

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7263235号

(P7263235)

(45)発行日 令和5年4月24日(2023.4.24)

(24)登録日 令和5年4月14日(2023.4.14)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 15/867

Z

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

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

請求項の数 10 (全122頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-526305(P2019-526305)

(86)(22)出願日 平成29年11月17日(2017.11.17)

(65)公表番号 特表2019-535275(P2019-535275 A)

(43)公表日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/062358

(87)国際公開番号 WO2018/094244

(87)国際公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)

審査請求日 令和2年11月13日(2020.11.13)

(31)優先権主張番号 62/423,565

(32)優先日 平成28年11月17日(2016.11.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/467,496

(32)優先日 平成29年3月6日(2017.3.6)

最終頁に続く

(73)特許権者 521438515

2 セブンティ バイオ インコーポレイテ
ッドアメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチュー
セッツ州 ケンブリッジ ビニー ストリ
ート 6 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T G F β シグナルコンバーター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

I) (a) T G F β R 2 ポリペプチドであって、

(i) T G F β R 2 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、

(i i) I L - 1 2 R β 2 膜貫通ドメイン、および

(i i i) I L - 1 2 R β 2 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 2 ポ
リペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、

(c) T G F β R 1 ポリペプチドであって、

(i) T G F β R 1 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、

(i i) I L - 1 2 R β 1 膜貫通ドメイン、および

(i i i) I L - 1 2 R β 1 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 1 ポ
リペプチドと、あるいは

I I) (a) T G F β R 2 ポリペプチドであって、

(i) T G F β R 2 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、

(i i) I L - 1 2 R β 1 膜貫通ドメイン、および

(i i i) I L - 1 2 R β 1 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 2 ポ
リペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、

(c) T G F β R 1 ポリペプチドであって、

(i) TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
 (ii) IL-12Rβ2膜貫通ドメイン、および
 (iii) IL-12Rβ2細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1ポリペプチドと
 を含む、融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクター。
 【請求項2】

(i) 遺伝子操作された抗原受容体および(ii)第2のポリペプチド切断シグナルまたはウイルス自己切断型2Aポリペプチドをさらに含む、請求項1に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項3】

前記遺伝子操作された抗原受容体が、遺伝子操作されたT細胞受容体(TCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、DARIC受容体もしくはその構成成分、およびキメラサイトカイン受容体からなる群から選択される、請求項2に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項4】

前記遺伝子操作された抗原受容体が、アルファ葉酸受容体、5T4、αvβ6インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2(HER2)を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、胎児性Achr、FRα、GD2、GD3、Glypican-3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11Rα、IL-13Rα2、ラムダ、ルイス-Y、カッパ、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、Survivin、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1からなる群から選択される抗原を認識する、請求項3に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項5】

配列番号28～30のいずれか1つに示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクター。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクターを含む、細胞。

【請求項7】

前記細胞が、

- (a) 造血細胞；
 - (b) T細胞；
 - (c) CD3⁺、CD4⁺、および／またはCD8⁺細胞；
 - (d) 免疫エフェクター細胞；
 - (e) 細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、またはヘルパーT細胞；あるいは
 - (f) ナチュラルキラー(NK)細胞またはナチュラルキラーT(NKT)細胞
- である、請求項6に記載の細胞。

【請求項8】

請求項1～5のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター、または請求項6もしくは請求項7に記載の細胞を含む、組成物。

【請求項9】

薬学的に許容される担体と、請求項1～5のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター、または請求項6もしくは請求項7に記載の細胞と、を含む、薬学的組成物。

【請求項10】

10

20

30

40

50

がん、固形がん、血液悪性腫瘍、感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、および免疫不全症、またはそれらに関連する病態のうちの少なくとも1つの症状を治療、予防、または改善するのに使用するための、請求項9に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

関連出願の相互参照

本出願は、2017年3月6日出願の米国仮特許出願第62/467,496号の米国特許法第119条(e)、および2016年11月17日出願の米国仮特許出願第62/423,565号の下で利益を主張するものであり、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表に関する陳述

本出願に関連する配列表は、ハードコピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むこのテキストファイル名は、BLBD_080_02WO_ST25.txtである。本テキストファイルは215KBであり、2017年11月17日に作成され、本明細書の出願と同時に、EFS-Webを介して電子的に提出されている。

【0003】

本開示は、養子細胞療法の改善に関する。より具体的には、本開示は、シグナル伝達分子、細胞、およびそれらを用いる方法の改善に関する。

【背景技術】

【0004】

がんの世界的な負担は1975年～2000年の間に2倍となった。がんは、世界中の疾病率および死亡率の2番目に高い要因であり、2012年において新たな症例はおおよそ1410万件、がん関連死は820万件となっている。最もよく見られるがんは、乳がん、肺および気管支がん、前立腺がん、結腸および直腸がん、膀胱がん、皮膚の黒色腫、非ホジキンリンパ腫、甲状腺がん、腎臓および腎盂がん、子宮内膜がん、白血病、ならびに膵臓がんである。新たながん症例件数は、今後20年以内に2200万件に上昇すると予想される。

【0005】

免疫系は、ヒトがんの検出および撲滅において主要な役割を有する。形質転換細胞の大部分は、免疫センチネルによって迅速に検出され、クローン的に発現されたT細胞受容体(TCR)を介した抗原特異的T細胞の活性化を通して破壊される。したがって、がんは、免疫学的障害、すなわち、この疾患を恒久的に抑制および排除するために必要な抗腫瘍応答を開始する免疫系の機能障害とみなすことができる。がんをより有効に撲滅するために、過去数十年間にわたって開発されたある特定の免疫療法介入は、T細胞免疫性を強化することに特に注力してきた。これらの治療は、疾患寛解の孤発例をもたらしてきたのみであり、実質的な全体的奏功は達成していない。CTLA-4またはPD-1などのT細胞活性化を阻害する分子を標的とするモノクローナル抗体を使用する、より最近の療法は、より実質的な抗腫瘍効果を示してきたが、これらの治療はまた、全身免疫活性化に起因する実質的な毒性にも関連する。

【0006】

より最近では、T細胞の単離、修飾、増殖、および再注入に基づく養子細胞免疫療法戦略が探索されており、初期段階の臨床試験で試験されている。T細胞はしばしば、それらの選択的認識および強力なエフェクター機構に起因して、がん免疫療法のための一般的に好まれるエフェクター細胞となっている。これらの治療は、まちまちの奏効率を示してきたが、少数の患者は長期寛解を経験しており、T細胞系の免疫療法のいまだ実現していない可能性を強調している。

【0007】

細胞溶解性T細胞による腫瘍細胞関連抗原の成功裏の認識は、標的とする腫瘍の溶解を惹起し、任意の有効ながん免疫療法アプローチを実証する。腫瘍浸潤T細胞（TIL）は、腫瘍関連抗原に特異的に標的されたTCRを発現するが、実質的なTIL数は、少数のヒトがんのみに限定される。遺伝子操作されたT細胞受容体（TCR）およびキメラ抗原受容体（CAR）は、多くのがんおよび他の免疫障害に対するT細胞ベースの免疫療法の適用性を増加させる可能性がある。

【0008】

その上、最新技術による遺伝子操作されたT細胞は依然として、がん細胞、炎症性細胞、間質細胞、およびサイトカインからなる複合の免疫抑制腫瘍微小環境によって調節される。これらの構成要素のうち、がん細胞、炎症性細胞、および抑制性サイトカインが、T細胞表現型および機能に悪影響を与える。集合的に、腫瘍微小環境は、T細胞が疲弊したT細胞へと最終的に分化するよう駆り立てる。

10

【0009】

T細胞疲弊は、阻害性受容体の増加した発現または阻害性受容体による増加したシグナル伝達、低減されたエフェクターサイトカイン産生、および持続してがんを排除する能力の減少によって特徴付けられる慢性的環境における、T細胞機能不全の状態である。疲弊したT細胞はまた、階層的様態で機能喪失を示す。すなわち、減少したIL-2産生およびエクスピボでの殺傷能力が疲弊の早期段階で失われ、TNF- α 産生が中間段階で失われ、IFN- γ およびGzmB産生が疲弊の後期段階で失われる。腫瘍微小環境におけるほとんどのT細胞は、疲弊したT細胞へと分化し、がんを排除する能力を失い、最終的には取り除かれる。

20

【0010】

形質転換増殖因子 β （TGF β ）は、腫瘍微小環境内で免疫抑制シグナル伝達分子として関与する多面発現性サイトカインである。TGF β は、TGF β R1およびTGF β R2セリン／スレオニンキナーゼ受容体複合体に結合し、下流転写因子Smad2およびSmad3の受容体媒介性のリン酸化をもたらす。多くの腫瘍は、TGF β R2レセプターおよび／または下流Smadシグナル伝達タンパク質における変異を得ることによって、TGF β の細胞増殖抑制性および抗増殖性作用を回避する。TGF β は、IFN γ 分泌などの、インビトロでのT細胞のエフェクター活性および細胞溶解性活性に関与する主要分子を抑制する。

30

【0011】

これまでに、中和Abまたはキナーゼ阻害剤を用いたTGF β シグナル伝達の阻害を対象とした臨床試験は、不本意な結果に終わり、有意な治療的有用性はまだ報告されていない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、部分的には、TGF β シグナルコンバーター（キメラTGF β レセプターまたはCTBR）、遺伝子修飾された細胞、組成物、およびそれらを用いる方法の改善に関する。

40

【0013】

種々の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGF β R2の細胞外TGF β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、TGF β R1の細胞外TGF β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む第2のポリペプチドと、を含むことが企図される。

【0014】

追加の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、またはT

50

o l l 様受容体から単離されている。

【0015】

特定の実施形態において、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、またはT o l l 様受容体から単離されている。

【0016】

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 1 2 R β 2 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 1 2 R β 1 細胞内シグナル伝達ドメインである。種々の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 1 2 R β 2 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 1 2 R β 1 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 1 2 または C T B R 1 2 シグナルコンバーターと呼ばれる。

10

【0017】

ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 1 2 R β 1 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 1 2 R β 2 細胞内シグナル伝達ドメインである。さらなる実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 1 2 R β 1 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 1 2 R β 2 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 1 2 または C T B R 1 2 シグナルコンバーターと呼ばれる。

20

【0018】

追加の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 7 R α 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 2 R γ 細胞内シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 7 R α 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 2 R γ 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 7 または C T B R 7 シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0019】

種々の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 2 R γ 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 7 R α 細胞内シグナル伝達ドメインである。さらなる実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 2 R γ 膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 7 R α 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 7 または C T B R 7 シグナルコンバーターと呼ばれる。

30

【0020】

追加の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 2 R β 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 2 R γ 細胞内シグナル伝達ドメインである。種々の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 2 R β 膜貫通ドメインを含む。種々の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 2 R γ 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 1 5 または C T B R 1 5 シグナルコンバーターと呼ばれる。

40

【0021】

特定の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 2 R γ 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L - 2 R β 細胞内シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L - 2 R γ

50

膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-2 R β 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 1 5 または C T B R 1 5 シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0022】

さらなる実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-2 1 R 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-2 R γ 細胞内シグナル伝達ドメインである。特定の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-2 1 R 膜貫通ドメインを含む。種々の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-2 R γ 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 2 1 または C T B R 2 1 シグナルコンバーターと呼ばれる。

10

【0023】

追加の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-2 R γ 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-2 1 R 細胞内シグナル伝達ドメインである。ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-2 R γ 膜貫通ドメインを含む。さらなる実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-2 1 R 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 2 1 または C T B R 2 1 シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0024】

20

種々の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-1 8 R 1 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-1 8 R A P 細胞内シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-1 8 R 1 膜貫通ドメインを含む。種々の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-1 8 R A P 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 1 8 または C T B R 1 8 シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0025】

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-1 8 R A P 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-1 8 R 1 細胞内シグナル伝達ドメインである。追加の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-1 8 R A P 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-1 8 R 1 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 1 8 または C T B R 1 8 シグナルコンバーターと呼ばれる。

30

【0026】

ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-1 R 1 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-1 R A P 細胞内シグナル伝達ドメインである。さらなる実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-1 R 1 膜貫通ドメインを含む。種々の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-1 R A P 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、C T B R 1 または C T B R 1 シグナルコンバーターと呼ばれる。

40

【0027】

ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-1 R A P 細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、I L-1 R 1 細胞内シグナル伝達ドメインである。種々の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-1 R A P 膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、I L-1 R 1 膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパ

50

ク質は、CTBR1またはCTBR1シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0028】

追加の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-1RAP細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-1RL2細胞内シグナル伝達ドメインである。種々の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、IL-1RAP膜貫通ドメインを含む。さらなる実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、IL-1RL2膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR36またはCTBR36シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0029】

特定の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-1RL2細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-1RAP細胞内シグナル伝達ドメインである。ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、IL-1RL2膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、IL-1RAP膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR36またはCTBR36シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0030】

種々の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、IFNAR1細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、IFNAR2細胞内シグナル伝達ドメインである。さらなる実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、IFNAR1膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、IFNAR2膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBRIFN1またはCTBRIFN1シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0031】

種々の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、IFNAR2細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、IFNAR1細胞内シグナル伝達ドメインである。ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、IFNAR2膜貫通ドメインを含む。種々の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、IFNAR1膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBRIFN1またはCTBRIFN1シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0032】

さらなる実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR1細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR1細胞内シグナル伝達ドメインである。追加の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR1膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR1膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR.TLR1またはCTBR.TLR1シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0033】

特定の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR2細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR2細胞内シグナル伝達ドメインである。ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR2膜貫通ドメインを含む。さらなる実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR2膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR.TLR2またはCTBR.TLR2シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0034】

10

20

30

40

50

種々の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR3細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR3細胞内シグナル伝達ドメインである。さらなる実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR3膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR3膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR・TLR3またはCTBR・TLR3シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0035】

種々の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR4細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR4細胞内シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR4膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR4膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR・TLR4またはCTBR・TLR4シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0036】

追加の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR5細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR5細胞内シグナル伝達ドメインである。特定の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR5膜貫通ドメインを含む。種々の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR5膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR・TLR5またはCTBR・TLR5シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0037】

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR6細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR6細胞内シグナル伝達ドメインである。さらなる実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR6膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR6膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR・TLR6またはCTBR・TLR6シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0038】

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR7細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR7細胞内シグナル伝達ドメインである。種々の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR7膜貫通ドメインを含む。さらなる実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR7膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR・TLR7またはCTBR・TLR7シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0039】

ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR8細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR8細胞内シグナル伝達ドメインである。特定の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR8膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR8膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR・TLR8またはCTBR・TLR8シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0040】

種々の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR9細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体

10

20

30

40

50

の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR9細胞内シグナル伝達ドメインである。さらなる実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR9膜貫通ドメインを含む。追加の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR9膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR・TLR9またはCTBR・TLR9シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0041】

ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR10細胞内シグナル伝達ドメインであり、第2のポリペプチドの免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR10細胞内シグナル伝達ドメインである。ある特定の実施形態において、第1のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR10膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、第2のポリペプチドの膜貫通ドメインは、TLR10膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR・TLR10またはCTBR・TLR10シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0042】

さらなる実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型ポリペプチドである。

【0043】

様々な実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型2Aポリペプチドである。

【0044】

さらなる実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、ブタテッシュウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される、ウイルス自己切断型ペプチドである。

【0045】

特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFB β 2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、IL-12R β 2膜貫通ドメイン、およびIL-12R β 2細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFB β 2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFB β 1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、IL-12R β 1膜貫通ドメイン、およびIL-12R β 1細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFB β 1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR12またはCTBR12シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0046】

様々な実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFB β 2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、IL-12R β 1膜貫通ドメイン、およびIL-12R β 1細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFB β 2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFB β 1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、IL-12R β 2膜貫通ドメイン、およびIL-12R β 2細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFB β 1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR12またはCTBR12シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0047】

追加の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFB β 2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、IL-7R α 膜貫通ドメイン、およびIL-7R α 細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFB β 2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFB β 1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、IL-2R γ 膜貫通ドメイン、およびIL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFB β 1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR7またはCTBR7シグナルコンバーターと呼ばれる。

10

20

30

40

50

【0048】

特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R2$ ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-7R\alpha$ 膜貫通ドメイン、および $IL-7R\alpha$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R1$ ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR7またはCTBR7シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0049】

ある特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-2R\beta$ 膜貫通ドメイン、および $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R2$ ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R1$ ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR15またはCTBR15シグナルコンバーターと呼ばれる。

10

【0050】

種々の実施形態において、融合ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R2$ ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-2R\beta$ 膜貫通ドメイン、および $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R1$ ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR15またはCTBR15シグナルコンバーターと呼ばれる。

20

【0051】

いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-21R$ 膜貫通ドメイン、および $IL-21R$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R2$ ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R1$ ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR21またはCTBR21シグナルコンバーターと呼ばれる。

30

【0052】

ある特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R2$ ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-21R$ 膜貫通ドメイン、および $IL-21R$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R1$ ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR21またはCTBR21シグナルコンバーターと呼ばれる。

40

【0053】

種々の実施形態において、融合ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-18R1$ 膜貫通ドメイン、および $IL-18R1$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R2$ ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $IL-18RAP$ 膜貫通ドメイン、および $IL-18RAP$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R1$ ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR18またはCTBR18シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0054】

追加の実施形態において、融合ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合

50

ドメイン、IL-18RAP膜貫通ドメイン、およびIL-18RAP細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、IL-18R1膜貫通ドメイン、およびIL-18R1細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR18またはCTBR18シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0055】

特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、IL-1R1膜貫通ドメイン、およびIL-1R1細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、IL-1RAP膜貫通ドメイン、およびIL-1RAP細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR36またはCTBR36シグナルコンバーターと呼ばれる。

10

【0056】

ある特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、IL-1RAP膜貫通ドメイン、およびIL-1RAP細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、IL-1R1膜貫通ドメイン、およびIL-1R1細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の

20

【0057】

種々の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、IFNAR1膜貫通ドメイン、およびIFNAR1細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、IFNAR2膜貫通ドメイン、およびIFNAR2細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、IFN1またはCTBR、IFN1シグナルコンバーターと呼ばれる。

30

【0058】

いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、IFNAR2膜貫通ドメイン、およびIFNAR2細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、IFNAR1膜貫通ドメイン、およびIFNAR1細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。

【0059】

さらなる実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR1膜貫通ドメイン、およびTLR1細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR1膜貫通ドメイン、およびTLR1細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、TLR1またはCTBR、TLR1シグナルコンバーターと呼ばれる。

40

【0060】

特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR2膜貫通ドメイン、およびTLR2細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR2膜貫通ドメイン、およびTLR2細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合

50

タンパク質は、CTBR、TLR2またはCTBR、TLR2シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0061】

種々の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR3膜貫通ドメイン、およびTLR3細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR3膜貫通ドメイン、およびTLR3細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、TLR3またはCTBR、TLR3シグナルコンバーターと呼ばれる。

10

【0062】

ある特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR4膜貫通ドメイン、およびTLR4細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR4膜貫通ドメイン、およびTLR4細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、TLR4またはCTBR、TLR4シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0063】

追加の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR5膜貫通ドメイン、およびTLR5細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR5膜貫通ドメイン、およびTLR5細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、TLR5またはCTBR、TLR5シグナルコンバーターと呼ばれる。

20

【0064】

種々の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR6膜貫通ドメイン、およびTLR6細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR6膜貫通ドメイン、およびTLR6細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、TLR6またはCTBR、TLR6シグナルコンバーターと呼ばれる。

30

【0065】

いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR7膜貫通ドメイン、およびTLR7細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR7膜貫通ドメイン、およびTLR7細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、TLR7またはCTBR、TLR7シグナルコンバーターと呼ばれる。

40

【0066】

特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR8膜貫通ドメイン、およびTLR8細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR2ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、TLR8膜貫通ドメイン、およびTLR8細胞内シグナル伝達ドメインを含むTGFβR1ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、TLR8またはCTBR、TLR8シグナルコンバーターと呼ばれる。

50

【0067】

追加の実施形態において、融合ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $TLR9$ 膜貫通ドメイン、および $TLR9$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R2$ ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $TLR9$ 膜貫通ドメイン、および $TLR9$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R1$ ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、 $TLR9$ またはCTBR、 $TLR9$ シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0068】

種々の実施形態において、融合ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $TLR10$ 膜貫通ドメイン、および $TLR10$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R2$ ポリペプチドと、ウイルス自己切断型2Aペプチドと、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、 $TLR10$ 膜貫通ドメイン、および $TLR10$ 細胞内シグナル伝達ドメインを含む $TGF\beta R1$ ポリペプチドと、を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、CTBR、 $TLR10$ またはCTBR、 $TLR10$ シグナルコンバーターと呼ばれる。

【0069】

いくつかの実施形態において、ウイルス自己切断型2Aポリペプチドは、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea assigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、ブタテッシュウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される。

【0070】

さらなる実施形態において、本明細書で企図される融合ポリペプチドは、遺伝子操作された抗原受容体および第2のウイルス自己切断型2Aポリペプチドをさらに含む。

【0071】

ある特定の実施形態において、第2のウイルス自己切断型2Aポリペプチドは、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea assigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、ブタテッシュウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される。

【0072】

特定の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体が、遺伝子操作されたT細胞受容体(TCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、DARIC受容体もしくはその構成成分、およびキメラサイトカイン受容体からなる群から選択され、任意選択的に、遺伝子操作された抗原受容体が、アルファ葉酸受容体、5T4、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2(HER2)を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、胎児性AChR、FR α 、GD2、GD3、Glypican-3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R $\alpha 2$ 、ラムダ、ルイス-Y、カップ、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、Survivin、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1からなる群から選択される抗原を認識する。

【0073】

さらなる実施形態において、融合ポリペプチドは、配列番号26~35のいずれか一つ

に示すアミノ酸配列を含む。

【0074】

種々の実施形態において、本明細書で企図される融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

【0075】

追加の実施形態において、本明細書で企図されるポリヌクレオチドまたは融合ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【0076】

特定の実施形態において、本明細書で企図される融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはベクターを含む細胞が提供される。

【0077】

さらなる実施形態において、細胞は造血細胞である。

【0078】

ある特定の実施形態において、細胞はT細胞である。

【0079】

種々の実施形態において、細胞は、CD3+、CD4+、および／またはCD8+細胞である。

【0080】

いくつかの実施形態において、細胞は免疫エフェクター細胞である。

【0081】

追加の実施形態において、細胞は、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、またはヘルパーT細胞である。

【0082】

さらなる実施形態において、細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞またはナチュラルキラーT（NKT）細胞である。

【0083】

特定の実施形態において、本細胞の源は、末梢血単核球、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺問題（issue）、感染部位由来組織、復水、胸水、脾臓組織、または腫瘍である。

【0084】

いくつかの実施形態において、本明細書で企図される融合ポリペプチドを含む細胞は、遺伝子操作された抗原受容体をさらに含む。

【0085】

種々の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体は、遺伝子操作されたT細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、DARIC受容体もしくはその構成要素、またはキメラサイトカイン受容体である。

【0086】

追加の実施形態において、本明細書で企図される融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または細胞を含む組成物が提供される。

【0087】

特定の実施形態において、本明細書で企図される、薬学的に許容される担体および融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または細胞を含む薬学的組成物が提供される。

【0088】

ある特定の実施形態において、それを必要とする対象を治療する方法は、本明細書で企図される有効量の組成物または薬学的組成物を対象に投与することを含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、がん、感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、および免疫不全症、またはそれらに関連する病態のうちの少なくとも1つの症状を治療、予防、または改善する方法は、本明細書で企図される有効量の組成物または薬学的組成物を対象に

10

20

30

40

50

投与することを含む。

【0090】

追加の実施形態において、固形がんを治療する方法は、本明細書で企図される有効量の組成物または薬学的組成物を対象に投与することを含む。

【0091】

種々の実施形態において、固形がんは、肝臓がん、膵臓がん、肺がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、精巣がん、膀胱がん、脳腫瘍、肉腫、頭頸部がん、骨がん、甲状腺がん、腎臓がん、または皮膚がんを含む。

【0092】

特定の実施形態において、固形がんは、膵臓がん、肺がん、または乳がんである。

10

【0093】

ある特定の実施形態において、本明細書で企図される有効量の組成物または薬学的組成物を対象に投与することを含む、血液悪性腫瘍を治療する方法が提供される。

【0094】

種々の実施形態において、血液悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または多発性骨髄腫である。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

(a) 第1のポリペプチドであって、

(i) TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、

20

(ii) 膜貫通ドメイン、および

(iii) 免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、

(b) ポリペプチド切断シグナルと、

(c) 第2のポリペプチドであって、

(i) TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、

(ii) 膜貫通ドメイン、および

(iii) 免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目2)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、またはToll様受容体から単離されている、項目1に記載の融合ポリペプチド。

30

(項目3)

前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、またはToll様受容体から単離されている、項目1または項目2に記載の融合ポリペプチド。

(項目4)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-12Rβ2細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-12Rβ1細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

40

(項目5)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが、IL-12Rβ2膜貫通ドメインを含む、項目4に記載の融合ポリペプチド。

(項目6)

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが、IL-12Rβ1膜貫通ドメインを含む、項目4または項目5に記載の融合ポリペプチド。

(項目7)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-12Rβ1細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体

50

の細胞内シグナル伝達ドメインが、 $IL-12R\beta 2$ 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

(項目8)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが $IL-12R\beta 1$ 膜貫通ドメインを含む、項目7に記載の融合ポリペプチド。

(項目9)

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが、 $IL-12R\beta 2$ 膜貫通ドメインを含む、項目7または項目8に記載の融合ポリペプチド。

(項目10)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、 $IL-7R\alpha$ 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、 $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

10

(項目11)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが $IL-7R\alpha$ 膜貫通ドメインを含む、項目10に記載の融合ポリペプチド。

(項目12)

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが、 $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメインを含む、項目10または項目11に記載の融合ポリペプチド。

(項目13)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、 $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、 $IL-7R\alpha$ 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

20

(項目14)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメインを含む、項目13に記載の融合ポリペプチド。

(項目15)

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが、 $IL-7R\alpha$ 膜貫通ドメインを含む、項目13または項目14に記載の融合ポリペプチド。

30

(項目16)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、 $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、 $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

(項目17)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが $IL-2R\beta$ 膜貫通ドメインを含む、項目16に記載の融合ポリペプチド。

(項目18)

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが、 $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメインを含む、項目16または項目17に記載の融合ポリペプチド。

40

(項目19)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、 $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、 $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

(項目20)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメインを含む、項目19に記載の融合ポリペプチド。

(項目21)

50

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインがIL-2R β 膜貫通ドメインを含む、項目19または項目20に記載の融合ポリペプチド。

(項目22)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-21R細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

(項目23)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインがIL-21R膜貫通ドメインを含む、項目22に記載の融合ポリペプチド。

(項目24)

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインがIL-2R γ 膜貫通ドメインを含む、項目22または項目23に記載の融合ポリペプチド。

(項目25)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-21R細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

(項目26)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインがIL-2R γ 膜貫通ドメインを含む、項目25に記載の融合ポリペプチド。

(項目27)

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインがIL-21R膜貫通ドメインを含む、項目25または項目26に記載の融合ポリペプチド。

(項目28)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-18R1細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-18RAP細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

(項目29)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインがIL-18R1膜貫通ドメインを含む、項目28に記載の融合ポリペプチド。

(項目30)

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインがIL-18RAP膜貫通ドメインを含む、項目28または項目29に記載の融合ポリペプチド。

(項目31)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-18RAP細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-18R1細胞内シグナル伝達ドメインである、項目1に記載の融合ポリペプチド。

(項目32)

前記第1のポリペプチドの前記膜貫通ドメインがIL-18RAP膜貫通ドメインを含む、項目31に記載の融合ポリペプチド。

(項目33)

前記第2のポリペプチドの前記膜貫通ドメインがIL-18R1膜貫通ドメインを含む、項目31または項目32に記載の融合ポリペプチド。

(項目34)

前記第1のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-1R1細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第2のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、IL-1RAP細胞内シグナル伝達ドメインである、項目

10

20

30

40

50

1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 5)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I L - 1 R 1 膜貫通ドメインを含む、
項目 3 4 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 6)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I L - 1 R A P 膜貫通ドメインを含む、
項目 3 4 または項目 3 5 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 7)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、I L - 1
R A P 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の
細胞内シグナル伝達ドメインが、I L - 1 R 1 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目
1 に記載の融合ポリペプチド。

10

(項目 3 8)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I L - 1 R A P 膜貫通ドメインを含む、
項目 3 7 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 9)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I L - 1 R 1 膜貫通ドメインを含む、
項目 3 7 または項目 3 8 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 0)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、I L - 1
R A P 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の
細胞内シグナル伝達ドメインが、I L - 1 R L 2 細胞内シグナル伝達ドメインである、項
目 1 に記載の融合ポリペプチド。

20

(項目 4 1)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I L - 1 R A P 膜貫通ドメインを含む、
項目 2 2 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 2)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I L - 1 R L 2 膜貫通ドメインを含む、
項目 4 0 または項目 4 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 3)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、I L - 1
R L 2 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の
細胞内シグナル伝達ドメインが、I L - 1 R A P 細胞内シグナル伝達ドメインである、項
目 1 に記載の融合ポリペプチド。

30

(項目 4 4)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I L - 1 R L 2 膜貫通ドメインを含む、
項目 4 3 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 5)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I L - 1 R A P 膜貫通ドメインを含む、
項目 4 3 または項目 4 4 に記載の融合ポリペプチド。

40

(項目 4 6)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、I F N A
R 1 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細
胞内シグナル伝達ドメインが、I F N A R 2 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1
に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 7)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I F N A R 1 膜貫通ドメインを含む、
項目 4 6 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 8)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I F N A R 2 膜貫通ドメインを含む、

50

項目 4 6 または項目 4 7 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 9)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、I F N A R 2 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、I F N A R 1 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 0)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I F N A R 2 膜貫通ドメインを含む、項目 4 9 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 1)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが I F N A R 1 膜貫通ドメインを含む、項目 4 9 または項目 5 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 2)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 1 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 1 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 3)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 1 膜貫通ドメインを含む、項目 5 2 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 4)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 1 膜貫通ドメインを含む、項目 5 2 または項目 5 3 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 5)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 2 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 2 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 6)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 2 膜貫通ドメインを含む、項目 5 5 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 7)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 2 膜貫通ドメインを含む、項目 5 5 または項目 5 6 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 8)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 3 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 3 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5 9)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 3 膜貫通ドメインを含む、項目 5 8 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 0)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 3 膜貫通ドメインを含む、項目 5 8 または項目 5 9 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 1)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 4 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 4 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

10

20

30

40

50

(項目 6 2)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 4 膜貫通ドメインを含む、項目 6 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 3)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 4 膜貫通ドメインを含む、項目 6 1 または項目 6 2 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 4)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 5 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 5 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

10

(項目 6 5)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 5 膜貫通ドメインを含む、項目 6 4 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 6)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 5 膜貫通ドメインを含む、項目 6 4 または項目 6 5 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 7)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 6 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 6 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

20

(項目 6 8)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 6 膜貫通ドメインを含む、項目 6 7 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 9)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 6 膜貫通ドメインを含む、項目 6 7 または項目 6 8 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 0)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 7 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 7 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

30

(項目 7 1)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 7 膜貫通ドメインを含む、項目 7 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 2)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 7 膜貫通ドメインを含む、項目 7 0 または項目 7 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 3)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 8 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 8 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

40

(項目 7 4)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 8 膜貫通ドメインを含む、項目 7 3 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 5)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 8 膜貫通ドメインを含む、項目 7 3 または項目 7 4 に記載の融合ポリペプチド。

50

(項目 7 6)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 9 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 9 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 7)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 9 膜貫通ドメインを含む、項目 7 6 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 8)

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 9 膜貫通ドメインを含む、項目 7 6 または項目 7 7 に記載の融合ポリペプチド。

10

(項目 7 9)

前記第 1 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 1 0 細胞内シグナル伝達ドメインであり、前記第 2 のポリペプチドの前記免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが、T L R 1 0 細胞内シグナル伝達ドメインである、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 8 0)

前記第 1 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 1 0 膜貫通ドメインを含む、項目 7 9 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 8 1)

20

前記第 2 のポリペプチドの前記膜貫通ドメインが T L R 1 0 膜貫通ドメインを含む、項目 7 9 または項目 8 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 8 2)

前記ポリペプチド切断シグナルがウイルス自己切断型ポリペプチドである、項目 1 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目 8 3)

前記ポリペプチド切断シグナルがウイルス自己切断型 2 A ポリペプチドである、項目 1 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目 8 4)

前記ポリペプチド切断シグナルが、口蹄疫ウイルス (F M D V) (F 2 A) ペプチド、ウマ鼻炎 A ウイルス (E R A V) (E 2 A) ペプチド、トセア・アシグナ (T h o s e a a s i g n a) ウイルス (T a V) (T 2 A) ペプチド、ブタテッシュウウイルス-1 (P T V - 1) (P 2 A) ペプチド、タイロウイルス 2 A ペプチド、および脳心筋炎ウイルス 2 A ペプチドからなる群から選択される、ウイルス自己切断型ペプチドである、項目 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

30

(項目 8 5)

(a) T G F β R 2 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 2 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) I L - 1 2 R β 2 膜貫通ドメイン、および
(i i i) I L - 1 2 R β 2 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 2 ポリペプチドと、
(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、
(c) T G F β R 1 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 1 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) I L - 1 2 R β 1 膜貫通ドメイン、および
(i i i) I L - 1 2 R β 1 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 1 ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

40

(項目 8 6)

(a) T G F β R 2 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 2 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、

50

- (i i) IL-12R β 1膜貫通ドメイン、および
 (i i i) IL-12R β 1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R2ポリペプチドと、
 (b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
 (c) TGF β R1ポリペプチドであって、
 (i) TGF β R1の細胞外TGF β 1結合ドメイン、
 (i i) IL-12R β 2膜貫通ドメイン、および
 (i i i) IL-12R β 2細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。
 (項目87)
- (a) TGF β R2ポリペプチドであって、
 (i) TGF β R2の細胞外TGF β 1結合ドメイン、
 (i i) IL-7R α 膜貫通ドメイン、および
 (i i i) IL-7R α 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R2ポリペプチドと、
 (b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
 (c) TGF β R1ポリペプチドであって、
 (i) TGF β R1の細胞外TGF β 1結合ドメイン、
 (i i) IL-2R γ 膜貫通ドメイン、および
 (i i i) IL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。
 (項目88)
- (a) TGF β R2ポリペプチドであって、
 (i) TGF β R2の細胞外TGF β 1結合ドメイン、
 (i i) IL-2R γ 膜貫通ドメイン、および
 (i i i) IL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R2ポリペプチドと、
 (b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
 (c) TGF β R1ポリペプチドであって、
 (i) TGF β R1の細胞外TGF β 1結合ドメイン、
 (i i) IL-7R α 膜貫通ドメイン、および
 (i i i) IL-7R α 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。
 (項目89)
- (a) TGF β R2ポリペプチドであって、
 (i) TGF β R2の細胞外TGF β 1結合ドメイン、
 (i i) IL-2R β 膜貫通ドメイン、および
 (i i i) IL-2R β 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R2ポリペプチドと、
 (b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
 (c) TGF β R1ポリペプチドであって、
 (i) TGF β R1の細胞外TGF β 1結合ドメイン、
 (i i) IL-2R γ 膜貫通ドメイン、および
 (i i i) IL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。
 (項目90)
- (a) TGF β R2ポリペプチドであって、
 (i) TGF β R2の細胞外TGF β 1結合ドメイン、
 (i i) IL-2R γ 膜貫通ドメイン、および
 (i i i) IL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R2ポリペ

10

20

30

40

50

チドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、

(c) TGFβR1 ポリペプチドであって、

(i) TGFβR1 の細胞外 TGFβ1 結合ドメイン、

(ii) IL-2Rβ 膜貫通ドメイン、および

(iii) IL-2Rβ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1 ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目 9 1)

(a) TGFβR2 ポリペプチドであって、

(i) TGFβR2 の細胞外 TGFβ1 結合ドメイン、

(ii) IL-21R 膜貫通ドメイン、および

(iii) IL-21R 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2 ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、

(c) TGFβR1 ポリペプチドであって、

(i) TGFβR1 の細胞外 TGFβ1 結合ドメイン、

(ii) IL-2Rγ 膜貫通ドメイン、および

(iii) IL-2Rγ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1 ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目 9 2)

(a) TGFβR2 ポリペプチドであって、

(i) TGFβR2 の細胞外 TGFβ1 結合ドメイン、

(ii) IL-2Rγ 膜貫通ドメイン、および

(iii) IL-2Rγ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2 ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、

(c) TGFβR1 ポリペプチドであって、

(i) TGFβR1 の細胞外 TGFβ1 結合ドメイン、

(ii) IL-21R 膜貫通ドメイン、および

(iii) IL-21R 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1 ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目 9 3)

(a) TGFβR2 ポリペプチドであって、

(i) TGFβR2 の細胞外 TGFβ1 結合ドメイン、

(ii) IL-18R1 膜貫通ドメイン、および

(iii) IL-18R1 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2 ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、

(c) TGFβR1 ポリペプチドであって、

(i) TGFβR1 の細胞外 TGFβ1 結合ドメイン、

(ii) IL-18RAP 膜貫通ドメイン、および

(iii) IL-18RAP 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1 ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目 9 4)

(a) TGFβR2 ポリペプチドであって、

(i) TGFβR2 の細胞外 TGFβ1 結合ドメイン、

(ii) IL-18RAP 膜貫通ドメイン、および

(iii) IL-18RAP 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2 ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、

(c) TGFβR1ポリペプチドであって、
(i) TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
(ii) IL-18R1膜貫通ドメイン、および
(iii) IL-18R1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目95)

(a) TGFβR2ポリペプチドであって、
(i) TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
(ii) IL-1R1膜貫通ドメイン、および
(iii) IL-1R1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2ポリペプチドと、

10

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
(c) TGFβR1ポリペプチドであって、
(i) TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
(ii) IL-1RAP膜貫通ドメイン、および
(iii) IL-1RAP細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目96)

(a) TGFβR2ポリペプチドであって、
(i) TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
(ii) IL-1RAP膜貫通ドメイン、および
(iii) IL-1RAP細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2ポリペプチドと、

20

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
(c) TGFβR1ポリペプチドであって、
(i) TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
(ii) IL-1R1膜貫通ドメイン、および
(iii) IL-1R1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目97)

(a) TGFβR2ポリペプチドであって、
(i) TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
(ii) IFNAR1膜貫通ドメイン、および
(iii) IFNAR1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2ポリペプチドと、

30

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
(c) TGFβR1ポリペプチドであって、
(i) TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
(ii) IFNAR2膜貫通ドメイン、および
(iii) IFNAR2細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

40

(項目98)

(a) TGFβR2ポリペプチドであって、
(i) TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
(ii) IFNAR2膜貫通ドメイン、および
(iii) IFNAR2細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
(c) TGFβR1ポリペプチドであって、
(i) TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、

50

(i i) I F N A R 1 膜貫通ドメイン、および
(i i i) I F N A R 1 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 1 ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目 9 9)

(a) T G F β R 2 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 2 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) T L R 1 膜貫通ドメイン、および
(i i i) T L R 1 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 2 ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、
(c) T G F β R 1 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 1 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) T L R 1 膜貫通ドメイン、および
(i i i) T L R 1 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 1 ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目 1 0 0)

(a) T G F β R 2 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 2 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) T L R 2 膜貫通ドメイン、および
(i i i) T L R 2 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 2 ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、
(c) T G F β R 1 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 1 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) T L R 2 膜貫通ドメイン、および
(i i i) T L R 2 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 1 ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目 1 0 1)

(a) T G F β R 2 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 2 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) T L R 3 膜貫通ドメイン、および
(i i i) T L R 3 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 2 ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、
(c) T G F β R 1 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 1 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) T L R 3 膜貫通ドメイン、および
(i i i) T L R 3 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 1 ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目 1 0 2)

(a) T G F β R 2 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 2 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) T L R 4 膜貫通ドメイン、および
(i i i) T L R 4 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 2 ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型 2 A ペプチドと、
(c) T G F β R 1 ポリペプチドであって、
(i) T G F β R 1 の細胞外 T G F β 1 結合ドメイン、
(i i) T L R 4 膜貫通ドメイン、および
(i i i) T L R 4 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、T G F β R 1 ポリペプチド

10

20

30

40

50

と、を含む、融合ポリペプチド。

(項目103)

(a) TGF β R2ポリペプチドであって、

(i) TGF β R2の細胞外TGF β 1結合ドメイン、

(ii) TLR5膜貫通ドメイン、および

(iii) TLR5細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R2ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、

(c) TGF β R1ポリペプチドであって、

(i) TGF β R1の細胞外TGF β 1結合ドメイン、

(ii) TLR5膜貫通ドメイン、および

(iii) TLR5細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目104)

(a) TGF β R2ポリペプチドであって、

(i) TGF β R2の細胞外TGF β 1結合ドメイン、

(ii) TLR6膜貫通ドメイン、および

(iii) TLR6細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R2ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、

(c) TGF β R1ポリペプチドであって、

(i) TGF β R1の細胞外TGF β 1結合ドメイン、

(ii) TLR6膜貫通ドメイン、および

(iii) TLR6細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目105)

(a) TGF β R2ポリペプチドであって、

(i) TGF β R2の細胞外TGF β 1結合ドメイン、

(ii) TLR7膜貫通ドメイン、および

(iii) TLR7細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R2ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、

(c) TGF β R1ポリペプチドであって、

(i) TGF β R1の細胞外TGF β 1結合ドメイン、

(ii) TLR7膜貫通ドメイン、および

(iii) TLR7細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目106)

(a) TGF β R2ポリペプチドであって、

(i) TGF β R2の細胞外TGF β 1結合ドメイン、

(ii) TLR8膜貫通ドメイン、および

(iii) TLR8細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R2ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、

(c) TGF β R1ポリペプチドであって、

(i) TGF β R1の細胞外TGF β 1結合ドメイン、

(ii) TLR8膜貫通ドメイン、および

(iii) TLR8細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGF β R1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

(項目107)

(a) TGFβR2ポリペプチドであって、
 (i) TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
 (ii) TLR9膜貫通ドメイン、および
 (iii) TLR9細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
 (c) TGFβR1ポリペプチドであって、
 (i) TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
 (ii) TLR9膜貫通ドメイン、および
 (iii) TLR9細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

10

(項目108)

