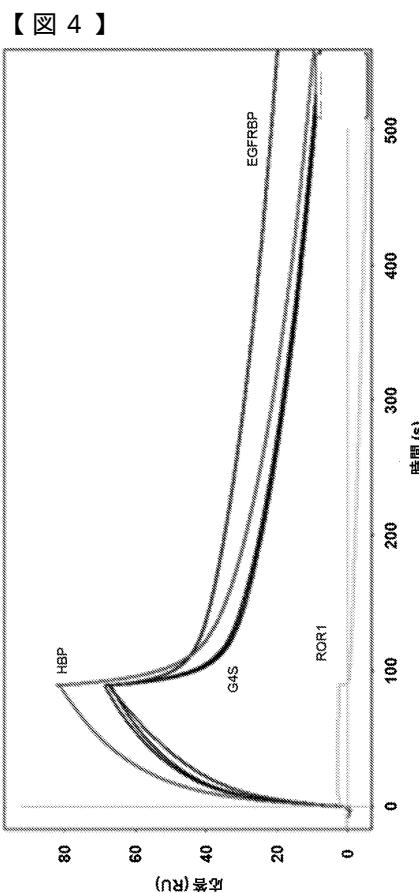
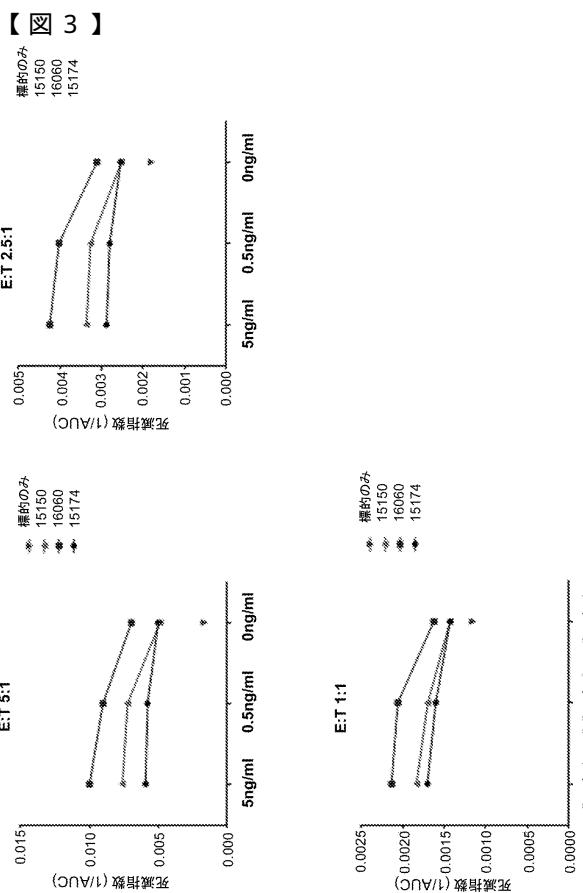
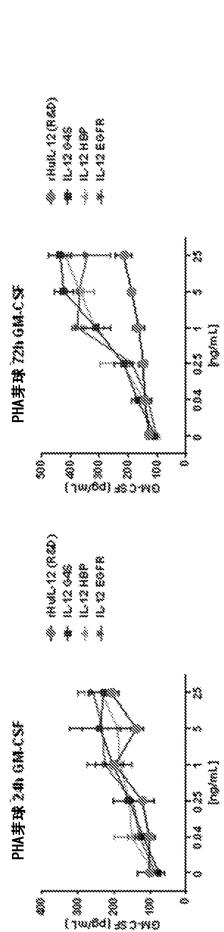
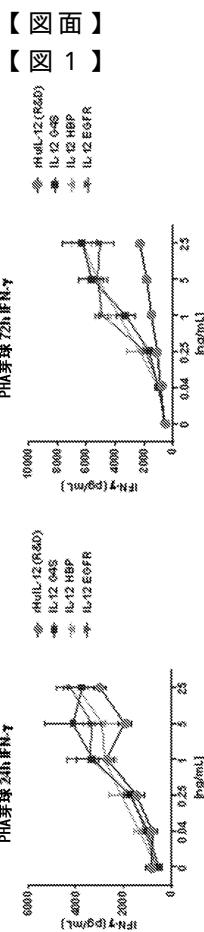
10

20

30

40

50



【配列表】

0007295795000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
C 0 7 K	14/435 (2006.01)
C 0 7 K	14/51 (2006.01)
C 0 7 K	14/78 (2006.01)
C 0 7 K	7/00 (2006.01)
C 1 2 N	15/63 (2006.01)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)
A 6 1 P	37/02 (2006.01)
A 6 1 P	31/00 (2006.01)
A 6 1 P	35/00 (2006.01)
A 6 1 K	38/20 (2006.01)
A 6 1 K	47/42 (2017.01)
A 6 1 K	35/12 (2015.01)
A 6 1 K	35/17 (2015.01)
	C 0 7 K 14/435
	C 0 7 K 14/51
	C 0 7 K 14/78
	C 0 7 K 7/00
	C 1 2 N 15/63 Z
	C 1 2 N 5/10
	A 6 1 P 37/02
	A 6 1 P 31/00
	A 6 1 P 35/00
	A 6 1 K 38/20
	A 6 1 K 47/42
	A 6 1 K 35/12
	A 6 1 K 35/17

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ホースキンス コリン

アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0 0 ス
イート 1 2 0 0

(72)発明者 イーブンス アレン

アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0 0 ス
イート 1 2 0 0

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 特表 2 0 0 3 - 5 0 7 0 1 2 (J P , A)

J. Immunol. , 1999年 , Vol. 162 , pp.1064-1070

Cancer Res. , 2011年 , Vol. 71, Issue 17 , pp.5697-5706

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

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

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 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