(a) TGFβR2ポリペプチドであって、
 (i) TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
 (ii) TLR10膜貫通ドメイン、および
 (iii) TLR10細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR2ポリペプチドと、

(b) ウイルス自己切断型2Aペプチドと、
 (c) TGFβR1ポリペプチドであって、
 (i) TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、
 (ii) TLR10膜貫通ドメイン、および
 (iii) TLR10細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、TGFβR1ポリペプチドと、を含む、融合ポリペプチド。

20

(項目109)

前記ウイルス自己切断型2Aポリペプチドが、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea assigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、ブタテッショウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される、項目85～108のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

30

(項目110)

遺伝子操作された抗原受容体および第2のウイルス自己切断型2Aポリペプチドをさらに含む、項目1～109のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目111)

前記第2のウイルス自己切断型2Aポリペプチドが、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea assigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、ブタテッショウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される、項目110に記載の融合ポリペプチド。

40

(項目112)

前記遺伝子操作された抗原受容体が、遺伝子操作されたT細胞受容体(TCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、DARIC受容体もしくはその構成成分、およびキメラサイトカイン受容体からなる群から選択され、任意選択的に、前記遺伝子操作された抗原受容体が、アルファ葉酸受容体、5T4、αvβ6インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、Erbb2(HER2)を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎児性AChR、FRα、GD2、GD3、Glyp

50

i c a n - 3 (G P C 3) 、 H L A - A 1 + M A G E 1 、 H L A - A 2 + M A G E 1 、 H L A - A 3 + M A G E 1 、 H L A - A 1 + N Y - E S O - 1 、 H L A - A 2 + N Y - E S O - 1 、 H L A - A 3 + N Y - E S O - 1 、 I L - 1 1 R α 、 I L - 1 3 R α 2 、 ラムダ、ルイス-Y、カップ、メソテリン、M u c 1、M u c 1 6、N C A M、N K G 2 D リガンド、N Y - E S O - 1、P R A M E、P S C A、P S M A、R O R 1、S S X、S u r v i v i n、T A G 7 2、T E M、V E G F R 2、および W T - 1 からなる群から選択される抗原を認識する、項目 1 1 0 または項目 1 1 1 に記載のポリペプチド。

(項目 1 1 3)

配列番号 2 6 ~ 3 5 のいずれか 1 つに示すアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

(項目 1 1 4)

項目 1 ~ 1 1 3 のいずれか一項に記載の T G F β R 2 ポリペプチドおよび T G F β R 1 ポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体。

(項目 1 1 5)

項目 1 ~ 1 1 3 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

(項目 1 1 6)

項目 1 ~ 1 1 3 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または項目 1 1 4 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

(項目 1 1 7)

項目 1 ~ 1 1 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド、項目 1 1 3 に記載のポリペプチド複合体、項目 1 1 4 に記載のポリヌクレオチド、または項目 1 1 5 に記載のベクターを含む、細胞。

(項目 1 1 8)

前記細胞が造血細胞である、項目 1 1 7 に記載の細胞。

(項目 1 1 9)

前記細胞が T 細胞である、項目 1 1 7 または 1 1 8 に記載の細胞。

(項目 1 2 0)

前記細胞が C D 3 $^{+}$ 、C D 4 $^{+}$ 、および / または C D 8 $^{+}$ 細胞である、項目 1 1 7 ~ 1 1 9 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 2 1)

前記細胞が免疫エフェクター細胞である、項目 1 1 7 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 2 2)

前記細胞が、細胞傷害性 T リンパ球 (C T L)、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L)、またはヘルパー T 細胞である、項目 1 1 7 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 2 3)

前記細胞がナチュラルキラー (N K) 細胞またはナチュラルキラー T (N K T) 細胞である、項目 1 1 7 ~ 1 2 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 2 4)

前記細胞の源が、末梢血単核球、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来組織、腹水、胸水、脾臓組織、または腫瘍である、項目 1 1 7 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 2 5)

遺伝子操作された抗原受容体をさらに含む、項目 1 1 7 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 2 6)

前記遺伝子操作された抗原受容体が、遺伝子操作された T 細胞受容体 (T C R)、キメラ抗原受容体 (C A R)、D A R I C 受容体、またはその構成要素、およびキメラサイトカイン受容体からなる群から選択される、項目 1 2 5 に記載の細胞。

(項目 1 2 7)

項目 1 ~ 1 1 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド、項目 1 1 4 に記載のポリペプチ

10

20

30

40

50

ド複合体、項目 1 1 5 に記載のポリヌクレオチド、項目 1 1 6 に記載のベクター、または項目 1 1 7 ～ 1 2 6 のいずれか一項に記載の細胞を含む、組成物。

(項目 1 2 8)

薬学的に許容される担体と、項目 1 ～ 1 1 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド、項目 1 1 3 に記載のポリペプチド複合体、項目 1 1 4 に記載のポリヌクレオチド、項目 1 1 5 に記載のベクター、または項目 1 1 7 ～ 1 2 6 のいずれか一項に記載の細胞と、を含む、薬学的組成物。

(項目 1 2 9)

治療を必要とする対象を治療する方法であって、有効量の項目 1 2 8 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 1 3 0)

がん、感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、および免疫不全症、またはそれらに関連する病態のうちの少なくとも 1 つの症状を治療、予防、または改善する方法であって、有効量の項目 1 2 8 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 1 3 1)

固形がんを治療する方法であって、有効量の項目 1 2 8 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 1 3 2)

前記固形がんが、肝臓がん、膵臓がん、肺がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、精巣がん、膀胱がん、脳腫瘍、肉腫、頭頸部がん、骨がん、甲状腺がん、腎臓がん、または皮膚がんを含む、項目 1 3 1 に記載の方法。

(項目 1 3 3)

前記固形がんが膵臓がん、肺がん、または乳がんである、項目 1 3 1 または 1 3 2 に記載の方法。

(項目 1 3 4)

血液悪性腫瘍を治療する方法であって、有効量の項目 1 2 8 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 1 3 5)

前記血液悪性腫瘍が白血病、リンパ腫、または多発性骨髄腫である、項目 1 3 4 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図 1】キメラ抗原受容体 (CAR) および TGF β 優性陰性受容体 (CAR-DNR)、CAR および TGF β R2 サブユニット (R2)、CAR および CTBR12 シグナルコンバーター (CAR-CTBR12)、ならびに CAR および CTBR7 シグナルコンバーター (CAR-CTBR7) をコードするポリペプチドの略画を示す。

【図 2】抗 ROR1 CAR 単独、ならびに TGF β DNR、TGF β R2 サブユニット、および CTBR12 シグナルコンバーターと組み合わせて抗 ROR1 CAR を形質導入した、初代ヒト T 細胞における CAR および TGF β R2 サブユニットの発現を示す。

【図 3】抗 ROR1 CAR 単独、ならびに TGF β DNR、TGF β R2 サブユニット、および CTBR12 シグナルコンバーターと組み合わせて抗 ROR1 CAR を形質導入し、未処置細胞との対比で TGF β 1 で処置した、初代ヒト T 細胞におけるリン酸化 SMAD2/3 の発現を示す。

【図 4】抗 ROR1 CAR 単独、ならびに TGF β DNR、TGF β R2 サブユニット、および CTBR12 シグナルコンバーターと組み合わせて抗 ROR1 CAR を形質導入し、IL-12 (上段) または TGF β 1 (下段) のいずれかで処置した、初代ヒト T 細胞におけるリン酸化 STAT4 の発現を示す。

【図 5】抗 ROR1 CAR および CTBR12 シグナルコンバーターを形質導入し、IL-12 (左パネル) または TGF β 1 (右パネル) のいずれかで処置した、初代ヒト T 細胞におけるリン酸化 STAT4 およびリン酸化 STAT5 の発現を示す。

10

20

30

40

50

【図6-1】CTBR12シグナルコンバーターと組み合わせて抗ROR1 CARを形質導入し、TGFβ1の存在下または非存在下にて21日間ROR1を発現する標的細胞で連続的に再刺激した、初代ヒトT細胞からの遺伝子発現分析を示す。

【図6-2】CTBR12シグナルコンバーターと組み合わせて抗ROR1 CARを形質導入し、TGFβ1の存在下または非存在下にて21日間ROR1を発現する標的細胞で連続的に再刺激した、初代ヒトT細胞からの遺伝子発現分析を示す。

【図7】抗ROR1 CAR単独およびTGFβ DNRまたはCTBR12シグナルコンバーターと組み合わせた抗ROR1 CARを形質導入し、TGFβ1の存在下または不存在下にてCD3またはROR1でコーティングしたプレートで培養した、初代ヒトT細胞からのIFNγ分泌を示す。

10

【図8】抗ROR1 CAR単独、およびTGFβ DNRまたはCTBR12シグナルコンバーターと組み合わせた抗ROR1 CARを形質導入し、TGFβ1の存在下または不存在下にてROR1を発現する標的細胞で連続的に再刺激した、初代ヒトT細胞の増殖曲線を示す。

【図9】抗ROR1 CAR単独、ならびにTGFβ DNRおよびCTBR7シグナルコンバーターと組み合わせた抗ROR1 CARを形質導入した初代ヒトT細胞におけるCARおよびTGFβR2サブユニットの発現を示す。

【図10】抗ROR1 CAR単独、ならびにTGFβ DNRおよびCTBR7シグナルコンバーターと組み合わせた抗ROR1 CARを形質導入し、TGFβ1で処置した、初代ヒトT細胞におけるリン酸化SMAD2/3の発現を示す。

20

【図11】抗ROR1 CAR単独、ならびにTGFβ DNRおよびCTBR7シグナルコンバーターと組み合わせた抗ROR1 CARを形質導入し、TGFβ1で処置した、初代ヒトT細胞におけるリン酸化STAT5の発現を示す。

【図12】抗ROR1 CAR単独、およびTGFβ DNRおよびCTBR7シグナルコンバーターと組み合わせて抗ROR1 CARを形質導入し、TGFβ1で処置した、初代ヒトT細胞におけるBCL2の発現を示す。

【図13】TGFβ1の存在下または不存在下にて、抗ROR1 CAR単独、およびTGFβ DNRまたはCTBR7シグナルコンバーターと組み合わせて抗ROR1 CARを形質導入した、初代ヒトT細胞の増殖曲線を示す。

【図14】抗ROR1 CAR単独、およびTGFβ DNRまたはCTBR7シグナルコンバーターと組み合わせて抗ROR1 CARを形質導入し、TGFβ1の存在下または不存在下にてROR1を発現する標的細胞で連続的に再刺激した、初代ヒトT細胞の増殖曲線を示す。

30

【図15】抗EGFR CAR単独、ならびにTGFβ DNR、CTBR12シグナルコンバーター、およびCTBR7シグナルコンバーター（上段パネル）と組み合わせて抗EGFR CARを形質導入した、初代ヒトT細胞におけるCARおよびTGFβR2サブユニットの発現を示す。図15はまた、抗EGFR CAR単独、およびTGFβ DNR、CTBR12シグナルコンバーター、およびCTBR7シグナルコンバーターと組み合わせて抗EGFR CARを形質導入し、未処置細胞との対比でTGFβ1（下段パネル）で処置した、初代ヒトT細胞におけるリン酸化SMAD2/3の発現を示す。

40

【図16】抗EGFR CAR単独、TGFβ DNR、およびCTBR12シグナルコンバーターと組み合わせて抗EGFR CARを形質導入し、IL-12またはTGFβ1のいずれかで処置した、初代ヒトT細胞におけるリン酸化STAT4の発現を示す。

【図17】抗EGFR CAR単独、ならびにTGFβ DNRおよびCTBR7シグナルコンバーターと組み合わせて抗EGFR CARを形質導入し、IL-7またはTGFβ1のいずれかで処置した、初代ヒトT細胞におけるリン酸化STAT5の発現を示す。

【図18】抗EGFR CAR単独、ならびにTGFβ DNRまたはCTBR12シグナルコンバーターと組み合わせて抗EGFR CARを形質導入し、TGFβ1の存在下または不存在下にてEGFR（-）またはEGFR（+）細胞株と共に培養した、初代ヒトT細胞からのIFNγ分泌を示す。

50

【図19】抗EGFR CAR単独、およびTGFβ DNR、CTBR12シグナルコンバーター、またはCTBR7シグナルコンバーターと組み合わせて抗EGFR CARを形質導入し、TGFβ1の存在下または不存在下にてEGFRを発現する標的細胞で連続的に再刺激した、初代ヒトT細胞の増殖曲線を示す。

【図20】NY-ESO1(A2)、NY-ESO1TCRおよびTGFβ優性陰性受容体(NY-ESO1.DNR)、NY-ESO1TCRおよびCTBR7シグナルコンバーター(NY-ESO1.CTBR7)、ならびにNY-ESO1TCRおよびCTBR12シグナルコンバーター(NY-ESO1.CTBR12)を認識するT細胞受容体(TCR)をコードするポリペプチドの略画を示す。

【図21】NY-ESO1TCR、NY-ESO1.DNR、NY-ESO1.CTBR7、およびNY-ESO1.CTBR12を形質導入し、未処置細胞との対比でTGFβ1で処置した、初代ヒトT細胞におけるリン酸化SMAD2/3の発現を示す。

【図22】NY-ESO1.CTBR7を形質導入し、IL-7またはTGFβ1(上段パネル)のいずれかで処置した、初代ヒトT細胞におけるリン酸化STAT5の発現を示す。図22はまた、NY-ESO1.CTBR12を形質導入し、IL-12またはTGFβ1(下段パネル)のいずれかで処置した、初代ヒトT細胞におけるリン酸化STAT4の発現を示す。

【図23】NY-ESO1TCR、NY-ESO1.DNR、NY-ESO1.CTBR7、およびNY-ESO1.CTBR12を形質導入し、TGFβ1の存在下または不存在下にてA2(+)/NY-ESO1(+)細胞株と共に培養した、初代ヒトT細胞からのIFNγ分泌を示す。

【発明を実施するための形態】

【0096】

配列識別の簡単な説明

配列番号1は、ヒトTGFβR1のポリペプチド配列を示す。

配列番号2は、ヒトTGFβR2のポリペプチド配列を示す。

配列番号3は、ヒトIL-12Rβ1(CD212)のポリペプチド配列を示す。

配列番号4は、ヒトIL-12Rβ2のポリペプチド配列を示す。

配列番号5は、ヒトIL-7Rα(CD127)のポリペプチド配列を示す。

配列番号6は、ヒトIL-2Rγ(CD132)のポリペプチド配列を示す。

配列番号7は、ヒトIL-2Rβ(CD122)のポリペプチド配列を示す。

配列番号8は、ヒトIL-21R(CD360)のポリペプチド配列を示す。

配列番号9は、ヒトIL-18R1(CD218a)のポリペプチド配列を示す。

配列番号10は、ヒトIL-18RAP(CD218b)のポリペプチド配列を示す。

配列番号11は、ヒトIL-1R1(CD121a)のポリペプチド配列を示す。

配列番号12は、ヒトIL-1RAPのポリペプチド配列を示す。

配列番号13は、ヒトIFNAR1のポリペプチド配列を示す。

配列番号14は、ヒトIFNAR2のポリペプチド配列を示す。

配列番号15は、ヒトIL-1RL2のポリペプチド配列を示す。

配列番号16は、ヒトTLR1(CD281)のポリペプチド配列を示す。

配列番号17は、ヒトTLR2(CD282)のポリペプチド配列を示す。

配列番号18は、ヒトTLR3(CD283)のポリペプチド配列を示す。

配列番号19は、ヒトTLR4(CD284)のポリペプチド配列を示す。

配列番号20は、ヒトTLR5(CD285)のポリペプチド配列を示す。

配列番号21は、ヒトTLR6(CD286)のポリペプチド配列を示す。

配列番号22は、ヒトTLR7(CD287)のポリペプチド配列を示す。

配列番号23は、ヒトTLR8(CD288)のポリペプチド配列を示す。

配列番号24は、ヒトTLR9(CD289)のポリペプチド配列を示す。

配列番号25は、ヒトTLR10(CD290)のポリペプチド配列を示す。

配列番号26は、ヒトTGFβR1の細胞外ドメイン、ならびにヒトIL-12Rβ1

の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。

配列番号 27 は、ヒト TGF β R2 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-12 R β 2 の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。

配列番号 28 は、ヒト TGF β R2 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-12 R β 2 の膜貫通および細胞内ドメイン、ポリペプチド切断配列、ならびにヒト TGF β R1 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-12 R β 1 の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。

配列番号 29 は、キメラ抗原受容体、ポリペプチド切断配列、ヒト TGF β R2 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-12 R β 2 の膜貫通および細胞内ドメイン、ポリペプチド切断配列、ならびにヒト TGF β R1 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-12 R β 1 の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。

配列番号 30 は、キメラ抗原受容体、ポリペプチド切断配列、ヒト TGF β R2 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-12 R β 2 の膜貫通および細胞内ドメイン、ポリペプチド切断配列、ならびにヒト TGF β R1 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-12 R β 1 の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。X は、任意の scFv 配列を表す。

配列番号 31 は、ヒト TGF β R1 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-2 R γ の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。

配列番号 32 は、ヒト TGF β R2 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-7 R α の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。

配列番号 33 は、ヒト TGF β R2 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-7 R α の膜貫通および細胞内ドメイン、ポリペプチド切断配列、ならびにヒト TGF β R1 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-2 R γ の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。

配列番号 34 は、キメラ抗原受容体、ポリペプチド切断配列、ヒト TGF β R2 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-7 R α の膜貫通および細胞内ドメイン、ポリペプチド切断配列、ならびにヒト TGF β R1 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-2 R γ の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。

配列番号 35 は、キメラ抗原受容体、ポリペプチド切断配列、ヒト TGF β R2 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-7 R α の膜貫通および細胞内ドメイン、ポリペプチド切断配列、ならびにヒト TGF β R1 の細胞外ドメイン、ならびにヒト IL-2 R γ の膜貫通および細胞内ドメインを含む融合タンパク質のポリペプチド配列を示す。

配列番号 36 ~ 46 は、種々のリンカーのアミノ酸配列を示す。

配列番号 47 ~ 71 は、プロテアーゼ切断部位および自己切断型ポリペプチド切断部位のアミノ酸配列を示す。

【0097】

A. 概要

キメラ抗原受容体を発現する T 細胞 (CAR T 細胞) は、血液悪性腫瘍における有意な抗腫瘍活性を示す。しかし、固形腫瘍における活性は、免疫抑制性の固形腫瘍微小環境 (TME) のために部分的に制限を受ける。腫瘍細胞および腫瘍浸潤リンパ球による TGF β を含む免疫抑制サイトカインの過剰産生は、免疫抑制腫瘍微小環境に貢献する。TGF β は、様々なメカニズムを介して T 細胞機能を阻害する。TGF β は、しばしば、がん罹患している患者における免疫細胞の機能および不良な予後を阻害する、腫瘍転移および浸潤に関連する。腫瘍特異的 CTL 中の TGF β R2 を介した TGF β シグナル伝達は、腫瘍におけるそれらの機能および頻度を弱め、モノクローナル抗体による CD8⁺ T 細胞上の TGF β シグナル伝達の遮断は、腫瘍部位でより急速な腫瘍監視およびさらに多くの CTL の存在をもたらす。これまでに、臨床環境において TGF β を阻害する戦略は有意な治療効果が得られなかった。

【0098】

本開示は、一般に、免疫抑制 TGF β シグナルを免疫刺激シグナルおよびポリペプチド

10

20

30

40

50

を発現する細胞に変換するポリペプチドに関する。いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、本明細書で企図されるポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ および $TGF\beta R2$ の $TGF\beta$ 結合ドメインを含む $TGF\beta$ シグナルコンバーターであり、それは、免疫刺激エンドドメインに連結され、免疫エフェクター細胞で共発現される場合、免疫抑制シグナルによる $TGF\beta$ 曝露を、免疫エフェクター細胞の活性および機能を刺激する免疫刺激シグナルに変換することができる。免疫エフェクター細胞における $TGF\beta$ シグナルコンバーターポリペプチドの共発現は、例えば、炎症性サイトカインを回復または増加させることによって、細胞を $TGF\beta$ の免疫抑制性の影響力に対して抵抗性にする。特定の好ましい実施形態において、 $TGF\beta$ シグナルコンバーターポリペプチドはキメラ $TGF\beta$ 受容体または $CTBR$ と呼ばれる。

10

【0099】

種々の実施形態において、本開示は、部分的には、免疫抑制 $TGF\beta$ シグナルを1つ以上の免疫受容体のうちの1つ以上の細胞内ドメインを介してまたはそれによって媒介された免疫刺激シグナルに変換するポリペプチドを企図する。

【0100】

種々の実施形態において、本開示は、部分的には、免疫抑制 $TGF\beta$ シグナルを1つ以上のサイトカイン受容体のうちの1つ以上の細胞内ドメインを介してまたはそれによって媒介された免疫刺激シグナルに変換するポリペプチドを企図する。

【0101】

種々の実施形態において、本開示は、部分的には、免疫抑制 $TGF\beta$ シグナルを1つ以上のインターロイキン受容体のうちの1つ以上の細胞内ドメインを介してまたはそれによって媒介された免疫刺激シグナルに変換するポリペプチドを企図する。

20

【0102】

種々の実施形態において、本開示は、部分的には、免疫抑制 $TGF\beta$ シグナルを1つ以上のパターン認識受容体のうちの1つ以上の細胞内ドメインを介してまたはそれによって媒介された免疫刺激シグナルに変換するポリペプチドを企図する。

【0103】

種々の実施形態において、本開示は、部分的には、免疫抑制 $TGF\beta$ シグナルを1つ以上の $Toll$ 様受容体のうちの1つ以上の細胞内ドメインを介してまたはそれによって媒介された免疫刺激シグナルに変換するポリペプチドを企図する。

30

【0104】

特定の実施形態において、本開示は、部分的には、 $TGF\beta$ 、膜貫通ドメイン、および1つ以上の免疫受容体のうちの1つ以上の細胞内ドメインに結合する $TGF\beta R1$ 細胞外ドメインを含むポリペプチド、ならびに $TGF\beta$ 、膜貫通ドメイン、および1つ以上の免疫受容体のうちの1つ以上の細胞内ドメインに結合する $TGF\beta R2$ 細胞外ドメインを含むポリペプチド、を企図する。一実施形態において、ポリペプチドは、ポリペプチド切断シグナル、例えば、 $2A$ ポリペプチド切断シグナルによって、互いに連結される。

【0105】

特定の実施形態において、本開示は、部分的には、 $TGF\beta$ 、膜貫通ドメイン、および1つ以上の免疫受容体のうちの1つ以上の細胞内ドメインに結合する $TGF\beta R1$ 細胞外ドメインを含むポリペプチド、ならびに $TGF\beta$ 、膜貫通ドメイン、および1つ以上の免疫受容体のうちの1つ以上の細胞内ドメインに結合する $TGF\beta R2$ 細胞外ドメインを含むポリペプチド、を発現する免疫エフェクター細胞、例えば、 CAR T 細胞を企図する。

40

【0106】

特定の実施形態において、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインは、 $IL-12$ 受容体、 $IL-7$ 受容体、 $IL-15$ 受容体、 $IL-21$ 受容体、 $IL-2$ 受容体、 $IL-1$ 受容体、 $IL-18$ 受容体、 $IL-36$ 受容体、 I 型 IFN 受容体、 $TLR1$ 受容体、 $TLR2$ 受容体、 $TLR3$ 受容体、 $TLR4$ 受容体、 $TLR5$ 受容体、 $TLR6$ 受容体、 $TLR7$ 受容体、 $TLR8$ 受容体、 $TLR9$ 受容体、または $TLR10$ 受容体から単離された。

50

【0107】

特定の実施形態において、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-12R β 2、IL-7R α 、IL-2R γ 、IL-2R β 、IL-21R、IL-18R1、IL-18RAP、IL-1R1、IL-1RAP、IFNAR1、IFNAR2、IL-1RL2、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、またはTLR10から単離される。

【0108】

特定の実施形態の実践は、特にそれとは反対の指定がない限り、当業者の技能の範囲内にある、化学、生化学、有機化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA技法、遺伝学、免疫学、および細胞生物学の従来の方法を用いることになり、これらの多くが例示説明の目的で下記に記載される。かかる技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001)、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989)、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008)、Short Protocols in Molecular Biology A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I&II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984)、Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)、Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991)、Annual Review of Immunology、ならびにAdvances in Immunologyなどの学術誌における研究論文を参照されたい。

【0109】

B. 定義

別途規定されない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様または同等のいずれの方法および材料も、特定の実施形態の実践または試験において使用することができるが、組成物、方法、および材料の好ましい実施形態が本明細書に記載される。本開示において、次の用語が下記で定義される。

【0110】

冠詞「a」、「an」、および「the」は、その冠詞の文法上の目的語の1つまたは1つよりも多く（すなわち、少なくとも1つ、または1つ以上）を指すように本明細書で使用する。例として、「(an) 要素」は、1つの要素または1つ以上の要素を意味する。

【0111】

二者択一（例えば、「または」）の使用は、その二者択一対象の一方、両方、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味するように理解されるべきである。

【0112】

「および／または」という用語は、その二者択一対象の一方、または両方のいずれかを意味するように理解されるべきである。

【0113】

本明細書で使用されるとき、「約」または「およそ」という用語は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して最大15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%異なる、数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さを指す。一実施形態において、「約」または「およそ」という用語は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さの±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、または±1%の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さの範囲を指す。

10

【0114】

本明細書全体を通して、文脈上他の解釈を要する場合を除き、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、「および含むこと (comprising)」という語は、述べられる工程もしくは要素または工程または要素の群を包含するが、任意の他の工程もしくは要素または工程もしくは要素の群は排除することを暗示することが理解されよう。「からなる (consisting of)」とは、何であれ「からなる」という語句に続くものを含み、かつそれらに限定されることを意味する。故に、「からなる」という語句は、列挙される要素が必要とされるか、または必須であること、かつ他の要素が何ら存在してはならないことを示す。「から本質的になる (consisting essentially of)」とは、その語句の後に列挙される任意の要素を含み、かつ、その列挙される要素に関して本開示で指定される活性または作用に干渉しないまたは寄与しない他の要素に限定されることを意味する。故に、「から本質的になる」という語句は、列挙される要素が必要とされるか、または必須であること、ただし、列挙される要素の活性または作用に実質的に影響を及ぼす他の要素が何ら存在しないことを示す。

20

【0115】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「ある実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「ある特定の実施形態」、「追加の実施形態」、もしくは「さらなる実施形態」、またはそれらの組み合わせへの言及は、その実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造、または特性が少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。故に、本明細書全体を通じた種々の箇所での上述の語句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態を指しているわけではない。さらに、それらの特定の特徵、構造、または特性は、1つ以上の実施形態において任意の好適な状態で組み合わせられてもよい。一実施形態におけるある特徴の肯定的列挙が、特定の実施形態におけるその特徴の排除の根拠としての機能を果たすことも理解される。

30

【0116】

「抗原 (Ag)」は、動物において抗体の産生またはT細胞応答を刺激し得る、化合物、組成物、または物質を指し、動物に注射されるかまたは動物に吸収される組成物（腫瘍特異的タンパク質を含むもの等）を含む。例示的な抗原としては、脂質、炭水化物、多糖類、糖タンパク質、ペプチド類、または核酸が挙げられるが、これらに限定されない。抗原は、開示される抗原などの異種抗原によって誘導されるものを含めて、特異的な液性免疫または細胞性免疫の産物と反応する。

40

【0117】

「標的抗原」または「目的とする標的抗原」は、本明細書で企図される結合ドメインが結合するように設計される、抗原である。特定の実施形態において、標的抗原は、アルファ葉酸受容体、5T4、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD1

50

23、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2)、EGFRvIIIを含むEGFRファミリー、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、胎児AChR、FR α 、GD2、GD3、グリピカン-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、ラムダ、ルイス-Y、カップ、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、サバイビン、STn、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1からなる群から選択される抗原に結合する。

【0118】

一実施形態において、抗原は、MHC-ペプチド複合体、例えば、クラスI MHC-ペプチド複合体またはクラスII MHC-ペプチド複合体である。

【0119】

本明細書で使用されるとき、「結合ドメイン」、「細胞外ドメイン」、「抗原結合ドメイン」、「細胞外結合ドメイン」、「細胞外抗原特異的結合ドメイン」、「抗原特異的結合ドメイン」、および「細胞外抗原特異的結合ドメイン」という用語は、同じ意味で用いられ、目的となる標的抗原に特異的に結合する能力を有するポリペプチドを提供する。結合ドメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。結合ドメインの例示的な例としては、抗体およびその抗原結合断片、FN3ドメイン、およびDARPinが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0120】

本明細書で使用される「特異的結合親和性」または「特異的に結合する」または「特異的に結合した」または「特異的結合」または「特異的に標的とする」という用語は、バックグラウンド結合よりも高い結合親和性で、抗体またはその抗原結合断片の標的抗原への結合を説明する。結合ドメインは、それが、例えば、約 $10^5 M^{-1}$ 以上の親和性または K_a （すなわち、 $1/M$ の単位での特定の結合相互作用の平衡会合定数）で抗原に結合または会合する場合、標的抗原に「特異的に結合する」。ある特定の実施形態において、結合ドメイン（またはその融合タンパク質）は、約 $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 、 $10^{13} M^{-1}$ 以上の K_a で、標的に結合する。「高親和性」結合ドメイン（またはその一本鎖融合タンパク質）とは、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} M^{-1}$ 、またはそれ以上の K_a の高親和性結合ドメインを指す。

【0121】

代替的に、親和性は、 M の単位での特定の結合相互作用（例えば、 $10^{-5} M \sim 10^{-13} M$ 、またはそれ未満）の平衡解離定数（ K_d ）として定義されてもよい。結合ドメインポリペプチドの親和性は、従来の技法、例えば、競合ELISA（酵素結合免疫吸着測定法）によって、または標識リガンドを使用した、もしくはBiacore T100（Biacore, Inc., Piscataway, NJから入手可能）などの表面プラズモン共鳴デバイス、もしくはEPICシステムもしくはEnSpire（それぞれCorningおよびPerkin Elmerから入手可能）などの光バイオセンサー技術を使用した、結合会合、または置換アッセイによって、容易に決定することができる（例えば、Scatchard et al. (1949) Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660、および米国特許第5,283,173号、同第5,468,614号、または同等の文献を参照）。

【0122】

一実施形態において、特異的結合の親和性は、バックグラウンド結合よりも約2倍高い、バックグラウンド結合よりも約5倍高い、バックグラウンド結合よりも約10倍高い、バックグラウンド結合よりも約20倍高い、バックグラウンド結合よりも約50倍高い、

10

20

30

40

50

バックグラウンド結合よりも約100倍高い、もしくはバックグラウンド結合よりも約1000倍高い、またはそれを超える。

【0123】

「抗体」は、脂質、炭水化物、多糖、糖タンパク質、ペプチド、または抗原決定基を含む核酸、例えば、免疫細胞によって認識されるものである、抗原のエピトープを特異的に認識および結合する少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドである結合剤を指す。

【0124】

「エピトープ」または「抗原決定基」は、結合因子が結合する抗原の領域を指す。

【0125】

抗体は、その抗原結合断片、例えば、ラクダIg、IgNAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)₂断片、F(ab)₃断片、Fv、一本鎖Fvタンパク質類（「scFv」）、ビス-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）、および単ドメイン抗体（sdAb、Nanobody）または抗原結合を担う全長抗体の部分を含む。用語はまた、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロ共役抗体（二重特異性抗体など）、およびその抗原結合断片などの遺伝子操作された形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

【0126】

当業者により理解され、本明細書の他の箇所で記載のとおり、完全抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む。各重鎖は、可変領域および第1の、第2の、および第3の定常領域からなり、各軽鎖は、可変領域および定常領域からなる。哺乳動物の重鎖は、α、δ、ε、γ、およびμと分類された。哺乳動物の軽鎖は、λまたはκと分類された。α、δ、ε、γ、およびμ重鎖を含む免疫グロブリンは、免疫グロブリン(Ig)A、IgD、IgE、IgG、およびIgMと分類された。完全抗体は、「Y」形状を形成する。Yの幹は、互いと結合した2つの重鎖の第2および第3の定常領域（および、IgEおよびIgMに関しては第4の定常領域）からなり、ヒンジにおいてジスルフィド結合（鎖間）が形成される。重鎖γ、α、およびδは、3つのタンデムな（直列に）Igドメイン、および追加の柔軟性のためのヒンジ領域で構成される定常領域を有し、重鎖μおよびεは、4つの免疫グロブリンドメインで構成される定常領域を有する。第2のおよび第3の定常領域は、それぞれ「CH2ドメイン」および「CH3ドメイン」と呼ばれる。Yの各腕は、1本の軽鎖の可変領域および定常領域に結合された1本の重鎖の可変領域および第1の定常領域を含む。軽鎖および重鎖の可変領域は、抗原結合を担う。

【0127】

軽鎖および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる、3つの超可変領域によって中断された「フレームワーク」領域を含有する。CDRは、Kabata et al. (Wu, T T and Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970)、Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84:2440-2443 (1987)、(参照として本明細書に組み込まれている、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services, 1991を参照)による配列、またはChothia et al (Chothia, C. and Lesk, A. M., J Mol. Biol., 196(4):901-917 (1987)、Chothia, C. et al, Nature, 342:877-883 (1989))による構造などの、従来の方法によって規定または識別され得る。

【0128】

10

20

30

40

50

軽鎖 C D R を予測するための法則の例示的な例としては、以下が挙げられる：C D R - L 1 は、約残基 2 4 で開始し、C y s が先行し、約 1 0 ~ 1 7 残基であり、T r p が続き（通常は T r p - T y r - G l n だが、T r p - L e u - G l n、T r p - P h e - G l n、T r p - T y r - L e u も続く）、C D R - L 2 は、C D R - L 1 の端部の後の約 1 6 残基で開始し、一般に I l e - T y r が先行するが、V a l - T y r、I l e - L y s、I l e - P h e も先行し、7 残基であり、および C D R - L 3 は、C D R - L 2 の端部の後の約 3 3 残基で開始し、C y s が先行し、7 ~ 1 1 残基であり、P h e - G l y - X X X - G l y が続く（X X X は任意のアミノ酸である）〔配列番号 7 3〕。

【0129】

重鎖 C D R を予測するための法則の例示的な例としては、以下が挙げられる：C D R - H 1 は、約残基 2 6 で開始し、C y s - X X X - X X X - X X X（配列番号 7 4）が先行し、1 0 ~ 1 2 残基であり、T r p が続き（通常は T r p - V a l だが、T r p - I l e、T r p - A l a も続く）、C D R - H 2 は、C D R - H 1 の端部の後の約 1 5 残基で開始し、一般に L e u - G l u - T r p - I l e - G l y（配列番号 7 5）、またはいくつかの変化が先行し、1 6 ~ 1 9 残基であり、L y s / A r g - L e u / I l e / V a l / P h e / T h r / A l a - T h r / S e r / I l e / A l a が続き、および C D R - H 3 は、C D R - H 2 の端部の後の約 3 3 残基で開始し、C y s - X X X - X X X（通常は C y s - A l a - A r g）が先行し、3 ~ 2 5 残基であり、T r p - G l y - X X X - G l y（配列番号 7 6）が続く。

【0130】

一実施形態において、軽鎖 C D R および重鎖 C D R は、K a b a t 法に従って決定される。

【0131】

一実施形態において、軽鎖 C D R ならびに重鎖 C D R 2 および C D R 3 は、K a b a t 法に従って決定され、重鎖 C D R 1 は、A b M 法に従って決定され、これは、K a b a t 法および C l o t h i a 法との間に含まれる。例えば、W h i t e l e g g N & R e s A R, P r o t e i n E n g. 2 0 0 0 D e c ; 1 3 (1 2) : 8 1 9 - 2 4 および M e t h o d s M o l B i o l. 2 0 0 4 ; 2 4 8 : 5 1 - 9 1 を参照されたい。例えば、A b Y s i s (www.bioinf.org.uk/abysis/) などの、C D R を予測するためのプログラムが公的に利用可能である。

【0132】

異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、ヒトなどの種内に比較的保存される。抗体のフレームワーク領域、すなわち構成要素の軽鎖および重鎖を混ぜ合わせたフレームワーク領域は、三次元空間における C D R を位置づけ整列させるのに役立つ。C D R は、抗原のエピトープへの結合を主に担う。各鎖の C D R は通常、N 末端から開始して順次付番され C D R 1、C D R 2、および C D R 3 と称され、また通常は、特定の C D R が位置する鎖によって特定される。したがって、抗体の重鎖の可変ドメインに位置する C D R は、C D R H 1、C D R H 2、および C D R H 3 と呼ばれる一方、抗体の軽鎖の可変ドメインに位置する C D R は、C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 と呼ばれる。異なる特異性（すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位）を有する抗体は、異なる C D R を有する。抗体間で異なるのは C D R であるが、C D R 内の限定された数のアミノ酸位置のみが、抗原結合に直接関与する。C D R 内のこれらの位置は特異性決定残基（S D R）と呼ばれる。

【0133】

「V_L」または「V_L」への言及は、免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指し、本明細書に開示の抗体、F_v、s c F_v、d s F_v、F a b、または他の抗体断片の可変領域を包含する。

【0134】

「V_H」または「V_H」への言及は、免疫グロブリン重鎖の可変領域を指し、本明細書に開示の抗体、F_v、s c F_v、d s F_v、F a b、または他の抗体断片の可変領域を包

10

20

30

40

50

含する。

【0135】

「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単一のクローンによって、または単一の抗体の軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子がトランスフェクトされた細胞によって産生される抗体である。モノクローナル抗体は、例えば、免疫脾臓細胞と骨髄腫細胞との融合からハイブリッド抗体を形成する細胞を作製することによって、当業者に周知の方法により産生される。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

【0136】

「キメラ抗体」は、1つの種、例えばヒトなどに由来するフレームワーク残基と、別の種、例えばマウスなどに由来するCDR（一般に、抗原結合を付与する）を有する。特に好ましい実施形態において、抗原特異性結合ドメインは、キメラ抗体またはその抗原結合断片である。

【0137】

特定の実施形態において、抗体は、標的抗原に特異的に結合するヒト抗体（例えばヒトモノクローナル抗体）またはその抗原結合断片である。ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリから選択されるFvクローン可変ドメイン配列（複数可）を、上述のような既知のヒト定常ドメイン配列（複数可）と組み合わせることによって構築することができる。あるいは、ヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法によって作製してよい。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫およびマウス-ヒト異種骨髄腫の細胞株は、例えば、Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、およびBoerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991)によって説明されている。加えて、トランスジェニック動物（例えば、マウス）を使用して、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができる。例えば、Jakobovits et al., PNAS USA, 90:2551 (1993)、Jakobovits et al., Nature, 362:255 (1993)、Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)を参照されたい。ヒト抗体が、非ヒト抗体の開始に対して同様の親和性および特異性を有する場合、遺伝子シャフリングを用いて、非ヒト、例えば齧歯類の抗体からヒト抗体を誘導することもできる。1993年4月1日公開のPCT WO93/06213を参照されたい。伝統的なCDR移植による非ヒト抗体のヒト化と異なり、この技術により、非ヒト起源のFRまたはCDR残基を全く有しない完全なヒト抗体が得られる。

【0138】

「ヒト化」抗体は、ヒトフレームワーク領域および非ヒト（例えば、マウス、ラット、または合成）免疫グロブリン由来の1つ以上のCDRを含む免疫グロブリンである。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。一実施形態において、すべてのCDRはヒト化免疫グロブリン内のドナー免疫グロブリン由来である。定常領域は存在する必要がなく、存在する場合は、それらは、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85~90%、例えば約95%以上同一でなければならない。したがって、場合によりCDR以外は、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、天然ヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。ヒト化または他のモノクローナル抗体は追加の保存的アミノ酸置換を有することができ、実質的に抗原結合または他の免疫グロブリン機能に対して影響力を有さない。ヒト化抗体は、遺伝子操作を用いて構築することができる（例えば、米国特許第5,585,089号を参照のこと）。

【0139】

本明細書で使用される「ラクダIg」または「ラクダ科VHH」は、重鎖抗体の最小の

10

20

30

40

50

既知の抗原結合単位を指す (Koch-Nolte, et al, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007))。「重鎖抗体」または「ラクダ科抗体」とは、2つのVHドメインを含有し、軽鎖を含有しない抗体を指す (Riechmann L. et al, J. Immunol. Methods 231: 25~38 (1999)、WO94/04678、WO94/25591、米国特許第6,005,079号)。

【0140】

「免疫グロブリン新抗原受容体」の「IgNAR」は、1つの可変新抗原受容体 (VNAR) ドメイン、および5つの定常新抗原受容体 (CNAR) ドメインのホモ二量体からなる、サメ免疫レパートリー由来の抗体のクラスを指す。IgNARは、最小の既知の免疫グロブリン系のタンパク質足場の一部を表し、非常に安定であり、かつ効率的な結合特性を有する。本質的な安定性は、(i) マウス抗体に見られる従来の抗体のVHおよびVLドメインと比較して相当数の荷電した親水性の表面露出残基を提示する、基礎となるIg足場、および(ii) ループ間ジスルフィド架橋、およびループ内水素結合のパターンを含む、相補性決定領域 (CDR) ループ内の安定化する構造的特徴の両方に起因し得る。

【0141】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる、それぞれが単一の抗原結合部位を有する2つの同一の抗原結合断片、および容易に結晶化する能力を反映する名称である残りの「Fc」断片を産生する。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有しながらも抗原に架橋結合することのできるF(ab')₂断片をもたらす。

【0142】

「Fv」は、完全な抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。一実施形態において、二本鎖Fv種は、緊密な非共有結合性会合をなした一つの重鎖および一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Fv (scFv) 種では、軽鎖および重鎖が二本鎖Fv種におけるものと類似の「二量体」構造に会合することができるよう、柔軟なペプチドリンカーによって1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインを共有結合性に会合することができる。各可変ドメインの3つの超可変領域 (HVR) がVH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を規定するように相互作用するのは、この立体配置にある。集合的に、6つのHVRは抗体に特異的な抗原結合を付与する。しかしながら、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、単一の可変ドメイン (または抗原に対して特異的な3つのHVRのみを含むFvの半分) でさえ、抗原を認識しそれに結合する能力を有する。

【0143】

Fab断片は、重鎖および軽鎖可変ドメインを含有し、また軽鎖および重鎖の第1の定常ドメイン (CH1) を含有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端におけるいくつかの残基の付加により、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基 (複数可) が遊離チオール基を保有するFab'に対する、本明細書における名称である。F(ab')₂抗体断片は、元々、ヒンジシステインをそれらの間に有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学結合もまた知られている。

【0144】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を含む抗体断片を指し、断片は、同一のポリペプチド鎖 (VH-VL) における軽鎖可変ドメイン (VL) に結合された重鎖可変ドメイン (VH) を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間で対形成を可能にするには短すぎるリンカーを用いることによって、ドメインは、別の鎖の相補ドメインと対形成するよう強いられ、2つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、二価または二重特異性であってよい。ダイアボディについては、例えばEP404,097、WO1993/01161、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003)、およびHollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448 (1993) により詳細に記載されている。トリアボディおよびテトラボディについては、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003) にも記載されている。

【0145】

「単ドメイン抗体」または「sdAb」または「ナノボディ」は、抗体重鎖の可変領域（VHドメイン）または抗体軽鎖の可変領域（VLドメイン）からなる抗体断片を指す（Holt, L., et al, Trends in Biotechnology, 21 (11) : 484-490）。

【0146】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のVHおよびVLドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に、いずれかの方向（例えば、VL-VHまたはVH-VL）で存在する。一般に、scFvポリペプチドは、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成することを可能にする、VHドメインとVLドメインとの間のポリペプチドリンカーをさらに含む。scFvの総説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315を参照されたい。

【0147】

一本鎖抗体は、所望の標的に特異的なハイブリドーマのV領域遺伝子からクローニングしてもよい。このようなハイブリドーマの作製は、日常的なものになる。可変領域重鎖（VH）および可変領域軽鎖（VL）のクローニングに使用することのできる技術は、例えば、Orlandi et al., PNAS, 1989; 86: 3833-3837に記載されている。

【0148】

「リンカー」とは、種々のポリペプチドドメイン間の、例えば、分子の適切な間隔および立体構造のために付加された、VHおよびVLドメイン間の複数のアミノ酸残基を指す。特定の実施形態において、リンカーは配列に連結する可変領域である。「可変領域連結配列」は、VHドメインおよびVLドメインに接続し、得られるポリペプチドが、同じ軽鎖および重鎖可変領域を含む抗体と同じ標的分子に特異的結合親和性を保持するように、2つのサブ結合ドメインの相互作用に適合性のあるスペーサー機能を提供するアミノ酸配列である。特定の実施形態において、リンカーは、1つ以上の重鎖または軽鎖可変ドメイン、ヒンジドメイン、多量体ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激性ドメイン、および／または一次シグナル伝達ドメインを分離する。

【0149】

本明細書で企図される特定の実施形態での使用に好適なリンカーの例示的な例としては、GGG、DGGGS（配列番号36）、TGEKP（配列番号37）（例えば、Liu et al., PNAS 5525-5530（1997）を参照）、GGRR（配列番号38）（上記Pomerantz et al. 1995）、(GGGGS)_n、式中、n=1、2、3、4または5である（配列番号37）（Kim et al., PNAS 93, 1156-1160（1996）、EGKSSGSGSESKVD（配列番号40）（Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 1066-1070）、KESGSVSSEQLAQFRSLD（配列番号41）（Bird et al., 1988, Science 242: 423-426）、GGRRGGS（配列番号42）、LRQRDGERP（配列番号43）、LRQKDGGSERP（配列番号44）、LRQKD（GGGS）₂ERP（配列番号45）のアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。代替として、可撓性リンカーは、DNA結合部位およびペプチド自体の両方をモデリングし得るコンピュータプログラム（Desjarlais & Berg, PNAS 90: 2256-2260（1993）、PNAS 91: 11099-11103（1994））を使用して、またはファージディスプレイ方法によって理性的に設計され得る。一実施形態において、リンカーは、GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号46）のアミノ酸配列を含む（Cooper et al., Blood, 101（4）: 1637-1644（2003））

)。

【0150】

「スパーサードメイン」とは、2つのドメインを分離するポリペプチドを指す。一実施形態において、スパーサードメインは、抗原結合ドメインをエフェクター細胞表面から離して、適切な細胞／細胞接触、抗原結合、および活性化を可能にする (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419)。特定の実施形態において、スパーサードメインは、1つ以上の重鎖または軽鎖可変ドメイン、多量体ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激性ドメイン、および／または一次シグナル伝達ドメインを分離する。スパーサードメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。ある特定の実施形態において、スパーサードメインは、1つ以上の重鎖定常領域、例えば、CH2およびCH3が挙げられるが、これらに限定されない、免疫グロブリンの部分である。スパーサードメインは、天然に存在する免疫グロブリンヒンジ領域または変化した免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含み得る。

10

【0151】

一実施形態において、適切な細胞／細胞接触、抗原結合、および活性化を可能にするためにエフェクター細胞表面から離れて抗原結合ドメインを位置決めする役割を果たす、ポリペプチドを指す。特定の実施形態において、ポリペプチドは、結合ドメインと多量体化ドメインとの間、結合ドメインと膜貫通ドメイン (TM) との間、または多量体化ドメインと膜貫通ドメインとの間に1つ以上のヒンジドメインを含み得る。ヒンジドメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。ヒンジドメインは、天然に存在する免疫グロブリンヒンジ領域または変化した免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含み得る。

20

【0152】

「変更されたヒンジ領域」とは、(a) 最大30%のアミノ酸の変化 (例えば、最大25%、20%、15%、10%、もしくは5%のアミノ酸の置換もしくは欠失) を有する天然に存在するヒンジ領域、(b) 最大30%のアミノ酸の変化 (例えば、最大25%、20%、15%、10%、もしくは5%アミノ酸の置換もしくは欠失) を有する、長さが少なくとも10アミノ酸 (例えば、少なくとも12、13、14もしくは15アミノ酸) である天然に存在するヒンジ領域の一部、または(c) コアヒンジ領域 (長さが4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15、または少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸であり得る) を含む天然に存在するヒンジ領域の一部を指す。ある特定の実施形態において、天然の免疫グロブリンヒンジ領域の1つ以上のシステイン残基は、1つ以上の他のアミノ酸残基 (例えば、1つ以上のセリン残基) によって置換されていてよい。変更された免疫グロブリンヒンジ領域は、別のアミノ酸残基 (例えば、セリン残基) によって置換された、野生型免疫グロブリンヒンジ領域のプロリン残基を代替的にまたは追加的に有し得る。

30

【0153】

本発明で使用するとき、「多量体ドメイン」とは、直接的または架橋分子により、別の異なるポリペプチドと優先的に相互作用するか、またはそれと会合するポリペプチドを指し、異なる多量体ドメインの相互作用は、多量体化に実質的に寄与し、それを効率的に促進する (すなわち、二量体、三量体、または多複合体の形成、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ三量体、ヘテロ三量体、ホモ多量体、ヘテロ多量体であってもよい)。多量体ドメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。

40

【0154】

本明細書で企図される特定の実施形態で使用するのに適した多量体ドメインの例示的な例は、FKBPポリペプチド、FRBポリペプチド、カルシニューリンポリペプチド、シクロフィリンポリペプチド、細菌DHFRポリペプチド、PYL1ポリペプチド、ABI1ポリペプチド、GIB1ポリペプチド、GAIポリペプチド、またはそれらのバリエーションを含む。

【0155】

50

「架橋因子」は、2つ以上の多量体ドメインと会合し、それらの間に配置される分子を指す。特定の実施形態において、多量体化ドメインは、架橋因子の存在下で、ポリペプチド複合体の形成に実質的に寄与または効率的に促進する。特定の実施形態において、多量体化ドメインは、架橋因子の不在下ではポリペプチド複合体の形成に寄与も効率的に促進もしない。本明細書で企図される特定の実施形態で使用するのに適した架橋因子の例示的な例としては、ラパマイシン（シロリムス）またはそのラパログ、クーママイシンまたはその誘導体、ジベレリンまたはその誘導体、アブシジン酸（ABA）またはその誘導体、メトトレキサートまたはその誘導体、シクロスポリンAまたはその誘導体、FKCsAまたはその誘導体、FKBP（SLF）のためのトリメトプリム（Tm p）－合成リガンドまたはその誘導体、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0156】

ラパマイシン類似体（ラパログ）は、米国特許第6,649,595号に開示されるものを含むが、これに限定されず、ラパログ構造は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態において、架橋因子は、ラパマイシンと比較して、実質的に低減された免疫抑制効果を有するラパログである。好ましい実施形態において、ラパログは、AP21967誘導体である（C-16-（S）-7-メチルインドールラパマイシン、IC₅₀ = 10 nM、化学修飾した非免疫抑制性ラパマイシン類似体としても既知）。

【0157】

「実質的に低減された免疫抑制効果」は、臨床的にまたは適切なインビトロ（例えば、T細胞増殖の阻害）またはインビボでのヒト免疫抑制活性の代替のいずれかで測定される、同一用量について観察または予測された、少なくとも0.1～0.005倍未満の免疫抑制効果を指す。

20

【0158】

本明細書で使用されるとき、「アンカードメイン」とは、二量体化可能な受容体の、細胞表面へのテザリング、アンカリング、または会合を促進する、アミノ酸配列、または他の分子を指す。例示的なアンカードメインは、細胞膜内で安定な構造を伴うアミノ酸配列、または糖脂質（グリコシルホスファチジルイノシトールまたはGPIとしても既知）の付加を促進するアミノ酸配列などを含む。ある特定の実施形態において、アンカードメインは、疎水性ドメイン（例えば、膜貫通ドメイン）またはGPIシグナル配列である。いくつかの実施形態において、本明細書で企図されるポリペプチドをコードする核酸分子は、アンカードメインを含み、任意選択的に、アンカードメインはGPI分子である。

30

【0159】

「膜貫通ドメイン」または「TMドメイン」は、ポリペプチドを細胞の原形質膜に繫留するドメインである。TMドメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。

【0160】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞を、特殊機能を行うように誘導するタンパク質の部分の部分を指す。通常は、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を使用することができるが、多くの場合、ドメイン全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分を使用する範囲内で、そのような切断部分を、エフェクター機能シグナルを伝達する限りは、ドメイン全体の代わりに使用することができる。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断部分を含むことを意味する。

40

【0161】

「エフェクター機能」または「エフェクター細胞機能」という用語は、免疫エフェクター細胞の特殊機能を指す。エフェクター機能は、細胞傷害性因子の放出、または免疫エフェクター細胞で発現された受容体への抗原結合で誘発される他の細胞応答を含む、活性化、サイトカイン産生、増殖、および細胞傷害活性を含むが、これらに限定されない。

50

【0162】

T C R単独によって生成されるシグナルは、T細胞の完全な活性化に不十分であり、二次または共刺激シグナルも必要であることが公知である。したがって、T細胞活性化は、2つの異なるクラスの細胞内シグナル伝達ドメイン、すなわちT C R（例えば、T C R／C D 3複合体）によって抗原依存的一次活性化を開始する一次シグナル伝達ドメイン、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もたらす共刺激シグナル伝達ドメインによって媒介されるということができる。

【0163】

「一次シグナル伝達ドメイン」は、T C R複合体の一次活性化を刺激性に、または阻害性に調節する。刺激性に作用する主要シグナル伝達ドメインは、免疫受容体活性化チロシン依存性モチーフまたはI T A Mとして公知であるシグナル伝達モチーフを含有し得る。特定の実施形態での使用に好適な一次シグナル伝達ドメインを含有するI T A Mの例示的な例には、F c R γ 、F c R β 、C D 3 γ 、C D 3 δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 ζ 、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、およびC D 6 6 dに由来するものが挙げられるが、これらに限定されるものではない

【0164】

本明細書で使用される、「共刺激シグナル伝達ドメイン」、または「共刺激ドメイン」という用語は、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインを指す。共刺激性分子は、抗原に結合するとTリンパ球の効率的な活性化および機能に必要な第2のシグナルを提供する、抗原受容体またはF c受容体以外の細胞表面分子である。このような共刺激性ドメインが単離され得る共刺激性分子の例示的な例としては、T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 10、C A R D 1 1、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 5 4（I C A M）、C D 8 3、C D 1 3 4（O X 4 0）、C D 1 3 7（4-1 B B）、C D 2 7 8（I C O S）、D A P 1 0、L A T、N K D 2 C、S L P 7 6、T R I M、およびZ A P 7 0が挙げられるが、これらに限定されない。

【0165】

「免疫障害」は、免疫系からの応答を喚起する疾患を指す。特定の実施形態において、「免疫障害」という用語は、がん、自己免疫疾患、または免疫不全を指す。一実施形態において、免疫障害は、感染疾患を包含する。

【0166】

本明細書で使用されるとき、「がん」という用語は一般に、異常な細胞が制限なく分裂し、近隣組織に浸潤し得る、疾患または病態の分類を指す。

【0167】

本明細書で使用されるとき、「悪性」という用語は、腫瘍細胞の群が無制限の成長（すなわち、正常な限度を超えた分裂）、浸潤（すなわち、隣接組織への侵入およびその破壊）、および転移（すなわち、リンパまたは血液を介した体内の他の場所への広がり）のうちの1つ以上を示す、がんを指す。本明細書で使用されるとき、「転移する」という用語は、身体の一部から別の部分へのがんの広がりを指す。広がった細胞によって形成される腫瘍は、「転移性腫瘍」または「転移」と呼ばれる。転移性腫瘍は、原発（一次）腫瘍と同様である細胞を含む。

【0168】

本明細書で使用されるとき、「両性」または「非悪性」という用語は、より大きく成長し得るが、身体の一部には広がらない腫瘍を指す。両性腫瘍は、自己制限的であり、典型的には浸潤または転移しない。

【0169】

「がん細胞」は、がん性成長または組織を伴う個々の細胞を指す。がん細胞は、固形がんおよび液性がんの両方を含む。「腫瘍」または「腫瘍細胞」は一般に、細胞の異常な成長によって形成される腫瘍または病変を指し、それは良性、前悪性、または悪性であり得る。ほとんどのがんが腫瘍を形成するが、液性がん、例えば、白血病は、必ずしも腫瘍を

10

20

30

40

50

形成しない。腫瘍を形成するがんに関して、がん（細胞）および腫瘍（細胞）という用語は、交換可能に使用される。個体における腫瘍の量は、腫瘍の数、体積、または重量として測定され得る「腫瘍負荷」である。

【0170】

「再発」という用語は、改善または寛解の期間後の、がんの、再発の診断、または再発の兆候および症状を指す。

【0171】

「寛解」は、「臨床的寛解」とも称され、部分的かつ完全な寛解の両方を含む。部分的な寛解期には、がんの兆候および症状のすべてではなく一部が消失する。完全寛解期には、がんのすべての兆候および症状が消失するが、がんは依然として体内に存在し得る。

【0172】

「抵抗性」とは、特定の治療薬による治療法に対して抵抗性であるか、または無反応であるがんを指す。がんは、治療開始時（すなわち、治療薬への最初の曝露に無反応）から、または治療薬抵抗性を生じた結果として、第1の治療期間の過程もしくはその後の治療期間中のいずれかで、抵抗性であり得る。

【0173】

「抗原陰性」とは、抗原を発現しないか、または検出不能で無視できる量の抗原を発現する、細胞を指す。一実施形態において、抗原陰性細胞は、抗原を対象とする受容体に結合しない。一実施形態において、抗原陰性細胞は、抗原を対象とする受容体に実質的に結合しない。

【0174】

「自己免疫疾患」は、身体がその自己の組織の一部の構成要素に対する免疫原性（すなわち、免疫系）応答を生み出す疾患を指す。換言すると、免疫系は、体内の一部の組織または系を「自己」として認識するその能力を喪失し、それをあたかも異物であるかのように標的とし攻撃する。自己免疫疾患は、主として1つの臓器が侵されるもの（例えば、溶血性貧血および抗免疫甲状腺炎）と、自己免疫疾患過程が多くの組織にわたって拡散するもの（例えば、全身性エリテマトーデス）とに分類され得る。例えば、多発性硬化症は、T細胞が脳および脊髄の神経線維を包囲する鞘を攻撃することによって引き起こされると考えられている。これは、協調運動の喪失、衰弱、および視朦をもたらす。自己免疫疾患は当該技術分野で知られており、例えば、橋本甲状腺炎、グレーブス病、狼瘡、多発性硬化症、関節リウマチ、溶血性貧血、抗免疫甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、セリアック病、クローン病、大腸炎、糖尿病、強皮症、乾癬などが含まれる。

【0175】

「免疫不全」は、疾患によってまたは化学物質の投与によって免疫系が損なわれた患者の状態を意味する。この病態では、系は、異物に対して防御するのに必要とされる血球の数および種類が不足するようになる。免疫不全病態または疾患は当該技術分野で知られており、例えば、AIDS（後天性免疫不全症候群）、SCID（重症複合免疫不全症）、選択的IgA欠損症、分類不能型免疫不全症、X連鎖無ガンマグロブリン血症、慢性肉芽腫性疾患、高IgM症候群、および糖尿病が含まれる。

【0176】

「感染疾患」は、人から人へと、または生物から生物へと伝染し得、微生物またはウイルス因子によって引き起こされる疾患（例えば、感冒）を指す。感染疾患は当該技術分野で知られており、例えば、肝炎、性行為感染症（例えば、クラミジア感染症、淋病）、結核症、HIV/AIDS、ジフテリア、肝炎B、肝炎C、コレラ、およびインフルエンザが含まれる。

【0177】

本明細書で使用されるとき、「個体」および「対象」という用語は、多くの場合同じ意味で用いられ、本明細書の他の箇所で企図される組成物および方法で治療され得る、がんまたは他の免疫障害の症状を呈する任意の動物を指す。好適な対象（例えば、患者）には、実験動物（マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットなど）、家畜、および飼育動物

10

20

30

40

50

またはペット（ネコまたはイヌなど）が含まれる。非ヒト霊長類、および好ましくは、ヒト患者が含まれる。典型的な対象には、がんもしくは別の免疫障害を有する、そうであると診断された、またはそれを有する危険性があるヒト患者が含まれる。

【0178】

本明細書で使用されるとき、「患者」という用語は、本明細書の他の箇所で開示される組成物および方法で治療され得る、がんまたは別の免疫障害であると診断された対象を指す。

【0179】

本明細書で使用されるとき、「治療」または「治療すること」は、疾患または病理学的状態の症状または病理に対する有益または望ましいいかなる効果も含み、治療されている疾患または病態の1つ以上の測定可能マーカーにおける最小限の低減さえも含み得る。治療には、任意選択で、疾患もしくは病態の低減、または疾患もしくは病態の進行を遅延、例えば、腫瘍増殖の遅延のいずれかに関わり得る。「治療」は必ずしも、疾患もしくは病態、またはその関連する症状の完全な撲滅または治療を指すものではない。

【0180】

本明細書で使用されるとき、「予防」、および「予防される」、「予防すること」などと同様の語は、疾患または病態の発生または再発の可能性を予防、阻害、または低減するための手法を指す。それはまた、疾患もしくは病態の発症もしくは再発を遅延させること、または疾患もしくは病態の症状の発生もしくは再発を遅延させることも指す。本明細書で使用されるとき、「予防」および同様の語は、疾患または病態の発症または再発前に疾患または病態の強度、影響、症状、および／または負荷を低減することも含む。

【0181】

本明細書で使用されるとき、「～の少なくとも1つの症状を改善すること」という語句は、対象が治療されている疾患または病態の1つ以上の症状を減少させることを指す。特定の実施形態において、治療されている疾患または病態はがんであり、改善される1つ以上の症状には、衰弱、疲労、息切れ、打撲および出血の起こりやすさ、頻繁な感染、腫脹したリンパ節、膨張したまたは痛みのある腹部（肥大した腹部臓器に起因）、骨または関節痛、骨折、意図しない体重減少、食欲不振、寝汗、持続する微熱、および減少した排尿（腎機能不全に起因）が含まれるが、これらに限定されない。

【0182】

「強化する」もしくは「促進する」、または「増加させる」もしくは「増殖させる」とは、一般に、ビヒクルまたは対照分子／組成物のいずれかによって引き起こされる応答と比較してより高い生理的応答（すなわち、下流効果）を生み出す、引き出す、または引き起こす、本明細書で企図される組成物の能力を指す。測定可能な生理的応答には、当該技術分野における理解から明らかであり、かつ本明細書に記載されるものの中でもとりわけ、T細胞増殖、活性化、持続性、サイトカイン分泌の増加、および／またはがん細胞死滅能力の増加が含まれ得る。「増加した」または「強化された」量は、典型的に「統計的に有意な」量であり、ビヒクルまたは対照組成物によって生み出される応答の1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍またはそれを超える倍率（例えば、500、1000倍）（1を超えるすべての整数かつそれらの間の小数点、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8等）である増加を含み得る。

【0183】

「減少させる」もしくは「低下させる」、または「減らす」もしくは「低減する」とは、一般に、ビヒクルまたは対照分子／組成物のいずれかによって引き起こされる応答と比較してより低い生理的応答（すなわち、下流効果）を生み出す、引き出す、または引き起こす、本明細書で企図される組成物の能力を指す。「減少する」または「低減された」量は、典型的に「統計的に有意な」量であり、ビヒクル、対照組成物、または特定の細胞系譜における応答によって生み出される応答（参照応答）の1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍またはそれを超える倍率（例えば、500、1000倍）（1を超えるすべての整数およびそれらの間の小数点、例えば

、1.5、1.6、1.7、1.8等)である減少を含み得る。

【0184】

「維持する」、または「保存する」、または「維持」、または「変化なし」、または「実質的な変化なし」、または「実質的な減少なし」とは、一般に、ビヒクル、対照分子／組成物のいずれかによって引き起こされる応答、または特定の細胞系譜における応答と比較して、細胞において実質的に同様のまたは同等の生理的応答（すなわち、下流作用）を生み出す、引き出す、または引き起こす、本明細書で企図される組成物の能力を指す。同等の応答は、参照応答と有意に異なるまたは測定可能異なることはないものである。

【0185】

C. TGFβシグナルコンバーター（キメラTGFβ受容体）

特定の実施形態において、TGFβ1を含むがこれに限定されない、TGFβに曝露すると免疫刺激シグナルを形質導入するTGFβシグナルコンバーターが企図される。本明細書で使用されるとき、「TGFβシグナルコンバーター」という用語は、腫瘍微小環境からのTGFβ免疫抑制シグナルを、例えば、免疫エフェクター細胞活性および機能を刺激する、T細胞中の免疫刺激シグナルに変換する1つ以上の非天然ポリペプチドを指し、炎症性サイトカインの産生および／または分泌を増加させる。特定の実施形態において、「TGFβシグナルコンバーター」という用語は、「キメラTGFβ受容体（複数可）」または「CTBR」または「CTBRシグナルコンバーター」と同じ意味で用いられる。

【0186】

特定の実施形態において、CTBRシグナルコンバーターは、TGFβR2の細胞外TGFβ結合ドメイン、膜貫通ドメイン、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、およびToll様受容体を含むが、これらに限定されない、免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびに、TGFβR1の細胞外TGFβ結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびサイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、およびToll様受容体を含むが、これらに限定されない、免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン、を含むポリペプチドである。

【0187】

特定の実施形態において、CTBRシグナルコンバーターは、TGFβR2の細胞外TGFβ結合ドメインと、膜貫通ドメインと、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、およびToll様受容体を含むが、これらに限定されない、免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインと、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびに、TGFβR1の細胞外TGFβ結合ドメインと、膜貫通ドメインと、およびサイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、およびToll様受容体を含むが、これらに限定されない、免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインと、を含む、第2のポリペプチドと、を含む融合ポリペプチドである。

【0188】

他の特定の実施形態において、CTBRシグナルコンバーターは、TGFβR2の細胞外TGFβ結合ドメインと、膜貫通ドメインと、およびサイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、およびToll様受容体を含むが、これらに限定されない、免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインと、を含む、ポリペプチドと、ならびに、TGFβR1の細胞外TGFβ結合ドメインと、膜貫通ドメインと、およびサイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、およびToll様受容体を含むが、これらに限定されない、免疫受容体の細胞内シグナル伝達ドメインと、を含む、ポリペプチドと、を含むポリペプチドの複合体である。

【0189】

本明細書で使用されるとき、「免疫受容体」という用語は、その同族リガンドに結合すると、免疫応答を調節する免疫細胞の表面上に発現される受容体を指す。特定の実施形態においてに使用するのに適した免疫受容体としては、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、パターン認識受容体、およびToll様受容体が挙げられるが、これらに限定されるものでなく、免疫受容体を介したシグナル伝達は免疫応答を刺激する。

10

20

30

40

50

【0190】

本明細書で企図される特定の実施形態で使用可能な免疫受容体の膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインの例示的な例としては、IL-12受容体、IL-7受容体、IL-15受容体、IL-21受容体、IL-2受容体、IL-1受容体、IL-18受容体、IL-36受容体、I型IFN受容体、TLR1受容体、TLR2受容体、TLR3受容体、TLR4受容体、TLR5受容体、TLR6受容体、TLR7受容体、TLR8受容体、TLR9受容体、またはTLR10受容体から単離された膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0191】

さらに、本明細書で企図される特定の実施形態で使用可能な免疫受容体の膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン例示的な例としては、IL-12R β 2、IL-7R α 、IL-2R γ 、IL-2R β 、IL-21R、IL-18R1、IL-18RAP、IL-1R1、IL-1RAP、IFNAR1、IFNAR2、IL-1RL2、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、またはTLR10から単離された膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0192】

本明細書で企図される特定の実施形態で使用可能なサイトカイン受容体の膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインの例示的な例としては、IL-12R β 2、IL-7R α 、IL-2R γ 、IL-2R β 、IL-21R、IL-18R1、IL-18RAP、IL-1R1、IL-1RAP、IFNAR1、IFNAR2、およびIL-1RL2から単離された膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0193】

本明細書で企図される特定の実施形態で使用可能なインターロイキン受容体の膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインの例示的な例としては、IL-12R β 2、IL-7R α 、IL-2R γ 、IL-2R β 、IL-21R、IL-18R1、IL-18RAP、IL-1R1、IL-1RAP、およびIL-1RL2から単離された膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0194】

本明細書で企図される特定の実施形態で使用可能なToll様受容体受容体の膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインの例示的な例としては、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、およびTLR10から単離された膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0195】

1. CTBR12シグナルコンバーター

インターロイキン12 (IL-12) は、部分的には、IFN γ 発現を増加、T細胞増殖を増加、およびIL-12シグナル伝達を増強することによって、T細胞機能および活性を促進するサイトカインである。IL-12は、インターロイキン12受容体、ベータ1 (IL-12R β 1、CD212としても既知) およびインターロイキン12受容体、ベータ2 (IL-12R β 2) に結合する。

40

【0196】

IL-12R β 1およびIL-12R β 2を介したIL-12シグナル伝達は、STAT3、STAT4、およびSTAT5リン酸化をもたらす。リン酸化STAT3/STAT4は核へ転座し、IFN γ プロモーターに結合してIFN γ 発現を増加させる。リン酸化STAT4はまた、Junがん遺伝子 (c-Jun) をIFN γ プロモーターに動員してIFN γ 発現を増加させ、IL-12R β 2の転写を増加させることによってIL-12シグナル伝達を増強する。STAT5リン酸化は、T細胞増殖を増加させる。

【0197】

50

IL-12シグナル伝達はまた、STAT4およびc-JunをIL-2Rのプロモーターに動員することによって、インターロイキン2受容体、アルファ（IL-2R）の発現を増加させ、それによってT細胞増殖を増強する。

【0198】

種々の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体を発現する免疫エフェクター細胞を包含する、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR12シグナルコンバーターをコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。種々の実施形態において、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR12シグナルコンバーターおよび遺伝子操作された抗原受容体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。

10

【0199】

特定の実施形態において、CTBR12シグナルコンバーターは、免疫抑制TGFβシグナルをIL-12媒介性免疫刺激シグナルに変換する。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR12シグナルコンバーターは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ1細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびにTGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ2細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR12シグナルコンバーターは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ2細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびにTGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。

20

【0200】

特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR12シグナルコンバーターは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびにTGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ2細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR12シグナルコンバーターは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ2細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびにTGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。

30

【0201】

特定の実施形態において、CTBR12シグナルコンバーターは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびにTGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ2細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。特定の実施形態において、CTBR12シグナルコンバーターは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ2細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびにTGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-12Rβ1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。

40

【0202】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、TGFβR1またはTGFβR2の膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、IL-12Rβ1またはIL-12Rβ2の膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、およびIL-12Rβ1膜貫通ドメイ

50

ン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-12R\beta 2$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-12R\beta 2$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-12R\beta 1$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0203】

さらなる実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型ポリペプチド、より好ましくは、ウイルス自己切断型2Aポリペプチド、およびより好ましくは、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、プタテッシュウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される、ウイルス自己切断型ペプチドである。一実施形態において、ポリペプチド切断シグナルはP2AまたはT2Aウイルス自己切断型ポリペプチドである。

【0204】

2. CTBR7シグナルコンバーター

インターロイキン(IL-7)は、部分的には、T細胞前駆体の生存および増殖を向上することによって、T細胞機能および活性を促進するサイトカインである。IL-7は、インターロイキン7受容体アルファ(IL-7R α 、CD127としても既知)およびインターロイキン2受容体、共通 γ 鎖(IL-2R γ 、CD132および γc としても既知)に結合する。IL-7シグナル伝達は、JAK/STAT、PI-3K、およびSrcキナーゼ経路を活性化し、抗アポトーシス遺伝子およびT細胞前駆体の増殖を促進する遺伝子の転写をもたらす。

【0205】

種々の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体を発現する免疫エフェクター細胞を包含する、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR7シグナルコンバーターをコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。種々の実施形態において、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR7シグナルコンバーターおよび遺伝子操作された抗原受容体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。

【0206】

特定の実施形態において、 $TGF\beta$ シグナルコンバーターは、免疫抑制 $TGF\beta$ シグナルをIL-7媒介性免疫刺激シグナルに変換する。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR7シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-7R α 細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR7シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-7R α 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。

【0207】

特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR7シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-7R α 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR7シグナル

コンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-7R\alpha$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。

【0208】

特定の実施形態において、CTBR7シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-7R\alpha$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。特定の実施形態において、CTBR7シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-7R\alpha$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。

【0209】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ または $TGF\beta R2$ の膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、 $IL-7R\alpha$ または $IL-2R\gamma$ の膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-7R\alpha$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-7R\alpha$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0210】

さらなる実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型ポリペプチド、より好ましくは、ウイルス自己切断型2Aポリペプチド、およびより好ましくは、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea assigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、ブタテッシュウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される、ウイルス自己切断型ペプチドである。一実施形態において、ポリペプチド切断シグナルはP2AまたはT2Aウイルス自己切断型ポリペプチドである。

【0211】

3. CTBR15シグナルコンバーター

インターロイキン(IL-15)は、部分的には、T細胞前駆体の生存および増殖を向上することによってT細胞機能および活性を促進するサイトカインである。IL-15は、 $IL-15R\alpha$ (CD215としても既知)に高親和性で結合し、次いで、同一細胞または異なる細胞のいずれかで発現される、 $IL-2R\beta$ ($IL-15R\beta$ およびCD122としても既知)および $IL-2R\gamma$ (CD132および γc としても既知)を含む複合体と会合する。IL-15シグナル伝達は、JAK/STAT、PI-3K、およびSrcキナーゼ経路を活性化し、抗アポトーシス遺伝子およびT細胞前駆体の増殖を促進する遺伝子の転写をもたらす。

【0212】

種々の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体を発現する免疫エフェクター細胞を包含する、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR15シグナルコンバーター

をコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクター、および任意選択的に、 $IL-15R\alpha$ ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。種々の実施形態において、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR15シグナルコンバーターおよび遺伝子操作された抗原受容体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクター、ならびに任意選択的に、 $IL-15R\alpha$ ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。

【0213】

特定の実施形態において、 $TGF\beta$ シグナルコンバーターは、免疫抑制 $TGF\beta$ シグナルを $IL-15$ 媒介性免疫刺激シグナルに変換する。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR15シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR15シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。

【0214】

特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR15シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR15シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。

【0215】

特定の実施形態において、CTBR15シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。特定の実施形態において、CTBR15シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-2R\beta$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。

【0216】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ または $TGF\beta R2$ の膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、 $IL-2R\beta$ または $IL-2R\gamma$ の膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-2R\beta$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-2R\gamma$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 TG

10

20

30

40

50

Fβ1結合ドメイン、およびIL-2Rβ膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0217】

さらなる実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型ポリペプチド、より好ましくは、ウイルス自己切断型2Aポリペプチド、およびより好ましくは、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、ブタテッシュウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される、ウイルス自己切断型ペプチドである。一実施形態において、ポリペプチド切断シグナルはP2AまたはT2Aウイルス自己切断型ポリペプチドである。

10

【0218】

4. CTBR21シグナルコンバーター

インターロイキン21(IL-21)は、部分的には、T細胞前駆体の生存および増殖を向上することによって、T細胞機能および活性を促進するサイトカインである。IL-21は、インターロイキン21受容体(IL-21R、CD360としても既知)およびIL-2Rγ(CD132およびγc)に結合する。IL-21シグナル伝達は、JAK/STAT、PI-3K、およびSrcキナーゼ経路を活性化し、抗アポトーシス遺伝子およびT細胞前駆体の増殖を促進する遺伝子の転写をもたらす。

【0219】

種々の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体を発現する免疫エフェクター細胞を包含する、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR21シグナルコンバーターをコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。種々の実施形態において、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR21シグナルコンバーターおよび遺伝子操作された抗原受容体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。

20

【0220】

特定の実施形態において、TGFBシグナルコンバーターは、免疫抑制TGFBシグナルをIL-21媒介性免疫刺激シグナルに変換する。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR21シグナルコンバーターは、TGFB R1の細胞外TGFB1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-21R細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびにTGFB R2の細胞外TGFB1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-2Rγ細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR21シグナルコンバーターは、TGFB R1の細胞外TGFB1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-2Rγ細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびにTGFB R2の細胞外TGFB1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-21R細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。

30

【0221】

特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR21シグナルコンバーターは、TGFB R1の細胞外TGFB1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-21R細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびにTGFB R2の細胞外TGFB1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-2Rγ細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR21シグナルコンバーターは、TGFB R1の細胞外TGFB1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-2Rγ細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびにTGFB R2の細胞外TGFB1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-21R細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。

40

【0222】

50

特定の実施形態において、CTBR21シグナルコンバーターは、TGFB β R1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-21R細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびにTGFB β R2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。特定の実施形態において、CTBR21シグナルコンバーターは、TGFB β R1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-2R γ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびにTGFB β R2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-21R細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。

10

【0223】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R1またはTGFB β R2の膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ポリペプチドはIL-21RまたはIL-2R γ の膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、およびIL-21R膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、およびIL-2R γ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、およびIL-2R γ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、およびIL-21R膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

20

【0224】

さらなる実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型ポリペプチド、より好ましくは、ウイルス自己切断型2Aポリペプチド、およびより好ましくは、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea assigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、プタテッシュウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される、ウイルス自己切断型ペプチドである。一実施形態において、ポリペプチド切断シグナルはP2AまたはT2Aウイルス自己切断型ポリペプチドである。

30

【0225】

5. CTBR18シグナルコンバーター

インターロイキン18(IL-18)は、部分的には、IFN γ 発現を増加し、T細胞増殖を増加し、活性化誘導細胞死(AICD)から保護することによって、T細胞機能および活性を促進するサイトカインである。IL-18は、インターロイキン18受容体1(IL-18R1、CD218aとしても既知)およびインターロイキン18受容体アクセサリタンパク質(IL-18RAP、CD218b)に結合する。

【0226】

IL-18R1およびIL-18RAPによるIL-18シグナル伝達は、MyD88アダプタンパク質およびIRAK4リン酸化による活性化をもたらす。IRAK4のリン酸化および後続のIRAK1/2のリン酸化は、最終的にはNF- κ BおよびAP-1転写因子の活性化を引き起こし、IFN γ 発現を増加させIL-12の感受性を増加させる。IL-18によって誘導された転写プログラムはまた、細胞増殖を増大させAICDから保護する。

40

【0227】

種々の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体を発現する免疫エフェクター細胞を包含する、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR18シグナルコンバーターをコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。種々の実施形態において、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR18シグ

50

ナルコンバーターおよび遺伝子操作された抗原受容体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。

【0228】

特定の実施形態において、 $TGF\beta$ シグナルコンバーターは、免疫抑制 $TGF\beta$ シグナルを $IL-18$ 媒介性免疫刺激シグナルに変換する。特定の実施形態において、本明細書で企図される $CTBR18$ シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18RAP$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18R1$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。特定の実施形態において、本明細書で企図される $CTBR18$ シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18R1$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18RAP$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。

10

【0229】

特定の実施形態において、本明細書で企図される $CTBR18$ シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18R1$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18RAP$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。特定の実施形態において、本明細書で企図される $CTBR18$ シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18RAP$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18R1$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。

20

【0230】

特定の実施形態において、 $CTBR18$ シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18RAP$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18R1$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。特定の実施形態において、 $CTBR18$ シグナルコンバーターは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18R1$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびに $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および $IL-18RAP$ 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。

30

【0231】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ または $TGF\beta R2$ の膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ポリペプチドは $IL-18R1$ または $IL-18RAP$ の膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-18RAP$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-18R1$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R1$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-18R1$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、 $TGF\beta R2$ の細胞外 $TGF\beta 1$ 結合ドメイン、および $IL-18RAP$ 膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

40

【0232】

50

さらなる実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型ポリペプチド、より好ましくは、ウイルス自己切断型 2 A ポリペプチド、およびより好ましくは、口蹄疫ウイルス (FMDV) (F 2 A) ペプチド、ウマ鼻炎 A ウイルス (ERAV) (E 2 A) ペプチド、トセア・アシグナ (Thosea signa) ウイルス (TaV) (T 2 A) ペプチド、ブタテッシュウウイルス-1 (PTV-1) (P 2 A) ペプチド、タイロウイルス 2 A ペプチド、および脳筋炎ウイルス 2 A ペプチドからなる群から選択される、ウイルス自己切断型ペプチドである。一実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは P 2 A または T 2 A ウイルス自己切断型ポリペプチドである。

【0233】

6. CTBR1 シグナルコンバーター

インターロイキン-1 (IL-1) は、部分的には、IFN γ 発現を増加し、T 細胞増殖を増加し、活性化誘導細胞死 (AICD) から保護することを増強することによって、T 細胞機能および活性を促進するサイトカインである。IL-1 は、インターロイキン 1 受容体 1 (IL-1R1、CD121a としても既知) およびインターロイキン 1 受容体アクセサリタンパク質 (IL-1RAP) に結合する。

【0234】

IL-1R1 および IL-1RAP による IL-1 シグナル伝達は、MyD88 アダプタンパク質および IRAK4 リン酸化による活性化をもたらす。IRAK4 のリン酸化および後続の IRAK1/2 のリン酸化は、最終的には NF- κ B および AP-1 転写因子の活性化を引き起こし、IFN γ 発現を増加させ IL-12 の感受性を増加させる。IL-1 によって誘導された転写プログラムはまた、細胞増殖を増大させ AICD から保護する。

【0235】

種々の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体を発現する免疫エフェクター細胞を包含する、1 つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR1 シグナルコンバーターをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。種々の実施形態において、1 つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR1 シグナルコンバーターおよび遺伝子操作された抗原受容体をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。

【0236】

特定の実施形態において、TGF β シグナルコンバーターは、免疫抑制 TGF β シグナルを IL-1 媒介性免疫刺激シグナルに変換する。特定の実施形態において、本明細書で企図される CTBR1 シグナルコンバーターは、TGF β R1 の細胞外 TGF β 1 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および IL-1RAP 細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびに TGF β R2 の細胞外 TGF β 1 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および IL-1R1 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。特定の実施形態において、本明細書で企図される CTBR1 シグナルコンバーターは、TGF β R1 の細胞外 TGF β 1 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および IL-1R1 細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびに TGF β R2 の細胞外 TGF β 1 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および IL-1RAP 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む。

【0237】

特定の実施形態において、本明細書で企図される CTBR1 シグナルコンバーターは、TGF β R1 の細胞外 TGF β 1 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および IL-1R1 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第 1 のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびに TGF β R2 の細胞外 TGF β 1 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および IL-1RAP 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第 2 のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。特定の実施形態において、本明細書で企図される CTBR1 シグナルコンバーターは、TGF β R1 の細胞外 TGF β 1 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および IL-1RAP 細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第 1 のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびに TGF β R2 の細胞外 TGF β 1 結合ドメイン、膜貫

10

20

30

40

50

通ドメイン、およびIL-1R1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。

【0238】

特定の実施形態において、CTBR1シグナルコンバーターは、TGFB β R1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-1RAP細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびにTGFB β R2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-1R1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。特定の実施形態において、CTBR1シグナルコンバーターは、TGFB β R1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-1R1細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびにTGFB β R2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびIL-1RAP細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。

【0239】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R1またはTGFB β R2の膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ポリペプチドはIL-1R1またはIL-1RAPの膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、およびIL-1RAP膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、およびIL-1R1膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R1の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、およびIL-1R1膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFB β R2の細胞外TGFB β 1結合ドメイン、およびIL-1RAP膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0240】

さらなる実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型ポリペプチド、より好ましくは、ウイルス自己切断型2Aポリペプチド、およびより好ましくは、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、プタテッシュウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される、ウイルス自己切断型ペプチドである。一実施形態において、ポリペプチド切断シグナルはP2AまたはT2Aウイルス自己切断型ポリペプチドである。

【0241】

7. CTBR. TLRシグナルコンバーター

Toll様受容体(TLR1からTLR10)は、侵入病原体を検出し自然免疫応答および適応免疫応答を活性化するパターン認識受容体である。種々のリガンドによるTLRの活性化は、炎症促進性転写プログラムの誘導および複数の炎症性サイトカインの発現を引き起こす。

【0242】

TLRシグナル伝達は、MyD88アダプタンパク質およびIRAK4リン酸化による活性化をもたらす、TLRシグナル伝達ドメインホモ二量体化により生じる。IRAK4のリン酸化および後続のIRAK1/2のリン酸化は、最終的にはNF- κ BおよびAP-1転写因子の活性化を引き起こし、炎症性サイトカイン産生を増加させ増殖を誘発させる。TLR活性化はまた、IRF3およびIRF7転写因子の活性化を引き起こす。

【0243】

種々の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体を発現する免疫エフェクター細胞を包含する、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR. TLRシグナルコンバーターをコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修

飾される。種々の実施形態において、1つ以上の免疫エフェクター細胞は、CTBR、TLRシグナルコンバーターおよび遺伝子操作された抗原受容体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって修飾される。

【0244】

特定の実施形態において、TGFβシグナルコンバーターは、免疫抑制TGFβシグナルをTLR媒介性免疫刺激シグナルに変換する。特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR、TLRシグナルコンバーターは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびTLR細胞内シグナル伝達ドメイン、ポリペプチド切断シグナル、ならびにTGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびTLRシグナル伝達ドメイン、を含む。

10

【0245】

特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBR、TLRシグナルコンバーターは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびTLR細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ポリペプチド切断シグナルと、ならびにTGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および同一TLRシグナル伝達ドメイン、を含む、第2のポリペプチド、を含む、融合ポリペプチドを含む。

【0246】

特定の実施形態において、CTBR、TLRシグナルコンバーターは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびTLR細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、第1のポリペプチドと、ならびにTGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および同一TLR細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの複合体である。

20

【0247】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、TGFβR1またはTGFβR2の膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ポリペプチドはTLRの膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFβR1の細胞外TGFβ1結合ドメイン、およびTLR膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態において、ポリペプチドは、TGFβR2の細胞外TGFβ1結合ドメイン、およびTLR膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0248】

さらなる実施形態において、ポリペプチド切断シグナルは、ウイルス自己切断型ポリペプチド、より好ましくは、ウイルス自己切断型2Aポリペプチド、およびより好ましくは、口蹄疫ウイルス(FMDV)(F2A)ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)(E2A)ペプチド、トセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(TaV)(T2A)ペプチド、プタテッシュウウイルス-1(PTV-1)(P2A)ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される、ウイルス自己切断型ペプチドである。一実施形態において、ポリペプチド切断シグナルはP2AまたはT2Aウイルス自己切断型ポリペプチドである。

【0249】

40

D. 遺伝子操作された抗原受容体

特定の実施形態において、ポリペプチドは、遺伝子操作された抗原受容体、ポリペプチド切断シグナル、およびCTBRを含む。他の特定の実施形態において、CTBRをコードするポリヌクレオチドまたはベクターは、遺伝子操作された抗原受容体を含む免疫エフェクター細胞内に導入される。いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、当技術分野で既知の任意の機構を使用して、同一免疫エフェクター細胞または細胞集団内で、遺伝子操作された抗原受容体およびCTBRを導入して共発現し、TMEに対する免疫エフェクター細胞の耐性を増加させ、免疫エフェクター細胞応答の効率、効力および耐久性を増強および増加できることが特定の実施形態で企図される。

【0250】

50

特定の実施形態において、本明細書で企図される免疫エフェクター細胞は、遺伝子操作された抗原受容体およびCTBRを含む。特定の実施形態において、遺伝子操作された抗原受容体は、遺伝子操作されたT細胞受容体(TCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、DARIC受容体もしくはそれらの構成要素、またはゼータカインである。

【0251】

1. 遺伝子操作されたTCR

特定の実施形態において、本明細書で企図される免疫エフェクター細胞は、遺伝子操作されたTCRおよびCTBRシグナルコンバーターを含む。一実施形態において、T細胞は、遺伝子操作されたTCRをコードするポリヌクレオチドまたはベクター、および1つ以上のポリペプチド切断シグナルによって分離されたCTBRシグナルコンバーターを導入することによって遺伝子操作される。一実施形態において、T細胞は、遺伝子操作されたTCRをコードするポリヌクレオチドまたはベクター、ならびにCTBRシグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって遺伝子操作される。一実施形態において、遺伝子操作されたTCRを発現するよう遺伝子操作されたT細胞は、CTBRシグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによってさらに遺伝子操作される。

【0252】

天然T細胞受容体は、2つのサブユニット、アルファ鎖およびベータ鎖サブユニットを含み、これらのそれぞれは、各T細胞のゲノムにおいて組換え事象によって産生される固有のタンパク質である。TCRのライブラリは、特定の標的抗原に対してそれらの選択性についてスクリーニングされ得る。このように、標的抗原に対して高い結合活性および反応性を有する天然TCRは、選択され、クローン化され、その後、養子免疫療法に対して使用されるT細胞の集団内に導入され得る。

【0253】

一実施形態において、T細胞は、標的抗原を発現する腫瘍細胞に対してT細胞への特異性を与えるTCRを形成する能力を有するTCRサブユニットを導入することによって修飾される。特定の実施形態において、サブユニットは、サブユニットが、TCRを形成する能力を保持し、トランスフェクトT細胞が標的細胞に誘導される能力を与え、免疫学的に関連するサイトカインシグナル伝達に関与する限り、天然サブユニットと比較して、1つ以上のアミノ酸置換、欠失、挿入、または修飾を有する。遺伝子操作されたTCRはまた、好ましくは、高い結合活性を有する関連のある腫瘍関連ペプチドを表示する標的細胞に結合し、および任意選択で、インビボで関連ペプチドを提示する標的細胞の効率的な殺傷を媒介する。

【0254】

遺伝子操作されたTCRをコードする核酸は、好ましくは、T細胞の(天然に存在する)染色体においてそれらの天然の状況から単離され、本明細書の他の箇所で記載される、好適なベクターに組み込まれ得る。それらを含む核酸およびベクターの両方が、細胞に、好ましくは、特定の実施形態において、T細胞に移動され得る。次いで、修飾T細胞は、形質導入された核酸または核酸によってコードされるTCRのうちの1つ以上の鎖を発現することができる。好ましい実施形態において、遺伝子操作されたTCRは、特定のTCRを正常に発現しないT細胞内に導入されるため、外因性TCRである。遺伝子操作されたTCRの本質的態様は、主要組織適合複合体(MHC)または同様の免疫学的構成要素によって提示される腫瘍抗原に対して高い結合活性を有することである。遺伝子操作されたTCRとは対照的に、CARは、MHCの独立した様式で標的抗原に結合するように遺伝子操作される。

【0255】

TCRは、結合したさらなるポリペプチドが、機能的T細胞受容体およびMHC依存性抗原認識を形成するアルファ鎖またはベータ鎖の能力に干渉しない限り、TCRのアルファ鎖またはベータ鎖のアミノ末端またはカルボキシル末端部分に結合するさらなるポリペプチドで発現され得る。

【0256】

特定の実施形態で企図される遺伝子操作されたTCRによって認識される抗原としては、血液がんおよび固形腫瘍の両方における抗原を含む、がん抗原が挙げられるが、これに限定されない。例示的な抗原としては、アルファ葉酸受容体、アルファ葉酸受容体、5T4、 $\alpha\text{v}\beta 6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2)、EGFRvIIIを含むEGFRファミリー、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、胎児AchR、FR α 、GD2、GD3、グリピカン-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R $\alpha 2$ 、ラムダ、ルイス-Y、カップ、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、サバイビン、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0257】

2. キメラ抗原受容体

種々の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、腫瘍細胞に対して細胞傷害性をリダイレクトするCARを発現する。CARは、特異的抗腫瘍細胞性免疫活性を示すキメラタンパク質を生成するために、T細胞受容体を活性化する細胞内ドメインを有する標的抗原（例えば、腫瘍抗原）に対する抗体系特異性を組み合わせる分子である。本明細書で使用される、「キメラ」という用語は、異なるタンパク質の部分または異なる起源からのDNAからなることを説明する。

20

【0258】

特定の実施形態において、本明細書で企図される免疫エフェクター細胞は、CARおよびCTBRシグナルコンバーターを含む。一実施形態において、T細胞は、CAR、および1つ以上のポリペプチド切断シグナルによって分離されたCTBRシグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって遺伝子操作される。一実施形態において、T細胞は、CARおよびポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドもしくはベクター、またはCTBRシグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって遺伝子操作される。一実施形態において、CARを発現するよう遺伝子操作されたT細胞は、CTBRシグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによってさらに遺伝子操作される。

30

【0259】

種々の実施形態において、CARは、特異的標的抗原（結合ドメインまたは抗原特異的結合ドメインとも称される）に結合する細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。CARの主な特性は、免疫エフェクター細胞特異性を再指向するそれらの能力であり、それによって、主要組織適合性 (MHC) の独立した様式で、標的抗原を発現する細胞の細胞死を媒介し得る、分子の増殖、サイトカイン産生、食作用、または産生を引き起こし、モノクローナル抗体、可溶性リガンド、または細胞特異的共受容体の細胞特異的標的能力を利用する。

40

【0260】

特定の実施形態において、CARは、標的ポリペプチド、例えば、腫瘍細胞上で発現される標的抗原に特異的に結合する細胞外結合ドメインを含む。本明細書で使用される、「結合ドメイン」、「細胞外ドメイン」、「細胞外結合ドメイン」、「抗原結合ドメイン」、「抗原特異的結合ドメイン」、および「細胞外抗原特異的結合ドメイン」という用語は、交換可能に使用され、キメラ受容体、例えば、目的となる標的抗原に特異的に結合する能力を有するCARまたはDARICを提供する。結合ドメインは、生物学的分子（例え

50

ば、細胞表面受容体または腫瘍タンパク質、脂質、多糖、または他の細胞表面標的分子、またはその構成要素)に特異的に認識および結合する能力を有する、任意のタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、またはペプチドを含み得る。結合ドメインは、目的となる生物学的分子に対する、任意に天然に存在する、合成、半合成、または組換え技術によって産生された結合パートナーを含む。

【0261】

特定の実施形態において、細胞外結合ドメインは、抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0262】

「抗体」は、ペプチド、脂質、多糖、または抗原決定基を含有する核酸、例えば、免疫細胞によって認識されるものである、標的抗原のエピトープに特異的に認識および結合する少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドである結合剤を指す。抗体には、抗原結合断片、例えば、ラクダIg (ラクダ科抗体またはそのVHH断片)、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fv抗体(「scFv」)、ビス-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質(「dsFv」)、および単ドメイン抗体(sdAb、Nanobody)またはその他の抗体断片が含まれる。用語はまた、キメラ抗体(例えば、ヒト化マウス抗体)、ヘテロ共役抗体(二重特異性抗体など)、およびその抗原結合断片などの遺伝子操作された形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

【0263】

1つの好ましい実施形態において、結合ドメインは、scFvである。

【0264】

別の好ましい実施形態において、結合ドメインは、ラクダ科抗体である。

【0265】

特定の実施形態において、CARは、アルファ葉酸受容体、5T4、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2(HER2)、EGFRvIIIを含むEGFRファミリー、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、胎児AchR、FR α 、GD2、GD3、グリピカン-3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、ラムダ、ルイス-Y、カップ、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、サバイビン、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1からなる群から選択される抗原に結合する細胞外ドメインを含む。

【0266】

特定の実施形態において、CARは、細胞外結合ドメイン、例えば、抗原に結合する抗体またはその抗原結合断片を含み、抗原は、クラスI MHC-ペプチド複合体またはクラスII MHC-ペプチド複合体などのMHC-ペプチド複合体である。

【0267】

ある特定の実施形態において、CARは、様々なドメイン間のリンカー残基を含む。「可変領域連結配列」は、重鎖可変領域を軽鎖可変領域に接続し、得られるポリペプチドが、同じ軽鎖および重鎖可変領域を含む抗体と同じ標的分子に特異的結合親和性を保持するように、2つのサブ結合ドメインの相互作用に適合性のあるスペーサー機能を提供するアミノ酸配列である。特定の実施形態において、CARは、1つの、2つの、3つの、4つ

10

20

30

40

50

の、または5つもしくはそれ以上のリンカーを含む。特定の実施形態において、リンカーの長さは、約1～約25のアミノ酸、約5～約20のアミノ酸、または約10～約20のアミノ酸、またはアミノ酸の任意の介在する長さである。いくつかの実施形態において、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはそれ以上のアミノ酸長である。

【0268】

特定の実施形態において、CARの結合ドメインの後ろに、1つ以上の「スペーサードメイン」が続き、これは、抗原結合ドメインをエフェクター細胞表面から離して適切な細胞／細胞接触、抗原結合および活性化を可能にする領域を指す(Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419)。スペーサードメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。ある特定の実施形態において、スペーサードメインは、1つ以上の重鎖定常領域、例えば、CH2およびCH3が挙げられるが、これらに限定されない、免疫グロブリンの部分である。スペーサードメインは、天然に存在する免疫グロブリンヒンジ領域または変化した免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含み得る。

10

【0269】

一実施形態において、スペーサードメインは、IgG1、IgG4、またはIgDのCH2およびCH3を含む。

【0270】

一実施形態において、CARの結合ドメインは、適切な細胞／細胞接触、抗原結合および活性化を可能にするためにエフェクター細胞表面から離れて抗原結合ドメインを位置決めする役割を果たす、1つ以上の「ヒンジドメイン」に連結される。CARは、一般には、結合ドメインと膜貫通ドメイン(TM)との間に1つ以上のヒンジドメインを含む。ヒンジドメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。ヒンジドメインは、天然に存在する免疫グロブリンヒンジ領域または変化した免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含み得る。

20

【0271】

本明細書に記載のCARでの使用に好適な例示的なヒンジドメインは、CD8α、およびCD4などの1型膜タンパク質の細胞外領域に由来するヒンジ領域を含み、これは、これらの分子から野生型ヒンジ領域であり得るか、または変化する。別の実施形態において、ヒンジドメインは、CD8αヒンジ領域を含む。

30

【0272】

一実施形態において、ヒンジは、PD-1ヒンジまたはCD152ヒンジである。

【0273】

「膜貫通ドメイン」は、細胞外結合部分および細胞内シグナル伝達ドメインを融合し、CARを免疫エフェクター細胞の形質膜に固定するCARの部分である。TMドメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。

【0274】

例示的なTMドメインは、T細胞受容体、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN、およびPD-1のアルファまたはベータ鎖の少なくとも膜貫通領域(複数可)に由来し得る(すなわち、それらを含む)。

40

【0275】

一実施形態において、CARは、CD8αに由来するTMドメインを含む。別の実施形態において、本明細書で企図されるCARは、好ましくは、TMドメインおよびCARの細胞内シグナル伝達ドメインに連結する、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸長のCD8αおよび短オリゴまたはポリペプチドリンカーに由来するTMドメインを含む。グリシン-セリンリンカーは、特定の好適なリンカーを提供する。

50

【0276】

特定の実施形態において、CARは、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、標的抗原への有効なCAR結合のメッセージを、免疫エフェクター細胞の内部に形質導入して、エフェクター細胞機能、例えば、CAR結合標的細胞への細胞傷害性因子の放出、または細胞外CARDドメインへの抗原結合で引き出される他の細胞応答を含む、活性化、サイトカイン産生、増殖、および細胞傷害性活性を引き出すことに関与するCARの部分を目指す。

【0277】

「エフェクター機能」という用語は、該細胞の特殊機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解性活性またはサイトカインの分泌を含む、補助もしくは活性であり得る。故に、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞を、特殊機能を行うように誘導するタンパク質の部分を目指す。通常は、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を使用することができるが、多くの場合、ドメイン全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分を使用する範囲内で、そのような切断部分を、エフェクター機能シグナルを伝達する限りは、ドメイン全体の代わりに使用することができる。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断部分を含むことを意味する。

【0278】

TCR単独によって生成されるシグナルは、T細胞の完全な活性化に不十分であること、および二次または共刺激シグナルも必要であることが公知である。故に、T細胞活性化は、2つの別個のクラスの細胞内シグナル伝達ドメイン：TCR（例えば、TCR/CD3複合体）によって抗原依存的一次活性化を開始する主要シグナル伝達ドメインと、抗原非依存的に作用して二次または共刺激シグナルをもたらす共刺激シグナル伝達ドメインによって媒介されるということが出来る。好ましい実施形態において、CARは、1つ以上の「共刺激シグナル伝達ドメイン」および「主要シグナル伝達ドメイン」を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0279】

主要シグナル伝達ドメインは、TCR複合体の一次活性化を刺激性に、または阻害性に調節する。刺激性に作用する主要シグナル伝達ドメインは、免疫受容体活性化チロシン依存性モチーフまたはITAMとして公知であるシグナル伝達モチーフを含有し得る。

【0280】

特定の実施形態で企図されるCARでの使用に好適な主要シグナル伝達ドメインを含有するITAMの例示的な例には、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するものが挙げられる。特に好ましい実施形態において、CARは、CD3ζ主要シグナル伝達ドメインおよび1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。細胞内主要シグナル伝達および共刺激シグナル伝達ドメインは、任意の順序でタンデムに膜貫通ドメインのカルボキシル末端と連結することができる。

【0281】

特定の実施形態において、CARは、CAR受容体を発現するT細胞の有効性および増殖を増強するための1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。本明細書で使用される、「共刺激シグナル伝達ドメイン」、または「共刺激ドメイン」という用語は、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインを指す。

【0282】

特定の実施形態で企図されるCARでの使用に好適なかかる共刺激分子の例示的な例としては、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54（ICAM）、CD83、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD278（ICOS）、DAP10、LAT、NKD2C、S

10

20

30

40

50

L P 7 6、T R I M、および Z A P 7 0 が挙げられる。一実施形態において、C A R は、C D 2 8、C D 1 3 7、および C D 1 3 4、および C D 3 ζ 主要シグナル伝達ドメインからなる群から選択される 1 つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0283】

種々の実施形態において、C A R は、B C M A、C D 1 9、C S P G 4、P S C A、R O R 1、および T A G 7 2 からなる群から選択される抗原に結合する細胞外ドメインと、C D 4、C D 8 α、C D 1 5 4、および P D-1 からなる群から選択されるポリペプチドから単離された膜貫通ドメインと、C D 2 8、C D 1 3 4、および C D 1 3 7 からなる群から選択されるポリペプチドから単離された 1 つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、F c R γ、F c R β、C D 3 γ、C D 3 δ、C D 3 ε、C D 3 ζ、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、および C D 6 6 d からなる群から選択されるポリペプチドから単離されたシグナル伝達ドメインと、を含む。

【0284】

3. D A R I C

特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、1 つ以上の D A R I C 受容体の鎖を含む。本明細書で使用されるとき、「D A R I C 受容体」という用語は、多鎖の遺伝子操作された抗原受容体を指す。

【0285】

特定の実施形態において、本明細書で企図される免疫エフェクター細胞は、D A R I C 受容体および C T B R シグナルコンバーターの 1 つ以上の鎖を含む。一実施形態において、T 細胞は、D A R I C 受容体の 1 つ以上の鎖および 1 つ以上のポリペプチド切断シグナルによって分離された C T B R シグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって遺伝子操作される。一実施形態において、T 細胞は、D A R I C 受容体の 1 つ以上の鎖をコードするポリヌクレオチドまたはベクター、および C T B R シグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって遺伝子操作される。一実施形態において、D A R I C 受容体の 1 つ以上の鎖を発現するよう遺伝子操作された T 細胞は、C T B R シグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによってさらに遺伝子操作される。

【0286】

D A R I C アーキテクチャおよび構成要素の例示的な例は、P C T 国際公開特許 W O 2 0 1 5 / 0 1 7 2 1 4 および米国特許公開第 2 0 1 5 0 2 6 6 9 7 3 号に開示されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0287】

一実施形態において、ドナー修復テンプレートは、第 1 の多量体化ドメイン、第 1 の膜貫通ドメイン、および 1 つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、および / または一次シグナル伝達ドメインを含むシグナル伝達ポリペプチドと、結合ドメイン、第 2 の多量体化ドメイン、および任意選択で第 2 の膜貫通ドメインを含む結合ポリペプチドと、を含む D A R I C 構成要素を含む。機能的 D A R I C は、シグナル伝達ポリペプチドおよび結合ポリペプチドの多量体化ドメインに関連するおよびそれらとの間に配置される架橋因子を有する細胞表面上に D A R I C 受容体複合体の形成を促進する架橋因子を含む。

【0288】

特定の実施形態において、第 1 のおよび第 2 の多量体化ドメインは、ラパマイシンまたはそのラパログ、クーママイシンまたはその誘導体、ジベレリンまたはその誘導体、アブシジン酸 (A B A) またはその誘導体、メトトレキサートまたはその誘導体、シクロスポリン A またはその誘導体、F K C s A またはその誘導体、F K B P (S L F) のためのトリメトプリム (T m p) - 合成リガンドまたはその誘導体、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される架橋因子と関連する。

【0289】

ラパマイシン類似体 (ラパログ) の例示的な例は、米国特許第 6, 6 4 9, 5 9 5 号に開示されるものを含み、ラパログ構造は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる

10

20

30

40

50

。ある特定の実施形態において、架橋因子は、ラパマイシンと比較して、実質的に低減された免疫抑制効果を有するラパログである。「実質的に低減された免疫抑制効果」は、臨床的にまたはヒト免疫抑制活性の適切なインビトロ（例えば、T細胞増殖の阻害）もしくはインビボでのサロゲートで測定される、等モル量のラパマイシンに観察されたまたは期待された免疫抑制効果を少なくとも0.1～0.005倍未満有するラパログを指す。一実施形態において、「実質的に低減された免疫抑制効果」は、同じアッセイにおいてラパマイシンに観察されたEC50値よりも少なくとも10～250倍大きいインビトロアッセイにおいて、EC50値を有するラパログを指す。

【0290】

ラパログの他の例示的な例としては、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダフォロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、およびゾタロリムスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0291】

ある特定の実施形態において、多量体化ドメインは、ラパマイシンまたはそのラパログである架橋因子と関連があるであろう。例えば、第1のおよび第2の多量体化ドメインは、FKBPおよびFRBから選択される対である。FRBドメインは、FKBPタンパク質およびラパマイシンまたはそのラパログとともに三部分複合体を形成することができるポリペプチド領域（タンパク質「ドメイン」）である。FRBドメインは、ヒトおよび他の種からのmTORタンパク質（文献においてFRAP、RAPT1、またはRAFTとも称される）、Tor1およびTor2を含む酵母タンパク質、ならびにカンジダFRAPホモログを含む、多くの天然に存在するタンパク質中に存在する。ヌクレオチド配列、クローニング、およびこれらのタンパク質の他の態様に関する情報は、既に当該技術分野で既知である。例えば、ヒトmTORのタンパク質配列アクセッション番号は、GenBankアクセッション番号L34075.1である（Brown et al., Nature 369: 756, 1994）。

【0292】

本明細書で企図される特定の実施形態での使用に好適なFRBドメインは、一般に、少なくとも約85～約100個のアミノ酸残基を含有する。ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質で使用するFRBアミノ酸配列は、GenBankアクセッション番号L34075.1のアミノ酸配列に基づいて、93アミノ酸配列Ile-2021～Lys-2113およびT2098Lの変異を含む。特定の実施形態で企図されるDARICで使用するFRBドメインは、ラパマイシンまたはそのラパログに結合したFKBPタンパク質の複合体に結合することができる。ある特定の実施形態において、FRBドメインのペプチド配列は、（a）相同タンパク質のヒトmTORの少なくとも示された93アミノ酸領域または対応する領域に及ぶ天然に存在するペプチド配列、（b）天然に存在するペプチドの、最大約10個のアミノ酸、または約1～約5個のアミノ酸または約1～約3個のアミノ酸、またはいくつかの実施形態において、わずか1個のアミノ酸が、欠失、挿入、または置換されている天然に存在するFRBのバリエーション、または（c）天然に存在するFRBドメインをコードするDNA分子に選択的にハイブリダイズすることができる核酸分子によって、または遺伝コードの縮重がなかったら、天然に存在するFRBドメインをコードするDNA分子に選択的にハイブリダイズすることができ得るDNA配列によってコードされるペプチドを含む。

【0293】

FKBP（FK506結合タンパク質）は、FK506、FK520、およびラパマイシンなどのマクロライドの細胞質受容体であり、種線にわたって高度に保存される。FKBPは、ラパマイシンまたはそのラパログに結合し、FRBを含有するタンパク質または融合タンパク質を用いて三部分複合体をさらに形成することができるタンパク質またはタンパク質ドメインである。FKBPドメインはまた、「ラパマイシン結合ドメイン」と称され得る。ヌクレオチド配列、クローニング、および種々のFKBP種の他の態様に関する情報は、当該技術分野で既知である（例えば、Staendart et al., Na

10

20

30

40

50

ture 346:671, 1990 (human FKBP12)、Kay, Biochem. J. 314:361, 1996を参照のこと)。他の哺乳動物種、酵母、および他の生物における相同FKBPタンパク質はまた、当該技術分野で既知であり、本明細書に開示されている融合タンパク質において使用され得る。特定の実施形態で企図されるFKBPドメインは、ラパマイシンまたはそのラパログに結合し、FRBを含有するタンパク質を用いて三部分複合体に関与することができるであろう（かかる結合を検出するために、任意の手段によって、直接または間接的に決定され得るように）。

【0294】

特定の実施形態で企図されるDARICでの使用に好適なFKBPドメインの例示的な例としては、好ましくはヒトFKBP12タンパク質（GenBankアクセッション番号AAA58476.1）から、またはそこから単離されたペプチド配列、別のヒトFKBPから、マウスもしくは他の哺乳動物FKBPから、またはいくつかの他の動物、酵母、もしくは真菌FKBPから単離された天然に存在するFKBPペプチド配列、天然に存在するペプチドの、最大約10個のアミノ酸、または約1～約5個のアミノ酸または約1～約3個のアミノ酸、またはいくつかの実施形態において、わずか1個のアミノ酸が、欠失、挿入、または置換されている天然に存在するFKBPのバリエーション、あるいは天然に存在するFKBPドメインをコードするDNA分子に選択的にハイブリダイズすることができる核酸分子によって、または遺伝コードの縮重がなかったら、天然に存在するFKBPをコードするDNA分子に選択的にハイブリダイズすることができ得るDNA配列によってコードされるペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0295】

特定の実施形態で企図されるDARICでの使用に好適な多量体化ドメインの他の例示的な例としては、FKBPおよびFRB、FKBPおよびカルシニューリン、FKBPおよびシクロフィリン、FKBPおよび細菌DHFR、カルシニューリンおよびシクロフィリン、PYL1およびABI1、またはGIB1およびGAI、またはそれらのバリエーションが挙げられるが、これらに限定されない。

【0296】

さらに他の実施形態において、抗架橋因子は、シグナル伝達ポリペプチドおよび結合ポリペプチドと架橋因子との関連性を遮断する。例えば、シクロスポリンまたはFK506は、ラパマイシンを滴定するための抗架橋因子として使用され、したがって、1つの多量体化ドメインのみが結合するため、シグナル伝達を停止し得る。ある特定の実施形態において、抗架橋因子（例えば、シクロスポリン、FK506）は、免疫抑制剤である。例えば、免疫抑制抗架橋因子は、特定の実施形態で企図されるDARIC構成要素の機能を遮断または最小限に抑え、同時に、臨床環境において望ましくないもしくは病理学的炎症応答を阻害または遮断するために使用され得る。

【0297】

一実施形態において、第1の多量体化ドメインは、FRB T2098Lを含み、第2の多量体化ドメインは、FKBP12を含み、架橋因子は、ラパログAP21967である。

【0298】

別の実施形態において、第1の多量体化ドメインは、FRBを含み、第2の多量体化ドメインは、FKBP12を含み、架橋因子は、ラパマイシン、テムシロリムス、またはエベロリムスである。

【0299】

特定の実施形態において、シグナル伝達ポリペプチド、第1の膜貫通ドメインおよび結合ポリペプチドは、第2の膜貫通ドメインまたはGPIアンカーを含む。第1のおよび第2の膜貫通ドメインの例示的な例としては、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN、およびPD-1からなる群から独立して選択されるポリ

ペプチドから単離される。

【0300】

一実施形態において、シグナル伝達ポリペプチドは、1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインおよび／または主要シグナル伝達ドメインを含む。

【0301】

特定の実施形態で企図されるDARICシグナル伝達の構成要素での使用に好適な一次シグナル伝達ドメインの例示的な例には、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するものが含まれる。特に好ましい実施形態において、DARICシグナル伝達の構成要素は、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインおよび1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。細胞内主要シグナル伝達および共刺激シグナル伝達ドメインは、任意の順序でタンデムに膜貫通ドメインのカルボキシル末端と連結することができる。

10

【0302】

特定の実施形態で企図されるDARICシグナル伝達の構成要素での使用に好適なこのような共刺激分子の例示的な例としては、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、およびZAP70が挙げられる。一実施形態において、DARICシグナル伝達の構成要素は、CD28、CD137、およびCD134、およびCD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインからなる群から選択される1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

20

【0303】

特定の実施形態において、DARIC結合の構成要素は、結合ドメインを含む。一実施形態において、結合ドメインは、抗体またはその抗原結合断片である。

【0304】

抗体またはその抗原結合断片は、ペプチド、脂質、多糖、または抗原決定基を含有する核酸、例えば、免疫細胞によって認識されるものである、標的抗原のエピトープに特異的に認識および結合する少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含む。抗体には、抗原結合断片、例えば、ラクダIg (ラクダ科抗体またはそのVHH断片)、IgNAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fv抗体 (「scFv」)、ビス-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質 (「dsFv」)、および単一ドメイン抗体 (sdAb、Nanobody) またはその他の抗体断片が含まれる。用語はまた、キメラ抗体 (例えば、ヒト化マウス抗体)、ヘテロ共役抗体 (二重特異性抗体など)、およびその抗原結合断片などの遺伝子操作された形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

30

【0305】

1つの好ましい実施形態において、結合ドメインは、scFvである。

【0306】

別の好ましい実施形態において、結合ドメインは、ラクダ科抗体である。

【0307】

特定の実施形態において、DARIC結合の構成要素は、アルファ葉酸受容体、5T4、 α v β 6インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2)、EGFRvIIIを含むEG

50

FRファミリー、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎児Achr、FR α 、GD2、GD3、グリピカン-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、ラムダ、ルイス-Y、カップ、メソテリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、サバイビン、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1からなる群から選択される抗原に結合する細胞外ドメインを含む。

【0308】

一実施形態において、DARIC結合の構成要素は、細胞外ドメイン、例えば、クラスI MHC-ペプチド複合体またはクラスII MHC-ペプチド複合体などのMHC-ペプチド複合体に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0309】

特定の実施形態において、本明細書で企図されるDARIC構成要素は、2つのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ドメイン、領域、またはモチーフを接続するリンカーまたはスペーサーを含む。ある特定の実施形態において、リンカーは、約2～約35個のアミノ酸、または約4～約20個のアミノ酸または約8～約15個のアミノ酸または約15～約25個のアミノ酸を含む。他の実施形態において、スペーサーは、抗体CH2CH3ドメイン、ヒンジドメインなどの特定の構造を有し得る。一実施形態において、スペーサーは、IgG1、IgG4、またはIgDのCH2およびCH3ドメインを含む。

【0310】

特定の実施形態において、本明細書で企図されるDARIC構成要素は、1つ以上の「ヒンジドメイン」を含み、適切な細胞／細胞接触、抗原結合および活性化を可能にするためにドメインを位置決めする役割を果たす。DARICは、結合ドメインと多量体化ドメインおよび／または膜貫通ドメイン (TM) との間、または多量体化ドメインと膜貫通ドメインとの間に1つ以上のヒンジドメインを含み得る。ヒンジドメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。ヒンジドメインは、天然に存在する免疫グロブリンヒンジ領域または変化した免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、ヒンジは、CD8 α ヒンジまたはCD4ヒンジである。

【0311】

一実施形態において、DARICは、シグナル伝達ポリペプチドを含み、シグナル伝達ポリペプチドは、FRBT2098Lの第1の多量体化ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインを含み、結合ポリペプチドは、CD19に結合するscFv、FKBP12の第2の多量体化ドメインおよびCD4膜貫通ドメインを含み、架橋因子は、ラパログAP21967である。

【0312】

一実施形態において、DARICは、シグナル伝達ポリペプチドを含み、シグナル伝達ポリペプチドは、FRBの第1の多量体化ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインを含み、結合ポリペプチドは、CD19に結合するscFv、FKBP12の第2の多量体化ドメイン、およびCD4膜貫通ドメインを含み、架橋因子は、ラパマイシン、テムシロリムス、またはエベロリムスである。

【0313】

4. ゼータカイン

種々の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、腫瘍細胞に対して細胞傷害性をリダイレクトするキメラサイトカイン受容体を含む。ゼータカインは、細胞外ドメインを細胞表面に連結することができる支援領域に連結された可溶性受容体リガンドを含む細胞外ドメインと、膜貫通領域と、細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ膜貫通免疫受容体である。ゼータカインは、Tリンパ球の表面上で発現されるとき、可溶性受容体リガンドが特異的である受容体を発現するような細胞に、T細胞活性を誘導する。ゼータカイン

10

20

30

40

50

キメラ免疫受容体は、様々ながんの治療への適用とともに、具体的には、ヒト悪性腫瘍によって利用される自己分泌／パラクリンサイトカイン系を介してT細胞の抗原特異性を再指向する。

【0314】

特定の実施形態において、本明細書で企図される免疫エフェクター細胞は、ゼータカイン受容体の1つ以上の鎖およびCTBRシグナルコンバーターを含む。一実施形態において、T細胞は、ゼータカイン受容体の1つ以上の鎖および1つ以上のポリペプチド切断シグナルによって分離されたCTBRシグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって遺伝子操作される。一実施形態において、T細胞は、ゼータカイン受容体の1つ以上の鎖をコードするポリヌクレオチドまたはベクター、およびCTBRシグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによって遺伝子操作される。一実施形態において、ゼータカイン受容体の1つ以上の鎖を発現するよう遺伝子操作されたT細胞は、CTBRシグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを導入することによってさらに遺伝子操作される。

10

【0315】

特定の実施形態において、ゼータカインは、免疫抑制サイトカインまたはそのサイトカイン受容体結合バリエーション、リンカー、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0316】

特定の実施形態において、サイトカインまたはそのサイトカイン受容体結合バリエーションは、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-10 (IL-10)、およびインターロイキン-13 (IL-13) からなる群から選択される。

20

【0317】

ある特定の実施形態において、リンカーは、CH2CH3ドメイン、ヒンジドメインなどを含む。さらなる実施形態において、リンカーは、IgG1、IgG4、またはIgDのCH2およびCH3ドメインを含む。一実施形態において、リンカーは、CD8αまたはCD4ヒンジドメインを含む。

【0318】

特定の実施形態において、膜貫通ドメインは、T細胞受容体、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN、およびPD-1のアルファまたはベータ鎖からなる群から選択される。

30

【0319】

特定の実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、主要シグナル伝達ドメインおよび／または共刺激ドメインを含有するITAMからなる群から選択される。

【0320】

特定の実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dからなる群から選択される。

40

【0321】

特定の実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、およびZAP70からなる群から選択される。

【0322】

50

一実施形態において、キメラサイトカイン受容体は、CD28、CD137、およびCD134、およびCD3と主要シグナル伝達ドメインからなる群から選択される1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0323】

E. ポリペプチド

種々のポリペプチドが本明細書で企図され、TGFβシグナルコンバーターポリペプチド、CTBR、遺伝子操作されたTCR、CAR、DARIC、ゼータカイン、上記のポリペプチドおよびそれらの断片を含む融合タンパク質を含むが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、ポリペプチドは、配列番号1〜71のいずれか一つに記載されるアミノ酸配列を含む。「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、別段の規定がない限り、従来の意味に従って、すなわち、アミノ酸の配列と同じ意味で用いられる。一実施形態において、「ポリペプチド」は、融合ポリペプチドおよび他のバリエーションを含む。ポリペプチドは、様々な公知の組換えおよび／または合成技術のうちのいずれかを用いて調製され得る。ポリペプチドは、特定の長さには限定されず、例えば、それらは、完全長タンパク質配列、完全長タンパク質の断片、または融合タンパク質を含み、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに天然または非天然の両方の、当該技術分野で既知の他の修飾を含み得る。

【0324】

本明細書で使用される、「単離ペプチド」または「単離ポリペプチド」等は、細胞環境からの、および本細胞の他の構成要素との会合からの、ペプチドまたはポリペプチド分子のインビトロ単離および／または精製を指す、すなわち、これは、インビボ物質とは著しく関係していない。

【0325】

ポリペプチドは、「ポリペプチドバリエーション」を含む。ポリペプチドバリエーションは、1つ以上の置換、欠失、付加、および／または挿入において天然に存在するポリペプチドとは異なり得る。このようなバリエーションは、天然に存在し得るか、または例えば、上述のポリペプチド配列の1つ以上のアミノ酸を修飾することによって合成的に生成され得る。例えば、特定の実施形態において、ポリペプチドへの1つ以上の置換、欠失、付加、および／または挿入を導入することによって、ポリペプチドの結合親和性および／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。特定の実施形態において、ポリペプチドには、本明細書で企図される任意の参照配列のいずれかに対して、少なくとも約65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、86%、97%、98%、または99%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドを含み、典型的には、バリエーションが、参照配列の少なくとも1つの生物学的活性を維持する。

【0326】

ポリペプチドバリエーションは、生物学的に活性な「ポリペプチド断片」を含む。生物学的に活性なポリペプチド断片の例示的な例には、DNA結合ドメイン、ヌクレアーゼドメインなどが挙げられる。本明細書で使用されるとき、「生物学的に活性な断片」または「最小の生物学的に活性な断片」という用語は、少なくとも100%、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも40%、少なくとも30%、少なくとも20%、少なくとも10%、または少なくとも5%の天然に存在するポリペプチド活性を保持するポリペプチド断片を指す。ある特定の実施形態において、ポリペプチド断片は、少なくとも5〜約1700アミノ酸長さのアミノ酸鎖を含み得る。ある特定の実施形態において、断片は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、1

50、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700またはそれ以上のアミノ酸長であることが認識されよう。

【0327】

特定の実施形態において、本明細書に示すポリペプチドは、「X」で表す1つ以上のアミノ酸を含んでよい。「X」は、アミノ酸配列番号に存在する場合、1つ以上のアミノ酸のいずれかを指す。特定の実施形態において、融合タンパク質を表す配列番号は、任意のアミノ酸配列を累積的に表す一連の持続的なX残基を含む。

【0328】

上述のように、ポリペプチドは、アミノ酸置換、欠失、切断短縮、および挿入を含む様々な方法で変更することができる。かかる操作のための方法は、一般に当該技術分野で既知である。例えば、参照ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションは、DNAにおける変異によって調製され得る。変異誘発およびヌクレオチド配列変更は、当該技術分野で公知である。例えば、Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:488-492)、Kunkel et al., (1987, Methods in Enzymol, 154:367-382)、U.S. Pat. No. 4,873,192、Watson, J. D. et al., (Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif, 1987) およびそこに引用される参考文献を参照されたい。目的となるタンパク質の生物学的活性に影響を及ぼさない適切なアミノ酸置換に対するガイダンスは、Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) のモデルにおいて見出され得る。

【0329】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドバリエーションは、1つ以上の保存的置換を含む。「保存的置換」は、アミノ酸が同様の特性を有する別のアミノ酸で置換され、そのためペプチド化学分野の当業者によってポリペプチドの二次構造およびヒドロパシー特性が実質的に変化しないことが予想されるような置換である。修飾は、特定の実施形態で企図されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造において行われ、望ましい特性を有するバリエーションまたは誘導体ポリペプチドをコードする機能的分子を依然として含み得る。同等の、またはさらに改良された、バリエーションポリペプチドを作製するためポリペプチドのアミノ酸配列を変更することが望ましいとき、当業者は、例えば、表1に従って例えば、コードするDNA配列のコドンのうちの1つ以上を変化させ得る。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1ーアミノ酸コドン

アミノ酸	1 文 字コ ード	3 文 字コ ード	コドン					
アラニン	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU		
システイン	C	Cys	UGC	UGU				
アスパラギン 酸	D	Asp	GAC	GAU				
グルタミン酸	E	Glu	GAA	GAG				
フェニルアラ ニン	F	Phe	UUC	UUU				
グリシン	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
ヒスチジン	H	His	CAC	CAU				
イソロイシン	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
リジン	K	Lys	AAA	AAG				
ロイシン	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
メチオニン	M	Met	AUG					
アスパラギン	N	Asn	AAC	AAU				
プロリン	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
グルタミン	Q	Gln	CAA	CAG				
アルギニン	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
セリン	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
スレオニン	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
バリン	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
トリプトファ ン	W	Trp	UGG					
チロシン	Y	Tyr	UAC	UAU				

【0330】

生物学的活性を消失することなく、置換、挿入、または欠失され得るアミノ酸残基を決定するガイドは、DNA STAR、DNAStrider、Geneious、Macベクター、またはベクターNTソフトウェアなどの当該技術分野で公知のコンピュータプログラムを用いて見出され得る。好ましくは、本明細書に開示されるタンパク質バリエーションのアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち、同様に荷電したまたは非荷電のアミノ酸の置換である。保存的アミノ酸変化は、それらの側鎖に関連するアミノ酸のファミリーのうちの1つの置換を伴う。天然に存在するアミノ酸は、一般に、4つのファミリー：酸性（アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩）、塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、および非荷電極性（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン）アミノ酸に分類される。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、しばしば、芳香族アミノ酸として一緒に分類される。ペプチドまたはタンパク質において、アミノ酸の好適な保存的置換は、当業者に知られており、一般に、得られる分子の生物学的活性を変更することなく行われ得る。当業者は、全般に、ポリペプチドの非必須領域における単一アミノ酸置換が、生物学的活性を実質的に変更しないことを認識する（例えば、Watson et al. Mo

l e c u l a r B i o l o g y o f t h e G e n e , 4 t h E d i t i o n , 1
9 8 7 , T h e B e n j a m i n / C u m m i n g s P u b . C o . , p . 2 2 4 を 参
照されたい)。

【0331】

一実施形態において、2つ以上のポリペプチドの発現が所望される場合、それらをコードするポリヌクレオチド配列を、本明細書の他の箇所で開示されているIRES配列によって分離することができる。

【0332】

特定の実施形態で企図されるポリペプチドは、融合ポリペプチドを含む。特定の実施形態において、融合ポリペプチドおよび融合ポリヌクレオチドをコードするポリペプチドが、提供される。融合ポリペプチドおよび融合タンパク質は、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のポリペプチドセグメントを有するポリペプチドを指す。

【0333】

別の実施形態において、2つ以上のポリペプチドは、本明細書の他の箇所で開示される、1つ以上の自己切断型ポリペプチド配列を含む融合タンパク質として発現され得る。

【0334】

融合ポリペプチドは、シグナルペプチド、細胞透過性ペプチドドメイン(CPP)、DNA結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン等、エピトープタグ(例えば、マルトース結合タンパク質(「MBP」)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、HIS6、MYC、FLAG、V5、VSV-G、およびHA)、ポリペプチドリンカー、およびポリペプチド切断シグナルを含むが、これらに限定されない、1つ以上のポリペプチドドメインまたはセグメント含むことができる。融合ポリペプチドは、C末端からC末端、N末端からN末端、またはN末端からC末端に連結することも可能であるが、それらは、典型的に、C末端からN末端に連結される。特定の実施形態において、融合タンパク質のポリペプチドは、任意の順番であり得る。融合ポリペプチドまたは融合タンパク質はまた、融合ポリペプチドの所望の活性が保存されている限りは、保守的に修飾されたバリエーション、多型バリエーション、対立遺伝子、変異体、部分配列、および種間ホモログも含むことができる。融合ポリペプチドは、化学的な合成方法によって、または2つの部分間の化学結合によって産生することができるか、または一般に、他の標準の技法を使用して調製することもできる。融合ポリペプチドを含むライゲーションされたDNA配列は、本明細書の他の箇所で開示されるように、好適な転写または翻訳制御要素に作動可能に連結されている。

【0335】

融合ポリペプチドは、任意選択で、1つ以上のポリペプチドまたはポリペプチド内のドメインを連結させるために使用することができるリンカーを含む。ペプチドリンカー配列は、ポリペプチドドメインがそれらの所望の機能を発揮することができるように、各ポリペプチドがその適切な二次および三次構造に折り畳むのを確保するのに十分な距離により、任意の2つ以上のポリペプチド構成要素を分離するために使用され得る。かかるペプチドリンカー配列は、当該技術分野で標準的な技術を使用して融合ポリペプチドに組み込まれる。適切なペプチドリンカー配列は、(1)可撓性拡張立体構造を採用する能力、(2)第1のおよび第2のポリペプチド上の機能性エピトープと相互作用し得る二次構造を採用できない能力、ならびに(3)ポリペプチドの機能性エピトープと反応し得る疎水性または荷電残基の欠如、の要素に基づいて選択され得る。好ましいペプチドリンカー配列は、Gly、Asn、およびSer残基を含む。ThrおよびAlaなどの他の近い中性アミノ酸はまた、リンカー配列において使用され得る。リンカーとして有用に使用され得るアミノ酸配列は、Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985、Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986、米国特許第4,935,233号および米国特許第4,751,180号に開示されるものを含む。リンカー配列は、特定の融合ポリペプチドセグメントが、機能的ドメインを分離し、立体干渉を防ぐために使用され得る非必須N末端ア

10

20

30

40

50

ミノ酸領域を含むとき、必要とされない。好ましいリンカーは、典型的に、組換え融合タンパク質の一部として合成される可撓性アミノ酸部分配列である。リンカーポリペプチドは、1～200アミノ酸長、1～100アミノ酸長、または1～50アミノ酸長であり得、その間の全ての整数値を含む。

【0336】

代表的なポリペプチド切断シグナルには、プロテアーゼ切断部位、ヌクレアーゼ切断部位（例えば、希な制限酵素認識部位、自己切断型リボザイム認識部位）、および自己切断型ウイルスオリゴペプチドなどのポリペプチド切断認識部位が含まれる（de Felipe and Ryan, 2004. Traffic, 5 (8); 616-26を参照されたい）。

【0337】

好適なプロテアーゼ切断部位および自己切断型ペプチドは、当業者に既知である（例えば、Ryan et al., 1997 J. Gener. Virol. 78, 699-722、Scymczak et al. (2004) Nature Biotech. 5, 589-594を参照されたい）。代表的なプロテアーゼ切断部位としては、ポチウイルスNIaプロテアーゼ（例えば、タバコetchウイルスプロテアーゼ）、ポチウイルスHCプロテアーゼ、ポチウイルスP1（P35）プロテアーゼ、ピオウイルス（biovirus）NIaプロテアーゼ、ピオウイルスRNA-2コードプロテアーゼ、アフトウイルスLプロテアーゼ、エンテロウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス2Aプロテアーゼ、ピコルナ3Cプロテアーゼ、コモウイルス24Kプロテアーゼ、ネポウイルス24Kプロテアーゼ、RTSV（イネツングロスフェリカルウイルス）3C様プロテアーゼ、PYVF（パースニップ黄斑ウイルス）3C様プロテアーゼ、ヘパリン、トロンビン、第Xa因子、およびエンテロキナーゼの切断部位が挙げられるが、これらに限定されない。その高い切断厳密性により、TEV（タバコetchウイルス）プロテアーゼ切断部位は、一実施形態において、例えば、EXXYXQ（G/S）（配列番号47）、例えば、ENLYFQG（配列番号48）およびENLYFQS（配列番号49）（式中、Xは、任意のアミノ酸を表す）（TEVによる切断は、QとGまたはQとSとの間に生じる）が好ましい。

【0338】

ある特定の実施形態において、自己切断型ポリペプチド部位は、2Aまたは2A様部位、配列またはドメインを含む（Donnelly et al., 2001. J. Gen. Virol. 82: 1027-1041）。特定の実施形態において、ウイルス2Aペプチドは、アフトウイルス2Aペプチド、ポチウイルス2Aペプチド、またはカルジオウイルス2Aペプチドである。

【0339】

一実施形態において、ウイルス2Aペプチドは、口蹄疫ウイルス（FMDV）（F2A）ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス（ERAV）（E2A）ペプチド、ゾーシーアシグナウイルス（TaV）（T2A）ペプチド、ブタテッシュウウイルス-1（PTV-1）（P2A）ペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群から選択される。

【0340】

2A部位の例示的な例を表2に提供する。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2

配列番号 50	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
配列番号 51	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
配列番号 52	LLKQAGDVEENPGP
配列番号 53	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
配列番号 54	EGRGSLLTCGDVEENPGP
配列番号 55	LLTCGDVEENPGP
配列番号 56	GSGQCTNYALLKLAGDVESNP GP
配列番号 57	QCTNYALLKLAGDVESNP GP
配列番号 58	LLKLAGDVESNP GP
配列番号 59	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNP GP
配列番号 60	VKQTLNFDLLKLAGDVESNP GP
配列番号 61	LLKLAGDVESNP GP
配列番号 62	LLNFDLLKLAGDVESNP GP
配列番号 63	TLNFDLLKLAGDVESNP GP
配列番号 64	LLKLAGDVESNP GP
配列番号 65	NFDLLKLAGDVESNP GP
配列番号 66	QLLNFDLLKLAGDVESNP GP
配列番号 67	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNP GP
配列番号 68	VTELLYRMKRAETCYCP RPL LAIHPTEARHK QKIVAPVKQT
配列番号 69	LNFDLLKLAGDVESNP GP
配列番号 70	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKL AGDVESNP GP
配列番号 71	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESN PGP

10

20

30

【0341】

好ましい実施形態において、ポリペプチドは、CTBRシグナルコンバーターポリペプチドを含む。

【0342】

F. ポリヌクレオチド

特定の実施形態において、TGFβシグナルコンバーターポリペプチド、CTBR、遺伝子操作されたTCR、CAR、DARIC、ゼータカイン、上記のポリペプチドおよびそれらの断片を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。本明細書で使用されるとき、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、およびDNA/RNAハイブリッドを指す。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖、および組換え、合成、または単離のいずれかであり得る。ポリヌクレオチドとしては、プレメッセンジャーRNA（プレ-mRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、RNA、短干渉RNA（siRNA）、短ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、ゲノムRNA（gRNA）、プラス鎖RNA（RNA（+））、マイナス鎖RNA（RNA（-））、tracrRNA、crRNA、単一ガイドRNA（sgRNA）、合成RNA、合成mRNA、ゲノムDNA（gDNA）、PCR増幅DNA、相補的DNA（cDNA）、合成DNA、または組換えDNAが挙げられるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドは、リ

40

50

ポヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドのいずれか、またはヌクレオチドのいずれかの種類の修飾形態である、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも1000、少なくとも5000、少なくとも10000、または少なくとも15000またはそれ以上のヌクレオチド長、ならびに全ての中間の長さのヌクレオチドの多量体形態を指す。この文脈において、「中間の長さ」は、6、7、8、9などの、101、102、103などの、151、152、153などの、201、202、203などの引用された値の間の任意の長さを意味することは容易に理解されよう。特定の
10
実施形態において、ポリヌクレオチドまたはバリエーションは、参照配列に対して少なくともまたは約50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

【0343】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドはコドン最適化され得る。本明細書で使用されるとき、「コドン最適化された」という用語は、ポリペプチドの発現、安定および／または活性を増加させるために、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでコドンを置換することを指す。コドン最適化に影響を与える因子として、(i) 2つ以上の生物または遺伝子または合成的に構成されたバイアス表との間コドンバイアスの変動、(ii) 生物、遺伝子、または遺伝子群内のコドンバイアスの程度における変動、(iii) コン
20
テキストを含むコドンの系統的分岐、(iv) それらの解読tRNAによるコドンの変動、(v) 全体的、またはトリプレットの1つの位置のいずれかのGC%によるコドンの変動、(vi) 参照配列、例えば天然に存在する配列、に対する類似度の変動、(vii) コドン頻度中断の変動、(viii) DNA配列由来の転写されたmRNAの構造特性、(ix) コドン置換群の設計の基になるDNA配列の機能についての事前知識、(x) 各アミノ酸のコドン群の系統的分岐、および／または(xi) 偽性翻訳開始部位の単離された除去、のうち1つ以上を含むが、これらに限定されるものではない。

【0344】

本明細書で使用するとき、「ヌクレオチド」という用語は、リン酸化糖とのN-グリコシド結合における複素環式窒素塩基を指す。ヌクレオチドは、天然塩基および多種多様の当技術分野において認識される修飾塩基を含むことが理解される。そのような塩基は、一般に、ヌクレオチド糖部分の1'位に位置する。ヌクレオチドは、一般に、塩基、糖、およびリン酸基を含む。リボ核酸(RNA)では、糖は、リボースであり、また、デオキシリボ核酸(DNA)では、糖は、デオキシリボース、すなわち、リボース中に存在するヒドロキシル基を欠く糖である。例示的な天然窒素塩基は、プリン、アデノシン(A)、およびグアニジン(G)、ならびにピリミジン、シチジン(C)、およびチミジン(T) (またはRNAの場合、ウラシル(U))を含む。デオキシリボースのC-1原子は、ピリミジンのN-1またはプリン
30
のN-9に結合する。ヌクレオチドは、通常、一、二、または三リン酸エステルである。ヌクレオチドは、糖、リン酸、および／または塩基成分で未修飾または修飾することができる(ヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド誘導体、修飾ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、および非標準ヌクレオチドとも同じ意味で呼ばれる。たとえばWO92/07065およびWO93/15187を参照されたい)。修飾核酸塩基の例は、Limbachら(1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183-2196)によって要約される。

【0345】

ヌクレオチドはまた、糖のC-5に結合したヒドロキシル基に生じたエステル化により、ヌクレオシドのリン酸エステルと見なされてもよい。本明細書で使用するとき、「ヌクレオシド」という用語は、糖とのN-グリコシド結合における複素環式窒素塩基を指す。ヌクレオシドは、当該技術分野において天然塩基を含むこと、および公知の修飾塩基を含
40
50

むことが認識される。そのような塩基は、一般に、ヌクレオシド糖部分の1'位に位置する。ヌクレオシドは、一般に、塩基および糖類を含む。ヌクレオシドは、糖、および／または塩基成分で未修飾または修飾することができる（ヌクレオシドアナログ、ヌクレオシド誘導体、修飾ヌクレオシド、非天然ヌクレオシド、または非標準ヌクレオチドとも同じ意味で呼ばれる）。上記にもあるとおり、修飾核酸塩基の例は、Limbachら（1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183-2196）によって要約される。

【0346】

ポリヌクレオチドの例示的な例としては、配列番号1～71をコードするポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0347】

種々の例示的な実施形態において、本明細書で企図されるポリヌクレオチドとしては、TGFβシグナルコンバーター、CTBRシグナルコンバーター、遺伝子操作された抗原受容体、融合ポリペプチド、および発現ベクター、ウイルスペクターをコードするポリヌクレオチド、ならびに本明細書で企図されるポリヌクレオチドを含む転移プラスミドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0348】

本明細書で使用されるとき、「ポリヌクレオチドバリエーション」および「バリエーション」などの用語は、以下に定義される厳密な条件下で、参照配列でハイブリダイズする参照ポリヌクレオチド配列またはポリヌクレオチドで実質的な配列同一性を示すポリヌクレオチドを指す。これらの用語はまた、少なくとも1つのヌクレオチドの付加、欠失、置換、または修飾によって参照ポリヌクレオチドと区別されるポリヌクレオチドも包含する。したがって、「ポリヌクレオチドバリエーション」および「バリエーション」という用語には、1つ以上のヌクレオチドが、付加または欠失され、または修飾される、または異なるヌクレオチドで置き換えられるポリヌクレオチドが含まれる。これに関して、変異、付加、欠失、および置換を含む、ある特定の変更が、参照ポリヌクレオチドに行われ得、それによって、変更されたポリヌクレオチドが、参照ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性を保持することが当該技術分野で十分に理解される。

【0349】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、厳密な条件下で、標的核酸配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。「厳密な条件」下でハイブリダイズすることは、互いに少なくとも60%と同一するヌクレオチド配列がハイブリダイズのままである、ハイブリダイゼーションプロトコルを説明する。一般に、厳密な条件は、定義されたイオン強度およびpHで特異的な配列に対して熱融解点（Tm）よりも約5℃低くなるように選択される。Tmは、標的配列に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度（定義されたイオン強度、pH、および核酸濃度下）である。標的配列が、一般に過剰に存在するため、Tmでは、プローブの50%が、平衡状態で占有されている。

【0350】

本明細書で使用される、「配列同一性」または、例えば、「配列50%同一性」という記述は、比較ウィンドウ上のヌクレオチドベースまたはアミノ酸ベースで同一である程度を指す。故に、「配列同一性の割合」は、比較ウィンドウ上の2つの最適に整列させた配列を比較し、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、およびMet）が両方の配列中に生じる位置の数を決定し、一致した位置の数を得、その一致した位置の数を比較ウィンドウ（すなわち、ウィンドウサイズ）中の位置の総数で割り、その結果に100を乗じることによって計算し、配列同一性の割合を得ることができる。本明細書に記載の任意の参照配列に対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、

10

20

30

40

50

75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、86%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するヌクレオチドおよびポリペプチドを含み、典型的には、ポリペプチドバリエーションが、参照ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を維持する。

【0351】

2つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の配列関係を説明するために使用される用語には、「参照配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一性の割合」、および「実質的な同一性」が含まれる。「参照配列」は、ヌクレオチドおよびアミノ酸残基を含めて、長さが少なくとも12個、しばしば、15~18個、多くの場合、少なくとも25個のモノマー単位である。2つのポリヌクレオチドは、それぞれ、(1) 2つのポリヌクレオチド間で類似性がある配列（すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部のみ）、および(2) 2つのポリヌクレオチド間で多様性がある配列を含み得るため、2つ（またはそれ以上）のポリヌクレオチド間の配列比較は、典型的には、配列類似性の局所領域を特定および比較するために、「比較ウィンドウ」上の2つのポリヌクレオチドを比較することによって行われる。「比較ウィンドウ」は、2つの配列を最適に整列させた後に、配列が同数の連続した位置の参照配列と比較される少なくとも6個の連続した位置、一般的には約50~約100個、より一般的には約100~約150個の概念セグメントを指す。比較ウィンドウは、2つの配列の最適なアライメントのために、（付加または欠失を含まない）参照配列と比較して約20%以下の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。比較ウィンドウを整列させるための配列の最適なアライメントは、アルゴリズム（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0、Genetics Computer Group、575 Science Drive (Madison, WI, USA) のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）のコンピュータ実装によって、または検査および選択された様々な方法のいずれかによって生成された最良のアライメント（すなわち、比較ウィンドウ上で最も高い割合の相同性を生じること）によって行うことができる。例えば、Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389によって開示されるようなプログラムのBLASTファミリーも参照することができる。配列分析の詳細な考察は、Unit 19.3 of Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994-1998, Chapter 15に見出すことができる。

【0352】

本明細書で使用されるとき、「単離されたポリヌクレオチド」は、自然発生状態でその両側に位置する配列から精製されたポリヌクレオチド、例えば、ある断片に通常は隣接している配列から取り出されたそのDNA断片を指す。「単離されたポリヌクレオチド」はまた、自然界には存在せず、人為的に作製された、相補的DNA (cDNA)、組換えDNA、または他のポリヌクレオチドも指す。

【0353】

種々の実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書で企図されるポリペプチドをコードするmRNAを含む。ある特定の実施形態において、mRNAは、キャップ、1つ以上のヌクレオチド、およびポリ(A)テイルを含む。

【0354】

ポリヌクレオチドの方向を説明する用語としては、5'（通常は、遊離リン酸基を有するポリヌクレオチド末端）および3'（通常は、遊離ヒドロキシル(OH)基を有するポリヌクレオチド末端）が挙げられる。ポリヌクレオチド配列は、5'から3'の方向または3'から5'の方向で注記され得る。DNAおよびmRNAについて、5'から3'の鎖は、「センス」、「プラス」、または「コード」鎖と呼ばれ、これは、その配列が、[DNAのチミン(T)の代わりにRNAのウラシル(U)を除いて] プレメッセンジャー (プレmRN

10

20

30

40

50

A) の配列と同一であるからである。DNA および mRNA については、RNA ポリメラーゼによって転写される鎖である相補的な 3' から 5' の鎖は、「鋳型」、「アンチセンス」、「マイナス」、または「非コード」鎖と呼ばれる。本明細書で使用されるとき、「逆方向」という用語は、3' から 5' の方向で書かれた 5' から 3' の配列または 5' から 3' の方向で書かれた 3' から 5' の配列を指す。

【0355】

「相補的」および「相補性」という用語は、塩基対合則によって関連するポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）を指す。例えば、DNA 配列 5' A G T C A T G 3' の相補的鎖は、3' T C A G T A C 5' である。後者の配列は、左に 5' 末端および右に 3' 末端を有する逆相補鎖、5' C A T G A C T 3' とし 10 て書かれることが多い。その逆相補鎖に等しい配列は、回文配列と言われる。相補性は、核酸の塩基のいくつかのみが塩基対合則に従ってマッチしている、「部分的」であり得る。または、核酸の間に「完璧な」または「完全な」相補性が存在し得る。

【0356】

さらに、本明細書に記載されるように、遺伝子コードの縮重の結果として、ポリペプチドまたはそのバリエーションの断片をコードする多くのヌクレオチド配列があることは、当業者によって理解されるであろう。これらのポリヌクレオチドのいくつかは、いかなる天然遺伝子のヌクレオチド配列に対しても最小の相同性を有する。それにもかかわらず、コドン使用における相違により変動するポリヌクレオチド、例えば、ヒトおよび／または霊長類コドン選択に最適化されるポリヌクレオチドは、特定の実施形態で具体的に企図される。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、発現および／または安定に関してコドン最適化されている。さらに、本明細書で提供されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子を使用してもよい。対立遺伝子は、ヌクレオチドの欠失、付加、および／または置換などの 1 つ以上の変異の結果として変更される内在性遺伝子である。

20

【0357】

本明細書で使用される、「核酸カセット」または「発現カセット」という用語は、RNA を発現し、その後ポリペプチドを発現することができる、ベクター内の遺伝子配列を指す。一実施形態において、核酸カセットは、目的となる遺伝子（複数可）、例えば、目的となるポリヌクレオチド（複数可）を含む。別の実施形態において、核酸カセットは、1 つ以上の発現対照配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリ(A)配列、および目的となる遺伝子（複数可）、例えば、目的となるポリヌクレオチド（複数可）を含む。ベクターは、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 またはそれ以上の核酸カセットを含み得る。核酸カセットは、カセット内の核酸が RNA に転写され、必要であればタンパク質またはポリペプチドに翻訳され、形質転換された細胞における活性のために必要な適切な翻訳後修飾を受け、かつ、適切な細胞内区画への標的化または細胞外区画への分泌によって生物学的活性のために適した区画に転座され得るような位置および配列でベクター内に方向付けられる。好ましくは、カセットは、ベクターへの即座の挿入に適合させたその 3' および 5' 末端を有し、例えば、カセットは、各末端に制限エンドヌクレアーゼ部位を有する。好ましい実施形態において、核酸カセットは、遺伝的障害を治療、予防、または改善するために使用される治療遺伝子の配列を含有する。カセットを除去し、単一ユニットとしてプラスミドまたはウイルスベクターに挿入することができる。

30

40

【0358】

ポリヌクレオチドは、目的となるポリヌクレオチド（複数可）を含む。本明細書で使用されるとき、「目的となるポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で企図される、阻害性ポリヌクレオチドの転写のためのテンプレートとして機能するポリペプチドまたは融合ポリペプチドまたはポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

【0359】

コード配列それ自体の長さに関わらず、本明細書で企図されるポリヌクレオチドは、本明細書の他の箇所で開示または当該技術分野で既知の、プロモーターおよび／またはエンハンサー、非翻訳領域(UTR)、シグナル配列、Kozak 配列、ポリアデニル化シグ

50

ナル、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位、内部リボソーム侵入部位（IRES）、リコンビナーゼ認識部位（例えば、LoxP、FRT、およびAtt部位）、終止コドン、転写終結シグナル、および自己切断型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、エピトープタグなどの、他のDNA配列と組み合わせられ、それにより、それらの全体的な長さが大幅に変動し得る。したがって、調製の容易さおよび意図される組換えDNAプロトコルの使用によって全長が好ましくは制限されている状態で、ほとんどいかなる長さのポリヌクレオチド断片も使用できることが企図される。

【0360】

ポリヌクレオチドは、当該技術分野で既知であり、入手可能な様々な十分に確立された技術のいずれかを使用して、調製、操作、発現、および／または送達され得る。所望のポリペプチドを発現するために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、適切なベクターに挿入され得る。

10

【0361】

ベクターの例示的な例としては、プラスミド、自律的に複製する配列、および置き換え可能な要素、例えば、Sleeping Beauty、PiggyBacが挙げられるが、これらに限定されない。

【0362】

ベクターの追加の例示的な例としては、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、またはP1由来の人工染色体（PAC）等の人工染色体、ラムダファージまたはM13ファージ等のバクテリオファージ、および動物ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0363】

ベクターとして有用なウイルスの例示的な例としては、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、およびパポバウイルス（例えば、SV40）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0364】

発現ベクターの例示的な例としては、哺乳動物細胞における発現のためのpCNeoベクター（Promega）、哺乳動物細胞におけるレンチウイルス媒介遺伝子導入および発現のためのpLenti4/V5-DEST（商標）、pLenti6/V5-DEST（商標）、およびpLenti6.2/V5-GW/lacZ（Invitrogen）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本明細書に開示されるポリペプチドのコード配列は、哺乳動物細胞におけるポリペプチドの発現のためのかかる発現ベクターにライゲーションされ得る。

30

【0365】

特定の実施形態において、ベクターは、エピソームベクター、または染色体外に維持されるベクターである。本明細書で使用されるとき、「エピソーム」という用語は、宿主の染色体DNA内に組み込むことなしに、および宿主細胞の分裂により徐々に失われることなく複製することができるベクターを指し、前記ベクターは染色体外またはエピソームで複製することも意味する。

40

【0366】

発現ベクター中に存在する「発現制御配列」、「制御要素」、または「調節配列」は、転写および翻訳を実行するために宿主細胞タンパク質と相互作用する、複製のベクター起点のそれらの非翻訳領域、選択カセット、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル（Shine Dalgarno配列またはKozak配列）イントロン、ポリアデニル化配列、5'および3'非翻訳領域である。かかる要素は、それらの強度および特異性が異なり得る。利用されるベクター系および宿主に応じて、遍在性プロモーターおよび誘導性プロモーターを含む、任意の数の好適な転写および翻訳要素を使用することができる。

【0367】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、発現ベクターおよびウイルスベクター

50

を含むが、これらに限定されないベクターを含む。ベクターは、プロモーターおよび／またはエンハンサーなどの1つ以上の外因性、内在性、または異種制御配列を含む。「内在性制御配列」は、ゲノムにおいて所与の遺伝子と自然に連結するものである。「外因性制御配列」は、その遺伝子の転写が連結されたエンハンサー／プロモーターにより指向されるように、遺伝子操作の手段（すなわち、分子生物学的技法）により遺伝子と並立に配置されるものである。「異種制御配列」は、遺伝子操作された細胞とは異なる種からの外因性配列である。「合成」制御配列は、もう1つの内在性および／または外因性配列、ならびに／またはインビトロもしくはインシリコで特定の療法のための最適なプロモーターおよび／またはエンハンサー活性を提供することが決定された配列の要素を含んでもよい。

【0368】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、RNAポリメラーゼが結合するポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）の認識部位を指す。RNAポリメラーゼは、プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを開始および転写する。特定の実施形態において、哺乳動物細胞において作動されるプロモーターは、転写が開始される部位からおよそ25～30塩基上流に位置するATリッチな領域を含み、および／または転写の開始から70～80塩基上流に見出される別の配列は、CNCAAT領域であり、式中、Nは、任意のヌクレオチドであってよい。

【0369】

「エンハンサー」という用語は、転写の増強をもたらすことができる配列を含有し、いくつかの場合には別の制御配列に対するその方向とは独立して機能することができるDNAのセグメントを指す。エンハンサーは、プロモーターおよび／または他のエンハンサー要素と協同的または相加的に機能することができる。「プロモーター／エンハンサー」という用語は、プロモーター機能およびエンハンサー機能の両方をもたらすことができる配列を含有するDNAのセグメントを指す。

【0370】

「作動可能に連結した」という用語は、記載されている構成要素が、それらの意図された様式で機能することを可能にする関係にある並置を指す。一実施形態において、この用語は、核酸発現制御配列（プロモーター、および／またはエンハンサーなど）と第2のポリヌクレオチド配列、例えば、目的となるポリヌクレオチドとの間の機能的連結であって、発現制御配列により、第2の配列に対応する核酸の転写が指向される機能的連結を指す。

【0371】

本明細書で使用时、「構成的発現制御配列」という用語は、作動可能に連結した配列の転写を継続的または連続的に可能にするプロモーター、エンハンサー、またはプロモーター／エンハンサーを指す。構成的発現制御配列は、多種多様な細胞および組織型における発現を可能にする「遍在」プロモーター、エンハンサー、またはプロモーター／エンハンサーであってもよく、制限された様々な細胞および組織型をそれぞれ可能にする、「細胞特異的」、「細胞型特異的」、「細胞系列特異的」、または「組織特異的」プロモーター、エンハンサー、またはプロモーター／エンハンサーであってもよい。

【0372】

特定の実施形態での使用に好適な例示的な遍在発現制御配列としては、サイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーター、ウイルスシリアンウイルス40（SV40）（例えば、初期または後期）、Moloneyマウス白血病ウイルス（MoMLV）LTRプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTR、単純ヘルペスウイルス（HSV）（チミジンキナーゼ）プロモーター、ワクシニアウイルスからのH5、P7.5、およびP11プロモーター、伸長因子1-アルファ（EF1a）プロモーター、初期増殖応答1（EGR1）、フェリチンH（FerH）、フェリチンL（FerL）、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）、真核生物翻訳開始因子4A1（EIF4A1）、熱ショック70kDaタンパク質5（HSPA5）、熱ショックタンパク質90kDaベータ、メンバー1（HSP90B1）、熱ショックタンパク質70kDa（HSP70）、β-キネシン（β-KIN）、ヒトROSA26遺伝子座（Irisons et

10

20

30

40

50

al., Nature Biotechnology 25, 1477-1482 (2007))、ユビキチンCプロモーター (UBC)、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1 (PGK) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリβ-アクチン (CAG) プロモーター、β-アクチンプロモーターおよび骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域の欠失した、dl587revプライマー結合部位が置換された (MND) プロモーター (Challita et al., J Virol. 69 (2): 748-55 (1995)) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0373】

一実施形態において、ベクターはMNDプロモーターを含む。

【0374】

一実施形態において、ベクターは、ヒトEF1a遺伝子の第1のイントロンを含むEF1aプロモーターを含む。

【0375】

一実施形態において、ベクターは、ヒトEF1a遺伝子の第1のイントロンを欠くEF1aプロモーターを含む。

【0376】

特定の実施形態において、所望のポリヌクレオチド配列の細胞型特異的、細胞系列特異的、または組織特異的な発現を達成するために (例えば、ポリペプチドをコードする特定の核酸を細胞型、細胞系列、または組織のサブセットにおいてのみ、または特定の発生段階に発現させるために) 細胞、細胞型、細胞系列、または組織特異的発現制御配列を使用することが望ましい場合がある。

【0377】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド、T細胞特異的プロモーターを発現するのに望ましい場合がある。

【0378】

本明細書で使用される、「条件発現」は、誘導性発現、抑圧可能な発現、特定の生理学的、生物学的、または疾患の状態を有する細胞または組織における発現などが挙げられるが、これらに限定されない、任意の種類の条件発現を指し得る。この定義は、細胞型または組織特異的発現を除外することを意図しない。ある特定の実施形態は、例えば、細胞、組織、生物体などを、ポリヌクレオチドの発現を引き起こす処理もしくは条件、または目的となるポリヌクレオチドによってコードされるポリヌクレオチドの発現の増大または減少を引き起こす処理または条件に供することによって発現が制御される、目的となるポリヌクレオチドの条件発現を提供する。

【0379】

誘導性プロモーター/系の例示的な例としては、ステロイド誘導性プロモーター、例えば、グルココルチコイドまたはエストロゲン受容体をコードする遺伝子のプロモーターなど (対応するホルモンで処理することによって誘導される)、メタロチオネイン (metallothionein) プロモーター (種々の重金属で処理することによって誘導される)、MX-1プロモーター (インターフェロンによって誘導される)、「遺伝子スイッチ」ミフェプリストン調節可能系 (Sirin et al., 2003, Gene, 323: 67)、クメート (cumate) 誘導性遺伝子スイッチ (WO2002/088346)、テトラサイクリン依存性調節系などが挙げられるが、これらに限定されない。誘発剤には、グルココルチコイド、エストロゲン、ミフェプリストン (RU486)、金属類、インターフェロン、小分子、cumate、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、およびそれらのバリエーションが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0380】

条件発現はまた、部位特異的DNAリコンビナーゼを使用することによって達成することもできる。ある特定の実施形態によれば、ベクターは、部位特異的リコンビナーゼによって媒介される組換えのための少なくとも1つの (典型的に、2つの) 部位 (複数可) を含む。本明細書で使用されるとき、「リコンビナーゼ」または「部位特異的リコンビナー

10

20

30

40

50

ぜ」という用語は、野生型タンパク質であってよい、1つ以上の組換え部位（例えば、2、3、4、5、7、10、12、15、20、30、50等）が関与する組換え反応に関与する切除的または統合的なタンパク質、酵素、補因子または関連するタンパク質（Landy, Current Opinion in Biotechnology 3:699-707 (1993) を参照のこと）、または変異体、誘導体（例えば、組換えタンパク質配列またはその断片を含む融合タンパク質）、それらの断片、および変異体を含む。特定の実施形態での使用に好適なリコンビナーゼの例示的な例としては、Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、ΦC31、Cin、Tn3リゾルバーゼ、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCCE1、およびParAが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0381】

ポリヌクレオチドは、多種多様な部位特異的リコンビナーゼのいずれかのための1つ以上の組換え部位を含んでもよい。部位特異的リコンビナーゼの標的部位が、ベクター、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターの組込みのために必要な任意の部位（複数可）に加えたものであることが理解されるべきである。本明細書で使用されるとき、「組換え配列」、「組換え部位」、または「部位特異的組換え部位」という用語は、リコンビナーゼが認識し、結合する特定の核酸配列を指す。

【0382】

例えば、Creリコンビナーゼのための1つの組換え部位は、8塩基対コア配列と隣接した2つの13塩基対の逆方向反復（リコンビナーゼ結合部位としての機能を果たす）を含む34塩基対の配列であるloxPである（Sauer, B., Current Opinion in Biotechnology 5:521-527 (1994) の図1を参照されたい）。他の代表的なloxP部位としては、lox511（Hoess et al., 1996、Bethke and Sauer, 1997）、lox5171（Lee and Saito, 1998）、lox2272（Lee and Saito, 1998）、m2（Langer et al., 2002）、lox71（Albert et al., 1995）、およびlox66（Albert et al., 1995）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0383】

FLPリコンビナーゼに好適な認識部位としては、FRT（McLeod, et al., 1996）、F₁、F₂、F₃（Schlake and Bode, 1994）、F₄、F₅（Schlake and Bode, 1994）、FRT（LE）（Senecoff et al., 1988）、FRT（RE）（Senecoff et al., 1988）が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0384】

認識配列の他の例は、attB、attP、attL、およびattR配列であり、これらは、リコンビナーゼ酵素λインテグラーゼ、例えば、phi-c31によって認識される。ΦC31 SSRは、ヘテロタイプの部位attB（長さ34bp）とattP（長さ39bp）との間の組換えのみを媒介する（Groth et al., 2000）。attBおよびattPは、それぞれ、細菌ゲノムおよびファージゲノムに対するファージインテグラーゼの付着部位に対して名づけられ、どちらも、ΦC31ホモ二量体が結合する可能性がある不完全な逆方向反復を含有する（Groth et al., 2000）。産物の部位であるattLおよびattRは、さらなるΦC31媒介性組換えに対して有効に不活性であり（Belteki et al., 2003）、それにより反応が不可逆になる。挿入を触媒するために、ゲノムのattP部位へのattBを有するDNAの挿入が、ゲノムのattB部位へのattP部位の挿入よりも容易であることが見出されている（Thyagarajan et al., 2001、Belteki et al., 2003）。故に、典型的な戦略では、相同組換えによってattPを有する「ドッキング部位」を定義済みの遺伝子座に位置付け、次いでそれを挿入のために、attBを有する入ってくる配列とパートナーにする。

40

50

【0385】

本明細書で使用される、「内部リボソーム侵入部位」または「IRES」は、ATGなどの開始コドンへのシストロン（タンパク質をコードする領域）の直接内部リボソーム侵入を促進し、それにより、キャップに依存しない遺伝子の翻訳を導く要素を指す。例えば、Jackson et al., 1990. Trends Biochem Sci 15 (12): 477-83) および Jackson and Kaminski. 1995. RNA 1 (10): 985-1000 を参照されたい。当業者によって一般に用いられるIRESの例は、米国特許第6,692,736号に記載されるものを含む。当該技術分野で既知の「IRES」のさらなる例としては、ピコルナウイルスから得られるIRES (Jackson et al., 1990) およびウイルスまたは細胞mRNA源から得られるIRES、例えば、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (BiP)、血管内皮増殖因子 (VEGF) (Huez et al. 1998. Mol. Cell. Biol. 18 (11): 6178-6190)、線維芽細胞増殖因子2 (FGF-2)、およびインスリン様増殖因子 (IGFII)、翻訳開始因子eIF4G、ならびに酵母転写因子TFIIDおよびHAP4、Novagenから市販されている脳心筋炎ウイルス (EMCV) (Duke et al., 1992. J. Virol 66 (3): 1602-9) およびVEGF IRES (Huez et al., 1998. Mol Cell Biol 18 (11): 6178-90) が挙げられるが、これらに限定されない。IRESはまた、Picornaviridae、Dicistroviridae、およびFlaviviridae種のウイルスゲノム、およびHCV、Friendマウス白血病ウイルス (FrMLV) およびMoloneyマウス白血病ウイルス (MoMLV) において報告されている。

10

20

【0386】

一実施形態において、本明細書で企図されるポリヌクレオチドに使用されるIRESは、EMCV IRESである。

【0387】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、コンセンサスKozak配列を有し、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。本明細書で使用されるとき、「Kozak配列」という用語は、リボソームの小さなサブユニットに対するmRNAの初期結合を大幅に促進し、翻訳を増加させる、短ヌクレオチド配列を指す。コンセンサスKozak配列は、(GCC)RCCATGG (配列番号72) であり、式中、Rは、プリン (AまたはG) である (Kozak, 1986. Cell. 44 (2): 283-92、およびKozak, 1987. Nucleic Acids Res. 15 (20): 8125-48)。

30

【0388】

異種核酸転写物の効率的な終止およびポリアデニル化を指向する要素は、異種遺伝子の発現を増加させる。転写終止シグナルは、一般に、ポリアデニル化シグナルの下流に見出される。特定の実施形態において、ベクターは、発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのポリアデニル化配列3'を含む。本明細書で使用される、「ポリA部位」または「ポリA配列」という用語は、RNAポリメラーゼIIによる新生RNA転写産物の終結およびポリアデニル化の両方を導くDNA配列を指す。ポリアデニル化配列は、コード配列の3'末端へのポリAテイルの添加によりmRNAの安定性を促進し、それ故に、転写効率の増加に寄与することができる。切断およびポリアデニル化は、RNAのポリ (A) 配列によって誘導される。哺乳動物プレ-mRNAのコアなポリ (A) 配列は、切断-ポリアデニル化部位に隣接する2つの認識要素を有する。典型的には、ほぼ不変のAAUAAA六量体は、20~50ヌクレオチド上流のUまたはGU残基に富むより可変の要素に位置する。新生転写産物の切断はこれら2つの要素間で生じ、5'切断産物への最大250個のアデノシンの付加に関連する。特定の実施形態では、コアなポリ (A) 配列は、理想的なポリA配列 (例えば、AATAAA、ATTAAA、AGTAAA) である。特定の実施形態において、ポリ (A) 配列は、SV40ポリA配列、ウシ成長ホルモンポリ

40

50

A配列 (B G H p A)、ウサギβ-グロビンポリA配列 (r β g p A)、または当該技術分野で既知の別の好適な異種または内在性ポリA配列である。

【0389】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドまたは細胞は、直接毒性および／または制御されていない増殖のリスクを低減させるために、誘導性自殺遺伝子を含む、自殺遺伝子を用いる。特定の実施形態において、自殺遺伝子は、ポリヌクレオチドまたは細胞を含む宿主に対して免疫原性ではない。使用され得る自殺遺伝子のある特定の例は、カスパーゼ-9またはカスパーゼ-8またはシトシンデアミナーゼである。カスパーゼ-9は、二量化の特定の活性化された化学誘導物質 (C I D) を使用して活性化され得る。

10

【0390】

ある特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、インビボでネガティブ選択の影響を受けやすい、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞を生じる遺伝子セグメントを含む。

「ネガティブ選択」は、個体のインビボでの状態の変化の結果として除去され得る注入された細胞を指す。陰性の選択可能な表現型は、投与された薬剤、例えば、化合物に対する感受性を付与する遺伝子の挿入から生じ得る。ネガティブ選択可能な遺伝子は、当該技術分野で既知であり、とりわけ、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 (H S V - I T K) 遺伝子 (W i g l e r e t a l . , C e l l 1 1 : 2 2 3 , 1 9 7 7)、細胞ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (H P R T) 遺伝子、細胞アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (A P R T) 遺伝子、および細菌シトシンデアミナーゼ (M u l l e n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A . 8 9 : 3 3 (1 9 9 2)) を含む。

20

【0391】

いくつかの実施形態において、T細胞などの遺伝子修飾された免疫エフェクター細胞は、インビトロでネガティブ選択可能な表現型の細胞の選択を可能にするポジティブマーカーをさらに含むポリヌクレオチドを含む。ポジティブ選択可能なマーカーは、宿主細胞内に導入されたとき、その遺伝子を有する細胞のポジティブ選択を可能にする優性表現型を発現する遺伝子であってもよい。この型の遺伝子は当該技術分野で既知であり、とりわけ、ハイグロマイシンBに対する耐性を与える、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p h)、抗生物質G 4 1 8に対する耐性をコードするT n 5由来のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (n e oまたはa p h)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R) 遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子 (A D A)、および多剤耐性 (M D R) 遺伝子が挙げられる。

30

【0392】

一実施形態において、ポジティブ選択可能なマーカーおよびネガティブ選択可能な要素は、ネガティブ選択可能な要素の消失がまた必ず、ポジティブ選択可能なマーカーの消失を伴うように連結される。特定の実施形態において、ポジティブおよびネガティブ選択可能なマーカーは、一方の消失が、義務的に、他方の消失をもたらすように、融合される。発現産物として、上述の所望のポジティブ選択特徴およびネガティブ選択特徴の両方を与えるポリペプチドを生じる融合ポリヌクレオチドの例は、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ・チミジンキナーゼ融合遺伝子 (H y T K) である。この遺伝子の発現は、インビトロでのポジティブ選択のためのハイグロマイシンB耐性、およびインビボでのネガティブ選択のためのガンシクロビル感受性を与えるポリペプチドを生じる。優性ポジティブ選択可能なマーカーをネガティブ選択可能なマーカーと融合することに由来する二機能性選択可能な融合遺伝子の使用について記載する、S . D . L u p t o nによるP C T U S 9 1 / 0 8 4 4 2およびP C T / U S 9 4 / 0 5 6 0 1の刊行物も参照されたい。

40

【0393】

好ましいポジティブ選択可能なマーカーは、h p h、n c o、およびg p tからなる群から選択される遺伝子に由来し、好ましいネガティブ選択可能なマーカーは、シトシンデアミナーゼ、H S V - I T K、V Z V T K、H P R T、A P R Tおよびg p tからなる

50

群から選択される遺伝子に由来する。特定の実施形態で企図される代表的な二機能性選択可能な融合遺伝子としては、ポジティブ選択可能なマーカーが、h p hまたはn e oに由来し、ネガティブ選択可能なマーカーが、シトシンデアミナーゼまたはT K遺伝子または選択可能なマーカーに由来する遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0394】

特定の実施形態において、1つ以上のポリペプチド、または融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、非ウイルス方法およびウイルス方法の両方によって、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞内に導入され得る。特定の実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、同じ方法によってもしくは異なる方法によって、および／または同じベクターもしくは異なるベクターによって提供されてよい。

10

【0395】

「ベクター」という用語は、別の核酸分子を移入または輸送することができる核酸分子を指すように本明細書で使用される。移入された核酸は、一般に、ベクター核酸分子に連結され、例えば、それに挿入される。ベクターは、細胞中に自律複製を指向する配列を含んでもよいが、または宿主細胞DNAへの組込みを可能にするのに十分な配列を含んでもよい。特定の実施形態において、非ウイルスベクターは、本明細書で企図される1つ以上のポリヌクレオチドをT細胞に送達するために使用される。

【0396】

非ウイルスベクターの例示的な例としては、プラスミド（例えば、DNAプラスミドまたはRNAプラスミド）、トランスポゾン、コスミド、および細菌人工染色体が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0397】

特定の実施形態で企図されるポリヌクレオチドの非ウイルス送達の例示的な方法としては、電気穿孔、ソノポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ウィロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ナノ粒子、ポリカチオンまたは脂質：核酸共役体、裸のDNA、人工ビリオン、DEAE-デキストラン媒介移入、遺伝子銃、および熱ショックが挙げられるが、これらに限定されない。

【0398】

特定の実施形態で企図される特定の実施形態での使用に好適なポリヌクレオチド送達系の例示的な例としては、Amaxa Biosystems, Maxcyte, Inc.、BTX Molecular Delivery Systems、およびCopernicus Therapeutics Incによって提供されるものが挙げられるが、これらに限定されない。リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、Transfectedam（商標）およびLipofectin（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適なカチオン性および中性脂質は、文献に記載されている。例えば、Liu et al. (2003) Gene Therapy. 10:180-187、およびBalazs et al. (2011) Journal of Drug Delivery. 2011:1-12を参照されたい。抗体標的のバクテリア由来の非生存のナノ細胞系送達もまた、特定の実施形態で企図される。

30

【0399】

特定の実施形態で企図されるポリヌクレオチドを含むウイルスベクターは、以下に記載されるように、個々の患者への投与によって、典型的に、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または頭蓋内注入）または局所適用によって、インビボで送達され得る。代替として、ベクターは、個々の患者から外植された細胞（例えば、動員された末梢血、リンパ球、骨髓穿刺液、組織生検）などの細胞にエクスピボで、または万能ドナー造血幹細胞に送達し、続いて、患者に細胞を再移植することができる。

40

【0400】

一実施形態において、ヌクレアーゼバリエントおよび／またはドナー修復テンプレートを含むウイルスベクターは、インビボで細胞の形質導入のために生物に直接投与される。代替として、裸のDNAを投与することができる。投与は、注射、注入、局所適用、およ

50

び電気穿孔が挙げられるが、これらに限定されない、血液または組織細胞との最終接触に分子を導入するために通常用いられる任意の経路による。かかる核酸を投与する好適な方法は、利用可能でかつ当業者に周知であり、1つを超える経路を用いて特定の組成物を投与することができるが、特定の経路は、別の経路よりもさらに即時的かつさらに有効な反応を提供し得る場合が多い。

【0401】

特定の実施形態で企図される特定の実施形態での使用に好適なウイルスベクター系の例示的な例としては、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、およびワクシニアウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0402】

種々の実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、1つ以上のポリヌクレオチドを含む組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）で細胞を形質導入することによって、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に導入される。

【0403】

AAVは、小さな（約26 nm）複製欠損、主に、エピソーム性の非エンベロープウイルスである。AAVは、分裂細胞および非分裂細胞の両方を感染させることができ、そのゲノムを宿主細胞のゲノムに組み込み得る。組換えAAV（rAAV）は、典型的に、最低限で、導入遺伝子およびその調節配列、ならびに5'および3' AAV逆方向末端反復（ITR）からなる。ITR配列は、長さが約145 bpである。特定の実施形態において、rAAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、またはAAV10から単離される、ITRおよびカプシド配列を含む。

【0404】

いくつかの実施形態において、キメラrAAVが使用され、ITR配列は、1つのAAV血清型から単離され、カプシド配列は、異なるAAV血清型から単離される。例えば、AAV2に由来するITR配列およびAAV6に由来するカプシド配列を有するrAAVは、AAV2/AAV6と称される。特定の実施形態において、rAAVベクターは、AAV2からのITR、およびAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、またはAAV10のうちの任意の1つからのカプシドタンパク質を含み得る。好ましい実施形態において、rAAVは、AAV2に由来するITR配列およびAAV6に由来するカプシド配列を含む。好ましい実施形態において、rAAVは、AAV2に由来するITR配列およびAAV2に由来するカプシド配列を含む。

【0405】

いくつかの実施形態において、遺伝子操作されたおよび選択方法を、AAVカプシドに適用して、それらを目的となる細胞を伝達する

【0406】

rAAVベクターの構築、産生、およびその精製は、例えば、米国特許第9,169,494号、同第9,169,492号、同第9,012,224号、同第8,889,641号、同第8,809,058号、および同第8,784,799号に開示されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0407】

種々の実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、1つ以上のポリヌクレオチドを含むレトロウイルス、例えばレンチウイルスで細胞を形質導入することによって、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に導入される。

【0408】

本明細書で使用されるとき、「レトロウイルス」という用語は、そのゲノムRNAを直鎖二本鎖DNAコピーに逆転写し、その後、そのゲノムDNAを宿主ゲノムに共有結合するRNAウイルスを指す。特定の実施形態での使用に好適な例示的なレトロウイルスとし

10

20

30

40

50

ては、M o l l o n e yマウス白血病ウイルス (M - M u L V)、M o l l o n e yマウス肉腫ウイルス (M o M S V)、H a r v e yマウス肉腫ウイルス (H a M u S V)、マウス乳腺腫瘍ウイルス (M u M T V)、テナガザル白血病ウイルス (G a L V)、ネコ白血病ウイルス (F L V)、スプマウイルス、F r i e n dマウス白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス (M S C V) およびラウス肉腫ウイルス (R S V)) およびレンチウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0409】

本明細書で使用されるとき、「レンチウイルス」という用語は、複合レトロウイルスの群 (または族) を指す。例示的なレンチウイルスとしては、H I V (ヒト免疫不全ウイルス、H I V 1 型およびH I V 2 型を含む)、ビスナーマエディウイルス (V M V) ウイルス、ヤギ関節炎-脳炎ウイルス (C A E V)、ウマ感染性貧血ウイルス (E I A V)、ネコ免疫不全ウイルス (F I V)、ウシ免疫不全ウイルス (B I V)、およびサル免疫不全ウイルス (S I V) が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、H I V ベースのベクター骨格 (すなわち、H I V シス作用配列要素) が、好ましい。

【0410】

種々の実施形態において、本明細書で企図されるレンチウイルスベクターは、本明細書の他の箇所で論じられるように、1 つ以上のL T R、およびアクセサリ要素: c P P T / F L A P、プシー (Ψ) パッケージングシグナル、輸出要素、ポリ (A) 配列のうちの1 つ以上または全てを含み、任意選択で、W P R E またはH P R E、絶縁体要素、選択可能なマーカー、および細胞自殺遺伝子を含み得る。

【0411】

特定の実施形態において、本明細書で企図されるレンチウイルスベクターは、組込みまたは非組込みまたは組込み欠損レンチウイルスであり得る。本明細書で使用されるとき、「組込み欠損レンチウイルス」または「I D L V」という用語は、ウイルスゲノムを宿主細胞のゲノムに組み込む能力を欠いているインテグラーゼを有するレンチウイルスを指す。組込み-インコンピテントウイルスベクターは、特許出願W O 2 0 0 6 / 0 1 0 8 3 4 に記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0412】

インテグラーゼ活性を低下させるのに適したH I V - 1 p o l 遺伝子における例示的な変異としては、H 1 2 N、H 1 2 C、H 1 6 C、H 1 6 V、S 8 1 R、D 4 1 A、K 4 2 A、H 5 1 A、Q 5 3 C、D 5 5 V、D 6 4 E、D 6 4 V、E 6 9 A、K 7 1 A、E 8 5 A、E 8 7 A、D 1 1 6 N、D 1 1 6 1、D 1 1 6 A、N 1 2 0 G、N 1 2 0 1、N 1 2 0 E、E 1 5 2 G、E 1 5 2 A、D 3 5 E、K 1 5 6 E、K 1 5 6 A、E 1 5 7 A、K 1 5 9 E、K 1 5 9 A、K 1 6 0 A、R 1 6 6 A、D 1 6 7 A、E 1 7 0 A、H 1 7 1 A、K 1 7 3 A、K 1 8 6 Q、K 1 8 6 T、K 1 8 8 T、E 1 9 8 A、R 1 9 9 c、R 1 9 9 T、R 1 9 9 A、D 2 0 2 A、K 2 1 1 A、Q 2 1 4 L、Q 2 1 6 L、Q 2 2 1 L、W 2 3 5 F、W 2 3 5 E、K 2 3 6 S、K 2 3 6 A、K 2 4 6 A、G 2 4 7 W、D 2 5 3 A、R 2 6 2 A、R 2 6 3 A、およびK 2 6 4 Hが挙げられるが、これらに限定されない。

【0413】

「長い末端反復 (L T R)」という用語は、それらの天然の配列の状況では、直接反復であり、U 3、R およびU 5 領域を含有する、レトロウイルスD N A の末端に位置する塩基対のドメインを指す。

【0414】

本明細書で使用されるとき、「F L A P 要素」または「c P P T / F L A P」という用語は、配列が、レトロウイルス、例えば、H I V - 1 またはH I V - 2 の中央ポリプリン区域および中央終止配列 (c P P T およびC T S) を含む核酸を指す。好適なF L A P 要素は、米国特許第6, 6 8 2, 9 0 7 号およびZ e n n o u, e t a l., 2 0 0 0, C e l l, 1 0 1: 1 7 3 に記載されている。

【0415】

本明細書で使用されるとき、「パッケージングシグナル」または「パッケージング配列

10

20

30

40

50

」という用語は、ウイルスカプシドまたは粒子へのウイルスRNAの挿入に必要とされるレトロウイルスゲノム内に位置するプシー〔Ψ〕配列を指す。例えば、Clever et al., 1995. J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109を参照されたい。

【0416】

「輸送要素」という用語は、核から細胞の細胞質へのRNA転写物の輸送を調節するシス作用性転写後調節要素を指す。RNA輸送要素の例としては、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）rev応答要素（RRE）（例えば、Cullen et al., 1991. J. Virol. 65:1053、およびCullen et al., 1991. Cell 58:423を参照）、およびB型肝炎ウイルス転写後調節調節要素（HPRE）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0417】

特定の実施形態において、ウイルスベクターにおける異種配列の発現は、転写後調節要素、効率的なポリアデニル化部位、および任意選択で、転写終止シグナルをベクターに組み込むことによって増大する。様々な転写後調節要素は、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素（WPRE; Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73:2886）、B型肝炎ウイルスに存在する転写後調節要素（HPRE）（Huang et al., Mol. Cell. Biol., 5:3864）、および同様のもの（Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766）タンパク質における異種核酸の発現が増大し得る。

20

【0418】

レンチウイルスベクターは、好ましくは、LTRの改変の結果としていくつかの安全性の増強を含有する。「自己不活性化」（SIN）ベクターは、複製欠損性ベクター、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを指し、例えば、1回目のウイルス複製を越えてウイルスが転写されることを防ぐために、U3領域として既知の右側の（3'）LTRエンハンサープロモーター領域が修飾されている（例えば、欠失または置換によって）。自己不活性化は、ベクターDNA、すなわちベクターRNAを産生するために用いられるDNAの3'LTRのU3領域における欠失の導入を通じて達成されることが好ましい。したがって、逆転写反応の間、この欠失をプロウイルスDNAの5'LTRに移した。特定の実施形態において、LTRの転写活性を全部大いに減少または消失させるように十分なU3配列を排除し、それによって形質導入された細胞において、全長ベクターRNAの産生を大いに減少または消失させることが望ましい。HIV系レンチベクターの場合、このようなベクターは、ベクター力価の大幅な減少なくLTR TATAボックスの除去（例えば、-418から-18の欠失）などの重要なU3欠失を許容することがわかっている。

30

【0419】

追加の安全性の増強は、ウイルス粒子の産生時にウイルスゲノムの転写を駆動させるために、5'LTRのU3領域を異種プロモーターで置き換えることによって提供される。使用することができる異種プロモーターの例は、例えば、ウイルスサルウイルス40（SV40）（例えば、早期または後期）、サイトメガロウイルス（CMV）（例えば、最初期）、Moloneyマウス白血病ウイルス（MoMLV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、および単純ヘルペスウイルス（HSV）（チミジンキナーゼ）プロモーター。

40

【0420】

本明細書で使用される、「シュードタイプ」または「シュードタイピング」という用語は、ウイルスエンベロープタンパク質が、好ましい特性を保有する別のウイルスのウイルスエンベロープタンパク質で置換されたウイルスを指す。例えば、HIVは、水疱性口内炎ウイルスG-タンパク質（VSV-G）エンベロープタンパク質を用いてシュードタイピングすることができ、これにより、HIVエンベロープタンパク質（env遺伝子によってコードされる）は通常ウイルスをCD4⁺提示細胞に標的化されるため、HIVがより広い範囲の細胞に感染することが可能になる。

50

【0421】

ある特定の実施形態において、レンチウイルスベクターは、既知の方法に従って產生される。例えば、Kutner et al., BMC Biotechnol. 2009; 9:10. doi:10.1186/1472-6750-9-10; Kutner et al. Nat. Protoc. 2009; 4(4):495-505. doi:10.1038/nprot.2009.22を参照されたい。

【0422】

本明細書で企図されるある特定の実施形態によれば、ウイルスベクター骨格配列のほとんどまたは全てが、レンチウイルス、例えば、HIV-1に由来する。しかしながら、レトロウイルスおよび／またはレンチウイルス配列の多くの異なる源を用いることができるか、またはある特定のレンチウイルス配列の組み合わせられたおよび多数の置換および変更を、移入ベクターの本明細書に記載の機能を行う能力を損なうことなく適応させることができることが理解されるべきである。さらに、様々なレンチウイルスベクターが、当該技術分野で既知であり、Naldini et al., (1996a、1996b、および1998)、Zufferey et al., (1997)、Dull et al., 1998、米国特許第6,013,516号および同第5,994,136号を参照されたく、これらの多くは、本明細書で企図されるウイルスベクターまたは転移プラスミドを生成するために適合され得る。

【0423】

種々の実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、1つ以上のポリヌクレオチドを含むアデノウイルスで細胞を形質導入することによって、免疫エフェクター細胞に導入される。

【0424】

アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型において極めて高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要しない。かかるベクターを用いて、高力価かつ高レベルの発現が得られている。このベクターは、比較的単純なシステムにおいて大量に生成することができる。ほとんどのアデノウイルスベクターが、導入遺伝子がAd E1a、E1b、および／またはE3遺伝子を置き換えるように遺伝子操作され、その後、複製欠損ベクターは、欠失した遺伝子機能をトランスで供給するヒト293細胞において増幅する。Adベクターは、肝臓、腎臓、および筋肉に見出されるもの等の非分裂の分化細胞を含む複数の種類の組織をインビボで形質導入することができる。従来のAdベクターは、高い輸送能力を有する。

【0425】

複製欠損である現行のアデノウイルスベクターの作製および増殖は、Ad5 DNA断片によってヒト胎児腎臓細胞から形質転換されて、E1タンパク質を構造的に発現する293と呼ばれる特有のヘルパー細胞株を利用し得る(Graham et al., 1977)。E3領域は、アデノウイルスゲノムから可欠であるため(Jones & Shenk, 1978)、現行のアデノウイルスベクターは293細胞を利用して、E1、D3または両方の領域に外来DNAを運搬する(Graham & Prevec, 1991)。アデノウイルスベクターは、真核性遺伝子発現(Levrero et al., 1991、Gomez-Foix et al., 1992)およびワクチン開発(Grunhaus & Horwitz, 1992、Graham & Prevec, 1992)に使用されている。組換えアデノウイルスを異なる組織に投与した研究には、気管点滴(Rosenfeld et al., 1991、Rosenfeld et al., 1992)、筋肉注射(Ragot et al., 1993)、末梢静脈内注入(Herz & Gerard, 1993)、および脳内への定位接種(Le Gal La Salle et al., 1993)が含まれる。臨床試験におけるAdベクターの使用の例は、筋肉内注射での抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド療法を含んだ(Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998))。

【0426】

種々の実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、1つ以上のポリヌクレオチドを含む単純ヘルペスウイルス、例えば、HSV-1、HSV-2で形質導入することによって、免疫エフェクター細胞に導入される。

【0427】

成熟HSVビリオンは、152 kbである直鎖二本鎖DNA分子からなるウイルスゲノムを含むエンベロープで覆われた二十面体カプシドからなる。一実施形態において、HSVベースのウイルスベクターは、1つ以上の必須または非必須HSV遺伝子において欠損している。一実施形態において、HSVベースのウイルスベクターは、複製欠損である。ほとんどの複製欠損HSVベクターは、複製を防止するために1つ以上の最初期、早期、または後期HSV遺伝子を除去するための欠失を含む。例えば、HSVベクターは、ICP4、ICP22、ICP27、ICP47、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される前初期遺伝子において欠損され得る。HSVベクターの利点は、長期間のDNA発現をもたらすことができる潜伏期に入る能力、および最大25 kbの外因性DNAを収容することができるその大きなウイルスDNAゲノムである。HSV系のベクターは、例えば、米国特許第5,837,532号、同第5,846,782号、および同第5,804,413号、ならびに国際特許出願第WO91/02788号、同第WO96/04394号、同第WO98/15637号、および同第WO99/06583号に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0428】

G. 遺伝子修飾された細胞

種々の実施形態において、がんの治療にて使用するために、本明細書で企図される、TGFβシグナルコンバーターポリペプチド、CTBR、遺伝子操作されたTCR、CAR、DARIC、ゼータカイン、および融合タンパク質を発現するように、細胞は、修飾される。細胞は、本明細書で企図されるポリペプチドを発現するように非遺伝子修飾であってもよく、特に好ましい実施形態において、細胞は、本明細書で企図されるポリペプチドを発現するように遺伝子修飾であってもよい。本明細書で使用されるとき、「遺伝子操作された」または「遺伝子修飾された」という用語は、DNAまたはRNAの形態での外部遺伝物質の、細胞内の総遺伝物質への付加を指す。「遺伝子修飾された細胞」、「修飾された細胞」、および「リダイレクトされた細胞」という用語は、特定の実施形態で同じ意味で用いられる。

【0429】

特定の実施形態において、TGFβによって媒介されたTME中の免疫抑制シグナルに対する細胞の抵抗性を向上させるために、本明細書で企図されるCTBRシグナルコンバーターポリペプチドを、免疫エフェクター細胞内に導入および発現する。特定の実施形態において、CTBRシグナルコンバーターポリペプチドは、細胞内で遺伝子操作された抗原受容体を同時発現するおかげで標的細胞にリダイレクトされた免疫エフェクター細胞内で導入および発現された。

【0430】

「免疫エフェクター細胞」は、1つ以上のエフェクター機能（例えば、細胞傷害性細胞殺傷活性、サイトカインの分泌、ADCCおよび／またはCDCの誘導）を有する免疫系の任意の細胞である。本明細書で企図される例示的な免疫エフェクター細胞は、Tリンパ球、特に細胞傷害性T細胞（CTL、すなわちCD8+T細胞）、TIL、およびヘルパーT細胞（HTL、すなわちCD4+T細胞）である。一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞を含む。一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラーT（NKT）細胞を含む。免疫エフェクター細胞は、自己移植／自家（「自己」）または非自己移植（「非自己」、例えば、同種、同系、または異種）であり得る。

【0431】

本明細書で使用される、「自己移植」は、同じ対象からの細胞を指す。本明細書で使用される、「自家」は、相対的に遺伝的に細胞とは異なる同じ種の細胞を指す。本明細書で

10

20

30

40

50

使用される、「同系」は、相対的に遺伝的に細胞と同一である異なる対照の細胞を指す。本明細書で使用される、「異種」は、相対的に細胞に異なる種の細胞を指す。好ましい実施形態において、細胞は、自己移植である。

【0432】

本明細書で企図されるCTBRシグナルコンバーターポリペプチドを導入するのに適している、例示的な免疫エフェクター細胞は、Tリンパ球を含む。「T細胞」または「Tリンパ球」という用語は、当該技術分野で認識されており、胸腺細胞、未成熟Tリンパ球、成熟Tリンパ球、休止Tリンパ球、または活性化Tリンパ球を含むことを意図する。T細胞は、Tヘルパー（Th）細胞、例えばTヘルパー1（Th1）またはTヘルパー2（Th2）細胞であり得る。T細胞は、ヘルパーT細胞（HTL、すなわちCD4⁺T細胞）CD4⁺T細胞、細胞傷害性T細胞（CTL、すなわちCD8⁺T細胞）、CD4⁺CD8⁺T細胞、CD4⁻CD8⁻T細胞、またはT細胞の任意の他のサブセットであり得る。特定の実施形態において使用するのに好適なT細胞の他の例示的な集団には、ナイーブT細胞およびメモリーT細胞が含まれる。

10

【0433】

当業者により理解されるとおり、他の細胞はさらに、本明細書で企図されるCTBRシグナルコンバーターポリペプチドを有する免疫エフェクター細胞としても使用することができる。特に、免疫エフェクター細胞はまた、NK細胞、NKT細胞、好中球、およびマクロファージを含む。免疫エフェクター細胞はまた、エフェクター細胞の前駆体を含み、このような前駆細胞を誘導して、インビボまたはインビトロで免疫エフェクター細胞に分化できる。したがって、特定の実施形態において、対象に投与すると成熟免疫エフェクター細胞に分化するか、またはインビトロで誘導されて成熟免疫エフェクター細胞に分化する、臍帯血、骨髄、または動員末梢血由来の細胞のCD34⁺集団内に含有された造血幹細胞（HSC）などの免疫エフェクター細胞の前駆体を、免疫エフェクター細胞は含む。

20

【0434】

本明細書で使用される場合、特異的なキメラ受容体を含有するよう遺伝子操作された免疫エフェクター細胞は、「抗原特異的リダイレクト免疫エフェクター細胞」と呼ばれ得る。

【0435】

本発明で使用する時、「CD34⁺細胞」という用語は、その細胞表面上にCD34タンパク質を発現する細胞を指す。本発明で使用される「CD34」は、多くの場合細胞間接着因子として作用し、リンパ節へのT細胞進入に関与する、細胞表面糖タンパク質（例えば、シアロムチンタンパク質）を指す。CD34⁺細胞集団は、造血幹細胞（HSC）を含有し、それは患者に投与すると分化し、T細胞、NK細胞、NKT細胞、好中球、および単球／マクロファージの細胞系譜を含む、すべての造血系譜に寄与する。

30

【0436】

本明細書で企図されるTGFβシグナルコンバーターポリペプチドを発現する免疫エフェクター細胞を作製するための方法が、特定の実施形態において提供される。一実施形態において、方法は、本明細書で企図されるように、免疫エフェクター細胞が1つ以上のTGFβシグナルコンバーターポリペプチドを発現するように、個体から単離された免疫エフェクター細胞をトランスフェクトまたは形質導入することを含む。一実施形態において、方法は、免疫エフェクター細胞が、本明細書で企図される、1つ以上のTGFβシグナルコンバーターポリペプチドおよび遺伝子操作された抗原受容体を発現するように、個体から単離された免疫エフェクター細胞をトランスフェクトまたは形質導入することを含む。ある特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、個体から単離され、インビトロでのさらなる操作を伴わずに遺伝子修飾される。次いで、このような細胞を個体に直接的再投与し得る。さらなる実施形態において、免疫エフェクター細胞を、遺伝子修飾される前に、まず活性化および刺激して、インビトロで増殖させる。これに関して、免疫エフェクター細胞は、遺伝子修飾される前および／またはその後培養されてもよい。

40

【0437】

特定の実施形態において、本明細書に記載の免疫エフェクター細胞のインビトロ操作ま

50

たは遺伝子修飾より前に、細胞の供給源を対象から得た。特定の実施形態において、修飾免疫エフェクター細胞は、T細胞を含む。

【0438】

T細胞は、末梢血単核球、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺問題 (issue)、感染部位由来組織、復水、胸水、脾臓組織、および腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない、多くの源から得ることができる。ある特定の実施形態において、T細胞は、沈降、例えば、FICOLL (商標) 分離などの当業者に既知の任意の数の技法を使用して、対象から収集した血液単位から得ることができる。

【0439】

他の実施形態において、T細胞の単離または精製された集団が、使用される。いくつかの実施形態において、PBMCを単離した後、細胞傷害性およびヘルパーTリンパ球の両方を、活性化、増殖、および／または遺伝子改変の前またはその後に、ナイーブ、メモリー、およびエフェクターT細胞サブ集団に選別することができる。

10

【0440】

一実施形態において、T細胞の単離または精製された集団は、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない、マーカーのうちの1つ以上を発現する。

【0441】

ある特定の実施形態において、T細胞は、個体から単離され、修飾されてTGFβシグナルコンバーターポリペプチドを発現する前に、まず活性化および刺激して、インビトロで増殖させる。

20

【0442】

T細胞組成物の十分な治療量を達成するために、T細胞は、しばしば、刺激、活性化、および／または増殖の1つ以上のラウンドに供される。T細胞は、一般に、例えば、米国特許第6,352,694号、同第6,534,055号、同第6,905,680号、同第6,692,964号、同第5,858,358号、同第6,887,466号、同第6,905,681号、同第7,144,575号、同第7,067,318号、同第7,172,869号、同第7,232,566号、同第7,175,843号、同第5,883,223号、同第6,905,874号、同第6,797,514号、および同第6,867,041号（これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される、方法を使用して、活性化し、増殖させ得る。特定の実施形態において、TGFβシグナルコンバーターポリペプチドをコードするベクターまたはポリヌクレオチドを導入する前に、T細胞を、約6時間、約12時間、約18時間、または約24時間活性化し、増殖させる。任意選択的に、本明細書で企図される遺伝子操作された抗原受容体と組み合わせる。

30

【0443】

一実施形態において、組成物を修飾すると同時に、T細胞が活性化される。

【0444】

種々の実施形態において、免疫エフェクター細胞を生成する方法は、T細胞を含む細胞集団を活性化し、T細胞の集団を増殖することを含む。T細胞活性化は、T細胞TCR/CD3複合体を通して一次刺激シグナルをもたらすことによって、およびアクセサリ分子、例えば、CD28を通して二次共刺激シグナルをもたらすことによって達成され得る。

40

【0445】

TCR/CD3複合体は、T細胞を、好適なCD3結合剤、例えば、CD3リガンドまたは抗CD3モノクローナル抗体と接触させることによって刺激され得る。CD3抗体の例示的な例としては、OKT3、G19-4、BC3、および64.1が挙げられるが、これらに限定されない。

【0446】

TCR/CD3複合体を介して提供される一次刺激シグナルに加えて、T細胞応答の誘発は、二次共刺激シグナルを必要とする。特定の実施形態において、CD28結合剤は、

50

共刺激シグナルを提供するために使用され得る。C D 2 8 結合剤の例示的な例としては、天然のC D 2 8 リガンド、例えば、C D 2 8 の天然リガンド（例えば、B 7 - 1（C D 8 0）およびB 7 - 2（C D 8 6）などのタンパク質のB 7 ファミリーのメンバー；C D 2 8 分子を架橋することができる抗C D 2 8 モノクローナル抗体またはその断片、例えば、モノクローナル抗体 9 . 3、B - T 3、X R - C D 2 8、K O L T - 2、1 5 E 8、2 4 8 . 2 3 . 2、およびE X 5 . 3 D 1 0 が挙げられるが、これらに限定されない。

【0447】

一実施形態において、一次刺激シグナルを提供する分子、例えば、T C R / C D 3 複合体を通して刺激を提供する分子、および共刺激分子は、同じ表面に結合される。

【0448】

ある特定の実施形態において、刺激および共刺激シグナルを提供する結合剤は、細胞の表面上に局在化される。これは、細胞表面上でのその発現に好適な形態で、結合剤をコードする核酸を細胞にトランスフェクトまたは形質導入することにより、または代替として、結合剤を細胞表面に結合することにより達成され得る。

【0449】

別の実施形態において、一次刺激シグナルを提供する分子、例えば、T C R / C D 3 複合体を通して刺激を提供する分子、および共刺激分子は、抗原提示細胞上に表示される。

【0450】

一実施形態において、一次刺激シグナルを提供する分子、例えば、T C R / C D 3 複合体を通して刺激を提供する分子、および共刺激分子が、別個の表面上に提供される。

【0451】

ある特定の実施形態において、刺激および共刺激シグナルを提供する結合剤のうちの1つは、可溶性（溶液中で提供される）であり、他の薬剤（複数可）が、1つ以上の表面上に提供される。

【0452】

特定の実施形態において、刺激および共刺激シグナルを提供する結合剤は、両方とも可溶形態で提供される（溶液中で提供される）。

【0453】

種々の実施形態において、本明細書で企図されるT細胞を作製するための方法は、抗C D 3 および抗C D 2 8 抗体でT細胞を活性化することを含む。

【0454】

一実施形態において、本明細書で企図される方法によって活性化されたT細胞の増幅は、数時間（約3時間）～約7日～約28日間、またはそれらの間の任意の時間単位の整数値の間、T細胞を含む細胞集団を培養することをさらに含む。別の実施形態において、T細胞組成物は、14日間培養され得る。特定の実施形態において、T細胞は、約21日間培養され得る。別の実施形態において、T細胞組成物は、約2～3日間培養される。T細胞の培養時間が60日以上であり得るように、数サイクルの刺激／活性化／増殖が望ましい場合もある。

【0455】

特定の実施形態において、T細胞培養に適切な条件は、適切な培地（例えば、最小必須培地、またはRPMI Media 1640、もしくはX-vivo15、（Lonza））、ならびに血清（例えば、ウシ胎仔またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、IL-21、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 、およびTNF- α 、または当業者に既知の細胞の成長に好適な任意の他の添加剤を含むが、これらに限定されない、増殖および生存能に必要な1つ以上の因子を含む。

【0456】

細胞培養培地のさらに例示的な例としては、RPMI1640、Clicks、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo15、およびX-Vivo20、Optimizerが挙げられるが、これらに限定されるものではなく、これに

10

20

30

40

50

アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンが添加され、無血清、または適切な量の血清（もしくは血漿）もしくは定義されたホルモニー式、ならびに／またはT細胞の成長および増殖に十分な量のサイトカイン（複数可）を補充されるかのいずれかである。

【0457】

抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験培地にのみ含まれ、対象に注入される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、成長を支持するのに必要な条件下、例えば、適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5%CO₂）下で維持される。

【0458】

特定の実施形態において、PBMCまたは単離されたT細胞は、IL-2、IL-7、および／またはIL-15などの適切なサイトカインを含む培養培地において、一般にビーズまたは他の表面に結合される抗CD3および抗CD28抗体などの刺激剤および共刺激剤と接触させられる。

10

【0459】

他の実施形態において、様々な共刺激分子およびサイトカインの安定した発現および分泌を指向するために、K562、U937、721.221、T2、およびC1R細胞を遺伝子操作することによって人工APC（aAPC）。特定の実施形態において、K32またはU32 aAPCは、APC細胞表面上に1つ以上の抗体ベースの刺激分子の表示を指向するために使用される。T細胞集団は、CD137L（4-1BBL）、CD134L（OX40L）、および／またはCD80もしくはCD86が挙げられるが、これらに限定されない、様々な共刺激分子を発現するaAPCによって増幅され得る。最後に、aAPCは、遺伝子修飾されたT細胞を増殖し、CD8T細胞上のCD28の発現を維持するために、効率的なプラットフォームを提供する。aAPCは、WO03/057171およびUS2003/0147869で提供され、参考としてその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0460】

特定の実施形態において、TGFβシグナルコンバーターおよび遺伝子操作された抗原受容体をコードするポリヌクレオチドは、T細胞集団内に導入される。特定の実施形態において、TGFβシグナルコンバーターをコードするポリヌクレオチドは、遺伝子操作された抗原受容体を発現するT細胞集団内に導入される。ポリヌクレオチドは、マイクロインジェクション、トランスフェクション、リポフェクション、熱ショック、エレクトロポレーション、形質導入、遺伝子銃、マイクロインジェクション、DEAEデキストラン媒介移入などによってT細胞内に導入することができる。

30

【0461】

好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは、ウイルス形質導入によってT細胞内に導入される。

【0462】

ポリヌクレオチドを免疫エフェクター細胞またはCD34⁺細胞に導入するのに好適なウイルスベクター系の例示的な例としては、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、遺伝子導入のためのワクシニアウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0463】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、AAV形質導入によってT細胞内に導入される。

【0464】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、レトロウイルス形質導入によってT細胞内に導入される。

【0465】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、レンチウイルス形質導入によってT細胞内に導入される。

50

【0466】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、アデノウイルス形質導入によってT細胞内に導入される。

【0467】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、単純ヘルペスウイルス形質導入によってT細胞内に導入される。

【0468】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、ワクシニアウイルス形質導入によってT細胞内に導入される。

【0469】

H. 組成物および製剤

本明細書で企図される組成物は、1つ以上のポリペプチド、ポリヌクレオチド、それを含むベクター、および遺伝子修飾された免疫エフェクター細胞を含むことができる。組成物としては、薬学的組成物が挙げられるが、これに限定されない。「薬学的組成物」は、単独でまたは療法の1つ以上の他のモダリティと組み合わせて、細胞または動物への投与のために、薬学的に許容されるまたは生理学的に許容される溶液中に製剤化される組成物を指す。必要に応じて、組成物が、例えば、サイトカイン、成長因子、ホルモン、小分子、化学療法薬、プロドラッグ、薬物、抗体、または他の種々の薬学的に活性な薬剤などの他の薬剤と組み合わせて投与することができることも理解されよう。組成物に含めることができる他の構成成分に対する限定は、追加の薬剤が、組成物の意図された療法を送達する能力に悪影響を及ぼさないのであれば、実質的に存在しない。

【0470】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内において、過度の毒性、炎症、アレルギー反応、または妥当な利益／リスク比に釣り合った他の問題もしくは合併症などを伴うことなく、ヒトおよび動物の組織との接触での使用に好適である、これらに組成物、材料、組成物、および／または剤形を指すように本明細書で使用される。

【0471】

「薬学的に許容される担体」という用語は、希釈剤、補助剤、賦形剤、または、ビヒクルを指し、それらと共に、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、それを含むベクター、または遺伝子修飾された免疫エフェクター細胞を投与する。薬学的担体の例示的な例は、細胞培養培地、水および油（石油、動物、植物または合成起源の油を含む、例えば、ピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等）のような滅菌液体であり得る。食塩溶液、ならびに水性デキストロースおよびグリセロール溶液はまた、特に注射溶液用の液体担体として用いることができる。特定の実施形態で好適な薬学的賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセリン、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等を含む。従来の任意の媒体および薬剤が活性成分と不適合である場合を除いて、治療組成物中でのその使用を企図している。補助的な活性成分もまた、組成物中に組み込むことができる。

【0472】

一実施形態において、薬学的に許容される担体を含む組成物は、対象に投与するのに適している。特定の実施形態において、担体を含む組成物は、非経口投与、例えば、血管内（静脈内または動脈内）、腹腔内または筋肉内投与、に適している。特定の実施形態において、薬学的に許容される担体を含む組成物は、脳室内、脊髄内、または髄腔内投与に適している。薬学的に許容される担体としては、滅菌水溶液、細胞培養培地、または分散剤を含む。薬学的に活性な物質へのそのような培地および薬剤の使用は、当該技術分野で周知である。従来の任意の媒体または薬剤が、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、それを含むベクター、または遺伝子修飾された免疫エフェクター細胞と適合しない場合を除いて、薬学的組成物中のそれらの使用が企図される。

【0473】

特定の実施形態において、本明細書で企図される組成物は、遺伝子修飾されたT細胞および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で企図される、細胞ベースの組成物を含む組成物は、経腸投与方法もしくは非経口投与方法によって別々に、または所望の治療目的に影響を及ぼすように他の好適な化合物と組み合わせて投与することができる。

【0474】

薬学的に許容される担体は、処置されるヒト対象への投与に適したものとするために、十分に高い純度と十分に低い毒性のものでなければならない。それは、さらに、組成物の安定性を維持するか、または増加させるべきである。薬学的に許容される担体は、液体または固体であり、計画された投与方法を考慮して、組成物の他の構成要素と組み合わせたときに、所望の嵩、一貫性等を提供するように選択される。例えば、薬学的に許容される担体は、限定されないが、結合剤（例えば、糊化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース等）、充填剤（例えば、ラクトースおよび他の糖類、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、リン酸水素カルシウム等）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、ステアリン酸金属塩、水素化植物油、トウモロコシデンプン、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、崩壊剤（例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウム等）、または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等）であり得る。本明細書で企図される組成物のために他の好適な薬学的に許容される担体としては、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が挙げられるが、これに限定されない。

【0475】

そのような担体溶液はまた、緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤を含むことができる。本明細書で使用される「緩衝液」という用語は、pHの著しい変化なく、化学組成が酸または塩基を中和する、溶液または液体を指す。本明細書で企図される緩衝液の例としては、ダルベッコリン酸緩衝食塩水（PBS）、リンガー液、5%ブドウ糖液（D5W）、正常／生理食塩水（0.9%NaCl）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0476】

薬学的に許容される担体は、約7の組成物のpHを維持するのに十分な量で存在し得る。あるいは、組成物は、約6.8～約7.4の範囲内、例えば、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、および7.4のpHを有する。さらに別に実施形態において、組成物は、約7.4のpHを有する。

【0477】

本明細書で企図される組成物は、非毒性の薬学的に許容される培地を含み得る。組成物は、懸濁液であり得る。本明細書で使用される「懸濁液」という用語は、細胞が、固体支持体に結合されない非接着性状態を指す。例えば、懸濁液として維持される細胞は、混合または攪拌でき、培養皿等の支持体に接着しない。

【0478】

特定の実施形態において、本明細書で企図される組成物は、懸濁液中に製剤化され、修飾T細胞は、許容される液体培地または溶液、例えば、静脈内（IV）バッグ等の生理食塩水または無血清培地内で分散される。許容される希釈剤としては、水、PlasmaLyte、リンガー溶液、等張塩化ナトリウム（生理食塩水）溶液、無血清細胞培養培地、および極低温保存に好適な培地、例えば、Cryostor（登録商標）培地が挙げられるが、これらに限定されない。

【0479】

ある特定の実施形態において、薬学的に許容される担体は、実質的には、ヒトまたは動物起源の天然タンパク質がなく、修飾T細胞の集団を含む組成物を保存するのに好適である。治療組成物は、ヒト患者へ投与されることが意図され、それ故に、実質的に、ウシ血清アルブミン、ウマ血清、およびウシ胎仔血清等の細胞培養構成要素がない。

【0480】

一実施形態において、組成物は、薬学的に許容される細胞培養培地で製剤化される。かかる組成物は、ヒト対象への投与のために好適である。特定の実施形態において、薬学的に許容される細胞培養培地は、無血清培地である。

【0481】

無血清培地は、簡易化およびより良好な定義された組成物、低減された度合いの汚染物質、感染剤の潜在源の除外、およびより低い費用を含む、血清含有培地にわたっていくらかの利点を有する。種々の実施形態において、無血清培地は、動物質を含まず、任意選択で、タンパク質を含み得ない。任意選択で、培地は、生物薬学的に許容される組換えタンパク質を含有し得る。「動物質を含まない」培地は、構成要素が非動物源に由来する培地を指す。組換えタンパク質は、動物質を含まない培地中の天然動物タンパク質に置き換え、栄養素は、合成、植物、または微生物源から得られる。対照的に、「タンパク質を含まない」培地は、タンパク質を実質的に含まないと定義される。

10

【0482】

特定の組成物中に使用された無血清培地の例示的な例としては、QBSF-60 (Quality Biological, Inc.)、StemPro-34 (Life Technologies)、およびX-VIVO 10が挙げられるが、これらに限定されない。

【0483】

好ましい実施形態において、修飾T細胞を含む組成物は、PlasmaLyte中で製剤化される。

20

【0484】

種々の実施形態において、修飾T細胞を含む組成物は、凍結保存培地中で製剤化される。例えば、凍結保存剤を含む凍結保存培地は、解凍後に、高い細胞生存率の結果を維持するために使用され得る。特定の組成物中に使用された凍結保存培地の例示的な例としては、CryoStor CS10、CryoStor CS5、およびCryoStor CS2が挙げられるが、これらに限定されない。

【0485】

一実施形態において、組成物は、PlasmaLyte AとCryoStor CS10を50:50で含む溶液中で製剤化される。

30

【0486】

特定の実施形態において、組成物は、マイコプラズマ、エンドトキシン、および微生物の汚染が実質的にない。内毒素について「実質的に含まない」とは、1日当たり体重1 kg当たり5 EUの総内毒素、平均70 kgのヒトについて細胞の全用量当たり350 EUである、生物製剤についてFDAにより認可されているものより少ない、細胞の1用量当たりの内毒素が存在することを意味する。特定の実施形態において、本明細書で企図されるレトロウイルスベクターで形質導入した造血幹細胞または前駆細胞を含む組成物は、約0.5 EU/mL〜約5.0 EU/mL、または約0.5 EU/mL、1.0 EU/mL、1.5 EU/mL、2.0 EU/mL、2.5 EU/mL、3.0 EU/mL、3.5 EU/mL、4.0 EU/mL、4.5 EU/mL、または5.0 EU/mLを含有する。

40

【0487】

特定の実施形態において、薬学的に許容される担体溶液の製剤は、本明細書に記載される特定の組成物を、例えば、腸内および非経口、例えば、血管内、静脈内、動脈内、骨内、および髄内への投与および製剤を含めた種々の治療レジメンにおいて使用するための好適な投薬および治療レジメンの開発と同様に当業者に周知である。本明細書で企図される特定の実施形態は、例えば、製薬技術分野で周知であるものなど他の製剤を含み、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, volume I and volume II, 22nd Edition. Edited by Loyd V. Allen Jr. Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press; 2012に記載され、その全体が参照に

50

より本明細書に組み込まれることが当業者によって理解されるだろう。

【0488】

特定の実施形態において、組成物は、本明細書で企図される、CTBRシグナルコンバーターを発現するCAR T細胞を包む、ある量の免疫エフェクター細胞を含む。本明細書で使用されるとき、「量」という用語は、臨床結果を含む有益なまたは所望の予防結果または治療結果を達成するために、本明細書で企図されるCTBRシグナルコンバーター等を含む「有効量 (amount effective)」または「有効量 (effective amount)」の細胞を指す。

【0489】

「予防上有効量」とは、所望の予防的結果を達成するのに有効な、本明細書で企図されるCTBRシグナルコンバーターを含む細胞のある量を指す。必然的ではないが典型的には、疾患の前またはその早期に予防的用量が対象において使用されるため、予防上有効量は、治療上有効量よりも少ない。

【0490】

「治療上有効量」とは、対象（例えば、患者）を「治療」するのに有効である、本明細書で企図されるCTBRシグナルコンバーターを含む細胞のある量を指す。治療の量が指示されるとき、投与されるべき組成物の正確な量は、医師によって、患者（対象）の年齢、重量、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および病態における個体差を考慮して決定され得る。本明細書に記載の免疫エフェクター細胞を含む薬学的組成物は、 $10^2 \sim 10^{10}$ 細胞/kg 体重、好ましくは $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg 体重、これらの範囲内のすべての整数値を含む投与量で投与されることが一般的に説明され得る。細胞の数は、組成物の最終的な用途に依存するであろうし、それに含まれる細胞の型も同様であろう。本明細書に提供される使用については、細胞は、一般に、1リットル以下の体積であり、500 mL 以下、さらに250 mL または100 mL 以下であり得る。したがって、所望の細胞の密度は、典型的に、約 10^6 細胞/mL より大きく、一般には、約 10^7 細胞/mL より大きく、一般には、約 10^8 細胞/mL またはそれ以上である。臨床的に関連する数の免疫細胞を、複数回に分けて注入することができ、これを累積すると、約 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、または 10^{12} 細胞に等しいか、あるいはそれを上回る。いくつかの実施形態において、特に、注入された細胞のすべてが、特定の標的抗原に対してリダイレクトされるであろうとの理由から、 10^6 /キログラム（患者当たり $10^6 \sim 10^{11}$ ）の範囲のより少数の細胞が投与され得る。必要に応じて、治療はまた、免疫応答の誘導を増強する、本明細書に記載のマイトジェン（例えば、PHA）またはリンホカイン、サイトカイン、および/またはケモカイン（例えば、IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18、およびTNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α など）の投与も含んでよい。

【0491】

一般に、本明細書に記載される、活性化し、増大させた細胞を含む組成物を、免疫障害を持つ個体において生じる疾患の治療および予防において利用することができる。特に、本明細書で企図される組成物は、がんの治療において使用される。特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、単独で、あるいは、担体、希釈剤、賦形剤、および/またはIL-2もしくは他のサイトカインもしくは細胞集団などの他の構成要素と組み合わせた薬学的組成物として投与することができる。

【0492】

特定の実施形態において、薬学的組成物は、1つ以上の薬学的にまたは生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて、ある量の遺伝子修飾されたT細胞を含む。

【0493】

特定の実施形態において、組成物は、単独で、または1つ以上の治療剤、例えば、放射線治療、化学療法、移植、免疫療法、ホルモン治療法、光治療等と組み合わせて、本明細

10

20

30

40

50

書で企図されるCTBRシグナルコンバーターを含む有効量の免疫エフェクター細胞を含む。組成物はまた、抗生物質と組み合わせて投与され得る。かかる治療剤は特定のがんなどの本明細書に記載の特定の疾患状態に対する標準的な治療として当該技術分野で許容され得る。企図される例示的な治療剤には、サイトカイン、成長因子、ステロイド、NSAID、DMARD、抗炎症剤、化学療法剤、放射線療法剤、治療用抗体、または他の活性作用物質および補助的作用物質が挙げられる。

【0494】

ある特定の実施形態において、本明細書で企図されるCTBRシグナルコンバーターを含む免疫エフェクター細胞を含む組成物は、任意の数の化学療法剤と組み合わせて投与することができる。化学療法剤の例示的な例には、チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXAN（商標））などのアルキル化剤；アルキルスルホナート、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、およびウレドパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホラミド（triethylenethiophosphoramidate）およびトリメチロールメラミン（trimethylolmelamine）を含む、エチレンイミンおよびメチルメラミン（methylmelamines）；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンピキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア（nitrosoureas）、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン（anthramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-2-ノルロイシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリンアナログ、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジン、5-FU；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えば、フォリン酸（folic acid）；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキサート（edatraxate）；デホファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エフロルニチン（elformithine）；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）；ラゾキサソ；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル（TAXOL（登録商標））、Bristol-Myers Squibb Oncology, Prince

10

20

30

40

50

ton, N. J.) およびドセタキセル (TAXOTERE (登録商標)、Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); クロラムブシル; ゲムシタビン; 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキサート; 白金アナログ、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン; ビンブラスチン; 白金; エトポシド (VP-16); イホスファミド; マイトマイシンC; ミトキサントロン; ビンクリスチン; ビノレルビン; ナベルビン; ノバントロン; テニポシド; ダウノマイシン; アミノプテリン; ゼローダ; イバンドロネート; CPT-11; トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000; ジフルオロメチロールニチン (DMFO); レチノイン酸誘導体、例えば、Targretin (商標) (ベキサロテン)、Panretin (商標) (アリトレチノイン); ONTAK (商標) (デノロイキンディフティトックス); エスペラマイシン; カペシタビン; および上記のいずれかの薬学的に許容され得る塩、酸または誘導体が挙げられる。この定義には、抗エストロゲンなどのがんに対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤も含まれ、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン (Fareston)、およびフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドなどの抗アンドロゲン剤、およびゴセレリン、ならびに上記いずれかの薬学的に許容される塩、酸、または、誘導体が含まれる。

【0495】

様々な他の治療剤は、本明細書で企図される組成物と組み合わせて投与することができる。一実施形態において、本明細書で企図されるCTBRシグナルコンバーターを含む免疫エフェクター細胞を含む組成物は、抗炎症剤と共に投与される。抗炎症剤または薬物としては、ステロイドおよびグルココルチコイド (ベータメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロンを含む)、アスピリン、イブuproフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗TNF薬剤、シクロホスファミド、およびミコフェノールートを含む非ステロイド系抗炎症剤 (NSAID) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0496】

他の代表的なNSAIDは、イブuproフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、VIOXX (登録商標) (ロフェコキシブ) およびCELEBREX (登録商標) (セレコキシブ) などのCox-2阻害剤、およびシアリレートからなる群から選択される。代表的な鎮痛剤は、アセトアミノフェン、オキシコドン、塩酸プロポキシフェンのトラマドールからなる群から選択される。代表的なグルココルチコイドは、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、またはプレドニゾンからなる群から選択される。代表的な生物学的反応修飾物質としては、細胞表面マーカー (例えば、CD4、CD5など) に対する分子、TNFアンタゴニスト (例えば、エタネルセプト (ENBREL (登録商標))、アダリムマブ (HUMIRA (登録商標)) およびインフリキシマブ (REMICADE (登録商標)) などのサイトカイン阻害剤、ケモカイン阻害剤、および接着分子阻害剤が挙げられる。生物学的反応修飾物質としては、モノクローナル抗体ならびに組換え型の分子が挙げられる。代表的なDMARDとしては、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシラミン、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、Gold (経口用 (オーラノフィン) および筋肉内) およびミノサイクリンが挙げられる。

【0497】

本明細書で企図されるCTBRシグナルコンバーターを含む修飾T細胞と組み合わせるのに好適な治療用抗体の例示的な例としては、バビツキシマブ、ベバシズマブ (アバスタ)、ビバツズマブ、ブリナツモマブ、コナツムマブ、ダラツムマブ、ドゥリゴツマブ、ダセツズマブ、ダロツズマブ、エロツズマブ (HuLuc63)、ゲムツズマブ、イブリツモマブ、インダツキシマブ、イノツズマブ、ロルボツズマブ、ルカツムマブ、ミラツズ

10

20

30

40

50

マブ、モキセツモマブ、オカラツズマブ、オフアツムマブ、リツキシマブ、シルツキシマブ、テプロツムマブ、およびウブリツキシマブが挙げられるが、これらに限定されない。

【0498】

ある特定の実施形態において、本明細書で企図される組成物は、サイトカインと組み合わせて投与される。本明細書で使用される「サイトカイン」とは、1つの細胞集団により放出され、細胞間メディエーターとして別の細胞に作用するタンパク質に対する一般的な用語を意味する。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインには、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH）などの糖タンパク質ホルモン；肝臓増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子-アルファおよび腫瘍壊死因子-ベータ；ミューラー阻害物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF-ベータなどの神経増殖因子；血小板増殖因子；TGF-アルファおよびTGF-ベータなどの形質転換増殖因子（TGF）；インスリン様増殖因子-Iおよびインスリン様増殖因子-II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導性因子；インターフェロン-アルファ、インターフェロン-ベータ、およびインターフェロン-ガンマなどのインターフェロン；マクロファージ-CSF（M-CSF）などのコロニー刺激因子（CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；および顆粒球-CSF（G-CSF）；IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15などのインターロイキン（IL）、TNF-アルファまたはTNF-ベータなどの腫瘍壊死因子；ならびにLIFおよびk i tリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子が含まれる。本明細書で使用される、サイトカインという用語は、天然源または組換え細胞培養からのタンパク質、および天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

【0499】

I. 治療方法

本明細書で企図されるCTBRを含むCAR T細胞を含む、免疫エフェクター細胞は、がんの予防、治療、および改善に使用するための、またはがんに関連する少なくとも1つの症状を予防、治療、もしくは改善するための、養子免疫療法の方法の向上を提供する。

【0500】

遺伝子操作された受容体および本明細書で企図されるCTBRを含む免疫エフェクター細胞は、がん、GVHD、感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、または免疫不全症うちの少なくとも1つの症状の予防、治療、または改善にて使用する製剤の改善を提供する。本明細書で使用されるとき、「製剤」という用語は、本明細書で企図される組成物および方法を用いて産生された修飾された細胞を指す。特定の実施形態では、製剤は、遺伝子修飾された免疫エフェクター細胞、遺伝子操作された受容体を含むT細胞、またはCTBRシグナルコンバーターを発現するようにさらに修飾されたCAR T細胞、を含む。さらに、特定の実施形態で企図される修飾T細胞は安全かつより効果的な養子細胞療法を提供する。なぜなら、修飾されたT細胞は、T細胞の消耗に対して抵抗性であり、持続的な治療をもたらすことができる腫瘍微小環境において耐久性および持続性を示すからである。

【0501】

特定の実施形態では、有効量の修飾された免疫エフェクター細胞、または遺伝子操作された受容体およびCTBRシグナルコンバーターを含むT細胞を対象に投与して、がん、GVHD、感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、または免疫不全症のうちの少なくとも1つの症状を予防、治療、または改善する。

【0502】

特定の実施形態において、がんの少なくとも1つの症状を予防、治療、および改善する

方法は、有効量の修飾された免疫エフェクター細胞もしくはCTBRシグナルコンバーターおよび遺伝子操作されたTCR、CAR、またはDarcを含むT細胞、または腫瘍もしくはがん細胞をリダイレクトする他の治療用導入遺伝子、を対象に投与することを含む。遺伝子修飾された細胞は、より耐久性と持続性があるより製剤である。なぜなら、当該細胞は、免疫抑制TGFβシグナルを免疫刺激シグナルに変換するおかげで、腫瘍微小環境からの免疫抑制シグナルに対してより抵抗性であるからである。

【0503】

特定の実施形態において、本明細書で企図される修飾免疫エフェクター細胞は、固形腫瘍またはがんの治療で使用される。

【0504】

特定の実施形態において、本明細書で企図される修飾免疫エフェクター細胞は、副腎がん、副腎皮質がん、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、非定型奇形腫様／ラブドイド腫瘍、基底細胞がん、胆管がん、膀胱がん、骨がん、脳／CNSがん、乳がん、気管支腫瘍、心臓腫瘍、子宮頸がん、胆管がん、軟骨肉腫、脊索腫、結腸がん、結腸直腸がん、頭蓋咽頭腫、非浸潤性乳管がん（DCIS）子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、鼻腔神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、眼がん、卵管がん、線維性組織肉腫、線維肉腫、胆嚢がん、胃がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、胚細胞腫瘍、神経膠腫、膠芽腫、頭頸部がん、血管芽細胞腫、肝細胞がん、下咽頭がん、眼内黒色腫、カポジ肉腫、腎臓がん、喉頭がん、平滑筋肉腫、口唇がん、脂肪肉腫、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、肺カルチノイド腫瘍、悪性中皮腫、髄様がん、髄芽細胞腫、髄膜腫、黒色腫、メルケル細胞がん、正中線管がん、口腔がん、粘液肉腫、骨髓異形成症候群、骨髓増殖性腫瘍、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、乏突起神経膠腫、口腔がん、口腔がん、口腔咽頭がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、膵島細胞腫瘍、乳頭がん、傍神経節腫、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体腫、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性腹膜がん、前立腺がん、直腸がん、網膜芽細胞腫、腎細胞がん、腎盂および尿管がん、横紋筋肉腫、唾液腺がん、脂腺がん、皮膚がん、軟部組織肉腫、扁平上皮細胞がん腫、小細胞肺がん、小腸がん、胃がん、汗腺がん、滑膜腫、精巣がん、咽喉がん、胸腺がん、甲状腺がん、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膣がん、膣がん、外陰がん、およびウィルムス腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない、固形腫瘍またはがんの治療で使用される。

【0505】

特定の実施形態において、本明細書で企図される修飾免疫エフェクター細胞は、肝臓がん、膵臓がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、脳がん、骨がん、甲状腺がん、腎臓がん、または皮膚がんが挙げられるが、これらに限定されない、固形腫瘍またはがんの治療で使用される。

【0506】

特定の実施形態において、本明細書で企図される修飾免疫エフェクター細胞は、膵臓、膀胱、および肺が挙げられるが、これらに限定されない、様々ながんの治療で使用される。

【0507】

特定の実施形態において、本明細書で企図される修飾免疫エフェクター細胞は、液性がんまたは血液がんの治療で使用される。

【0508】

特定の実施形態において、本明細書で企図される修飾免疫エフェクター細胞は、白血病、リンパ腫、および多発性骨髄腫が挙げられるが、これらに限定されない、B細胞悪性腫瘍の治療で使用される。

【0509】

特定の実施形態において、本明細書で企図される修飾免疫エフェクター細胞は、白血病、リンパ腫、および多発性骨髄腫：急性リンパ球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病、有毛細胞性白血病（HCL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、および慢性骨髄性白血病（CML）、

慢性骨髄単球性白血病（CMML）および真性赤血球増加症、ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、免疫芽細胞性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、菌状息肉腫、未分化大細胞リンパ腫、セザリー症候群、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、多発性骨髄腫、顕性多発性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、非分泌性骨髄腫、IgD骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、骨の孤立性形質細胞腫、および髄外性形質細胞腫が挙げられるが、これらに限定されない、液性がんの治療で使用される。

【0510】

本明細書で企図される方法で使用するための好ましい細胞は、自己移植／自家（「自己」）の細胞、好ましくは造血細胞、より好ましくはT細胞、およびより好ましくは免疫エフェクター細胞を含む。

10

【0511】

特定の実施形態において、本明細書で企図される治療有効量の修飾免疫エフェクター細胞またはそれを含む組成物を、単独でまたは1つ以上の治療剤と組み合わせてそれを必要とする患者に投与することを含む方法が、提供される。ある特定の実施形態において、本細胞は、がん、GVHD、感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、または免疫不全症を発症するリスクがある患者の治療に使用される。したがって、特定の実施形態は、本明細書で企図される治療有効量のゲノム編集された細胞を、それを必要とする対象に投与することを含む、がん、感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、または免疫不全症のうちの少なくとも1つの症状の治療または予防または改善を含む。

20

【0512】

一実施形態において、治療を必要とする対象におけるがん、GVHD、感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、または免疫不全症を治療する方法は、有効量、例えば、本明細書で企図される、治療上有効量の修飾免疫エフェクター細胞を含む組成物を投与することを含む。投与の量および頻度は、適切な投与量が臨床試験によって決定され得るが、患者の状態、ならびに患者の疾患の種類および重症度のような因子によって決定されよう。

【0513】

一例示的な実施形態において、対象に提供された有効量の修飾免疫エフェクターが、少なくとも 2×10^6 細胞/kg、少なくとも 3×10^6 細胞/kg、少なくとも 4×10^6 細胞/kg、少なくとも 5×10^6 細胞/kg、少なくとも 6×10^6 細胞/kg、少なくとも 7×10^6 細胞/kg、少なくとも 8×10^6 細胞/kg、約 9×10^6 細胞/kg、もしくは約 10×10^6 細胞/kg、またはそれ以上の細胞/kgであり、すべての介在する用量の細胞を含む。

30

【0514】

別の例示的な実施形態において、対象に提供された有効量の修飾免疫エフェクター細胞が、約 2×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg、約 6×10^6 細胞/kg、約 7×10^6 細胞/kg、約 8×10^6 細胞/kg、約 9×10^6 細胞/kg、もしくは約 10×10^6 細胞/kg、またはそれ以上の細胞/kgであり、すべての介在する用量の細胞を含む。

40

【0515】

別の例示的な実施形態において、対象に提供された有効量の修飾免疫エフェクター細胞が、約 2×10^6 細胞/kg～約 10×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg～約 10×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg～約 10×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg～約 10×10^6 細胞/kg、約 2×10^6 細胞/kg～約 6×10^6 細胞/kg、約 2×10^6 細胞/kg～約 7×10^6 細胞/kg、約 2×10^6 細胞/kg～約 8×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg～約 6×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg～約 7×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg～約 8×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg～約 6×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg～約 7×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg～約 8×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg

50

g ～約 6×10^6 細胞 / kg、約 5×10^6 細胞 / kg ～約 7×10^6 細胞 / kg、約 5×10^6 細胞 / kg ～約 8×10^6 細胞 / kg、または約 6×10^6 細胞 / kg ～約 8×10^6 細胞 / kg であり、すべての介在する用量の細胞を含む。

【0516】

当業者は、特定の実施形態で企図される組成物の複数回投与が所望の療法に影響を及ぼすために必要とされ得ることを認識するであろう。例えば、組成物は、1週間、2週間、3週間、1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、1年間、2年間、5年間、10年間、またはそれ以上の間にわたって、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回またはそれ以上投与され得る。

【0517】

ある特定の実施形態において、活性化されたT細胞を対象に投与し、その後、再採血し（またはアフエーシスを実施し）、その血液からT細胞を活性化し、患者にこれらの活性化し、増大させたT細胞を再注入することが望ましい場合がある。このプロセスは、数週間ごとに複数回行うことができる。ある特定の実施形態において、T細胞は、10cc ～400ccの採血から活性化され得る。ある特定の実施形態において、T細胞は、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、100cc、150cc、200cc、250cc、300cc、350cc、または400ccもしくはそれ以上採血から活性化される。理論に拘束されるものではないが、この複数の採血／複数の再注入プロトコルを使用することは、ある特定のT細胞の集団を選択するのに役立ち得る。

【0518】

一実施形態において、がんと診断された対象を治療する方法は、対象から免疫エフェクター細胞を取り出すことと、遺伝子操作された抗原受容体およびTGFβシグナルコンバーターをコードする1つ以上のベクターを導入することによって免疫エフェクター細胞を修飾して、修飾された免疫エフェクター細胞の集団を産生することと、修飾された免疫エフェクター細胞の集団を同じ対象に投与することと、を含む。好ましい実施形態において、免疫エフェクター細胞は、T細胞を含む。

【0519】

特定の実施形態で企図される細胞組成物を投与するための方法は、エキスピボで修飾免疫エフェクター細胞の再導入、または対象に導入されると、成熟免疫エフェクター細胞に分化する、免疫エフェクター細胞の修飾前駆体の再導入をもたらしするために有効な任意の方法を含む。1つの方法は、遺伝子操作された抗原受容体およびTGFβシグナルコンバーターをコードする1つ以上のベクターを導入することによって、エキスピボで末梢血T細胞を修飾すること、および形質導入された細胞を対象に戻すことを含む。

【0520】

本明細書において引用される刊行物、特許出願、および発行特許は全て、個々の刊行物、特許出願、または発行された特許のそれぞれが参照により組み込まれることが具体的にかつ個別に示されているかのように参照により本明細書に組み込まれる。

【0521】

前述の実施形態は、明瞭な理解のために図解および実施例により少し詳細に記載されているが、本明細書で企図される教示を考慮して、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく、それらに対してある特定の変化および改変を成すことができることが当業者には容易に明らかになる。以下の実施例は、単に例示として提供され、限定としては提供されない。基本的に同様の結果を得るために変化または改変され得る種々の重大でないパラメータは当業者には容易に認識されよう。

【実施例】

【0522】

実施例1

T細胞を発現するTGFβIL-12Rシグナルコンバーター（CTBR12）およびキメラ抗原受容体（CAR）

例示的な TGFβ IL-12R 系のシグナルコンバーター構築物を図 1 に示されるように設計した。

【0523】

最適な IL-12 受容体シグナル伝達は、IL-12 ライゲーション後、IL-12Rβ1 および IL-12Rβ2 サブユニットの細胞内ドメインの二量化によって開始される。TGFβ に曝露後、TGFβ シグナルを IL-12 受容体シグナル伝達を誘発するように変換するために、TGFβ 受容体 1 (TGFβR1) および TGFβ 受容体 2 (TGFβR2) の細胞内ドメインをそれぞれ IL-12Rβ1 および IL-12Rβ2 シグナル伝達ドメインに置換した。IL-12Rβ1 および IL-12Rβ2 の膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを、CAR をコードするレンチウイルスベクターにクローニングして、2A 自己切断型ポリペプチド配列によって分離した (CAR-CTBR12)。

【0524】

健常ドナー PBMC からの初代ヒト T 細胞を可溶性抗 CD3 (1 μg/ml) および抗 CD28 (5 μg/ml) で活性化し、ビヒクルまたは (i) 抗 ROR1 CAR、(ii) 抗 ROR1 CAR および優性陰性 TGFβ 受容体 (抗 ROR1, DNR)、(iii) 抗 ROR1 CAR および TGFβR2 サブユニット、もしくは (iv) 抗 ROR1 CAR および CTBR12 (抗 ROR1, CTBR12) を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2 含有増殖培地で 10 日培養後、抗 ROR1 CAR および TGFβR2 を発現する細胞表面をフローサイトメトリーによって決定した。R-フィリコエリトリン (R-PE) に共役された組換えヒト ROR1 タンパク質を使用して、抗 ROR1 CAR を発現する T 細胞を特異的に染色した。TGFβR2 に対する市販の抗体を使用して、CTBR12 を検出した。代表的な発現データを図 2 に示す。

【0525】

抗 ROR1 CAR および CTBR12 をコードするレンチウイルスベクターを形質導入した T 細胞の 50% は、抗 ROR1 CAR および CTBR12 (図 2 の右端のパネル) を共発現した。対照的に、未形質導入の T 細胞では抗 ROR1 CAR も CTBR12 もどちらも検出されず、TGFβR2 に対する抗体が内因性 TGFβR2 を検出しなかったことを示している。

【0526】

実施例 2

CTBR12 によって阻害された免疫抑制 TGFβ シグナル伝達

2 ユニットの TGFβR1 および 2 ユニットの TGFβR2 を含有する四量体複合体に対する TGFβ1 ライゲーションは、SMAD2 および SMAD3 のリン酸化を誘導し、細胞核へ免疫抑制シグナルを伝搬する。切断型 TGFβR2 (優性陰性 TGFβ 受容体-DNR) の過剰発現は、TGFβ 処置に応答した SMAD2/3 リン酸化の喪失によって、T 細胞を TGFβ に対して非感受性にする。したがって、リン酸化リン酸化 SMAD2/3 発現を使用して、TGFβ シグナル伝達経路の活性化を調べた。

【0527】

健常ドナー PBMC 由来の初代ヒト T 細胞を可溶性抗 CD3 (1 μg/ml) および抗 CD28 (5 μg/ml) で活性化し、ビヒクルまたは (i) 抗 ROR1 CAR、(ii) 抗 ROR1 CAR および優性陰性 TGFβ 受容体 (抗 ROR1, DNR)、(iii) 抗 ROR1 CAR および TGFβR2 サブユニット、もしくは (iv) 抗 ROR1 CAR および CTBR12 (抗 ROR1, CTBR12) を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2 含有増殖培地で 10 日培養後、培養物を 10 ng/ml の組換えヒト TGFβ1 で 20 分間処理した。SMAD2/3 のリン酸化をリン酸化した SMAD2/3 に特異的な抗体で評価した。CTBR12 または DNR のいずれかを発現する T 細胞を SMAD2/3 のリン酸化から完全に保護した (図 3)。これらのデータは、CTBR12 の発現が、抗 ROR1 CAR T 細胞を TGFβ 免疫抑制シグナル伝達に対して非感受性にすることを示した。

【0528】

実施例 3

TGF β 1 に曝露すると CTBR 12 は IL-12 R シグナル伝達を伝達する。

IL-12 に対する細胞応答は、受容体の二量化ならびに STAT 4 および STAT 5 のリン酸化によって開始される。したがって、リン酸化 STAT 4 およびリン酸化 STAT 5 の発現を使用して、IL-12 受容体シグナル伝達経路の活性化を評価した。

【0529】

健常ドナー PBMC 由来の初代ヒト T 細胞を可溶性抗 CD 3 (1 μ g/mL) および抗 CD 28 (5 μ g/mL) で活性化し、ビヒクルまたは (i) 抗 ROR 1 CAR、(ii) 抗 ROR 1 CAR および優性陰性 TGF β 受容体 (抗 ROR 1. DNR)、(iii) 抗 ROR 1 CAR および TGF β R 2 サブユニット、もしくは (iv) 抗 ROR 1 CAR および CTBR 12 (抗 ROR 1. CTBR 12) を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2 含有増殖培地で 10 日培養後、培養物を 50 ng/mL の組換えヒト IL-12 でまたは 10 ng/mL の組換えヒト TGF β 1 で 20 分間処理した。

10

【0530】

抗 ROR 1 CAR 細胞を発現する T 細胞はリン酸化 STAT 4 のレベル増加を示した (図 4、上段、未形質導入対照 (UTD) と右端 4 パネルを比較のこと)。CTBR 12 を発現する CAR T 細胞のみが、組換えヒト TGF β 1 で処置された場合、リン酸化 STAT 4 発現の検出可能なレベルを示した (図 4、下段、右端のパネルを他のパネルと比較のこと)。対照的に、シグナルコンバーターの TGF β R 2 部分のみを発現する CAR T 細胞は、TGF β 処置に応答して STAT 4 をリン酸化しなかった (図 4、下段、右から 4 番目のパネル)。

20

【0531】

CTBR 12 を発現する CAR T 細胞はまた、IL-12 または TGF β 1 のいずれかで処置された場合にリン酸化 STAT 5 の検出可能なレベルを示し、変換された TGF β シグナルが内因性 IL-12 受容体シグナル伝達を誘発することを確認した (図 5)。

【0532】

抗 ROR 1. CTBR 12 を発現する CAR T 細胞の遺伝子発現を、TGF β 1 の存在下または不存在下にて、抗原駆動の連続増殖アッセイで測定した。簡潔に説明すると、ヒト ROR 1 抗原を発現する、GFP 標識された K562 標的細胞を使用して、組換えヒト TGF β 1 の存在下または不存在下にて、CAR T 細胞を連続的に増殖した。5 ng/mL の組換えヒト TGF β 1 の存在下または不存在下にて、CAR T 細胞を、7 日おきに 1:1 の比で標的細胞で刺激した。T 細胞を播種し、最初の刺激 21 日後に、遺伝子発現解析のための mRNA を分離した。Nanostring 免疫プロファイリングパネルを使用して遺伝子発現解析を実施した。TGF β 1 処置によって駆動した有意な遺伝子発現の変化を抗 ROR 1. CTBR 12 発現細胞内に同定し (図 6、左パネル)、既知の IL-12 R 調節された転写産物、IFNG、SELL、IL18RAP、IL18R1、および IL21R のアップレギュレーションを包含する (図 6、右パネル)。

30

【0533】

実施例 4

CTBR 12 を発現する CAR T 細胞は、抗原および TGF β 1 に曝露すると IFN γ の増加を分泌する。

40

ヒト T 細胞における IL-12 受容体シグナル伝達は、TH1 の分化を促進し、エフェクター機能増大させる。IL-12 受容体シグナル伝達は、TCR シグナルと協力して、抗原刺激に応答した IFN γ の放出を増大させることができる。

【0534】

組換えヒト TGF β 1 の存在下で、TCR または CAR のいずれかを介して T 細胞を刺激した場合、R2/R1 シグナルコンバーターは、IFN γ 産生を増幅させる。健常ドナー PBMC 由来の初代ヒト T 細胞を可溶性抗 CD 3 (1 μ g/mL) および抗 CD 28 (5 μ g/mL) で活性化し、ビヒクルまたは (i) 抗 ROR 1 CAR、(ii) 抗 RO

50

R1 CARおよび優性陰性TGFβ受容体（抗ROR1.DNR）、もしくは（iii）抗ROR1 CARおよびCTBR12（抗ROR1.CTBR12）を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、5 ng/mLの組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下にて、細胞をプレート結合抗CD3抗体（1 μg/mL）または組換えヒトROR1タンパク質（100 ng/mL）のいずれかに播種した。播種後48時間で、上清を回収し、可溶性サイトカイン含有量について、Luminexで分析した。

【0535】

組換えヒトTGFβ1の存在下で、TCRまたはCARのいずれかを介して刺激した場合、CTBR12発現細胞は他方の細胞型より有意に大量のIFNγを産生した（図7）。

【0536】

実施例5

CTBR12を発現するCAR T細胞は、TGFβ1免疫抑制シグナルに対して抵抗性である。

TGFβシグナル伝達は、抗原刺激に応答したT細胞増殖を減少させる。対照的に、IL-12シグナル伝達は、T細胞増殖を増大させ、長期の抗原曝露から生じるT細胞の機能不全を低減する。

【0537】

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性抗CD3（1 μg/mL）および抗CD28（5 μg/mL）で活性化し、ビヒクルまたは（i）抗ROR1 CAR、（ii）抗ROR1 CARおよび優性陰性TGFβ受容体（抗ROR1.DNR）、もしくは（iii）抗ROR1 CARおよびCTBR12（抗ROR1.CTBR12）を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、細胞はインビトロ連続再刺激アッセイを受けた。

【0538】

簡潔に説明すると、ヒトROR1抗原を発現する、GFP標識されたK562標的細胞を使用して、組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下にて、CAR T細胞を連続的に増殖した。5 ng/mL組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下にて、CAR T細胞を7日おきに1:1の比で標的細胞で刺激した対照抗ROR1 CAR-T細胞は、アッセイの過程で、5 ng/mLの組換えヒトTGFβ1の存在下で、最小の増殖を示した。対照的に、TGFβ.DNRまたはCTBR12のいずれかを共発現する抗ROR1 CAR T細胞を、免疫抑制TGFβ1媒介性シグナル伝達から有意に保護した。図8これらの結果は、SMADのリン酸化を遮断するDNRおよびCTBR12両方の能力と相關する（図8）。

【0539】

実施例6

TGFβ-IL-7RシグナルコンバーターR2/R1（CTBR7）およびキメラ抗原受容体（CAR）を発現するT細胞

例示的なTGFβIL-7R系のシグナルコンバーター（CTBR7）構築物を図1に示されるように設計した。

【0540】

最適なIL-7受容体シグナル伝達は、IL-7ライゲーション後のIL-7Rαおよび共通γ鎖（γc、IL-2Rγ）の細胞内ドメインの二量化によって開始される。TGFβに曝露後、TGFβシグナルをIL-7受容体シグナル伝達を誘発するように変換するために、TGFβ受容体1（TGFβR1）およびTGFβ受容体2（TGFβR2）の細胞内ドメインをそれぞれIL-2RγおよびIL-7Rαシグナル伝達ドメインに置換し、IL-7シグナル伝達キメラTGFβ受容体（CTBR7）産生した。IL-2RγおよびIL-7Rαの膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを、CARをコードするレンチウイルスベクターにクローニングして、2A自己切断型ポリペプチド配列によって分離した（CAR.CTBR7）。

10

20

30

40

50

【0541】

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性抗CD3 (1 μ g/ml) および抗CD28 (5 μ g/ml) で活性化し、ビヒクルまたは (i) 抗ROR1 CAR、(ii) 抗ROR1 CARおよび優性陰性TGF β 受容体 (抗ROR1. DNR)、(iii) 抗ROR1 CARおよびCTBR7 (抗ROR1. CTBR7) を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2 含有増殖培地で10日培養後、抗ROR1 CARおよびTGF β R2を発現する細胞表面をフローサイトメトリーによって決定した。R-フィリコエリトリン (R-PE) に共役された組換えヒトROR1タンパク質を使用して、抗ROR1 CARを発現するT細胞を特異的に染色した。TGFBR2に対する市販の抗体を使用して、CTBR7を検出した。代表的な発現データを図9に示す。

10

【0542】

抗ROR1 CARおよびCTBR7をコードするレンチウイルスベクターを形質導入したT細胞の40%は、抗ROR1 CARおよびCTBR7 (図9の右端のパネル) を共発現した。対照的に、未形質導入のT細胞では抗ROR1 CARもCTBR7もどちらも検出されず、TGFBR2に対する抗体が内因性TGFBR2を検出しなかったことを示している。

【0543】

実施例7

CTBR7によって阻害された免疫抑制TGF β シグナル伝達

2ユニットのTGF β R1および2ユニットのTGF β R2を含有する四量体複合体に対するTGF β 1ライゲーションは、SMAD2およびSMAD3のリン酸化を誘導し、細胞核へ免疫抑制シグナルを伝搬する。切断型TGF β R2 (優性陰性TGF β 受容体-DNR) の過剰発現は、TGF β 処置に応答したSMAD2/3リン酸化の喪失によって、T細胞をTGF β に対して非感受性にする。したがって、リン酸化リン酸化SMAD2/3発現を使用して、TGF β シグナル伝達経路の活性化を調べた。

20

【0544】

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性抗CD3 (1 μ g/ml) および抗CD28 (5 μ g/ml) で活性化し、ビヒクルまたは (i) 抗ROR1 CAR、(ii) 抗ROR1 CARおよび優性陰性TGF β 受容体 (抗ROR1. DNR)、(iii) 抗ROR1 CARおよびCTBR7 (抗ROR1. CTBR7) を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2 含有増殖培地で10日培養後、培養物を10 ng/mlの組換えヒトTGF β 1で20分間処理した。SMAD2/3のリン酸化をリン酸化したSMAD2/3に特異的な抗体で評価した。CTBR7またはDNRのいずれかを発現するT細胞をSMAD2/3のリン酸化から保護した (図10)。これらのデータは、CTBR7の発現が、抗ROR1 CART細胞をTGF β 免疫抑制シグナル伝達に対して非感受性にすることを示した。

30

【0545】

実施例8

TGF β 1に曝露するとCTBR7はIL-7Rシグナル伝達を伝達する。

IL-7に対する細胞応答は、受容体の二量化およびSTAT5のリン酸化によって開始される。したがって、リン酸化STAT5の発現を使用して、CTBR7を発現するT細胞について、IL-7受容体シグナル伝達経路の活性化を評価した。

40

【0546】

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性抗CD3 (1 μ g/ml) および抗CD28 (5 μ g/ml) で活性化し、ビヒクルまたは (i) 抗ROR1 CAR、(ii) 抗ROR1 CARおよび優性陰性TGF β 受容体 (抗ROR1. DNR)、(iii) 抗ROR1 CARおよびCTBR7 (抗ROR1. CTBR7) を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2 含有増殖培地で10日培養後、培養物を10 ng/mlの組換えヒトTGF β 1で20分間処理した。CTBR7を発現するCART細胞のみが、組換えヒトTGF β 1で処置された場合に、検出可能なレベルのリン酸化

50

STAT5発現を示した（図11、右端のパネルを他のパネルと比較のこと）。

【0547】

さらに変化されたIL-7Rシグナル伝達を調べるために、連続的なTGFβ1曝露に
応答してBcl-2タンパク質発現をアップレギュレートするCTBR7発現細胞の能力
を決定した。対照CAR T細胞またはDNR（抗ROR1、DNR）またはCTBR7
（抗ROR1、CTBR7）のいずれかを共発現するCAR T細胞は、外因性サイトカ
イン支持の不在下で、およびTGFβ1の存在下または不存在下のいずれかで、抗原駆動
の連続増殖アッセイを受けた。簡潔に説明すると、ヒトROR1抗原を発現する、GFP
標識されたK562標的細胞を使用して、組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下
にて、CAR T細胞を連続的に増殖した。5 ng/mLの組換えヒトTGFβ1の存在
下または不存在下にて、CAR T細胞を、7日おきに1：1の比で標的細胞で刺激した
。第2の刺激の6日後、Bcl-2タンパク質発現について、抗ROR1 CAR、抗R
OR1 CAR、DNR、または抗ROR1 CAR、CTBR7 T細胞をフローサイトメ
トリーで調べた。CTBR7を発現するCAR T細胞のみが、TGFβ1の存在下で増
殖された場合に、Bcl-2タンパク質発現レベルの増加を示した（図12）。

【0548】

実施例9

CTBR7を共発現するCAR T細胞は、外因性IL-2の非存在下およびTGFβ1
の存在下で、持続性のエフェクター活性を示す。

TGFβシグナル伝達は、抗原刺激に応答したT細胞増殖を減少させる。対照的に、IL-7シグナル伝達は、T細胞の増殖および生存、特にメモリT細胞集団について明らか
な活性を誘導することができる。CTBR7シグナル伝達が、TGFβ1の存在下で、C
AR T細胞エフェクター活性を増加させることができるかどうかを評価するために、外
因性IL-2サイトカイン支持が提供されない場合に、連続再刺激アッセイにおいて、対
照CAR T細胞およびCAR、DNR T細胞に対するCAR、CTBR7増殖および抗
腫瘍活性を比較した。

【0549】

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性抗CD3（1 μg/mL）および抗
CD28（5 μg/mL）で活性化し、ビヒクルまたは（i）抗ROR1 CAR、（i
i）抗ROR1 CARおよび優性陰性TGFβ受容体（抗ROR1、DNR）、もしくは
（iii）抗ROR1 CARおよびCTBR7（抗ROR1、CTBR7）を発現す
るレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、外因
性IL-2サイトカイン支持の不在下で、細胞はインビトロ連続再刺激アッセイを受けた。

【0550】

簡潔に説明すると、ヒトROR1抗原を発現する、GFP標識されたK562標的細胞
を使用して、組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下にて、CAR T細胞を連続
的に増殖した。5 ng/mLの組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下にて、C
AR T細胞を、7日おきに1：1の比で標的細胞で刺激した。外因性IL-2はこのアッ
セイの支持に使用されない。対照抗ROR1 CAR T細胞は、アッセイの過程で、5 n
g/mLの組換えヒトTGFβ1の存在下で、最小の増殖を示した。DNRを共発現する
CAR T細胞はまた、TGFβ1の存在下で増殖させた場合、増殖の低下を示した。対
照的に、CTBR7を共発現する抗ROR1 CAR T細胞は、TGFβ1の不在下で増
殖した同一細胞と比較して、増殖の増強を示した（図13）。これらのデータは、活性C
TBR7シグナル伝達がCAR単独と比較してT細胞増殖を増加させることを示した。

【0551】

CTBR7を共発現するCAR T細胞は、IL-2支持を伴うことなく上述の連続再
刺激アッセイで培養物から腫瘍細胞を除去する。2度目の刺激の後、CTBR7を共発現
しTGFβ1で処置したCAR T細胞のみが、腫瘍集団を除去する（培養物内に残存す
るGFP陽性腫瘍細胞の存在によってモニターされる）（図13）。これらのデータは、
CARシグナル伝達単独では十分ではない条件下で、CTBR7シグナル伝達がエフェク

ター機能を支持するのに十分であることを示した。

【0552】

実施例10

キメラ抗原受容体（CAR）およびCTBR12またはCTBR7を発現するT細胞

例示的なTGFβIL-12RまたはTGFβIL-7Rのシグナルコンバーター構築物を図1に示されるように設計した。

【0553】

IL-12Rβ1およびIL-12Rβ2の膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを抗EGFR CARをコードするレンチウイルスベクターにクローニングして、2A自己切断型ポリペプチド配列によって分離した（抗EGFR・CTBR12）。

【0554】

IL-2RγおよびIL-7Rαの膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを抗EGFR CARをコードするレンチウイルスベクターにクローニングして、2A自己切断型ポリペプチド配列によって分離した（抗EGFR・CTBR7）。

【0555】

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性CD3（1μg/ml）およびCD28（5μg/ml）で活性化し、ビヒクルまたは（i）抗EGFR CAR、（ii）抗EGFR CARおよび優性陰性TGFβ受容体（抗EGFR・DNR）、（iii）抗EGFR CARおよびCTBR12（抗EGFR・CTBR12）、および（iv）抗EGFR CARおよびCTBR7（抗EGFR・CTBR7）を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、抗EGFR CARおよびTGFβR2を発現する細胞表面をフローサイトメトリーによって決定した。代表的な発現データを図15（上段パネル）に示す。

【0556】

実施例11

抗EGFR CARおよびCTBR12または抗EGFR CARおよびCTBR7を発現するT細胞によって阻害された免疫抑制TGFβシグナル伝達

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性CD3（1μg/ml）およびCD28（5μg/ml）で活性化し、ビヒクルまたは（i）抗EGFR CAR、（ii）抗EGFR CARおよび優性陰性TGFβ受容体（抗EGFR・DNR）、（iii）抗EGFR CARおよびCTBR12（抗EGFR・CTBR12）、および（iv）抗EGFR CARおよびCTBR7（抗EGFR・CTBR7）を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、培養物を10ng/mlの組換えヒトTGFβ1で20分間処理した。SMAD2/3のリン酸化をリン酸化したSMAD2/3に特異的な抗体で評価した。DNR、CTBR12またはCTBR7を発現するT細胞をSMAD2/3のリン酸化から完全に保護した（図15、下段パネル）。これらのデータは、CTBR12またはCTBR7のいずれかの発現が、抗EGFR CAR T細胞をTGFβ免疫抑制シグナル伝達に対して非感受性にすることを示した。

【0557】

実施例12

CTBRはTGFβ1に曝露するとIL-Rシグナル伝達を伝達する

IL-12に対する細胞応答は、受容体の二量化ならびにSTAT4およびSTAT5のリン酸化によって開始される。リン酸化STAT4の発現を使用して、抗EGFR・CTBR12を発現するT細胞についてIL-12受容体シグナル伝達経路の活性化を評価した。

【0558】

IL-7に対する細胞応答は、受容体の二量化およびSTAT5のリン酸化によって開始される。したがって、リン酸化STAT5の発現を使用して、抗EGFR・CTBR7を発現するT細胞について、IL-7受容体シグナル伝達経路の活性化を評価した。

【0559】

10

20

30

40

50

健常ドナーPBM C由来の初代ヒトT細胞を可溶性CD3 (1 μg/ml) およびCD28 (5 μg/ml) で活性化し、ビヒクルまたは(i)抗EGFR CAR、(ii)抗EGFR CARおよびCTBR12 (抗EGFR, CTBR12)、および(iii)抗EGFR CARおよびCTBR7 (抗EGFR, CTBR7)を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、T細胞培養物を組換えヒトIL-12または組換えヒトTGFβ1で20分間(図16)または組換えヒトIL-7または組換えヒトTGFβ1で20分間(図17)処理した。

【0560】

抗EGFR CARまたは抗EGFR, CTBR12を発現するT細胞は、IL-12の存在下でリン酸化されたSTAT4のレベルの増加を示し(図16、左パネル)、抗EGFR, CTBR12を発現するT細胞のみが、TGFβ1の存在下でリン酸化されたSTAT4のレベルの増加を示す(図16、右下パネル)。

10

【0561】

抗EGFR CARまたは抗EGFR, CTBR7を発現するT細胞は、IL-7の存在下でリン酸化されたSTAT5のレベルの増加を示し(図17、左パネル)、抗EGFR, CTBR7を発現するT細胞のみが、TGFβ1の存在下でリン酸化されたSTAT4のレベルの増加を示す(図17、右下パネル)。

【0562】

実施例13

CTBR12を発現するCAR T細胞は、抗原およびTGFβ1に曝露するとIFNγの増加を分泌する。

20

健常ドナーPBM C由来の初代ヒトT細胞を可溶性CD3 (1 μg/ml) およびCD28 (5 μg/ml) で活性化し、ビヒクルまたは(i)抗EGFR CAR、(ii)抗EGFR CARおよび優性陰性TGFβ受容体(抗EGFR, DNR)、もしくは(iii)抗EGFR CARおよびCTBR12 (抗EGFR, CTBR12)を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、CARおよびCTBRを発現するT細胞を、5 ng/mLの組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下のいずれかで、ジャーカット細胞(EGFR(-))、A549細胞(EGFR(+))、またはHT1080細胞(EGFR(+))と共に48時間培養した。上清を回収し、可溶性サイトカイン含有量について、Luminexで分析した。

30

【0563】

組換えヒトTGFβ1の存在下で、EGFR(-)細胞株と比較してEGFR(+)細胞株と共に培養した場合に、CTBR12発現細胞は、より有意に大量のIFNγを産生した(図18)。

【0564】

実施例14

CTBRを共発現する抗EGFR CAR T細胞は、外因性IL-2の非存在下およびTGFβ1の存在下で、持続性のエフェクター活性を示す。

健常ドナーPBM C由来の初代ヒトT細胞を可溶性CD3 (1 μg/ml) およびCD28 (5 μg/ml) で活性化し、ビヒクルまたは(i)抗EGFR CAR、(ii)抗EGFR CARおよび優性陰性TGFβ受容体(抗EGFR, DNR)、(iii)抗EGFR CARおよびCTBR12 (抗EGFR, CTBR12)、および(iv)抗EGFR CARおよびCTBR7 (抗EGFR, CTBR7)を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、外因性IL-2サイトカイン支持の不在下で、細胞はインビトロ連続再刺激アッセイを受けた。

40

【0565】

簡潔に説明すると、ヒトEGFR抗原を発現する、GFP標識された標的細胞を使用し、組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下にて、CAR T細胞を連続的に増殖させた。5 ng/mLの組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下にて、CAR T細胞を、7日おきに1:1の比で標的細胞で刺激した。外因性IL-2はこのアッセイの

50

支持に使用されない。対照抗EGFR CAR T細胞は、第1の刺激を介して5 ng/mLの組換えヒトTGFβ1の存在下で、最小の増殖を示し、さらなる培養は行わなかった。DNRを共発現するCAR T細胞はまた、TGFβ1の存在下で増殖させた場合、増殖の低下を示した。対照的に、CTBR12またはCTBR7を共発現する抗EGFR CAR T細胞は、TGFβ1の不在下で増殖した同一細胞と比較して、増殖の増強を示した（図19）。これらのデータが、活性CTBR12またはCTBR7シグナル伝達が、CAR単独と比較してT細胞増殖を増加させたことを示した。

【0566】

実施例15

CTBRを共発現するNY-ESO1TCRT細胞は、外因性IL-2の非存在下およびTGFβ1の存在下で、持続性のエフェクター活性を示す。

10

例示的なTCR系のTGFβIL-12RおよびTGFβIL-Rシグナルコンバーター構築物を図20に示されるように設計した。

【0567】

IL-12Rβ1およびIL-12Rβ2の膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを抗NY-ESO1TCRをコードするレンチウイルスベクターにクローニングして、2A自己切断型ポリペプチド配列によって分離した（NY-ESO1.CTBR12）。

【0568】

IL-2RγおよびIL-7Rαの膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインをNY-ESO1TCRをコードするレンチウイルスベクターにクローニングして、2A自己切断型ポリペプチド配列によって分離した（NY-ESO1.CTBR7）。

20

【0569】

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性CD3（1 μg/mL）およびCD28（5 μg/mL）で活性化し、ビヒクルまたは（i）NY-ESO1TCR、（ii）NY-ESO1TCRおよび優性陰性TGFβ受容体（NY-ESO1.DNR）、（iii）NY-ESO1TCRおよびCTBR12（NY-ESO1.CTBR12）、および（iv）NY-ESO1TCRおよびCTBR7（NY-ESO1.CTBR7）を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、NY-ESO1TCRRおよびTGFβR2を発現する細胞表面をフローサイトメトリーによって決定した。すべての構築物を発現した。

30

【0570】

実施例16

NY-ESO1TCRおよびCTBR12またはNY-ESO1TCRおよびCTBR7を発現するT細胞によって阻害された免疫抑制TGFβシグナル伝達

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性CD3（1 μg/mL）およびCD28（5 μg/mL）で活性化し、ビヒクルまたは（i）NY-ESO1TCR、（ii）NY-ESO1TCRおよび優性陰性TGFβ受容体（NY-ESO1.DNR）、（iii）NY-ESO1TCRおよびCTBR12（NY-ESO1.CTBR12）、および（iv）NY-ESO1TCRおよびCTBR7（NY-ESO1.CTBR7）を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、培養物を10 ng/mLの組換えヒトTGFβ1で20分間処理した。SMAD2/3のリン酸化をリン酸化したSMAD2/3に特異的な抗体で評価した。DNR、CTBR12またはCTBR7を発現するT細胞をSMAD2/3のリン酸化から完全に保護した（図21）。これらのデータは、CTBR12またはCTBR7のいずれかの発現が、NY-ESO1TCRT細胞をTGFβ免疫抑制シグナル伝達に対して非感受性にすることを示した。

40

【0571】

実施例17

CTBRはTGFβ1に曝露するとIL-Rシグナル伝達を伝達する

IL-12に対する細胞応答は、受容体の二量化ならびにSTAT4およびSTAT5

50

のリン酸化によって開始される。リン酸化STAT4の発現を使用して、NY-ESO1・CTBR12を発現するT細胞について、IL-12受容体シグナル伝達経路の活性化を評価した。

【0572】

IL-7に対する細胞応答は、受容体の二量化およびSTAT5のリン酸化によって開始される。したがって、リン酸化STAT5の発現を使用して、NY-ESO1・CTBR7を発現するT細胞について、IL-7受容体シグナル伝達経路の活性化を評価した（させた）

【0573】

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性CD3（1 μg/mL）およびCD28（5 μg/mL）で活性化し、ビヒクルまたは（i）NY-ESO1TCRおよびCTBR12（NY-ESO1・CTBR12）、および（ii）NY-ESO1TCRおよびCTBR7（NY-ESO1・CTBR7）を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、T細胞培養物を組換えヒトIL-7または組換えヒトTGFβ1で20分間（図22、上段パネル）または組換えヒトIL-12または組換えヒトTGFβ1で20分間（図22、下段パネル）処理した。

【0574】

実施例18

CTBR12を発現するCAR T細胞は、抗原およびTGFβ1に曝露するとIFNγの増加を分泌する。

健常ドナーPBMC由来の初代ヒトT細胞を可溶性CD3（1 μg/mL）およびCD28（5 μg/mL）で活性化し、ビヒクルまたは（i）NY-ESO1TCR、（ii）NY-ESO1TCRおよび優性陰性TGFβ受容体（NY-ESO1・DNR）、（iii）NY-ESO1TCRおよびCTBR12（NY-ESO1・CTBR12）、および（iv）NY-ESO1TCRおよびCTBR7（NY-ESO1・CTBR7）を発現するレンチウイルスベクターを形質導入した。IL-2含有増殖培地で10日培養後、CARおよびCTBRを発現するT細胞を、5 ng/mLの組換えヒトTGFβ1の存在下または不存在下のいずれかで48時間、標的細胞に対してT細胞5：1の比で、SaOs2細胞（A2、NY-ESO1（+））またはA549 A2 NY-ESO1細胞（A2、NY-ESO1（+））と共に培養した。上清を回収し、可溶性サイトカイン含有量について、Luminexで分析した。

【0575】

A2およびNY-ESO1（+）細胞株と比較して組換えヒトTGFβ1の存在下で、A2およびNY-ESO1（+）細胞株と共に培養した場合に、CTBR12発現細胞は、より有意に大量のIFNγを産生した（図23）。CTBR発現細胞は、免疫抑制TGFβシグナル伝達に対する抵抗性を示す。

【0576】

全般に、以下の特許請求の範囲において、使用された用語は、本明細書および特許請求の範囲に開示されている特定の実施形態への特許請求の範囲に限定するものと解釈されるべきではないが、そのような特許請求の範囲が権利を与える等価物の完全な範囲とともに全ての可能な実施形態を含むものと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

10

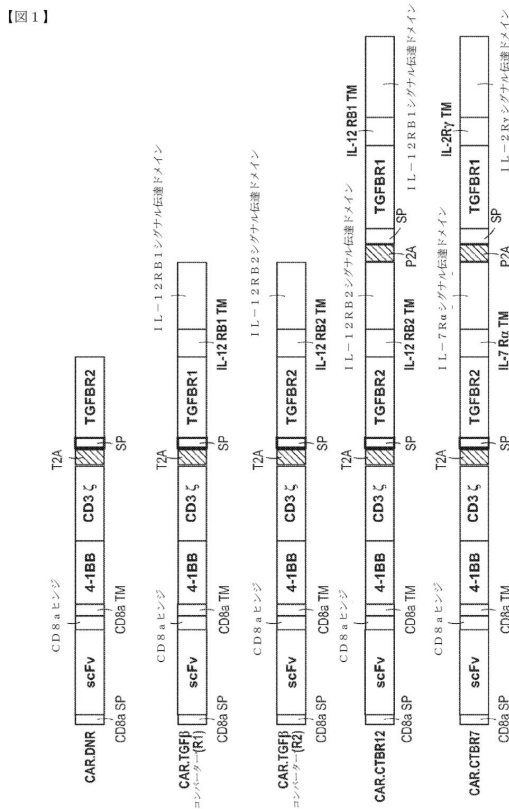
20

30

40

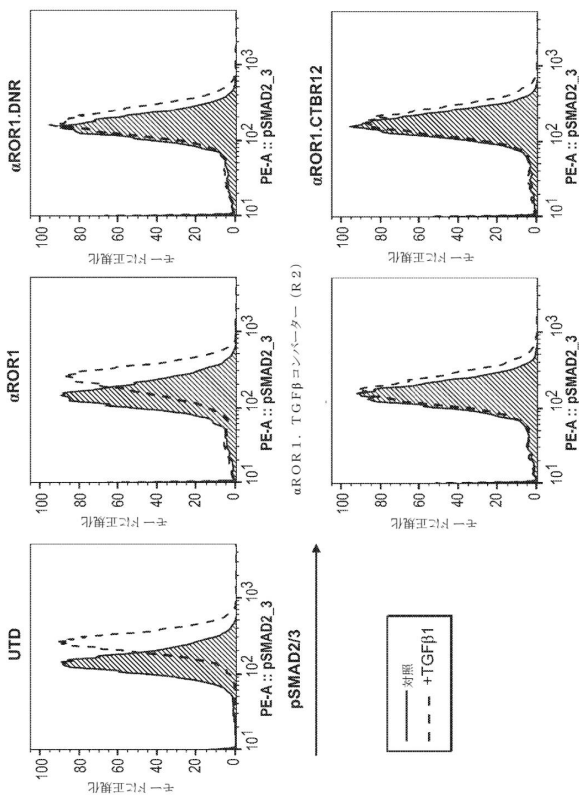
50

【図面】
【図 1】



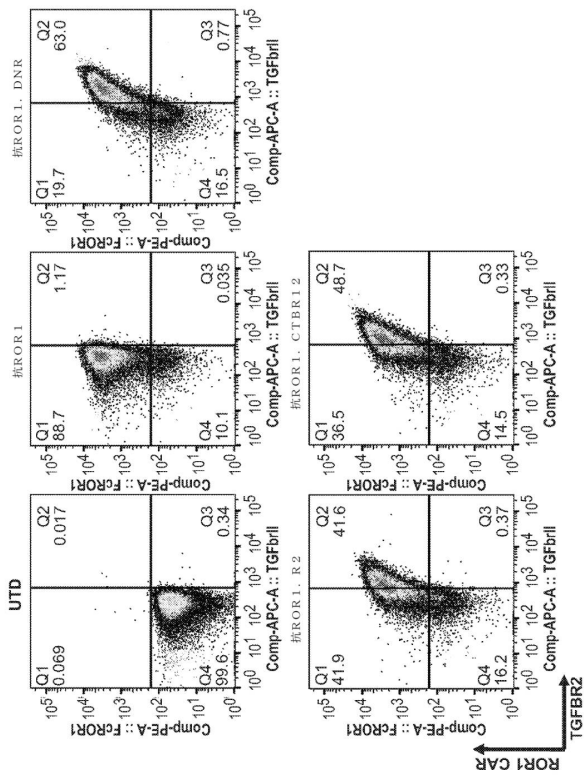
【図 3】

【図 3】



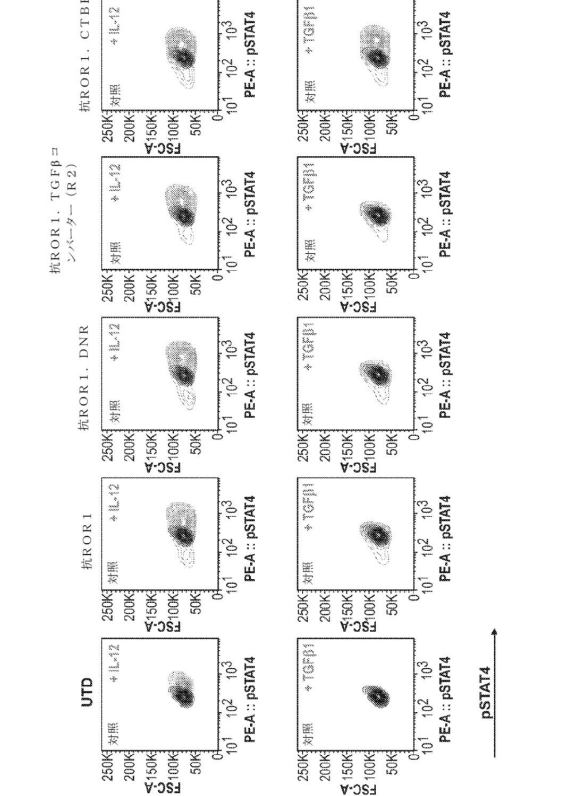
【図 2】

【図 2】



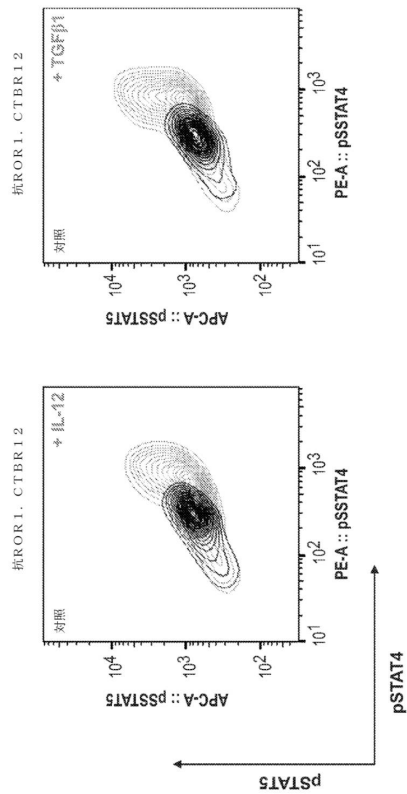
【図 4】

【図 4】



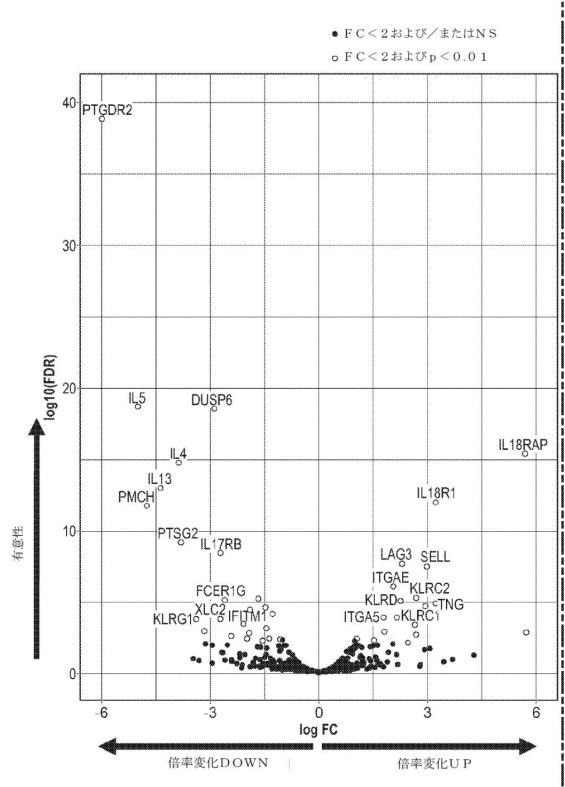
【図 5】

【図 5】



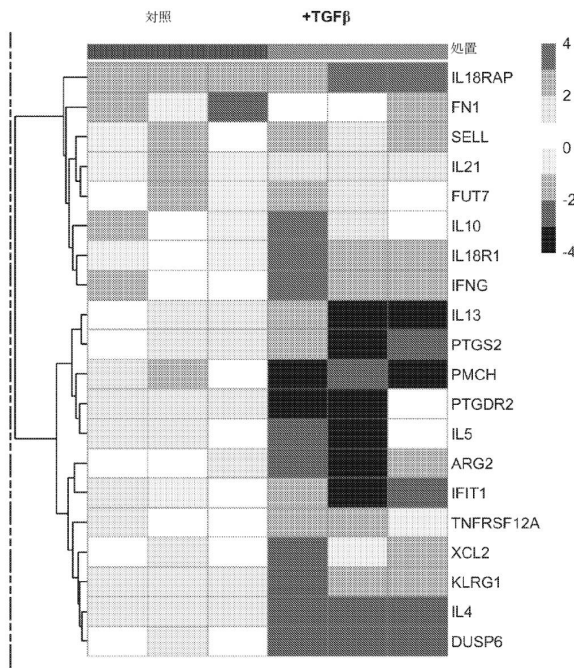
【図 6 - 1】

【図 6】



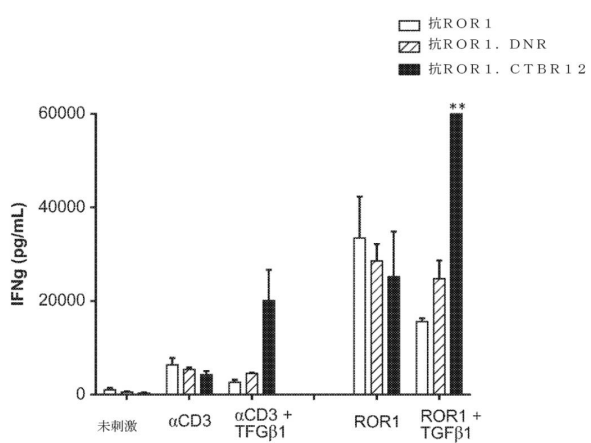
【図 6 - 2】

【図 6】 (続き)



【図 7】

【図 7】



* 3 ドナーからまとめたデータ
* *測定限界値-アッセイの線形範囲外

10

20

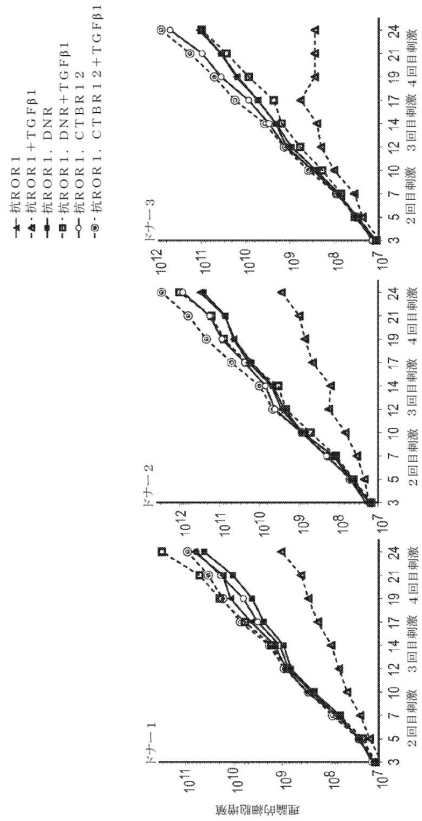
30

40

50

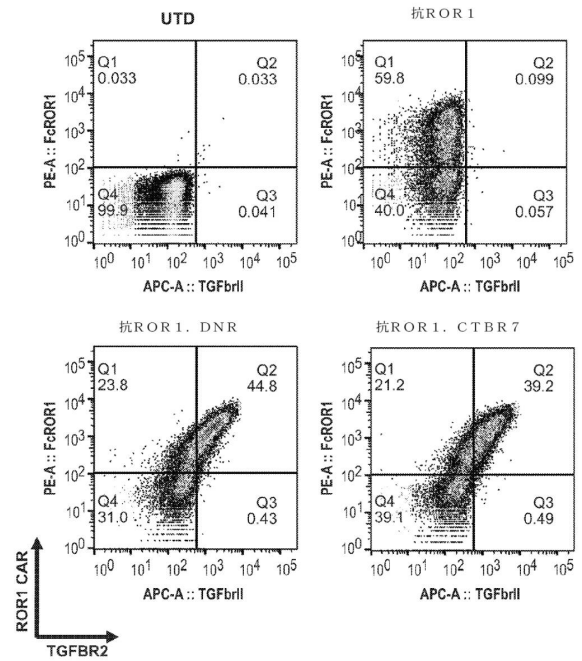
【図 8】

【図 8】



【図 9】

【図 9】

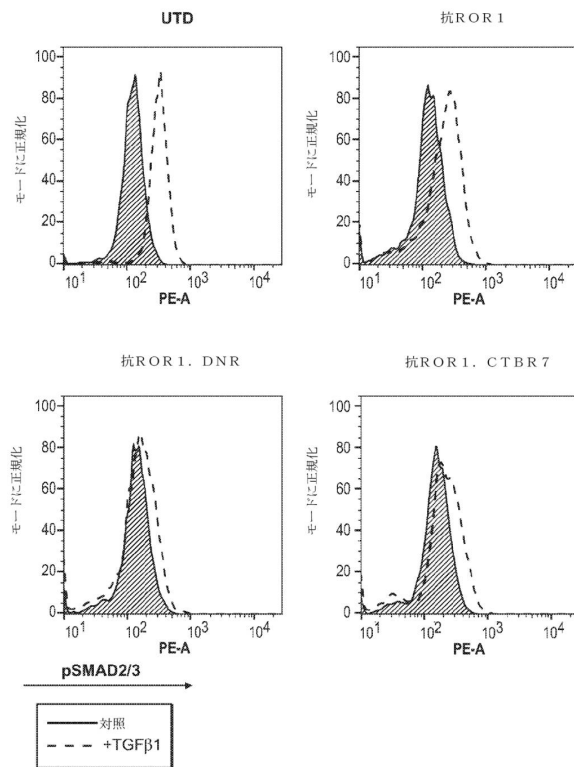


10

20

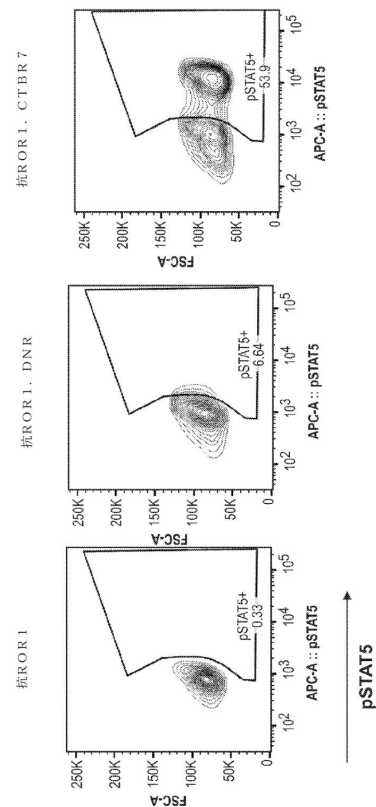
【図 10】

【図 10】



【図 11】

【図 11】



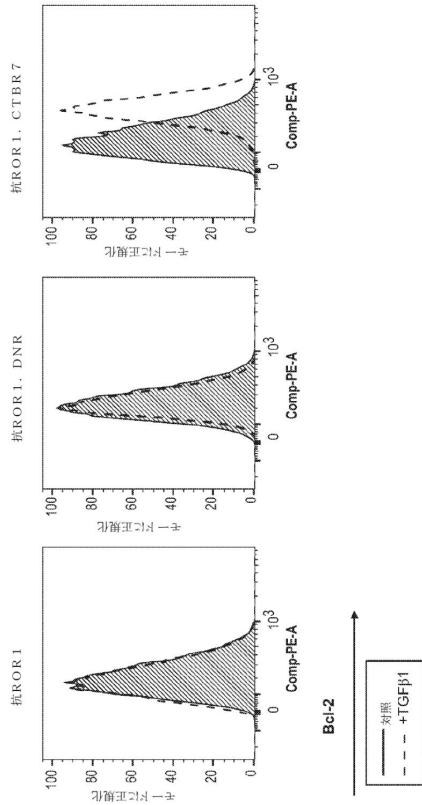
30

40

50

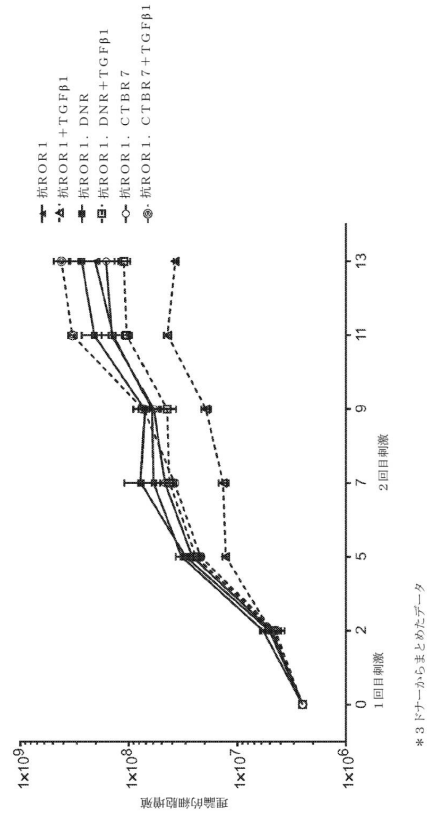
【図 1 2】

【図 1 2】



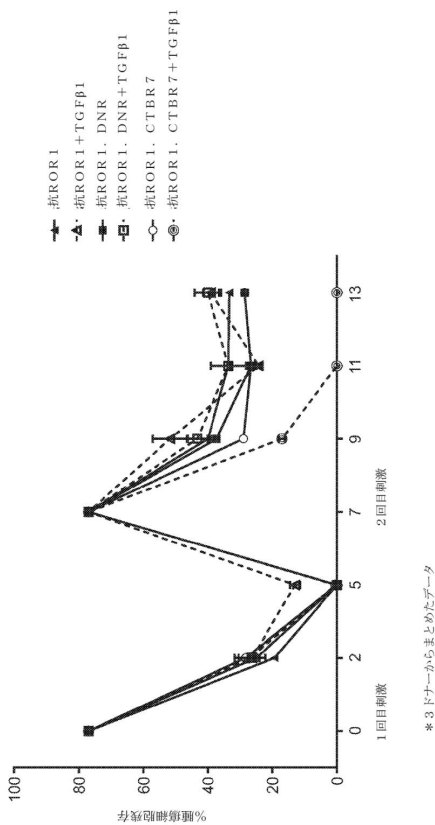
【図 1 3】

【図 1 3】



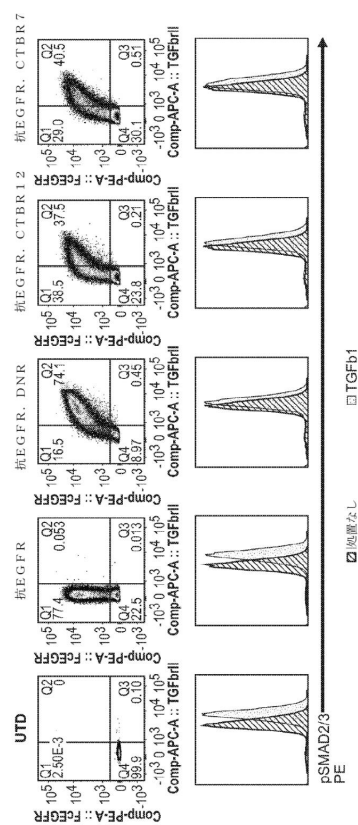
【図 1 4】

【図 1 4】



【図 1 5】

【図 1 5】



10

20

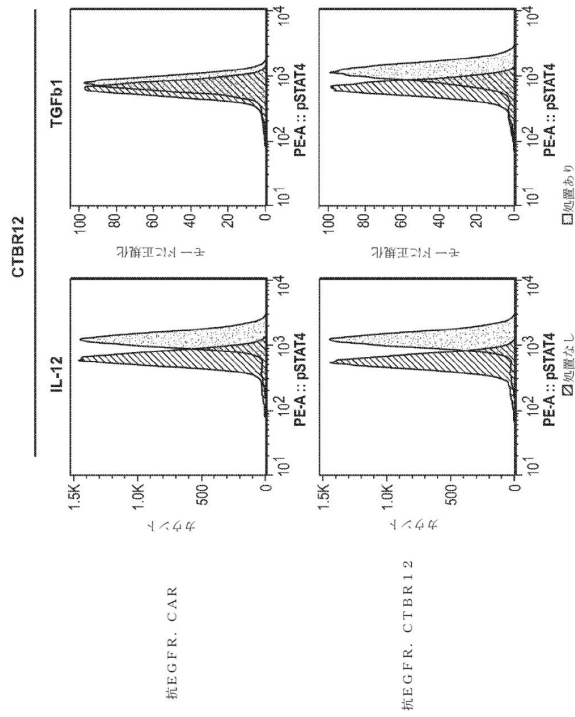
30

40

50

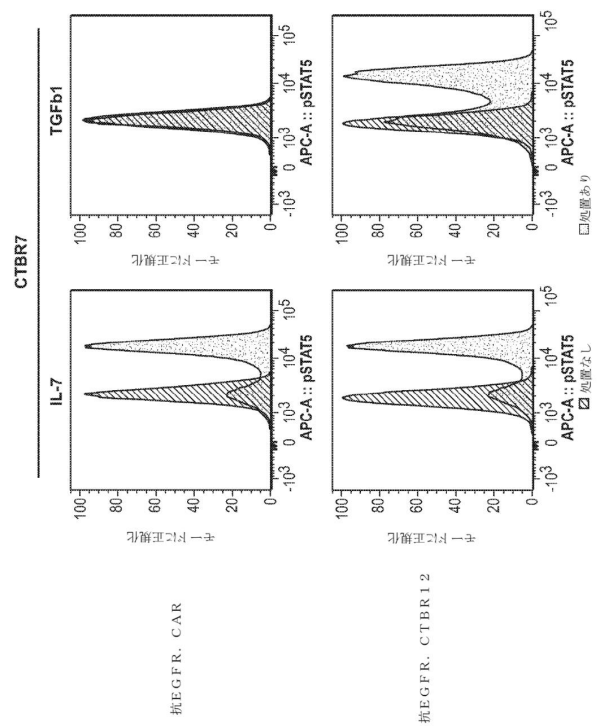
【図 16】

【図 16】



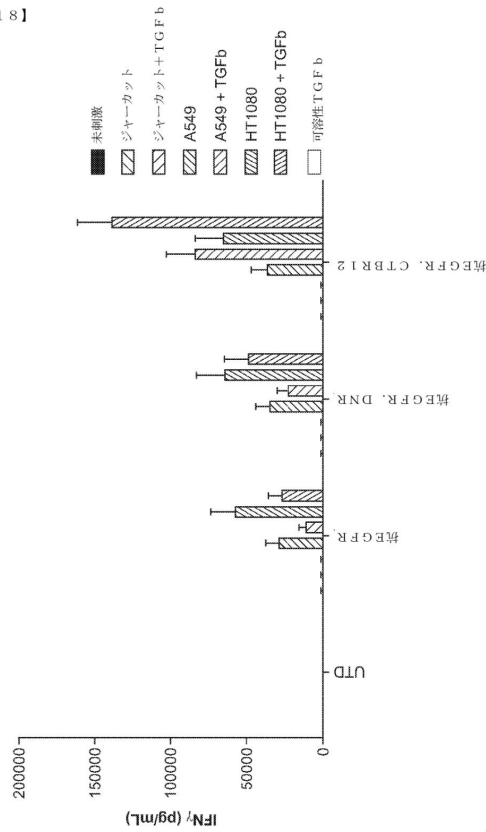
【図 17】

【図 17】



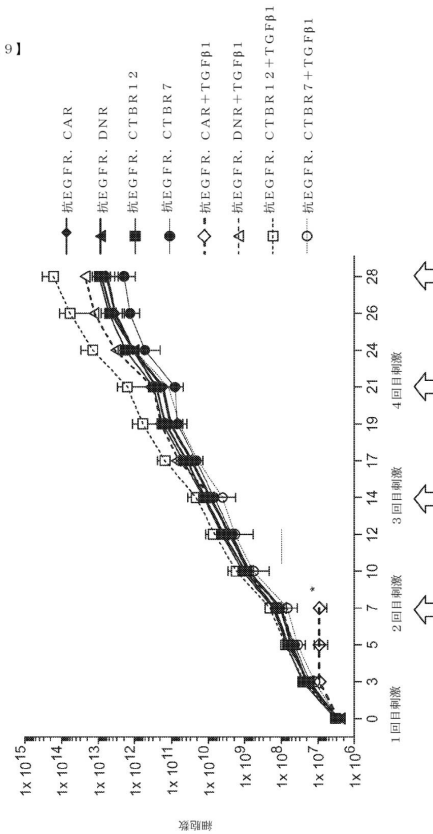
【図 18】

【図 18】



【図 19】

【図 19】



10

20

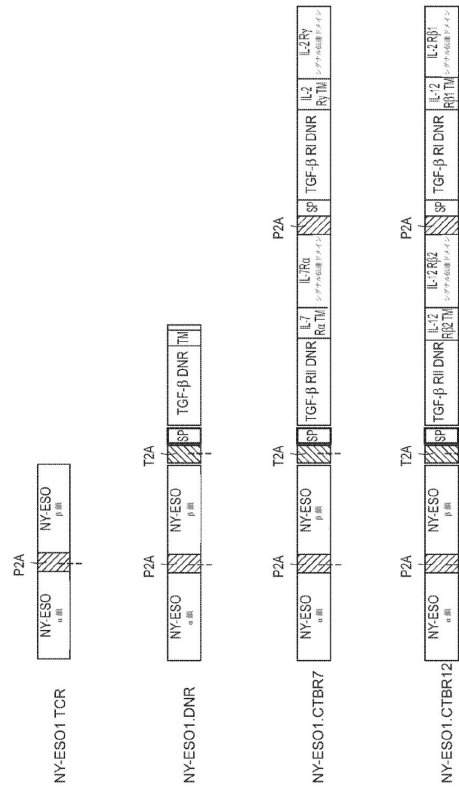
30

40

50

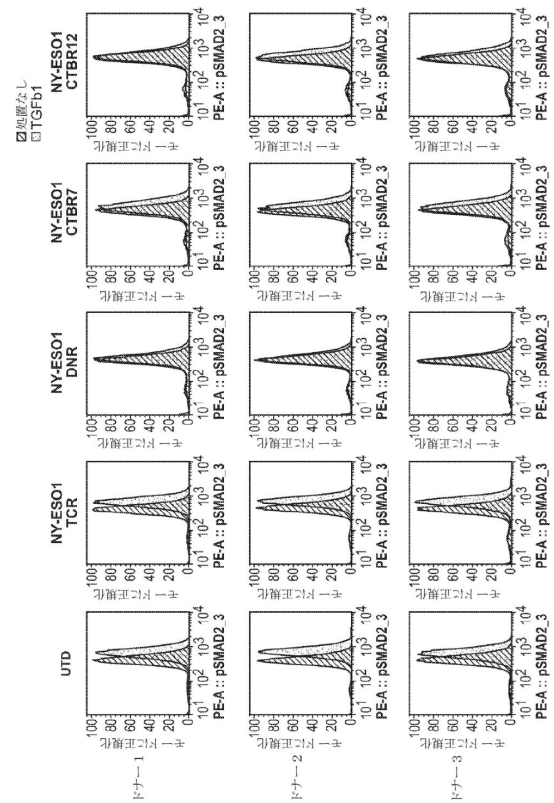
【図 2 0】

【図 2 0】



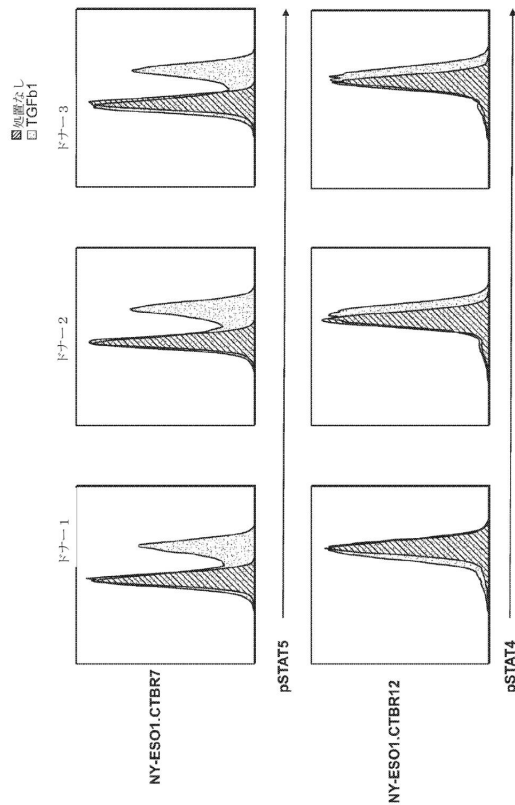
【図 2 1】

【図 2 1】



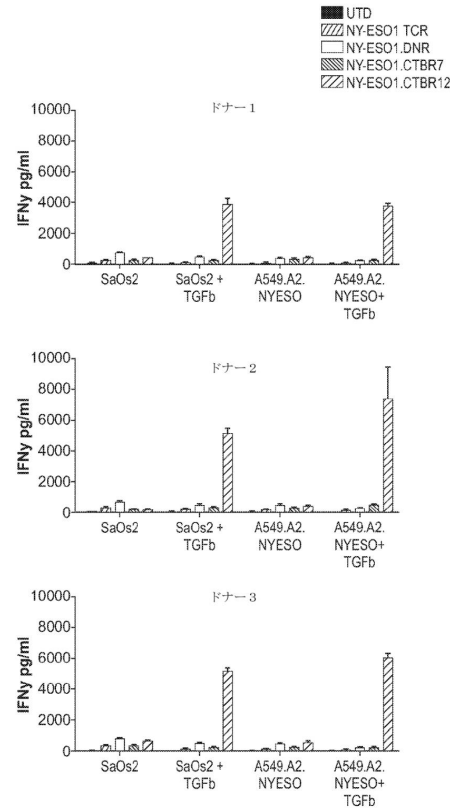
【図 2 2】

【図 2 2】



【図 2 3】

【図 2 3】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007263235000001.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	14/715 (2006.01)	C 0 7 K	14/715
C 0 7 K	16/24 (2006.01)	C 0 7 K	16/24
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/078(2010.01)	C 1 2 N	5/078
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
A 6 1 K	38/18 (2006.01)	A 6 1 K	38/18
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/15 (2015.01)	A 6 1 K	35/15
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28
A 6 1 K	35/26 (2015.01)	A 6 1 K	35/26
A 6 1 K	35/51 (2015.01)	A 6 1 K	35/51
A 6 1 K	35/13 (2015.01)	A 6 1 K	35/13
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ボイエリナス, ベンジャミン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルックライン, クーリッジ ストリート 170, アpartment 1

審査官 原 大樹

(56)参考文献 国際公開第2016/122738 (WO, A1)

特表2009-514541 (JP, A)

特表2016-520302 (JP, A)

Cancer Research, 2016年03月15日, 76, 6, 1578-1590

Molecular Therapy, 2014年05月, 22, Supplement 1, S298

動脈硬化, 1996年, 24, 4・5, 155-161

The Journal of Biological Chemistry, 2002年08月16日, 277, 33, 29355-29358

The Journal of Immunology, 2001年, 167, 1-5

The Journal of Immunology, 2005年, 174, 5351-5357

Gene Ther., 2008年, 15, 21, 1411-1423

タカラバイオ株式会社, 遺伝子導入実験ハンドブック, 2015年11月, p.1-10

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K

C 1 2 N

A 6 1 K

MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/CAPLUS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq