

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7620560号
(P7620560)

(45)発行日 令和7年1月23日(2025.1.23)

(24)登録日 令和7年1月15日(2025.1.15)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	9/88 (2006.01)	C 1 2 N	9/88	Z N A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52	
C 1 2 N	15/60 (2006.01)	C 1 2 N	15/60	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	
請求項の数 14 (全263頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-553006(P2021-553006)	(73)特許権者	519318535	
(86)(22)出願日	令和2年3月6日(2020.3.6)		オブシディアン セラピューティクス、	
(65)公表番号	特表2022-524081(P2022-524081 A)		インコーポレイテッド	
(43)公表日	令和4年4月27日(2022.4.27)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2	
(86)国際出願番号	PCT/US2020/021596		1 3 8, ケンブリッジ, マサチューセ	
(87)国際公開番号	WO2020/185632		ッツ アベニュー 1 0 3 0, フォース	
(87)国際公開日	令和2年9月17日(2020.9.17)	(74)代理人	フロア	
審査請求日	令和5年2月20日(2023.2.20)		100078282	
(31)優先権主張番号	62/826,487		弁理士 山本 秀策	
(32)優先日	平成31年3月29日(2019.3.29)	(74)代理人	100113413	
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 森下 夏樹	
米国(US)		(74)代理人	100181674	
(31)優先権主張番号	62/815,399		弁理士 飯田 貴敏	
(32)優先日	平成31年3月8日(2019.3.8)	(74)代理人	100181641	
	最終頁に続く		弁理士 石川 大輔	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 調整可能な制御のためのヒトカルボニックアンヒドラーゼ2組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2 (C A 2)を含む刺激反応要素 (S R E)であって、前記S R Eが、C A 2 (W Tのa a 2～2 6 0、L 1 5 6 H) (配列番号2 1 0 6 0 0)、C A 2 (L 1 5 6 H) (配列番号2 1 0 6 0 2)、またはC A 2 (W Tのa a 2～2 6 0、L 1 5 6 H、S 1 7 2 C、F 1 7 8 Y、E 1 8 6 D) (配列番号2 1 0 7 5 6)である、S R E。

【請求項2】

前記S R Eが、C A 2 (W Tのa a 2～2 6 0、L 1 5 6 H)であり、前記S R Eが、配列番号2 1 0 6 0 0を含む、請求項1に記載のS R E。

【請求項3】

前記S R Eが、C A 2 (L 1 5 6 H)であり、前記S R Eが、配列番号2 1 0 6 0 2を含む、請求項1に記載のS R E。

【請求項4】

前記S R Eが、1つまたはより多くの刺激物に対して反応性である、請求項1に記載のS R E。

【請求項5】

前記刺激物が、小分子であり、前記小分子が、アセタゾラミドまたはセレコキシブである、請求項4に記載のS R E。

【請求項6】

CA2生体回路システムであって、

(a) ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2 (CA2) を含む刺激反応要素 (SRE) であって、前記SREが、CA2 (WTのaa2～260、L156H) (配列番号210600)、CA2 (L156H) (配列番号210602)、またはCA2 (WTのaa2～260、L156H、S172C、F178Y、E186D) (配列番号210756) である、SRE；ならびに

(b) 前記SREに結合、付加または関連付けられる、少なくとも1つのペイロード、を含む、CA2生体回路システム。

【請求項7】

前記SREが、CA2 (WTのaa2～260、L156H) であり、前記SREが、配列番号210600を含む、請求項6に記載のCA2生体回路システム。

【請求項8】

前記SREが、CA2 (L156H) であり、前記SREが、配列番号210602を含む、請求項6に記載のCA2生体回路システム。

【請求項9】

前記ペイロードが、サイトカインまたはCARである、請求項6に記載のCA2生体回路システム。

【請求項10】

前記ペイロードが、IL-12、CD40L、またはCD19 CARである、請求項6に記載のCA2生体回路システム。

【請求項11】

前記IL-12が、膜結合型IL-12である、請求項10に記載のCA2生体回路システム。

【請求項12】

配列番号210927のアミノ酸配列を含む、請求項6に記載のCA2生体回路システム。

【請求項13】

配列番号210694、または配列番号211114のアミノ酸配列を含む、請求項6に記載のCA2生体回路システム。

【請求項14】

前記SREが、1つまたはより多くの刺激物に対して反応性であり、前記1つまたはより多くの刺激物が、小分子を含み、前記小分子が、アセタゾラミドまたはセレコキシブである、請求項6に記載のCA2生体回路システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年3月8日に出願された米国仮出願番号62/815,399；2019年3月8日に出願された米国仮出願番号62/815,402；2019年3月29日に出願された米国仮出願番号62/826,487；2019年3月29日に出願された米国仮出願番号62/826,443；2019年4月18日に出願された米国仮出願番号62/835,548；2019年4月18日に出願された米国仮出願番号62/835,552；及び2019年6月12日に出願された米国仮出願番号62/860,388の優先権の利益を主張する。前述した出願の内容全体は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照

本出願は、印刷された紙コピーの代わりにCD-Rで提出された「冗長な」配列表を含有し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2020年3月6日に作成及び記録された前記CD-Rは、それぞれ、「CRF」、「Copy 1」、「Copy 2」

10

20

30

40

50

「Copy 3」、及び「Copy 4」とラベルが付されており、各々は、268052-462540__SL.txtという名前の1つの同一の699,270,904バイト(MS-WINDOWSで測定される)のファイルのみを含有する。各CD-Rの機械可読フォーマットはIBM-PCであり、各コンパクトディスクのオペレーティングシステムはMS-Windowsである。

【0003】

分野

本開示は、少なくとも1つのペイロードのためのタンパク質安定性を調整し得るヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2)に由来する脱安定化ドメイン(DD)、ならびにその組成物及び使用方法に関する。本開示で提供されるものには、がん免疫療法において使用するためのCA2生体回路システム、CA2エフェクターモジュール、刺激反応要素(SRE)のポリペプチド、それをコードするポリヌクレオチド、そのポリペプチド及び／またはポリヌクレオチドを含有するベクター及び細胞が含まれる。

10

【背景技術】

【0004】

背景

遺伝子及び細胞療法は、薬物療法に革命をもたらし、これまでに解決困難な病態の処置のための新たな見通しを提供している。しかしながら、現在のほとんどの技術は、標的タンパク質誘導のタイミングまたはレベルの調節が不可能である。これにより、多くの潜在的な遺伝子及び細胞療法の適用は、安全かつ効果的に展開することが困難または不可能になっている。

20

【0005】

不適切な外因性及び／または内因性遺伝子コントロールは、多くの遺伝子及び細胞療法の背景において重要な問題である。また、この調整可能性の欠如により、狭いもしくは不安定な治療ウィンドウを有するタンパク質またはより調節されるもしくは一過性の発現を必要とするものを安全に発現させることが困難となる。

【0006】

制御されたタンパク質発現または機能に対する1つのアプローチは、脱安定化ドメイン(DD)の使用である。脱安定化ドメインは、対象となる標的タンパク質に付加され得る小さなタンパク質ドメインである。DDは、DD結合リガンドの非存在下で、結合された対象となるタンパク質を不安定にし、対象となるタンパク質は、細胞のユビキチン-プロテアソーム系によって急速に分解される。しかしながら、特定の小分子DD結合リガンドがDDに結合した場合、結合された対象となるタンパク質は安定化され、タンパク質機能が達成される。

30

【0007】

DD技術は、遺伝子の発現及び機能の調整可能かつ一時的なコントロールを提供し得る新たなクラスの細胞及び遺伝子療法の基礎を形成し、細胞及び遺伝子療法モダリティに安全かつ効果的に組み込まれ得るタンパク質治療剤の領域を拡大させる。

【発明の概要】

【0008】

本開示は、小分子依存性安定性を示すヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2)に由来する新規タンパク質ドメインを提供する。そのようなタンパク質ドメインは、脱安定化ドメイン(DD)と称される。その結合リガンドの非存在下で、DDは、DDに融合されたペイロード(例えば、対象となるタンパク質(POI))を脱安定化し、その分解を引き起こすのに対し、その結合リガンドの存在下では、融合されたDD及びペイロードは安定化され得、その安定性は用量依存的である。

40

【0009】

第1の態様では、本開示は、エフェクターモジュールを含む組成物を提供する。エフェクターモジュールは、刺激反応要素(SRE)及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、脱安定化ドメイン(DD)

50

)を含み、DDは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2;配列番号11717)の一領域または全体を含み、配列番号11717の位置122におけるアミノ酸(H122)のH122Y変異をさらに含む。

【0010】

第2の態様では、本開示は、エフェクターモジュールを含む組成物を提供する。エフェクターモジュールは、刺激反応要素(SRE)及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、脱安定化ドメイン(DD)を含み、DDは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2;配列番号11717)の一領域または全体を含み、配列番号11717の位置106におけるアミノ酸(E106)のE106D変異をさらに含む。

10

【0011】

本開示の第3の態様では、エフェクターモジュールを含む組成物が提供される。エフェクターモジュールは、刺激反応要素(SRE)及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、脱安定化ドメイン(DD)を含み、DDは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2;配列番号11717)の一領域または全体を含み、配列番号11717の位置208におけるアミノ酸(W208)のW208S変異をさらに含む。

【0012】

本開示の第4の態様では、エフェクターモジュールを含む組成物が提供される。エフェクターモジュールは、刺激反応要素(SRE)及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、脱安定化ドメイン(DD)を含み、DDは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2;配列番号11717)の一領域または全体を含み、配列番号11717の位置59におけるアミノ酸(I59)のI59N変異をさらに含む。

20

【0013】

本開示の第5の態様では、エフェクターモジュールを含む組成物が提供される。エフェクターモジュールは、刺激反応要素(SRE)及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、脱安定化ドメイン(DD)を含み、DDは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2;配列番号11717)の一領域または全体を含み、配列番号11717の位置156におけるアミノ酸(L156)のL156H変異をさらに含む。第5の態様に関連する実施形態では、DDは、(i)配列番号11717の位置4におけるアミノ酸(W4)のW4Y変異；(ii)配列番号11717の位置225におけるアミノ酸(F225)のF225L変異；(iii)配列番号11717の位置257～260におけるアミノ酸の欠失；(iv)配列番号11717の位置1～5におけるアミノ酸の欠失；または(v)配列番号11717のアミノ酸G234、E235及びP236の欠失をさらに含み、またはDDは、(i)L156H、S172C、F178Y、及びE186D；または(ii)D70N、D74N、D100N、及びL156Hに対応する変異を含む、配列番号11717に対する4つの変異を含む。

30

【0014】

第6の態様では、本開示は、エフェクターモジュールを含む組成物を提供する。エフェクターモジュールは、刺激反応要素(SRE)及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2;配列番号11717)の一領域または全体を含み、かつ配列番号11717に対する第1の変異及び第2の変異をさらに含む脱安定化ドメイン(DD)を含み、(i)第1の変異は、配列番号11717の位置73におけるアミノ酸(S73)のS73N変異であり、(ii)第2の変異は、配列番号11717のアミノ酸位置89(R89)におけるFまたはYの置換である。

40

【0015】

第7の態様では、エフェクターモジュールを含む組成物が提供される。エフェクターモ

50

ジュールは、刺激反応要素（SRE）及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2（CA2；配列番号11717）の一領域または全体を含み、かつ配列番号11717のアミノ酸位置56（S56）におけるNまたはFの置換をさらに含む脱安定化ドメイン（DD）を含む。

【0016】

第8の態様では、エフェクターモジュールを含む組成物が提供される。エフェクターモジュールは、刺激反応要素（SRE）及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2（CA2；配列番号11717）の一領域または全体を含み、かつ配列番号11717に対する1つまたはより多くの置換をさらに含む脱安定化ドメイン（DD）を含み、少なくとも1つの置換は、配列番号11717のアミノ酸位置63（G63）におけるDまたはNの置換であり、1つまたはより多くの置換は、G63D；G63D及びM240L；G63D、E69V及びN231I；またはT55K、G63N及びQ248Nに対応する。

【0017】

第9の態様では、エフェクターモジュールを含む組成物が提供される。エフェクターモジュールは、刺激反応要素（SRE）及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2（CA2；配列番号11717）の一領域または全体を含み、かつ配列番号11717に対する2つまたはより多くの置換をさらに含む脱安定化ドメイン（DD）を含み、2つまたはより多くの置換のうちの1つは、配列番号11717のアミノ酸位置71（D71）におけるLまたはKの置換である。様々な実施形態では、2つまたはより多くの置換は、D71L及びT87N；D71L及びL250R；D71L、T87N及びL250R；またはD71K及びT192Fに対応する。

【0018】

第10の態様では、エフェクターモジュールを含む組成物が提供される。エフェクターモジュールは、刺激反応要素（SRE）及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。様々な実施形態では、SREは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2（CA2；配列番号11717）の一領域または全体を含み、かつ配列番号11717に対する2つまたはより多くの置換をさらに含む脱安定化ドメイン（DD）を含む。2つまたはより多くの置換のうちの少なくとも1つは、（i）配列番号11717のアミノ酸位置241（V241）におけるFの置換、または（ii）配列番号11717のアミノ酸位置249（P249）におけるFもしくはLの置換であり、2つまたはより多くの置換は、D72F及びV241F；D72F及びP249L；D72F及びP249F；D72F、V241F及びP249L；A77I及びP249F；またはV241F及びP249Lに対応する。

【0019】

第11の態様では、本開示は、エフェクターモジュールを含む組成物を提供する。エフェクターモジュールは、刺激反応要素（SRE）及びSREに機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含む。SREは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2（CA2；配列番号11717）の一領域または全体を含み、かつY51T、L183S、Y193I、L197PならびにV134F及びL228Fの組み合わせから選択される、配列番号11717に対する1つまたはより多くの置換をさらに含む脱安定化ドメイン（DD）を含む。

【0020】

上記で提供される例示された態様のすべてに関連する実施形態では、SREは、1つまたはより多くの刺激物に対して反応性である。様々な実施形態では刺激物は、アセタゾラミド、セレコキシブ、バルデコキシブ、ロフェコキシブ、メタゾラミド、ドルゾラミド、プリンゾラミド、ジクロフェナミド、エトキシゾラミド、ゾニサミド、ダンシルアミド、

10

20

30

40

50

またはジクロルフェナミドから選択される小分子である。さらに、本明細書に記載され、例示される組成物は、DDを含み、DDは、DDにおける少なくとも1つの変異または置換を有し、これは、刺激物の非存在下でDD及び少なくとも1つのペイロードを脱安定化し、DD及びペイロードは、刺激物の存在下で安定化される。

【0021】

第12の態様では、本開示は、態様1～10に記載の組成物のうちの任意の1つまたはより多くを含む生体回路システム；態様1～10に記載の組成物、及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む薬学的組成物；態様1～10に記載の組成物をコードするポリヌクレオチド；態様1～10に記載の組成物をコードするポリヌクレオチドを含むベクター；態様1～10に記載の組成物をコードするポリヌクレオチドを含む細胞；態様1～10に記載の組成物をコードするポリヌクレオチドを含む細胞、及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。

10

【0022】

第13の態様では、本開示は、対象における疾患の処置を、それを必要とする対象において行う方法を提供する。方法は、(a)治療的有效量の態様11の細胞を対象に投与することであって、細胞は、疾患を処置するペイロードを含む、投与すること；及び(b)治療的有效量の刺激物を対象に投与することであって、SREは、刺激物に対して反応性である、投与することを含み、ペイロードの発現は、刺激物に反応して調節され、それにより疾患を処置する。

【0023】

20

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2；配列番号11717)に全体としてまたは部分的に由来する脱安定化ドメイン(DD)を含み得る刺激反応要素(SRE)を提供する。一実施形態では、DDは、CA2(配列番号11717)全体を含み得る。

【0024】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2；配列番号11717)の一領域または全体を含み、かつA115L、A116Q、A116V、A133L、A133T、A141P、A152D、A152L、A152R、A173C、A173G、A173L、A173T、A23P、A247L、A247S、A257L、A257S、A38P、A38V、A54Q、A54V、A54X、A65L、A65N、A65V、A77I、A77P、A77Q、C205M、C205R、C205V、C205W、C205Y、D101G、D101M、D110I、D129I、D138G、D138M、D138N、D161*、D161M、D161V、D164G、D164I、D174*、D174T、D179E、D179I、D179R、D189G、D189I、D19T、D19V、D242G、D242T、D32T、D34T、D41T、D52I、D52L、D71F、D71G、D71K、D71M、D71S、D71Y、D72I、D72S、D72T、D72X、D75T、D75V、D85M、E106D、E106G、E106S、E117*、E117N、E14N、E186*、E186N、E204A、E204D、E204G、E204N、E213*、E213G、E213N、E220K、E220R、E220S、E233D、E233G、E233R、E235*、E235G、E235N、E237K、E237R、E238*、E238N、E238R、E26S、E69D、E69K、E69S、F130L、F146V、F175I、F175L、F175S、F178L、F178S、F20L、F20S、F225I、F225L、F225S、F225Y、F230I、F230L、F230S、F259L、F259S、F66S、F70I、F70L、F95Y、G102D、G104R、G104V、G128R、G12D、G12E、G131E、G131R、G131W、G139D、G144D、G144V、G150A、G150S、G150W、G155A、G155C、G155D、G155S、G170A、G170D、G182A、G182W、G195A、G195R、G232R、G232W、G234L、G234V、G25E、G63D、G63V、G81E、G81V、G8

30

40

50

2D、G86A、G86D、G98V、H107I、H107Q、H119T、H119Y、H122T、H122Y、H15L、H15T、H15Y、H17D、H17I、H36I、H36Q、H64M、H94T、H96T、I145F、I145M、I166H、I166L、I209D、I209L、I215H、I215S、I22L、I255N、I255S、I33S、I59F、I59N、I59S、I91F、K111E、K111N、K112R、K113I、K113N、K126N、K132E、K132R、K148E、K148R、K153*、K153N、K158E、K158N、K167*、K169N、K169R、K171Q、K171R、K18R、K212N、K212Q、K212R、K212W、K224E、K224N、K227*、K227N、K24R、K251E、K251R、K256Q、K260F、K260L、K260Q、K39S、K45N、K45S、K80M、K80R、L118F、L120W、L140V、L140W、L143*、L147*、L147F、L156F、L156H、L156P、L156Q、L163A、L163W、L183P、L183S、L184F、L184P、L188P、L188W、L197*、L197M、L197P、L197R、L197T、L202F、L202H、L202I、L202P、L202R、L202S、L203P、L203S、L203W、L211*、L211A、L211S、L223*、L223I、L223V、L228F、L228H、L228T、L239*、L239F、L239T、L250*、L250P、L250T、L44*、L44M、L47C、L47V、L57*、L57X、L60S、L79F、L79S、L84W、L90*、L90V、M240D、M240L、M240R、M240W、N11D、N11K、N124T、N177*、N177T、N229*、N229T、N231D、N231F、N231K、N231L、N231M、N231Q、N231T、N243Q、N243T、N252E、N252T、N61R、N61T、N61Y、N62K、N62M、N67D、N67T、P137L、P13A、P13H、P13L、P13S、P154L、P154R、P154T、P180L、P180S、P185L、P185S、P185V、P194Q、P200A、P200L、P200S、P200T、P201A、P201L、P201R、P201S、P214T、P236L、P236T、P246L、P246Q、P249A、P249F、P249H、P249I、P249X、P30L、P30S、P42L、P83A、Q103K、Q135S、Q136N、Q157R、Q157S、Q221A、Q221R、Q248F、Q248L、Q248S、Q254A、Q254K、Q28S、Q53H、Q53K、Q53N、Q74R、Q92H、Q92S、R181H、R181S、R181V、R226H、R226P、R226V、R245A、R253G、R253Q、R27A、R58G、R89D、R89F、R89I、R89X、R89Y、S105L、S105Q、S151A、S151I、S151Q、S165F、S165P、S172E、S172V、S187I、S187P、S196H、S196L、S216A、S216Q、S218A、S218Q、S219A、S219Q、S258F、S258P、S29C、S29P、S43P、S43T、S48L、S50P、S56F、S56N、S56P、S56X、S73L、S73N、S73X、S99H、T108L、T125I、T125P、T168K、T168N、T168Q、T176H、T176L、T192D、T192F、T192I、T192N、T192P、T192X、T198D、T198I、T198P、T199A、T199H、T199P、T207D、T207I、T207P、T207S、T35I、T35L、T37Q、T55L、T87L、V109M、V109W、V121F、V134C、V134F、V142F、V149G、V149L、V159L、V159S、V160C、V160L、V162A、V162C、V206*、V206C、V206M、V210C、V217L、V217R、V217S、V222A、V222C、V222G、V241G、V241W、V241X、V31L、V49F、V68L、V68W、V78C、W123G、W123R、W16G、W191*、W191G、W191L、W208G、W208L、W208S、W244*、W244G、W244L、W97C、W97G、Y114H、Y114M、Y127M、Y190*

10

20

30

40

50

、Y190L、Y190T、Y193C、Y193F、Y193I、Y193L、Y193T、Y193V、Y193X、Y40M、Y51F、Y51M、Y51T、Y51X、Y88T、K9N、及びS29Aから選択される配列番号11717に対する変異をさらに含むDDを提供する。

【0025】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2（CA2；配列番号11717）の一領域または全体を含み、かつE106D、G63D、H122Y、I59N、L156H、L183S、L197P、S56F、S56N、W208S、Y193I、及びY51Tから選択される配列番号11717に対する変異をさらに含むDDを提供する。

【0026】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2（CA2；配列番号11717）の一領域または全体を含み、かつ配列番号11717に対する2つまたはより多くの変異をさらに含むDDを提供する。いくつかの実施形態では、DDは、CA2（WTのaa2～260、R27L、H122Y）、CA2（WTのaa2～260、T87I、H122Y）、CA2（WTのaa2～260、H122Y、N252D）、CA2（WTのaa2～260、D72F、V241F）、CA2（WTのaa2～260、V241F、P249L）、CA2（WTのaa2～260、D72F、P249L）、CA2（WTのaa2～260、D71L、L250R）、CA2（WTのaa2～260、D72F、P249F）、CA2（WTのaa2～260、T55K、G63N、Q248N）、CA2（WTのaa2～260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del）、CA2（WTのaa2～260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del）、CA2（WTのaa2～260、W4Y、L156H）、CA2（WTのaa2～260、L156H、G234del、E235del、P236del）、CA2（WTのaa2～260、L156H、F225L）、CA2（WTのaa2～260、D70N、D74N、D100N、L156H）、（CA2（WTのaa2～260、I59N、G102R）（配列番号210598）、CA2（WTのaa2～260、G63D、E69V、N231I）（配列番号210748）、CA2（WTのaa2～260、R27L、T87I、H122Y、N252D）（配列番号210702）、CA2（WTのaa2～260、D72F、V241F、P249L）（配列番号210503）、CA2（WTのaa2～260、D71L、T87N、L250R）（配列番号210510）、CA2（WTのaa2～260、L156H、S172C、F178Y、E186D）（配列番号210756）、CA2（WTのaa2～260、D71F、N231F）（配列番号210505）、CA2（WTのaa2～260、A77I、P249F）（配列番号210514）、CA2（WTのaa2～260、D71K、P249H）（配列番号210516）、CA2（WTのaa2～260、D72F、P249H）（配列番号210518）、CA2（WTのaa2～260、Q53N、N61Y）（配列番号210521）、CA2（WTのaa2～260、E106D、C205S）（配列番号210523）、CA2（WTのaa2～260、C205S、W208S）（配列番号210525）、CA2（WTのaa2～260、S73N、R89Y）（配列番号210532）、CA2（WTのaa2～260、D71K、T192F）（配列番号210534）、CA2（WTのaa2～260、Y193L、K260L）（配列番号210540）、CA2（WTのaa2～260、D71F、V241F、P249L）（配列番号210544）、CA2（WTのaa2～260、L147F、Q248F）（配列番号210548）、CA2（WTのaa2～260、D52I、S258P）（配列番号210550）、CA2（WTのaa2～260、D72S、T192N）（配列番号210552）、CA2（WTのaa2～260、D179E、T192I）（配列番号210554）、CA2（WTのaa2～260、S56N、Q103K）（配列番号210558）、CA2（WTのaa2～260、D71Y、Q248L）（配列番号210560）、CA2（WT

10

20

30

40

50

の a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 N、R 8 9 F) (配列番号 2 1 0 5 6 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、N 2 3 1 L、E 2 3 5 G、L 2 3 9 F) (配列番号 2 1 0 5 6 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、P 2 4 9 I) (配列番号 2 1 0 5 6 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 X、V 2 4 1 X、P 2 4 9 X) (配列番号 2 1 0 5 7 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 5 4 X、S 5 6 X、L 5 7 X、T 1 9 2 X) (配列番号 2 1 0 5 7 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、Y 1 9 3 V、K 2 6 0 F) (配列番号 2 1 0 5 7 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、M 2 4 0 L) (配列番号 2 1 0 5 7 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、V 1 3 4 F、L 2 2 8 F) (配列番号 2 1 0 5 8 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 G、N 2 3 1 K) (配列番号 2 1 0 5 8 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、S 5 6 F、D 7 1 S) (配列番号 2 1 0 5 8 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 5 2 L、G 1 2 8 R、Q 2 4 8 F) (配列番号 2 1 0 5 8 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 X、R 8 9 X) (配列番号 2 1 0 5 8 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、Y 5 1 X、D 7 2 X、V 2 4 1 X、P 2 4 9 X) (配列番号 2 1 0 5 9 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 I、W 9 7 C) (配列番号 2 1 0 5 9 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、T 1 9 2 F、N 2 3 1 F) (配列番号 2 1 0 5 9 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、H 3 6 Q、S 4 3 T、Y 5 1 F、N 6 7 D、G 1 3 1 W、R 2 2 6 H) (配列番号 2 1 0 6 9 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、F 7 0 I、F 1 4 6 V) (配列番号 2 1 0 7 0 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、K 4 5 N、V 6 8 L、H 1 1 9 Y、K 1 6 9 R、D 1 7 9 E) (配列番号 2 1 0 7 0 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、H 1 5 L、A 5 4 V、K 1 1 1 E、E 2 2 0 K、F 2 2 5 I) (配列番号 2 1 0 7 0 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、P 1 3 S、P 8 3 A、D 1 0 1 G、K 1 1 1 N、F 2 3 0 I) (配列番号 2 1 0 7 0 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、W 1 2 3 R、E 2 2 0 K) (配列番号 2 1 0 7 1 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、N 1 1 D、E 6 9 K、G 8 6 D、V 1 0 9 M、K 1 1 3 I、T 1 2 5 I、D 1 3 8 G、G 1 5 5 S) (配列番号 2 1 0 7 1 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 N、G 1 0 2 R、A 1 7 3 T) (配列番号 2 1 0 7 1 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、L 7 9 F、P 1 8 0 S) (配列番号 2 1 0 7 1 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 7 7 P、G 1 0 2 R、D 1 3 8 N) (配列番号 2 1 0 7 2 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、F 2 0 L、K 4 5 N、G 6 3 D、E 6 9 V、N 2 3 1 I) (配列番号 2 1 0 7 2 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、T 1 9 9 N、L 2 0 2 P、L 2 2 8 F) (配列番号 2 1 0 7 2 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、K 9 N、H 1 2 2 Y、T 1 6 8 K) (配列番号 2 1 0 7 3 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、Q 5 3 H、L 9 0 V、Q 9 2 H、G 1 3 1 E) (配列番号 2 1 0 7 3 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、L 4 4 M、L 4 7 V、N 6 2 K、E 6 9 D) (配列番号 2 1 0 7 3 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 5 V、K 1 6 9 N、F 2 5 9 L) (配列番号 2 1 0 7 3 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、T 2 0 7 S、V 2 2 2 A、N 2 3 1 D) (配列番号 2 1 0 7 4 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 F、V 2 0 6 M、G 2 3 2 R) (配列番号 2 1 0 7 4 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、P 1 3 A、A 1 3 3 T) (配列番号 2 1 0 7 4 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 N、R 8 9 I) (配列番号 2 1 0 7 5 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 6 5 N、G 8 6 D、G 1 3 1 R、G 1 5 5 D、K 1 5 8 N、V 1 6 2 A、G 1 7 0 D、P 2 3 6 L) (配列番号 2 1 0 7 5 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 1 2 R、H 1 5 Y、D 1 9 V) (配列番号 2 1 0 7 5 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 6 5 V、F 9 5 Y、E 1 0 6 G、H 1 0 7 Q、I 1 4 5 M、F 1 7 5 I) (配列番号 2 1 0 7 5 8)、及び／または C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、E 6 9 V、N 2 3 1 I) (配列番号 2 1 0 8 5 1 または 2 1 0 8 4 7) を含み得る。

【0027】

いくつかの実施形態では、D D は、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、R 2 7 L、H 1 2 2 Y)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、T 8 7 I、H 1 2 2 Y)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、H 1 2 2 Y、N 2 5 2 D)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、V

10

20

30

40

50

241F)、CA2(WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2(WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2(WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2(WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2(WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2(WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2(WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2(WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2(WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2(WTのaa2~260、I59N、G102R)(配列番号210598)、CA2(WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I)(配列番号210748)、CA2(WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D)(配列番号210702)、CA2(WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L)(配列番号210503)、CA2(WTのaa2~260、D71L、T87N、L250R)(配列番号210510)、CA2(WTのaa2~260、L156H、S172C、F178Y、E186D)(配列番号210756)、CA2(WTのaa2~260、A77I、P249F)(配列番号210514)、CA2(WTのaa2~260、E106D、C205S)(配列番号210523)、CA2(WTのaa2~260、C205S、W208S)(配列番号210525)、CA2(WTのaa2~260、S73N、R89Y)(配列番号210532)、CA2(WTのaa2~260、D71K、T192F)(配列番号210534)、CA2(WTのaa2~260、S73N、R89F)(配列番号210562)、CA2(WTのaa2~260、G63D、M240L)(配列番号210578)、CA2(WTのaa2~260、V134F、L228F)(配列番号210580)、及び／またはCA2(WTのaa2~260、S56F、D71S)(配列番号210584)を含み得る。

10

20

【0028】

本明細書に記載のSREは、1つまたはより多くの刺激物に対して反応性であり得る。そのような刺激物は、小分子、例えば、限定されないが、アセタゾラミド、セレコキシブ、バルデコキシブ、ロフェコキシブ、メタゾラミド、ドルゾラミド、ブリンゾラミド、ジクロフェナミド、エトキシゾラミド、ゾニサミド、ダンシルアミド、及びジクロルフエナミドであり得る。実施形態では、小分子は、アセタゾラミドであり得る。いくつかの態様では、刺激物は、セレコキシブであり得る。

30

【0029】

本開示は、1つのエフェクターモジュールを含むCA2生体回路システムを提供する。そのようなエフェクターモジュールは、刺激反応要素(SRE)を含み得る。本明細書では、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2(CA2;配列番号11717)の一領域または全体を含むSREを有する生体回路が提供される。

【0030】

CA2生体回路システムに含まれるペイロードは、治療剤、天然タンパク質、融合ポリペプチド、抗体またはそのバリエーションもしくは断片であり得る。

40

【0031】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、治療剤であり得る。いくつかの実施形態では、治療剤は、サイトカイン、キメラ抗原受容体、サイトカインまたはサイトカイン-サイトカイン受容体融合タンパク質であり得る。

【0032】

CA2生体回路システムは、1つまたはより多くの刺激物に対して反応性であり得る。一態様では、刺激物は、小分子、例えば、限定されないが、アセタゾラミド、セレコキシブ、バルデコキシブ、ロフェコキシブ、メタゾラミド、ドルゾラミド、ブリンゾラミド、ジクロフェナミド、エトキシゾラミド、ゾニサミド、ダンシルアミド、またはジクロルフ

50

エナミドであり得る。一実施形態では、小分子は、アセタゾラミドであり得る。別の態様では、小分子は、セレコキシブであり得る。

【0033】

本明細書ではまた、本明細書に記載のSRE、生体回路システム及び／または組成物をコードするポリヌクレオチドならびにそのポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。本開示はまた、本明細書に記載のCA2生体回路及び／または組成物ならびに薬学的に許容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を記載している。

【0034】

前述の及び他の目的、特徴、及び利点は、添付の図面に示されているように、以下の本開示の特定の実施形態の説明から明らかになる。図面は、必ずしも縮尺通りではなく、代わりに、本開示の様々な実施形態の原理を例示することに重点が置かれている。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】CA2キメラ抗原受容体のリガンド依存性制御を示している。

【図2】アセタゾラミドの様々な用量に対するCA2生体回路の反応を示している。

【図3】OT-002347（CA2-070としてラベルが付されている）及びOT-001978（CA2-026としてラベルが付されている）についてのアセタゾラミド反応を示している。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本開示の1つまたはより多くの実施形態の詳細が添付の明細書において以下に説明されている。本明細書に記載のものと同様または同等の任意の物質及び方法が本開示の実施または試験において使用され得るが、好ましい物質及び方法をこれより説明する。本開示の他の特徴、目的及び利点は、明細書から明らかになる。明細書において、単数形には、文脈が別段明らかに示さない限り、複数形も含まれる。別段定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的及び科学的用語は、本開示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。矛盾がある場合、本明細書が優先する。

【0037】

I. 組成物

生体回路または生体回路システム

本開示によれば、生体回路システムであって、それらのコアにおいて、少なくとも1つのエフェクターモジュールを含む、生体回路システムが提供される。そのようなエフェクターモジュール（複数可）は、独立して、1つまたはより多くの刺激反応要素（SRE）と関連付けられ、または一体となっている。通常、刺激反応要素（SRE）は、対象となる任意のタンパク質（POI）（例えば、免疫療法剤）であり得るペイロードに機能可能に連結されてエフェクターモジュールが形成され得る。SREは、特定の刺激物、例えば、小分子によって活性化された場合は、安定化シグナルもしくは脱安定化シグナルまたは任意の他のタイプの制御を持続させることによって、連結されたペイロードの転写及び／またはタンパク質レベルを上方または下方のいずれかに制御するためのシグナルまたはアウトカムを生成し得る。生体回路システムの多くの詳細な説明は、2016年4月11日に
出願された共有米国仮特許出願番号62/320,864、2017年3月3日に
出願された62/466,596及び国際公開WO2017/180587（その各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている。本開示によれば、免疫療法のために使用される任意の薬剤の発現レベル及び活性を調整する生体回路システム、エフェクターモジュール、SRE及び成分が提供される。

【0038】

本明細書で使用される場合、「生体回路」または「生体回路システム」は、生体系内のまたは生体系において有用な回路であって、刺激物及び刺激物に対して反応性の少なくとも1つのエフェクターモジュールを含み、刺激物に対する反応は、生体系内で、生体系間で、生体系の指標として、または生体系上で少なくとも1つのシグナルまたはアウトカム

10

20

30

40

50

を生み出す、回路として定義される。生体系は通常、動物、植物、真菌、細菌、またはウイルスにかかわらず、任意の細胞、組織、器官、器官システムまたは生物と理解される。生体回路は、本開示によって教示される刺激物またはエフェクターモジュールを用い、診断、レポーターシステム、デバイス、アッセイまたはキットなどの無細胞環境においてシグナルまたはアウトカムをもたらす人工回路であり得ることも理解される。人工回路は、1つまたはより多くの電気性、磁気性、または放射性成分または部分に関連付けられ得る。

【0039】

本開示によれば、生体回路システムは、脱安定化ドメイン（DD）生体回路システム、キメラ抗原受容体（CAR）生体回路システム（例えば、I/O生体回路システム）、二量化生体回路システム、受容体生体回路システム、及び細胞生体回路システムであり得る。これらのシステムのいずれかは、これらの生体回路システムの任意の他のものに対するシグナルとして作用し得る。

【0040】

エフェクターモジュール

本開示の生体回路は、少なくとも1つのエフェクターモジュールを含む。本明細書で使用される場合、「エフェクターモジュール」は、少なくとも（a）1つまたはより多くの刺激反応要素（SRE）及び（b）1つまたはより多くのペイロード（例えば、対象となるタンパク質（POI））を含む単一または複数成分のコンストラクトまたは複合体である。

【0041】

エフェクターモジュールは、1つまたはより多くのペイロード、1つまたはより多くのSRE、1つまたはより多くの切断部位、1つまたはより多くのシグナル配列及び1つまたはより多くのリンカー存在または非存在を含む1つまたはより多くの追加の特徴を含むように設計され得る。本開示の代表的なエフェクターモジュールの実施形態は、国際公開番号WO2017/180587（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）における図2～6で示されている。そのようなエフェクター分子を利用する生体回路及び成分は、国際公開番号WO2017/180587（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）における図7～12に提供されている。

【0042】

国際公開番号WO2017/180587における図2に示されているように、1つのペイロード、すなわち、1つの免疫療法剤を含む代表的なエフェクターモジュールの実施形態が示されている。エフェクターモジュールの各成分は、切断部位を有さない（A～F）または有する（G～Z、及びAA～DD）様々な配置で位置し、または配置され得る。任意のリンカーが、エフェクターモジュールの各成分の間に挿入され得る。

【0043】

国際公開番号WO2017/180587における図3～6は、2つのペイロード、すなわち、2つの免疫療法剤を含む代表的なエフェクターモジュールの実施形態を示している。いくつかの態様では、2つを超える免疫療法剤（ペイロード）が、同じSRE（例えば、同じDD）の制御下でエフェクターモジュールに含まれ得る。2つまたはより多くの薬剤は、互いに直接連結されていてもよく、または離れていてもよい。SREは、コンストラクトのN末端、もしくはコンストラクトのC末端、または内部位置に配置され得る。

【0044】

いくつかの実施形態では、本開示の生体回路は、それらの免疫原性を低下させるために改変され得る。免疫原性は、外来物として認識される物質に対する一連の複雑な反応の結果であり、中和及び非中和抗体の生成、免疫複合体の形成、補体活性化、肥満細胞活性化、炎症、過敏症反応、ならびにアナフィラキシーを含み得る。タンパク質配列、投与の経路及び頻度ならびに患者集団を含むがこれらに限定されないいくつかの要素は、タンパク質免疫原性に寄与し得る。好ましい実施形態では、タンパク質修飾が、本開示の組成物の免疫原性を低下させるために使用され得る。いくつかの実施形態では、免疫原性を低下させるための改変は、MHCタンパク質に対する、親配列に由来する処理されたペプチドの

10

20

30

40

50

結合を低下させる改変を含み得る。例えば、アミノ酸改変は、任意の一般的なMHCアレルに対して高い親和性で結合することが予測される免疫エピトープが存在しないか、またはその数が最小となるように修飾され得る。既知のタンパク質配列のMHC結合エピトープを特定するいくつかの方法が当該技術分野で知られており、本開示の組成物におけるエピトープをスコア化するために使用され得る。そのような方法は、米国特許公開番号US 20020119492、US 20040230380、及びUS 20060148009（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により組み込まれる）に開示されている。

【0045】

エフェクターモジュール（それらのSRE及びペイロードを含む）は、核酸ベース、タンパク質ベースまたはそれらの組み合わせであり得る。それらは、DNA、RNA、mRNA、タンパク質、融合タンパク質、または前述の任意の組み合わせの形態であり得る。

【0046】

エフェクターモジュール（それらのSRE及びペイロードを含む）は、個々に、集合的にまたは独立して、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み得る。タンパク質レベルでは、そのようなペイロードは、任意の天然もしくは人工ペプチドもしくはポリペプチドまたはその断片であり得る。ペイロードの天然ペプチドまたはポリペプチド成分は、任意の種の任意の既知のタンパク質に由来し得る。

【0047】

エフェクターモジュールは、1、2、3、4またはそれより多くのモジュールの群で動作するように設計され得る。複数のエフェクターモジュールが生体回路において利用される場合、それは、その生体回路のエフェクターモジュールシステムとして知られている。

【0048】

刺激反応要素（SRE）

本明細書で使用される場合、「刺激反応要素」（SRE）は、1つまたはより多くのペイロードに接合、結合、連結または関連付けられたエフェクターモジュールの成分であり、いくつかの例では、1つまたはより多くの刺激物に対するエフェクターモジュールの反応性特質の原因である。本明細書で使用される場合、刺激物に対するSREの「反応性」特質は、刺激物に対する共有もしくは非共有結合性相互作用、直接的もしくは間接的会合または構造的もしくは化学的反応を特徴とし得る。さらに、任意のSREの刺激物に対する反応は、程度または種類の問題であり得る。反応は、部分的反応であり得る。反応は、可逆的反応であり得る。反応は、最終的に、制御されたシグナルまたは出力につながり得る。そのような出力シグナルは、刺激物に対する相対的な特質のもの、例えば、1%~100%の間の調節性効果または2倍、3倍、4倍、5倍、10倍もしくはそれより多くななどの倍数増加もしくは減少の生成であり得る。いくつかの実施形態では、SREは、ポリペプチドペイロードに融合されたポリペプチドである。

【0049】

いくつかの実施形態では、本開示は、タンパク質の発現、機能またはレベルを調節するための方法を提供する。いくつかの態様では、タンパク質の発現、機能またはレベルの調節は、少なくとも約20%、例えば、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及び100%、または少なくとも20~30%、20~40%、20~50%、20~60%、20~70%、20~80%、20~90%、20~95%、20~100%、30~40%、30~50%、30~60%、30~70%、30~80%、30~90%、30~95%、30~100%、40~50%、40~60%、40~70%、40~80%、40~90%、40~95%、40~100%、50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、50~100%、60~70%、60~80%、60~90%、60~95%、60~100%、70~80%、70~90%、70~95%、70~100%、80~90%、80~95%、80~100%、90~95%、90~100%または95~100%の発現、機能またはレベルの調節を指す。

【0050】

脱安定化ドメイン

脱安定化ドメイン（DD）は、対象となる標的タンパク質に付加され得る小さなタンパク質ドメインである。脱安定化ドメイン（DD）という用語は、薬物反応性ドメイン（DRD）という用語と互換可能である。DDは、DD結合リガンドの非存在下で、結合された対象となるタンパク質を不安定にすることで、そのタンパク質は、細胞のユビキチン-プロテアソーム系によって急速に分解される（Banaszynski, L. A., and Wandless, T. J. Chem. Biol. ; 2006, 13:11-21及びRakhit R et al., Chem Biol. 2014; 21(9):1238-1252でレビューされたStankunas, K., et al., Mol. Cell, 2003, 12:1615-1624; Banaszynski, et al., Cell; 2006, 126(5):995-1004)。しかしながら、特定の小分子リガンドが、リガンド結合パートナーとしてのその意図されたDDと結合した場合、不安定性は逆転され、タンパク質機能は回復される。DD安定性の条件付き特質により、安定なタンパク質から、分解のための不安定な基質への迅速かつ非摂動的な切り替えが可能となる。その上、そのリガンドの濃度に対するその依存性は、分解速度の調整可能なコントロールをさらに提供する。

10

【0051】

一実施形態では、SREは、脱安定化ドメイン（DD）である。DDと結合するまたは相互作用する小分子リガンドの存在、非存在または量は、そのような結合または相互作用をすると、ペイロード（複数可）の安定性及び結果的にペイロードの機能を調節し得る。結合及び／または相互作用の程度に応じて、ペイロードの変化した機能は異なり、これによりペイロード機能の「調整」を提供し得る。

20

【0052】

いくつかの実施形態では、DDの所望の特性には、DDのリガンドの非存在下での低いタンパク質レベル（例えば、低い基礎安定性）、広い動態範囲、頑強かつ予測可能な用量反応挙動、及び分解の急速動態が含まれ得るがこれらに限定されない。所望のリガンドに結合するが、内因性分子には結合しないDDが好ましい場合がある。

【0053】

いくつかの実施形態では、本開示のDDは、本明細書で親タンパク質と称される既知のタンパク質から開発され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるまたは当該技術分野で知られているCA2脱安定化ドメインは、本明細書で教示されるペイロード（例えば、対象となるタンパク質または免疫療法剤）のいずれかと関連付けて本開示の生体回路システムにおいてSREとして使用され得る。

30

【0054】

野生型タンパク質（例えば、CA2）の領域または部分またはドメインは、SRE/DDとして全体としてまたは部分的に利用され得る。それらは、組み合わされ、または再配置されて新たなペプチド、タンパク質、領域またはドメインを作成し得、そのいずれかは、SRE/DDとしてまたはさらなるSRE及び／またはDDの設計のための開始点として使用され得る。

【0055】

一実施形態では、SREは、親タンパク質（例えば、CA2）の一領域または変異体タンパク質に由来する。親タンパク質の領域は、長さが10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、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、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、11

40

50

6、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、または450超のアミノ酸であり得る。親タンパク質の領域は、長さが5～50、25～75、50～100、75～125、100～150、125～175、150～200、175～225、200～250、225～275、250～300、275～325、300～350、325～375、350～400、375～425、または400～450アミノ酸であり得る。非限定的な例として、親タンパク質の領域は、長さが250～270アミノ酸であり得る。非限定的な例として、親タンパク質の領域は、長さが225～250アミノ酸であり得る。非限定的な例として、親タンパク質の領域は、長さが225～260アミノ酸であり得る。

【0056】

一実施形態では、SREは、親タンパク質（例えば、CA2）または変異体タンパク質に由来し、親タンパク質の一領域を含む。SREは、親タンパク質または変異体タンパク質の1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%、5～10%、10～15%、15～20%、20～25%、25～30%、30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、95～100%、10～20%、20～30%、3

0～40%、40～50%、50～60%、60～70%、70～80%、80～90%、90～100%、10～30%、20～40%、30～50%、40～60%、50～70%、60～80%、70～90%、80～100%、10～40%、20～50%、30～60%、40～70%、50～80%、60～90%、70～100%、10～50%、20～60%、30～70%、40～80%、50～90%、60～100%、10～60%、20～70%、30～80%、40～90%、50～100%、10～70%、20～80%、30～90%、40～100%、10～80%、20～90%、30～100%、10～90%、20～100%、25～50%、50～75%、または75～100%である親タンパク質の一領域を含み得る。

【0057】

一実施形態では、SREは、親タンパク質（例えば、CA2）または変異体タンパク質に由来し、親タンパク質または変異体タンパク質と1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%、5～10%、10～15%、15～20%、20～25%、25～30%、30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、95～100%、10～20%、20～30%、30～40%、40～50%、50～60%、60～70%、70～80%、80～90%、90～100%、10～30%、20～40%、30～50%、40～60%、50～70%、60～80%、70～90%、80～100%、10～40%、20～50%、30～60%、40～70%、50～80%、60～90%、70～100%、10～50%、20～60%、30～70%、40～80%、50～90%、60～100%、10～60%、20～70%、30～80%、40～90%、50～100%、10～70%、20～80%、30～90%、40～100%、10～80%、20～90%、30～100%、10～90%、20～100%、25～50%、50～75%、または75～100%の同一性を有し得る。

【0058】

（テンプレートとして）親タンパク質のタンパク質ドメインから特定される脱安定化ドメイン配列候補は、候補テンプレートドメイン配列に基づいて変異体のライブラリを生成するために変異され得る。DDライブラリを生成するために使用される変異誘発戦略には、例えば、構造誘導情報を使用することによる部位特異的変異誘発；もしくは、例えば、エラーブローンPCRを使用するランダム変異誘発、またはその両方の組み合わせが含まれ得る。いくつかの実施形態では、ランダム変異誘発を使用して特定される脱安定化ドメインは、脱安定化のために必要とされ得る候補DDの構造的特性を特定するために使用され得、これは次いで、部位特異的変異誘発を使用して変異のライブラリをさらに生成するために使用され得る。

【0059】

いくつかの実施形態では、DD変異体ライブラリは、野生型タンパク質と比較して、リガンドに対する変化した、好ましくはより高い結合親和性で変異についてスクリーニングされ得る。DDライブラリはまた、2つまたはより多くのリガンドを使用してスクリーニングされ得、いくつかのリガンドによって安定化されるが、他のものでは安定化されないDD変異が優先的に選択され得る。天然に存在するタンパク質と比較してリガンドと優先的に結合するDD変異も選択され得る。そのような方法は、DDのリガンド選択及びリガンド結合親和性を最適化するために使用され得る。また、そのようなアプローチは、標的外リガンド結合によって引き起こされる有害作用を最小化するために使用され得る。

【0060】

いくつかの実施形態では、好適なDDは、バーコードを使用して変異体ライブラリをスクリーニングすることによって特定され得る。そのような方法は、異種変異体ライブラリ内の個々の変異体クローンを検出、特定及び定量するために使用され得る。ライブラリ内の各DD変異体は、（互いに関して）区別されるバーコード配列を有し得る。他の例では

10

20

30

40

50

、ポリヌクレオチドはまた、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多くの核酸塩基に関して異なるバーコード配列を有し得る。ライブラリ内の各DD変異体はまた、複数のバーコード配列を含み得る。複数で使用される場合、各バーコードが任意の他のバーコードに対して独自となるように使用され得る。代替的には、使用される各バーコードは独自でない場合があるが、使用されるバーコードの組み合わせは、独立して追跡され得る独自の配列を生成し得る。バーコード配列は、SREの上流、SREの下流に配置され得、またはいくつかの例では、SRE内に配置され得る。DD変異体は、シーケンシングアプローチ、例えば、サンガーシーケンシング、及び次世代シーケンシングを使用してバーコードによって特定され得るが、ポリメラーゼ連鎖反応及び定量ポリメラーゼ連鎖反応によっても特定され得る。いくつかの実施形態では、各バーコードについて異なるサイズの生成物を増幅するポリメラーゼ連鎖反応プライマーが、アガロースゲル上で各バーコードを特定するために使用され得る。他の例では、各バーコードは、各バーコードの標的化された増幅を可能にする独自の定量ポリメラーゼ連鎖反応プローブ配列を有し得る。

【0061】

一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、少なくとも1つの脱安定化ドメイン（DD）を含み得る。エフェクターモジュール及び／またはSREは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または10超のDDを含み得る。複数のDDが存在する場合、DDの各々は、同じ親タンパク質、異なる親タンパク質に由来し得、2つの異なる親タンパク質の融合物に由来し得、または人工であり得る。

【0062】

一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、2つのDDを含み得る。一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、3つのDDを含み得る。一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、4つのDDを含み得る。一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、5つのDDを含み得る。一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、6つのDDを含み得る。一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、7つのDDを含み得る。一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、8つのDDを含み得る。一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、9つのDDを含み得る。一実施形態では、本開示のエフェクターモジュール及び／またはSREは、10個のDDを含み得る。DDは、当該技術分野で知られている及び／または本明細書に記載される任意の親タンパク質に由来し得る。いくつかの実施形態ではDDは、同じ親タンパク質に由来する。いくつかの実施形態では、DDは、同じ親タンパク質の異なる領域に由来する。いくつかの実施形態では、DDは、異なる親タンパク質に由来する。

【0063】

CA2脱安定化ドメイン

いくつかの実施形態では、本開示のDDは、すべての生物界に存在する金属酵素のスーパーファミリーであるカルボニックアンヒドラーゼ（CA、EC 4.2.1.1）のメンバーであるヒトカルボニックアンヒドラーゼ2 CA2に由来し得る。CAは、3つの化学種：CO₂、重炭酸イオン、及びプロトンの間の反応を平衡化する。CAは収束的に進化しており、細菌、古細菌、及び真核生物において独立して進化した7種の遺伝子的に区別されるCAファミリーα、β、γ、δ、ζ、η、及びθ-CAを有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のDDは、限定されないが、カルボニックアンヒドラーゼ2（CA2）、カルボニックアンヒドラーゼ1（CA1）、カルボニックアンヒドラーゼ3（CA3）、カルボニックアンヒドラーゼ4（CA4）、カルボニックアンヒドラーゼ5A（CA5A）、カルボニックアンヒドラーゼ5B（CA5B）、カルボニックアンヒドラーゼ6（CA6）、カルボニックアンヒドラーゼ7（CA7）、カルボニックアンヒドラーゼ8（CA8）、カルボニックアンヒドラーゼ9（CA9）、カルボニックアンヒドラーゼ10（CA10）、カルボニックアンヒドラーゼ11（CA11）、カルボニックアンヒドラーゼ12（CA12）、カルボニックアンヒドラーゼ13（CA13）、及びカ

ルボニックアンヒドラーゼ 14 (CA14) から選択される少なくとも 1 つの親タンパク質に由来し得る。

【0064】

一実施形態では、DD は、細胞質性 CA、例えば、限定されないが、カルボニックアンヒドラーゼ 2 (CA2)、カルボニックアンヒドラーゼ 1 (CA1)、カルボニックアンヒドラーゼ 3 (CA3)、カルボニックアンヒドラーゼ 7 (CA7)、及びカルボニックアンヒドラーゼ 13 (CA13) に由来し得る。一実施形態では、DD は、ミトコンドリア性 CA、例えば、限定されないが、カルボニックアンヒドラーゼ 5A (CA5A)、及びカルボニックアンヒドラーゼ 5B (CA5B) に由来し得る。一実施形態では、DD は、分泌 CA、例えば、限定されないが、カルボニックアンヒドラーゼ 6 (CA6) に由来し得る。一実施形態では、DD は、膜関連 CA、例えば、限定されないが、カルボニックアンヒドラーゼ 4 (CA4)、カルボニックアンヒドラーゼ 9 (CA9)、カルボニックアンヒドラーゼ 12 (CA12)、及びカルボニックアンヒドラーゼ 14 (CA14) に由来し得る。一実施形態では、DD は、CA2 に由来し得る。別の態様では、DD は、CA9 に由来し得る。

【0065】

いくつかの実施形態では、本開示の DD は、リガンド、例えば、CA2 の小分子阻害剤によって安定化され得る CA2 (配列番号 11717; Uniprot ID: P00918) に由来し得る。本明細書で使用される場合、用語「CA2 WT」は、アミノ酸配列: MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K を有する、GenBank アクセス番号 P00918 を有する、配列番号 11717 として定義されるヒト野生型 CA2 タンパク質配列を指す。いくつかの態様では、DD は、配列番号 11718 (アミノ酸配列: MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAASLGSL EHQIWGFWE SCAAT を有する) または配列番号 11719 (アミノ酸配列: MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAEKGISMLRKKDVKNIHSPDNACEE を有する) の CA2 に由来し得る。いくつかの実施形態では、本開示の DD は、CA2 阻害剤のカクテルを利用することによって特定され得る。他の例では、好適な DD は、まず 1 つ目の CA2 阻害剤を用いてスクリーニングし、その後 2 つ目の CA2 阻害剤を用いてスクリーニングすることによって特定され得る。

【0066】

本開示に包含される脱安定化ドメインのアミノ酸配列は、本明細書に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 40%、50 または 60% の同一性、さらに少なくとも約 70% の同一性、好ましくは少なくとも約 75% または 80% の同一性、より好ましくは少なくとも約 85%、86%、87%、88%、89% または 90% の同一性、さらに好ましくは少なくとも約 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% の同一性を有する。同一率は、例えば、National Institutes of Health から利用可能なバージョン Magic-BLAST 1.2.0 を含むアドバンスド BLAST コンピュータプログラムを使用して配列情報を比較することによって決定され得る。BLAST プログラムは、Karls and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-68 (その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる) において論述されるアライメント方法に基

づく。

【0067】

いくつかの実施形態では、CA2に由来するDDは、親CA2配列のアミノ酸2～260を含み得る。これは、本明細書ではM1del変異と称される。一実施形態では、CA2に由来するDDは、親CA2配列のアミノ酸2～237を含み得る。

【0068】

本明細書では、表1、表2、表3、表4、及び表6において、変異体のライブラリを生成するためのヌクレオチドアナログ変異誘発及びエラープローンPCRの組み合わせを使用する、ランダム変異誘発スクリーニング、または飽和変異誘発などの変異誘発によって特定されたCA2変異体が提供されている。CA2脱安定化変異体はまた、構造誘導変異誘発によって特定され得、表1に提供されている。表1、表2、表3、表4、表5及び表6において列挙された変異アミノ酸の位置は、配列番号11717の全長CA2に対するものである。

【表1-1】

表1：CA2 DD

ライブラリ ID	記	AA 配列	AA 配列番号	NA 配列番号
-	CA2 (WT の aa2～260)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21049 2	21049 3
-	CA2 (WT の aa2～260, W208S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTSIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21049 4	21049 5
LibC000103	CA2 (WT の aa2～260, Y51N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSNDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21049 6	21049 7

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

LibC000 101	CA2 (WT の aa2～ 260, S56N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATNLRILNNGHAFNVEFDD SQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECWTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21049 8	21049 9
LibC000 098	CA2 (WT の aa2～ 260, Y51T)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSTDQATSLRILNNGHAFNVEFDD QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECWTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21050 0	21050 1
LibC000 097				21050 2
LibC000 095	CA2 (WT の aa2～ 260, D72F, V241F, P249L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDD QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECWTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMFDNWRPAQLLK NRQIKASFK	21050 3	21050 4
LibC000 084	CA2 (WT の aa2～ 260, D71F, N231F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDD QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECWTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21050 5	21050 6
LibC000 079	CA2 (WT の aa2～ 260, S56F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATFLRILNNGHAFNVEFDD QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECWTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21050 7	21050 8
LibC000 078				21050 9
LibC000 073	CA2 (WT の aa2～ 260, D71L, T87N, L250R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFLDS QDKAVLKGGPLDGNYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECWTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPRK NRQIKASFK	21051 0	21051 1

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

LibC000 090	CA2 (WT の aa2～ 260, L183S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSD QDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQPPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGSLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21051 2	21051 3
LibC000 076	CA2 (WT の aa2～ 260, A77I, P249F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSD QDKIVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTV DKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQPPDGLAVL GIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPIs VSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQFLK NRQIKASFK	21051 4	21051 5
LibC000 099	CA2 (WT の aa2～ 260, D71K, P249H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDS QDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQPPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQHL KNRQIKASFK	21051 6	21051 7
LibC000 081	CA2 (WT の aa2～ 260, D72F, P249H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFS QDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQPPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQFLK NRQIKASFK	21051 8	21051 9
LibC000 065				21052 0
LibC000 082	CA2 (WT の aa2～ 260, Q53N, N61Y)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDNATSLRILYNNGHAFNVEFDDSD QDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQPPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21052 1	21052 2
-				

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

	CA2 (WT の aa2～ 260, E106D, C205S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSdHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21052 3	21052 4
-	CA2 (WT の aa2～ 260, C205S, W208S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSdHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESVTWIVLKEPI VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21052 5	21052 6
-	CA2 (WT の aa2～ 260, C205S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSdHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21052 7	21052 8
LibC000 066	CA2 (WT の aa2～ 260, Y193I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSdHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPI VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21052 9	21053 0
LibC000 069				21053 1
LibC000 056	CA2 (WT の aa2～ 260, S73N, R89Y)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDD NQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSdHT TVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLA VLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTN FDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEP ISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPL KNRQIKASFK	21053 2	21053 3
LibC000 057	CA2 (WT の aa2～ 260, D71K, T192F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSdHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWFYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21053 4	21053 5

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

LibC000 061	CA2 (WT の aa2～ 260, E238*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPE*LMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21053 6 ; 21069 6	21053 7
LibC000 061	CA2 (WT の aa2～ 260, G144D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LDIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21053 8	21053 9
LibC000 092	CA2 (WT の aa2～ 260, Y193L, K260L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTLPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFL	21054 0	21054 1
LibC000 053	CA2 (WT の aa2～ 260, V206M)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21054 2	21054 3
LibC000 054	CA2 (WT の aa2～ 260, D71F, V241F, P249L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFFDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMFDNWRPAQLLK NRQIKASFK	21054 4	21054 5
LibC000 055	CA2 (WT の aa2～ 260, Y193F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTFPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21054 6	21054 7

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

LibC000 058	CA2 (WT の aa2～ 260, L147F, Q248F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAFPLK NRQIKASFK	21054 8	21054 9
LibC000 059	CA2 (WT の aa2～ 260, D52I, S258P)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYIQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKAPFK	21055 0	21055 1
LibC000 060	CA2 (WT の aa2～ 260, D72S, T192N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDSS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWNYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21055 2	21055 3
LibC000 062	CA2 (WT の aa2～ 260, D179E, T192I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF EPRGLLPESLDYWIYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21055 4	21055 5
LibC000 063	CA2 (WT の aa2～ 260, Y193L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTLPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21055 6	21055 7

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

LibC000 064	CA2 (WT の aa2~ 260, S56N, Q103K)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATNLRILNNGHAFNVEFDD SQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGKGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21055 8	21055 9
LibC000 067	CA2 (WT の aa2~ 260, D71Y, Q248L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFYDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPALPLK NRQIKASFK	21056 0	21056 1
LibC000 068	CA2 (WT の aa2~ 260, S73N, R89F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDD NQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEH TVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLA VLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTN FDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEP ISVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPL KNRQIKASFK	21056 2	21056 3
LibC000 070	CA2 (WT の aa2~ 260, D71K, N231L, E235G, L239F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfLGEGGPEEFMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21056 4	21056 5
LibC000 071	CA2 (WT の aa2~ 260, D71F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFFDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21056 6	21056 7

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

LibC000 072	CA2 (WT の aa2～ 260, D72F, P249I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHFWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQILK NRQIKASFK	21056 8	21056 9
LibC000 074	CA2 (WT の aa2～ 260, T192N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHFWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWNYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21057 0	21057 1
LibC000 075	CA2 (WT の aa2～ 260, D72X, V241X, P249X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDXS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHFWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMXDNWRPAQXL KNRQIKASFK	21057 2	21057 3
LibC000 077	CA2 (WT の aa2～ 260, A54X, S56X, L57X, T192X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQXTXXRILNNGHAFNVEFDD SQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHFWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWXYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21057 4	21057 5
LibC000 080	CA2 (WT の aa2～ 260, Y193V, K260F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHFWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTVPGLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFF	21057 6	21057 7

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

LibC000 085	CA2 (WT の aa2~ 260, G63D, M240L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVEFDDSD QDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGGQSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGKQKVVVDVLSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELLDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21057 8	21057 9
LibC000 086	CA2 (WT の aa2~ 260, V134F, L228F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSD QDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGGQSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAFQQPDGLAVL GIFLKVGSAKPGKQKVVVDVLSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKFNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21058 0	21058 1
LibC000 087	CA2 (WT の aa2~ 260, D71G, N231K)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFGDS QDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGGQSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGKQKVVVDVLSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFKGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21058 2	21058 3
LibC000 088	CA2 (WT の aa2~ 260, S56F, D71S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATFLRILNNGHAFNVEFSDS QDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGGQSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGKQKVVVDVLSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21058 4	21058 5
LibC000 089	CA2 (WT の aa2~ 260, D52L, G128R, Q248F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYLQATSLRILNNGHAFNVEFDDSD QDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGGQSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYRDFGKAVQQPDGLAVL GIFLKVGSAKPGKQKVVVDVLSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAFPLKN RQIKASFK	21058 6	21058 7

10

20

30

40

50

【表 1 - 10】

LibC000 091	CA2 (WT の aa2～ 260, S73X, R89X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDD XQDKAVLKGGPLDGTXYLIQFHFHWGSLDGQGSEH TVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLA VLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTN FDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEP ISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPL KNRQIKASFK	21058 8	21058 9
LibC000 093	CA2 (WT の aa2～ 260, Y193X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDD QDKAVLKGGPLDGTXYLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21059 0	21059 1
LibC000 096	CA2 (WT の aa2～ 260, Y51X, D72X, V241X, P249X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSXDQATSLRILNNGHAFNVEFDXS QDKAVLKGGPLDGTXYLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMXDNWRPAQXL KNRQIKASFK	21059 2	21059 3
LibC000 100	CA2 (WT の aa2～ 260, D72I, W97C)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDIS QDKAVLKGGPLDGTXYLIQFHFHWGSLDGQGSEHTV DKKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVL GIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21059 4	21059 5
LibC000 102	CA2 (WT の aa2～ 260, D71K, T192F, N231F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDS QDKAVLKGGPLDGTXYLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWFYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21059 6	21059 7
-	CA2 (WT の aa2～ 260, I59N, G102R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEFDD SQDKAVLKGGPLDGTXYLIQFHFHWGSLDRQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21059 8	21059 9
LibC000 210				21084 7
LibC000 184				21084 8
LibC000 187				21084 9

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

-	CA2 (WT の aa2～ 260, L156H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21060 0	21060 1
LibC000 208				21085 0
-	CA2 (L156H)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDT HTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFD DSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGL AVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDsIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKE PISVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQP LKNRQIKASFK	21060 2	21060 3
LibC000 061 切断 型	CA2 (WT の aa2～ 237)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPE	21053 6	21069 7

10

20

【0069】

さらなるCA2脱安定化ドメインが表2に提供される。

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 : CA 2 DD

ライブラリ ID	記	AA 配列	AA 配列番号	NA 配列番号
LibC000229	CA2 (WT の aa2~260, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID TQTAKYDPTLKPLSVSFDQATSLRILNNGHAFDVE FDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFWKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFHKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21069 8	21069 9
LibC000228	CA2 (WT の aa2~260, F70I, F146V)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EIDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIVLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21070 0	21070 1
LibC000226	CA2 (WT の aa2~260, R27L, T87L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGIYrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTKYGDFGKAV	21070 2	21070 3

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

	H122Y, N252D)	QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK		
LibC000225	CA2 (WT の aa2~260, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)	SHHWGYGKHNHPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNLE FDSDQDKAVLKGGLDGTIRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELYLVHWNTKYGDFGKAVQ QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTR KGKSADFTNFEPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLE CVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEEL MVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21070 4	21070 5
LibC000224	CA2 (WT の aa2~260, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)	SHHWGYGKHNHPELWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQVTSRILNNGHAFNV EFDDSDQDKAVLKGGLDGTIRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDEKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQ QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTK KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLE CVTWIVLKEPISVSSEQVLKIRKLNFNNGEGEPEEL MVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21070 6	21070 7
LibC000221	CA2 (WT の aa2~260, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)	SHHWGYGKHNHSEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSDQDKAVLKGGLDGTIRLIQFHFHWGSLG QGSEHTVDNKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNNGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21070 8	21070 9
LibC000220	CA2 (WT の aa2~260, L47R)	SHHWGYGKHNHPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPRSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSDQDKAVLKGGLDGTIRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21071 0	21071 1
LibC000219	CA2 (WT の aa2~260, G63D, W123R, E220K)	SHHWGYGKHNHPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNV EFDDSDQDKAVLKGGLDGTIRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHRNTKYGDFGKAVQ QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTK KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLE CVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEEL MVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21071 2	21071 3
LibC000217	CA2 (WT の aa2~260, N11D, E69K,	SHHWGYGKHGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV KFDDSDQDKAVLKGGLDDTYRLIQFHFHWGSLD QGSEHTMDKKIYAAELHLVHWNIKYGDFGKAV	21071 4	21071 5

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

	G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)	QQPGGLAVLGIFLKVGSAKPSLQKVVDVLDISIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000214	CA2 (WT の aa2~260, I59N, G102R, A173T)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDR QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDISIKT KGKSTDFNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21071 6	21071 7
LibC000213	CA2 (WT の aa2~260, L79F, P180S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVFKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDISIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21071 8	21071 9
LibC000212	CA2 (WT の aa2~260, S73F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDFQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDISIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21072 0	21072 1
LibC000211	CA2 (WT の aa2~260, G12R)	SHHWGYGKHNRPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDISIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21072 2	21072 3
LibC000209	CA2 (WT の aa2~260, A77P, G102R, D138N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKPVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDR QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPNGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDISIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21072 4	21072 5
LibC000183				

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

	CA2 (WT の aa2~260, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNV VFDDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLD GQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21072 6	21072 7
LibC000207	CA2 (WT の aa2~260, T199N, L202P, L228F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QPPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTNPPP LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKFNFNAGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21072 8	21072 9
LibC000206	CA2 (WT の aa2~260, K9N, H122Y, T168K)	SHHWGYGNHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNKYGDFGKAV QPPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKK KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNAGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21073 0	21073 1
LibC000205	CA2 (WT の aa2~260, Q53H, L90V, Q92H, G131E)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDHATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGLDGTyrVIHFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFEKAVQ QPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKTK GKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLE CVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNAGEGEPEEL MVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21073 2	21073 3
LibC000204	CA2 (WT の aa2~260, L44M, L47V, N62K, E69D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSMKPVSVSYDQATSLRILNKGHAFNV DFDDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLD GQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNAGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21073 4	21073 5
LibC000203	CA2 (WT の aa2~260, F20L, K45N, G104R, A116V)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QRSEHTVDKKKYAVELHLVHWNTKYGDFGKAVQ QPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKTK GKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLE CVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNAGEGEPEEL MVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21073 6	21073 7

10

20

30

40

【表 2 - 5】

LibC000202	CA2 (WT の aa2~260, D75V, K169N, F259L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQVKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDsIKT NGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASLK	21073 8	21073 9
LibC000182	CA2 (WT の aa2~260, T207S, V222A, N231D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDsIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVSWIVLKEPISVSSEQALKFRKLNFDGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21074 0	21074 1
LibC000201	CA2 (WT の aa2~260, I59F, V206M, G232R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRFLNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDsIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECMTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNREGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21074 2	21074 3
LibC000199	CA2 (WT の aa2~260, P13A, A133T)	SHHWGYGKHNGAEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKTV QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDsIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21074 4	21074 5
LibC000198	CA2 (WT の aa2~260, N61R, K80M, K212N, N231T, L250P)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLMGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLD QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDsIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL LECVTWIVLNEPISVSSEQVLKFRKLNFTEGEPEE ELMVDNWRPAQPPKNRQIKASFK	21074 6	21074 7
LibC000196	CA2 (WT の aa2~260, G63D, E69V, N231I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNV VFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLD QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDsIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIDGEPEE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21074 8	21074 9

10

20

30

40

【表 2 - 6】

LibC000181	CA2 (WT の aa2~260, I59N, R89I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYLILQFHHWGS LDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21075 0	21075 1
LibC000194	CA2 (WT の aa2~260, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHNFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDDTYRLIQFHHWGS LDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFRKAVQ QQPDGLAVLGIFLKVGSAPDLQNVVDALDSIKTK DKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLE CVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGELEEL MVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21075 2	21075 3
LibC000192	CA2 (WT の aa2~260, G12R, H15Y, D19V)	SHHWGYGKHNRPEYWHKVFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYLILQFHHWGS LDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21075 4	21075 5
LibC000193	CA2 (WT の aa2~260, L156H, S172C, F178Y, E186D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYLILQFHHWGS LDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLD SIKT KGKCADFTNYDPRGLLPDSLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21075 6	21075 7
LibC000189	CA2 (WT の aa2~260, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHVFN EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYLILQFHHWGS LD QGSGQTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGMFLKVGSAPGLQKVVDVLD SI KTKGKSADITNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21075 8	21075 9
LibC000186	CA2 (WT の aa2~260, L197P)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYLILQFHHWGS LDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKT	21076 0	21076 1

10

20

30

40

50

【表 2－7】

		KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSPTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
-	CA2 (WT の aa2～260, G63D, E69V, N231I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNV VFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLD GQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21085 1	21085 2

10

【0070】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCA2 DDは、表3で提供される配列のいずれかを含み得る。表3において、「*」は、終止コドンの翻訳を表す。表3におけるアミノ酸配列が、1つまたはより多くの終止コドンを含む場合、「AA配列番号」欄は、それらがアミノ酸配列で生じる順序で、終止コドンに先行する及び後続する個々の成分の配列番号を提供する。

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 : CA2 DD

ライブラリ ID	記	AA 配列	AA 配列番号	NA 配列番号
LibC000223	CA2 (WT の aa2~260, G12E, A38V, A65V, G98V, S99H, D101M, G102D, Q103K, G104V, S105Q, E106S, H107I, T108L, V109W, D110I, K112R, K113N, Y114M, A115L, A116Q, E117N, L118F, H119T, L120W, V121F, H122T, W123G, N124T, T125P, K126N, Y127M, D129I, F130L, K132E, A133L, V134C, Q135S, Q136N, P137L, D138M, G139D, L140W, A141P, V142F, L143*, G144V, I145F, L156Q, V162A)	SHHWGYGKHNEPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTVKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGH VFNVEFDDSQDKAVLKGGPLD GTYRLIQFHFHWVHLMQVQ SILWIKRNMLQNFTWFTGTPN MGILGELCSNLMWPF*VFLL KVGSAKPGQKVVDAALDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLEC VTWIV LKEPISVSSEQVLKFRKLNFG EGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	21076 2 ; 21076 3	210764
LibC000185	CA2 (WT の aa2~260, F20L, K45N, G104R, A116V, A173G, W191*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDL PIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLNPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQRS EHTVDKKKYAVELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGLQKVVVDVLSIK TKGKSGDFTNFDPRGLLPESL DY*TYPGSLTTPPLLEC VTWIV LKEPISVSSEQVLKFRKLNFG EGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	21076 5;210 766	210767

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

LibC000215	CA2 (WT の aa2~260, H17D, P30S, G81V, K132R, S151I, A152D, A173G, W191*)	SHHWGYGKHNGPEHWKDFP IAKGERQSSVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKVGPLD GTyrLIQFHFHWGSLDGQGSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDfGRAVQQPDGLAVLGIFL KVGIDKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSGDFTNFDPRGLLPESLD Y*TYPGSLTTPPILLECVTWIVL KEPISVSSEQVLKFRKLNFNGE GEPEELMVDNWRPAQPLKNR QIKASFK	21076 8 ; 21076 6	210769
LibC000191	CA2 (WT の aa2~260, H17D, P30S, G81V, K132R, S151I, A152D, A173G, W191*)	SHHWGYGKHNGPEHWKDFP IAKGERQSSVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKVGPLD GTyrLIQFHFHWGSLDGQGSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDfGRAVQQPDGLAVLGIFL KVGIDKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSGDFTNFDPRGLLPESLD Y*TYPGSLTTPPILLECVTWIVL KEPISVSSEQVLKFRKLNFNGE GEPEELMVDNWRPAQPLKNR QIKASFK	21076 8 ; 21076 6	210770
LibC000200	CA2 (WT の aa2~260, I59N, L90*, G102R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRNLNNG HAFNVEFDDSDQKAVLKGGLD DGTyr*IQFHFHWGSLDRQGS EHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDfGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPILLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21077 1:210 772	210773
LibC000197	CA2 (WT の aa2~260, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, Q221R, F225L, E233D, W244*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDIHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGLD GTyrLIQFHFHWGSLDGQGSE HTVDKKKHAAELHLVHWNTK YGDfGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAKLGLQKVVVVLDSIKT KGKKSADFTNFDPRGLLPESLD	21077 4 ; 21077 5	210776

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

		YWTYPGSLTTAPLLEC VTWIV LKEPISVSSE RVLKRLNFNG DGEPEELMVDN*RPAQPLKNR QIKASFK		
LibC000195	CA2 (WT の aa2~260, S105L, L140V, G155C, Y190*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKG GPLD GTYRLIQFHFHWGSLDGQGLE HTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGVAVLGIFL KVGSAPCLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLD *WTYPGSLTTPP LLEC VTWIVL KEPISVSSEQVLKFRKLNFNGE GEPEELMVDNWRPAQPLKNR QIKASFK	21077 7:210 778	210779
LibC000188	CA2 (WT の aa2~260, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, F225L, E233D, W244*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDIHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKG GPLD GTYRLIQFHFHWGSLDGQGSE HTVDKKKHAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAKLGLQKV VVVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTAPLLEC VTWIV LKEPISVSSEQVLKRLKLNFNNG DGEPEELMVDN*RPAQPLKNR QIKASFK	21078 0 ; 21077 5	210781
LibC000180	CA2 (WT の aa2~260, K167*, R181H, E213*, V217L, L228H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKG GPLD GTYRLIQFHFHWGSLDGQGSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAPGLQKVVDVLDSI*T KGKSADFTNFDPHGLLPESLD YWTYPGSLTTPP LLEC VTWIV LK*PISLSSEQVLKFRKHNFNNG EGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	21078 2 ; 21078 3 ; 21078 4	210785
LibC000190	CA2 (WT の aa2~259, K167*, R181H, P194Q, G195A, S196H, L197*, T198P, T199P, P200L, P201L, L202F, L203W, E204N, C205V, V206*, T207P, W208G,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKG GPLD GTYRLIQFHFHWGSLDGQGSE	21078 2 ; 21078 6 ; 21078	210792

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

	I209L, V210C, L211S, K212R, E213N, I215S, S216A, V217S, S218A, S219A, E220S, Q221R, V222C, L223*, K224N, F225S, R226V, K227N, N229T, F230S, N231M, E233R, G234L, E235N, E237K, E238N, L239*, M240W, V241W, D242T, N243T, W244G, R245A, P246Q, A247L, Q248S, P249H, L250*, K251R, N252T, R253G, Q254K, I255S, A257L, S258P, F259S)	HTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAKPGQLQKVVDVLDSI*T KGKSADFTNFDPHGLLPESLD YWTYQAH*PPLLFWNV*PGLC SRNPSASAASRC*NSVNLTS M GRLNPKN*WWTTGAQLSH*R TGKSKLPS	7 ; 21078 8 ; 21078 9 ; 21079 0 ; 21079 1	
LibC000227	CA2 (WT の aa2~259, P13H, E117*, G150S, L184F, P185L, E186N, S187P, L188W, D189I, Y190T, W191G, T192P, Y193T, P194Q, G195A, S196H, L197*, T198P, T199P, P200L, P201L, L202F, L203W, E204N, C205V, V206*, T207P, W208G, I209L, V210C, L211*, K212R, E213N, I215S, S216A, V217S, S218A, S219A, E220S, Q221R, V222C, L223*, K224N, F225S, R226V, K227N, N229T, F230S, N231M, E233R, G234V, E235N, E237K, E238N, L239*, M240W, V241W, D242T, N243T, W244G, R245A, P246Q, A247L, Q248S, P249H, L250*, K251R, N252T, R253G, Q254K, I255S, A257L, S258P, F259S)	SHHWGYGKHNGHEHWHKDF PIAKGERQSPVDIDHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGGQS EHTVDKKKYAA*LHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVSSAKPGQLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLFLNPW ITGPTQAH*PPLLFWNV*PGLC *RNPSASAASRC*NSVNLTS M GRVNPKN*WWTTGAQLSH*R TGKSKLPS	21079 3 ; 21079 4 ; 21078 7 ; 21079 5 ; 21079 6 ; 21079 7 ; 21079 0 ; 21079 1	210798
LibC000218	CA2 (WT の aa2~260, A133T, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R, K153*, P154T, L156P, Q157S, K158E, V159S, V160C, D161*, V162C, L163A, D164G, S165F, I166H, K167*, T168N, K171Q, S172E, A173C, D174*, F175L, T176H, N177*, F178L, D179R, P180S, R181S, G182W, L183P, L184P, P185S, E186*, S187I, L188P, D189G, Y190L, W191L, T192D, Y193L, G195R, S196L, L197T, T198D, T199H, P201S, L202S, L203S, E204G, C205M, V206C, T207D, W208L, I209D, V210C, L211A,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLD GTYRLIQFHFHWGSLDGGQSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKTVQQPDGLAVLGIF EGWQR*TGPESEC*CAGFH*N KGQEC*LH*LRSSWPPS*IPGL LDLPRLTDHPSSSGMCDLDC A QGTHQRQQRAGVEIP*T*LQW GG*TRRTDGGQLAPSSATEEQ ANQSFLQ	21079 9 ; 21080 0 ; 21080 1 ; 21080 2 ; LH ; 21080 3 ; 21080 4 ; T ; 21080	210807

10

20

30

40

【表 3 - 5】

	K212Q, E213G, P214T, I215H, S216Q, V217R, S218Q, S219Q, E220R, Q221A, V222G, L223V, K224E, F225I, R226P, K227*, L228T, N229*, F230L, N231Q, G232W, E233G, E235*, P236T, E237R, E238R, L239T, M240D, V241G, D242G, N243Q, W244L, R245A, A247S, Q248S, P249A, L250T, K251E, N252E, R253Q, Q254A, I255N, K256Q, A257S, S258F, F259L, K260Q)		5 ; 21080 6	
LibC000216	CA2 (WT の aa2~260, F20L, K45N, G104R, A116V, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R, K153*, P154T, L156P, Q157S, K158E, V159S, V160C, D161*, V162C, L163A, D164G, S165F, I166H, K167*, T168N, K171Q, S172E, A173C, D174*, F175L, T176H, N177*, F178L, D179R, P180S, R181S, G182W, L183P, L184P, P185S, E186*, S187I, L188P, D189G, Y190L, W191L, T192D, Y193L, G195R, S196L, L197T, T198D, T199H, P201S, L202S, L203S, E204G, C205M, V206C, T207D, W208L, I209D, V210C, L211A, K212Q, E213G, P214T, I215H, S216Q, V217R, S218Q, S219Q, E220R, Q221A, V222G, L223I, K224E, F225I, R226P, K227*, L228T, N229*, F230L, N231Q, G232W, E233G, E235*, P236T, E237R, E238R, L239T, M240D, V241G, D242G, N243Q, W244L, R245A, A247S, Q248S, P249A, L250T, K251E, N252E, R253Q, Q254A, I255N, K256Q, A257S, S258F, F259L, K260Q)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDL PIAKGERQSPVDIDHTAKYD PSLNPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQRS EHTVDKKKYAVELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF FEGWQR*TGPSESC*CAGFH* NKGQEC*LH*LRSSWPPS*IPG LLDLPRLTDPSSSGMCDLDC AQGTHQRQQRAGIEIP*T*LQ WGG*TRRTDGGQLAPSSATEE QANQSFLQ	21080 8 ; 21080 0 ; 21080 1 ; 21080 2 ; LH ; 21080 3 ; 21080 9 ; T ; 21080 5 ; 21080 6	210810
LibC000222	CA2 (WT の aa2~259, N11K, G12D, P13L, E14N, H15T, W16G, H17I, K18R, D19T, F20S, I22L, A23P, K24R, G25E, E26S, R27A, Q28S, S29P, P30L, V31L, D32T, I33S, D34T, T35L, H36I, T37Q, A38P, K39S,	SHHWGYGKHKDLNTGIRTSPL PRESASPLLTSTLIQPSMTLP*S PCLFPMIKQLP*GSSTMVMLS TWSLMTLRTKQCSREDPWMA LTD*FSFTFTGVHLMDKVQSIL WIKRNMLQNFTWFTGTPNMG ILGKLCSNLMWDPF*VFF*RL	21081 1 ; 21081 2 ; 21081 3 ; 21081	210819

10

20

30

40

【表 3 - 6】

Y40M, D41T, P42L, S43P, L44*, K45S, L47C, S48L, V49F, S50P, Y51M, D52I, Q53K, A54Q, T55L, S56P, L57*, R58G, I59S, L60S, N61T, N62M, G63V, H64M, A65L, F66S, N67T, V68W, E69S, F70L, D71M, D72T, S73L, Q74R, D75T, A77Q, V78C, L79S, K80R, G81E, G82D, L84W, D85M, G86A, T87L, Y88T, R89D, L90*, I91F, Q92S, H94T, H96T, W97G, G98V, S99H, D101M, G102D, Q103K, G104V, S105Q, E106S, H107I, T108L, V109W, D110I, K112R, K113N, Y114M, A115L, A116Q, E117N, L118F, H119T, L120W, V121F, H122T, W123G, N124T, T125P, K126N, Y127M, D129I, F130L, A133L, V134C, Q135S, Q136N, P137L, D138M, G139D, L140W, A141P, V142F, L143*, G144V, I145F, L147*, K148R, V149L, G150A, S151A, A152L, K153N, P154R, G155A, L156F, Q157R, V159L, V160L, D161M, V162C, L163W, D164I, S165P, I166L, T168Q, K169R, G170A, K171R, S172V, A173L, D174T, F175S, T176L, N177T, F178S, D179I, P180L, R181V, G182A, L183S, L184F, P185V, E186N, S187P, L188W, D189I, Y190T, W191G, T192P, Y193T, P194Q, G195A, S196H, L197*, T198P, T199P, P200L, P201L, L202F, L203W, E204N, C205V, V206*, T207P, W208G, I209L, V210C, L211S, K212W, E213N, I215S, S216A, V217S, S218A, S219A, E220S, Q221R, V222C, L223*, K224N, F225Y, R226V, K227N, N229T, F230S, N231M, E233R, G234V, E235N, E237K, E238N, L239*, M240R, V241W, D242T, N243T, W244G, R245A, P246L, A247L, Q248S, P249H, L250*,	AALNRAFRKLLMCWIPLKQR ARVLTSLTSILVASFVNPNWITGP TQAH*PPLLFWNV*PGLCSWN PSASAASRC*NYVNLTSMGRV NPKN*RWTTGALLSH*RTGKS KLPS	4 ; VFF ; 21081 5 ; 21078 7 ; 21081 6 ; 21081 7 ; 21081 8 ; 21079 1 ;	
---	---	--	--

10

20

30

40

【表 3 - 7】

K251R, N252T, R253G, Q254K, I255S, A257L, S258P, F259S)			
--	--	--	--

【 0 0 7 1】

さらなる C A 2 脱安定化ドメインが表 4 に提供される。表 3 B で提供される C A 2 脱安定化変異体は、上述したように、例えば、構造誘導変異誘発によってまたは単一変異体を組み合わせることによって特定される。

【表 4 - 1】

表 4 : CA 2 DD

記	AA 配列	AA 配列 番号	NA 配列 番号
CA2 (M1del, E106D) - バリエアン ト 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQHFHFWGSLDGGQSDHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210968	211004
CA2 (M1del, I59N, G102R) - バリエアン ト 2	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQHFHFWGSLDRQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210969	211005
CA2 (M1del, L197P) - バリエアン ト 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQHFHFWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSPTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210970	211006
CA2 (M1del, L156H, S172C, F178Y, E186D) - バリエアン ト 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQHFHFWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGK CADFTNYDPRGLLPDSL DYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210971	211007
CA2 (M1del, L156H) - バリエアン ト 2	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQHFHFWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210972	211008
CA2 (M1del, KPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGIY	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDHTAKYDPSL KPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGIY	210973	211009

10

20

30

40

【表 4 - 2】

R27L, T87I, H122Y, N252D) - バリエ ント 1	RLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTKYGDF GKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSA DFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVS SEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASF		
CA2 (I59N) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210974	211010
CA2 (G63D) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210975	211011
CA2 (M1del, H122Y) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210976	211012
CA2 (M1del, G63D, M240L) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELLVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210977	211013
CA2 (M1del, A77I, P249F) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKIVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNRQIKASF	210978	211014
CA2 (M1del, D71K, T192F) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWFYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210979	211015

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

CA2 (M1del, L156H)	SHHWGYGKHNNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210980	211016
CA2 (M1del, R27L, H122Y) - バリエアン ト 1	SHHWGYGKHNNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDHTAKYDPSL KPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDSIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210981	211017
CA2 (M1del, T87I, H122Y) - バリエアン ト 1	SHHWGYGKHNNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGI YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDSIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210982	211018
CA2 (M1del, H122Y, N252D) - バリエアン ト 1	SHHWGYGKHNNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASF K	210983	211019
CA2 (M1del, D72F, V241F) - バリエアン ト 1	SHHWGYGKHNNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDSIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMFDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210984	211020
CA2 (M1del, V241F, P249L) - バリエアン ト 1	SHHWGYGKHNNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMFDNWRPAQLLKNRQIKASF K	210985	211021
CA2 (M1del, D72F, P249L) - バリエアン ト 1	SHHWGYGKHNNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQKVVDVLDSIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQLLKNRQIKASFK	210986	211022

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

CA2 (M1del, D71L, T87N) - バリエー ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFLDSQDKAVLKGGPLDG NYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210987	211023
CA2 (M1del, D71L, L250R) - バリエー ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFLDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPRKNRQIKASF K	210988	211024
CA2 (Y51T) - バリエー ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSTDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210989	211025
CA2 (S73N, R89F) - バリエー ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDNQDKAVLKGGPLDG TYFLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210990	211026
CA2 (D72F, P249F) - バリエー ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNRQIKASF K	210991	211027
CA2 (T55K, G63N, Q248N) - バリエー ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQAKSLRILNNHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPANPLKNRQIKASF K	210992	211028
CA2 (Y193I) - バリエー ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGKQVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210993	211029

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

CA2 (S56F) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATFLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210994	211030
CA2 (S56F, D71S) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATFLRILNNGHAFNVEFSDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210995	211031
CA2 (S73N, R89Y) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDNQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210996	211032
CA2 (V134F, L228F) - バリエ ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	210997	211033
CA2 (M1del, L156H, A256del, S257del, F258del, K259del) - バリア ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIK	210998	211034
CA2 (M1del, S2del, H3del, H4del, W5del, L156H) - バリエ ント 1	GYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLS VSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLI QFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGK AVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADF TNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSE QVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210999	211035
CA2 (M1del, W5Y,	SHHYGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSL KPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD	211000	211036

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

L156H) - バリアン ト 1	FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF		
CA2 (M1del, L156H, G234del, E235del, P236del) - バリア ント 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGQGEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF	211001	211037
CA2 (M1del, L156H, F225L) - バリアン ト 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLDGQGEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKLRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	211002	211038
CA2 (M1del, D71N, D75N, D101N, L156H) - バリアン ト 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFNDSQNKAVLKGGPLDG TYRLIQFHFHWGSLNGQGEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K	211003	211039

10

20

【 0 0 7 2】

いくつかの実施形態では、CA2 WTの一領域または一部分は、CA2 DDを生成するためのテンプレートとして使用され得る。いくつかの実施形態では、CA2 DDは、配列番号 1 1 7 1 7 の位置 2 6 0 におけるリジンを除外し得る。いくつかの態様では、CA2 領域には、表 5 に記載されているものが含まれ得るがこれらに限定されない。

【表 5 - 1】

表 5 : CA2 領域

記	AA 配列	AA 配 列番号	NA 配列 番号
CA2 (WT の aa1~142)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAV	21082 0	-
CA2 (WT の aa2~142)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAV	21082 1	-
CA2 (WT の aa1~190)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPL	21082 2	-

30

40

50

【表 5 - 2】

	DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDY		
CA2 (WT の aa2～190)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDY	21082 3	-
CA2 (WT の aa1～89)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYR	21082 4	-
CA2 (WT の aa2～89)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYR	21082 5	-
CA2 (WT の aa1～243)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLEC VTWIV LKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEPEELMVDN	21082 6	-
CA2 (WT の aa2～243)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLEC VTWIV LKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEPEELMVDN	21082 7	-
CA2 (WT の aa1～166)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSI	21082 8	-
CA2 (WT の aa2～166)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSI	21078 2	2108 29
CA2 (WT の aa1～116)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAA	21083 0	-
CA2 (WT の aa2～116)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAA	21083 1	-
CA2 (WT の aa1～152)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS A	21083 2	-
CA2 (WT の aa2～152)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHHWGS LDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS A	21083 3	-

10

20

30

40

【表 5 - 3】

CA2 (WT の aa1～43)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PS	21083 4	-
CA2 (WT の aa2～43)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP S	21083 5	-

【0073】

本明細書に記載のCA2領域のいずれかは、CA2 DDを生成するために利用され得

50

る。表 6 は、C A 2 領域に由来する C A 2 D D を提供する。

【表 6 - 1】

表 6 : C A 2 領域に由来する C A 2 D D

記	AA 配列	AA 配 列番号	NA 配 列番 号
CA2 (WT の aa2~142, G12E, A38V, A65V, G98V, S99H, D101M, G102D, Q103K, G104V, S105Q, E106S, H107I, T108L, V109W, D110I, K112R, K113N, Y114M, A115L, A116Q, E117N, L118F, H119T, L120W, V121F, H122T, W123G, N124T, T125P, K126N, Y127M, D129I, F130L, K132E, A133L, V134C, Q135S, Q136N, P137L, D138M, G139D, L140W, A141P, V142F)	SHHWGYGKHNEPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDT HTVKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHVFNVEF DDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWVHMDK VQSILWIKRNLQNFTWFTGTPNMGILGELCSNL MDWPF	21076 2	21083 6
CA2 (WT の aa2~190, F20L, K45N, G104R, A116V, A173G)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDT HTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQR SEHTVDKKKYAVELHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPLQKVVDVLDSIKTKGKS GDFTNFDPRGLLPESLDY	21076 5	21083 7
CA2 (WT の aa2~190, H17D, P30S, G81V, K132R, S151I, A152D, A173G)	SHHWGYGKHNGPEHWDKDFPIAKGERQSSVDIDT HTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGRAVQQP DGLAVLGIFLKVGIDKPLQKVVDVLDSIKTKGKS GDFTNFDPRGLLPESLDY	21076 8	21083 8
CA2 (WT の aa2~89, I59N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDT HTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGLDGTyr	21077 1	21083 9
CA2 (WT の aa2~243, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, Q221R, F225L, E233D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDI HTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKHAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKLGLQKVVVVLDSIKTKGKS	21077 4	21084 0

10

20

30

40

【表 6 - 2】

	ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTAPLLEC VT WIVLKEPISVSSEVLKLRKLNFGDGEPEELMVD N		
CA2 (WT の aa2~189, S105L, L140V, G155C)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDT HTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQG LEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGVAVLGIFLKVGSAKPCQLQKVVDVLSIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLD	21077 7	21084 1
CA2 (WT の aa2~243, T35L, Y114H, P154L, D161V, P200A, F225L, E233D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDI HTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKHAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKLGLQKVVVVLSIKTKGKS ADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTAPLLEC VT WIVLKEPISVSSEVLKLRKLNFGDGEPEELMVD N	21078 0	21084 2
CA2 (WT の aa2~116, P13H)	SHHWGYGKHNGHEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDT HTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKYAA	21079 3	21084 3
CA2 (WT の aa2~152, A133T, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDT HTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKTVQQP DGLAVLGIFFEWQR	21079 9	21084 4
CA2 (WT の aa2~152, F20L, K45N, G104R, A116V, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDT HTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQR SEHTVDKKKYAVELHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFFEWQR	21080 8	21084 5
CA2 (WT の aa2~43, N11K, G12D, P13L, E14N, H15T, W16G, H17L, K18R, D19T, F20S, I22L, A23P, K24R, G25E, E26S, R27A, Q28S, S29P, P30L, V31L, D32T, I33S, D34T, T35L, H36I, T37Q, A38P, K39S, Y40M, D41T, P42L, S43P)	SHHWGYGKHKDLNTGIRTSPLPRESASPLLTSTLIQ PSMTLP	21081 1	21084 6

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態では、C A 2 に由来する D D は、先行する表に記載の変異の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたはそれより多くを含み得る。

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、変異は、保存された（変異部位におけるアミノ酸と同様の物理化学的特性を有する）、半保存された（例えば、負から正に帯電するアミノ酸）または保存されていない（変異部位におけるアミノ酸とは異なる物理化学的特性を有するアミノ酸）ものであり得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸リジンは、グルタミン酸またはアルギニンに変異され得；アミノ酸フェニルアラニンは、ロイシンに変異され得；アミノ

酸ロイシンは、フェニルアラニンに変異され得；またはアミノ酸アスパラギンは、セリンに変異され得る。野生型タンパク質の領域または部分またはドメインは、S R E / D Dとして全体としてまたは部分的に利用され得る。それらは、組み合わせられ、または再配置されて新たなペプチド、タンパク質、領域またはドメインを作成し得、そのいずれかは、S R E / D DとしてまたはさらなるS R E及び／またはD Dの設計のための開始点として使用され得る。

【0076】

本明細書に記載の脱安定化ドメインにはまた、保存的、非保存的置換及びまたは多型を含む、安定性に影響を及ぼさないアミノ酸及びヌクレオチド置換が含まれ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のC A 2 D Dはまた、バリエーションアミノ酸配列を含有する断片を含む、上記脱安定化ドメインの断片であり得る。好ましい断片は、刺激物の非存在下で不安定であり、刺激物の添加で安定化される。好ましい断片は、本明細書に記載のD Dと同様の効率で刺激物と相互作用する能力を保持する。

【0077】

一実施形態では、S R Eは、C A 2タンパク質の一領域を含む。C A 2タンパク質の領域は、長さが10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、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、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260または260超のアミノ酸であり得る。親タンパク質の領域は、長さが5～50、25～75、50～100、75～125、100～150、125～175、150～200、175～225、200～250、225～260アミノ酸であり得る。

【0078】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のC A 2 D Dは、Uniprot ID: P00918（配列番号11717）に対する1つまたはより多くの変異を含み得る。それらの変異には、A115L、A116Q、A116V、A133L、A133T、A141P、A152D、A152L、A152R、A173C、A173G、A173L、A173T、A23P、A247L、A247S、A257L、A257S、A38P、A38V、A54Q、A54V、A54X、A65L、A65N、A65V、A77I、A77P、A77Q、C205M、C205R、C205V、C205W、C205Y、D101G、D101M、D110I、D129I、D138G、D138M、D138N

、D161*、D161M、D161V、D164G、D164I、D174*、D174T、D179E、D179I、D179R、D189G、D189I、D19T、D19V、D242G、D242T、D32T、D34T、D41T、D52I、D52L、D71F、D71G、D71K、D71M、D71S、D71Y、D72I、D72S、D72T、D72X、D75T、D75V、D85M、E106D、E106G、E106S、E117*、E117N、E14N、E186*、E186N、E204A、E204D、E204G、E204N、E213*、E213G、E213N、E220K、E220R、E220S、E233D、E233G、E233R、E235*、E235G、E235N、E237K、E237R、E238*、E238N、E238R、E26S、E69D、E69K、E69S、F130L、F146V、F175I、F175L、F175S、F178L、F178S、F20L、F20S、F225I、F225L、F225S、F225Y、F230I、F230L、F230S、F259L、F259S、F66S、F70I、F70L、F95Y、G102D、G104R、G104V、G128R、G12D、G12E、G131E、G131R、G131W、G139D、G144D、G144V、G150A、G150S、G150W、G155A、G155C、G155D、G155S、G170A、G170D、G182A、G182W、G195A、G195R、G232R、G232W、G234L、G234V、G25E、G63D、G63V、G81E、G81V、G82D、G86A、G86D、G98V、H107I、H107Q、H119T、H119Y、H122T、H122Y、H15L、H15T、H15Y、H17D、H17I、H36I、H36Q、H64M、H94T、H96T、I145F、I145M、I166H、I166L、I209D、I209L、I215H、I215S、I22L、I255N、I255S、I33S、I59F、I59N、I59S、I91F、K111E、K111N、K112R、K113I、K113N、K126N、K132E、K132R、K148E、K148R、K153*、K153N、K158E、K158N、K167*、K169N、K169R、K171Q、K171R、K18R、K212N、K212Q、K212R、K212W、K224E、K224N、K227*、K227N、K24R、K251E、K251R、K256Q、K260F、K260L、K260Q、K39S、K45N、K45S、K80M、K80R、L118F、L120W、L140V、L140W、L143*、L147*、L147F、L156F、L156H、L156P、L156Q、L163A、L163W、L183P、L183S、L184F、L184P、L188P、L188W、L197*、L197M、L197P、L197R、L197T、L202F、L202H、L202I、L202P、L202R、L202S、L203P、L203S、L203W、L211*、L211A、L211S、L223*、L223I、L223V、L228F、L228H、L228T、L239*、L239F、L239T、L250*、L250P、L250T、L44*、L44M、L47C、L47V、L57*、L57X、L60S、L79F、L79S、L84W、L90*、L90V、M240D、M240L、M240R、M240W、N11D、N11K、N124T、N177*、N177T、N229*、N229T、N231D、N231F、N231K、N231L、N231M、N231Q、N231T、N243Q、N243T、N252E、N252T、N61R、N61T、N61Y、N62K、N62M、N67D、N67T、P137L、P13A、P13H、P13L、P13S、P154L、P154R、P154T、P180L、P180S、P185L、P185S、P185V、P194Q、P200A、P200L、P200S、P200T、P201A、P201L、P201R、P201S、P214T、P236L、P236T、P246L、P246Q、P249A、P249F、P249H、P249I、P249X、P30L、P30S、P42L、P83A、Q103K、Q135S、Q136N、Q157R、Q157S、Q221A、Q221R、Q248F、Q248L、Q248S、Q254A、Q254K、Q28S、Q53H、Q53K、Q53N、Q74R、Q92H、Q92S、R181H、R181S、R181V、R226H、R226P、R226V、R245A、R

10

20

30

40

50

253G、R253Q、R27A、R58G、R89D、R89F、R89I、R89X、R89Y、S105L、S105Q、S151A、S151I、S151Q、S165F、S165P、S172E、S172V、S187I、S187P、S196H、S196L、S216A、S216Q、S218A、S218Q、S219A、S219Q、S258F、S258P、S29C、S29P、S43P、S43T、S48L、S50P、S56F、S56N、S56P、S56X、S73L、S73N、S73X、S99H、T108L、T125I、T125P、T168K、T168N、T168Q、T176H、T176L、T192D、T192F、T192I、T192N、T192P、T192X、T198D、T198I、T198P、T199A、T199H、T199P、T207D、T207I、T207P、T207S、T35I、T35L、T37Q、T55L、T87L、V109M、V109W、V121F、V134C、V134F、V142F、V149G、V149L、V159L、V159S、V160C、V160L、V162A、V162C、V206*、V206C、V206M、V210C、V217L、V217R、V217S、V222A、V222C、V222G、V241G、V241W、V241X、V31L、V49F、V68L、V68W、V78C、W123G、W123R、W16G、W191*、W191G、W191L、W208G、W208L、W208S、W244*、W244G、W244L、W97C、W97G、Y114H、Y114M、Y127M、Y190*、Y190L、Y190T、Y193C、Y193F、Y193I、Y193L、Y193T、Y193V、Y193X、Y40M、Y51F、Y51M、Y51T、Y51X、Y88T、K9N、S29Aが含まれ得るがこれらに限定されない。本明細書で使用される場合、「*」は、終止コドンの翻訳を示し、Xは、任意のアミノ酸を示す。

【0079】

一実施形態では、本明細書に記載のCA2 DDは、E106D、G63D、H122Y、I59N、L156H、L183S、L197P、S56F、S56N、W208S、Y193I、及びY51Tから選択される、Uniprot ID:P00918（配列番号11717）に対する変異を含む。

【0080】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCA2 DDは、Uniprot ID:P00918（配列番号11717）に対する変異を含み得る。それらの変異には、CA2（WTのaa2～260、R27L、H122Y）、CA2（WTのaa2～260、T87I、H122Y）、CA2（WTのaa2～260、H122Y、N252D）、CA2（WTのaa2～260、D72F、V241F）、CA2（WTのaa2～260、V241F、P249L）、CA2（WTのaa2～260、D72F、P249L）、CA2（WTのaa2～260、D71L、L250R）、CA2（WTのaa2～260、D72F、P249F）、CA2（WTのaa2～260、T55K、G63N、Q248N）、CA2（WTのaa2～260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del）、CA2（WTのaa2～260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del）、CA2（WTのaa2～260、W4Y、L156H）、CA2（WTのaa2～260、L156H、G234del、E235del、P236del）、CA2（WTのaa2～260、L156H、F225L）、CA2（WTのaa2～260、D70N、D74N、D100N、L156H）、（CA2（WTのaa2～260、I59N、G102R）（配列番号210598）、CA2（WTのaa2～260、G63D、E69V、N231I）（配列番号210748）、CA2（WTのaa2～260、R27L、T87I、H122Y、N252D）（配列番号210702）、CA2（WTのaa2～260、D72F、V241F、P249L）（配列番号210503）、CA2（WTのaa2～260、D71L、T87N、L250R）（配列番号210510）、CA2（WTのaa2～260、L156H、S172C、F178Y、E186D）（配列番号210756）、CA2（WTのaa2～260、D71F、N231F）（配列番号210505）、C

10

20

30

40

50

A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、A 7 7 I、P 2 4 9 F) (配列番号 2 1 0 5 1 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、P 2 4 9 H) (配列番号 2 1 0 5 1 6)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、P 2 4 9 H) (配列番号 2 1 0 5 1 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、Q 5 3 N、N 6 1 Y) (配列番号 2 1 0 5 2 1)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、E 1 0 6 D、C 2 0 5 S) (配列番号 2 1 0 5 2 3)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、C 2 0 5 S、W 2 0 8 S) (配列番号 2 1 0 5 2 5)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 N、R 8 9 Y) (配列番号 2 1 0 5 3 2)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、T 1 9 2 F) (配列番号 2 1 0 5 3 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、Y 1 9 3 L、K 2 6 0 L) (配列番号 2 1 0 5 4 0)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 F、V 2 4 1 F、P 2 4 9 L) (配列番号 2 1 0 5 4 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、L 1 4 7 F、Q 2 4 8 F) (配列番号 2 1 0 5 4 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 5 2 I、S 2 5 8 P) (配列番号 2 1 0 5 5 0)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 S、T 1 9 2 N) (配列番号 2 1 0 5 5 2)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 1 7 9 E、T 1 9 2 I) (配列番号 2 1 0 5 5 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、S 5 6 N、Q 1 0 3 K) (配列番号 2 1 0 5 5 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 Y、Q 2 4 8 L) (配列番号 2 1 0 5 6 0)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 N、R 8 9 F) (配列番号 2 1 0 5 6 2)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、N 2 3 1 L、E 2 3 5 G、L 2 3 9 F) (配列番号 2 1 0 5 6 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、P 2 4 9 I) (配列番号 2 1 0 5 6 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 X、V 2 4 1 X、P 2 4 9 X) (配列番号 2 1 0 5 7 2)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、A 5 4 X、S 5 6 X、L 5 7 X、T 1 9 2 X) (配列番号 2 1 0 5 7 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、Y 1 9 3 V、K 2 6 0 F) (配列番号 2 1 0 5 7 6)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、M 2 4 0 L) (配列番号 2 1 0 5 7 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、V 1 3 4 F、L 2 2 8 F) (配列番号 2 1 0 5 8 0)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 G、N 2 3 1 K) (配列番号 2 1 0 5 8 2)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、S 5 6 F、D 7 1 S) (配列番号 2 1 0 5 8 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 5 2 L、G 1 2 8 R、Q 2 4 8 F) (配列番号 2 1 0 5 8 6)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 X、R 8 9 X) (配列番号 2 1 0 5 8 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、Y 5 1 X、D 7 2 X、V 2 4 1 X、P 2 4 9 X) (配列番号 2 1 0 5 9 2)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 I、W 9 7 C) (配列番号 2 1 0 5 9 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、T 1 9 2 F、N 2 3 1 F) (配列番号 2 1 0 5 9 6)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、H 3 6 Q、S 4 3 T、Y 5 1 F、N 6 7 D、G 1 3 1 W、R 2 2 6 H) (配列番号 2 1 0 6 9 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、F 7 0 I、F 1 4 6 V) (配列番号 2 1 0 7 0 0)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、K 4 5 N、V 6 8 L、H 1 1 9 Y、K 1 6 9 R、D 1 7 9 E) (配列番号 2 1 0 7 0 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、H 1 5 L、A 5 4 V、K 1 1 1 E、E 2 2 0 K、F 2 2 5 I) (配列番号 2 1 0 7 0 6)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、P 1 3 S、P 8 3 A、D 1 0 1 G、K 1 1 1 N、F 2 3 0 I) (配列番号 2 1 0 7 0 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、W 1 2 3 R、E 2 2 0 K) (配列番号 2 1 0 7 1 2)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、N 1 1 D、E 6 9 K、G 8 6 D、V 1 0 9 M、K 1 1 3 I、T 1 2 5 I、D 1 3 8 G、G 1 5 5 S) (配列番号 2 1 0 7 1 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 N、G 1 0 2 R、A 1 7 3 T) (配列番号 2 1 0 7 1 6)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、L 7 9 F、P 1 8 0 S) (配列番号 2 1 0 7 1 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、A 7 7 P、G 1 0 2 R、D 1 3 8 N) (配列番号 2 1 0 7 2 4)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、F 2 0 L、K 4 5 N、G 6 3 D、E 6 9 V、N 2 3 1 I) (配列番号 2 1 0 7 2 6)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、T 1 9 9 N、L 2 0 2 P、L 2 2 8 F) (配列番号 2 1 0 7 2 8)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、K 9 N、H 1 2 2 Y、T 1 6 8 K) (配列番号 2 1 0 7 3 0)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、Q 5 3 H、L 9 0 V、Q 9 2 H、G 1 3 1 E) (配列番号 2 1 0 7 3 2)、C A 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、L 4 4 M、L 4 7 V、N 6

10

20

30

40

50

2 K、E 6 9 D) (配列番号 2 1 0 7 3 4)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 5 V、K 1 6 9 N、F 2 5 9 L) (配列番号 2 1 0 7 3 8)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、T 2 0 7 S、V 2 2 2 A、N 2 3 1 D) (配列番号 2 1 0 7 4 0)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 F、V 2 0 6 M、G 2 3 2 R) (配列番号 2 1 0 7 4 2)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、P 1 3 A、A 1 3 3 T) (配列番号 2 1 0 7 4 4)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 N、R 8 9 I) (配列番号 2 1 0 7 5 0)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、A 6 5 N、G 8 6 D、G 1 3 1 R、G 1 5 5 D、K 1 5 8 N、V 1 6 2 A、G 1 7 0 D、P 2 3 6 L) (配列番号 2 1 0 7 5 2)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、G 1 2 R、H 1 5 Y、D 1 9 V) (配列番号 2 1 0 7 5 4)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、A 6 5 V、F 9 5 Y、E 1 0 6 G、H 1 0 7 Q、I 1 4 5 M、F 1 7 5 I) (配列番号 2 1 0 7 5 8)、及び／または CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、E 6 9 V、N 2 3 1 I) (配列番号 2 1 0 8 5 1 または 2 1 0 8 4 7) が含まれ得るがこれらに限定されない。

【0081】

一実施形態では、本明細書に記載の CA 2 DD は、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、R 2 7 L、H 1 2 2 Y)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、T 8 7 I、H 1 2 2 Y)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、H 1 2 2 Y、N 2 5 2 D)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、V 2 4 1 F)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、V 2 4 1 F、P 2 4 9 L)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、P 2 4 9 L)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 L、L 2 5 0 R)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、P 2 4 9 F)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、T 5 5 K、G 6 3 N、Q 2 4 8 N)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、L 1 5 6 H、A 2 5 7 del、S 2 5 8 del、F 2 5 9 del、K 2 6 0 del)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、L 1 5 6 H、S 2 del、H 3 del、H 4 del、W 5 del)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、W 4 Y、L 1 5 6 H)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、L 1 5 6 H、G 2 3 4 del、E 2 3 5 del、P 2 3 6 del)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、L 1 5 6 H、F 2 2 5 L)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 0 N、D 7 4 N、D 1 0 0 N、L 1 5 6 H)、(CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 N、G 1 0 2 R) (配列番号 2 1 0 5 9 8)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、E 6 9 V、N 2 3 1 I) (配列番号 2 1 0 7 4 8)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、R 2 7 L、T 8 7 I、H 1 2 2 Y、N 2 5 2 D) (配列番号 2 1 0 7 0 2)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、V 2 4 1 F、P 2 4 9 L) (配列番号 2 1 0 5 0 3)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 L、T 8 7 N、L 2 5 0 R) (配列番号 2 1 0 5 1 0)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、L 1 5 6 H、S 1 7 2 C、F 1 7 8 Y、E 1 8 6 D) (配列番号 2 1 0 7 5 6)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、A 7 7 I、P 2 4 9 F) (配列番号 2 1 0 5 1 4)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、E 1 0 6 D、C 2 0 5 S) (配列番号 2 1 0 5 2 3)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、C 2 0 5 S、W 2 0 8 S) (配列番号 2 1 0 5 2 5)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 N、R 8 9 Y) (配列番号 2 1 0 5 3 2)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、T 1 9 2 F) (配列番号 2 1 0 5 3 4)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 N、R 8 9 F) (配列番号 2 1 0 5 6 2)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、M 2 4 0 L) (配列番号 2 1 0 5 7 8)、CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、V 1 3 4 F、L 2 2 8 F) (配列番号 2 1 0 5 8 0)、及び／または CA 2 (WTの a a 2 ~ 2 6 0、S 5 6 F、D 7 1 S) (配列番号 2 1 0 5 8 4) から選択される、UniProt ID: P 0 0 9 1 8 (配列番号 1 1 7 1 7) に対する複数の変異を含む。

【0082】

【0083】

いくつかの実施形態では、CA 2 は、Homo sapiens のカルボニックアンヒドラーゼに由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の CA 2 DD は、本明細書に記載される及び当業者に知られている配列アライメントプログラム及びパラメータによって決定される、特定の参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドと少なくとも 4

10

20

30

40

50

0%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%であるが100%未満の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では参照ポリペプチドは、配列番号11717であり得る。アライメントのためのツールには、BLAST suite (Stephen F. Altschul, et al. (1997), ‘ ‘ Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs ’ ’, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) のものが含まれ得る。

【0084】

いくつかの実施形態では、CA2 DDは、Homo sapiens以外の種のカルボニックアンヒドラーゼに由来し得る。いくつかの実施形態では、CA2 DDは、限定されないが、Acinonyx jubatus、Ailuropoda melanoleuca、Balaenoptera acutorostrata scammoni、Callithrix jacchus、Callorhinus ursinus、Camelus bactrianus、Camelus dromedarius、Camelus ferus、Canis lupus dingo、Canis lupus familiaris、Carlito syrichta、Castor canadensis、Cebus capucinus imitator、Ceratotherium simum、Cercopithecus atys、Chinchilla lanigera、Chlorocebus sabaeus、Colobus angolensis palliatus、Delphinapterus leucas、Dipodomys ordii、Enhydra lutris kenyoni、Equus asinus、Equus caballus、Equus przewalskii、Erinaceus europaeus、Eumetopias jubatus、Felis catus、Galeopterus variegatus、Gorilla、Homo sapiens、Ictidomys tridecemlineatus、Jaculus、Lagenorhynchus obliquidens、Lemur catta、Leptonyctes weddellii、Lipotes vexillifer、Loxodonta africana、Macaca fascicularis、Macaca mulatta、Macaca nemestrina、Mandrillus leucophaeus、Manis javanica、Marmota flaviventris、Marmota、Microcebus murinus、Mus caroli、Mus musculus、Mus pahari、Mustela putorius furo、Nannospalax galili、Neomonachus schauinslandi、Neophocaena asiaeorientalis、Nomascus leucogenys、Odobenus rosmarus divergens、Orcinus orca、Oryctolagus cuniculus、Otolemur garnettii、Pan paniscus、Pan troglodytes、Panthera pardus、Panthera tigris altaica、Papio anubis、Physeter catodon、Piliocolobus tephrosceles、Pongo abelii、Propithecus coquereli、Puma concolor、Rhinopithecus bieti、Rhinopithecus roxellana、Saimiri boliviensis、Sus scrofa、Theropithecus gelada、Trichechus manatus latirostris、Tupaia chinensis、Tursiops truncatus、Urocitellus parryi、Ursus arctos horribilis、Ursus maritimus、Vulpes、及び／またはZalophus californianusのような種のカルボニックアンヒドラーゼに由来し得る。

【0085】

10

20

30

40

50

本明細書に記載のSREは、限定されないが、1つ、2つ、3つまたはそれより多くの
変異、例えば、限定されないが、A115L、A116Q、A116V、A133L、A
133T、A141P、A152D、A152L、A152R、A173C、A173G
、A173L、A173T、A23P、A247L、A247S、A257L、A257
S、A38P、A38V、A54Q、A54V、A54X、A65L、A65N、A65
V、A77I、A77P、A77Q、C205M、C205R、C205V、C205W
、C205Y、D101G、D101M、D110I、D129I、D138G、D13
8M、D138N、D161*、D161M、D161V、D164G、D164I、D
174*、D174T、D179E、D179I、D179R、D189G、D189I
、D19T、D19V、D242G、D242T、D32T、D34T、D41T、D5
2I、D52L、D71F、D71G、D71K、D71M、D71S、D71Y、D7
2I、D72S、D72T、D72X、D75T、D75V、D85M、E106D、E
106G、E106S、E117*、E117N、E14N、E186*、E186N、
E204A、E204D、E204G、E204N、E213*、E213G、E213
N、E220K、E220R、E220S、E233D、E233G、E233R、E2
35*、E235G、E235N、E237K、E237R、E238*、E238N、
E238R、E26S、E69D、E69K、E69S、F130L、F146V、F1
75I、F175L、F175S、F178L、F178S、F20L、F20S、F2
25I、F225L、F225S、F225Y、F230I、F230L、F230S、
F259L、F259S、F66S、F70I、F70L、F95Y、G102D、G1
04R、G104V、G128R、G12D、G12E、G131E、G131R、G1
31W、G139D、G144D、G144V、G150A、G150S、G150W、
G155A、G155C、G155D、G155S、G170A、G170D、G182
A、G182W、G195A、G195R、G232R、G232W、G234L、G2
34V、G25E、G63D、G63V、G81E、G81V、G82D、G86A、G
86D、G98V、H107I、H107Q、H119T、H119Y、H122T、H
122Y、H15L、H15T、H15Y、H17D、H17I、H36I、H36Q、
H64M、H94T、H96T、I145F、I145M、I166H、I166L、I
209D、I209L、I215H、I215S、I22L、I255N、I255S、
I33S、I59F、I59N、I59S、I91F、K111E、K111N、K11
2R、K113I、K113N、K126N、K132E、K132R、K148E、K
148R、K153*、K153N、K158E、K158N、K167*、K169N
、K169R、K171Q、K171R、K18R、K212N、K212Q、K212
R、K212W、K224E、K224N、K227*、K227N、K24R、K25
1E、K251R、K256Q、K260F、K260L、K260Q、K39S、K4
5N、K45S、K80M、K80R、L118F、L120W、L140V、L140
W、L143*、L147*、L147F、L156F、L156H、L156P、L1
56Q、L163A、L163W、L183P、L183S、L184F、L184P、
L188P、L188W、L197*、L197M、L197P、L197R、L197
T、L202F、L202H、L202I、L202P、L202R、L202S、L2
03P、L203S、L203W、L211*、L211A、L211S、L223*、
L223I、L223V、L228F、L228H、L228T、L239*、L239
F、L239T、L250*、L250P、L250T、L44*、L44M、L47C
、L47V、L57*、L57X、L60S、L79F、L79S、L84W、L90*
、L90V、M240D、M240L、M240R、M240W、N11D、N11K、
N124T、N177*、N177T、N229*、N229T、N231D、N231
F、N231K、N231L、N231M、N231Q、N231T、N243Q、N2
43T、N252E、N252T、N61R、N61T、N61Y、N62K、N62M
、N67D、N67T、P137L、P13A、P13H、P13L、P13S、P15
4L、P154R、P154T、P180L、P180S、P185L、P185S、P

10

20

30

40

50

185V、P194Q、P200A、P200L、P200S、P200T、P201A、P201L、P201R、P201S、P214T、P236L、P236T、P246L、P246Q、P249A、P249F、P249H、P249I、P249X、P30L、P30S、P42L、P83A、Q103K、Q135S、Q136N、Q157R、Q157S、Q221A、Q221R、Q248F、Q248L、Q248S、Q254A、Q254K、Q28S、Q53H、Q53K、Q53N、Q74R、Q92H、Q92S、R181H、R181S、R181V、R226H、R226P、R226V、R245A、R253G、R253Q、R27A、R58G、R89D、R89F、R89I、R89X、R89Y、S105L、S105Q、S151A、S151I、S151Q、S165F、S165P、S172E、S172V、S187I、S187P、S196H、S196L、S216A、S216Q、S218A、S218Q、S219A、S219Q、S258F、S258P、S29C、S29P、S43P、S43T、S48L、S50P、S56F、S56N、S56P、S56X、S73L、S73N、S73X、S99H、T108L、T125I、T125P、T168K、T168N、T168Q、T176H、T176L、T192D、T192F、T192I、T192N、T192P、T192X、T198D、T198I、T198P、T199A、T199H、T199P、T207D、T207I、T207P、T207S、T35I、T35L、T37Q、T55L、T87L、V109M、V109W、V121F、V134C、V134F、V142F、V149G、V149L、V159L、V159S、V160C、V160L、V162A、V162C、V206*、V206C、V206M、V210C、V217L、V217R、V217S、V222A、V222C、V222G、V241G、V241W、V241X、V31L、V49F、V68L、V68W、V78C、W123G、W123R、W16G、W191*、W191G、W191L、W208G、W208L、W208S、W244*、W244G、W244L、W97C、W97G、Y114H、Y114M、Y127M、Y190*、Y190L、Y190T、Y193C、Y193F、Y193I、Y193L、Y193T、Y193V、Y193X、Y40M、Y51F、Y51M、Y51T、Y51X、Y88T、K9N、S29Aを含むCA2 DDを含み得る。

【0086】

一実施形態では、本明細書に記載のSREは、E106D、G63D、H122Y、I59N、L156H、L183S、L197P、S56F、S56N、W208S、Y193I、及びY51Tから選択される変異を含むCA2 DDを含み得る。

【0087】

本明細書に記載のSREは、限定されないが、CA2 (WTのaa2~260、R27L、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、T87I、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、H122Y、N252D)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F)、CA2 (WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2 (WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2 (WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2 (WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2 (WTのaa2~260、I59N、G102R) (配列番号210598)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210748)、CA2 (WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D) (配列番号210702)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L) (配列番

10

20

30

40

50

号 210503)、CA2 (WTの aa2~260、D71L、T87N、L250R)
(配列番号 210510)、CA2 (WTの aa2~260、L156H、S172C、
F178Y、E186D) (配列番号 210756)、CA2 (WTの aa2~260、
D71F、N231F) (配列番号 210505)、CA2 (WTの aa2~260、A
77I、P249F) (配列番号 210514)、CA2 (WTの aa2~260、D7
1K、P249H) (配列番号 210516)、CA2 (WTの aa2~260、D72
F、P249H) (配列番号 210518)、CA2 (WTの aa2~260、Q53N
、N61Y) (配列番号 210521)、CA2 (WTの aa2~260、E106D、
C205S) (配列番号 210523)、CA2 (WTの aa2~260、C205S、
W208S) (配列番号 210525)、CA2 (WTの aa2~260、S73N、R
89Y) (配列番号 210532)、CA2 (WTの aa2~260、D71K、T19
2F) (配列番号 210534)、CA2 (WTの aa2~260、Y193L、K26
0L) (配列番号 210540)、CA2 (WTの aa2~260、D71F、V241
F、P249L) (配列番号 210544)、CA2 (WTの aa2~260、L147
F、Q248F) (配列番号 210548)、CA2 (WTの aa2~260、D52I
、S258P) (配列番号 210550)、CA2 (WTの aa2~260、D72S、
T192N) (配列番号 210552)、CA2 (WTの aa2~260、D179E、
T192I) (配列番号 210554)、CA2 (WTの aa2~260、S56N、Q
103K) (配列番号 210558)、CA2 (WTの aa2~260、D71Y、Q2
48L) (配列番号 210560)、CA2 (WTの aa2~260、S73N、R89
F) (配列番号 210562)、CA2 (WTの aa2~260、D71K、N231L
、E235G、L239F) (配列番号 210564)、CA2 (WTの aa2~260
、D72F、P249I) (配列番号 210568)、CA2 (WTの aa2~260、
D72X、V241X、P249X) (配列番号 210572)、CA2 (WTの aa2
~260、A54X、S56X、L57X、T192X) (配列番号 210574)、C
A2 (WTの aa2~260、Y193V、K260F) (配列番号 210576)、C
A2 (WTの aa2~260、G63D、M240L) (配列番号 210578)、CA
2 (WTの aa2~260、V134F、L228F) (配列番号 210580)、CA
2 (WTの aa2~260、D71G、N231K) (配列番号 210582)、CA2
(WTの aa2~260、S56F、D71S) (配列番号 210584)、CA2 (W
Tの aa2~260、D52L、G128R、Q248F) (配列番号 210586)、
CA2 (WTの aa2~260、S73X、R89X) (配列番号 210588)、CA
2 (WTの aa2~260、Y51X、D72X、V241X、P249X) (配列番号
210592)、CA2 (WTの aa2~260、D72I、W97C) (配列番号 21
0594)、CA2 (WTの aa2~260、D71K、T192F、N231F) (配
列番号 210596)、CA2 (WTの aa2~260、H36Q、S43T、Y51F
、N67D、G131W、R226H) (配列番号 210698)、CA2 (WTの aa
2~260、F70I、F146V) (配列番号 210700)、CA2 (WTの aa2
~260、K45N、V68L、H119Y、K169R、D179E) (配列番号 21
0704)、CA2 (WTの aa2~260、H15L、A54V、K111E、E22
0K、F225I) (配列番号 210706)、CA2 (WTの aa2~260、P13
S、P83A、D101G、K111N、F230I) (配列番号 210708)、CA
2 (WTの aa2~260、G63D、W123R、E220K) (配列番号 21071
2)、CA2 (WTの aa2~260、N11D、E69K、G86D、V109M、K
113I、T125I、D138G、G155S) (配列番号 210714)、CA2 (W
Tの aa2~260、I59N、G102R、A173T) (配列番号 210716)
、CA2 (WTの aa2~260、L79F、P180S) (配列番号 210718)、
CA2 (WTの aa2~260、A77P、G102R、D138N) (配列番号 210
724)、CA2 (WTの aa2~260、F20L、K45N、G63D、E69V、
N231I) (配列番号 210726)、CA2 (WTの aa2~260、T199N、

10

20

30

40

50

L202P、L228F) (配列番号210728)、CA2(WTのaa2~260、K9N、H122Y、T168K) (配列番号210730)、CA2(WTのaa2~260、Q53H、L90V、Q92H、G131E) (配列番号210732)、CA2(WTのaa2~260、L44M、L47V、N62K、E69D) (配列番号210734)、CA2(WTのaa2~260、D75V、K169N、F259L) (配列番号210738)、CA2(WTのaa2~260、T207S、V222A、N231D) (配列番号210740)、CA2(WTのaa2~260、I59F、V206M、G232R) (配列番号210742)、CA2(WTのaa2~260、P13A、A133T) (配列番号210744)、CA2(WTのaa2~260、I59N、R89I) (配列番号210750)、CA2(WTのaa2~260、A65N、G86D、G131R、G155D、K158N、V162A、G170D、P236L) (配列番号210752)、CA2(WTのaa2~260、G12R、H15Y、D19V) (配列番号210754)、CA2(WTのaa2~260、A65V、F95Y、E106G、H107Q、I145M、F175I) (配列番号210758)、及び／またはCA2(WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210851または210847)などの変異を含むCA2 DDを含み得る。

【0088】

一実施形態では、本明細書に記載のSREは、CA2(WTのaa2~260、R27L、H122Y)、CA2(WTのaa2~260、T87I、H122Y)、CA2(WTのaa2~260、H122Y、N252D)、CA2(WTのaa2~260、D72F、V241F)、CA2(WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2(WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2(WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2(WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2(WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2(WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2(WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2(WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2(WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2(WTのaa2~260、I59N、G102R) (配列番号210598)、CA2(WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210748)、CA2(WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D) (配列番号210702)、CA2(WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L) (配列番号210503)、CA2(WTのaa2~260、D71L、T87N、L250R) (配列番号210510)、CA2(WTのaa2~260、L156H、S172C、F178Y、E186D) (配列番号210756)、CA2(WTのaa2~260、A77I、P249F) (配列番号210514)、CA2(WTのaa2~260、E106D、C205S) (配列番号210523)、CA2(WTのaa2~260、C205S、W208S) (配列番号210525)、CA2(WTのaa2~260、S73N、R89Y) (配列番号210532)、CA2(WTのaa2~260、D71K、T192F) (配列番号210534)、CA2(WTのaa2~260、S73N、R89F) (配列番号210562)、CA2(WTのaa2~260、G63D、M240L) (配列番号210578)、CA2(WTのaa2~260、V134F、L228F) (配列番号210580)、及び／またはCA2(WTのaa2~260、S56F、D71S) (配列番号210584)から選択される変異を含むCA2 DDを含み得る。

【0089】

本明細書ではまた、少なくとも1つのエフェクターモジュールを含む生体回路システムが提供される。生体回路のエフェクターモジュールは、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ

10

20

30

40

50

2 (CA2; 配列番号 11717) を全体としてまたは部分的に含む刺激反応要素 (SRE) を含み得る。生体回路はまた、SRE に結合、付加または関連付けられ得る少なくとも 1 つのペイロードを含み得る。

【0090】

ヒトカルボニックアンヒドラーゼ 2 (CA2; 配列番号 11717) を全体としてまたは部分的に含む生体回路システムの SRE は、1 つ、2 つ、3 つまたはそれより多くの変異、例えば、限定されないが、A115L、A116Q、A116V、A133L、A133T、A141P、A152D、A152L、A152R、A173C、A173G、A173L、A173T、A23P、A247L、A247S、A257L、A257S、A38P、A38V、A54Q、A54V、A54X、A65L、A65N、A65V、A77I、A77P、A77Q、C205M、C205R、C205V、C205W、C205Y、D101G、D101M、D110I、D129I、D138G、D138M、D138N、D161*、D161M、D161V、D164G、D164I、D174*、D174T、D179E、D179I、D179R、D189G、D189I、D19T、D19V、D242G、D242T、D32T、D34T、D41T、D52I、D52L、D71F、D71G、D71K、D71M、D71S、D71Y、D72I、D72S、D72T、D72X、D75T、D75V、D85M、E106D、E106G、E106S、E117*、E117N、E14N、E186*、E186N、E204A、E204D、E204G、E204N、E213*、E213G、E213N、E220K、E220R、E220S、E233D、E233G、E233R、E235*、E235G、E235N、E237K、E237R、E238*、E238N、E238R、E26S、E69D、E69K、E69S、F130L、F146V、F175I、F175L、F175S、F178L、F178S、F20L、F20S、F225I、F225L、F225S、F225Y、F230I、F230L、F230S、F259L、F259S、F66S、F70I、F70L、F95Y、G102D、G104R、G104V、G128R、G12D、G12E、G131E、G131R、G131W、G139D、G144D、G144V、G150A、G150S、G150W、G155A、G155C、G155D、G155S、G170A、G170D、G182A、G182W、G195A、G195R、G232R、G232W、G234L、G234V、G25E、G63D、G63V、G81E、G81V、G82D、G86A、G86D、G98V、H107I、H107Q、H119T、H119Y、H122T、H122Y、H15L、H15T、H15Y、H17D、H17I、H36I、H36Q、H64M、H94T、H96T、I145F、I145M、I166H、I166L、I209D、I209L、I215H、I215S、I22L、I255N、I255S、I33S、I59F、I59N、I59S、I91F、K111E、K111N、K112R、K113I、K113N、K126N、K132E、K132R、K148E、K148R、K153*、K153N、K158E、K158N、K167*、K169N、K169R、K171Q、K171R、K18R、K212N、K212Q、K212R、K212W、K224E、K224N、K227*、K227N、K24R、K251E、K251R、K256Q、K260F、K260L、K260Q、K39S、K45N、K45S、K80M、K80R、L118F、L120W、L140V、L140W、L143*、L147*、L147F、L156F、L156H、L156P、L156Q、L163A、L163W、L183P、L183S、L184F、L184P、L188P、L188W、L197*、L197M、L197P、L197R、L197T、L202F、L202H、L202I、L202P、L202R、L202S、L203P、L203S、L203W、L211*、L211A、L211S、L223*、L223I、L223V、L228F、L228H、L228T、L239*、L239F、L239T、L250*、L250P、L250T、L44*、L44M、L47C、L47V、L57*、L57X、L60S、L79F、L79S、L84W、L90*、L90V、M240D、M240L、M240R、M240W、N11D、N11K、N

10

20

30

40

50

124T、N177*、N177T、N229*、N229T、N231D、N231F、N231K、N231L、N231M、N231Q、N231T、N243Q、N243T、N252E、N252T、N61R、N61T、N61Y、N62K、N62M、N67D、N67T、P137L、P13A、P13H、P13L、P13S、P154L、P154R、P154T、P180L、P180S、P185L、P185S、P185V、P194Q、P200A、P200L、P200S、P200T、P201A、P201L、P201R、P201S、P214T、P236L、P236T、P246L、P246Q、P249A、P249F、P249H、P249I、P249X、P30L、P30S、P42L、P83A、Q103K、Q135S、Q136N、Q157R、Q157S、Q221A、Q221R、Q248F、Q248L、Q248S、Q254A、Q254K、Q28S、Q53H、Q53K、Q53N、Q74R、Q92H、Q92S、R181H、R181S、R181V、R226H、R226P、R226V、R245A、R253G、R253Q、R27A、R58G、R89D、R89F、R89I、R89X、R89Y、S105L、S105Q、S151A、S151I、S151Q、S165F、S165P、S172E、S172V、S187I、S187P、S196H、S196L、S216A、S216Q、S218A、S218Q、S219A、S219Q、S258F、S258P、S29C、S29P、S43P、S43T、S48L、S50P、S56F、S56N、S56P、S56X、S73L、S73N、S73X、S99H、T108L、T125I、T125P、T168K、T168N、T168Q、T176H、T176L、T192D、T192F、T192I、T192N、T192P、T192X、T198D、T198I、T198P、T199A、T199H、T199P、T207D、T207I、T207P、T207S、T35I、T35L、T37Q、T55L、T87L、V109M、V109W、V121F、V134C、V134F、V142F、V149G、V149L、V159L、V159S、V160C、V160L、V162A、V162C、V206*、V206C、V206M、V210C、V217L、V217R、V217S、V222A、V222C、V222G、V241G、V241W、V241X、V31L、V49F、V68L、V68W、V78C、W123G、W123R、W16G、W191*、W191G、W191L、W208G、W208L、W208S、W244*、W244G、W244L、W97C、W97G、Y114H、Y114M、Y127M、Y190*、Y190L、Y190T、Y193C、Y193F、Y193I、Y193L、Y193T、Y193V、Y193X、Y40M、Y51F、Y51M、Y51T、Y51X、Y88T、K9N、S29Aを含み得る。

【0091】

一実施形態では、全体としてまたは部分的に、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2（CA2；配列番号11717）を含む生体回路システムのSREは、E106D、G63D、H122Y、I59N、L156H、L183S、L197P、S56F、S56N、W208S、Y193I、及びY51Tから選択される変異を含み得る。

【0092】

ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2（CA2；配列番号11717）を全体としてまたは部分的に含む生体回路システムのSREは、複数の変異、例えば、限定されないが、CA2（WTのaa2～260、R27L、H122Y）、CA2（WTのaa2～260、T87I、H122Y）、CA2（WTのaa2～260、H122Y、N252D）、CA2（WTのaa2～260、D72F、V241F）、CA2（WTのaa2～260、V241F、P249L）、CA2（WTのaa2～260、D72F、P249L）、CA2（WTのaa2～260、D71L、L250R）、CA2（WTのaa2～260、D72F、P249F）、CA2（WTのaa2～260、T55K、G63N、Q248N）、CA2（WTのaa2～260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del）、CA2（WTのaa2～260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del）、CA2（WTのaa2～

10

20

30

40

50

260、W4Y、L156H)、CA2(WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2(WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2(WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2(WTのaa2~260、I59N、G102R)(配列番号210598)、CA2(WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I)(配列番号210748)、CA2(WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D)(配列番号210702)、CA2(WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L)(配列番号210503)、CA2(WTのaa2~260、D71L、T87N、L250R)(配列番号210510)、CA2(WTのaa2~260、L156H、S172C、F178Y、E186D)(配列番号210756)、CA2(WTのaa2~260、D71F、N231F)(配列番号210505)、CA2(WTのaa2~260、A77I、P249F)(配列番号210514)、CA2(WTのaa2~260、D71K、P249H)(配列番号210516)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249H)(配列番号210518)、CA2(WTのaa2~260、Q53N、N61Y)(配列番号210521)、CA2(WTのaa2~260、E106D、C205S)(配列番号210523)、CA2(WTのaa2~260、C205S、W208S)(配列番号210525)、CA2(WTのaa2~260、S73N、R89Y)(配列番号210532)、CA2(WTのaa2~260、D71K、T192F)(配列番号210534)、CA2(WTのaa2~260、Y193L、K260L)(配列番号210540)、CA2(WTのaa2~260、D71F、V241F、P249L)(配列番号210544)、CA2(WTのaa2~260、L147F、Q248F)(配列番号210548)、CA2(WTのaa2~260、D52I、S258P)(配列番号210550)、CA2(WTのaa2~260、D72S、T192N)(配列番号210552)、CA2(WTのaa2~260、D179E、T192I)(配列番号210554)、CA2(WTのaa2~260、S56N、Q103K)(配列番号210558)、CA2(WTのaa2~260、D71Y、Q248L)(配列番号210560)、CA2(WTのaa2~260、S73N、R89F)(配列番号210562)、CA2(WTのaa2~260、D71K、N231L、E235G、L239F)(配列番号210564)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249I)(配列番号210568)、CA2(WTのaa2~260、D72X、V241X、P249X)(配列番号210572)、CA2(WTのaa2~260、A54X、S56X、L57X、T192X)(配列番号210574)、CA2(WTのaa2~260、Y193V、K260F)(配列番号210576)、CA2(WTのaa2~260、G63D、M240L)(配列番号210578)、CA2(WTのaa2~260、V134F、L228F)(配列番号210580)、CA2(WTのaa2~260、D71G、N231K)(配列番号210582)、CA2(WTのaa2~260、S56F、D71S)(配列番号210584)、CA2(WTのaa2~260、D52L、G128R、Q248F)(配列番号210586)、CA2(WTのaa2~260、S73X、R89X)(配列番号210588)、CA2(WTのaa2~260、Y51X、D72X、V241X、P249X)(配列番号210592)、CA2(WTのaa2~260、D72I、W97C)(配列番号210594)、CA2(WTのaa2~260、D71K、T192F、N231F)(配列番号210596)、CA2(WTのaa2~260、H36Q、S43T、Y51F、N67D、G131W、R226H)(配列番号210698)、CA2(WTのaa2~260、F70I、F146V)(配列番号210700)、CA2(WTのaa2~260、K45N、V68L、H119Y、K169R、D179E)(配列番号210704)、CA2(WTのaa2~260、H15L、A54V、K111E、E220K、F225I)(配列番号210706)、CA2(WTのaa2~260、P13S、P83A、D101G、K111N、F230I)(配列番号210708)、CA2(WTのaa2~260、G63D、W123R

10

20

30

40

50

、E220K) (配列番号210712)、CA2 (WTのaa2~260、N11D、E69K、G86D、V109M、K113I、T125I、D138G、G155S) (配列番号210714)、CA2 (WTのaa2~260、I59N、G102R、A173T) (配列番号210716)、CA2 (WTのaa2~260、L79F、P180S) (配列番号210718)、CA2 (WTのaa2~260、A77P、G102R、D138N) (配列番号210724)、CA2 (WTのaa2~260、F20L、K45N、G63D、E69V、N231I) (配列番号210726)、CA2 (WTのaa2~260、T199N、L202P、L228F) (配列番号210728)、CA2 (WTのaa2~260、K9N、H122Y、T168K) (配列番号210730)、CA2 (WTのaa2~260、Q53H、L90V、Q92H、G131E) (配列番号210732)、CA2 (WTのaa2~260、L44M、L47V、N62K、E69D) (配列番号210734)、CA2 (WTのaa2~260、D75V、K169N、F259L) (配列番号210738)、CA2 (WTのaa2~260、T207S、V222A、N231D) (配列番号210740)、CA2 (WTのaa2~260、I59F、V206M、G232R) (配列番号210742)、CA2 (WTのaa2~260、P13A、A133T) (配列番号210744)、CA2 (WTのaa2~260、I59N、R89I) (配列番号210750)、CA2 (WTのaa2~260、A65N、G86D、G131R、G155D、K158N、V162A、G170D、P236L) (配列番号210752)、CA2 (WTのaa2~260、G12R、H15Y、D19V) (配列番号210754)、CA2 (WTのaa2~260、A65V、F95Y、E106G、H107Q、I145M、F175I) (配列番号210758)、及び／またはCA2 (WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210851または210847)を含み得る。

【0093】

一実施形態では、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2 (CA2; 配列番号11717) を全体としてまたは部分的に含む生体回路システムのSREは、CA2 (WTのaa2~260、R27L、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、T87I、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、H122Y、N252D)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F)、CA2 (WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2 (WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2 (WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2 (WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2 (WTのaa2~260、I59N、G102R) (配列番号210598)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210748)、CA2 (WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D) (配列番号210702)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L) (配列番号210503)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、T87N、L250R) (配列番号210510)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S172C、F178Y、E186D) (配列番号210756)、CA2 (WTのaa2~260、A77I、P249F) (配列番号210514)、CA2 (WTのaa2~260、E106D、C205S) (配列番号210523)、CA2 (WTのaa2~260、C205S、W208S) (配列番号210525)、CA2 (WTのaa2~260、S73N、R89Y) (配列番号210532)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、T192F) (配列番号210534)、CA2 (WTのaa2~2

10

20

30

40

50

60、S73N、R89F) (配列番号210562)、CA2(WTのaa2~260、G63D、M240L) (配列番号210578)、CA2(WTのaa2~260、V134F、L228F) (配列番号210580)、及び／またはCA2(WTのaa2~260、S56F、D71S) (配列番号210584)から選択される複数の変異を含み得る。

【0094】

SREの安定化及び脱安定化比

【0095】

いくつかの実施形態では、本開示は、安定化比及び脱安定化比を測定することによってタンパク質、発現、機能またはレベルを調節するための方法を提供する。本明細書で使用される場合、安定化比は、刺激物に反応する対象となるタンパク質の発現、機能またはレベルの、SREに特異的な刺激物の非存在下での対象となるタンパク質の発現、機能またはレベルに対する比として定義され得る。いくつかの態様では、安定化比は、少なくとも1、例えば、少なくとも1~10、1~20、1~30、1~40、1~50、1~60、1~70、1~80、1~90、1~100、20~30、20~40、20~50、20~60、20~70、20~80、20~90、20~95、20~100、30~40、30~50、30~60、30~70、30~80、30~90、30~95、30~100、40~50、40~60、40~70、40~80、40~90、40~95、40~100、50~60、50~70、50~80、50~90、50~95、50~100、60~70、60~80、60~90、60~95、60~100、70~80、70~90、70~95、70~100、80~90、80~95、80~100、90~95、90~100または95~100であり得る。本明細書で使用される場合、脱安定化比は、エフェクターモジュールに特異的な刺激物の非存在下での対象となるタンパク質の発現、機能またはレベルの、SREに特異的な刺激物の非存在下での構成的に発現される対象となるタンパク質の発現、機能またはレベルに対する比として定義され得る。本明細書で使用される場合、「構成的に」は、SREに連結されておらず、そのため、刺激物の存在下及び非存在下の両方で発現される対象となるタンパク質の発現、機能またはレベルを指す。いくつかの態様では、脱安定化比は、少なくとも0、例えば、少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、または少なくとも0~0.1、0~0.2、0~0.3、0~0.4、0~0.5、0~0.6、0~0.7、0~0.8、0~0.9、0.1~0.2、0.1~0.3、0.1~0.4、0.1~0.5、0.1~0.6、0.1~0.7、0.1~0.8、0.1~0.9、0.2~0.3、0.2~0.4、0.2~0.5、0.2~0.6、0.2~0.7、0.2~0.8、0.2~0.9、0.3~0.4、0.3~0.5、0.3~0.6、0.3~0.7、0.3~0.8、0.3~0.9、0.4~0.5、0.4~0.6、0.4~0.7、0.4~0.8、0.4~0.9、0.5~0.6、0.5~0.7、0.5~0.8、0.5~0.9、0.6~0.7、0.6~0.8、0.6~0.9、0.7~0.8、0.7~0.9または0.8~0.9である。

【0096】

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールのSREは、1またはより多くの安定化比で対象となるペイロードを安定化し得、安定化比は、刺激物の存在下での対象となるペイロードの発現、機能またはレベルの、刺激物の非存在下での対象となるペイロードの発現、機能またはレベルに対する比を含み得る。

【0097】

いくつかの実施形態では、SREは、0~0.09の間の脱安定化比で対象となるペイロードを脱安定化し得、脱安定化比は、SREに特異的な刺激物の非存在下での対象となるタンパク質の発現、機能またはレベルの、SREに特異的な刺激物の非存在下での構成的に発現される対象となるタンパク質の発現、機能またはレベルに対する比を含み得る。

【0098】

SREのタンパク質-タンパク質相互作用

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ 2 (CA2; 配列番号 11717) に全体としてまたは部分的に由来する脱安定化ドメイン (DD) を含み得る刺激反応要素 (SRE) を提供する。一実施形態では、DD は、CA2 (配列番号 11717) 全体を含み得る。いくつかの実施形態では、DD は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼの一部分または一領域を含み得る。CA2 の部分または領域は、限定されないが、CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~260、例えば、限定されないが、配列番号 (210492); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 1~142、例えば、限定されないが、配列番号 (210820); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~142、例えば、限定されないが、配列番号 (210821); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 1~190、例えば、限定されないが、配列番号 (210822); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~190、例えば、限定されないが、配列番号 (210823); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 1~89、例えば、限定されないが、配列番号 (210824); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~89、例えば、限定されないが、配列番号 (210825); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 1~243、例えば、限定されないが、配列番号 (210826); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~243、例えば、限定されないが、配列番号 (210827); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 1~166、例えば、限定されないが、配列番号 (210828); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~166、例えば、限定されないが、配列番号 (210782); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 1~116、例えば、限定されないが、配列番号 (210830); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~116、例えば、限定されないが、配列番号 (210831); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 1~152 例えば、限定されないが、配列番号 (210832); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~152、例えば、限定されないが、配列番号 (210833); CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 1~43、例えば、限定されないが、配列番号 (210834); または CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~43、例えば、限定されないが、配列番号 (210835) から選択され得る。一実施形態では、DD は、CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~260 を含み得る。一実施形態では、DD は、CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~260、例えば、限定されないが、配列番号 210492 を含み得る。

【0099】

一実施形態では、DD は、CA2 (配列番号 11717) のアミノ酸 2~260 を含み得る。

【0100】

いくつかの実施形態では、DD は、1つ、2つ、3つまたはそれより多くの変異、例えば、限定されないが、A115L、A116Q、A116V、A133L、A133T、A141P、A152D、A152L、A152R、A173C、A173G、A173L、A173T、A23P、A247L、A247S、A257L、A257S、A38P、A38V、A54Q、A54V、A54X、A65L、A65N、A65V、A77I、A77P、A77Q、C205M、C205R、C205V、C205W、C205Y、D101G、D101M、D110I、D129I、D138G、D138M、D138N、D161*、D161M、D161V、D164G、D164I、D174*、D174T、D179E、D179I、D179R、D189G、D189I、D19T、D19V、D242G、D242T、D32T、D34T、D41T、D52I、D52L、D71F、D71G、D71K、D71M、D71S、D71Y、D72I、D72S、D72T、D72X、D75T、D75V、D85M、E106D、E106G、E106S、E117*、E117N、E14N、E186*、E186N、E204A、E204D、E204G、E204N、E213*、E213G、E213N、E220K、E220R、E220S、E233D、E233G、E233R、E235*、E235G、E235N、E237K、E237R、E238*、E238N、E238R

、 E 2 6 S、 E 6 9 D、 E 6 9 K、 E 6 9 S、 F 1 3 0 L、 F 1 4 6 V、 F 1 7 5 I、 F
1 7 5 L、 F 1 7 5 S、 F 1 7 8 L、 F 1 7 8 S、 F 2 0 L、 F 2 0 S、 F 2 2 5 I、 F
2 2 5 L、 F 2 2 5 S、 F 2 2 5 Y、 F 2 3 0 I、 F 2 3 0 L、 F 2 3 0 S、 F 2 5 9 L
、 F 2 5 9 S、 F 6 6 S、 F 7 0 I、 F 7 0 L、 F 9 5 Y、 G 1 0 2 D、 G 1 0 4 R、 G
1 0 4 V、 G 1 2 8 R、 G 1 2 D、 G 1 2 E、 G 1 3 1 E、 G 1 3 1 R、 G 1 3 1 W、 G
1 3 9 D、 G 1 4 4 D、 G 1 4 4 V、 G 1 5 0 A、 G 1 5 0 S、 G 1 5 0 W、 G 1 5 5 A
、 G 1 5 5 C、 G 1 5 5 D、 G 1 5 5 S、 G 1 7 0 A、 G 1 7 0 D、 G 1 8 2 A、 G 1 8
2 W、 G 1 9 5 A、 G 1 9 5 R、 G 2 3 2 R、 G 2 3 2 W、 G 2 3 4 L、 G 2 3 4 V、 G
2 5 E、 G 6 3 D、 G 6 3 V、 G 8 1 E、 G 8 1 V、 G 8 2 D、 G 8 6 A、 G 8 6 D、 G
9 8 V、 H 1 0 7 I、 H 1 0 7 Q、 H 1 1 9 T、 H 1 1 9 Y、 H 1 2 2 T、 H 1 2 2 Y、
H 1 5 L、 H 1 5 T、 H 1 5 Y、 H 1 7 D、 H 1 7 I、 H 3 6 I、 H 3 6 Q、 H 6 4 M、
H 9 4 T、 H 9 6 T、 I 1 4 5 F、 I 1 4 5 M、 I 1 6 6 H、 I 1 6 6 L、 I 2 0 9 D、
I 2 0 9 L、 I 2 1 5 H、 I 2 1 5 S、 I 2 2 L、 I 2 5 5 N、 I 2 5 5 S、 I 3 3 S、
I 5 9 F、 I 5 9 N、 I 5 9 S、 I 9 1 F、 K 1 1 1 E、 K 1 1 1 N、 K 1 1 2 R、 K 1
1 3 I、 K 1 1 3 N、 K 1 2 6 N、 K 1 3 2 E、 K 1 3 2 R、 K 1 4 8 E、 K 1 4 8 R、
K 1 5 3 *、 K 1 5 3 N、 K 1 5 8 E、 K 1 5 8 N、 K 1 6 7 *、 K 1 6 9 N、 K 1 6 9
R、 K 1 7 1 Q、 K 1 7 1 R、 K 1 8 R、 K 2 1 2 N、 K 2 1 2 Q、 K 2 1 2 R、 K 2 1
2 W、 K 2 2 4 E、 K 2 2 4 N、 K 2 2 7 *、 K 2 2 7 N、 K 2 4 R、 K 2 5 1 E、 K 2
5 1 R、 K 2 5 6 Q、 K 2 6 0 F、 K 2 6 0 L、 K 2 6 0 Q、 K 3 9 S、 K 4 5 N、 K 4
5 S、 K 8 0 M、 K 8 0 R、 L 1 1 8 F、 L 1 2 0 W、 L 1 4 0 V、 L 1 4 0 W、 L 1 4
3 *、 L 1 4 7 *、 L 1 4 7 F、 L 1 5 6 F、 L 1 5 6 H、 L 1 5 6 P、 L 1 5 6 Q、 L
1 6 3 A、 L 1 6 3 W、 L 1 8 3 P、 L 1 8 3 S、 L 1 8 4 F、 L 1 8 4 P、 L 1 8 8 P
、 L 1 8 8 W、 L 1 9 7 *、 L 1 9 7 M、 L 1 9 7 P、 L 1 9 7 R、 L 1 9 7 T、 L 2 0
2 F、 L 2 0 2 H、 L 2 0 2 I、 L 2 0 2 P、 L 2 0 2 R、 L 2 0 2 S、 L 2 0 3 P、 L
2 0 3 S、 L 2 0 3 W、 L 2 1 1 *、 L 2 1 1 A、 L 2 1 1 S、 L 2 2 3 *、 L 2 2 3 I
、 L 2 2 3 V、 L 2 2 8 F、 L 2 2 8 H、 L 2 2 8 T、 L 2 3 9 *、 L 2 3 9 F、 L 2 3
9 T、 L 2 5 0 *、 L 2 5 0 P、 L 2 5 0 T、 L 4 4 *、 L 4 4 M、 L 4 7 C、 L 4 7 V
、 L 5 7 *、 L 5 7 X、 L 6 0 S、 L 7 9 F、 L 7 9 S、 L 8 4 W、 L 9 0 *、 L 9 0 V
、 M 2 4 0 D、 M 2 4 0 L、 M 2 4 0 R、 M 2 4 0 W、 N 1 1 D、 N 1 1 K、 N 1 2 4 T
、 N 1 7 7 *、 N 1 7 7 T、 N 2 2 9 *、 N 2 2 9 T、 N 2 3 1 D、 N 2 3 1 F、 N 2 3
1 K、 N 2 3 1 L、 N 2 3 1 M、 N 2 3 1 Q、 N 2 3 1 T、 N 2 4 3 Q、 N 2 4 3 T、 N
2 5 2 E、 N 2 5 2 T、 N 6 1 R、 N 6 1 T、 N 6 1 Y、 N 6 2 K、 N 6 2 M、 N 6 7 D
、 N 6 7 T、 P 1 3 7 L、 P 1 3 A、 P 1 3 H、 P 1 3 L、 P 1 3 S、 P 1 5 4 L、 P 1
5 4 R、 P 1 5 4 T、 P 1 8 0 L、 P 1 8 0 S、 P 1 8 5 L、 P 1 8 5 S、 P 1 8 5 V、
P 1 9 4 Q、 P 2 0 0 A、 P 2 0 0 L、 P 2 0 0 S、 P 2 0 0 T、 P 2 0 1 A、 P 2 0 1
L、 P 2 0 1 R、 P 2 0 1 S、 P 2 1 4 T、 P 2 3 6 L、 P 2 3 6 T、 P 2 4 6 L、 P 2
4 6 Q、 P 2 4 9 A、 P 2 4 9 F、 P 2 4 9 H、 P 2 4 9 I、 P 2 4 9 X、 P 3 0 L、 P
3 0 S、 P 4 2 L、 P 8 3 A、 Q 1 0 3 K、 Q 1 3 5 S、 Q 1 3 6 N、 Q 1 5 7 R、 Q 1
5 7 S、 Q 2 2 1 A、 Q 2 2 1 R、 Q 2 4 8 F、 Q 2 4 8 L、 Q 2 4 8 S、 Q 2 5 4 A、
Q 2 5 4 K、 Q 2 8 S、 Q 5 3 H、 Q 5 3 K、 Q 5 3 N、 Q 7 4 R、 Q 9 2 H、 Q 9 2 S
、 R 1 8 1 H、 R 1 8 1 S、 R 1 8 1 V、 R 2 2 6 H、 R 2 2 6 P、 R 2 2 6 V、 R 2 4
5 A、 R 2 5 3 G、 R 2 5 3 Q、 R 2 7 A、 R 5 8 G、 R 8 9 D、 R 8 9 F、 R 8 9 I、
R 8 9 X、 R 8 9 Y、 S 1 0 5 L、 S 1 0 5 Q、 S 1 5 1 A、 S 1 5 1 I、 S 1 5 1 Q、
S 1 6 5 F、 S 1 6 5 P、 S 1 7 2 E、 S 1 7 2 V、 S 1 8 7 I、 S 1 8 7 P、 S 1 9 6
H、 S 1 9 6 L、 S 2 1 6 A、 S 2 1 6 Q、 S 2 1 8 A、 S 2 1 8 Q、 S 2 1 9 A、 S 2
1 9 Q、 S 2 5 8 F、 S 2 5 8 P、 S 2 9 C、 S 2 9 P、 S 4 3 P、 S 4 3 T、 S 4 8 L
、 S 5 0 P、 S 5 6 F、 S 5 6 N、 S 5 6 P、 S 5 6 X、 S 7 3 L、 S 7 3 N、 S 7 3 X
、 S 9 9 H、 T 1 0 8 L、 T 1 2 5 I、 T 1 2 5 P、 T 1 6 8 K、 T 1 6 8 N、 T 1 6 8
Q、 T 1 7 6 H、 T 1 7 6 L、 T 1 9 2 D、 T 1 9 2 F、 T 1 9 2 I、 T 1 9 2 N、 T 1
9 2 P、 T 1 9 2 X、 T 1 9 8 D、 T 1 9 8 I、 T 1 9 8 P、 T 1 9 9 A、 T 1 9 9 H、

10

20

30

40

50

T199P、T207D、T207I、T207P、T207S、T35I、T35L、T37Q、T55L、T87L、V109M、V109W、V121F、V134C、V134F、V142F、V149G、V149L、V159L、V159S、V160C、V160L、V162A、V162C、V206*、V206C、V206M、V210C、V217L、V217R、V217S、V222A、V222C、V222G、V241G、V241W、V241X、V31L、V49F、V68L、V68W、V78C、W123G、W123R、W16G、W191*、W191G、W191L、W208G、W208L、W208S、W244*、W244G、W244L、W97C、W97G、Y114H、Y114M、Y127M、Y190*、Y190L、Y190T、Y193C、Y193F、Y193I、Y193L、Y193T、Y193V、Y193X、Y40M、Y51F、Y51M、Y51T、Y51X、Y88T、K9N、S29Aを含み得る。本明細書で使用される場合、「*」は、終止コドンの翻訳を示し、Xは、任意のアミノ酸を示す。

10

【0101】

一実施形態では、DDは、E106D、G63D、H122Y、I59N、L156H、L183S、L197P、S56F、S56N、W208S、Y193I、またはY51T変異を含み得る。

【0102】

いくつかの実施形態では、DDは、複数の変異、例えば、限定されないが、CA2 (WTのaa2~260、R27L、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、T87I、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、H122Y、N252D)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F)、CA2 (WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2 (WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2 (WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2 (WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2 (WTのaa2~260、I59N、G102R) (配列番号210598)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210748)、CA2 (WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D) (配列番号210702)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L) (配列番号210503)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、T87N、L250R) (配列番号210510)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S172C、F178Y、E186D) (配列番号210756)、CA2 (WTのaa2~260、D71F、N231F) (配列番号210505)、CA2 (WTのaa2~260、A77I、P249F) (配列番号210514)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、P249H) (配列番号210516)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249H) (配列番号210518)、CA2 (WTのaa2~260、Q53N、N61Y) (配列番号210521)、CA2 (WTのaa2~260、E106D、C205S) (配列番号210523)、CA2 (WTのaa2~260、C205S、W208S) (配列番号210525)、CA2 (WTのaa2~260、S73N、R89Y) (配列番号210532)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、T192F) (配列番号210534)、CA2 (WTのaa2~260、Y193L、K260L) (配列番号210540)、CA2 (WTのaa2~260、D71F、V241F、P249L) (配列番号210544)、CA2 (WTのaa2~260、L147F、Q248F) (配列番号210548)、CA2 (WT

20

30

40

50

の a a 2 ~ 2 6 0、D 5 2 I、S 2 5 8 P) (配列番号 2 1 0 5 5 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 S、T 1 9 2 N) (配列番号 2 1 0 5 5 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 1 7 9 E、T 1 9 2 I) (配列番号 2 1 0 5 5 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、S 5 6 N、Q 1 0 3 K) (配列番号 2 1 0 5 5 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 Y、Q 2 4 8 L) (配列番号 2 1 0 5 6 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 N、R 8 9 F) (配列番号 2 1 0 5 6 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、N 2 3 1 L、E 2 3 5 G、L 2 3 9 F) (配列番号 2 1 0 5 6 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、P 2 4 9 I) (配列番号 2 1 0 5 6 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 X、V 2 4 1 X、P 2 4 9 X) (配列番号 2 1 0 5 7 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 5 4 X、S 5 6 X、L 5 7 X、T 1 9 2 X) (配列番号 2 1 0 5 7 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、Y 1 9 3 V、K 2 6 0 F) (配列番号 2 1 0 5 7 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、M 2 4 0 L) (配列番号 2 1 0 5 7 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、V 1 3 4 F、L 2 2 8 F) (配列番号 2 1 0 5 8 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 G、N 2 3 1 K) (配列番号 2 1 0 5 8 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、S 5 6 F、D 7 1 S) (配列番号 2 1 0 5 8 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 5 2 L、G 1 2 8 R、Q 2 4 8 F) (配列番号 2 1 0 5 8 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 X、R 8 9 X) (配列番号 2 1 0 5 8 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、Y 5 1 X、D 7 2 X、V 2 4 1 X、P 2 4 9 X) (配列番号 2 1 0 5 9 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 I、W 9 7 C) (配列番号 2 1 0 5 9 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、T 1 9 2 F、N 2 3 1 F) (配列番号 2 1 0 5 9 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、H 3 6 Q、S 4 3 T、Y 5 1 F、N 6 7 D、G 1 3 1 W、R 2 2 6 H) (配列番号 2 1 0 6 9 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、F 7 0 I、F 1 4 6 V) (配列番号 2 1 0 7 0 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、K 4 5 N、V 6 8 L、H 1 1 9 Y、K 1 6 9 R、D 1 7 9 E) (配列番号 2 1 0 7 0 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、H 1 5 L、A 5 4 V、K 1 1 1 E、E 2 2 0 K、F 2 2 5 I) (配列番号 2 1 0 7 0 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、P 1 3 S、P 8 3 A、D 1 0 1 G、K 1 1 1 N、F 2 3 0 I) (配列番号 2 1 0 7 0 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、W 1 2 3 R、E 2 2 0 K) (配列番号 2 1 0 7 1 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、N 1 1 D、E 6 9 K、G 8 6 D、V 1 0 9 M、K 1 1 3 I、T 1 2 5 I、D 1 3 8 G、G 1 5 5 S) (配列番号 2 1 0 7 1 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 N、G 1 0 2 R、A 1 7 3 T) (配列番号 2 1 0 7 1 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、L 7 9 F、P 1 8 0 S) (配列番号 2 1 0 7 1 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 7 7 P、G 1 0 2 R、D 1 3 8 N) (配列番号 2 1 0 7 2 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、F 2 0 L、K 4 5 N、G 6 3 D、E 6 9 V、N 2 3 1 I) (配列番号 2 1 0 7 2 6)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、T 1 9 9 N、L 2 0 2 P、L 2 2 8 F) (配列番号 2 1 0 7 2 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、K 9 N、H 1 2 2 Y、T 1 6 8 K) (配列番号 2 1 0 7 3 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、Q 5 3 H、L 9 0 V、Q 9 2 H、G 1 3 1 E) (配列番号 2 1 0 7 3 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、L 4 4 M、L 4 7 V、N 6 2 K、E 6 9 D) (配列番号 2 1 0 7 3 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 5 V、K 1 6 9 N、F 2 5 9 L) (配列番号 2 1 0 7 3 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、T 2 0 7 S、V 2 2 2 A、N 2 3 1 D) (配列番号 2 1 0 7 4 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 F、V 2 0 6 M、G 2 3 2 R) (配列番号 2 1 0 7 4 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、P 1 3 A、A 1 3 3 T) (配列番号 2 1 0 7 4 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 N、R 8 9 I) (配列番号 2 1 0 7 5 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 6 5 N、G 8 6 D、G 1 3 1 R、G 1 5 5 D、K 1 5 8 N、V 1 6 2 A、G 1 7 0 D、P 2 3 6 L) (配列番号 2 1 0 7 5 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 1 2 R、H 1 5 Y、D 1 9 V) (配列番号 2 1 0 7 5 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 6 5 V、F 9 5 Y、E 1 0 6 G、H 1 0 7 Q、I 1 4 5 M、F 1 7 5 I) (配列番号 2 1 0 7 5 8)、及び／または C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、E 6 9

10

20

30

40

50

V、N231I) (配列番号210851または210847)を含み得る。

【0103】

一実施形態では、DDは、CA2 (WTのaa2~260、R27L、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、T87I、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、H122Y、N252D)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F)、CA2 (WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2 (WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2 (WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2 (WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2 (WTのaa2~260、I59N、G102R) (配列番号210598)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210748)、CA2 (WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D) (配列番号210702)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L) (配列番号210503)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、T87N、L250R) (配列番号210510)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S172C、F178Y、E186D) (配列番号210756)、CA2 (WTのaa2~260、A77I、P249F) (配列番号210514)、CA2 (WTのaa2~260、E106D、C205S) (配列番号210523)、CA2 (WTのaa2~260、C205S、W208S) (配列番号210525)、CA2 (WTのaa2~260、S73N、R89Y) (配列番号210532)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、T192F) (配列番号210534)、CA2 (WTのaa2~260、S73N、R89F) (配列番号210562)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、M240L) (配列番号210578)、CA2 (WTのaa2~260、V134F、L228F) (配列番号210580)、及び／またはCA2 (WTのaa2~260、S56F、D71S) (配列番号210584)を含み得る。

【0104】

一実施形態では、DDは、CA2 (配列番号11717) のアミノ酸2~260、例えば、限定されないが、配列番号 (210492) を含み得る。

【0105】

いくつかの実施形態では、SREは、限定されないが、CA2 (WTのaa2~260、R27L、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、T87I、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、H122Y、N252D)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F)、CA2 (WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2 (WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2 (WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2 (WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2 (WTのaa2~260、I59N、G102R) (配列番号210598)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210748)、CA

2 (WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D) (配列番号210702)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L) (配列番号210503)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、T87N、L250R) (配列番号210510)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S172C、F178Y、E186D) (配列番号210756)、CA2 (WTのaa2~260、D71F、N231F) (配列番号210505)、CA2 (WTのaa2~260、A77I、P249F) (配列番号210514)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、P249H) (配列番号210516)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249H) (配列番号210518)、CA2 (WTのaa2~260、Q53N、N61Y) (配列番号210521)、CA2 (WTのaa2~260、E106D、C205S) (配列番号210523)、CA2 (WTのaa2~260、C205S、W208S) (配列番号210525)、CA2 (WTのaa2~260、S73N、R89Y) (配列番号210532)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、T192F) (配列番号210534)、CA2 (WTのaa2~260、Y193L、K260L) (配列番号210540)、CA2 (WTのaa2~260、D71F、V241F、P249L) (配列番号210544)、CA2 (WTのaa2~260、L147F、Q248F) (配列番号210548)、CA2 (WTのaa2~260、D52I、S258P) (配列番号210550)、CA2 (WTのaa2~260、D72S、T192N) (配列番号210552)、CA2 (WTのaa2~260、D179E、T192I) (配列番号210554)、CA2 (WTのaa2~260、S56N、Q103K) (配列番号210558)、CA2 (WTのaa2~260、D71Y、Q248L) (配列番号210560)、CA2 (WTのaa2~260、S73N、R89F) (配列番号210562)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、N231L、E235G、L239F) (配列番号210564)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249I) (配列番号210568)、CA2 (WTのaa2~260、D72X、V241X、P249X) (配列番号210572)、CA2 (WTのaa2~260、A54X、S56X、L57X、T192X) (配列番号210574)、CA2 (WTのaa2~260、Y193V、K260F) (配列番号210576)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、M240L) (配列番号210578)、CA2 (WTのaa2~260、V134F、L228F) (配列番号210580)、CA2 (WTのaa2~260、D71G、N231K) (配列番号210582)、CA2 (WTのaa2~260、S56F、D71S) (配列番号210584)、CA2 (WTのaa2~260、D52L、G128R、Q248F) (配列番号210586)、CA2 (WTのaa2~260、S73X、R89X) (配列番号210588)、CA2 (WTのaa2~260、Y51X、D72X、V241X、P249X) (配列番号210592)、CA2 (WTのaa2~260、D72I、W97C) (配列番号210594)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、T192F、N231F) (配列番号210596)、CA2 (WTのaa2~260、H36Q、S43T、Y51F、N67D、G131W、R226H) (配列番号210698)、CA2 (WTのaa2~260、F70I、F146V) (配列番号210700)、CA2 (WTのaa2~260、K45N、V68L、H119Y、K169R、D179E) (配列番号210704)、CA2 (WTのaa2~260、H15L、A54V、K111E、E220K、F225I) (配列番号210706)、CA2 (WTのaa2~260、P13S、P83A、D101G、K111N、F230I) (配列番号210708)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、W123R、E220K) (配列番号210712)、CA2 (WTのaa2~260、N11D、E69K、G86D、V109M、K113I、T125I、D138G、G155S) (配列番号210714)、CA2 (WTのaa2~260、I59N、G102R、A173T) (配列番号210716)、CA2 (WTのaa2~260、L79F、P180S) (配列番号210718)、CA2 (WTのaa2~260、A77P、G102R、D138N) (配列番

10

20

30

40

50

号210724)、CA2(WTのaa2~260、F20L、K45N、G63D、E69V、N231I)(配列番号210726)、CA2(WTのaa2~260、T199N、L202P、L228F)(配列番号210728)、CA2(WTのaa2~260、K9N、H122Y、T168K)(配列番号210730)、CA2(WTのaa2~260、Q53H、L90V、Q92H、G131E)(配列番号210732)、CA2(WTのaa2~260、L44M、L47V、N62K、E69D)(配列番号210734)、CA2(WTのaa2~260、D75V、K169N、F259L)(配列番号210738)、CA2(WTのaa2~260、T207S、V222A、N231D)(配列番号210740)、CA2(WTのaa2~260、I59F、V206M、G232R)(配列番号210742)、CA2(WTのaa2~260、P13A、A133T)(配列番号210744)、CA2(WTのaa2~260、I59N、R89I)(配列番号210750)、CA2(WTのaa2~260、A65N、G86D、G131R、G155D、K158N、V162A、G170D、P236L)(配列番号210752)、CA2(WTのaa2~260、G12R、H15Y、D19V)(配列番号210754)、CA2(WTのaa2~260、A65V、F95Y、E106G、H107Q、I145M、F175I)(配列番号210758)、及び/またはCA2(WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I)(配列番号210851または210847)であり得る。

【0106】

一実施形態では、DDは、CA2(WTのaa2~260、R27L、H122Y)、CA2(WTのaa2~260、T87I、H122Y)、CA2(WTのaa2~260、H122Y、N252D)、CA2(WTのaa2~260、D72F、V241F)、CA2(WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2(WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2(WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2(WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2(WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2(WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2(WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2(WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2(WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2(WTのaa2~260、I59N、G102R)(配列番号210598)、CA2(WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I)(配列番号210748)、CA2(WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D)(配列番号210702)、CA2(WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L)(配列番号210503)、CA2(WTのaa2~260、D71L、T87N、L250R)(配列番号210510)、CA2(WTのaa2~260、L156H、S172C、F178Y、E186D)(配列番号210756)、CA2(WTのaa2~260、D71F、N231F)(配列番号210505)、CA2(WTのaa2~260、A77I、P249F)(配列番号210514)、CA2(WTのaa2~260、D71K、P249H)(配列番号210516)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249H)(配列番号210518)、CA2(WTのaa2~260、Q53N、N61Y)(配列番号210521)、CA2(WTのaa2~260、E106D、C205S)(配列番号210523)、CA2(WTのaa2~260、C205S、W208S)(配列番号210525)、CA2(WTのaa2~260、S73N、R89Y)(配列番号210532)、CA2(WTのaa2~260、D71K、T192F)(配列番号210534)、CA2(WTのaa2~260、Y193L、K260L)(配列番号210540)、CA2(WTのaa2~260、D71F、V241F、P249L)(配列番号210544)、CA2(WTのaa2~260、L147F、Q248F)(

配列番号210548)、CA2(WTのaa2~260、D52I、S258P)(配列番号210550)、CA2(WTのaa2~260、D72S、T192N)(配列番号210552)、CA2(WTのaa2~260、D179E、T192I)(配列番号210554)、CA2(WTのaa2~260、S56N、Q103K)(配列番号210558)、CA2(WTのaa2~260、D71Y、Q248L)(配列番号210560)、CA2(WTのaa2~260、S73N、R89F)(配列番号210562)、CA2(WTのaa2~260、D71K、N231L、E235G、L239F)(配列番号210564)、CA2(WTのaa2~260、D72F、P249I)(配列番号210568)、CA2(WTのaa2~260、D72X、V241X、P249X)(配列番号210572)、CA2(WTのaa2~260、A54X、S56X、L57X、T192X)(配列番号210574)、CA2(WTのaa2~260、Y193V、K260F)(配列番号210576)、CA2(WTのaa2~260、G63D、M240L)(配列番号210578)、CA2(WTのaa2~260、V134F、L228F)(配列番号210580)、CA2(WTのaa2~260、D71G、N231K)(配列番号210582)、CA2(WTのaa2~260、S56F、D71S)(配列番号210584)、CA2(WTのaa2~260、D52L、G128R、Q248F)(配列番号210586)、CA2(WTのaa2~260、S73X、R89X)(配列番号210588)、CA2(WTのaa2~260、Y51X、D72X、V241X、P249X)(配列番号210592)、CA2(WTのaa2~260、D72I、W97C)(配列番号210594)、CA2(WTのaa2~260、D71K、T192F、N231F)(配列番号210596)、CA2(WTのaa2~260、H36Q、S43T、Y51F、N67D、G131W、R226H)(配列番号210698)、CA2(WTのaa2~260、F70I、F146V)(配列番号210700)、CA2(WTのaa2~260、K45N、V68L、H119Y、K169R、D179E)(配列番号210704)、CA2(WTのaa2~260、H15L、A54V、K111E、E220K、F225I)(配列番号210706)、CA2(WTのaa2~260、P13S、P83A、D101G、K111N、F230I)(配列番号210708)、CA2(WTのaa2~260、G63D、W123R、E220K)(配列番号210712)、CA2(WTのaa2~260、N11D、E69K、G86D、V109M、K113I、T125I、D138G、G155S)(配列番号210714)、CA2(WTのaa2~260、I59N、G102R、A173T)(配列番号210716)、CA2(WTのaa2~260、L79F、P180S)(配列番号210718)、CA2(WTのaa2~260、A77P、G102R、D138N)(配列番号210724)、CA2(WTのaa2~260、F20L、K45N、G63D、E69V、N231I)(配列番号210726)、CA2(WTのaa2~260、T199N、L202P、L228F)(配列番号210728)、CA2(WTのaa2~260、K9N、H122Y、T168K)(配列番号210730)、CA2(WTのaa2~260、Q53H、L90V、Q92H、G131E)(配列番号210732)、CA2(WTのaa2~260、L44M、L47V、N62K、E69D)(配列番号210734)、CA2(WTのaa2~260、D75V、K169N、F259L)(配列番号210738)、CA2(WTのaa2~260、T207S、V222A、N231D)(配列番号210740)、CA2(WTのaa2~260、I59F、V206M、G232R)(配列番号210742)、CA2(WTのaa2~260、P13A、A133T)(配列番号210744)、CA2(WTのaa2~260、I59N、R89I)(配列番号210750)、CA2(WTのaa2~260、A65N、G86D、G131R、G155D、K158N、V162A、G170D、P236L)(配列番号210752)、CA2(WTのaa2~260、G12R、H15Y、D19V)(配列番号210754)、CA2(WTのaa2~260、A65V、F95Y、E106G、H107Q、I145M、F175I)(配列番号210758)、及び／またはCA2(W

10

20

30

40

50

Tのaa2～260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210851または210847)であり得る。

【0107】

本明細書ではまた、配列番号11717に対する少なくとも1つの変異を含む単離されたポリペプチドバリエーションが提供される。配列番号11717に対する変異の非限定的な例には、A115L、A116Q、A116V、A133L、A133T、A141P、A152D、A152L、A152R、A173C、A173G、A173L、A173T、A23P、A247L、A247S、A257L、A257S、A38P、A38V、A54Q、A54V、A54X、A65L、A65N、A65V、A77I、A77P、A77Q、C205M、C205R、C205V、C205W、C205Y、D101G、D101M、D110I、D129I、D138G、D138M、D138N、D161*、D161M、D161V、D164G、D164I、D174*、D174T、D179E、D179I、D179R、D189G、D189I、D19T、D19V、D242G、D242T、D32T、D34T、D41T、D52I、D52L、D71F、D71G、D71K、D71M、D71S、D71Y、D72I、D72S、D72T、D72X、D75T、D75V、D85M、E106D、E106G、E106S、E117*、E117N、E14N、E186*、E186N、E204A、E204D、E204G、E204N、E213*、E213G、E213N、E220K、E220R、E220S、E233D、E233G、E233R、E235*、E235G、E235N、E237K、E237R、E238*、E238N、E238R、E26S、E69D、E69K、E69S、F130L、F146V、F175I、F175L、F175S、F178L、F178S、F20L、F20S、F225I、F225L、F225S、F225Y、F230I、F230L、F230S、F259L、F259S、F66S、F70I、F70L、F95Y、G102D、G104R、G104V、G128R、G12D、G12E、G131E、G131R、G131W、G139D、G144D、G144V、G150A、G150S、G150W、G155A、G155C、G155D、G155S、G170A、G170D、G182A、G182W、G195A、G195R、G232R、G232W、G234L、G234V、G25E、G63D、G63V、G81E、G81V、G82D、G86A、G86D、G98V、H107I、H107Q、H119T、H119Y、H122T、H122Y、H15L、H15T、H15Y、H17D、H17I、H36I、H36Q、H64M、H94T、H96T、I145F、I145M、I166H、I166L、I209D、I209L、I215H、I215S、I22L、I255N、I255S、I33S、I59F、I59N、I59S、I91F、K111E、K111N、K112R、K113I、K113N、K126N、K132E、K132R、K148E、K148R、K153*、K153N、K158E、K158N、K167*、K169N、K169R、K171Q、K171R、K18R、K212N、K212Q、K212R、K212W、K224E、K224N、K227*、K227N、K24R、K251E、K251R、K256Q、K260F、K260L、K260Q、K39S、K45N、K45S、K80M、K80R、L118F、L120W、L140V、L140W、L143*、L147*、L147F、L156F、L156H、L156P、L156Q、L163A、L163W、L183P、L183S、L184F、L184P、L188P、L188W、L197*、L197M、L197P、L197R、L197T、L202F、L202H、L202I、L202P、L202R、L202S、L203P、L203S、L203W、L211*、L211A、L211S、L223*、L223I、L223V、L228F、L228H、L228T、L239*、L239F、L239T、L250*、L250P、L250T、L44*、L44M、L47C、L47V、L57*、L57X、L60S、L79F、L79S、L84W、L90*、L90V、M240D、M240L、M240R、M240W、N11D、N11K、N124T、N177*、N177T、N229*、N229T、N231D、N231F、N231K、N231

10

20

30

40

50

L、N231M、N231Q、N231T、N243Q、N243T、N252E、N252T、N61R、N61T、N61Y、N62K、N62M、N67D、N67T、P137L、P13A、P13H、P13L、P13S、P154L、P154R、P154T、P180L、P180S、P185L、P185S、P185V、P194Q、P200A、P200L、P200S、P200T、P201A、P201L、P201R、P201S、P214T、P236L、P236T、P246L、P246Q、P249A、P249F、P249H、P249I、P249X、P30L、P30S、P42L、P83A、Q103K、Q135S、Q136N、Q157R、Q157S、Q221A、Q221R、Q248F、Q248L、Q248S、Q254A、Q254K、Q28S、Q53H、Q53K、Q53N、Q74R、Q92H、Q92S、R181H、R181S、R181V、R226H、R226P、R226V、R245A、R253G、R253Q、R27A、R58G、R89D、R89F、R89I、R89X、R89Y、S105L、S105Q、S151A、S151I、S151Q、S165F、S165P、S172E、S172V、S187I、S187P、S196H、S196L、S216A、S216Q、S218A、S218Q、S219A、S219Q、S258F、S258P、S29C、S29P、S43P、S43T、S48L、S50P、S56F、S56N、S56P、S56X、S73L、S73N、S73X、S99H、T108L、T125I、T125P、T168K、T168N、T168Q、T176H、T176L、T192D、T192F、T192I、T192N、T192P、T192X、T198D、T198I、T198P、T199A、T199H、T199P、T207D、T207I、T207P、T207S、T35I、T35L、T37Q、T55L、T87L、V109M、V109W、V121F、V134C、V134F、V142F、V149G、V149L、V159L、V159S、V160C、V160L、V162A、V162C、V206*、V206C、V206M、V210C、V217L、V217R、V217S、V222A、V222C、V222G、V241G、V241W、V241X、V31L、V49F、V68L、V68W、V78C、W123G、W123R、W16G、W191*、W191G、W191L、W208G、W208L、W208S、W244*、W244G、W244L、W97C、W97G、Y114H、Y114M、Y127M、Y190*、Y190L、Y190T、Y193C、Y193F、Y193I、Y193L、Y193T、Y193V、Y193X、Y40M、Y51F、Y51M、Y51T、Y51X、Y88T、K9N、S29Aが含まれる。

【0108】

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドバリエーションは、CA2 (WTのaa2~260、R27L、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、T87I、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、H122Y、N252D)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F)、CA2 (WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2 (WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2 (WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2 (WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2 (WTのaa2~260、I59N、G102R) (配列番号210598)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210748)、CA2 (WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D) (配列番号210702)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L) (配列番号210503)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、T8

10

20

30

40

50

7 N、L 2 5 0 R) (配列番号 2 1 0 5 1 0)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、L 1 5 6 H、S 1 7 2 C、F 1 7 8 Y、E 1 8 6 D) (配列番号 2 1 0 7 5 6)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 F、N 2 3 1 F) (配列番号 2 1 0 5 0 5)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、A 7 7 I、P 2 4 9 F) (配列番号 2 1 0 5 1 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、P 2 4 9 H) (配列番号 2 1 0 5 1 6)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、P 2 4 9 H) (配列番号 2 1 0 5 1 8)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、Q 5 3 N、N 6 1 Y) (配列番号 2 1 0 5 2 1)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、E 1 0 6 D、C 2 0 5 S) (配列番号 2 1 0 5 2 3)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、C 2 0 5 S、W 2 0 8 S) (配列番号 2 1 0 5 2 5)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 N、R 8 9 Y) (配列番号 2 1 0 5 3 2)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、T 1 9 2 F) (配列番号 2 1 0 5 3 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、Y 1 9 3 L、K 2 6 0 L) (配列番号 2 1 0 5 4 0)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 F、V 2 4 1 F、P 2 4 9 L) (配列番号 2 1 0 5 4 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、L 1 4 7 F、Q 2 4 8 F) (配列番号 2 1 0 5 4 8)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 5 2 I、S 2 5 8 P) (配列番号 2 1 0 5 5 0)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 S、T 1 9 2 N) (配列番号 2 1 0 5 5 2)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 1 7 9 E、T 1 9 2 I) (配列番号 2 1 0 5 5 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、S 5 6 N、Q 1 0 3 K) (配列番号 2 1 0 5 5 8)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 Y、Q 2 4 8 L) (配列番号 2 1 0 5 6 0)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 N、R 8 9 F) (配列番号 2 1 0 5 6 2)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、N 2 3 1 L、E 2 3 5 G、L 2 3 9 F) (配列番号 2 1 0 5 6 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 F、P 2 4 9 I) (配列番号 2 1 0 5 6 8)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 X、V 2 4 1 X、P 2 4 9 X) (配列番号 2 1 0 5 7 2)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、A 5 4 X、S 5 6 X、L 5 7 X、T 1 9 2 X) (配列番号 2 1 0 5 7 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、Y 1 9 3 V、K 2 6 0 F) (配列番号 2 1 0 5 7 6)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、M 2 4 0 L) (配列番号 2 1 0 5 7 8)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、V 1 3 4 F、L 2 2 8 F) (配列番号 2 1 0 5 8 0)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 G、N 2 3 1 K) (配列番号 2 1 0 5 8 2)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、S 5 6 F、D 7 1 S) (配列番号 2 1 0 5 8 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 5 2 L、G 1 2 8 R、Q 2 4 8 F) (配列番号 2 1 0 5 8 6)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、S 7 3 X、R 8 9 X) (配列番号 2 1 0 5 8 8)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、Y 5 1 X、D 7 2 X、V 2 4 1 X、P 2 4 9 X) (配列番号 2 1 0 5 9 2)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 2 I、W 9 7 C) (配列番号 2 1 0 5 9 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 1 K、T 1 9 2 F、N 2 3 1 F) (配列番号 2 1 0 5 9 6)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、H 3 6 Q、S 4 3 T、Y 5 1 F、N 6 7 D、G 1 3 1 W、R 2 2 6 H) (配列番号 2 1 0 6 9 8)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、F 7 0 I、F 1 4 6 V) (配列番号 2 1 0 7 0 0)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、K 4 5 N、V 6 8 L、H 1 1 9 Y、K 1 6 9 R、D 1 7 9 E) (配列番号 2 1 0 7 0 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、H 1 5 L、A 5 4 V、K 1 1 1 E、E 2 2 0 K、F 2 2 5 I) (配列番号 2 1 0 7 0 6)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、P 1 3 S、P 8 3 A、D 1 0 1 G、K 1 1 1 N、F 2 3 0 I) (配列番号 2 1 0 7 0 8)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、W 1 2 3 R、E 2 2 0 K) (配列番号 2 1 0 7 1 2)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、N 1 1 D、E 6 9 K、G 8 6 D、V 1 0 9 M、K 1 1 3 I、T 1 2 5 I、D 1 3 8 G、G 1 5 5 S) (配列番号 2 1 0 7 1 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 N、G 1 0 2 R、A 1 7 3 T) (配列番号 2 1 0 7 1 6)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、L 7 9 F、P 1 8 0 S) (配列番号 2 1 0 7 1 8)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、A 7 7 P、G 1 0 2 R、D 1 3 8 N) (配列番号 2 1 0 7 2 4)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、F 2 0 L、K 4 5 N、G 6 3 D、E 6 9 V、N 2 3 1 I) (配列番号 2 1 0 7 2 6)、CA 2 (WT の a a 2 ~ 2 6 0、T 1 9 9 N、L 2 0 2 P、L 2 2 8 F) (配列番号 2 1 0 7 2 8)、CA 2 (WT

10

20

30

40

50

の a a 2 ~ 2 6 0、K 9 N、H 1 2 2 Y、T 1 6 8 K) (配列番号 2 1 0 7 3 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、Q 5 3 H、L 9 0 V、Q 9 2 H、G 1 3 1 E) (配列番号 2 1 0 7 3 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、L 4 4 M、L 4 7 V、N 6 2 K、E 6 9 D) (配列番号 2 1 0 7 3 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、D 7 5 V、K 1 6 9 N、F 2 5 9 L) (配列番号 2 1 0 7 3 8)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、T 2 0 7 S、V 2 2 2 A、N 2 3 1 D) (配列番号 2 1 0 7 4 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 F、V 2 0 6 M、G 2 3 2 R) (配列番号 2 1 0 7 4 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、P 1 3 A、A 1 3 3 T) (配列番号 2 1 0 7 4 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、I 5 9 N、R 8 9 I) (配列番号 2 1 0 7 5 0)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 6 5 N、G 8 6 D、G 1 3 1 R、G 1 5 5 D、K 1 5 8 N、V 1 6 2 A、G 1 7 0 D、P 2 3 6 L) (配列番号 2 1 0 7 5 2)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 1 2 R、H 1 5 Y、D 1 9 V) (配列番号 2 1 0 7 5 4)、C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、A 6 5 V、F 9 5 Y、E 1 0 6 G、H 1 0 7 Q、I 1 4 5 M、F 1 7 5 I) (配列番号 2 1 0 7 5 8)、及び／または C A 2 (W T の a a 2 ~ 2 6 0、G 6 3 D、E 6 9 V、N 2 3 1 I) (配列番号 2 1 0 8 5 1 または 2 1 0 8 4 7) であり得る。

【0109】

本明細書ではまた、少なくとも1つのエフェクターモジュールを含む生体回路システムが提供される。生体回路のエフェクターモジュールは、刺激反応要素 (S R E) を含み得、S R E は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ 2 (C A 2 ; 配列番号 1 1 7 1 7) を全体としてまたは部分的に含み得る。生体回路はまた、S R E に結合、付加または関連付けられ得る少なくとも1つのペイロードを含み得る。

【0110】

ヒトカルボニックアンヒドラーゼ 2 (C A 2 ; 配列番号 1 1 7 1 7) を全体としてまたは部分的に含む生体回路システムの S R E は、1つ、2つ、3つまたはそれより多くの変異、例えば、限定されないが、A 1 1 5 L、A 1 1 6 Q、A 1 1 6 V、A 1 3 3 L、A 1 3 3 T、A 1 4 1 P、A 1 5 2 D、A 1 5 2 L、A 1 5 2 R、A 1 7 3 C、A 1 7 3 G、A 1 7 3 L、A 1 7 3 T、A 2 3 P、A 2 4 7 L、A 2 4 7 S、A 2 5 7 L、A 2 5 7 S、A 3 8 P、A 3 8 V、A 5 4 Q、A 5 4 V、A 5 4 X、A 6 5 L、A 6 5 N、A 6 5 V、A 7 7 I、A 7 7 P、A 7 7 Q、C 2 0 5 M、C 2 0 5 R、C 2 0 5 V、C 2 0 5 W、C 2 0 5 Y、D 1 0 1 G、D 1 0 1 M、D 1 1 0 I、D 1 2 9 I、D 1 3 8 G、D 1 3 8 M、D 1 3 8 N、D 1 6 1 *、D 1 6 1 M、D 1 6 1 V、D 1 6 4 G、D 1 6 4 I、D 1 7 4 *、D 1 7 4 T、D 1 7 9 E、D 1 7 9 I、D 1 7 9 R、D 1 8 9 G、D 1 8 9 I、D 1 9 T、D 1 9 V、D 2 4 2 G、D 2 4 2 T、D 3 2 T、D 3 4 T、D 4 1 T、D 5 2 I、D 5 2 L、D 7 1 F、D 7 1 G、D 7 1 K、D 7 1 M、D 7 1 S、D 7 1 Y、D 7 2 I、D 7 2 S、D 7 2 T、D 7 2 X、D 7 5 T、D 7 5 V、D 8 5 M、E 1 0 6 D、E 1 0 6 G、E 1 0 6 S、E 1 1 7 *、E 1 1 7 N、E 1 4 N、E 1 8 6 *、E 1 8 6 N、E 2 0 4 A、E 2 0 4 D、E 2 0 4 G、E 2 0 4 N、E 2 1 3 *、E 2 1 3 G、E 2 1 3 N、E 2 2 0 K、E 2 2 0 R、E 2 2 0 S、E 2 3 3 D、E 2 3 3 G、E 2 3 3 R、E 2 3 5 *、E 2 3 5 G、E 2 3 5 N、E 2 3 7 K、E 2 3 7 R、E 2 3 8 *、E 2 3 8 N、E 2 3 8 R、E 2 6 S、E 6 9 D、E 6 9 K、E 6 9 S、F 1 3 0 L、F 1 4 6 V、F 1 7 5 I、F 1 7 5 L、F 1 7 5 S、F 1 7 8 L、F 1 7 8 S、F 2 0 L、F 2 0 S、F 2 2 5 I、F 2 2 5 L、F 2 2 5 S、F 2 2 5 Y、F 2 3 0 I、F 2 3 0 L、F 2 3 0 S、F 2 5 9 L、F 2 5 9 S、F 6 6 S、F 7 0 I、F 7 0 L、F 9 5 Y、G 1 0 2 D、G 1 0 4 R、G 1 0 4 V、G 1 2 8 R、G 1 2 D、G 1 2 E、G 1 3 1 E、G 1 3 1 R、G 1 3 1 W、G 1 3 9 D、G 1 4 4 D、G 1 4 4 V、G 1 5 0 A、G 1 5 0 S、G 1 5 0 W、G 1 5 5 A、G 1 5 5 C、G 1 5 5 D、G 1 5 5 S、G 1 7 0 A、G 1 7 0 D、G 1 8 2 A、G 1 8 2 W、G 1 9 5 A、G 1 9 5 R、G 2 3 2 R、G 2 3 2 W、G 2 3 4 L、G 2 3 4 V、G 2 5 E、G 6 3 D、G 6 3 V、G 8 1 E、G 8 1 V、G 8 2 D、G 8 6 A、G 8 6 D、G 9 8 V、H 1 0 7 I、H 1 0 7 Q、H 1 1 9 T、H 1 1 9 Y、H 1 2 2 T、H 1 2 2 Y、H 1 5 L、H 1 5 T、H 1 5 Y、H 1 7 D、H 1 7 I、H 3 6 I、H 3 6 Q、H

64M、H94T、H96T、I145F、I145M、I166H、I166L、I209D、I209L、I215H、I215S、I22L、I255N、I255S、I33S、I59F、I59N、I59S、I91F、K111E、K111N、K112R、K113I、K113N、K126N、K132E、K132R、K148E、K148R、K153*、K153N、K158E、K158N、K167*、K169N、K169R、K171Q、K171R、K18R、K212N、K212Q、K212R、K212W、K224E、K224N、K227*、K227N、K24R、K251E、K251R、K256Q、K260F、K260L、K260Q、K39S、K45N、K45S、K80M、K80R、L118F、L120W、L140V、L140W、L143*、L147*、L147F、L156F、L156H、L156P、L156Q、L163A、L163W、L183P、L183S、L184F、L184P、L188P、L188W、L197*、L197M、L197P、L197R、L197T、L202F、L202H、L202I、L202P、L202R、L202S、L203P、L203S、L203W、L211*、L211A、L211S、L223*、L223I、L223V、L228F、L228H、L228T、L239*、L239F、L239T、L250*、L250P、L250T、L44*、L44M、L47C、L47V、L57*、L57X、L60S、L79F、L79S、L84W、L90*、L90V、M240D、M240L、M240R、M240W、N11D、N11K、N124T、N177*、N177T、N229*、N229T、N231D、N231F、N231K、N231L、N231M、N231Q、N231T、N243Q、N243T、N252E、N252T、N61R、N61T、N61Y、N62K、N62M、N67D、N67T、P137L、P13A、P13H、P13L、P13S、P154L、P154R、P154T、P180L、P180S、P185L、P185S、P185V、P194Q、P200A、P200L、P200S、P200T、P201A、P201L、P201R、P201S、P214T、P236L、P236T、P246L、P246Q、P249A、P249F、P249H、P249I、P249X、P30L、P30S、P42L、P83A、Q103K、Q135S、Q136N、Q157R、Q157S、Q221A、Q221R、Q248F、Q248L、Q248S、Q254A、Q254K、Q28S、Q53H、Q53K、Q53N、Q74R、Q92H、Q92S、R181H、R181S、R181V、R226H、R226P、R226V、R245A、R253G、R253Q、R27A、R58G、R89D、R89F、R89I、R89X、R89Y、S105L、S105Q、S151A、S151I、S151Q、S165F、S165P、S172E、S172V、S187I、S187P、S196H、S196L、S216A、S216Q、S218A、S218Q、S219A、S219Q、S258F、S258P、S29C、S29P、S43P、S43T、S48L、S50P、S56F、S56N、S56P、S56X、S73L、S73N、S73X、S99H、T108L、T125I、T125P、T168K、T168N、T168Q、T176H、T176L、T192D、T192F、T192I、T192N、T192P、T192X、T198D、T198I、T198P、T199A、T199H、T199P、T207D、T207I、T207P、T207S、T35I、T35L、T37Q、T55L、T87L、V109M、V109W、V121F、V134C、V134F、V142F、V149G、V149L、V159L、V159S、V160C、V160L、V162A、V162C、V206*、V206C、V206M、V210C、V217L、V217R、V217S、V222A、V222C、V222G、V241G、V241W、V241X、V31L、V49F、V68L、V68W、V78C、W123G、W123R、W16G、W191*、W191G、W191L、W208G、W208L、W208S、W244*、W244G、W244L、W97C、W97G、Y114H、Y114M、Y127M、Y190*、Y190L、Y190T、Y193C、Y193F、Y193I、Y193L、Y193T、Y193V、Y193X、Y40M、Y51F、Y51M、Y51T、Y51X、Y88T、K9N、S

10

20

30

40

50

29Aを含み得る。

【0111】

いくつかの態様では、SREは、限定されないが、CA2 (WTのaa2~260、R27L、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、T87I、H122Y)、CA2 (WTのaa2~260、H122Y、N252D)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F)、CA2 (WTのaa2~260、V241F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249L)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、L250R)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249F)、CA2 (WTのaa2~260、T55K、G63N、Q248N)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、A257del、S258del、F259del、K260del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S2del、H3del、H4del、W5del)、CA2 (WTのaa2~260、W4Y、L156H)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、G234del、E235del、P236del)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、F225L)、CA2 (WTのaa2~260、D70N、D74N、D100N、L156H)、(CA2 (WTのaa2~260、I59N、G102R) (配列番号210598)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I) (配列番号210748)、CA2 (WTのaa2~260、R27L、T87I、H122Y、N252D) (配列番号210702)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、V241F、P249L) (配列番号210503)、CA2 (WTのaa2~260、D71L、T87N、L250R) (配列番号210510)、CA2 (WTのaa2~260、L156H、S172C、F178Y、E186D) (配列番号210756)、CA2 (WTのaa2~260、D71F、N231F) (配列番号210505)、CA2 (WTのaa2~260、A77I、P249F) (配列番号210514)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、P249H) (配列番号210516)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249H) (配列番号210518)、CA2 (WTのaa2~260、Q53N、N61Y) (配列番号210521)、CA2 (WTのaa2~260、E106D、C205S) (配列番号210523)、CA2 (WTのaa2~260、C205S、W208S) (配列番号210525)、CA2 (WTのaa2~260、S73N、R89Y) (配列番号210532)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、T192F) (配列番号210534)、CA2 (WTのaa2~260、Y193L、K260L) (配列番号210540)、CA2 (WTのaa2~260、D71F、V241F、P249L) (配列番号210544)、CA2 (WTのaa2~260、L147F、Q248F) (配列番号210548)、CA2 (WTのaa2~260、D52I、S258P) (配列番号210550)、CA2 (WTのaa2~260、D72S、T192N) (配列番号210552)、CA2 (WTのaa2~260、D179E、T192I) (配列番号210554)、CA2 (WTのaa2~260、S56N、Q103K) (配列番号210558)、CA2 (WTのaa2~260、D71Y、Q248L) (配列番号210560)、CA2 (WTのaa2~260、S73N、R89F) (配列番号210562)、CA2 (WTのaa2~260、D71K、N231L、E235G、L239F) (配列番号210564)、CA2 (WTのaa2~260、D72F、P249I) (配列番号210568)、CA2 (WTのaa2~260、D72X、V241X、P249X) (配列番号210572)、CA2 (WTのaa2~260、A54X、S56X、L57X、T192X) (配列番号210574)、CA2 (WTのaa2~260、Y193V、K260F) (配列番号210576)、CA2 (WTのaa2~260、G63D、M240L) (配列番号210578)、CA2 (WTのaa2~260、V134F、L228F) (配列番号210580)、CA2 (WTのaa2~260、D71G、N231K) (配列番号210582)、CA2 (WTのaa2~260、S56F、D71S) (配列番号210584)、CA2 (WTのaa2~260、D52L、G128R、Q248F) (配列番号210586)

10

20

30

40

50

)、CA2(WTのaa2~260、S73X、R89X)(配列番号210588)、
CA2(WTのaa2~260、Y51X、D72X、V241X、P249X)(配列
番号210592)、CA2(WTのaa2~260、D72I、W97C)(配列番号
210594)、CA2(WTのaa2~260、D71K、T192F、N231F)
(配列番号210596)、CA2(WTのaa2~260、H36Q、S43T、Y5
1F、N67D、G131W、R226H)(配列番号210698)、CA2(WTの
aa2~260、F70I、F146V)(配列番号210700)、CA2(WTのa
a2~260、K45N、V68L、H119Y、K169R、D179E)(配列番号
210704)、CA2(WTのaa2~260、H15L、A54V、K111E、E
220K、F225I)(配列番号210706)、CA2(WTのaa2~260、P
13S、P83A、D101G、K111N、F230I)(配列番号210708)、
CA2(WTのaa2~260、G63D、W123R、E220K)(配列番号210
712)、CA2(WTのaa2~260、N11D、E69K、G86D、V109M
、K113I、T125I、D138G、G155S)(配列番号210714)、CA
2(WTのaa2~260、I59N、G102R、A173T)(配列番号21071
6)、CA2(WTのaa2~260、L79F、P180S)(配列番号210718
)、CA2(WTのaa2~260、A77P、G102R、D138N)(配列番号2
10724)、CA2(WTのaa2~260、F20L、K45N、G63D、E69
V、N231I)(配列番号210726)、CA2(WTのaa2~260、T199
N、L202P、L228F)(配列番号210728)、CA2(WTのaa2~26
0、K9N、H122Y、T168K)(配列番号210730)、CA2(WTのaa
2~260、Q53H、L90V、Q92H、G131E)(配列番号210732)、
CA2(WTのaa2~260、L44M、L47V、N62K、E69D)(配列番号
210734)、CA2(WTのaa2~260、D75V、K169N、F259L)
(配列番号210738)、CA2(WTのaa2~260、T207S、V222A、
N231D)(配列番号210740)、CA2(WTのaa2~260、I59F、V
206M、G232R)(配列番号210742)、CA2(WTのaa2~260、P
13A、A133T)(配列番号210744)、CA2(WTのaa2~260、I5
9N、R89I)(配列番号210750)、CA2(WTのaa2~260、A65N
、G86D、G131R、G155D、K158N、V162A、G170D、P236
L)(配列番号210752)、CA2(WTのaa2~260、G12R、H15Y、
D19V)(配列番号210754)、CA2(WTのaa2~260、A65V、F9
5Y、E106G、H107Q、I145M、F175I)(配列番号210758)、
及び／またはCA2(WTのaa2~260、G63D、E69V、N231I)(配列
番号210851または210847)から選択され得る。

【0112】

本明細書に記載の生体回路システムは、1つより多くの刺激物に対して反応性であるSREを含み得る。

【0113】

いくつかの実施形態では、刺激物は、小分子であり得、小分子は、セレコキシブ、バルデコキシブ、ロフェコキシブ、アセタゾラミド、メタゾラミド、ドルゾラミド、プリンゾラミド、ジクロフェナミド、エトキシゾラミド、ゾニサミド、ダンシルアミド、及びジクロルフェナミドである。実施形態では、小分子は、アセタゾラミドであり得る。

【0114】

また、生体回路システムをコードするベクター、ならびに生体回路システム及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む薬学的組成物が本明細書に記載される。

【0115】

ペイロード

本明細書で使用される場合、「ペイロード」または「標的ペイロード」または「対象となるペイロード(POI)」は、機能が変化される任意のタンパク質または核酸として定

10

20

30

40

50

義される。

【0116】

ペイロードは、任意のコーディングもしくはノンコーディング遺伝子または任意のタンパク質もしくはその断片を含み得る。

【0117】

ペイロードは、しばしば、1つまたはより多くのSREと関連付けられ、本開示のポリヌクレオチドにおいて単独でまたは1つまたはより多くのSREと組み合わせてコードされ得る。ペイロード自体は、(タンパク質または核酸レベルで)変化され、これによりエフェクターモジュールの防御可能性の追加の層を提供し得る。例えば、ペイロードは、ペイロードの安定性またはその分解、切断もしくはトラフィッキングに対する感受性に影響を及ぼす単一のまたは複数の変異を含有するように修飾または設計され得る。刺激物に対する多様な反応を有し得るSREと、出力シグナル、例えば、発現レベルの多様な反応または漸次的変化を示すように変更されたペイロードとの組み合わせは、当該技術分野におけるものよりも優れた生体回路を生成する。例えば、変異または置換設計、例えば、WO 2016048903 (特にその実施例1) (その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる) においてIL12のために作成されたものは、二重の調整可能な生体回路を生成するために本開示のSREと併せて任意のタンパク質ペイロードにおいて使用され得る。SRE及びペイロードの両方を独立して調整する能力は、本開示のエフェクターモジュールの使用の範囲を大幅に拡大させる。

【0118】

ペイロードの人工ペプチドまたはポリペプチド成分は、天然に存在しない任意の既知のポリペプチドに由来し得る。

【0119】

本明細書で使用される場合、語句「に由来する」は、エフェクターモジュール、SREまたはペイロードに関する場合、エフェクターモジュール、SREまたはペイロードが、少なくとも部分的に、記述した親分子または配列を起源とすることを意味する。例えば、SREの設計において、そのようなSREは、天然に存在するタンパク質のエピトープまたは一領域に由来し得るが、次いでSRE機能を最適化するために本明細書に教示される方法のいずれかで改変されている。

【0120】

一実施形態では、ペイロードは、親タンパク質の一領域または変異体タンパク質に由来する。親タンパク質の領域は、長さが10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、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、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、2

18、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、または450超のアミノ酸であり得る。親タンパク質の領域は、長さが5～50、25～75、50～100、75～125、100～150、125～175、150～200、175～225、200～250、225～275、250～300、275～325、300～350、325～375、350～400、375～425、または400～450アミノ酸であり得る。

【0121】

一実施形態では、ペイロードは、親タンパク質の一領域または変異体タンパク質に由来し、親タンパク質の一領域を含む。ペイロードは、親タンパク質または変異体タンパク質の1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%、5～10%、10～15%、15～20%、20～25%、25～30%、30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、95～100%、10～20%、20～30%、30～40%、40～50%、50～60%、60～70%、70～80%、80～90%、90～100%、10～30%、20～40%、30～50%、40～60%、50～70%、60～80%、70～90%、80～100%、10～40%、20～50%、30～60%、40～70%、50～80%、60～90%、70～100%、10～50%、20～60%、30～70%、40～80%、50～90%、60～100%、10～60%、20～70%、30～80%、40～90%、50～100%、10～70%、20～80%、30～90%、40～100%、10～80%、20～90%、30～100%、10～90%、20～100%、25～50%、50～75%、または75～100%である親タンパク質の一領域を含み得る。

【0122】

一実施形態では、ペイロードは、親タンパク質または変異体タンパク質に由来し、親タンパク質または変異体タンパク質と1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80

10

20

30

40

50

％、85％、90％、95％、99％、または100％、5～10％、10～15％、15～20％、20～25％、25～30％、30～35％、35～40％、40～45％、45～50％、50～55％、55～60％、60～65％、65～70％、70～75％、75～80％、80～85％、85～90％、90～95％、95～100％、100～20％、20～30％、30～40％、40～50％、50～60％、60～70％、70～80％、80～90％、90～100％、10～30％、20～40％、30～50％、40～60％、50～70％、60～80％、70～90％、80～100％、10～40％、20～50％、30～60％、40～70％、50～80％、60～90％、70～100％、10～50％、20～60％、30～70％、40～80％、50～90％、60～100％、10～60％、20～70％、30～80％、40～90％、50～100％、10～70％、20～80％、30～90％、40～100％、10～80％、20～90％、30～100％、10～90％、20～100％、25～50％、50～75％、または75～100％の同一性を有し得る。

【0123】

一実施形態では、第1のペイロードの膜貫通ドメイン領域は、第2の親タンパク質からの膜貫通ドメイン、バリエントまたは断片で置き換えられ得る。

【0124】

ポリペプチド及びペイロードとしてのポリペプチド

本開示の刺激物、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSRE及びペイロードを含む）は、ポリペプチド全体、複数のポリペプチドまたはポリペプチドの断片として存在し得、これらは、独立して、1つまたはより多くの核酸、複数の核酸、核酸の断片または前述したもののいずれかのバリエントによってコードされ得る。

【0125】

本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、ほとんどの場合、ペプチド結合によって互いに連結されたアミノ酸残基（天然または非天然）のポリマーを指す。その用語は、本明細書で使用される場合、任意のサイズの構造、または機能のタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを指す。いくつかの例では、コードされるポリペプチドは、約50アミノ酸未満であり、そのときはポリペプチドはペプチドと称される。ポリペプチドがペプチドである場合、それは少なくとも約2、3、4、または少なくとも5アミノ酸残基長である。よって、ポリペプチドには、遺伝子産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、ホモログ、オーソログ、パラログ、断片ならびに前述のものの他の同等物、バリエント、及びアナログが含まれる。ポリペプチドは、単一分子であり得、または多分子複合体、例えば、二量体、三量体もしくは四量体であり得る。それらはまた、一本鎖または複数鎖のポリペプチドを含み得、関連付けまたは連結され得る。ポリペプチドという用語はまた、1つまたはより多くのアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的化学的アナログであるアミノ酸ポリマーに適用され得る。

【0126】

本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチドバリエント」は、それらのアミノ酸配列がネイティブまたは参照配列とは異なる分子を指す。アミノ酸配列バリエントは、ネイティブまたは参照配列と比較して、アミノ酸配列内の所定の位置で置換、欠失、及び／または挿入を保有し得る。通常、バリエントは、ネイティブまたは参照配列に対して少なくとも約50％の同一性（相同性）を保有し、好ましくは、それらは、ネイティブまたは参照配列に対して少なくとも約80％、より好ましくは少なくとも約90％同一（相同）である。

【0127】

いくつかの実施形態では「バリエント模倣体」が提供される。本明細書で使用される場合、用語「バリエント模倣体」は、活性化配列を模倣するであろう1つまたはより多くのアミノ酸を含有するバリエントを指す。例えば、グルタミン酸は、ホスホトレオニン及び／またはホスホセリンのための模倣体として機能し得る。代替的には、バリエント模倣体は、脱活性化または模倣体を含有する不活性化生成物をもたらし得る。例えば、フェ

10

20

30

40

50

ニルアラニンは、チロシンのための不活性化置換として作用し得；またはアラニンは、セリンのための不活性化置換として作用し得る。本開示の薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）のアミノ酸配列は、天然に存在するアミノ酸を含み得、そのようなものとして、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、またはその断片と考えられ得る。代替的には、薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、天然に存在するアミノ酸及び天然に存在しないアミノ酸の両方を含み得る。

【0128】

本明細書で使用される場合、用語「アミノ酸配列バリエーション」は、ネイティブまたは開始配列と比較してそれらのアミノ酸配列にいくつかの相違を有する分子を指す。アミノ酸配列バリエーションは、アミノ酸配列内の所定の位置で置換、欠失、及び／または挿入を保有し得る。本明細書で使用される場合、用語「ネイティブ」または「開始」は、配列に言及する場合、比較がなされ得る元の分子に言及する相対的用語である。ネイティブまたは開始配列は、野生型配列と混同されるべきではない。ネイティブ配列または分子は、野生型（天然に見られるその配列）を表し得るが、野生型配列と同一である必要はない。

【0129】

通常、バリエーションは、ネイティブ配列に対して少なくとも約70%の相同性を保有し、好ましくは、それらは、ネイティブ配列に対して少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%相同である。

【0130】

本明細書で使用される場合、用語「相同性」は、それがアミノ酸配列に適用される場合、最大相同率を達成するために、配列をアライメントし、必要に応じてギャップを導入した後、第2の配列のアミノ酸配列における残基と同一である候補アミノ酸配列における残基の割合として定義される。アライメントのための方法及びコンピュータプログラムは、当該技術分野でよく知られている。相同性は、同一率の計算に依存するが、計算に導入されたギャップ及びペナルティのため、値が異なり得ることが理解される。

【0131】

本明細書で使用される場合、用語「ホモログ」は、アミノ酸配列に適用される場合、第2の種の第2の配列と実質的同一性を有する他の種の対応する配列を意味する。

【0132】

本明細書で使用される場合、用語「アナログ」は、親ポリペプチドの特性を依然として維持するアミノ酸残基の1つまたはより多くのアミノ酸変化、例えば、置換、付加または欠失によって異なるポリペプチドバリエーションを含むことを意味する。

【0133】

本明細書で使用される場合、用語「誘導体」は、用語「バリエーション」と同義的に使用され、参照分子または開始分子に対して任意の方法で改変または変化した分子を指す。

【0134】

本開示は、バリエーション及び誘導体を含むアミノ酸ベースである、いくつかのタイプの薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）を企図している。これらには、置換、挿入、欠失及び共有結合性バリエーション及び誘導体が含まれる。このように、置換、挿入、付加、欠失及び／または共有結合性改変を含む薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、本開示の範囲内に含まれる。例えば、配列タグまたはアミノ酸、例えば、1つまたはより多くのリジンが、本開示のペプチド配列に（例えば、N末端またはC末端の端部で）加えられ得る。配列タグは、ペプチド精製または局在化のために使用され得る。リジンは、ペプチド溶解性を増加させるためまたはビオチン化を可能にするために使用され得る。代替的には、ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ及びアミノ末端領域に位置するアミノ酸残基が任意に欠失され、切断された配列を提供し得る。所定のアミノ酸（例えば、C末端またはN末端残基）は、代替的には、配列の使用に応じて、例えば、可溶性であるか、または固体支持体に連結されたよ

10

20

30

40

50

り大きな配列の一部としての配列の発現として欠失され得る。

【0135】

「置換バリエント」は、タンパク質に言及する場合、ネイティブまたは開始配列における少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、異なるアミノ酸がその箇所において同じ位置で挿入されたものである。置換は、分子における1つのアミノ酸のみが置換されている単一型であり得、またはそれらは、同じ分子において2つまたはより多くのアミノ酸が置換されている複数型であり得る。

【0136】

本明細書で使用される場合、用語「保存的アミノ酸置換」は、同様のサイズ、電荷、または極性の異なるアミノ酸での、配列に通常存在するアミノ酸の置換を指す。保存的置換の例には、非極性（疎水性）残基、例えば、イソロイシン、バリン及びロイシンでの別の非極性残基の置換が含まれる。同様に、保存的置換の例には、1つの極性（親水性）残基での別のものの置換、例えば、アルギニンとリジンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、及びグリシンとセリンとの間の置換が含まれる。また、塩基性残基、例えば、リジン、アルギニンもしくはヒスチジンでの別のものの置換、または1つの酸性残基、例えば、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸での別の酸性残基の置換は、保存的置換の追加の例である。非保存的置換の例には、非極性（疎水性）アミノ酸残基、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、メチオニンでの極性（親水性）残基、例えば、システイン、グルタミン、グルタミン酸またはリジンの置換及び／または極性残基での非極性残基の置換が含まれる。

【0137】

本明細書で使用される場合、用語「挿入バリエント」は、タンパク質に言及する場合、ネイティブまたは開始配列における特定の位置でアミノ酸に直接隣接して挿入された1つまたはより多くのアミノ酸を有するものである。本明細書で使用される場合、用語「直接隣接」は、開始または参照アミノ酸のアルファールカルボキシまたはアルファアミノ官能基のいずれかに接続された隣接アミノ酸を指す。

【0138】

本明細書で使用される場合、用語「欠失バリエント」は、タンパク質に言及する場合、ネイティブまたは開始アミノ酸配列における1つまたはより多くのアミノ酸が除去されたものである。通常、欠失バリエントは、分子の特定の領域において1つまたはより多くのアミノ酸が欠失される。

【0139】

本明細書で使用される場合、用語「誘導体」には、本明細書で言及される場合、有機タンパク質性または非タンパク質性誘導体化剤での1つまたはより多くの修飾、及び翻訳後修飾を含むネイティブまたは開始タンパク質のバリエントが含まれる。共有結合性修飾は、タンパク質の標的アミノ酸残基を、選択された側鎖もしくは末端残基と反応することが可能な有機誘導体化剤と反応させることによって、または選択された組換え宿主細胞において機能する翻訳後修飾のメカニズムを利用することによって伝統的に導入される。得られる共有結合性誘導体は、生物学的活性のために、イムノアッセイのために、または組換え糖タンパク質のイムノアフィニティー精製のための抗タンパク質抗体の調製のために重要な残基を特定することに向けられたプログラムにおいて有用である。そのような修飾は、当該技術分野における通常の技術の範囲内であり、過度な実験を行うことなく実施される。

【0140】

本明細書で使用される場合、用語「部位」は、アミノ酸ベースの実施形態に関する場合、「アミノ酸残基」及び「アミノ酸側鎖」と同義的に使用される。部位は、本開示のポリペプチドベースの分子の中で改変、操作、変化、誘導体化または変更され得るペプチドまたはポリペプチド内の位置を表す。

【0141】

本明細書で使用される場合、用語「末端 (termini)」または「末端 (term

10

20

30

40

50

i n u s)」は、タンパク質に言及する場合、ペプチドまたはポリペプチドの先端を指す。そのような先端は、ペプチドまたはポリペプチドの最初または最後の部位のみに限定されず、末端領域において追加のアミノ酸を含み得る。本開示のポリペプチドベースの分子は、N末端（遊離アミノ基（NH₂）を有するアミノ酸によって終結される）及びC末端（遊離カルボキシル基（COOH）を有するアミノ酸によって終結される）の両方を有するものとして特性化され得る。

【0142】

本開示のポリペプチドまたはタンパク質は、いくつかの場合では、ジスルフィド結合によってまたは非共有結合性力によって共にもたらされる複数のポリペプチド鎖から構成される（多重体、オリゴマー）。これらの種類のタンパク質は、複数のN末端及びC末端を有する。代替的には、ポリペプチドの末端は、場合によって、非ポリペプチドベースの部位、例えば、有機コンジュゲートで開始または終了するように改変され得る。

【0143】

特徴のいずれかが、本開示の生体回路システム成分、刺激物、エフェクターモジュール（SREまたはペイロードを含む）の成分として特定または定義されると、これらの特徴のいくつかの操作及び／または改変のいずれかは、移動、スワッピング、反転、欠失、ランダム化または複製によって実施され得る。さらに、特徴の操作は、本開示の組成物に対する改変と同じアウトカムをもたらし得ることが理解される。例えば、ドメインの欠失を含む操作は、全長分子未満のものをコードするための核酸の改変とちょうど同じように分子の長さの変化をもたらすであろう。

【0144】

改変及び操作は、当該技術分野で知られている方法、例えば、部位特異的変異誘発によって達成され得る。得られる改変された分子は次いで、*in vitro*もしくは*in vivo*アッセイ、例えば、本明細書に記載のもの、または当該技術分野で知られている任意の他の好適なスクリーニングアッセイを使用して活性について試験され得る。

【0145】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、同位体である1つまたはより多くの原子を含み得る。本明細書で使用される場合、用語「同位体」は、1つまたはより多くのさらなる中性子を有する化学元素を指す。いくつかの実施形態では、本開示の化合物は、重水素化され得る。本明細書で使用される場合、用語「重水素化する」は、物質における1つまたはより多くの水素原子を重水素同位体で置き換えるプロセスを指す。重水素同位体は、水素の同位体である。水素の核は、1つのプロトンを含むのに対し、重水素原子核は、プロトン及び中性子の両方を含む。本開示の薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、1つまたはより多くの物理的特性、例えば、安定性を変化させるために、または薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）を診断及び／または実験用途において使用することを可能とするために重水素化され得る。

【0146】

タンパク質レベルにおいて、生体回路成分のいずれかは、1つまたはより多くの翻訳後修飾（PTM）を含み得る。そのようなPTMは、タンパク質ベースの生体回路成分の投与の後、または前記生体回路成分をコードする核酸として投与される生体回路成分の翻訳時もしくは翻訳後に細胞内で生じ得る。

【0147】

本開示の翻訳後修飾（PTM）には、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、カルボキシル化、脱アミド化、脱アミノ化、脱アセチル化、ジヒドロキシル化、脱リン酸化、ホルミル化、ガンマーカルボキシグルタミン化、グルタチオン化、糖化、ヒドロキシル化、メチル化、ニトロ化、スモイル化、N-またはO-トランスグルタミン化、グリコシル化及びファルネシル化が含まれるがこれらに限定されない。

【0148】

エフェクターモジュール（それらのSRE及びペイロードを含む）は、独立して、同じまたは異なる1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多くのPTMを有し得る。

【0149】

エフェクターモジュールは、タンパク質ファミリーの1つまたはより多くの構造または機能性ドメイン、リピート、またはモチーフを含むように設計され得る。そのようなドメイン、リピート及びモチーフは、タンパク質ファミリーによってカテゴリー化され、代表的なファミリーは、<http://www.ebi.ac.uk/>にあるEMBL-EBIデータベースで提供されている。

【0150】

いくつかの実施形態では、抗原プロセッシング及びペプチド負荷、例えば、グリコシル化及びPEG化を妨げるための、本開示の組成物の構造に修飾されるタンパク質改変もまた、本開示において有用であり得る。本開示の組成物はまた、免疫原性がより低い組成物を設計するために非古典的のアミノ酸側鎖を含むように修飾され得る。免疫原性を低下させるための国際特許公開番号WO2005051975（その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる）において論述される方法のいずれかは、本開示において有用であり得る。

【0151】

SREは、限定されないが、ペプチド、ペプチド複合体、ペプチド-タンパク質複合体、タンパク質、融合タンパク質、タンパク質複合体、タンパク質-タンパク質複合体であり得る。SREは、任意の天然または変異タンパク質、または抗体に由来する1つまたはより多くの領域を含み得る。この態様では、SREは、刺激物に反応する場合、ペイロードの細胞内局在化、分子内活性化、及び／または分解を調整し得る要素である。

【0152】

いくつかの実施形態では、本開示のエフェクターモジュールは、エフェクターモジュールの発現及び制御を容易化する追加の特徴、例えば、1つまたはより多くのシグナル配列（SS）、1つまたはより多くの切断及び／またはプロセッシング部位、1つまたはより多くの標的化及び／または浸透性ペプチド、1つまたはより多くのタグ、及び／または1つまたはより多くのリンカーを含み得る。また、本開示のエフェクターモジュールは、他の制御性部位、例えば、誘導性プロモーター、エンハンサー配列、マイクロRNA部位、及び／またはマイクロRNA標的化部位をさらに含み得る。各態様または調整されたモダリティは、異なって調整される特徴をエフェクターモジュールまたは生体回路にもたらし得る。例えば、SREは、脱安定化ドメインを表し得るのに対し、タンパク質ペイロードにおける変異は、その切断部位または二量化特性または半減期を変化させ得、1つまたはより多くのマイクロRNAまたはマイクロRNA結合部位の包含は、細胞性脱標的化またはトラフィッキング特徴に影響を及ぼし得る。結果的に、本開示は、それらの防御可能性において多元的である生体回路を包含する。そのような生体回路は、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれより多くの調整される特徴を含有するように修飾され得る。

【0153】

いくつかの実施形態では、本開示のエフェクターモジュールは、発現を調整するための1つまたはより多くのデグロンを含み得る。本明細書で使用される場合、「デグロン」は、タンパク質分解システムによる認識及び分解に十分なタンパク質内の最小配列を指す。デグロンの重要な特性は、それらが転移可能であること、すなわち、配列へのデグロンの付加が、配列に対する分解をもたらすことである。いくつかの実施形態では、デグロンは、脱安定化ドメイン、ペイロードまたはその両方に付加され得る。本開示のエフェクターモジュール内のデグロンの組み込みは、追加のタンパク質不安定性をエフェクターモジュールに付与し、基底発現を最小化するために使用され得る。いくつかの実施形態では、デグロンは、Nデグロン、ホスホデグロン、熱誘導性デグロン、光感受性デグロン、酸素依存性デグロンであり得る。非限定的な例として、デグロンは、Takeuchi et al. (Takeuchi J et al. (2008). Biochem J. 2008

10

20

30

40

50

Mar 1; 410 (2): 401-7 (その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる) によって記載されているようにオルニチンデカルボキシラーゼデグロンであり得る。本開示において有用なデグロンの他の例には、国際特許公開番号WO2017004022、WO2016210343、及びWO2011062962 (これらの各々の内容は、それらの全体が参照により組み込まれる) に記載のデグロンが含まれる。

【0154】

免疫療法剤

本明細書に記載の生体回路は、免疫療法剤を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、生物において免疫反応を誘導する免疫療法剤であり得る。免疫療法剤は、限定されないが、抗体ならびにその断片及びバリエーション、キメラ抗原受容体 (CAR) 、キメラスイッチ受容体、サイトカイン、ケモカイン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、サイトカイン-サイトカイン受容体融合ポリペプチド、または免疫反応を誘導する任意の薬剤であり得る。一実施形態では、免疫療法剤は、細胞、または対象において抗がん免疫反応を誘導する。

【0155】

サイトカイン、ケモカイン及び他の因子

本開示によれば、本開示のペイロードは、身体内の細胞と組織との間の化学的コミュニケーションとして作用し得る、免疫細胞、がん細胞及び他の細胞タイプによって生成されるサイトカイン、ケモカイン、成長因子、及び可溶性タンパク質であり得る。これらのタンパク質は、細胞成長、分化、遊走及び生存に対する効果から多数のエフェクター活性まで広い範囲の生理的機能を媒介する。例えば、活性化T細胞は、細胞傷害性機能のための多様なサイトカインを生成して腫瘍細胞を排除する。

【0156】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、インターロイキン、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターフェロン (IFN)、TGFβ及びケモカインを含むがこれらに限定されないサイトカイン、ならびにその断片、バリエーション、アナログ及び誘導体であり得る。同じ遺伝子またはタンパク質についての所定の遺伝子及び／またはタンパク質命名法は、ダッシュ「-」などの句読点またはギリシャ文字などの記号を含む場合があり、または含まない場合があることが当該技術分野で理解されている。これらが本明細書において含まれるまたは含まれないにかかわらず、その意味は、当業者によって理解されるように、変更されることを意味していない。例えば、IL2、IL2及びIL-2は、同じインターロイキンを指す。同様に、TNFアルファ、TNFα、TNF-アルファ、TNF-α、TNFアルファ及びTNFαはすべて、同じタンパク質を指す。同様に、CD40L、CD40L及びCD40LGは、同じタンパク質を指す。

【0157】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、免疫反応を刺激するサイトカインであり得る。他の実施形態では、本開示のペイロードは、抗がん免疫反応に負の影響を及ぼすサイトカインのアンタゴニストであり得る。

【0158】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、サイトカイン受容体、その組換え受容体、バリエーション、アナログ及び誘導体；またはサイトカインのシグナル成分であり得る。

【0159】

いくつかの実施形態では、本開示のサイトカインは、免疫療法のために使用される免疫細胞、例えば、CD8+TEM、ナチュラルキラー細胞及び腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 細胞の増殖、生存、持続性、及び効力を改善するために利用され得る。他の実施形態では、2つまたはより多くのDD制御サイトカインで修飾されたT細胞が、T細胞活性化及び腫瘍微小環境リモデリングの動態コントロールを提供するために利用される。一態様では、本開示は、サイトカイン療法に関連する毒性を最小化するための生体回路及び組成物を提供する。腫瘍負荷を緩和するその成功にもかかわらず、全身性サイトカイン療法はしばしば、用量を制限する重篤な副作用の発症をもたらす。2つの要素が、観察された毒性に

寄与する（a）サイトカインが異なる細胞タイプに影響を及ぼし、時に状況に応じて同じ細胞に対して反対の効果をもたらす多面発現性（b）サイトカインは、短い血清半減期を有し、よって、治療効果を達成するために高用量で投与される必要があり、これは多面的効果を深刻にする。一態様では、本開示のサイトカインは、有害作用の事象においてサイトカイン発現を調節するために利用され得る。いくつかの実施形態では、本開示のサイトカインは、長期化した寿命または毒性を最小化するための向上した特異性を有するように設計され得る。

【0160】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、インターロイキン（IL）サイトカインであり得る。インターロイキン（IL）は、免疫反応を制御するための白血球によって生成される糖タンパク質のクラスである。本明細書で使用される場合、用語「インターロイキン（IL）」は、任意の種または源からのインターロイキンポリペプチドを指し、全長タンパク質ならびにタンパク質の断片または部分を含む。いくつかの態様では、インターロイキンペイロードは、IL1、IL1アルファ（ヘマトポエチン-1とも称される）、IL1ベータ（異化）、IL1デルタ、IL1イプシロン、IL1エータ、IL1ゼータ、インターロイキン-1ファミリーメンバー1~11（IL1F1~IL1F11）、インターロイキン-1ホモログ1~4（IL1H1~IL1H4）、IL1関連タンパク質1~3（IL1RP1~IL1RP3）、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL10C、IL10D、IL11、IL11a、IL11b、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17A、IL17B、IL17C、IL17E、IL17F、IL18、IL19、IL20、IL20様（IL20L）、IL21、IL22、IL23、IL23A、IL23-p19、IL23-p40、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL34、IL35、IL36アルファ、IL36ベータ、IL36ガンマ、IL36RN、IL37、IL37a、IL37b、IL37c、IL37d、IL37e及びIL38から選択される。他の態様では、本開示のペイロードは、CD121a、CDw121b、IL2R α /CD25、IL2R β /CD122、IL2R γ /CD132、CDw131、CD124、CD131、CDw125、CD126、CD130、CD127、CDw210、IL8RA、IL11R α 、CD212、CD213 α 1、CD213 α 2、IL14R、IL15R α 、CDw217、IL18R α 、IL18R β 、IL20R α 、及びIL20R β から選択されるインターロイキン受容体であり得る。他の態様では、本開示のペイロードは、限定されないが、TNFアルファ、CD40L、リンホトキシン（LTA）アルファ、LTAベータ及びOX40Lを含むTNFスーパーファミリーのメンバーであり得る。

【0161】

抗体ならびに抗体断片及びバリエーション

本明細書に記載の生体回路は、本明細書に記載の1つまたはより多くの抗体を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体の1つまたはより多くは、ペイロードであり得る。

【0162】

いくつかの実施形態では、抗体断片及びバリエーションは、インタクト抗体からの抗原結合領域を含み得る。抗体断片及びバリエーションの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子、例えば、一本鎖可変断片（scFv）；ならびに抗体断片から形成された多重特異的抗体が含まれ得るがこれらに限定されない。本開示の薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、これらの断片のうちの1つまたはより多くを含み得る。

【0163】

本明細書の目的のため、「抗体」は、重及び軽可変ドメインならびにFc領域を含み得

る。本明細書で使用される場合、用語「ネイティブ抗体」は、通常、互いにジスルフィド結合によって連結された2つの同一の軽（L）鎖及び2つの同一の重（H）鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質を指す。各重鎖は、一端に可変ドメイン（VH）と、それに続くいくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン（VL）及びその他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと並列とされ、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並列とされる。

【0164】

本明細書で使用される場合、用語「可変ドメイン」は、抗体間で配列が広範に異なる抗体重鎖及び軽鎖の両方に見られる特定の抗体ドメインを指し、その特定の抗原についての各々の特定の抗体の結合及び特異性に使用される。可変ドメインは、超可変領域を含む。本明細書で使用される場合、用語「超可変領域」は、抗原結合に貢献するアミノ酸残基を含む可変ドメイン内の一領域を指す。超可変領域内に存在するアミノ酸は、抗体の抗原結合部位の一部となる相補性決定領域（CDR）の構造を決定する。本明細書で使用される場合、用語「CDR」は、その標的抗原またはエピトープと相補的な構造を含む抗体の一領域を指す。抗原と相互作用しない可変ドメインの他の部分は、フレームワーク（FW）領域と称される。抗原結合部位（抗原結合部位またはパラトープとしても知られている）は、特定の抗原と相互作用するのに必要なアミノ酸残基を含む。

【0165】

VH及びVLドメインは、それぞれ、3つのCDRを含む。VLのCDRは、可変ドメインポリペプチドに沿ってN末端からC末端に移動する場合の発生順序で、本明細書でCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3と称される。VHのCDRは、可変ドメインポリペプチドに沿ってN末端からC末端に移動する場合の発生順序で、本明細書でCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3と称される。

【0166】

本明細書で使用される場合、用語「Fv」は、完全な抗原結合部位を形成するのに必要とされる抗体上の最小断片を含む抗体断片を指す。これらの領域は、強固な非共有結合性会合で1つの重鎖及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。Fv断片は、タンパク質分解切断によって生成され得、概ね不安定である。安定なFv断片を生成するための組換え方法は、当該技術分野で知られており、典型的には、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間へのフレキシブルリンカーの挿入を介する（一本鎖Fv（scFv）を形成するため）または重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間へのジスルフィド架橋の導入を介する（Strohl, W. R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p 46-47（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））。

【0167】

本明細書で使用される場合、用語「軽鎖」は、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパ及びラムダと称される、2つの明確に区別されるタイプのうちの1つに割り当てられる任意の脊椎動物種からの抗体の成分を指す。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体は、異なるクラスに割り当てられ得る。5つの主要なクラスのインタクト抗体：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2に分けられ得る。

【0168】

本明細書で使用される場合、用語「一本鎖Fv」または「scFv」は、VH及びVL抗体ドメインの融合タンパク質であって、これらのドメインが互いにフレキシブルペプチドリンカーによって連結されて単一のポリペプチド鎖となったものを指す。いくつかの実施形態では、Fvポリペプチドリンカーにより、scFvは、抗原結合にとって所望の構造を形成することができる。いくつかの実施形態では、scFvは、ファージディスプレイ

10

20

30

40

50

イ、酵母ディスプレイまたは他のディスプレイ方法と併せて利用され、その場合、それらは、表面メンバー（例えば、ファージコートタンパク質）と関連して発現され、所与の抗原に対する高親和性ペプチドの特定において使用され得る。

【0169】

分子遺伝学を使用して、2つのs c F vは、「タンデムs c F v」（t a s c F v）と称される、リンカードメインによって分離された単一ポリペプチドにタンデムで修飾され得る。2つの異なるs c F vのための遺伝子を用いたt a s c F vの構築は、「二重特異的一本鎖可変断片」（b i s - s c F v）を生成する。商業会社によって2つのみのt a s c F vが開発された；その両方は、がん適応症のためのM i c r o m e tによる進行中の初期段階の開発下にある二重特異的薬剤であり、「二重特異的T細胞エンゲージャー（B i T E）」として記載されている。ブリナツモマブは、第2相試験にあるB細胞非ホジキンリンパ腫に対するT細胞反応を増強する抗C D 1 9 / 抗C D 3二重特異的t a s c F vである。M T 1 1 0は、第1相試験にある固形腫瘍に対するT細胞反応を増強する抗E P - C A M / 抗C D 3二重特異的t a s c F vである。二重特異的四価「T a n d A b」もA f f i m e dによって研究されている（N e l s o n , A . L . , M A b s . , 2 0 1 0 , J a n - F e b ; 2 (1) : 7 7 - 8 3）。マキシボディ（I g GのF c（C H 2 - C H 3ドメイン）のアミノ末端に融合された二価s c F vも含まれ得る。

【0170】

本明細書で使用される場合、用語「二重特異的抗体」は、2つの異なる抗原に結合することが可能な抗体を指す。そのような抗体は、典型的には、少なくとも2つの異なる抗体からの領域を含む。二重特異的抗体には、R i e t h m u l l e r , G . C a n c e r I m m u n i t y . 2 0 1 2 , 1 2 : 1 2 - 1 8 , M a r v i n e t a l . , 2 0 0 5 . A c t a P h a r m a c o l o g i c a S i n i c a . 2 0 0 5 , 2 6 (6) : 6 4 9 - 6 5 8及びS c h a e f e r e t a l . , P N A S . 2 0 1 1 , 1 0 8 (2 7) : 1 1 1 8 7 - 1 1 1 9 2（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているもののいずれかが含まれ得る。

【0171】

本明細書で使用される場合、用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指す。ダイアボディは、機能性二重特異的一本鎖抗体（b s c A b）である。ダイアボディは、同じポリペプチド鎖において軽鎖可変ドメインV Lに接続された重鎖可変ドメインV Hを含む。同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには過度に短いリンカーを使用することにより、ドメインは、別の鎖の相補性ドメインと対形成し、2つの抗原結合部位を形成せざるを得なくなる。

【0172】

用語「イントラボディ」は、それが生成される細胞から分泌されないが、代わりに1つまたはより多くの細胞内タンパク質を標的とする抗体の形態を指す。イントラボディは、細胞内トラフィッキング、転写、翻訳、代謝プロセス、増殖シグナル伝達及び細胞分裂を含むがこれらに限定されない多数の細胞性プロセスに影響を及ぼすために使用され得る。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、イントラボディベースの療法を含み得る。いくつかのそのような実施形態では、本明細書に開示される可変ドメイン配列及び／またはC D R配列は、イントラボディベースの療法のための1つまたはより多くのコンストラクトに組み込まれ得る。

【0173】

本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な細胞（またはクローン）の集団から得られた抗体を指す。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、モノクローナル抗体の生成中に生じ得る可能性のあるバリエーション（そのようなバリエーションは通常、少量で存在する）を除き、同一であり及び／または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対して誘導された異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して誘導される。

【0174】

修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られるものとしての抗体の特性を示し、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とするものとして解釈されるものではない。本明細書におけるモノクローナル抗体には、重鎖及び／または軽鎖の一部が、特定の種に由来する、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同である一方で、鎖（複数可）の残部が、別の種に由来する、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、及びそのような抗体の断片が含まれる。

【0175】

本明細書で使用される場合、用語「ヒト化抗体」は、1つまたはより多くの非ヒト（例えば、マウス）抗体源（複数可）からの最小部分を含み、残りが1つまたはより多くのヒト免疫グロブリン源に由来するキメラ抗体を指す。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの抗体の超可変領域の残基が、所望の特異性、親和性、及び／または能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類の抗体の超可変領域の残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。一実施形態では、抗体は、ヒト化全長抗体であり得る。非限定的な例として、抗体は、米国特許公開番号US 20130303399（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている方法を使用してヒト化されている場合がある。

【0176】

本明細書で使用される場合、用語「抗体バリエント」は、（ネイティブまたは開始抗体に対して）改変された抗体または構造及び／または機能においてネイティブまたは開始抗体に似せた生体分子（例えば、抗体模倣体）を指す。抗体バリエントは、ネイティブ抗体と比較してそれらのアミノ酸配列、組成物または構造が変化され得る。抗体バリエントには、アイソタイプ（例えば、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G1、Ig G2、Ig G3、Ig G4、またはIg M）が変化した抗体、ヒト化バリエント、最適化バリエント、多重特異的抗体バリエント（例えば、二重特異的バリエント）、及び抗体断片が含まれ得るがこれらに限定されない。

【0177】

いくつかの実施形態では、本開示の薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、抗体模倣体であり得る。本明細書で使用される場合、用語「抗体模倣体」は、抗体の機能または効果を模倣し、かつそれらの分子標的に特異的かつ高親和性で結合する任意の分子を指す。いくつかの実施形態では、抗体模倣体は、タンパク質骨格としてフィブロネクチンIII型ドメイン（Fn3）を組み込むように設計されたモノボディであり得る（US 6,673,901; US 6,348,584）。いくつかの実施形態では、抗体模倣体は、アフィボディ分子、アフィリン、アフィチン、アンチカリン、アビマー、センチリン（Centyrin）、DARPinSTM、フィノマー（Fynomer）及びクーニッツ（Kunitz）ならびにドメインペプチドを含むがこれらに限定されない当該技術分野で知られているものであり得る。他の実施形態では、抗体模倣体は、1つまたはより多くの非ペプチド領域を含み得る。

【0178】

一実施形態では、抗体は、改変Fc領域を含み得る。非限定的な例として、改変Fc領域は、米国特許公開番号US 20150065690（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載の方法によって作製され得、またはそれに記載される領域のいずれかであり得る。

【0179】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、複数のエピトープに結合する多重特異的抗体をコードし得る。本明細書で使用される場合、用語「マルチボディ」または「多重特異的抗体」は、2つまたはより多くの可変領域が異なるエピトープに結合する抗体を

10

20

30

40

50

指す。エピトープは、同じまたは異なる標的のものであり得る。一実施形態では、多重特異的抗体は、国際特許公開番号WO2011109726及び米国特許公開番号US20150252119（その各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載の方法によって生成及び最適化され得る。これらの抗体はまた、高い特異性及び高い親和性で複数の抗原に結合することができる。

【0180】

所定の実施形態では、多重特異的抗体は、同じまたは異なる抗原上の2つの異なるエピトープを認識する「二重特異的抗体」である。一態様では、二重特異的抗体は、2つの異なる抗原に結合することが可能である。そのような抗体は、典型的には、少なくとも2つの異なる抗体からの抗原結合領域を含む。例えば、二重特異的モノクローナル抗体（BsMAb、BsAb）は、2つの異なるモノクローナル抗体の断片から構成される人工タンパク質であり、これによりBsAbは、2つの異なるタイプの抗原に結合することが可能となる。二重特異的抗体フレームワークには、Rietz et al., *Cancer Immunity*, 2012, 12:12-18; Marvin et al., *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, 26(6):649-658; 及び Schaefer et al., *PNAS*, 2011, 108(27):11187-11192（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているもののいずれかが含まれ得る。「三官能性二重特異的」抗体と称される新世代のBsMAbが開発されている。これらは、2つの重鎖及び2つの軽鎖からなり、各々が2つの異なる抗体に由来し、2つのFab領域（腕部）は2つの抗原に誘導され、Fc領域（足部）は2つの重鎖を含み、3つ目の結合部位を形成する。

【0181】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、単一の抗原結合ドメインを含む抗体をコードし得る。これらの分子は極端に小さく、分子量は、フルサイズのmAbで観察されるもののおよそ10分の1である。さらなる抗体には、軽鎖を欠く、ラクダ及びリヤマに見られる重鎖抗体の抗原結合可変重鎖領域（VHH）に由来する「ナノボディ」が含まれ得る（Nelson, A. L., *MAbs*, 2010, Jan-Feb; 2(1):77-83）。

【0182】

いくつかの実施形態では、抗体は、「小型化」され得る。mAbの小型化の最良の例には、Trubion Pharmaceuticals製の小型モジュール免疫薬（SMIP）がある。一価または二価であり得るこれらの分子は、1つのVL、1つのVH抗原結合ドメイン、及び1つまたは2つの定常「エフェクター」ドメインを含有し、すべてがリンカードメインによって接続されている組換え一本鎖分子である。おそらく、そのような分子は、定常ドメインによって提供されるエフェクター免疫機能を維持しながら、断片によって主張される組織または腫瘍浸透性の増加の利点を提供する可能性がある。少なくとも3つの「小型化」SMIPが臨床開発に入っている。

【0183】

小型化抗体の一例は、ヒンジ領域がIgG4分子から除去された「ユニボディ」と称される。IgG4分子は不安定であり、軽-重鎖ヘテロ二量体を互いに交換し得るが、ヒンジ領域の削除は、重鎖-重鎖の対形成を完全に防ぎ、高い特異性の一価軽/重ヘテロ二量体を残し、その一方でin vivoでの安定性及び半減期を確保するためのFc領域を保持する。

【0184】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、単一の単量体可変抗体ドメインからなる抗体断片である単ドメイン抗体（sdAbs、またはナノボディ）をコードし得る。完全抗体のように、それは、特定の抗原に選択的に結合することができる。一態様では、sdAbは、「ラクダIgまたは「ラクダ科VHH」であり得る。本明細書で使用される場合、用語「ラクダIg」は、重鎖抗体の既知の最小抗原結合単位を指す（Kocher

No l t e , e t a l , F A S E B J . , 2 0 0 7 , 2 1 : 3 4 9 0 - 3 4 9 8) 。
「重鎖抗体」または「ラクダ科抗体」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 (R i e c h m a n n L . e t a l , J . I m m u n o l . M e t h o d s , 1 9 9 9 , 2 3 1 : 2 5 - 3 8 ; 国際特許公開番号WO1994/04678及びWO1994/025591 ; ならびに米国特許番号6 , 0 0 5 , 0 7 9) 。別の態様では、s d A b は、「免疫グロブリン新抗原受容体」 (I g N A R) であり得る。本明細書で使用される場合、用語「免疫グロブリン新抗原受容体」は、1つの可変新抗原受容体 (V N A R) ドメイン及び5つの定常新抗原受容体 (C N A R) ドメインのホモ二量体からなるサメ免疫レパートリーからの抗体のクラスを指す。

【0185】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、イントラボディをコードし得る。イントラボディは、それが生成される細胞から分泌されないが、代わりに1つまたはより多くの細胞内タンパク質を標的とする抗体の形態である。イントラボディは、細胞内で発現及び機能し、細胞内トラフィッキング、転写、翻訳、代謝プロセス、増殖シグナル伝達及び細胞分裂を含むがこれらに限定されない多数の細胞性プロセスに影響を及ぼすために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法には、イントラボディベースの療法が含まれる。いくつかのそのような実施形態では、本明細書に開示される可変ドメイン配列及び／またはCDR配列は、イントラボディベースの療法のための1つまたはより多くのコンストラクトに組み込まれる。例えば、イントラボディは、1つまたはより多くの糖化細胞内タンパク質を標的とし得、または1つまたはより多くの糖化細胞内タンパク質と代替タンパク質との間の相互作用を調節し得る。

【0186】

いくつかの態様では、本開示のペイロードは、米国特許番号5 , 0 9 1 , 5 1 3 (その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載される生合成抗体をコードし得る。そのような抗体は、生合成抗体結合部位 (B A B S) として挙動する一領域を構成するアミノ酸の1つまたはより多くの配列を含み得る。その部位は、1) 非共有結合的に会合したもしくはジスルフィド結合した合成VH及びVL二量体、2) VH及びVLがポリペプチドリinkerによって結合したVH-VLもしくはVL-VH一本鎖、または3) 個々のVHもしくはVLドメインを含む。結合ドメインは、連結されたCDR及びFR領域を含み、これらは別々の免疫グロブリンに由来し得る。生合成抗体にはまた、例えば、酵素、毒素、結合部位、または固体化媒体もしくは放射性原子への結合部位として機能する他のポリペプチド配列が含まれ得る。生合成抗体を生成するための、抗体のi n v i v o 生成によって誘発され得る任意の特異性を有するB A B S を設計するための、及びそれらのアナログを生成するための方法が開示される。

【0187】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、米国特許番号8 , 3 9 9 , 6 2 5 で教示される抗体アクセプターフレームワークを有する抗体をコードし得る。そのような抗体アクセプターフレームワークは、対象となる抗体からの特に良好に適した受け入れCDRであり得る。

【0188】

一実施形態では、抗体は、条件付き活性生物学的タンパク質であり得る。抗体は、野生型の正常な生理的条件で可逆的または不可逆的に不活性化される条件付き活性生物学的タンパク質を生成するために使用され得、また、そのような条件付き活性生物学的タンパク質及びそのような条件付き活性生物学的タンパク質の使用が提供される。そのような方法及び条件付き活性タンパク質は、例えば、国際公開番号WO2015175375及びWO2016036916ならびに米国特許公開番号US20140378660 (これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる) で教示されている。

【0189】

免疫療法に使用される抗体

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、腫瘍特異的抗原 (T S A) 及び腫瘍

10

20

30

40

50

関連抗原（TAA）に特異的な抗体、その断片及びバリエーションであり得る。抗体は、TSA/TAAを発見し、結合するまで身体全体を循環する。結合すると、それらは、免疫系の他の成分を動員し、ADCC（抗体依存性細胞媒介細胞傷害性）及びADCP（抗体依存性細胞細胞媒介貪食）を増加させて腫瘍細胞を破壊する。本明細書で使用される場合、用語「腫瘍特異的抗原（TSA）」は、宿主生物における抗腫瘍免疫反応を誘発し得る、腫瘍細胞において生成される抗原性物質を意味する。一実施形態では、TSAは、腫瘍ネオアンチゲンであり得る。腫瘍抗原特異的抗体は、同じ抗原を発現する腫瘍細胞に対して補体依存性細胞傷害性反応を媒介する。

【0190】

いくつかの実施形態では、腫瘍特異的抗原（TSA）、腫瘍関連抗原（TAA）、病原体関連抗原、またはその断片は、ペプチドとしてまたはインタクトタンパク質もしくはその部分として発現され得る。インタクトタンパク質またはその一部は、ネイティブまたは変異のものであり得る。本明細書に記載されるがんまたはウイルス誘導がんに関連するがん抗原は、当該技術分野でよく知られている。そのようなTSAまたはTAAは、以前からがんに関連していてもよく、または当該技術分野で知られている任意の方法によって特定され得る。

【0191】

一実施形態では、抗原は、B細胞発生を通して発現されるB細胞表面タンパク質であるCD19である。CD19は、B細胞受容体が活性化されると、B細胞抗原受容体誘導シグナル伝達及びB細胞集団の増殖を向上させるよく知られているB細胞表面分子である。CD19は、正常な細胞及び新生物B細胞の両方において広く発現する。B細胞に由来する悪性腫瘍、例えば、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ球性白血病及び多くの非ホジキンリンパ腫は、CD19発現を頻繁に保持する。単一の細胞系列についてのこのほぼ普遍的な発現及び特異性により、CD19は、免疫療法のための魅力的な標的となっている。ヒトCD19は、14個のエクソンを有し、エクソン1～4は、CD19の細胞外部分をコードし、エクソン5は、CD19の膜貫通部分をコードし、エクソン6～14は、細胞質尾部をコードする。

【0192】

一実施形態では、本開示のペイロードは、CD19抗原に特異的な抗体、その断片及びバリエーションであり得る。

【0193】

いくつかの実施形態では、免疫療法剤は、腫瘍特異的抗原（TSA）、腫瘍関連抗原（TAA）、または抗原性エピトープから選択される抗原に対して特異的に免疫反応性である抗体であり得る。

【0194】

一態様では、抗原は、抗原性エピトープであり得る。いくつかの実施形態では、抗原性エピトープは、CD19であり得る。

【0195】

腫瘍特異的抗原（TSA）は、腫瘍ネオアンチゲンであり得る。ネオアンチゲンは、タンパク質コーディング配列を変化させ、そのため、新たな外来の抗原を生成する転写における遺伝子変異または変化のため、腫瘍細胞によってのみ発現する変異抗体である。遺伝子的変化は、ネイティブ同系タンパク質（すなわち、正常な細胞において発現する分子）の遺伝子置換、挿入、欠失または任意の他の遺伝子的変化に起因する。

【0196】

キメラ抗原受容体（CAR）

本明細書に記載の生体回路は、キメラ抗原受容体を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、免疫細胞（例えば、T細胞及びNK細胞）に形質導入される場合、CARの細胞外標的部位によって認識される分子を発現する標的（例えば、腫瘍細胞）に対して免疫細胞を再誘導することができるキメラ抗原受容体（CAR）であり得る。

【0197】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗原受容体（CAR）」は、T細胞の表面上のTCRを模倣する合成受容体を指す。通常、CARは、細胞外標的化ドメイン、膜貫通ドメイン／領域及び細胞内シグナル伝達／活性化ドメインから構成される。標準的なCAR受容体では、成分：細胞外標的化ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達／活性化ドメインは、単一の融合タンパク質として線状に構築されている。細胞外領域は、特定の腫瘍抗原または他の腫瘍細胞－表面分子を認識する標的化ドメイン／部位（例えば、scFv）を含む。細胞内領域は、TCR複合体のシグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ζのシグナル領域）、及び／または1つまたはより多くの共刺激性シグナル伝達ドメイン、例えば、CD28、4-1BB（CD137）及びOX-40（CD134）からのものを含有し得る。例えば、「第一世代CAR」は、CD3ζシグナル伝達ドメインのみを有する。T細胞の持続性及び増殖を高める努力の中で、共刺激性細胞内ドメインが加えられ、CD3ζシグナルドメインに加えて1つの共刺激性シグナル伝達ドメインを有する第2世代CAR、及びCD3ζシグナルドメインに加えて2つまたはより多くの共刺激性シグナル伝達ドメインを有する第三世代CARが出現した。CARは、T細胞によって発現する場合、CARの細胞外標的化部位によって決定される抗原特異性を有するT細胞をもたらす。最近では、1つまたはより多くの要素、例えば、ホーミング及び自殺遺伝子を加えて、より有能で安全なCARの構造を開発することも所望であり、これはいわゆる第4世代CARと呼ばれる。

【0198】

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールの免疫療法剤は、キメラ抗原受容体（CAR）である。キメラ抗原は、細胞外標的部位；膜貫通ドメイン；細胞内シグナル伝達ドメイン；及び任意に、1つまたはより多くの共刺激性ドメインを含み得る。

【0199】

いくつかの実施形態では、細胞外標的化ドメインは、ヒンジ（スペースドメインまたはスペーサーとも称される）及び膜貫通領域を介して細胞内シグナル伝達ドメインに接合される。ヒンジは、細胞外標的化ドメインを、細胞膜を横断し、かつ細胞内シグナル伝達ドメインに接続する膜貫通ドメインに接続させる。標的化部位が結合する標的タンパク質のサイズ、ならびに標的化ドメイン自体のサイズ及び親和性により、CAR発現細胞のがん細胞に対する効力を最適化するためにヒンジを変化させる必要があり得る。標的化部位が標的細胞を認識し、結合すると、細胞内シグナル伝達ドメインは、CAR T細胞のための活性化シグナルをもたらし、これは、1つまたはより多くの細胞内共刺激性ドメインからの「第2のシグナル」によってさらに増幅される。CAR T細胞は、活性化されると、標的細胞を破壊し得る。

【0200】

いくつかの実施形態では、本開示のCARは、2つの部分に分割され得、各部分は、二量化ドメインに連結されることで、二量化を誘発する入力がインタクトな機能性受容体の組み立てを促進する。Wu及びLimは最近分割CARを報告したが、分割CARでは、細胞外CD19結合ドメイン及び細胞内シグナル伝達要素は分離されており、ラパマイシンアナログAP21967の存在下でヘテロ二量化するFKBPドメイン及びFRB*（FKBP－ラパマイシン結合のT2089L変異体）ドメインに連結されている。分割受容体は、AP21967の存在下で組み立てられ、特異的抗原結合と共にT細胞を活性化する（Wu et al., Science, 2015, 625 (6258) : aab4077）。

【0201】

いくつかの実施形態では、本開示のCARは、誘導性CARとして設計され得る。Sakemuraらは最近、Tet-On誘導性システムのCD19 CARコンストラクトへの組み込みを報告した。CD19 CARは、ドキシサイクリン（Dox）の存在下でのみ活性化される。Sakemuraは、Doxの存在下のTet-CD19CAR T細胞が、従来のCD19CAR T細胞と比較して、CD19+細胞株に対して同等の細胞傷害性があり、CD19刺激時に同等のサイトカイン生成及び増殖を有することを報告

10

20

30

40

50

した (Sakemura et al., Cancer Immuno. Res., 2016, Jun 21, Epub ahead of print)。一例では、このTet-CARは、本開示のSRE (例えば、DD) のコントロール下のエフェクターモジュールのペイロードであり得る。二重システムは、形質導入されたT細胞におけるCAR発現のオン及びオフに対してより高い柔軟性を提供する。

【0202】

本開示によれば、本開示のペイロードは、第一世代CAR、または第二世代CAR、または第三世代CAR、または第四世代CARであり得る。いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、細胞外ドメイン、ヒンジ及び膜貫通ドメインならびに細胞内シグナル伝達領域から構成される完全なCARコンストラクトであり得る。他の実施形態では、本開示のペイロードは、細胞外標的化部位、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、1つまたはより多くの共刺激性ドメイン、ならびにリーダー配列、ホーミング要素及び安全性スイッチまたはそのような成分の組み合わせを含むがこれらに限定されないCAR構造及び機能性を改善する他の追加の要素を含む完全CARコンストラクトの成分であり得る。

【0203】

本開示の生体回路及び組成物によって制御されるCARは、調整可能であり、それによりいくつかの利点を提供する。可逆的オンオフスイッチメカニズムにより、過剰のCAR-T細胞増殖によって引き起こされる急性毒性の管理が可能となる。本開示のSREを使用した脈動的CAR発現は、リガンドレベルを循環させることによって達成され得る。リガンドで付与されるCARの制御は、抗原喪失によって誘導される腫瘍エスケープの相殺において有効であり得、慢性的抗原曝露による緊張性シグナル伝達によって引き起こされる機能消耗を回避し、*in vivo*でCAR発現細胞の持続性を向上させる。

【0204】

いくつかの実施形態では、本開示の生体回路及び組成物は、CAR発現を下方制御して、腫瘍溶解症候群によって引き起こされる標的上組織上毒性を制限するために利用され得る。抗腫瘍効力の後に本開示のCARの発現を下方制御することは、(1) 正常な組織において抗原発現によって引き起こされる標的上腫瘍外毒性、(2) *in vivo*での抗原非依存性活性化を防止し得る。

【0205】

細胞外標的化ドメイン／部位

本開示によれば、CARの細胞外標的化部位は、所与の標的分子、例えば、腫瘍細胞上のネオアンチゲンを高い特異性及び親和性で認識し、結合する任意の薬剤であり得る。標的化部位は、腫瘍細胞上の標的分子に特異的に結合する抗体及びそのバリエーション、または腫瘍細胞上の標的分子に結合するその能力に基づいてランダム配列プールから選択されたペプチドアプタマー、または腫瘍細胞上の標的分子に結合し得るバリエーションもしくはその断片、またはネイティブT細胞受容体(TCR)からの抗原認識ドメイン(例えば、HIV感染細胞を認識するCD4細胞外ドメイン)、または外来認識成分、例えば、サイトカイン受容体を保有する標的細胞の認識をもたらす連結サイトカイン、または受容体の天然リガンドであり得る。

【0206】

いくつかの実施形態では、CARの標的化ドメインは、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖可変断片(scFv)、bis-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)、ユニボディ、ナノボディ、または標的分子、例えば、腫瘍特異的抗原(TSA)を特異的に認識する抗体に由来する抗原結合領域であり得る。一実施形態では、標的化部位は、scFvである。scFvドメインは、CAR-T細胞の表面上に発現し、その後、がん細胞上の標的タンパク質に結合した場合、CAR-T細胞をがん細胞の近くに維持し、T細胞の活性化を誘発することができる。scFvは、慣用の組換えDNAテクノロジー技術を使用して生成され得、本

開示において論述される。

【0207】

一態様では、細胞外標的部位は、抗体に由来する s c F v であり得る。一態様では、s c F v は、C D 1 9 抗原に特異的に結合し得る。

【0208】

細胞内シグナル伝達ドメイン

C A R 融合ポリペプチドの細胞内ドメインは、その標的分子に結合した後、エフェクター免疫細胞にシグナルを伝達し、細胞溶解活性（例えば、サイトカイン分泌）またはヘルパー活性を含む、エフェクター免疫細胞の通常のエフェクター機能の少なくとも1つを活性化する。そのため、細胞内ドメインは、T細胞受容体（T C R）の「細胞内シグナル伝達ドメイン」を含む。

10

【0209】

いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメイン全体が用いられ得る。他の態様では、細胞内シグナル伝達ドメインの切断された部分は、エフェクター機能シグナルを伝達する限り、インタクト鎖の代わりに使用され得る。

【0210】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（I T A M）として知られているシグナル伝達モチーフを含有し得る。細胞質シグナル伝達配列を含有する I T A M の例には、T C R C D 3 ゼータ、F c R ガンマ、F c R ベータ、C D 3 ガンマ、C D 3 デルタ、C D 3 イプシロン、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、及び C D 6 6 d に由来するものが含まれる。一例では、細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3 ゼータ（C D 3 ζ）シグナル伝達ドメインである。

20

【0211】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞内領域は、追加のシグナルをエフェクター免疫細胞に提供する1つまたはより多くの共刺激性シグナル伝達ドメインをさらに含む。シグナル伝達ドメインと組み合わせられたこれらの共刺激性シグナル伝達ドメインは、C A R 修飾免疫細胞（例えば、C A R T 細胞）の増殖、活性化、記憶、持続性、及び腫瘍撲滅効率をさらに改善し得る。いくつかの場合では、共刺激性シグナル伝達領域は、1つまたはより多くの細胞内シグナル伝達及び／または共刺激性分子の1、2、3、または4つの細胞質ドメインを含有する。共刺激性シグナル伝達ドメインは、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、4-1 B B（C D 1 3 7）、O X 4 0（C D 1 3 4）、C D 3 0、C D 4 0、I C O S（C D 2 7 8）、G I T R（グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体）、L F A-1（リンパ球機能関連抗原-1）、L I G H T、N K G 2 C、B 7-H 3 を含むがこれらに限定されない共刺激性分子の細胞内／細胞質ドメインであり得る。一例では、共刺激性シグナル伝達ドメインは、C D 2 8 の細胞質ドメインに由来する。別の例では、共刺激性シグナル伝達ドメインは、4-1 B B（C D 1 3 7）の細胞質ドメインに由来する。別の例では、共刺激性シグナル伝達ドメインは、米国特許番号 9, 175, 308（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されているように、G I T R の細胞内ドメインであり得る。

30

40

【0212】

いくつかの実施形態では、国際特許公開 W O 2 0 1 4 1 5 3 2 7 0 に開示される細胞内シグナル伝達ドメインは、本開示において有用であり得る。

【0213】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のキメラ抗原受容体は、C A R 活性を調整するように変化した C D 3 ゼータドメインを含み得る。C D 3 ゼータドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（I T A M）における1つまたはより多くの変異を含み得る。一態様では、I T A M 内のチロシン残基は変異され、減少したリン酸化及び制限された下流シグナル伝達をもたらし得る。いくつかの実施形態では、I T A M の1つまたはより多くは、C D 3 ゼータドメインから欠失され得る。一態様では、C D 3 ゼータは、1

50

つのITAMを含み得る。Feucht et al. 2019によって記載されたCAR及びCD3ゼータドメインのいずれかが本明細書で使用され得る (Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. Nature Medicine 25, 82–88 (2019) (その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる))。

【0214】

いくつかの実施形態では、GITR共刺激性ドメインは、本明細書に記載のCARにおいて有用であり得る。いくつかの実施形態では、GITRドメインは、T細胞エフェクター機能を誘導し、T細胞を活性化することが可能であり得る。いくつかの態様では、本明細書に記載のGITRドメインは、免疫反応を阻止する阻害性T制御性細胞を抑制することが可能であり得る。いくつかの実施形態では、GITR細胞内ドメイン含有CAR T細胞は、サイトカインの生成を減少させ得、これは、サイトカイン放出症候群を軽減し得る。国際特許公開WO2018045034 (その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載のGITRドメインのいずれか。

【0215】

膜貫通ドメイン及びヒンジ領域

いくつかの実施形態では、本開示のCARは、膜貫通ドメインを含み得る。本明細書で 사용되는場合、用語「膜貫通ドメイン(TM)」は、細胞膜にまたがる長さが約15残基のアミノ酸配列を広く指す。より好ましくは、膜貫通ドメインは、少なくとも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、または45アミノ酸残基を含み、細胞膜にまたがる。いくつかの実施形態では、本開示の膜貫通ドメインは、天然または合成源のいずれかに由来し得る。CARの膜貫通ドメインは、任意の天然の膜結合または膜貫通タンパク質に由来し得る。例えば、膜貫通領域は、T細胞受容体のアルファ、ベータもしくはゼータ鎖、CD3イプシロン、CD4、CD5、CD8、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、またはCD154に由来し得る (すなわち、これらの少なくとも膜貫通領域(複数可)を含み得る)。

【0216】

代替的には、本開示の膜貫通ドメインは、合成であり得る。いくつかの態様では、合成配列は、主に、疎水性残基、例えば、ロイシン及びバリンを含み得る。

【0217】

いくつかの実施形態では、本開示の膜貫通ドメインは、CD8α膜貫通ドメイン、CD4膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CTLA-4膜貫通ドメイン、PD-1膜貫通ドメイン、及びヒトIgG4のFc領域からなる群から選択され得る。非限定的な例として、膜貫通ドメインは、国際特許公開番号WO2014/100385の配列番号1～5のアミノ酸配列を含むCTLA-4膜貫通ドメイン；及び国際特許公開番号WO2014100385の配列番号6～8のアミノ酸配列を含むPD-1膜貫通ドメインであり得、これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0218】

いくつかの実施形態では、本開示のCARは、任意のヒンジ領域(スペーサーとも称される)を含み得る。ヒンジ配列は、標的結合ドメインをエフェクター細胞表面から離れるように移動させて適切な細胞/細胞接触、標的結合及びエフェクター細胞活性化を可能とする細胞外標的化ドメインの柔軟性を容易化する短いアミノ酸の配列である(Patelet et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412–419)。ヒンジ配列は、標的化部位と膜貫通ドメインとの間に配置され得る。

【0219】

いくつかの実施形態では、本開示のCARは、CARのドメインのいずれかの間に1つまたはより多くのリンカーを含み得る。リンカーは、1～30アミノ酸長であり得る。

【0220】

いくつかの実施形態では、本開示の標的化部位、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む成分は、単一の融合ポリペプチドで構築され得る。融合ポリペプチドは、本開示のエフェクターモジュールのペイロードであり得る。いくつかの実施形態では、複数のCAR融合ポリペプチドがエフェクターモジュールに含まれ得、例えば、2つ、3つまたはそれより多くのCARが、単一のSRE（例えば、DD）のコントロール下でエフェクターモジュールに含まれ得る。

【0221】

一実施形態では、CARコンストラクトは、CD19scFv（例えば、CAT13.1E10またはFMC63）、CD8 α スパーサーまたは膜貫通ドメイン、ならびに4-1BB及びCD3 ζ エンドドメインを含む。CAT13.1E10を有するこれらのコンストラクトは、FMC63を有するコンストラクトと比較して、*in vitro*での刺激後の増殖の増加、CD19+標的に対する細胞傷害性の増加、及びエフェクターと標的の相互作用の増加を有し得る。

【0222】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、本明細書に記載の共刺激性分子及び／または細胞内ドメインのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、それぞれ異なるSREのコントロール下の1つまたはより多くの共刺激性分子が、本開示において使用され得る。SRE制御共刺激性分子はまた、第一世代CAR、第二世代CAR、第三世代CAR、第四世代CAR、または本明細書に記載の任意の他のCAR設計と併せて発現され得る。

【0223】

タンデムCAR (TanCAR)

いくつかの実施形態では、本開示のCARは、2つ、3つ、4つ、またはそれより多くの腫瘍特異的抗原を標的とすることができるタンデムキメラ抗原受容体 (TanCAR) であり得る。いくつかの態様では、CARは、腫瘍細胞上の2つの異なるTSAを認識する2つの標的化ドメインを含む二重特異的TanCARである。二重特異的CARは、第1の腫瘍抗原に特異的な標的化ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）及び第2の腫瘍抗原に特異的な標的化ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を含む細胞外領域を含むものとしてさらに定義され得る。他の態様では、CARは、タンデム配置で構成された3つまたはより多くの標的化ドメインを含む多重特異的TanCARである。TanCARにおける標的化ドメイン間のスペースは、長さが約5～約30アミノ酸の間、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29及び30アミノ酸であり得る。

【0224】

分割CAR

いくつかの実施形態では、本開示の標的化部位、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む成分は、インタクトな機能性受容体の組み立てを促進する複数の入力に依存するように2つまたはより多くの部分に分割され得る。一実施形態では、活性化CAR受容体の組み立てが、SREへのリガンド（例えば、小分子）の結合及び特異的抗原の標的化部位への結合に依存する分割合成CARシステムが構築され得る。非限定的な例として、分割CARは、小分子依存的に組み立てられる2つの部分からなり、受容体の一方の部分は、細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）を特徴とし、他方の部分は、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3 ζ 細胞内ドメインを有する。

【0225】

他の態様では、CARシステムの分割部分は、シグナルを増加させるようにさらに改変され得る。一例では、細胞質断片の第2の部分は、膜貫通ドメイン（例えば、CD8 α 膜貫通ドメイン）をコンストラクトに組み込むことによって細胞膜に固定され得る。追加の細胞外ドメイン、例えば、ホモ二量化を媒介する細胞外ドメインがまた、CARシステムの第2の部分に付加され得る。これらの改変は、受容体出力活性、すなわち、T細胞活性

化を増大させ得る。

【0226】

いくつかの態様では、分割CARシステムの2つの部分は、ヘテロ二量化小分子の結合時に条件付きで相互作用するヘテロ二量化ドメインを含有する。このように、受容体成分は、小分子の存在下で組み立てられて、インタクトシステムを形成し、これは次いで、抗原係合によって活性化され得る。任意の既知のヘテロ二量化成分が分割CARシステムに組み込まれ得る。ジベレリン誘導二量化システム(GID1-GAI)、トリメトプリム-SLF誘導ecDHFR及びFKBP二量化(Czlapinski et al., J Am Chem Soc., 2008, 130(40):13186-13187)ならびにPP2C及びPYLDメインのABA(アブシジン酸)誘導二量化(Cutler et al., Annu Rev Plant Biol. 2010, 61:651-679)を含むがこれらに限定されない他の小分子依存性ヘテロ二量化ドメインも使用され得る。分割CARシステムの誘導性組み立て(例えば、リガンド依存性二量化)及び分解(例えば、脱安定化ドメイン誘導CAR分解)を使用する二重制御は、CAR改変T細胞の活性をコントロールするためにより高い柔軟性を提供し得る。

10

【0227】

切り替え可能なCAR

いくつかの実施形態では、本開示のCARは、切り替え可能なCARであり得る。Juillerat et al(Juillerat et al., Sci. Rep., 2016, 6:18950(その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる))は最近、刺激物(例えば、小分子)に反応して一過性にオンに切り替えられ得るコントロール可能なCARを報告した。このCAR設計において、システムは、CARにおける細胞膜ドメインからscFvドメインを分離するヒンジドメインに直接的に組み込まれる。そのようなシステムは、TCRのネイティブ構造の複雑性を模倣する、受容体複合体の異なる鎖内での活性化及び共刺激などのCARの異なる重要な機能を分割し、または組み合わせることが可能である。この組み込みシステムは、刺激物の非存在/存在によってコントロールされるオン/オフ状態間でscFvと抗原の相互作用を切り替え得る。

20

【0228】

可逆的CAR

他の実施形態では、本開示のCARは、可逆的CARシステムであり得る。このCAR構造では、LIDドメイン(リガンド誘導分解)が、CARシステムに組み込まれる。CARは、LIDドメインのリガンドを添加することによって一次的に下方制御され得る。LID及びDD媒介制御の組み合わせは、継続的に活性化したCAR T細胞の調整可能なコントロールを提供し、それによりCAR媒介組織毒性を低下させる。

30

【0229】

活性化条件付きCAR

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、活性化免疫細胞でのみ発現する活性化条件付きキメラ抗原受容体であり得る。CARの発現は、配列、例えば、CARの転写及び/または発現をそのコントロール下で誘導する1つまたはより多くの核酸配列を指す活性化条件付きコントロール領域と連携され得る。そのような活性化条件付きコントロール領域は、エフェクター免疫細胞の活性化中に上方制御される遺伝子のプロモーター、例えば、IL2プロモーターまたはNFAT結合部位であり得る。いくつかの実施形態では、免疫細胞の活性化は、構成的に発現したCARによって達成され得る(国際公開番号WO2016126608(その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる))。

40

【0230】

ポリヌクレオチド

エフェクターモジュール、それらのSRE及びペイロードを含む生体回路成分は、核酸ベースであり得る。用語「核酸」は、その最も広い意味で、ヌクレオチドのポリマー、例えば、連結されたヌクレオシドを含む任意の化合物及び/または物質を含む。これらのポ

50

リマーは、しばしばポリヌクレオチドと称される。本開示の例示的な核酸またはポリヌクレオチドには、リボ核酸（RNA）、デオキシリボ核酸（DNA）、トレオース核酸（TNA）、グリコール核酸（GNA）、ペプチド核酸（PNA）、ロック核酸（LNA、β-D-リボ構成を有するLNA、α-L-リボ構成を有するα-LNA（LNAのジアステレオマー）、2'-アミノ官能化を有する2'-アミノ-LNA、及び2'-アミノ官能化を有する2'-アミノ-α-LNAを含む）またはそれらのハイブリッドが含まれるがこれらに限定されない。

【0231】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、メッセンジャーRNA（mRNA）である。本明細書で使用される場合、用語「メッセンジャーRNA」（mRNA）は、対象となるポリペプチドをコードし、かつ対象となるコードされたポリペプチドを *in vitro*、*in vivo*、*in situ* または *ex vivo* で生成するために翻訳されることが可能である任意のポリヌクレオチドを指す。本開示のポリヌクレオチドは、mRNA または任意の核酸分子であり得、化学的に改変されていてもされていなくてもよい。

【0232】

伝統的には、mRNA分子の基本的成分には、少なくともコーディング領域、5' UTR、3' UTR、5' キャップ及びポリ-Aテールが含まれる。この野生型モジュール構造に基づいて、本開示は、モジュール機構を維持するが、ポリヌクレオチドに有用な特性、例えば、機能の防御可能性を付与する1つまたはより多くの構造的及び／または化学的改変または変化を含むペイロードを提供することによって伝統的なmRNA分子の機能性の範囲を拡大させる。本明細書で使用される場合、「構造的」特徴または改変は、ヌクレオチド自体に対する大きな化学的改変を伴わずに、ポリヌクレオチドに2つまたはより多くの連結されたヌクレオチドが挿入、欠失、複製、反転、またはランダム化されているものである。構造的改変を達成するためには化学的結合が必ず切断され、再形成されるので、構造的改変は、化学的特質のものであり、したがって化学的改変である。しかしながら、構造的改変は、異なるヌクレオチド配列をもたらす。例えば、ポリヌクレオチド「ATCG」は、「AT-5meC-G」に化学的に改変され得る。同じポリヌクレオチドは、「ATCG」から「ATCCCCG」に構造的に改変され得る。ここでは、ジヌクレオチド「CC」が挿入されており、ポリヌクレオチドの構造的改変をもたらす。

【0233】

いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、翻訳開始において役割を有する5' UTR配列を保有し得る。5' UTR配列は、特徴、例えば、リボソームが遺伝子の翻訳を開始するプロセスに関与することが一般的に知られているコザック配列を含み得、コザック配列は、コンセンサスXCCR（A/G）CCAUG（Rは、開始コドン（AUG）の3塩基上流のプリン（アデニンまたはグアニン）であり、Xは、任意のヌクレオチドである）を有する。一実施形態では、コザック配列は、ACCGCCである。標的細胞または組織の豊富に発現した遺伝子に典型的に見られる特徴を修飾することにより、本開示のポリヌクレオチドの安定性及びタンパク質生成が向上し得る。

【0234】

さらに、ポリヌクレオチドにおける5' キャップ構造の非存在下でタンパク質合成を開始させる重要な役割を果たす内部リボソーム侵入部位（IRES）を含有し得るポリヌクレオチドが提供される。IRESは、唯一のリボソーム結合部位として作用し得、または複数の結合部位の1つとして機能し得る。複数の機能的リボソーム結合部位を含有する本開示のポリヌクレオチドは、いくつかのペプチドまたはポリペプチドをコードし得、これらはリボソームによって独立して翻訳され、バイシストロン性及び／またはマルチシストロン性核酸分子を生じさせる。

【0235】

一実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、参照ポリペプチド配列と所定の同一性を有するバリエーションポリペプチドをコードし得る。本明細書で使用される場合、「参照ポリペプチド配列」は、開始ポリペプチド配列を指す。参照配列は、野生型配列または別の

10

20

30

40

50

配列の設計において参照される任意の配列であり得る。

【0236】

用語「同一性」は、当該技術分野で知られているように、配列を比較することによって決定される、2つまたはより多くの配列間の関連性を指す。当該技術分野において、同一性はまた、2つまたはより多くの残基（アミノ酸または核酸）のストリング間の一致の数によって決定される、配列間の配列関連性の程度を意味する。同一性は、特定の数学的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって対処されるギャップアライメント（存在する場合）を伴って2つまたはより多くの配列間の同一の一致の割合を測定する。関連する配列の同一性は、既知の方法によって容易に計算され得る。そのような方法には、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; 及び Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988) に記載されているものが含まれるがこれらに限定されない。

【0237】

いくつかの実施形態では、バリエーション配列は、参照配列と同じまたは類似する活性を有し得る。代替的には、バリエーションは、参照配列に対して変化した活性（例えば、増加したまたは低下した）を有し得る。通常、本開示の特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのバリエーションは、本明細書に記載される及び当業者に知られている配列アライメントプログラム及びパラメータによって決定される、その特定の参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドと少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%であるが100%未満の配列同一性を有する。アライメントのためのそのようなツールには、BLAST suite (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs', Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) のものが含まれる。

【0238】

ポリヌクレオチドに対する化学的改変

本開示によれば、用語「改変」または、適切な場合には、「改変」ポリヌクレオチドは、A、G、U（DNAではT）またはCヌクレオチドに関する改変を指す。

【0239】

本開示のポリヌクレオチドの改変は、ポリヌクレオチドを含むヌクレオシドのヌクレオシド塩基及び／または糖部分上のものであり得る。いくつかの実施形態では、複数の改変が、改変核酸または1つまたはより多くの個々のヌクレオシドもしくはヌクレオチドに含まれる。例えば、ヌクレオシドに対する改変は、核酸塩基及び糖に対する1つまたはより多くの改変を含み得る。本開示のポリヌクレオチドに対する改変は、例えば、国際公開WO 2013 052523（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されているもののいずれかを含み得る。

【0240】

本明細書で記載される場合、「ヌクレオシド」は、有機塩基（例えば、プリンまたはピリミジン）またはその誘導体（本明細書で「核酸塩基」とも称される）と組み合わせて糖分子（例えば、ペントースまたはリボース）またはその誘導体を含む化合物として定義される。本明細書で記載される場合、「ヌクレオチド」は、リン酸基を含むヌクレオシドとして定義される。

【0241】

ポリヌクレオチドに組み込まれ得る改変ヌクレオチドは、ヌクレオシド間連結（例えば、リン酸骨格）上で改変され得る。本明細書では、ポリヌクレオチド骨格の文脈において、語句「リン酸」及び「ホスホジエステル」は、互換的に使用される。リン酸基骨格は、酸素原子のうちの1つまたはより多くを異なる置換基に置き換えることによって改変され得る。さらに、改変ヌクレオチド及びヌクレオチドは、未改変リン酸部位の、別のヌクレオシド間連結での大量置き換えを含み得る。改変リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホノセロエート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホルアミデート、ホスホノジアミダイト、アルキルまたはアリールホスホネート、及びホスホトリエステルが含まれるがこれらに限定されない。ホスホロジチオエートは、両方の非連結酸素が硫黄によって置き換えられている。リン酸リンカーはまた、窒素（架橋ホスホルアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、及び炭素（架橋メチレン-ホスホネート）での連結酸素の置き換えによって改変され得る。使用され得る他の改変は、例えば、国際出願WO2013052523（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている。

【0242】

異なる糖改変、ヌクレオチド改変、及び／またはヌクレオシド間連結（例えば、骨格構造）は、ポリヌクレオチドにおける様々な位置に存在し得る。当業者は、ヌクレオチドアナログまたは他の改変（複数可）が、ポリヌクレオチドの機能が実質的に低下しないように、ポリヌクレオチドの任意の位置（複数可）に配置され得ることを理解する。改変はまた、5'または3'末端改変であり得る。ポリヌクレオチドは、約1%～約100%の改変ヌクレオチド（ヌクレオチド含有量全体に関する、またはヌクレオチドの1つまたはより多くのタイプ、すなわち、A、G、UもしくはCのうちの任意の1つまたはより多くに関する）または任意の介入割合（例えば、1%～20%、1%～25%、1%～50%、1%～60%、1%～70%、1%～80%、1%～90%、1%～95%、10%～20%、10%～25%、10%～50%、10%～60%、10%～70%、10%～80%、10%～90%、10%～95%、10%～100%、20%～25%、20%～50%、20%～60%、20%～70%、20%～80%、20%～90%、20%～95%、20%～100%、50%～60%、50%～70%、50%～80%、50%～90%、50%～95%、50%～100%、70%～80%、70%～90%、70%～95%、70%～100%、80%～90%、80%～95%、80%～100%、90%～95%、90%～100%、及び95%～100%）を含有し得る。

【0243】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドには、改変ピリミジンまたはプリンが含まれる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド分子におけるピリミジンまたはプリンは、約1%～約100%の改変ウラシルまたは改変ウリジン（例えば、1%～20%、1%～25%、1%～50%、1%～60%、1%～70%、1%～80%、1%～90%、1%～95%、10%～20%、10%～25%、10%～50%、10%～60%、10%～70%、10%～80%、10%～90%、10%～95%、10%～100%、20%～25%、20%～50%、20%～60%、20%～70%、20%～80%、20%～90%、20%～95%、20%～100%、50%～60%、50%～70%、50%～80%、50%～90%、50%～95%、50%～100%、70%～80%、70%～90%、70%～95%、70%～100%、80%～90%、80%～95%、80%～100%、90%～95%、90%～100%、及び95%～100%

の改変ピリミジンまたはプリン)で置き換えられ得る。

【0244】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、A B A B A BもしくはA A B B A A B B A A B BもしくはA B C A B C A B Cまたはそのバリエーションなどのパターンが1回、2回、または3回超繰り返された2つまたはより多くのエフェクターモジュール成分配列を含み得る。これらのパターンにおいて、各文字A、B、またはCは、異なるエフェクターモジュール成分を表す。

【0245】

さらに別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つまたはより多くの配列を有する各成分を有する2つまたはより多くのエフェクターモジュール成分配列を含み得る。非限定的な例として、配列は、領域の各々において1回、2回、または3回を超えて繰り返されるA B A B A BもしくはA A B B A A B B A A B BもしくはA B C A B C A B Cなどのパターンまたはそのバリエーションのものであり得る。別の非限定的な例として、配列は、ポリヌクレオチド全体にわたって1回、2回、または3回を超えて繰り返されるA B A B A BもしくはA A B B A A B B A A B BもしくはA B C A B C A B Cなどのパターンまたはそのバリエーションのものであり得る。これらのパターンにおいて、各文字A、B、またはCは、異なる配列または成分を表す。

【0246】

コドン選択

いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドの1つまたはより多くのコドンは、コドン選択と称されるプロセスを介して、SREの発現を調整するためにネイティブアミノ酸配列をコードする他のコドンで置き換えられ得る。mRNAコドン、及びtRNAアンチコドンプールは、生物、細胞タイプ、細胞内位置の間で及び経時的に変化する傾向があるため、本明細書に記載のコドン選択は、時空(ST)コドン選択である。

【0247】

本開示のいくつかの実施形態では、所定のポリヌクレオチド特徴は、コドン最適化され得る。コドン最適化は、ネイティブアミノ酸配列を維持しつつ、ネイティブ配列の少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、50またはそれより多くのコドンを、その宿主細胞の遺伝子において最も頻繁に使用されるコドンで置き換えることによって宿主細胞における発現の向上のための核酸配列を改変するプロセスを指す。コドン使用頻度は、参照遺伝子セットからのコーディングポリヌクレオチド配列の逸脱を測定するコドン適合指標(CAI)を使用して測定され得る。コドン使用頻度データベース(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)で利用可能であり、CAIは、EMBOSS CAIプログラム(<http://emboss.sourceforge.net/>)によって計算され得る。コドン最適化方法は、当該技術分野で知られており、いくつかの目標のうちの1つまたはより多くを達成するための取り組みにおいて有用であり得る。これらの目標には、標的生物と宿主生物のコドン頻度を一致させて適切なフォールディングを確保し、ヌクレオチド含有量にバイアスをかけて安定性を変更するか、または二次構造を低減し、遺伝子構築または遺伝子発現を損なう可能性のあるタンデムリピートコドンまたは塩基ランを最小化し、転写及び翻訳制御領域をカスタマイズし、タンパク質シグナル伝達配列を挿入または除去し、コードされたタンパク質の翻訳後修飾部位(例えば、グリコシル化部位)を除去/追加し、タンパク質ドメインを追加、除去またはシャッフルし、制限酵素部位を挿入または削除し、リボソーム結合部位及び分解部位を改変し、翻訳速度を調整してタンパク質の様々なドメインを適切にフォールディングするか、またはポリヌクレオチド内の問題のある二次構造を低減もしくは排除することを可能とすることが含まれる。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列またはその一部は、最適化アルゴリズムを使用してコドン最適化され得る。各アミノ酸のためのコドンオプションは、その特定の種における発現のために最適化するための様々な種の表にあるとおり、当該技術分野でよく知られている。

【0248】

本開示のいくつかの実施形態では、所定のポリヌクレオチド特徴は、コドン最適化され得る。例えば、コドン最適化のための好ましい領域は、ポリペプチドをコードする領域に対して上流（5'）または下流（3'）であり得る。これらの領域は、ペイロードをコードする領域またはオープンリーディングフレーム（ORF）のコドン最適化の前及び／または後にポリヌクレオチドに組み込まれ得る。

【0249】

最適化（所望の場合）の後、ポリヌクレオチド成分は、再構成され、ベクター、例えば、限定されないが、プラスミド、ウイルス、コスミド、及び人工染色体に転換される。

【0250】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの所定の領域は、コドン選択のために好ましい場合がある。例えば、コドン選択のための好ましい領域は、ポリペプチドをコードする一領域に対して上流（5'）または下流（3'）であり得る。これらの領域は、ペイロードをコードする領域またはオープンリーディングフレーム（ORF）のコドン選択の前及び／または後にポリヌクレオチドに組み込まれ得る。

【0251】

本開示のポリヌクレオチドの終止コドンは、本開示のSRE、ペイロード及びエフェクターモジュールの発現レベルを変化させるための配列及びモチーフを含むように改変され得る。そのような配列は、終止コドンリードスルーを誘導するために組み込まれ得、その場合、終止コドンは、アミノ酸、例えば、セレノシステインまたはピロリシンを指定し得る。他の例では、終止コドンは完全にスキップされて、別のオープンリーディングフレームを介する翻訳を再開し得る。終止コドンリードスルーは、特定の比（例えば、終止コドンの前後関係によって示される）でエフェクターモジュールの成分の発現を調整するために利用され得る。好ましい終止コドンモチーフの例には、UGAN、UAAN、及びUAGN（Nは、CまたはUである）が含まれる。

【0252】

伸長したカルボキシ末端を有する第2のタンパク質を生成する手段として多くのウイルスmRNAの翻訳中に終結の抑制が行われる。レトロウイルスにおいて、gag及びpol遺伝子は、単一のmRNAによってコードされ、アンバー終止コドンUAGによって分離される。アンバーコドンの翻訳抑制により、gag-pol前駆体の合成が可能となる。翻訳抑制は、終止コドンを認識し、特定のアミノ酸を挿入し得るサプレッサーtRNAによって媒介される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターモジュールは、アンバー終止コドンを組み込み得る。そのようなコドンは、バイシストロン性コンストラクトにおけるIRES及びp2A配列の代わりにまたはそれに加えて使用され得る。終止コドンリードスルーは、下流遺伝子（例えば、IL12）の低レベル発現を得るためにP2Aと組み合わせられ得る。いくつかの実施形態では、アンバー終止コドンは、さらなるコントロールのためにtRNA発現またはアミノアシルtRNA合成酵素と組み合わせられ得る。一態様では、ペイロードは、制御されたtRNA合成酵素であり得る。

【0253】

コンジュゲート

本開示の組成物は、1つまたはより多くの同種または異種分子と複合体化、コンジュゲート化または組み合わせられ得ることが本開示によって企図される。本明細書で使用される場合、用語「同種分子」は、開始分子に対して構造または機能の少なくとも1つが類似する分子を指すが、「異種分子」は、開始分子に対して構造または機能の少なくとも1つが異なるものを指す。そのため、構造ホモログは、実質的に構造的に類似し得る分子である。いくつかの実施形態では、そのようなホモログは、同一であり得る。機能性ホモログは、実質的に機能的に類似し得る分子である。いくつかの実施形態では、そのようなホモログは、同一であり得る。

【0254】

本開示の薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、コンジュゲートを含み得る。本開示のそのようなコ

ンジュゲートは、天然に存在する物質またはリガンド、例えば、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低比重リポタンパク質（LDL）、高比重リポタンパク質（HDL）、またはグロブリン）；炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリンまたはヒアルロン酸）；または脂質を含み得る。コンジュゲートはまた、組換えまたは合成分子、例えば、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）であり得る。ポリアミノ酸の例には、ポリリジン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ（L-ラクチド-コグリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、またはポリホスファジンが含まれ得る。ポリアミンの例には、ポリエチレンジイミン、ポリリジン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、陽イオン性脂質、陽イオン性ポリフィリン、ポリアミンの第4級塩、またはアルファラセン形ペプチドが含まれる。

【0255】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートはまた、標的化基を含み得る。本明細書で 사용되는場合、用語「標的化基」は、所望の領域、組織、細胞及び／またはタンパク質への薬剤の局在化を容易化する薬剤に結合した官能基または部位を指す。そのような標的化基には、細胞または組織標的化剤または基（例えば、特定の細胞タイプ、例えば、腎臓細胞または他の細胞タイプに結合するレクチン、糖タンパク質、脂質、タンパク質、抗体）が含まれ得るがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、標的化基は、

【0256】

メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質A、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパルテート、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビオチン、RGDペプチド、RGDペプチド模倣体またはアプタマーを含み得る。

【0257】

いくつかの実施形態では、標的化基は、タンパク質、例えば、糖タンパク質、またはペプチド、例えば、コ・リガンドに対する特定の親和性を有する分子、または抗体、例えば、特定の細胞タイプ、例えば、がん細胞、内皮細胞、もしくは骨細胞に結合する抗体であり得る。標的化基はまた、ホルモン及び／またはホルモン受容体を含み得る。

【0258】

いくつかの実施形態では、標的化基は、特定の受容体を標的とすることが可能な任意のリガンドであり得る。例には、限定されないが、葉酸、GalNAc、ガラクトース、マンノース、マンノース-6-ホスフェート、アプタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、PSMA、エンドセリン、GCP-II、ソマトスタチン、LDL、及びHDLリガンドが含まれる。いくつかの実施形態では、標的化基は、アプタマーである。そのようなアプタマーは、改変されていなくてもよく、または本明細書に開示される改変の任意の組み合わせを含み得る。

【0259】

なおも他の実施形態では、本開示の薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、細胞浸透性ポリペプチドに共有結合でコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、細胞浸透性ペプチドはまた、シグナル配列を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートは、増加した安定性、増加した細胞トランスフェクション及び／または変化した生体

内分布（例えば、特定の組織または細胞タイプに標的化される）を有するように設計され得る。

【0260】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート化部位が、本開示の薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）に加えられることで、それらは、クリアランスのための標的に対する検出可能な標識の結合が可能となる。そのような検出可能な標識には、ビオチン標識、ユビキチン、蛍光分子、ヒトインフルエンザ血球凝集素（HA）、c-myc、ヒスチジン（His）、フラッグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、V5（サルウイルス5エピトープのパラミクソウイルス）、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）及びジゴキシゲニンが含まれるがこれらに限定されない。

【0261】

いくつかの実施形態では、本開示の薬学的組成物、生体回路、生体回路成分、エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、互いにまたは疾患及び／または病態の処置における他の分子と組み合わせられ得る。

【0262】

追加のエフェクターモジュール特徴

本開示のエフェクターモジュールは、対象となるペイロードの分布を制御するシグナル配列、エフェクターモジュールコンストラクトからのペイロードの切断を容易化する切断及び／またはプロセッシング特徴、エフェクターモジュールの細胞局在化を制御し得る標的化及び／または浸透性シグナル、タグ、及び／またはエフェクターモジュールの異なる成分を連結させる1つまたはより多くのリンカー配列をさらに含み得る。

【0263】

いくつかの実施形態では、本開示の追加のエフェクターモジュール特徴は、限定されないが、表7に教示されているもののいずれかを含む。

【表7】

表7：エフェクターモジュール特徴

特徴	AA 配列	AA 配列 番号	NA 配列または 配列番号
EGFP	VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGD ATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSR YPDHMKQHDFKFSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT RAEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRD HMLLEFVTAAGITLGMDELYK	211128	211133
Flag タグ	DYKDDDDK	211129	211134
リンカー (GSGSG)	GSGSG	211130	211135
HA タグ	YPYDVPDYA	211131	211136
リンカー (GS)	GS	-	ggatcc
リンカー (GSLDG)	GSLDG	211132	211137

【0264】

シグナル配列

SRE及びペイロード領域に加えて、本開示のエフェクターモジュールは、1つまたはより多くの追加の特徴、例えば、1つまたはより多くのシグナル配列をさらに含み得る。

【0265】

シグナル配列（時にシグナルペプチド、標的化シグナル、標的ペプチド、局在化配列、輸送ペプチド、リーダー配列またはリーダーペプチドと称される）は、タンパク質（例えば、本開示のエフェクターモジュール）を、それらの指定された細胞位置及び／または細胞外位置に誘導する。タンパク質シグナル配列は、ほぼすべての分泌タンパク質及び多くの不可欠な膜タンパク質の標的化及び転移において中心的役割を果たす。

【0266】

シグナル配列は、特定の位置に向かう新たな合成されたタンパク質の大部分のN末端に存在する短い（5～30アミノ酸長）ペプチドである。シグナル配列は、シグナル認識粒子（SRP）によって認識され、I及びII型シグナルペプチダーゼを使用して切断され得る。ヒトタンパク質に由来するシグナル配列は、特定の細胞位置及び／または細胞外位置にエフェクターモジュールを誘導するためのエフェクターモジュールの制御性モジュールとして組み込まれ得る。これらのシグナル配列は、実験的に検証されており、切断され得る（Zhang Z. and Henzel W. J. ; ‘ ‘ Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. ’ ’ ; Protein Sci. 2004, 13:2819-2824）。

【0267】

いくつかの実施形態では、シグナル配列は、エフェクターモジュールのN末端またはC末端に配置され得るが、必ずしもそうである必要はなく、また、「成熟」ペイロードを生成するために所望のエフェクターモジュールから切断され得るが、必ずしもそうである必要はない。

【0268】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるシグナル配列は、シグナル配列のアミノ酸配列の位置1におけるメチオニンを除外し得る。これは、M1del変異と称され得る。

【0269】

分泌タンパク質に由来するものなどの天然に存在するシグナル配列に加えて、シグナル配列は、タンパク質の既知のシグナル配列から改変されたバリエーションであり得る。例えば、Sleepの米国特許番号：8,258,102及び9,133,265は、分泌シグナル及びタンパク質分泌を増加させ得る追加のX1-X2-X3-X4-X5モチーフを有する改変されたアルブミンシグナル配列を開示しており；Doの米国特許番号9,279,007は、タンパク質の発現及び分泌を向上させ得るヒト免疫グロブリン重鎖結合タンパク質（Bip）の改変された断片のシグナル配列を開示しており；Leonharttsbergerらの米国特許番号8,148,494は、組換えタンパク質と融合され得る切断部位を有するシグナルペプチドを開示しており；これらの各々の内容は、それらの全体が参照により組み込まれる。

【0270】

いくつかの例では、分泌されるシグナル配列は、サイトカインシグナル配列、例えば、限定されないが、IL2シグナル配列またはp40シグナル配列であり得る。

【0271】

いくつかの例では、対象となるペイロードを標的細胞の表面膜に誘導するシグナル配列が使用され得る。標的細胞の表面上のペイロードの発現は、ペイロードの非標的in vivo環境への拡散を制限するために有用であり、それによりペイロードの安全性プロファイルを潜在的に改善し得る。また、ペイロードの膜提示により、生理的かつ定量的シグナル伝達ならびにより長い半減期のためのペイロードの安定化及びリサイクルが可能となり得る。膜配列は、対象となるペイロードのN末端成分の内因性シグナル配列であり得る。任意に、この配列を異なるシグナル配列と交換することが所望であり得る。シグナル配列は、ペイロードがT細胞の表面上に提示されるように、対象となる細胞タイプの分泌経路とのそれらの適合性に基づいて選択され得る。いくつかの実施形態では、シグナル配列

10

20

30

40

50

は、I g Eシグナル配列、C D 8 aシグナル配列（C D 8 aリーダーとも称される）、またはI L 1 5 R aシグナル配列（I L 1 5 R aリーダーとも称される）またはM 1 d e l C D 8 aシグナル配列（M 1 d e l C D 8リーダー配列とも称される）であり得る。

【0272】

本エフェクターモジュールにおいて使用され得る他のシグナル配列バリエーションには、米国特許出願公開番号：2007/0141666；PCT特許出願公開番号：1993/018181（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）が含まれ得る。

【0273】

シグナル配列の他の例には、米国特許番号8,148,494；8,258,102；9,133,265；9,279,007；及び米国特許出願公開番号20070141666；及び国際特許出願公開番号WO1993018181（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）において論述される改変されたシグナル配列であり得るバリエーションが含まれる。

【0274】

他の例では、シグナル配列は、エフェクターモジュールを特定の細胞部位、例えば、核に誘導し得る、他の生物、例えば、ウイルス、酵母及び細菌からの異種シグナル配列であり得る（例えば、EP1209450）。他の例には、酵素などの融合タンパク質の分泌を増加させ得るトリコデルマからのアスパラギン酸プロテアーゼ（NSP24）シグナル配列（例えば、Cervin及びKimの米国特許番号8,093,016）、細菌リポタンパク質シグナル配列（例えば、Lau及びRiouxのPCT出願公開番号WO199109952）、E.coliエンテロトキシンIIシグナルペプチド（例えば、Kwonらの米国特許番号6,605,697）、E.coli分泌シグナル配列（例えば、Malleryらの米国特許公開番号US2016090404）、メチロトロフ酵母からのリパーゼシグナル配列（例えば、米国特許番号8,975,041）、及びCorynebacteriumに由来するDNアーゼのためのシグナルペプチド（例えば、米国特許番号4,965,197）（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）が含まれ得る。

【0275】

シグナル配列にはまた、核局在化シグナル（NLS）、核外搬出シグナル（NES）、極性細胞小管小胞構造局在化シグナル（例えば、米国特許番号8,993,742；Courret al., Nucleic Acids Res. 2003, 31(1):393-396（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）、細胞外局在化シグナル、細胞内位置（例えば、リソソーム、小胞体、ゴルジ、ミトコンドリア、細胞膜及びペルオキシソームなど）に対するシグナル（例えば、米国特許番号7,396,811；及びNegiet al., Database, 2015, 1-7（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）が含まれ得る。

【0276】

切断部位

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは、切断及び／またはプロセッシング特徴を含む。

【0277】

本開示のエフェクターモジュールは、少なくとも1つのタンパク質切断シグナル／部位を含み得る。タンパク質切断シグナル／部位は、N末端、C末端、N末端とC末端との間の任意のスペース、例えば、限定されないが、N末端とC末端との間の中途、N末端と中途点との間、中途点とC末端との間、及びそれらの組み合わせに配置され得る。

【0278】

エフェクターモジュールは、任意のプロテイナーゼの1つまたはより多くの切断シグナル（複数可）／部位（複数可）を含み得る。プロテイナーゼは、セリンプロテイナーゼ、

10

20

30

40

50

システインプロテイナーゼ、エンドペプチダーゼ、ジペプチダーゼ、メタロプロテイナーゼ、グルタミン酸プロテイナーゼ、トレオニンプロテイナーゼ及びアスパラギン酸プロテイナーゼであり得る。いくつかの態様では、切断部位は、フォーリン、アクチニダイン、カルパイン-1、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼP、カルボキシペプチダーゼY、カスパーゼ-1、カスパーゼ-2、カスパーゼ-3、カスパーゼ-4、カスパーゼ-5、カスパーゼ-6、カスパーゼ-7、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9、カスパーゼ-10、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンG、カテプシンH、カテプシンK、カテプシンL、カテプシンS、カテプシンV、クロストリパイン、キマーゼ、キモトリプシン、エラスターゼ、エンドプロテイナーゼ、エンテロキナーゼ、第Xa因子、ギ酸、グランザイムB、マトリックスメタロペプチダーゼ-2、マトリックスメタロペプチダーゼ-3、ペプシン、プロテイナーゼK、SUMOプロテアーゼ、サブチリシン、TEVプロテアーゼ、サーモリシン、トロンピン、トリプシン及びTAG Zymeのシグナル配列であり得る。

【0279】

タグ

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは、タンパク質タグを含む。

【0280】

タンパク質タグは、エフェクターモジュールのプロセスを検出し、モニターするために使用され得る。エフェクターモジュールは、1つまたはより多くのタグ、例えば、エピトープタグ（例えば、FLAGまたは血球凝集素（HA）タグ）を含み得る。多数のタンパク質タグが、本エフェクターモジュールのために使用され得る。それらには、自己標識ポリペプチドタグ（例えば、ハロアルカンデハロゲナーゼ（ハロタグ2またはハロタグ7）、ACPタグ、クリップタグ、MCPタグ、スナップタグ）、エピトープタグ（例えば、FLAG、HA、His、及びMyc）、蛍光タグ（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、及びそのバリエーション）、生物発光タグ（例えば、ルシフェラーゼ及びそのバリエーション）、親和性タグ（例えば、マルトース結合タンパク質（MBP）タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）タグ）、免疫原親和性タグ（例えば、プロテインA/G、IRS、AU1、AU5、glu-glu、KT3、S-タグ、HSV、VSV-G、Xpress及びV5）、及び他のタグ（例えば、ビオチン（小分子）、StreptTag（StreptII）、SBP、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（BCCP）、exact、CBP、CYD、HPC、CBDインテイン-キチン結合ドメイン、Trx、NorpA、及びNusAが含まれるがこれらに限定されない。

【0281】

他の実施形態では、タグはまた、米国特許番号8,999,897;8,357,511;7,094,568;5,011,912;4,851,341;及び4,703,004;米国特許出願公開番号US2013115635及びUS2013012687;ならびに国際出願公開番号WO2013091661（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるものから選択され得る。

【0282】

いくつかの態様では、多数のタンパク質タグ（同じまたは異なるタグ）が使用され得る;タグの各々は、同じNまたはC末端に配置され得る一方で、他の場合ではこれらのタグは、各末端に配置され得る。

【0283】

リンカー

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは、リンカーを含む。

【0284】

いくつかの実施形態では、本開示のエフェクターモジュールは、リンカー配列をさらに含み得る。リンカー領域は、主に、エフェクターモジュール内の2つまたはより多くのポリペプチド間のスペーサーとして機能する。「リンカー」または「スペーサー」は、本明

10

20

30

40

50

細書で使用される場合、2つの分子、または分子の2つの部分、例えば、組換えタンパク質の2つのドメインを接続する分子または分子の群を指す。

【0285】

いくつかの実施形態では、「リンカー」(L)または「リンカードメイン」または「リンカー領域」または「リンカーモジュール」または「ペプチドリンカー」は、本明細書で使用される場合、エフェクターモジュールのドメイン／領域のいずれかを互いに連結する、長さが約1～100アミノ酸のオリゴまたはポリペプチド領域を指す(ペプチドリンカーとも称される)。ペプチドリンカーは、長さが1～40アミノ酸、または長さが2～30アミノ酸、または長さが20～80アミノ酸、または長さが50～100アミノ酸であり得る。リンカー長はまた、利用されるペイロードのタイプに応じて、ペイロードの結晶構造に基づいて最適化され得る。いくつかの例では、より短いリンカー長が好ましくは選択され得る。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは、ペプチド結合によって互いに連結されたアミノ酸、好ましくはペプチド結合によって連結された1～20アミノ酸から構成され、アミノ酸は、20種の天然に存在するアミノ酸：グリシン(G)、アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、セリン(S)、システイン(C)、トレオニン(T)、メチオニン(M)、プロリン(P)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)、ヒスチジン(H)、リジン(K)、アルギニン(R)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、アスパラギン(N)、及びグルタミン(Q)から選択される。これらのアミノ酸の1つまたはより多くは、当業者によって理解されるように、グリコシル化され得る。

【0286】

リンカー配列は、マルチドメインタンパク質に由来する天然リンカーであり得る。天然リンカーは、タンパク質内の2つの異なるドメインまたはモチーフを分離する短いペプチド配列である。

【0287】

いくつかの態様では、リンカーは、柔軟性または硬質性であり得る。他の態様では、リンカーは、切断可能または非切断可能であり得る。本明細書で使用される場合、用語「切断可能リンカードメインまたは領域」または「切断可能ペプチドリンカー」は、互換的に使用される。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、酵素的及び／または化学的に切断され得る。

【0288】

本開示のリンカーはまた、非ペプチドリンカーであり得る。例えば、アルキルリンカー、例えば、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_a-\text{C}(\text{O})-$ ($a=2\sim 20$) が使用され得る。これらのアルキルリンカーは、任意の非立体障害基、例えば、低級アルキル(例えば、 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$)、低級アシル、ハロゲン(例えば、Cl、Br)、CN、 NH_2 、フェニルなどによってさらに置換され得る。

【0289】

標的化または浸透性ペプチド

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは、標的化及び／または浸透性ペプチドを含む。

【0290】

細胞表面マーカー(例えば、受容体、膜貫通タンパク質、及び細胞外マトリックス分子)を選択的に認識する小さな標的化及び／または浸透性ペプチドが、エフェクターモジュールを所望の器官、組織または細胞に対して標的化するために用いられ得る。in vitroで合成される短いペプチド(5～50アミノ酸残基)及び天然に存在するペプチド、またはそのアナログ、バリエーション、誘導体は、エフェクターモジュールを所望の器官、組織及び細胞、及び／または細胞の中の細胞内位置にホーミングさせるためにエフェクターモジュールに組み込まれ得る。

【0291】

いくつかの実施形態では、標的化配列及び／または浸透性ペプチドは、エフェクターモ

10

20

30

40

50

ジュールを標的器官、または組織、または細胞（例えば、がん細胞）に送るためにエフェクターモジュールに含まれ得る。他の実施形態では、標的化及び／または浸透性ペプチドは、エフェクターモジュールを細胞の中の特定の細胞内位置に誘導し得る。非限定的な例として、そのような標的化配列及び／または浸透性ペプチドには、エフェクターモジュールを中枢神経系の所望の領域（例えば、米国特許番号：9, 259, 432；米国出願公開番号：2015/259392）；または脂肪組織（例えば、米国特許番号：8, 067, 377及び8, 710, 017）；または前立腺（例えば、米国特許公開番号：2016/0046668）（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に対して標的化するためのものが含まれ得る。

【0292】

他の実施形態では、標的化及び／または浸透性ペプチドは、エフェクターモジュールを細胞の中の特定の細胞内位置に誘導し得る。非限定的な例として、ミトコンドリア標的化ペプチド及び／またはミトコンドリア膜浸透性ペプチドは、エフェクターモジュールを細胞のミトコンドリアに送るためにエフェクターモジュールに含まれ得る。例えば、米国特許番号：9, 260, 495；9, 173, 952及び9, 132, 198；ならびに米国出願公開番号：2015/361140（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0293】

標的化ペプチドは、約6～約30個（両端を含む）のアミノ酸の任意の数を有する。ペプチドは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個のアミノ酸を有し得る。通常、標的化ペプチドは、25個以下、例えば、20個またはそれ未満、例えば、15個またはそれ未満のアミノ酸を有し得る。

【0294】

特定の組織または細胞を認識する天然に存在する小さな標的化及び／または浸透性ペプチドは、細胞表面分子（例えば、受容体、膜貫通タンパク質）と高い親和性で結合し、これにより、それらは魅力的なトラフィッキング部位となる。そのようなペプチドには、微生物、昆虫（例えば、サソリ、ミツバチ、クモ）、動物（例えば、ヘビ）及び植物からのペプチド毒素、及びそのアナログ、バリエーション及び誘導体；ならびに分泌ペプチドホルモン、リガンド及びシグナルペプチドが含まれ得る。

【0295】

いくつかの態様では、それらの細胞傷害性活性を無効にする天然毒素由来のアナログ、バリエーション及び誘導体は、標的化ペプチドとして使用され得る。外毒素は、細菌によって分泌される毒素である。多くの外毒素は、特定の細胞分子に結合することが示されている。例えば、細菌生物から生成及び分泌されるタンパク質毒素の群であるエンテロトキシンは、腸壁の粘膜（上皮）細胞に結合する。エンテロトキシンには、*E. coli* 熱安定エンテロトキシン（ST）、コレラ毒素（CT）、*E. coli* 易熱性エンテロトキシン（LT）、*Bordetella pertussis* 由来百日咳毒素（PT）、*Pseudomonas aeruginosa* 外毒素A（ETA）、*Staphylococcus* エンテロトキシン、*Corynebacterium diphtheria* 由来ジフテリア毒素、ロタウイルスからのエンテロトキシンNSP4が含まれ得るがこれらに限定されない。他の外毒素には、神経系に影響を及ぼす神経毒、心臓に影響を及ぼす心臓毒素、シュドモナス外毒素、*Botulinum* 神経毒、志賀毒素、志賀様毒素1及び2、*Clostridium difficile* 毒素、*Clostridium perfringens* イプシロン毒素ならびに炭疽毒素が含まれる。

【0296】

外毒素に加えて、他の毒素には、植物から単離されるもの、例えば、トウモロコシ RIP、ゲロニン、ヨウシュ抗ウイルスタンパク質、サポリン、トリクサンチン、リシン、アブリン；サソリ、例えば、チャリブドトキシン；クモ、例えば、PcTx1；イモガイ、例えば、PcTx1；イソギンチャク、例えば、ギガントキシン1；ミツバチ、例えば、

10

20

30

40

50

ミツバチ *Apis mellifera* (西洋または欧州またはオオミツバチ)、*Apis florea* (小ミツバチまたはコミツバチ)、*Apis dorsata* (ジャイアントミツバチ) 及び *Apis cerana* (東洋ミツバチ) の毒から単離された水溶性、陽イオン性、両親媒性 26 アミノ酸アルファ-ラセン形ペプチドの群であるメリチン；ヘビ毒の毒素、胃管及び脳において g-タンパク質結合ガストリン放出ペプチド受容体 (例えば、BBR-1 / 2 / 3) と結合する、ヒキガエルの皮膚から元々単離されたボンベシンが含まれ得る。例えば、Suchanek, G., et al., PNAS (1978) 75:701-704 (その内容は、その全体が参照により組み込まれる) を参照されたい。

【0297】

ペプチドホルモン及び他のシグナルペプチドは、細胞から細胞へのコミュニケーションのための重要なメッセージを伝達し、これらは、高親和性でそれらの受容体を発現する細胞に選択的に結合する。いくつかの態様では、ペプチドホルモンは、エフェクターモジュールに含まれ得る。そのような小さなペプチドホルモン及びシグナルペプチドには、アディポネクチン、アジポーズ由来ホルモン、アグーチシグナル伝達ペプチド、アラスタチン、アミリン、アンジオテンシン、心房性ナトリウム利尿ペプチド、ボンベン様ペプチド、大ガストリン、ベータトロフィン、ブラジキニン、カルシトニン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、コシントロフィン、エンドセリン、エンテログルカゴン、FGF、FND C5、卵胞刺激ホルモン、ガストリン、グレリン、グルカゴン及びグルカゴン様ペプチド、ゴナドトロピン、顆粒球コロニー刺激因子、成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ヘプシジン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤性ラクトゲン、インクレチン、インスリン及びインスリンアナログ、インスリン様成長因子、レプチン、小ガストリン、リラグルチド、黄体形成ホルモン、メラノコルチン、ミニガストリン、アルファ-メラノサイト-刺激ホルモン、神経ペプチド Y、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン-3 / 4、NPHインスリン、オレキシン、オベスタチン、オステオカルシン、膵臓ホルモン、副甲状腺ホルモン、ペプチドホルモン、ペプチド YY、プロラクチン、プレプロホルモン、リラキシ、レニン、サルカトニン、ソマトスタチン (SST)、セクレチン、物質 P、シンカライド、硬骨類レプチン、テンポリン、テサモレリン、甲状腺刺激ホルモン、ウロコルチン、血管活性腸管ペプチド (VIP)、VGF ならびにビテロジェニンが含まれ得るがこれらに限定されない。

【0298】

標的化及び浸透性ペプチドはまた、修飾された生体模倣ペプチド及び／または化学的改変された小ペプチドであり得る。正常条件または罹患条件において特定の細胞及び組織を高い親和性及び選択性で標的とする特定のモチーフ及び配列を有する多数のペプチドが特定される。合成標的化ペプチドは、長さが最大で 30 アミノ酸であり得、またはそれより長い場合がある。標的化ペプチドは、通常、少なくとも約 5 アミノ酸を有するが、それより少ない、例えば、4 アミノ酸、または 3 アミノ酸を有し得る。通常、標的化ペプチドは、約 6 ~ 約 30 個 (両端を含む) のアミノ酸の任意の数を有する。ペプチドは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 または 30 個のアミノ酸を有し得る。通常、標的化ペプチドは、25 個またはそれ未満、例えば、20 個またはそれ未満、例えば、15 個またはそれ未満のアミノ酸を有し得る。

【0299】

キメラペプチドはまた、天然に存在するタンパク質及び人工アミノ酸配列からの融合アミノ酸を用いて合成され得る。

【0300】

刺激物

本開示の生体回路は、1 つまたはより多くの刺激物によって誘発される。刺激物には、リガンド、外部添加または内因性代謝産物、定義されたリガンドの存在もしくは非存在、1 つまたはより多くのエフェクターモジュールの存在もしくは作用、またはイオンもしくは

10

20

30

40

50

は生体分子の濃度勾配などが含まれる。

【0301】

リガンド

いくつかの実施形態では、刺激物は、リガンドである。リガンドは、核酸ベース、タンパク質ベース、脂質ベース、有機、無機または前述のものの任意の組み合わせであり得る。

【0302】

いくつかの実施形態では、リガンドは、限定されないが、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、脂質誘導体、ステロール、ステロイド、代謝産物、代謝産物誘導体、及び小分子であり得る。

【0303】

いくつかの実施形態では、刺激物は、小分子である。いくつかの実施形態では、小分子は、細胞浸透性である。いくつかの実施形態では、小分子は、FDA承認されており、安全であり、経口投与される。

【0304】

いくつかの実施形態では、リガンドは、カルボニックアンヒドラーゼに結合する。いくつかの実施形態では、リガンドは、カルボニックアンヒドラーゼ機能に結合し、それを阻害し、本明細書ではカルボニックアンヒドラーゼ阻害剤と称される。

【0305】

いくつかの実施形態では、リガンドは、カルボニックアンヒドラーゼ2に結合する小分子である。一実施形態では、小分子は、CA2阻害剤である。CA2阻害剤の例には、セレコキシブ（セレブレックスとも称される）、バルデコキシブ、ロフェコキシブ、アセタゾラミド、メタゾラミド、ドルゾラミド、プリンゾラミド、ジクロフェナミド、エトキシゾラミド、ゾニサミド、ダンシルアミド、及びジクロルフェナミドが含まれるがこれらに限定されない。

【0306】

いくつかの実施形態では、リガンドは、CA2への結合を媒介することが知られている小分子の部分を含み得る。リガンドはまた、CA2以外のカルボニックアンヒドラーゼへの標的外結合を減少させ、CA2への特異的結合を増加させるように改変され得る。

【0307】

リガンドはまた、構造活性関係性（SAR）研究を通して、その分子／化学的構造に対する既知のCA2リガンドの活性の依存性の分析から選択され得る。当該技術分野で知られているSARに関連する方法のいずれかは、本開示の安定化リガンドを特定するために利用され得る。SARは、リガンドの性質、例えば、特異性、効力、薬物動態、バイオアベイラビリティ、及び安全性を改善するために利用され得る。既知のCA2阻害剤のSAR分析はまた、リガンドと複合体化されたCA2の高分解能X線構造と組み合わせられ得る。

【0308】

一実施形態では、本開示の刺激物は、特定のDDまたはDD内の標的領域に結合することが可能なFDA承認されたリガンドであり得る。

【0309】

いくつかの実施形態では、SREの非存在下で、免疫細胞の活性、及び／またはキメラ抗原受容体に影響を及ぼさないリガンドが好ましく選択され得る。

【0310】

いくつかの実施形態では、2つまたはより多くのリガンドが、同じ刺激反応要素を安定化するために利用され得る。

【0311】

リガンドコンジュゲート

いくつかの実施形態では、リガンドは、限定されないが、別のリガンド、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、脂質誘導体、ステロール、ステロイド、代謝産物、代謝産物誘導体または小分子などの別の分子に複合体化または結合され得る。いくつかの実施形態では、リガンド刺激物は、1つまたはより多くの他の分子に複合体化または結合される。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態では、リガンド刺激物は、1つまたはより多くの異なる種類及び／または数の他の分子に複合体化または結合される。いくつかの実施形態では、リガンド刺激物は、同じ種類のリガンドの多量体である。いくつかの実施形態では、リガンド刺激物多量体は、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれより多くの単量体を含む。

【0312】

候補タンパク質に結合することが知られている小分子などのリガンドは、タンパク質反応におけるそれらの制御について試験され得る。小分子は、安全であることが臨床的に承認されている場合があり、適切な薬学的動態及び分布を有し得る。いくつかの実施形態では、刺激物は、脱安定化ドメイン（DD）のリガンド、例えば、脱安定化ドメインに結合し、脱安定化ドメインに融合されたPOIを安定化する小分子である。

10

【0313】

いくつかの実施形態では、刺激物は、小分子である。いくつかの実施形態では、小分子は、細胞浸透性である。

【0314】

埋め込まれた刺激物、シグナルまたは他の制御性部位

いくつかの実施形態では、本開示のエフェクターモジュールは、1つまたはより多くのマイクロRNA、マイクロRNA結合部位、プロモーター及び調整可能な要素をさらに含み得る。

【0315】

マイクロRNA

20

一実施形態では、マイクロRNAは、調整可能な生体回路の生成の補助下で使用され得る。各態様または調整されたモダリティは、異なって調整される特徴をエフェクターモジュールまたは生体回路にもたらし得る。例えば、脱安定化ドメインは、切断部位もしくは二量化特性またはペイロードの半減期を変化させ得、1つまたはより多くのマイクロRNAまたはマイクロRNA結合部位の包含は、細胞性脱標的化またはトラフィッキング特徴に影響を及ぼし得る。結果的に、本開示は、それらの防御可能性において多元的である生体回路を包含する。そのような生体回路及びエフェクターモジュールは、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれより多くの調整される特徴を含有するように修飾され得る。

【0316】

マイクロRNA（またはmiRNA）は、核酸分子の3'UTRに結合し、核酸分子安定性を低下させることによってまたは翻訳を阻害することによってのいずれかで遺伝子発現を下方制御する19〜25ヌクレオチド長ノンコーディングRNAである。本開示のポリヌクレオチドは、1つまたはより多くのマイクロRNA標的配列、マイクロRNA配列、またはマイクロRNAシードを含み得る。

30

【0317】

例えば、ポリヌクレオチドが肝臓に送達されることが意図されていないが、そこに行き着いた場合、そのときは肝臓に豊富に存在するマイクロRNAであるmiR-122は、miR-122の1つまたは複数の標的部位がポリヌクレオチド内に修飾されている場合にポリヌクレオチドの発現を阻害し得る。異なるマイクロRNAのための1つまたは複数の結合部位の導入は、ポリヌクレオチドの寿命、安定性、及びタンパク質翻訳をさらに減少させるように修飾され、これにより、刺激物選択、SRE設計及びペイロードバリエーションを超えて防御可能性の追加の層を提供し得る。

40

【0318】

本明細書で使用される場合、用語「マイクロRNA部位」は、マイクロRNA標的部位もしくはマイクロRNA認識部位、またはマイクロRNAが結合もしくは関連する任意のヌクレオチド配列を指す。「結合」は、伝統的なワトソン・クリックハイブリダイゼーションルールに従う場合があり、またはマイクロRNA部位におけるもしくはそれに隣接する標的配列とマイクロRNAとの任意の安定な関連を示す場合があることが理解されるべきである。

【0319】

50

逆に、本開示のポリヌクレオチドの目的のため、特定の組織におけるタンパク質発現を増加させるために、マイクロRNA結合部位は、天然に存在する配列から離れるように修飾され得る（すなわち、除去され得る）。例えば、miR-122結合部位は、肝臓におけるタンパク質発現を改善するために除去され得る。

【0320】

複数の組織における発現の制御は、導入もしくは除去または1つもしくはいくつかのマイクロRNA結合部位を介して達成され得る。

【0321】

具体的には、マイクロRNAは、免疫細胞（造血細胞とも称される）、例えば、抗原提示細胞（APC）（例えば、樹状細胞及びマクロファージ）、マクロファージ、単球、Bリンパ球、Tリンパ球、顆粒球、ナチュラルキラー細胞などで異なって発現することが知られている。免疫細胞特異的マイクロRNAは、免疫原性、自己免疫、感染に対する免疫反応、炎症、ならびに遺伝子療法及び組織／器官移植の後の不要な免疫反応に関与する。免疫細胞特異的マイクロRNAはまた、造血細胞（免疫細胞）の発生、増殖、分化及びアポトーシスの多くの態様を制御する。例えば、miR-142及びmiR-146は、免疫細胞において独占的に発現しており、特に骨髄樹状細胞において豊富である。本開示のポリペプチドの3'-UTRへのmiR-142結合部位の導入は、miR-142媒介mRNA分解を介して抗原提示細胞において遺伝子発現を選択的に抑制し得、プロフェッショナルAPC（例えば、樹状細胞）における抗原提示を制限し、それにより遺伝子送達後の抗原媒介免疫反応を防止する（Annoni A et al., blood, 2009, 114, 5152-5161（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。

【0322】

一実施形態では、免疫細胞、特に、抗原提示細胞において発現することが知られているマイクロRNA結合部位は、マイクロRNA媒介RNA分解を介してAPCにおけるポリヌクレオチドの発現を抑制するためにポリヌクレオチド内に修飾され、抗原媒介免疫反応を抑えることができ、その一方でポリヌクレオチドの発現は、免疫細胞特異的マイクロRNAが発現しない非免疫細胞で維持される。

【0323】

様々ながん細胞／組織及び他の疾患におけるマイクロRNAの差次的発現をプロファイル化するために多くのマイクロRNA発現研究が行われており、当該技術分野で記載されている。いくつかのマイクロRNAは、所定のがん細胞において異常に過剰に発現し、他のものは低く発現する。例えば、マイクロRNAは、がん細胞（WO2008/154098、US2013/0059015、US2013/0042333、WO2011/157294）；がん幹細胞（US2012/0053224）；膵臓癌及び疾患（US2009/0131348、US2011/0171646、US2010/0286232、US8389210）；喘息及び炎症（US8415096）；前立腺癌（US2013/0053264）；肝細胞癌（WO2012/151212、US2012/0329672、WO2008/054828、US8252538）；肺癌細胞（WO2011/076143、WO2013/033640、WO2009/070653、US2010/0323357）；皮膚T細胞リンパ腫（WO2013/011378）；大腸癌細胞（WO2011/0281756、WO2011/076142）；がん陽性リンパ節（WO2009/100430、US2009/0263803）；鼻咽腔癌（EP2112235）；慢性閉塞性肺疾患（US2012/0264626、US2013/0053263）；甲状腺癌（WO2013/066678）；卵巣癌細胞（US2012/0309645、WO2011/095623）；乳癌細胞（WO2008/154098、WO2007/081740、US2012/0214699）；白血病及びリンパ腫（WO2008/073915、US2009/0092974、US2012/0316081、US2012/0283310、WO2010/018563（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））において異

なって発現する。

【0324】

一実施形態では、マイクロRNAは、調整可能な生体回路の生成の補助下で本明細書に記載されているように使用され得る。

【0325】

いくつかの実施形態では、エフェクターモジュールは、1つまたはより多くのペイロード、SRE及び／または制御性配列、例えば、マイクロRNAまたはマイクロRNA結合部位を（DNAまたはRNAまたはmRNAとして）コードするように設計され得る。いくつかの実施形態では、コードされるペイロードまたはSREのいずれかは、変異によって安定化または脱安定化され、次いで1つまたはより多くの制御性配列と組み合わせられて、二重または多重調整されるエフェクターモジュールまたは生体回路システムを生成し得る。

10

【0326】

各態様または調整されたモダリティは、異なって調整される特徴をエフェクターモジュールまたは生体回路にもたらし得る。例えば、SREは、脱安定化ドメインを表し得るのに対し、タンパク質ペイロードにおける変異は、その切断部位または二量化特性または半減期を変化させ得、1つまたはより多くのマイクロRNAまたはマイクロRNA結合部位の包含は、細胞性標的化またはトラフィッキング特徴に影響を及ぼし得る。結果的に、本開示は、それらの防御可能性において多元的である生体回路を包含する。

【0327】

そのような生体回路は、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれより多くの調整される特徴を含有するように修飾され得る。

20

【0328】

プロモーター

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、プロモーターを含む。

【0329】

本明細書で使用される場合、プロモーターは、本開示のポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるのに必要される、細胞の転写機構によって認識されるDNA配列として定義される。ベクターは、本開示のポリヌクレオチドに機能可能に連結されたネイティブまたは非ネイティブプロモーターを含み得る。選択されるプロモーターは、強、弱、構成的、誘導性、組織特異的、発達段階特異的、及び／または生物特異的であり得る。好適なプロモーターの一例は、最初期サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、例えば、限定されないが、配列番号210476～210478である。このプロモーター配列は、それに機能可能に連結されたポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を作動させることが可能な強力な構成的プロモーター配列である。プロモーターの別の例は、伸長成長因子-1アルファ（EF-1アルファ）例えば、限定されないが、配列番号210479～210483である。サルウイルス40（SV40）、マウス乳房腫瘍ウイルス（MTV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、長い末端反復（LTR）、プロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターならびにホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター（非限定的な例には、配列番号210484～210491が含まれる）、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、ユビキチンC（UbC）プロモーター、ヒトU6小核タンパク質プロモーター及びクレアチンキナーゼプロモーターを含むがこれらに限定されないヒト遺伝子プロモーターを含むがこれらに限定されない他の構成的プロモーターも使用され得る。いくつかの例では、誘導性プロモーター、例えば、限定されないが、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリンプロモーターが使用され得る。

30

40

【0330】

いくつかの実施形態では、最適なプロモーターは、リガンドの非存在下での本開示のSRE及びペイロードの最小発現ならびにリガンドの存在下での検出可能な発現を達成する

50

その能力に基づいて選択され得る。

【0331】

追加のプロモーター要素、例えば、エンハンサーが、転写開始の頻度を制御するために使用され得る。そのような領域は、開始部位の10～100塩基対上流または下流に配置され得る。いくつかの例では、2つまたはより多くのプロモーター要素が、協働してまたは独立して転写を活性化するために使用され得る。

【0332】

いくつかの実施形態では、本開示のプロモーターは、Tet-ONプロモーターであり得る。転写制御TetシステムとDDとの組み合わせにより、遺伝子発現及びタンパク質安定性の同時コントロールが可能となる。Pedone et al. (2018) doi: <https://doi.org/10.1101/404699>によって記載される二重Tet-ON-DDシステムのいずれかが本開示において有用であり得る（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0333】

他の制御性特徴

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、任意のプロテアソームアダプターを含み得る。本明細書で使用される場合、用語「プロテアソームアダプター」は、付加されたペイロードを分解の標的とする任意のヌクレオチド／アミノ酸配列を指す。いくつかの態様では、アダプターは、ペイロードを分解の標的とし、それにより直接的にユビキチン化反応の必要性を回避する。プロテアソームアダプターは、ペイロードの基底発現を低下させるために脱安定化ドメインと併せて使用され得る。例示的なプロテアソームアダプターには、Rad23またはhHR23bのUBLドメイン、標的タンパク質RbとプロテアソームのS4サブユニットの両方に高親和性で結合し、直接的なプロテアソーム標的化を可能にし、ユビキチン化機構をバイパスするHPV E7; Rb及びプロテアソームサブユニットS6に結合するタンパク質ガンキリンが含まれる。

【0334】

例示的なエフェクターモジュールコンストラクト

本開示の生体回路は、対象となる少なくとも1つのペイロードに機能可能に連結され得るCA2（「CA2 SRE」と称される）に由来する少なくとも1つのSREを含み得る少なくとも1つのエフェクターモジュールを含み得る。これらのタイプの生体回路及びエフェクターモジュールは、「CA2生体回路」及び「CA2エフェクターモジュール」と称される。また、CA2エフェクターモジュールは、シグナル配列、リンカー、スペーサー、タグ、フラッグ、切断部位、及びIRESを含むがこれらに限定されない追加の特徴を含み得る。本明細書で教示されるまたは当該技術分野で知られている例示的なSRE（例えば、DD）、対象となるペイロード、シグナル配列、リンカー、スペーサー、タグ、フラッグ、切断部位、及びIRESのいずれかは、本開示のCA2エフェクターモジュールを生成するために組み合わせられ得る。

【0335】

対象となるペイロード

一実施形態では、CA2エフェクターモジュールは、対象となるペイロードを含む。対象となるペイロードは、野生型ポリペプチド、野生型ポリペプチドの断片であり、及び／または野生型ポリペプチドに対する1つまたはより多くの変異を含み得る。

【0336】

一実施形態では、CA2エフェクターモジュールは、制御されたインターロイキン-15（IL15）を生成する。

【0337】

一実施形態では、CA2エフェクターモジュールは、制御されたインターロイキン-15受容体サブユニットアルファ（IL15Ra）を生成する。

【0338】

一実施形態では、CA2エフェクターモジュールは、制御された蛍光タンパク質を生成

10

20

30

40

50

する。一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールにおける少なくとも1つのペイロードは、mCherryタンパク質である。一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールにおける少なくとも1つのペイロードは、ウミシイタケルシフェラーゼ野生型配列（配列番号210644によってコードされる配列番号210643）である。一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールにおける少なくとも1つのペイロードは、ウミシイタケルシフェラーゼ配列である。一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールにおける少なくとも1つのペイロードは、ホタルシフェラーゼ配列である。一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールにおける少なくとも1つのペイロードは、ホタルシフェラーゼ配列の一領域である。一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールにおける少なくとも1つのペイロードは、Aequorea coerulescens GFP (AcGFP) 配列である。一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールにおける少なくとも1つのペイロードは、AcGFP配列の一領域である。

10

【0339】

一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールは、制御されたCD19 scFVを生成する。C A 2 エフェクターモジュールは、別の親タンパク質からの膜貫通ドメイン及び／または細胞質性ドメインのペイロードならびにCD19 scFVペイロードを含み得る。一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールにおける少なくとも1つのペイロードは、野生型配列と比較して少なくとも1つの変異を含む。

【0340】

一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールは、制御されたCARを生成する。

20

【0341】

いくつかの態様では、本明細書に記載のペイロードは、キメラ抗原受容体と共発現され得る。

【0342】

一実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールは、制御されたインターロイキン-12 (IL12) を生成する。

【0343】

一実施形態では、エフェクターモジュールは、制御を生成する

【0344】

。

30

【0345】

本開示のC A 2 生体回路及び／またはC A 2 エフェクターモジュールは、1つの（モノシストロン性）または1つより多くの（マルチシストロン性）メッセージ（例えば、対象となるペイロード）が生成されることを意味するモノシストロン性またはマルチシストロン性であり得る。2つのメッセージが生成される場合、C A 2 生体回路またはC A 2 エフェクターモジュールは、バイシストロン性とみなされる。

【0346】

一実施形態では、本開示の少なくとも1つのC A 2 エフェクターモジュールは、モノシストロン性である。

【0347】

一実施形態では、本開示の少なくとも1つのC A 2 エフェクターモジュールは、マルチシストロン性である。

40

【0348】

一実施形態では、本開示の少なくとも1つのC A 2 エフェクターモジュールは、バイシストロン性である。

【0349】

一実施形態では、本開示のC A 2 生体回路は、モノシストロン性である。

【0350】

一実施形態では、本開示のC A 2 生体回路は、マルチシストロン性である。

【0351】

50

一実施形態では、本開示のCA2生体回路は、バイシストロン性である。

【0352】

CA2 GFPエフェクターモジュール

一実施形態では、CA2 DDは、融合コンストラクトのN末端またはC末端のいずれかにおいてリンカー配列を介してAcGFPに融合される。これらは、「CA2 GFPエフェクターモジュール」と称される。融合タンパク質の脱安定化及びリガンド依存性安定化特性は、ウエスタンブロッティング、及びFACSなどの方法によって評価され得る。GFPに融合されるCA2変異体の例が表8に提供されている。コンストラクトは、当該技術分野で知られている任意のベクター、例えば、限定されないが、pLVX. IRES. Pur oベクターにクローニングされ得る。表8において、アスタリスクは、終止コドンの翻訳を示している。

【表8-1】

表8：CA2 GFPコンストラクト

記	配列	AA 配列 番号	NA 配列 番号
リンカー (GSG) (BamH1-Gly)	GSG	-	GGATC CGGT
リンカー (GS) (BamH1)	GS	-	GGATC C
リンカー (SLDG)	SLDG	210667	210668 ; 210669
P2A 切断部位	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	208337	208338
OT-001986 (AcGFP (WT の1~239); リンカー (GSG) (BamH1- Gly); CA2 (WT のaa2~ 260); 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAIITHGMDELYKSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDF PIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFH WGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGK	210670	210671

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

	AVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDISIKTK GKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNW RPAQPLKNRQIKASF*		
OT-001987 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GS) (BamH1) ; CA2 (WT の aa2~260) ; リ ンカー (SLDG) ; P2A 切断部位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQUERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQONT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMHYFGFV TAAAIHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL NNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDISIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRP AQPLKNRQIKASFSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTGGPLPAWDILSPQFMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*	210672	210673
OT-001515 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GS) (BamH1) ; CA2 (WT の aa2~260, W208S) ; リン カー (SLDG) ; P2A 切断部位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQUERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQONT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMHYFGFV TAAAIHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL NNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQKVVDVLDISIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTSI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRP AQPLKNRQIKASFSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTGGPLPAWDILSPQFMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*	210674	210675
OT-001976 (AcGFP (WT	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP	210676	210677

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

の 1~239) ; リンカー (GS) (BamH1) ; CA2 (WT の aa2~260, Y51N) ; リン カー (SLDG) ; P2A 切断部位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAIITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSNDQATSLRIL NNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDISIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLITPPLLECWTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNAGEPEELMVDNWRP AQPLKNRQIKASFSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIHKFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTGGPLPFAWDILSPQFMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*		
OT-001977 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GS) (BamH1) ; CA2 (WT の aa2~260, S56N) ; リン カー (SLDG) ; P2A 切断部位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTILKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAIITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATNLRIL NNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDISIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLITPPLLECWTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNAGEPEELMVDNWRP AQPLKNRQIKASFSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIHKFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTGGPLPFAWDILSPQFMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*	210678	210679
OT-001978 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GS) (BamH1) ; CA2 (WT の aa2~260, D72F, V241F,	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTILKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAIITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL	210680	210681

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

P249L) ; リンカー (SLDG) ; P2A 切断部位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	NNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPLQKVVDVLDsIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMFDNWRP AQLLKNRQIKASFKSLDGATNfSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIIEFMRfKVHMEGSVNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTKGGLPFAWDILSPQfMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGfKWERMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEfIYKVKLRGTNfPSDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDTSHNEDYTIveQYERAE GRHSTGGMDelyK*		
OT-001979 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GS) (BamH1) ; CA2 (WT の aa2~260, D71L, T87N, L250R) ; リンカー (SLDG) ; P2A 切断部位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKfSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVCfSRYp DHMKQHDFfKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNyNAHN VYIMTDKAKNGIKVNfKIRHNIEDGSVQLADHYQqNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDpNEKRdHMIYfGFV TAAAIthGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDThTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL NNGHAFNVEFLDSQDKAVLKGGLDGNyRLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPLQKVVDVLDsIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRP AQPRKNRQIKASFKSLDGATNfSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIIEFMRfKVHMEGSVNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTKGGLPFAWDILSPQfMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGfKWERMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEfIYKVKLRGTNfPSDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDTSHNEDYTIveQYERAE GRHSTGGMDelyK*	210682	210683
OT-001980 (AcGFP (WT の 1~239) ; CA2 (WT の aa2~260, L183S) ; P2A 切断部位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKfSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVCfSRYp DHMKQHDFfKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNyNAHN VYIMTDKAKNGIKVNfKIRHNIEDGSVQLADHYQqNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDpNEKRdHMIYfGFV TAAAIthGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDThTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL NNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTyrLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPLQKVVDVLDsIKTKG KSADFTNFDPRGSLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRP AQPLKNRQIKASFKSLDGATNfSLLKQAGDVEENPGPL	210684	210685

10

20

30

40

【表 8 - 5】

	SKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*		
OT-001681 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GSG) (BamH1- Gly) ; CA2 (WT の aa2~ 260, E106D, C205S) ; リン カー (SLDG) ; P2A 切断部位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGVSQADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDMHYFGFV TAAAIHGMDELYKSGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDF PIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFH WGSLDGGQSDHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFG KAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPLQKVVDVLDSEIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESV TWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDN WRPAQLKNRQIKASFSLDGATNFSLLKQAGDVEEN PGPLSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEG EGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYG SKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVV TVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMG WEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVK TTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYER AEGRHSTGGMDELYK*	210686	210687
OT-001682 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GSG) (BamH1- Gly) ; CA2 (WT の aa2~ 260, C205S, W208S) ; リン カー (SLDG) ; P2A 切断部位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGVSQADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDMHYFGFV TAAAIHGMDELYKSGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDF PIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFH WGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGK AVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPLQKVVDVLDSEIKTK GKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESVT SIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWR PAQPLKNRQIKASFSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGP LSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT	210688	210689

10

20

30

40

【表 8 - 6】

	YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*		
OT-001570 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GSG) (BamH1- Gly) ; CA2 (WT の aa2~ 260, C205S) ; P2A 切断部 位 ; mCherry (M1L) ; 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVS GEGEDA TYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCF SRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMYIFGV TAAAI THGMDELYKSGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDF PIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGTYRLIQFHFH WGSLDGQGESEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGK AVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTK GKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNW RPAQPLKNRQIKASFSLDGATNFSLLKQAGDVEENPG PLSKGEEDNMAHKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEG EGRPYEGTQTAKLKVTGGPLPAWDILSPQFMYGSK AYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVT V TQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSPDGPVMQKKT MGW EASSERMPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*	210690	210691
OT-002006 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GSG) ; CA2 (WT の aa2~ 260, G63D, E69V, N231I) ; 終止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVS GEGEDA TYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCF SRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMYIFGV TAAAI THGMDELYKSGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDF PIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNDHAFNVVFDSDQKAVLKGGLDGTYRLIQFHFH WGSLDGQGESEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGK AVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTK GKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEPEELMVDNWR PAQPLKNRQIKASF*	210853	210854
OT-002001 (AcGFP (WT の 1~239) ; リンカー (GSG) ; CA2 (WT の aa2~ 260, F20L, K45N, G104R, A116V) ; 終 止)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVS GEGEDA TYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCF SRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEV KFEGDTLVNRIELTGDFKEDGNILGNKMEYNNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMYIFGV TAAAI THGMDELYKSGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDL PIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGTYRLIQFHFH WGSLDGQRSEHTVDKKKYAVELHLVHWNTKYGDFGK AVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTK	210855	210856

【表 8 - 7】

	GKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNW RPAQPLKNRQIKASF*		
--	---	--	--

【 0 3 5 3 】

GFPに融合されるCA2変異体の追加の例が表9に提供されている。コンストラクトは、当該技術分野で知られている任意のベクター、例えば、限定されないが、pLVX、IRES、Puroベクターにクローニングされ得る。

10

20

30

40

50

【表 9 - 1】

表 9 : CA2 GFP コンストラクト

コンストラクト名	コンストラクト ID	記	AA 配列	AA 配列番号	NA 配列番号
OT-CA2-006	OT-002823	AcGFP (Met 開始) - リンカー (GSG) - CA2 (M1del, E106D) - IRES - Puro	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKSGSGSHHWGYGKHNG PEHWHKDFPIAKGERQSPVDI DTHTAKYDPSLKPLSVSYDQA TSLRILNNGHAFNVEFDDSQD KAVLKGGPLDGTyrLIQFHFH WGSLDGQGS DHTVDK KKYAA ELHLVHWNTKYGDFGKAVQQ PDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQ KVVDVLD SIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTT PPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFN GEGEPEELMVD NWRPAQPLKNRQIKASF K**S R*YDSLEIPPLSLPPP*RYWPKP LGIRPVCVCLYVIFHHIAVFWQ CEGPETWPCLLDEHS*GSFPSR QRNARSVECREGSSSSGSFLK TNNVCS DPLQAAEPPTWRQVP LRPKATCIRYTCKGGTTPVPRC ELDS CGKSQ MALLKRIQQGAE GCPEGTPLYGI*SGASVHMLY MCLVEVKKTSRPPEPRGRGFP LKNTMISLPQPTRRRPSMTEY KPTVRLATRDDVPRAVRTLAA AFADYPATRHTVDPDRHIERVT ELQELFLTRVGLDIGKVWVAD	211040 ; 211138 ; 211139 ; 211140 ; 211141	211076

10

20

30

40

【表 9 - 2】

			DGAHAVVWTTPESEAGAVFA EIGPRMAELSGSRLAAQQQME GLLAPHRPKEPAWFLATVGVS PDHQGKGLGSADVLPGEAAE RAGVPAFLETSA PRNLPFYERL GFTVTADVEVPEGPRWCMTR KPGA*		
OT-CA2-029	OT-001994	AcGFP - リンカー (GSG) - CA2 (M1del, I59N, G102R)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKSGSHHWGYGKHNG PEHWHKDFPIAKGERQSPVDI DTHTAKYDPSLKPLSVSYDQA TSLRNLNNGHAFNVEFDDSQD KAVLKGGLDGT YRLIQFHFH WGSLDRQGSEHTVDKKKYAA ELHLVHWNTKYGDFGKAVQQ PDGLAVLGIFLKVGSAPGLQ KVVDVLDSIKTKGSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTT PPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNGEPEELMVD NWRPAQPLKNRQIKASF*	211041	211077
OT-CA2-031	OT-002005	AcGFP - リンカー (GSG) - CA2 (M1del, L197P)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKSGSHHWGYGKHNG PEHWHKDFPIAKGERQSPVDI DTHTAKYDPSLKPLSVSYDQA TSLRILNNGHAFNVEFDDSQD KAVLKGGLDGT YRLIQFHFH WGSLDQGSEHTVDKKKYAA	211042	211078

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

			ELHLVHWNTKYGDFGKAVQQ PDGLAVLGIFLKVGSAKPGLO KVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSPIT PPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNGEPEELMVD NWRPAQPLKNRQIKASF*		
OT-CA2-032	OT-002004	AcGFP - リン カー (GSG) - CA2 (M1del, L156H, S172C, F178Y, E186D)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAAATHG MDELYKSGSHHWGYGKHNG PEHWHKDFPIAKGERQSPVDI DTHTAKYDPSLKPLSVSYDQA TSLRILNNGHAFNVEFDDSD KAVLKGGPLDGTYRLIQFHFH WGSLDGQGEHTVDKKKYAA ELHLVHWNTKYGDFGKAVQQ PDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQ KVVDVLDSIKTKGKCADFTNY DPRGLLPESLDYWTYPGSLTT PPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNGEPEELMVD NWRPAQPLKNRQIKASF*	211043	211079
OT-CA2-033	OT-002003	AcGFP - リン カー (GSG) - CA2 (M1del, L156H)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAAATHG MDELYKSGSHHWGYGKHNG PEHWHKDFPIAKGERQSPVDI DTHTAKYDPSLKPLSVSYDQA TSLRILNNGHAFNVEFDDSD KAVLKGGPLDGTYRLIQFHFH WGSLDGQGEHTVDKKKYAA	211044	211080

10

20

30

40

50

【表 9 - 4】

			ELHLVHWNTKYGDFGKAVQQ PDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQ KVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTT PPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNNGEPEELMVD NWRPAQPLKNRQIKASF*		
OT-CA2-034	OT-002002	AcGFP - リンカー (GSG) - CA2 (M1del, R27L, T87L, H122Y, N252D)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAAATHG MDELYKGSGSHHWGYGKHNG PEHWHKDFPIAKGELQSPVDI DTHTAKYDPSLKPLSVSYDQA TSLRILNNGHAFNVEFDDSDQ KAVLKGGLDGIYRLIQFHFH WGSLDGQGSEHTVDKKKYAA ELHLVYWNTKYGDFGKAVQQ PDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQ KVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTT PPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNNGEPEELMVD NWRPAQPLKDRQIKASF*	211045	211081
OT-CA2-038	OT-002187	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (I59N) - リンカー (SLDG) - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDI THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRNLNNGHAFNVEFDDSDQK AVLKGGLDGIYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE	211046	211082

10

20

30

40

50

【表 9 - 5】

			LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKGLQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNAGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2-039	OT-002188	AcGFP - リンカー(GS) - CA2 (G63D) - リンカー (SLDG) - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSSEGEEDATYTKL TLKFICTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNDHAFNVEFDDSDQK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKGLQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNAGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY	211047	211083

10

20

30

40

50

【表 9 - 6】

			LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2-046	OT-002490	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, H122Y) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSDK AVLKGGLDGTyrLIQHFHFW GSLDGQSEHTVDKKKYAAE LHLVYWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGKQ VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLEC VTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIKEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*	211048	211084
OT-CA2-058	OT-002828	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del,	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL	211049	211085

10

20

30

40

50

【表 9 - 7】

		G63D, M240L) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNDHAFNVEFDDSDQK AVLKGGLDGTyrLIQFHFHW GSLDGQGEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAPGLQK VVDVLSIKTKGSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEPEELLVDNW RPAQPLKNRQIKASFSLDGAT NFSLLKQAGDVEENPGPLSKG EEDNMAIIEFMRFKVHMEGS VNGHEFEIEGEGGRPYEGTQ TAKLKVTGGPLPAWDILSP QFMYGSKAYVKHPADIPDYLK LSFPEGFKWERVMNFEDGGVV TVTQDSSLQDGEFIYKVKLRG TNFPSDGPVMQKKTMGWEAS SERMYPEDGALKGEIKQRLKL KDGGHYDAEVKTTYKAKKPV QLPGAYNVNIKLDITSHNEDY TIVEQYERAEGRHSTGGMDEL YK*		
OT-CA2-059	OT-002829	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, A77I, P249F) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSDQKI	211050	211086

10

20

30

40

【表 9 - 8】

			VLKGGPLDGTyrLIQFHFHWG SLDGQGSEHTVDKKKYAAEL HLVHWNTKYGDFGKAVQQPD GLAVLGIFLKVGSAPGLQKV VDVLDsIKTKGKSADFTNFDp RGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLK FRKLNfNGEGEPEELMVDNW RPAQFLKNRQIKASFKSLDGAT NFSLLKQAGDVEENPGPLSKG EEDNMAIIEFMRFKVHMEGS VNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQ TAKLKVTGGGPLFAWDILSP QFMYGSKAYVKHPADIPDYLK LSFPEGFKWERVMNFEDGGVV TVTQDSSLQDGEFIYKVKLRG TNFPSDGPVMQKKTMGWEAS SERMPEDGALKGEIKQRLKL KDGGHYDAEVKTTYKAKKPV QLPGAYNVNIKLDITSHNEDY TIVEQYERAEGRHSTGGMDEL YK*		
OT-CA2-060	OT-002830	AcGFP - CA2 (M1del, D71K, T192F) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDFE KSAMPEGYIQUERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFKDSQDK AVLKGGPLDGTyrLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAPGLQK VVDVLDsIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWFYPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNfNGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFKSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG	211051	211087

10

20

30

40

【表 9 - 9】

			TQTAKLKVTKGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2- 070	OT- 002347	HA タグ - リ ンカー (GS) - CA2 (M1del, L156H) - リ ンカー (GSGSG) - Flag タグ - EGFP - リン カー (GS) - リンカー (GSLDG) - P2A - mCherry	MYPYDVPDYAGSSHHWGYGK HNGPEHWHKDFPIAKGERQSP VDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRLNNGHAFNVEFDD SQDKAVLKGGPLDGTyrLIQF HFHWGSLDGQGEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSACP GHQKVVDVLDSIKTKGKSADF TNFDPRGLLPESLDYWTYPGS LTPPLLECVTWIVLKEPISVSS EQVLKFRKLNFGEGEPEELM VDNWRPAQPLKNRQIKASFKE SGSGDYKDDDDKVSKGEELFT GVVPILVELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATYGKLTILKFICTTG KLPVPWPTLVTTLTYGVQCFS RYPDHMKQHDFFKSAMPEGY VQERTIFFKDDGNYKTRADEVK FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGN ILGHKLEYNYNshNVYIMADK QKNGIKVNFKIRHNIEDGGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDN HYLSTQSKLSDPNEKRDM VLLEFVTAAGITLGMDELYKG SGSLDGATNFSLLKQAGDVEE NPGPLSKGEEDNMAIIEFMR FKVHMEGSVNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTKGGPLP FAWDILSPQFMYGSKAYVKHP ADIPDYLKLSFPEGFKWERVM NFEDGGVVTVTQDSSLQDGEF IYKVKLRGTNFPDGPVMQKK TMGWEASSERMYPEDGALKG EIKQRLKLKDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDI TSHNEDYTIVEQYERAEGRHS TGGMDELYK*	211052	211088

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 0】

OT-CA2-073	OT-002832	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, R27L, H122Y) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVAAAITHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGELQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGLDGTyrLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVYWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAPGLQK VVDVLDSIKTKGSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAHKEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*	211053	211089
OT-CA2-075	OT-002834	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, T87I, H122Y) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVAAAITHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP	211054	211090

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 1】

			EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGIYRLIQHFHFW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAE LHLVYWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGLOK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNNGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2-077	OT-002836	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, H122Y, N252D) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTIRLIQHFHFW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAE LHLVYWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGLOK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNNGEGEPEELMVDN WRPAQPLKDRQIKASFSLDG	211055	211091

10

20

30

40

【表 9 - 1 2】

			ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTKGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2- 078	OT- 002939	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (M1del, D72F, V241F) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVIAAAITHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDFSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPLQK VVDVLDSEIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNNGEGEPEELMFDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTKGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE	211056	211092

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 3】

			DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2- 079	OT- 002837	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (M1del, V241F, P249L) - リン カー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDFD KSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSDQK AVLKGGLDGTYRLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAPGLQK VVDVLDISKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEPEELMFDN WRPAQLLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*	211057	211093
OT-CA2- 080	OT- 002838	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (M1del, D72F, P249L) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDFD KSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH	211058	211094

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 4】

			NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEDFSQDK AVLKGGPLDGTyrLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAPGLQK VVDVLDSIKTKGSADFTNFD PRGLLPESLDYWTPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEPEELMVDN WRPAQLLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAHKEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGRPyEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPSDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2-081	OT-002839	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, D71L, T87N) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGDATYgKL TLKFICTGKLVPWPVLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDFE KSAMPEGYIQERTIFFEDDgNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNyNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFLDSQDK AVLKGGPLDGNrLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAPGLQK VVDVLDSIKTKGSADFTNFD	211059	211095

10

20

30

40

50

【表 9 - 15】

			PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNAGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2-082	OT-002840	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, D71L, L250R) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSSEGEEDATYGKL TLKFICTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFLDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGIQQ VVDVLDSIKTKGSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNAGEPEELMVDN WRPAQPRKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE	211060	211096

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 6】

			ASSERMPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2- 085	OT- 002349	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (Y51T) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSTDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWG SLDGQGEHTVDKKKYAAEL HLVHWNTKYGDFGKAVQQPD GLAVLGIFLKVGSAPGLQKV VDVLDSIKTKGSADFTNFD RGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLK FRKLNFNGEPEELMVDNW RPAQPLKNRQIKASFSLDGAT NFSLLKQAGDVEENPGPLSKG EEDNMAIIEFMRFKVHMEGS VNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQ TAKLKVTGGPLPFAWDILSP QFMYGSKAYVKHPADIPDYLK LSFPEGFKWERVMNFEDGGVV TVTQDSSLQDGEFIYKVKL TNFSDGPVMQKKTMGWEAS SERMPEDGALKGEIKQRLKL KDGGHYDAEVKTTYKAKKPV QLPGAYNVNIKLDITSHNEDY TIVEQYERAEGRHSTGGMDEL YK*	211061	211097
OT-CA2- 086	OT- 002350	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (S73N, R89F) - リン カー (SLDG)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT	211062	211098

10

20

30

40

50

【表 9 - 17】

		- P2A - mCherry	DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALS KDP NEKRDHMIYFGFVAAAITHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDNQDK AVLKGGLDGTYFLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPG LQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASF KSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTKGGLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2- 087	OT- 002543	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (D72F, P249F) - リン カー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALS KDP NEKRDHMIYFGFVAAAITHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDFSQDK AVLKGGLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP	211063	211099

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 8】

			DGLAVLGIFLKVGSAKPLQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEPEPEELMVDN WRPAQFLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KKLDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2-088	OT-002544	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (T55K, G63N, Q248N) - リ ンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAK SLRILNNNHAFNVEFDDSQDK AVLKGGLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPLQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEPEPEELMVDN WRPANPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG	211064	211100

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 9】

			VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFSPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2-089	OT-002545	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (Y193I) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQUERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSDK AVLKGGLDGTYRLIQHFHFW GSLDGQSGEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGKQ VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTIPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNAGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIKEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFSPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*	211065	211101
OT-CA2-090	OT-002351	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (S56F) - リンカー	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF	211066	211102

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 0】

		(SLDG) - P2A - mCherry	KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSNDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT FLRILNNGHAFNVEFDDSDK AVLKGGLDGTYRLIQFHFHW GSLDGGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAPGLQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2- 091	OT- 002520	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (S56F, D71S) - リン カー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSNDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT FLRILNNGHAFNVEFSDSDK AVLKGGLDGTYRLIQFHFHW	211067	211103

10

20

30

40

【表 9 - 2 1】

			GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNAGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFKSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTKGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2-092	OT-002546	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (S73N, R89Y) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDFP KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDNQDK AVLKGGPLDGTYYLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGQLQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNAGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFKSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTKGGPLPFAWDIL	211068	211104

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 2】

			SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPSDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2-093	OT-002547	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (V134F, L228F) - リン カー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQUERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVIAAAITHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSDQK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAFQQP DGLAVLGIFLKVGSAPGLQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKFNFNGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFKSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPSDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*	211069	211105

10

20

30

40

【表 9 - 2 3】

OT-CA2-096	OT-003182	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, L156H, A256del, S257del, F258del, K259del) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSDQK AVLKGGPLDGTyrLIQFHFHW GSLDGGQSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGHQK VVDVLDSIKTKGSADFTNFD PRGLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEPEPEELMVDN WRPAQLKNRQIKSLDGATNF SLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIEFMRFKVHMEGSVN GHEFEIEGEGRPRPYEGTQTA KLKVTGGPLPFAWDILSPQF MYGSKAYVKHPADIPDYLKLS FPEGFKWERVMNFEDGGVVT VTQDSSLQDGEFIYKVKLRGT NFPSDGPVMQKKTMGWEASS ERMYPEDGALKGEIKQRLKLLK DGGHYDAEVKTTYKAKKPVQ LPGAYNVNIKLDITSHNEDYTI VEQYERAEGRHSTGGMDELY K*	211070	211106
OT-CA2-097	OT-003183	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, S2del, H3del, H4del, W5del, L156H) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKSGYGKHNGPEHWH	211071	211107

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 4】

			KDFPIAKGERQSPVDIDHTAK YDPSLKPLSVSYDQATSLRILN NGHAFNVEFDDSDQKAVLKG GPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVH WNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGHQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLP ESLDYWTYPGSLTTPPLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPL KNRQIKASFSLDGATNFSLLK QAGDVEENPGPLSKGEEDNM AIIKEFMRFKVHMEGSVNGHE FEIEGEGEGRPYEGTQTAKLK VTKGGPLPAWDILSPQFMYG SKAYVKHPADIPDYLKLSFPEG FKWERVMNFEDGGVVTVTQD SSLQDGEFIYKVKLRTNFPSPD GPVMQKKTMGWEASSERMYP EDGALKGEIKQRLKLDGGH YDAEVKTTYKAKKPVQLPGA YNVNIKLDITSHNEDYTIVEQY ERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-098	OT-003184	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, W5Y, L156H) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NUYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHYGYGKHNGP EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSDQK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGHQK VVDVLDISKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNNGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS	211072	211108

10

20

30

40

【表 9 - 2 5】

			KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
OT-CA2- 099	OT- 003185	AcGFP - リン カー (GS) - CA2 (M1del, L156H, G234del, E235del, P236del) - リ ンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQUERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSDQK AVLKGGLDGTyrLIQFHFHW GSLDGGGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGHQK VVDVLSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFNGEELMVDNWRP AQPLKNRQIKASFSLDGATN FSLKQAGDVEENPGPLSKGE EDNMAIIEFMRFKVHMEGSV NGHEFEIEGEGEGRPYEGTQT AKLKVTGGPLPFAWDILSPQ FMYGSKAYVKHPADIPDYLLK SFPEGFKWERVMNFEDGGVVT VTQDSSLQDGEFIYKVKLRGT NFPDGPVMQKKTMGWEASS ERMYPEDGALKGEIKQRLKLLK DGGHYDAEVKTTYKAKKPVQ LPGAYNVNIKLDITSHNEDYTI VEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*	211073	211109

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 6】

OT-CA2-101	OT-003187	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, L156H, F225L) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP EHWKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSDQK AVLKGGLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAPGHQK VVDVLDSTKTKGSADFTNFD PRGLPESLDYWTYPGSLTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL KLRKLNFNGEGEPEELMVDN WRPAQLKNRQIKASFSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGGRPYEG TQTAKLKVTGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFPDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*	211074	211110
OT-CA2-102	OT-003188	AcGFP - リンカー (GS) - CA2 (M1del, D71N, D75N, D101N, L156H) - リンカー (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGD VNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL SYGVQCFSRYPDHMKQHDF KSAMPEGYIQERTIFFEDDGN KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGT DFKEDGNILGNKMEYNYNAH NVYIMTDKAKNGIKVNFKIRH NIEDGSVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMIYFGFVTAATHG MDELYKGSSHHWGYGKHNGP	211075	211111

10

20

30

40

50

【表 9 - 2 7】

		EHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFND SQNK AVLKGGPLDGT YRLIQFHFHW GSLNGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQP DGLAVLGIFLKVGSAKPGHQK VVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLEC VTWIVLKEPISVSSEQVL KFRKLNFN GEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFKSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHME GSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTGGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RGTNFP SDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRL KLKDGGHYDAEVKTTYKAKK PVQLPGAYNVNIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		
--	--	--	--	--

10

20

【 0 3 5 4】

C A 2 C A R 及び C A 2 I L 1 5 エフェクターモジュール

一実施形態では、本明細書に記載の C A 2 D D は、対象となる C A R ペイロードのうちの 1 つまたはより多くに付加され得る。これらは、「C A 2 C A R エフェクターモジュール」と称される。表 1 0 は、C A 2 C A R コンストラクトを提供する。

30

40

50

【表 10-1】

表 10 : CA2 CAR 及び CA2 IL15 コンストラクト

記	配列	AA 配 列番号	NA 配 列番号
OT-001988 (CD8 α リーダー ; CD19 scFv ; CD8 α ヒンジ及び膜貫通 ドメイン ; CD28 共刺激性 ドメイン/4-1BB 細胞内ドメイン ; CD3 ゼータ 細胞内ドメイン ; リンカー (GS) ; CA2(WT	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQM TQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYH TSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITG GGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIHK DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDRQGSE	21069 2	21069 3

10

20

30

40

50

【表 10-2】

の aa2~260, I59N, G102R); 終止)	HTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFG EGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF*		
OT-001989 (CD8α リーダー; CD19 scFv; CD8α ヒンジ 及び膜貫通ドメイン; CD28 共刺激性 ドメイン/4-1BB 細胞内ドメイン; CD3 ゼータ 細胞内ドメイン; リンカー (GS); CA2 (WT の aa2~260, L156H); 終止)	MALPVTALLPLALLHAARPDQMTQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITG GGSGGGGGSGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLLTIK DNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHHYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPPEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQUALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFWGSLDGQGSSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFG EGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF*	21069 4	21069 5
OT-002094 (Ig カッパ軽鎖リー ダー; リンカー (GS)15); IL15 (WT の 49~ 162); B7-1 ヒ ンジ, 膜貫通ド メイン及び尾 部; リンカー (GS); CA2 (WT の aa2~ 260, L156H); 終止)	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARCNWVNVISDLKKIEDLIQSMH IDATLYTESDVHPSCKVAMKCFLEELQVISLES GDASIHD TVE NLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHVQ MFINTSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSKQEHFPD NLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRGSSHHWGYGK HNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTyrLIQF HFHWGSLDGQGSSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADF TNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSS EQVLKFRKLNFGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF*	21087 4	21087 5

【0355】

表 11 は、追加の CA2 CAR コンストラクトを提供する。

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 1 1 : C A 2 C A R

記	配列	AA 配 列番号	NA 配 列番号
OT-002173 (Met ; CD8 α リ ーダー ; CD19 scFv ; CD8 α ヒ ンジ-TM ; 4-	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITG GGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTHIK DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG	21111 2	21112 0

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

IBB 細胞内シグナル伝達ドメイン; CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン; リンカー (GS); CA2 (WT の aa2~260, G63D, E69V, N231I); 終止)	QGTSVTVSSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDH AFNVVFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAKPGQLQKVVDVLDISKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTPGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGE GEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
OT-002174 (Met; CD8α リーダー; CD19 scFv; CD8α ヒンジ-TM; 4-IBB 細胞内シグナル伝達ドメイン; CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン; リンカー (GS); CA2 (WT の aa2~260, L197P); 終止)	MALPVTALLPLALLLHAARPDIMQTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITG GGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIHK DNSKSQVFLKMNSLQTDDBAIYYCAKHHYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAKPGQLQKVVDVLDISKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTPGSPPTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFG EGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21111 3	21112 1
OT-002175 (Met; CD8α リーダー; CD19 scFv; CD8α ヒンジ-TM; 4-IBB 細胞内シグナル伝達ドメイン; CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン; リンカー (GS); CA2 (WT の aa2~260, L156H, S172C, F178Y, E186D); 終止)	MALPVTALLPLALLLHAARPDIMQTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITG GGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIHK DNSKSQVFLKMNSLQTDDBAIYYCAKHHYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAKPGHQKVVDVLDISKTKGKCADFTNYDPRGLLPDSLD YWTPGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFG EGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21111 4	21112 2

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

OT-002176 (Met ; CD8α リーダー ; CD19 scFv ; CD8α ヒンジ-TM ; 4-1BB 細胞内シグナル伝達ドメイン ; CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン ; リンカー (GS) ; CA2 (WT の aa2~260, R27L, T87L, H122Y, N252D) ; 終止)	MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGIYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVYWNKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDISKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK	21111 5	21112 3
OT-002177 (Met ; CD8α リーダー ; CD19 scFv ; CD8α ヒンジ-TM ; 4-1BB 細胞内シグナル伝達ドメイン ; CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン ; リンカー (GS) ; CA2 (WT の aa2~260, S56N) ; 終止)	MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATNLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGIYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHLVHWNKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDISKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK	21111 6	21112 4
OT-002178 (Met ; CD8α リーダー ; CD19 scFv ; CD8α ヒンジ-TM ; 4-1BB 細胞内シグナル伝達ドメイン ; CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン ; リンカー (GS) ; CA2	MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP	21111 7	21112 5

10

20

30

40

【表 1 1 - 4】

(WT の aa2～260, D72F, V241F, P249L); 終止)	IAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDQSQDKAVLKGGPLDGTIRLIQFHFHWGSLDGGQSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAPGLQKVVDVLDISKTKGKSADFTNFDPRGILLPESLD YWTYPGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFG EGEPEELMFDNWRPAQLLKNRQIKASFK		
OT-002179 (Met; CD8α リーダー; CD19 scFv; CD8α ヒンジ-TM; 4-1BB 細胞内シグナル伝達ドメイン; CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン; リンカー (GS); CA2 (WT の aa2～260, D71L, T87N, L250R); 終止)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITG GGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTHK DNSKSQVFLKMNSLQTDITAIIYYCAKHYYGGSYAMDYWG QGTSTVTSSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFLDSQDKAVLKGGPLDGNRYLIQFHFHWGSLDGGQSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAPGLQKVVDVLDISKTKGKSADFTNFDPRGILLPESLD YWTYPGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFG EGEPEELMVDNWRPAQPRKNRQIKASFK	21111 8	21112 6
OT-002180 (Met; CD8α リーダー; CD19 scFv; CD8α ヒンジ-TM; 4-1BB 細胞内シグナル伝達ドメイン; CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン; リンカー (GS); CA2 (WT の aa2～260, L183S); 終止)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITG GGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTHK DNSKSQVFLKMNSLQTDITAIIYYCAKHYYGGSYAMDYWG QGTSTVTSSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTIRLIQFHFHWGSLDGGQSE HTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAPGLQKVVDVLDISKTKGKSADFTNFDPRGSLPESLD YWTYPGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFG EGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	21111 9	21112 7

【0356】

CA2 CD40L エフェクターモジュール

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の CA2 DD は、CD40L に付加され得る。表 13 は、CD40L に付加された例示的な CA2 DD を提供する。表 12 は、表 13 において列挙された制御された CD40L CA2 コンストラクトを調製するためのコンストラクト成分を提供する。表 13 において、「*」は、終止コドンの翻訳を表す。

【表 1 2】

表 1 2. C A 2 C D 4 0 L コンストラクト成分

成分	AA 配列番号	NA 配列番号
リンカー (GGSGGGSGGGSG)	210882	210883
CD40L	13148	210920
CA2 (L156H)	210602	210603

【表 1 3】

表 1 3. C A 2 C D 4 0 L コンストラクト

ID	AA 配列	AA 配列番号	NA 配列番号
OT-001990 (CA2 (L156H) ; リンカー (GGSGGGSGGGSG) ; CD40L ; 終止)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKA VLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAK PGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYW TYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFSGGGSGGGSGG GSGMIETYNQTSRPAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMI GSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGE RSLSLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQK GDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLV TLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASL CLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP GASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL*	210927	210928

【0 3 5 7】

C A R を有する C A 2 m b I L 1 2 エフェクターモジュール

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の C A 2 D D は、本明細書で「m b I L 1 2」と称される膜結合型 I L 1 2 に付加され得る。表 1 5 は、m b I L 1 2 ペイロードに付加された C A 2 D D を提供する。そのようなエフェクターモジュールはさらに、本明細書に記載の C A R のいずれかと機能可能に連結され得、C D 1 9 C A R とタンデム化された膜関連 I L 1 2 コンストラクトが表 1 5 で提供されている。本明細書に記載の D D のいずれかは、表 1 5 に列挙される制御された膜結合型 I L 1 2 コンストラクトを調製するために表 1 4 におけるコンストラクト成分と組み合わせられ得る。表 1 5 において、「*」は、終止コドンの翻訳を表す。

【表 1 4 - 1】

表 1 4. C A R コンストラクト成分を有する C A 2 m b I L 2

成分	AA 配列番号	NA 配列番号
CD8a リーダー	207570	207571
IL12b (p40) リーダー	207912	207918
リンカー (GS)	GS	GGATCA ; GGATCC
リンカー (G4S)3	208369	208373

【表 1 4 - 2】

リンカー (GS)15	210880	210881
CD19 scFV	205092	205098
CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン	205909	205910 ; 205911
4-1BB 細胞内ドメイン	206147	206154
CD3 ゼータ細胞内ドメイン	206033	206039
P2A 切断部位	208337	208338
IL12B (p40) (WT の 23～328)	210884	210890
IL12A (p35) (WT の 57～253)	210898	210907
CA2 (WT の aa2～260, I59N, G102R)	210598	210599
CA2 (WT の aa2～260, L156H)	210600	210601
CA2 (WT の aa2～260, G63D, E69V, N231I)	210748	210749
CA2 (WT の aa2～260, R27L, T87I, H122Y, N252D)	210702	210703

10

20

30

40

50

【表 15-1】

表 15. CAR コンストラクトを有する CA2 m b I L 2

ID	AA 配列	AA 配列 番号	NA 配列 番号
OT-002007 (CD8a リーダー ; CD19 scFV ; CD8a ヒンジ及び膜貫通 ドメイン ; 4- 1BB 細胞内ド メイン ; CD3 ゼー タ細胞内ドメイ ン ; リンカー (GS) (BamH1 部位) ; P2A 切 断部位 ; IL12b (p40) リーダー ; IL12B (p40) (WT の 23~328) ; リン カー ((G4S)3) ; IL12A (p35) (WT の 57~ 253) ; リンカー ((GS)15) ; CD8a ヒンジ及 び膜貫通ドメイ	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPG VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLK QAGDVEENPGPMCHQQLVISWFSVLFLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDDQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSSHLL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLCEAKNYSGRF TCWWLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHK LKYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSW EYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGG SGGGSGGGGSRNLPVATPDPMFPCLLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFR IRAVTIDRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG	2109 49	2109 50

10

20

30

40

50

【表 15-2】

ン；4-1BB 細胞内ドメイン；リンカー (GS) (BamHI 部位)；CA2 (WT の aa2~260, I59N, G102R)；終止 (TGA))	SGSGSGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSS HHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAK YDPSLKPLSVSYDQATSLRLNNGHAFNVEFDDSDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDRQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDISKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWYTPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*		
OT-002008 (CD8a リーダー；CD19 scFV；CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン；4-1BB 細胞内ドメイン；CD3 ゼータ細胞内ドメイン；リンカー (GS) (BamHI 部位)；P2A 切断部位；IL12b (p40) リーダー；IL12B (p40) (WT の 23~328)；リンカー ((G4S)3)；IL12A (p35) (WT の 57~253)；リンカー ((GS)15)；CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン；4-1BB 細胞内ドメイン；リンカー (GS) (BamHI 部位)；CA2 (WT の aa2~260, L156H)；終止 (TGA))	MALPVTALLPLALLHAARPDQMTQTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTRSRLHS GVPSTRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKTLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGI VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNSALKSRLLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG SATNFSLLK QAGDVEENPGPMCHQQLVISWFSVFLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF TCWWLTITSTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHK LKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSW EYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGG SGGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTCTSEEDHEDITDKDTSTVEACLPL ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHA FR IRAVTIDRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG SGSGSGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSS HHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAK YDPSLKPLSVSYDQATSLRLNNGHAFNVEFDDSDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGHQKVVDVLDISKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWYTPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*	2109 51	2109 52

10

20

30

40

50

【表 15-3】

OT-002009 (CD8a リーダー ; CD19 scFV ; CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン ; 4-1BB 細胞内ドメイン ; CD3 ゼータ細胞内ドメイン ; リンカー (GS) (BamH1 部位) ; P2A 切断部位 ; IL12b (p40) リーダー ; IL12B (p40) (WT の 23~328) ; リンカー ((G4S)3) ; IL12A (p35) (WT の 57~253) ; リンカー ((GS)15) ; CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン ; 4-1BB 細胞内ドメイン ; リンカー (GS) (BamH1 部位) ; CA2 (WT の aa2~260, L156H) ; 終止 (TGA))	MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHSTRLHS GVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGTKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGL VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL VIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAFNLSLLK QAGDVEENPGPMCHQQLVISWFLVFLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYDPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCCHKGGEVLSHSL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF TCWWLTISTDLTFVSKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAEESLPIEVMVDVAVHK LKYENYTSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSW EYPDWSTPHSYFSLTFCVQVQGSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGG SGGGSGGGGSRNLPVATPDPMFPCPLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHA FRIRAVTIDRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG SGSGSGSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSS HHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAK YDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQPPDGLAVLGIFLKVGS AKPGHQKVVVDVLSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF*	2109 53	2109 54
OT-002010 (CD8a リーダー ; CD19 scFV ; CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン ; 4-1BB 細胞内ドメイン ; CD3 ゼータ細胞内ドメイン ; リンカー	MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHSTRLHS GVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGTKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGL VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL VIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK	2109 55	2109 56

10

20

30

40

【表 15-4】

(GS) (BamH1 部位); P2A 切 断部位; IL12b (p40) リーダ ー; IL12B (p40) (WT の 23~328); リン カー ((G4S)3); IL12A (p35) (WT の 57~ 253); リンカー ((GS)15); CD8a ヒンジ及 び膜貫通ドメイ ン; 4-1BB 細胞 内ドメイン; リ ンカー (GS) (BamH1 部 位); CA2 (WT の aa2~260, G63D, E69V, N231I); 終止 (TGA))	GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLK QAGDVEENPGPMCHQQLVISWFSVFLASPLVAIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDDQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSSHLL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF TCWWLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHK LKYENYTSSFFIRDIHKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSW EYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGG SGGGGSGGGGSRNLPVATPDGPMFPCLLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMALVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFR IRAVTIDRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG SGSGSGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCGSS HHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAK YDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVVFDSDQDKA VLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWYTPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFIGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF*		
OT-002012 (CD8a リーダ ー; CD19 scFV; CD8a ヒ ンジ及び膜貫通 ドメイン; 4- 1BB 細胞内ドメ イン; CD3 ゼー タ細胞内ドメイ ン; リンカー (GS) (BamH1 部位); P2A 切 断部位; IL12b (p40) リーダ ー; IL12B (p40) (WT の 23~328); リン カー ((G4S)3); IL12A (p35)	MALPVTALLLPLALLHAARPDIMQTTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGL VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL VIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSVTVSSTTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLK QAGDVEENPGPMCHQQLVISWFSVFLASPLVAIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDDQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSSHLL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF TCWWLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHK LKYENYTSSFFIRDIHKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSW EYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGG	2109 57	2109 58

10

20

30

40

50

【表 15 - 5】

(WT の 57～253) ; リンカー ((GS)15) ; CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン ; 4-1BB 細胞内ドメイン ; リンカー (GS) (BamH1 部位) ; CA2 (WT の aa2～260, R27L, T87I, H122Y, N252D) ; 終止 (TGA))	SGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFR IRAVTIDRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG SGSGSGSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSS HHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDTHTAK YDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKA VLKGGPLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQSGEHTVDKKKYA AELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSA KPGQLQKVVDVLSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDY WTYPGSLTTPPLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASF*		
OT-001895 (CD8a リーダー ; CD19 scFv ; CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン ; 4-1BB 細胞内ドメイン (CD28 共刺激性ドメイン) ; CD3 ゼータ細胞内ドメイン ; リンカー (GS) ; P2A 切断部位 ; IL12B リーダー ; インターロイキン-12 サブユニットベータ (p40) (WT の 23～328) ; リンカー (G4S)3 ; インターロイキン-12 サブユニットアルファ (p35) (WT の 57～253) ; リンカー ((GS)15) ;	MALPVTALLLPLALLHAARPDIMQTTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGL VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSTTTA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKGGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLK QAGDVEENPGPMCHQQLVISWFSVLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF TCWWLTITDITFVSKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHK LKYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSW EYPTDWTSPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGG SGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFR IRAVTIDRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG SGSGSGSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGS*	2109 59	2109 60

10

20

30

40

【表 15-6】

CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン；リンカー (GS)；終止)			
OT-002113 (CD8a リーダー；CD19 scFV；CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン；4-1BB 細胞内シグナル伝達ドメイン；CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン；リンカー (GS)；P2A 切断部位；Met；インターロイキン-12 サブユニットベータ (p40) リーダー；IL12B (p40) (WT の 23~328)；リンカー ((G4S)3)；IL12A (p35) (WT の 57~253)；リンカー (GS)15；CD8a ヒンジ；CD8a 膜貫通ドメイン；リンカー (GS)；CA2 (WT の aa2~260)；終止)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQM TQTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYH TSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGG TKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGL VAPQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTPA PRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG SATNFSLLK QAGDVEENPGPMCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSSHLL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF TCWWLTITISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHK LKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSW EYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGG SGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL ELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHA FR IRAVTIDRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG SGSGSGSTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSS HHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAK YDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDP RGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF K*	2109 61	2109 62

10

20

30

40

【0358】

II. 薬学的組成物及び製剤

本教示は、本開示の刺激物、CA2 生体回路、CA2 エフェクターモジュールまたはシステムのうちの1つまたはより多く、及び任意に少なくとも1つの薬学的に許容可能な賦形剤または不活性成分を含む薬学的組成物をさらに含む。

【0359】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的組成物」は、他の化学的成分、例えば、生理的に好適な担体及び賦形剤を任意に有する、本明細書に記載のCA2 生体回路もしくは成分のうちの1つまたはより多く、またはその薬学的に許容可能な塩の調製物を指す。

50

【0360】

用語「賦形剤」または「非活性成分」は、化合物の投与をさらに容易化するために薬学的組成物に添加される不活性または非活性物質を指す。そのような不活性成分の非限定的な例は、製剤下で本明細書に開示される。

【0361】

いくつかの実施形態では、組成物は、ヒト、ヒト患者または対象に投与される。本開示の目的のため、語句「活性成分」は通常、本明細書に記載される送達される任意の1つまたはより多くのCA2生体回路成分を指す。

【0362】

本明細書で提供される薬学的組成物の説明は、主に、ヒトへの投与に好適である薬学的組成物を対象としているが、そのような組成物は通常、任意の他の動物、例えば、非ヒト動物、例えば、非ヒト哺乳動物への投与に好適であることが当業者によって理解される。薬学的組成物の投与が企図される対象には、農業動物、例えば、ウシ、ウマ、ニワトリ及びブタ、家庭用動物、例えば、ネコ、イヌ、または研究動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及び非ヒト霊長類を含む非ヒト哺乳動物が含まれるがこれらに限定されない。

【0363】

本開示に従う薬学的組成物は、バルクで、単回単位用量として、及び／または複数の単回単位用量として調製、包装及び／または販売され得る。本明細書で使用される場合、「単位用量」は、既定の量の活性成分を含む薬学的組成物の個別の量である。活性成分の量は、通常、対象に投与されるであろう活性成分の投薬量、及び／または、例えば、そのような投薬量の2分の1または3分の1などの、そのような投薬量の好都合な分数に等しい。

【0364】

本開示に従う薬学的組成物における活性成分、薬学的に許容可能な賦形剤または不活性成分、及び／または任意の追加成分の相対量は、処置される対象の同一性、サイズ、及び／または状態に応じて、及びさらに組成物が投与される経路に応じて変化する。例として、組成物は、0.1%～100%の間、例えば、0.5～50%の間、1～30%の間、5～80%の間、少なくとも80% (w/w) の活性成分を含み得る。

【0365】

疾患の処置または改善の有効性は、例えば、疾患の進行、疾患の寛解、症状の重症度、疼痛の減少、生活の質、処置効果を持続させるために必要な薬の用量、疾患マーカーのレベル、または処置されているもしくは予防のために標的とされている所与の疾患に適切な任意の他の測定可能なパラメータを測定することによって評価され得る。そのようなパラメータのいずれか1つ、またはパラメータの任意の組み合わせを測定することによって処置または予防の有効性をモニターすることは十分に当業者の能力の範囲内である。本開示の組成物の投与に関連して、例えば、がん「に対して有効」は、臨床的に適切な手法での投与が、少なくとも統計的に有意な割合の患者にとって有益な効果、例えば、症状の改善、治癒、疾患負荷の減少、腫瘍質量もしくは細胞数の減少、延命、生活の質の改善、または特定のタイプのがんの処置に精通した医師によって肯定的と通常認識される他の効果をもたらすことを示す。

【0366】

処置または予防効果は、疾患状態の1つまたはより多くのパラメータの統計的に有意な改善が存在する場合、または他に予期されるであろう症状の悪化もしくは発症がないことによって明らかになる。例として、疾患の測定可能なパラメータの少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%またはそれより多くの好ましい変化は、効果的な処置の示唆となり得る。本開示の所与の組成物または製剤についての有効性はまた、当該技術分野で知られている所与の疾患についての実験動物モデルを使用して判断され得る。実験動物モデルを使用する場合、処置の有効性は、統計的に有意な変化が観察された場合に証明される。

【0367】

製剤

本開示の組成物は、送達に好適な任意の手法で製剤化され得る。製剤は、限定されないが、ナノ粒子、ポリ（乳酸－コグリコール酸）（PLGA）マイクロスフィア、リポイド、リポプレックス、リポソーム、ポリマー、炭水化物（単糖を含む）、陽イオン性脂質及びそれらの組み合わせであり得る。

【0368】

一実施形態では、製剤は、少なくとも1つの脂質を含み得るナノ粒子である。脂質は、限定されないが、DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG及びPEG化脂質から選択され得る。別の態様では、脂質は、陽イオン性脂質、例えば、限定されないが、DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA及びDODMAであり得る。

10

【0369】

本開示のポリヌクレオチドのため、製剤は、例えば、国際出願PCT/US2012/069610（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されるもののいずれかから選択され得る。

【0370】

非活性成分

いくつかの実施形態では、薬学的または他の製剤は、非活性成分である少なくとも1つの賦形剤を含み得る。本明細書で使用される場合、用語「非活性成分」は、製剤に含まれる1つまたはより多くの非活性剤を指す。いくつかの実施形態では、本開示の製剤において使用され得る非活性成分のすべてが米国食品医薬品局（FDA）によって承認されている場合があり、そのいずれも承認されていない場合があり、またはその一部が承認されている場合がある。

20

【0371】

III. 投薬、送達及び投与

本開示の組成物は、1つまたはより多くの経路及びモダリティを介して細胞または対象に送達され得る。本明細書に記載の1つまたはより多くのCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、SRE、ペイロード及び他の成分を含有するウイルスベクターは、それらを細胞及び／または対象に送達するために使用され得る。他のモダリティ、例えば、mRNA、プラスミド、及び組換えタンパク質も使用され得る。

30

【0372】

送達

むき出し送達

本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、むき出し形態で細胞、組織、器官及び／または生物に送達され得る。本明細書で使用される場合、用語「むき出し」は、トランスフェクションまたは浸透性を促進する薬剤または改変を伴わずに送達される薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）を指す。むき出しの薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、当該技術分野で知られている及び本明細書に記載される投与経路を使用して細胞、組織、器官及び／または生物に送達され得る。いくつかの実施形態では、むき出し送達は、単純な緩衝液、例えば、生理食塩水またはPBS中の製剤を含み得る。

40

【0373】

製剤化された送達

いくつかの実施形態では、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、本明細書に記載の方法を使用して製剤化され得る。製剤は、改変されていてもよい及び／または改変されていなくてもよい薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）を含み得る。製剤

50

には、細胞浸透剤、薬学的に許容可能な担体、送達剤、生体内分解性または生体適合性ポリマー、溶媒、及び／または持続放出送達デポ剤がさらに含まれ得るがこれらに限定されない。本開示の製剤は、当該技術分野で知られている及び本明細書に記載される投与経路を使用して細胞に送達され得る。

【0374】

薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）はまた、直接浸漬または浴入れ（bathing）、カテーテルを介するもの、ゲル、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、及び／または液滴によるもの、組成物で被覆または含浸されたファブリックまたは生分解性物質などの基材を使用することによるものを含むがこれらに限定されない当該技術分野におけるいくつかの方法のいずれかで器官または組織への直接送達のために製剤化され得る。

10

【0375】

細胞への送達

本開示の別の態様では、本開示のCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、SRE（例えば、CA2DD）、対象となるペイロード（例えば、免疫療法剤）及び組成物をコードするポリヌクレオチドならびに前記ポリヌクレオチドを含むベクターが細胞に導入され得る。非限定的な例として、細胞は、エフェクター免疫細胞であり得る。

【0376】

本開示の一態様では、本開示のCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、SRE（例えば、CA2DD）、対象となるペイロード（例えば、免疫療法剤）及び組成物をコードするポリヌクレオチドは、ウイルスベクターにパッケージングされ得、またはウイルスゲノムに組み込まれ得、ポリヌクレオチドの一過性または安定発現を可能とする。好ましいウイルスベクターは、レンチウイルスベクターを含むレトロウイルスベクターである。レトロウイルスベクターを構築するために、CA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、CA2DDまたは対象となるペイロード（例えば、免疫療法剤）をコードするポリヌクレオチド分子は、所定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入されて複製欠損性のウイルスが生成される。次いで組換えウイルスベクターは、gag、pol、及びenv遺伝子を含むが、LTR及びパッケージング成分を有さないパッケージング細胞株に導入される。組換えレトロウイルス粒子は、培地に分泌され、次いで収集され、任意に濃縮され、遺伝子移入のために使用される。レンチウイルスベクターは、分裂細胞及び非分裂細胞の両方を接触させることが可能な場合に特に好ましい。

20

30

【0377】

ベクターはまた、物理的方法、例えば、針、エレクトロポレーション、超音波、ハイドロポレーション；化学的担体、例えば、無機粒子（例えば、リン酸カルシウム、シリカ、金）及び／または化学的方法によって非ウイルス的方法によって細胞に移入され得る。いくつかの実施形態では、陽イオン性脂質、脂質ナノエマルジョン、ナノ粒子、ペプチドベースのベクター、またはポリマー系ベクターなどの合成または天然生分解性剤は、送達のために使用され得る。

【0378】

いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、細胞に直接的に送達され得る。一実施形態では、本開示のポリペプチドは、細胞膜浸透ドメイン（CLD）に融合されたエンドソーム漏出ドメイン（ELD）を含む合成ペプチドを使用して送達され得る。本開示のポリペプチドは、ELD-CLD-合成ペプチドと共に細胞に共導入される。ELDは、エンドソームにトラップされたタンパク質のサイトゾルへの解放を容易化する。そのようなドメインは、微生物及びウイルス起源のタンパク質に由来し、当該技術分野で記載されている。CPDは、細胞膜を横断するタンパク質の輸送を可能とし、また、当該技術分野で記載されている。ELD-CLD融合タンパク質は、いずれかのドメイン単独での共形質導入と比較した場合、形質導入効率を相乗的に向上させる。いくつかの実施形態では、ヒスチジンリッチドメインは、エンドソームからの搭載物のサイトゾルへの解放を可能にする追加の方法としてシャトルコンストラクトに任意に加えられ得る。シャトルはまた

40

50

、融合ペプチドの多重体を生成するためにNまたはC末端にシステイン残基を含み得る。ペプチドの末端へのシステイン残基の付加によって生成されるELD-CLD融合ペプチドの多量体は、単一融合ペプチドコンストラクトと比較した場合、さらにより高い形質導入効率を示す。本開示のポリペプチドはまた、適切な細胞内位置、例えば、核に搭載物を誘導するための適切な局在化シグナルに付加され得る。いくつかの実施形態では、国際特許公開、WO2016161516及びWO2017175072で教示されているELD、CLDまたは融合ELD-CLD合成ペプチドのいずれかは、本開示において有用であり得る（それらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0379】

送達モダリティ及び／またはベクター

本開示のCA2生体回路システム、CA2エフェクターモジュール、SRE及び／またはペイロードは、1つまたはより多くのモダリティを使用して送達され得る。本開示はまた、CA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、SRE（例えば、CA2DD）及び対象となるペイロード、ならびにそれらの組み合わせをコードする本開示のポリヌクレオチドをパッケージングするベクターを提供する。本開示のベクターはまた、パッケージングされたポリヌクレオチドを細胞、局所組織部位または対象に送達するために使用され得る。これらのベクターは、DNAベクター、RNAベクター、プラスミド、ウイルスベクター及び粒子を含む任意の種類のものであり得る。ウイルスベクター技術は、よく知られており、Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) に記載されている。ベクターとして有用なウイルスには、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス性(AAV)ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、腫瘍溶解性ウイルスなどが含まれるがこれらに限定されない。

【0380】

通常、ベクターは、少なくとも1つの生物における複製機能の起点、プロモーター配列及び好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、ならびに1つまたはより多くの選択可能なマーカー、例えば、薬物耐性遺伝子を含む。

【0381】

いくつかの実施形態では、組換え発現ベクターは、制御性配列、例えば、転写及び翻訳開始及び終止コドンを含み得、これらは、ベクターが導入される宿主細胞のタイプに特異的である。

【0382】

いくつかの実施形態では、本開示のベクターは、本明細書で教示される1つまたはより多くのペイロードを含み得、2つまたはより多くのペイロードが1つのCA2エフェクターモジュールに含まれ得る。この場合、2つまたはより多くのペイロードは、同じ刺激物によって同時に調整される。他の実施形態では、本開示のベクターは、2つまたはより多くのCA2エフェクターモジュールを含み得、各CA2エフェクターモジュールは、異なるペイロードを含む。この場合、2つまたはより多くのCA2エフェクターモジュール及びペイロードは、異なる刺激物によって調整され、2つまたはより多くの成分の独立した制御を別々に提供する。他の実施形態では、本開示のベクターは、1つまたはより多くのCA2エフェクターモジュール及び1つまたはより多くの非CA2エフェクターモジュールを含み得、各CA2エフェクターモジュールは、異なるペイロードを含む。この場合、CA2エフェクターモジュール及びペイロードは、異なる刺激物によって調整され、2つまたはより多くの成分の独立した制御を別々に提供する。

【0383】

レンチウイルスビヒクル／粒子

いくつかの実施形態では、レンチウイルスビヒクル／粒子は、送達モダリティとして使用され得る。レンチウイルスは、宿主ゲノムへの組み込みの前にウイルスRNAゲノムのDNAへの逆転写が必要となることから名付けられたRetroviridae科のウイ

10

20

30

40

50

ルスのサブグループである。このように、レンチウイルスビヒクル／粒子の最も重要な特徴は、標的／宿主細胞のゲノムへのそれらの遺伝子物質の組み込みである。レンチウイルスのいくつかの例には、ヒト免疫不全ウイルス：HIV-1及びHIV-2、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）、ジュンブラナ病ウイルス（JDV）、ウマ感染性貧血ウイルス（EIAV）、ウマ感染性貧血ウイルス、ビスナ・マエディならびにヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）が含まれる。

【0384】

典型的には、遺伝子送達ビヒクルを構成するレンチウイルス粒子は、それら自体が複製欠損性である（「自己不活性化」とも称される）。レンチウイルスは、インタクトな宿主の核エンベロープを介する侵入メカニズムにより、分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染することができる（Naldini *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998, 9: 457-463）。組換えレンチウイルスビヒクル／粒子は、HIV病原性遺伝子を複合的に減弱させることによって生成されてきた。例えば、遺伝子Env、Vif、Vpr、Vpu、Nef及びTatが欠失され、ベクターを生物学的に安全にする。これに対応して、例えば、HIV-1／HIV-2に由来するレンチウイルスビヒクルは、非分裂細胞への導入遺伝子の効率的な送達、組み込み、及び長期発現を媒介し得る。本明細書で使用される場合、用語「組換え」は、レンチウイルス配列及び非レンチウイルスレトロウイルス配列の両方を含有するベクターまたは他の核酸を指す。

【0385】

レンチウイルス粒子は、ウイルスパッケージング要素及びベクターゲノム自体を生成細胞、例えば、ヒトHEK293T細胞において共発現させることによって生成され得る。これらの要素は、通常、3つまたは4つの別個のプラスミドで提供される。産生細胞は、ウイルスのコア（すなわち、構造タンパク質）及び酵素成分、ならびにエンベロープタンパク質（複数可）（パッケージングシステムと称される）を含むレンチウイルス成分をコードするプラスミド、ならびに標的細胞に移入される外来導入遺伝子を含むゲノムをコードするプラスミド、すなわち、ビヒクル自体（移入ベクターとも称される）で共トランスフェクションされる。通常、プラスミドまたはベクターは、産生細胞株に含まれる。プラスミド／ベクターは、産生細胞株へのトランスフェクション、形質導入または感染を介して導入される。トランスフェクション、形質導入または感染のための方法は、当業者によく知られている。非限定的な例として、パッケージング及び移入コンストラクトは、通常は優性選択可能なマーカー、例えば、neo、DHFR、Gln合成酵素またはADAと一緒にリン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクションまたはエレクトロポレーションによって産生細胞株に導入され、続いて適切な薬物の存在下での選択及びクローンの単離がなされ得る。

【0386】

産生細胞は、外来遺伝子、例えば、本開示のCA2エフェクターモジュールを含有する組換えウイルス粒子を生成する。組換えウイルス粒子は、培地から回収され、当業者によって使用される標準的な方法によって力価測定される。組換えレンチウイルスビヒクルは、標的細胞を感染させるために使用され得る。

【0387】

高力価レンチウイルス粒子を生成するために使用され得る細胞には、HEK293T細胞、293G細胞、STAR細胞（Relander *et al.*, *Mol. Ther.*, 2005, 11: 452-459）、FreeStyle（商標）293 Expression System（ThermoFisher, Waltham, MA）、及び他のHEK293Tベースの産生細胞株（例えば、Stewart *et al.*, *Hum Gene Ther.* 2011, 22(3): 357-369; Lee *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 2012, 10996): 1551-1560; Throm *et al.*, *Blood.* 2009, 113(21): 5104-5110（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））が含まれ

得るがこれらに限定されない。

【0388】

いくつかの態様では、エンベロープタンパク質は、他のウイルスからの異種エンベロープタンパク質、例えば、水泡性口炎ウイルスのGタンパク質(VSV G)またはバキュロウイルスgp64エンベロープタンパク質であり得る。VSV-G糖タンパク質は、ベシキュロウイルス属に分類される種: Carajas virus (CJSV)、Chandipura virus (CHPV)、Cocal virus (COCV)、Isfahan virus (ISFV)、Maraba virus (MARAV)、Piry virus (PIRYV)、Vesicular stomatitis Alagoas virus (VSAV)、Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIIV) 及び Vesicular stomatitis New Jersey virus (VSNJV) 及び/または Grass carp rhabdovirus、BeAn 157575 virus (BeAn 157575)、Boteke virus (BTKV)、Calchaqui virus (CQIV)、Eel virus American (EVA)、Gray Lodge virus (GLOV)、Jurona virus (JURY)、Klamath virus (KLAV)、Kwatta virus (KWAV)、La Joya virus (LJV)、Malpais Spring virus (MSPV)、Mount Elgon bat virus (MEBV)、Perinet virus (PERV)、Pike fry rhabdovirus (PFRV)、Porton virus (PORV)、Radi virus (RADIV)、Spring viremia of carp virus (SV CV)、Tupaia virus (TUPV)、Ulcerative disease rhabdovirus (UDRV) 及び Yug Bogdanovac virus (YBV) としてベシキュロウイルス属に暫定的に分類された系統の中から特に選択され得る。gp64または他のバキュロウイルスenvタンパク質は、Autographa californica核多角体病ウイルス(AcMNPV)、Anagrapha falcifera核多角体病ウイルス、Bombyx mori核多角体病ウイルス、Choristoneura fumiferana核多角体病ウイルス、Orgyia pseudotsugata単カブシド核多角体病ウイルス、Epiphyas postvittana核多角体病ウイルス、Hyphantria cunea核多角体病ウイルス、Galleria mellonella核多角体病ウイルス、ドーリウイルス、トゴトウイルス、Antheraea pernyi核多角体病ウイルスまたはBatkenウイルスに由来し得る。

【0389】

レンチウイルス粒子で提供される他の要素は、5'または3'のいずれかの末端におけるレトロウイルスLTR(長い末端反復)、レトロウイルスエクスポート要素、任意にレンチウイルス逆反応要素(RRE)、プロモーターまたはその活性部分、及び遺伝子座制御領域(LCR)またはその活性部分を含み得る。CA2エフェクターモジュールは、ベクターに連結される。

【0390】

組換えレンチウイルス粒子を生成するための方法は、当該技術分野、例えば、米国特許番号: 8,846,385; 7,745,179; 7,629,153; 7,575,924; 7,179,903; 及び6,808,905(これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)で論述されている。

【0391】

使用されるレンチウイルスベクターは、限定されないが、pLVX、pLenti、pLenti6、pLJM1、FUGW、pWPXL、pWPI、pLenti CMV puro DEST、pLJM1-EGFP、pULTRA、pInducer20、pHIV-EGFP、pCW57.1、pTRPE、pELPS、pRRL、及びpLionIIから選択され得る。

【0392】

レンチウイルスベクターは、プラスミドベースまたはウイルスベースであり、当該技術分野で知られている（米国特許番号9,260,725;9,068,199;9,023,646;8,900,858;8,748,169;8,709,799;8,420,104;8,329,462;8,076,106;6,013,516;及び5,994,136（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。

【0393】

レンチウイルスベクター及び細胞修飾

レンチウイルスベクターは、最近承認された製品、例えば、再発性／難治性B細胞リンパ腫のためのTisagenlecleucel（KYMRIAHA（登録商標））を含む、前臨床研究及び臨床用途のためにT細胞（例えば、初代ヒトT細胞またはJurkat細胞）に導入遺伝子を導入するために使用される。VSV-Gシュードタイプ化第三世代レンチウイルスベクターは、高い力価、高い形質導入効率及び安全性を提供し、T細胞修飾のための最適なベクターとなっている。理論に縛られることを望むものではないが、T細胞修飾は、通常、CD3／CD28抗体によるT細胞活性化、それに続くレンチウイルス形質導入、次いで5～30日（例えば、9～14日または9～15日）持続し得る細胞増殖を伴う。通常、レンチウイルス導入遺伝子組み込みは、T細胞（例えば、初代ヒトT細胞またはJurkat細胞）において十分に安定するために7日超を要し得る。より長い培養は、細胞数を増加させ得るのに対し、より長い培養はまた、T細胞表現型をより分化した状態に変化させ得る。そのため、ex vivoでの培養の期間は、CAR T細胞の持続性及び有効性に影響を及ぼし得る。例えば、より短い期間で培養された細胞は、より分化していない表現型を示し得、前臨床モデルにおいて非常に有効であり得る。

【0394】

理論に縛られることを望むものではないが、T細胞分化の状態は、養子移植後のT細胞の生着及び持続性に影響を及ぼし得る。Ghassemi et al (Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. Cancer Immunol Res; 6 (9) Sept. 2018（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））は、経時的な初代ヒトT細胞の分化を記載しており、早期に収穫されたCAR T細胞が、向上したエフェクター機能及び増殖、ならびにin vivoでの向上した効力及び持続性を示したことを確認した。

【0395】

ex vivoでのT細胞（例えば、初代ヒトT細胞またはJurkat細胞）におけるレンチウイルスで導入された導入遺伝子の形質導入、組み込み及び／または発現動態などのレンチウイルス動態は、in vivo抗腫瘍反応の有効性及び持続性に影響を及ぼし得る。いくつかのタイプのT細胞は、異なる結果を生み出し得る。例えば、Jurkat細胞株は、初代ヒトT細胞として発現の動態範囲を提供する。これらのレンチウイルス動態を評価するための方法は、当該技術分野で知られており、本明細書に記載されている。

【0396】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子発現動態を決定するために、CD3／CD28活性化初代ヒトT細胞は、導入遺伝子（例えば、制御された導入遺伝子または構成的導入遺伝子、例えば、CD19 CAR、IL12、蛍光タンパク質または本明細書に記載の任意の導入遺伝子（例えば、ペイロード））を保有するレンチウイルスで形質導入され得る。細胞は、生存性、ウイルスゲノム組み込み（例えば、定量PCRを使用することによる）、転写産物レベル（例えば、定量RT-PCRを使用することによる）、及び適用可能な場合は導入遺伝子の細胞表面発現（例えば、導入遺伝子がCD19 CARであり、またはそれを誘導する場合、そのときはCD19 CARの表面発現が評価され得る）について本明細書に記載される及び／または当該技術分野で知られている方法によって分析さ

れ得る。細胞は、形質導入の前及び／または形質導入の後、例えば、形質導入から1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、7日後、8日後、9日後、10日後、11日後、12日後、13日後、14日後、15日後、16日後、17日後、18日後、19日後、20日後、21日後、22日後、23日後、24日後、25日後、26日後、27日後、28日後、29日後、30日後または30日よりも後に分析され得る。

【0397】

いくつかの実施形態では、CD3／CD28活性化初代ヒトT細胞は、形質導入後にCD3／CD28ビーズで再活性化され得る。細胞は、形質導入から5日後、6日後、7日後、8日後、9日後、10日後、11日後、12日後、13日後、14日後、15日後、16日後、17日後、18日後、19日後、20日後、21日後、22日後、23日後、24日後、25日後、26日後、27日後、28日後、29日後、30日後または30日よりも後に再活性化され得る。細胞は、生存性、ウイルスゲノム組み込み（例えば、定量PCRを使用することによる）、転写産物レベル（例えば、定量RT-PCRを使用することによる）、適用可能な場合は導入遺伝子の細胞表面発現（例えば、導入遺伝子がCD19 CARであり、またはそれを誘導する場合、そのときはCD19 CARの表面発現が評価され得る）、コピー数、及び／またはmRNAレベルについて本明細書に記載される及び／または当該技術分野で知られている方法によって分析され得る。

【0398】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子を保有するレンチウイルスで形質導入された活性化初代ヒトT細胞の細胞生存率は、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%超である。非限定的な例として、細胞生存率は、90%超である。非限定的な例として、細胞生存率は、85%超である。

【0399】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子を保有するレンチウイルスで形質導入されたJurkat細胞の細胞生存率は、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%超である。非限定的な例として、細胞生存率は、90%超である。非限定的な例として、細胞生存率は、85%超である。

【0400】

いくつかの実施形態では、細胞のゲノムへの導入遺伝子の組み込みは、飽和点におけるものであり得るか、またはそれ超え得る。非限定的な例として、飽和点は、細胞当たり3コピーであり得る。

【0401】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子のゲノムへの組み込みは、評価された初期の時点で高く、次いで、より低い組み込み値に低下してから培養の残りの期間で安定となり得る。非限定的な例として、ゲノムへの導入遺伝子の組み込みは、早期の時点の間で細胞当たり最大で20コピーであり、それから、細胞当たり2コピーに低下し、培養の残りの期間全体にわたって安定となり得る。

【0402】

いくつかの実施形態では、T細胞の能力の形質導入が評価され得る。少なくとも1人のドナーからのT細胞は、飽和レベルに達すると予測される用量（例えば、ポアソン分布が予想される場合、各細胞がコピーを含有するはずの十分なウイルス）及び飽和の5倍を超えるより高いレンチウイルス用量で、導入遺伝子を含有するレンチウイルスで形質導入され得る。すべての細胞が導入遺伝子を発現しているかどうかを決定するために、細胞当たりのコピー数、細胞の割合及びMFI（または導入遺伝子の培地中の濃度）が検出され得る。非限定的な例として、2つの区別されるドナーからのT細胞は、導入遺伝子を含むレンチウイルスで形質導入され得る。形質導入は、飽和及び5倍飽和の2つの用量でのものであり得、形質導入から5～10日後、すべての群が、組み込まれた導入遺伝子の予測される飽和レベル及び群間で同様の発現強度に達するか、またはそれを超える場合があるが、すべての細胞が導入遺伝子を発現しているわけではないことを示している。同じドナーを源とする場合であっても、すべてのT細胞が等しい形質導入感受性を有するとは限らな

10

20

30

40

50

い場合がある。G F Pを発現する（検出閾値を超える）総細胞の割合は、ドナー、ロット及び／またはウイルス用量の間で変化し得る。単一のドナーからのG F Pを発現する総細胞の割合は、70%～95%の間であり得る。

【0403】

いくつかの実施形態では、所定割合の培養されたT細胞（例えば、初代ヒトT細胞及び／またはJ u r k a t細胞）が導入遺伝子を発現し得る。導入遺伝子を発現する培養T細胞の割合は、限定されないが、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%または99%超であり得る。非限定的な例として、割合は、70%超であり得る。非限定的な例として、割合は、75%超であり得る。非限定的な例として、割合は、80%超であり得る。非限定的な例として、割合は、85%超であり得る。非限定的な例として、割合は、90%超であり得る。非限定的な例として、割合は、95%超であり得る。

10

【0404】

いくつかの実施形態では、培養物からのm R N Aレベルは、研究の期間にわたって低下し得る。低下は、特定の導入遺伝子に限定されない場合があり、その傾向は、複数のクラスの発現したタンパク質にわたって見られ得る。m R N Aレベルを増加させるために、細胞は、m R N Aレベルが開始レベルから低下した後、再活性化され得る。細胞は、形質導入から5日後、6日後、7日後、8日後、9日後、10日後、11日後、12日後、13日後、14日後、15日後、16日後、17日後、18日後、19日後、20日後、21日後、22日後、23日後、24日後、25日後、26日後、27日後、28日後、29日後、30日後または30日より後に再活性化され得る。

20

【0405】

いくつかの実施形態では、培養物からの表面発現は、研究の期間にわたって低下し得る。例えば、表面発現は、形質導入から3～13日後、3～14日後、または3～15日後に低下し得る。表面発現を増加させるために、細胞は、表面発現が開始レベルから低下した後、再活性化され得る。細胞は、形質導入から5日後、6日後、7日後、8日後、9日後、10日後、11日後、12日後、13日後、14日後、15日後、16日後、17日後、18日後、19日後、20日後、21日後、22日後、23日後、24日後、25日後、26日後、27日後、28日後、29日後、30日後または30日より後に再活性化され得る。

30

【0406】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、C A R、例えば、限定されないが、C D 1 9 C A Rである。非限定的な例として、C A Rは、C D 1 9 C A Rである。細胞生存率は、C D 1 9 C A Rで形質導入された細胞では90%超であり得る。細胞生存率は、C D 1 9 C A Rで形質導入された細胞では85%超であり得る。細胞がC D 1 9 C A Rで形質導入された初代T細胞である場合、そのときは生存細胞の数は、初期時点にわたって増加してから減少し得る。細胞がC D 1 9 C A Rで形質導入されたJ u r k a t細胞である場合、そのときは生存細胞の数は、少なくとも10日間増加し得る。C D 1 9 C A R形質導入細胞のための細胞当たりのコピー数は、初期の時点ではより高く、その後、より後の時点では50%またはより多く減少し得る。C D 1 9 C A Rの細胞表面発現は、研究の過程に、10日の期間にわたって（例えば、3日目から13日目まで）、約20000 C A R M F Iから5000 C A R M F I未満に減少し得る。15日目での再刺激の後、M F Iは、5000 C A R M F I超まで増加し得る。C A Rを発現する初代ヒトT細胞の割合は、形質導入後3～13日間で40%～60%の間であり得る。C A Rを発現するJ u r k a t細胞の割合は、形質導入後3～13日間で30%～70%の間であり得る。形質導入後3～6日目の間に約20%の初期減少が見られ得る。T細胞の再刺激は、C A R陽性細胞の割合を初期パーセンテージレベル（例えば、約60%）に戻るように増加させ得る。

40

【0407】

50

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、蛍光タンパク質、例えば、限定されないが、細胞質性緑色蛍光タンパク質（GFP）、ルシフェラーゼ、及びmCherryをコードする。非限定的な例として、蛍光タンパク質は、GFPである。細胞生存率は、GFPで形質導入された細胞では90%超であり得る。細胞生存率は、GFPで形質導入された細胞では85%超であり得る。細胞がGFPで形質導入された初代T細胞である場合、そのときは生存細胞の数は、初期時点にわたって増加してから減少し得る。細胞がGFPで形質導入されたJurkat細胞である場合、そのときは生存細胞の数は、少なくとも10日間増加し得る。GFP形質導入細胞のための細胞当たりのコピー数は、初期の時点ではより高く、その後、より後の時点では50%またはより多く減少し得る。細胞の表面発現は、着実かつ急速に減少して10日目で最低になると共に、再刺激された場合はわずかに増加し得る。Jurkat細胞におけるGFPの細胞表面発現の最も高いレベルは10日目であり（約35000 GFP MFI）、研究の残りの間減少し得る。GFPを発現する初代ヒトT細胞の割合は、形質導入後3～13日間で約80%であり得る。GFPを発現するJurkat細胞の割合は、形質導入後3～13日間で約90%であり得る。

【0408】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のレンチウイルスで修飾された細胞は、初期にコピー数が低下し、RNA及び表面発現レベルが経時的に低下した後に安定化するゲノムDNA組み込み、ならびに再刺激後のRNA及び表面発現の増加を有する。

【0409】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスで修飾された細胞は、以下の14日間の方法を使用して評価され得、その場合、サンプルは、培養を通して5回収集される。—1日目に、T細胞（例えば、初代ヒトT細胞またはJurkat細胞）は解凍され得、CD3／CD28ビーズが添加される。0日目に、条件の各々についてのレンチウイルスが添加され（例えば、 0.5×10^6 / mLで4 mLの細胞）、形質導入されていない細胞の対照が存在する。1日目に培地を8 mLに倍増させ、次いで2日目に培地を16 mLに倍増させる。3日目に4 mLを収穫し、次いで4日目に培地を24 mLに倍増させる。6日目に4 mLを収穫してから培地を40 mLに倍増させる。8日目に細胞を分割し得（例えば、 0.5×10^6 細胞 / mLで14 mL）、次いで6日目に4 mLを収穫してから培地を40 mLに倍増させる。10日目に4 mLを収穫し得、それから培地を20 mLに倍増させる。13日目に、4 mLを収穫してから培地を32 mLに倍増させる。培養物を半分に分割し、培養物の半分を活性化し（CD3／CD28活性化ビーズ1：1）、一晚刺激する。14日目に、4 mLの各々の刺激された細胞及び刺激されていない細胞を収穫し、培養を終了させる。細胞を収穫し、ゲノムDNAを抽出し、次いで内因性ゲノム及び導入遺伝子配列に対する標準曲線qPCRで定量し、次いで検出された量を比に変換することによって細胞当たりの導入遺伝子コピー数がアッセイされる。平均蛍光強度（MFI）は、各群について適切な染色を用いてAttuneでのFLOによってアッセイされる。発現率もまた、閾値を超えて蛍光を発する細胞の割合を定量するアチューンでのFLOによってアッセイされ得る。可溶性ペイロードは、マークされた各時点で培養上清を収穫し、メソスケールディスカバリープレートアッセイ（MSD）を実行し、次いで細胞密度について正規化することによってアッセイされ得る。

【0410】

アデノ随伴ウイルス粒子

本開示のCA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール、SREまたは対象となるペイロードのいずれかの送達は、組換えアデノ随伴ウイルス性（rAAV）ベクターを使用して達成され得る。そのようなベクターまたはウイルス粒子は、既知の血清型カプシドまたは血清型カプシドの組み合わせのいずれかを利用するように設計され得る。

【0411】

【0412】

AAVベクターには、一本鎖ベクターだけでなく、自己相補性AAVベクター（scAA

10

20

30

40

50

AV)が含まれる。scAAVベクターは、互いにアニーリングして二本鎖ベクターゲノムを形成するDNAを含有する。第2の鎖合成をスキップすることにより、scAAVは、細胞における急速発現が可能となる。

【0413】

rAAVベクターは、sf9昆虫細胞においてまたはHEK293細胞などのヒト細胞の浮遊細胞培養物において、当該技術分野における標準的な方法、例えば、三重トランスフェクションによって製造され得る。

【0414】

CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール、SREまたは対象となるペイロードは、本明細書で教示されるAAVカプシドにパッケージングされる1つまたはより多くのウイルスゲノムにおいてコードされ得る。

【0415】

そのようなベクターまたはウイルスゲノムにはまた、少なくとも1つのまたは2つのITR(末端逆位反復)に加えて、ベクターまたはウイルスゲノムからの発現に必要な所定の制御性要素が含まれ得る。そのような制御性要素は、当該技術分野でよく知られており、例えば、プロモーター、イントロン、スペーサー、スタッパー配列などを含む。

【0416】

本開示のCA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール、SREまたは対象となるペイロードは、1つまたはより多くのAAV粒子で投与され得る。

【0417】

いくつかの実施形態では、CA2エフェクターモジュールは、1つまたはより多くのAAV粒子で投与され得る。いくつかの実施形態では、複数のCA2エフェクターモジュールまたはSREは、ウイルスゲノムにコードされ得る。

【0418】

レトロウイルスビヒクル／粒子(γレトロウイルスベクター)

いくつかの実施形態では、レトロウイルスビヒクル／粒子は、本開示のCA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール、SREまたは対象となるペイロードを送達するために使用され得る。レトロウイルスベクター(RV)により、標的細胞における導入遺伝子の永続的組み込みが可能となる。複雑なHIV-1/2をベースとするレンチウイルスベクターに加えて、単純なガンマレトロウイルスをベースとするレトロウイルスベクターは、治療遺伝子を送達するために広く使用されており、広範囲の細胞タイプを形質導入することが可能な最も効率的かつ強力な遺伝子送達システムの1つとして臨床で実証されている。ガンマレトロウイルスの例示的な種には、マウス白血病ウイルス(MLV)及びネコ白血病ウイルス(FeLV)が含まれる。

【0419】

いくつかの実施形態では、哺乳動物ガンマレトロウイルス、例えば、マウス白血病ウイルス(MLV)に由来するガンマレトロウイルスベクターは、組換え型である。ガンマレトロウイルスのMLVファミリーには、同種指向性、両種指向性、異種指向性及び多指向性のサブファミリーが含まれる。同種指向性ウイルスは、mCAT-1受容体を使用してマウス細胞のみに感染することができる。同種指向性ウイルスの例は、モロニーMLV及びAKVである。両種指向性ウイルスは、Pit-2受容体を介してマウス、ヒト及び他の種に感染する。両種指向性ウイルスの一例は、4070Aウイルスである。異種指向性及び多指向性ウイルスは、同じ(Xpr1)受容体を利用するが、それらの種指向性が異なる。異種指向性ウイルス、例えば、NZB-9-1は、ヒト及び他の種に感染するが、マウス種には感染しない一方で、多指向性ウイルス、例えば、フォーカス形成ウイルス(MCF)は、マウス、ヒト及び他の種に感染する。

【0420】

ガンマレトロウイルスベクターは、レトロウイルス構造及び酵素(gag-pol)ポリタンパク質をコードするもの、エンベロープ(env)タンパク質をコードするもの、ならびに新たに形成されたウイルス粒子にパッケージングされる本開示の組成物をコー

10

20

30

40

50

ドするポリヌクレオチドを含むベクターmRNAをコードするものを含むいくつかのプラスミドで細胞を共トランスフェクションすることによってパッケージング細胞において生成され得る。

【0421】

いくつかの態様では、組換えガンマーレトロウイルスベクターは、他のウイルスからのエンベロープタンパク質でシュードタイプ化される。エンベロープ糖タンパク質は、細胞指向性を増加／変化させ得るウイルス粒子の外側脂質層に組み込まれる。例示的なエンベロープタンパク質には、テナガザル白血病ウイルスエンベロープタンパク質（GALV）または水胞性口炎ウイルスGタンパク質（VSV-G）、またはサル内因性レトロウイルスエンベロープタンパク質、または麻疹ウイルスH及びFタンパク質、またはヒト免疫不全ウイルスgp120エンベロープタンパク質、またはコカルベシクロウイルスエンベロープタンパク質が含まれる（例えば、米国出願公開番号：2012/164118（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。他の態様では、エンベロープ糖タンパク質は、標的化／結合リガンドをガンマーレトロウイルスベクターに組み込むように遺伝子改変され得、結合リガンドには、ペプチドリガンド、一本鎖抗体及び成長因子が含まれるがこれらに限定されない（Waehler et al., Nat. Rev. Genet. 2007, 8 (8) : 573-587（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。これらの修飾された糖タンパク質は、ベクターを、それらの対応する標的部位を発現する細胞に再標的化し得る。他の態様では、「分子橋」が、ベクターを特定の細胞に誘導するために導入され得る。分子橋は二重特異性を有する：一方の端部は、ウイルス糖タンパク質を認識し得、他方の端部は、標的細胞上の分子決定基に結合し得る。そのような分子橋、例えば、リガンドー受容体、アビジンービオチン、及び化学的コンジュゲーション、モノクローナル抗体及び修飾融合タンパク質は、形質導入のための標的細胞へのウイルスベクターの結合を誘導し得る（Yang et al., Biotechnol. Bioeng., 2008, 101 (2) : 357-368; 及びMaetzig et al., Viruses, 2011, 3, 677-713（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））。

【0422】

いくつかの実施形態では、組換えガンマーレトロウイルスベクターは、自己不活性化（SIN）ガンマレトロウイルスベクターである。そのベクターは、複製不能である。SINベクターは、エンハンサー／プロモーター活性を初期に含む3' U3領域内の欠失を保有し得る。さらに、5' U3領域は、サイトメガロウイルスもしくはRSVに由来する強力なプロモーター（パッケージング細胞株で必要とされる）、または最適な内部プロモーター、及び／またはエンハンサー要素で置き換えられ得る。内部プロモーターの選択は、本開示の特定の目的のために必要とされる遺伝子発現の特定の要件に応じて行われ得る。

【0423】

いくつかの実施形態では、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール、SREをコードするポリヌクレオチドは、組換えウイルスゲノム内に挿入される。組換えガンマーレトロウイルスベクターのウイルスmRNAの他の成分は、天然に存在する配列の挿入または除去（例えば、IRESの挿入、対象となるポリペプチドまたは阻害性核酸をコードする異種ポリヌクレオチドの挿入、野生型プロモーターの代わりに異なるレトロウイルスまたはウイルスからのより有効なプロモーターのシャッフルなど）によって改変され得る。いくつかの例では、組換えガンマーレトロウイルスベクターは、改変されたパッケージングシグナル、及び／またはプライマー結合部位（PBS）、及び／または5' -長い末端反復（LTR）のU3 -領域における5' -エンハンサー／プロモーター要素、及び／または3' -LTRのU3 -領域において改変された3' -SIN要素を含み得る。これらの改変は、力価及び感染能力を増大させ得る。

【0424】

本開示のCA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール、SREまたは対象となるペイロードを送達するのに好適なガンマレトロウイルスベクターは、

米国特許番号：8, 828, 718；7, 585, 676；7, 351, 585；米国出願公開番号：2007/048285；PCT出願公開番号：WO2010/113037；WO2014/121005；WO2015/056014；及びEP特許番号：EP1757702；EP1757703（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるものから選択され得る。

【0425】

腫瘍溶解性ウイルスベクター

いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、腫瘍溶解性ウイルスにパッケージングされ得る。本明細書で使用される場合、用語「腫瘍溶解性ウイルス」は、がん細胞、例えば、ワクチンウイルスを優先的に感染させ、殺傷するウイルスを指す。腫瘍溶解性ウイルスは、天然に存在し得、または遺伝子改変ウイルス、例えば、腫瘍溶解性アデノウイルス、及び腫瘍溶解性ヘルペスウイルスであり得る。

【0426】

いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクチンウイルスは、腫瘍における細胞の腫瘍溶解を誘導するのに十分な、チミジンキナーゼ（TK）欠損性の、顆粒球マクロファージ（GM）コロニー刺激因子（CSF）を発現する、複製可能なワクシニアウイルスベクターのウイルス粒子を含み得る；例えば、米国特許番号9, 226, 977（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0427】

メッセンジャーRNA（mRNA）

いくつかの実施形態では、本開示のCA2エフェクターモジュールは、メッセンジャーRNA（mRNA）として設計され得る。本明細書で使用される場合、用語「メッセンジャーRNA」（mRNA）は、対象となるポリペプチドをコードし、かつ対象となるコードされたポリペプチドを*in vitro*、*in vivo*、*in situ*または*ex vivo*で生成するために翻訳されることが可能である任意のポリヌクレオチドを指す。そのようなmRNA分子は、国際出願番号PCT/US2013/030062（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されているもののいずれかの構造的成分または特徴を有し得る。

【0428】

いくつかの実施形態では、CA2エフェクターモジュールは、自己増幅RNAとして設計され得る。「自己増幅RNA」は、本明細書で使用される場合、RNA及びRNAによってコードされるタンパク質の量の増加をもたらす、宿主において複製し得るRNA分子を指す。そのような自己増幅RNAは、国際特許出願公開番号WO2011005799（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されるもののいずれかの構造的特徴または成分を有し得る。

【0429】

投薬

本開示は、CA2生体回路システムの成分の任意の1つまたはより多くを、それを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。これらは、疾患、障害、及び／または病態（例えば、がんまたは自己免疫疾患に関連する疾患、障害、及び／または病態）を予防または処置または画像化するのに有効な任意の量及び任意の投与経路を使用して対象に投与され得る。必要とされる正確な量は、対象の種、年齢、及び全般的状態、疾患の重症度、特定の組成物、その投与様式、その活性様式などに応じて対象毎に変化する。

【0430】

本開示に従う組成物は、典型的には、投与の容易性及び投薬量の均一性のために投薬単位形態で製剤化される。しかしながら、本開示の組成物の1日総使用量は、合理的な医学的判断の範囲内で担当医によって決定されることが理解される。任意の特定の患者のための特定の治療的に有効な、予防的に有効な、または適切な画像化用量レベルは、処置されている障害及び障害の重症度；用いられる特定の化合物の活性；用いられる特定の組成物；患者の年齢、体重、全般的健康状態、性別及び食餌；用いられる特定の化合物の投与

10

20

30

40

50

時間、投与経路、及び排泄速度；処置の継続期間；用いられる特定の化合物と同時にまたは組み合わせて使用される薬物；ならびに医学分野でよく知られている同様の要素を含む多様な要素に依存する。

【0431】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、T細胞消耗を回避し、サイトカイン放出症候群を防止し、免疫療法に関連する毒性を最小化するために様々な用量で使用され得る。例えば、低用量の本開示の組成物は、腫瘍負荷が高い患者を最初に処置するために使用され得る一方で、腫瘍負荷が低い患者は、高い及び繰り返しの用量の本開示の組成物で処置されて、最小の腫瘍抗原負荷の認識が確保され得る。別の例では、本開示の組成物は、緊張性T細胞シグナル伝達を減少させ、*in vivo*での持続性を向上させるために脈動的様式で送達され得る。いくつかの態様では、毒性は、高用量を投与する前に、低用量の本開示の組成物を最初に使用することによって最小化され得る。血清マーカー、例えば、フェリチン、血清C反応性タンパク質、IL6、IFN- γ 、及びTNF- α が上昇した場合、投薬は改変され得る。

【0432】

いくつかの実施形態では、神経毒性は、CARまたはTIL療法に関連し得る。そのような神経毒性は、関連したCD19-CARであり得る。毒性は、脳内への過剰なT細胞浸潤に起因し得る。いくつかの実施形態では、神経毒性は、T細胞が血液脳関門を通過することを防止することによって緩和され得る。これは、内因性アルファ-4インテグリン阻害剤、例えば、タイサブリ／ナタリズマブの標的化遺伝子欠失によって達成され得、これらも本開示において有用であり得る。

【0433】

本明細書ではまた、本開示に従うリガンドを、それを必要とする対象に投与する方法が提供される。リガンドは、本開示のCA2生体回路を調整するのに有効な任意の量及び任意の投与経路を使用して対象または細胞に投与され得る。必要とされる正確な量は、対象の種、年齢、及び全般的状態、疾患の重症度、特定の組成物、その投与様式、その活性様式などに応じて対象毎に変化する。対象は、ヒト、哺乳動物、または動物であり得る。本開示に従う組成物は、典型的には、投与の容易性及び投薬量の均一性のために単位投薬形態で製剤化される。しかしながら、本開示の組成物の1日総使用量は、合理的な医学的判断の範囲内で担当医によって決定され得ることが理解される。所定の実施形態では、本開示に従うリガンドは、所望の効果をj得るために、1日1回またはより多くで、1日当たり約0.0001mg/kg～約100mg/kg、約0.001mg/kg～約0.05mg/kg、約0.005mg/kg～約0.05mg/kg、約0.001mg/kg～約0.005mg/kg、約0.05mg/kg～約0.5mg/kg、約0.01mg/kg～約50mg/kg、約0.1mg/kg～約40mg/kg、約0.5mg/kg～約30mg/kg、約0.01mg/kg～約10mg/kg、約0.1mg/kg～約10mg/kg、または約1mg/kg～約25mg/kg、約10mg/kg～約100mg/kg、約50mg/kg～約500mg/kg、約100mg/kg～約1000mg/kg対象体重を送達するのに十分な投薬量レベルで投与され得る。いくつかの実施形態では、投薬量レベルは、所望の効果をj得るために、1日1回またはより多くで、1日当たり1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、100mg/kg、110mg/kg、120mg/kg、130mg/kg、140mg/kg、150mg/kg、160mg/kg、170mg/kg、180mg/kg、190mg/kg対象体重であり得る。

【0434】

本開示は、本明細書に記載のリガンドのいずれかを細胞または組織に送達するための方法であって、細胞または組織を前記リガンドと接触させることを含む、方法を提供し、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*で達成され得る。所定の実施形態では、本開示に従うリガンドは、約1nM～約10nM、約5nM～約50nM、約10

nM～約100nM、約50nM～約500nM、約100nM～約1000nM、約1μM～約10μM、約5μM～約50μM、約10μM～約100μM、約25μM～約250μM、約50μM～約500μMを送達するのに十分な投薬量レベルで細胞に投与され得る。いくつかの実施形態では、リガンドは、限定されないが、0.00064μM、0.0032μM、0.016μM、0.08μM、0.4μM、1μM、2μM、10μM、50μM、75μM、100μM、150μM、175μM、200μM、250μMから選択される用量で細胞に投与され得る。

【0435】

本開示のリガンドの所望の投薬量は、1回のみ、1日3回、1日2回、1日1回、隔日、3日毎、1週毎、2週毎、3週毎、または4週毎に送達され得る。所定の実施形態では、所望の投薬量は、複数の投与（例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、またはそれより多くの投与）を使用して送達され得る。複数の投与が用いられる場合、分割投薬レジメン、例えば、本明細書に記載されるものが使用され得る。本明細書で使用される場合、「分割用量」は、「単回単位用量」または合計1日用量の2つまたはより多くの用量への分割、例えば、「単回単位用量」の2回またはより多くの投与である。本明細書で使用される場合、「単回単位用量」は、1つの用量で／1回／単一経路／単一接触点で、すなわち、単一投与事象で投与される任意の治療剤の用量である。本開示のリガンドの所望の投薬量は、「パルス用量」としてまたは「連続フロー」として投与され得る。本明細書で使用される場合、「パルス用量」は、所定期間にわたって設定された頻度で投与される任意の治療剤の一連の単回単位用量である。本明細書で使用される場合、「連続フロー」は、単一経路／単一接触点で所定期間で連続して投与される治療剤の用量、すなわち、連続投与事象である。総1日用量、すなわち、24時間で提供または処方される量は、これらの方法のいずれかによって、またはこれらの方法の組み合わせとして、または薬学的投与に好適な任意の他の方法によって投与され得る。

【0436】

投与

いくつかの実施形態では、免疫療法のための組成物は、*ex vivo*で細胞に投与され、その後、対象に投与され得る。

【0437】

いくつかの実施形態では、細胞の特質に応じて、細胞は、注射、輸液、注入、局所点滴または埋込によるものを含む多様な方法で宿主生物、例えば、哺乳動物に導入され得る。いくつかの態様では、本明細書に記載の細胞は、腫瘍の部位で導入され得る。用いられる細胞の数は、多くの状況、導入の目的、細胞の寿命、使用されるプロトコル、例えば、投与の回数、細胞の増殖能力などに依存する。細胞は、生理的に許容可能な媒体中にあり得る。

【0438】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞は、疾患または病態を有する対象に複数の用量で投与され得る。投与は通常、がんまたは臨床状態の1つまたはより多くの症状の改善を達成し、及び／またはがんもしくは臨床状態またはそれらの症状を処置または予防する。

【0439】

いくつかの実施形態では、免疫療法のための組成物は、*in vivo*で投与され得る。いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路、CA2エフェクター分子、SRE、対象となるペイロード（免疫療法剤）及び組成物を含む本開示のポリペプチドは、*in vivo*で対象に送達され得る。免疫療法剤の*in vivo*送達は、当該技術分野でよく記載されている。例えば、サイトカインの送達の方法は、EP特許番号EP0930892A1（その内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0440】

送達経路

本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R E（例えば、C A 2 D D）を含む）、ペイロード（例えば、免疫療法剤）、ベクター及び細胞は、治療的に有効なアウトカムを達成するために任意の経路によって投与され得る。

【0 4 4 1】

本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）は、治療的に有効なアウトカムを達成するために任意の経路によって投与され得る。これらには、経腸（腸内に）、胃腸、硬膜周囲（硬膜内に）、経口（口経由で）、経皮、硬膜外、脳内（大腦内に）、脳室内（脳室内に）、皮膚上（皮膚への塗布）、皮内（皮膚自体の中に）、皮下（皮膚の下に）、鼻腔内投与（経鼻で）、静脈内（静脈の中に）、静脈内ボラス、点滴静注、動脈内（動脈の中に）、筋肉内（筋肉の中に）、心臓内（心臓の中に）、骨内注入（骨髄の中に）、髄腔内（脊柱管の中に）、腹腔内、（腹腔の中への注入または注射）、洞内注入、硝子体内、（経眼で）、静脈内注入（病的腔の中に）、腔内（陰茎基部の中に）、腔内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮（全身分布用のインタクトな皮膚を介した拡散）、経粘膜（粘膜を介した拡散）、経膣、吹送法（吸引）、舌下、唇下、浣腸、点眼（結膜の上に）、点耳、耳介（耳の中または耳を介して）、頬側（頬に向けて）、結膜、皮膚、歯（歯（t o o t h）または歯（t e e t h））、電気浸透、子宮頸管内、洞内、気管内、体外、血液透析、浸透、間質内、腹腔内、羊膜内、関節内、胆管内、気管支内、嚢内、軟骨内（軟骨の中に）、尾内（馬尾の中に）、大槽内（小脳延髄大槽の中に）、角膜内（角膜の中に）、歯冠内（d e n t a l i n t r a c o r n a l）、冠動脈内（冠動脈の中に）、海綿体内（陰茎の海綿体の拡張可能な空間の中に）、椎間板内（椎間板の中に）、管内（腺管の中に）、十二指腸内（十二指腸の中に）、硬膜内（硬膜の中または下に）、表皮内（表皮に）、食道内（食道に）、胃内（胃の中に）、歯肉内（歯肉の中に）、回腸内（小腸の遠位部分の中に）、病巣内（局在化病巣の中またはそれに直接導入される）、管腔内（管の内腔内）、リンパ内（リンパの中に）、髄内（骨の骨髄腔の中に）、髄膜内（髄膜の中に）、心筋内（心筋の中に）、眼内（眼の中に）、卵巣内（卵巣の中に）、心膜内（心膜の中に）、胸膜内（胸膜の中に）、前立腺内（前立腺の中に）、肺内（肺またはその気管支の中に）、洞内（鼻または眼窩周囲の洞の中に）、髄腔内（脊柱の中に）、関節滑液嚢内（関節の滑膜腔の中に）、腱内（腱の中に）、精巣内（精巣の中に）、くも膜下腔内（任意レベルの脳脊髄軸の脳脊髄液の中に）、胸腔内（胸部の中に）、管内（器官の細管の中に）、腫瘍内（腫瘍の中に）、鼓室内（中耳の中に）、血管内（血管の中に）、脳室内（脳室の中に）、イオン導入（可溶性塩のイオンを身体組織に移動させる電流による）、灌注（傷口または体腔を浸すか、または洗い流すこと）、喉頭（喉頭に直接）、経鼻胃（鼻から胃の中に）、密封包帯療法（局所経路での投与後、領域を密封する包帯で覆う）、眼（外眼部へ）、口腔咽頭（口腔及び咽頭に直接）、非経口、経皮、関節周囲、硬膜外、神経周囲、歯周、直腸、呼吸器（局所的または全身的効果のための経口または経鼻吸入によって気道の中に）、眼球後方（脳橋の背後または眼球の背後）、心筋内（心筋内へ進入）、軟部組織、くも膜下、結膜下、粘膜下、局所、経胎盤（胎盤を介してまたは通過して）、経気管（気管の壁を介して）、経鼓膜（鼓室を通過してまたは介して）、尿管（尿管に）、尿道（尿道に）、腔、仙骨麻酔、診断、神経ブロック、胆汁灌流、心臓灌流、フォトフェレーシスまたは脊髄が含まれるがこれらに限定されない。

【0 4 4 2】

非経口及び注射投与

いくつかの実施形態では、本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）は、非経口で投与され得る。経口及び非経口投与のための液体投薬形態には、薬学的に許容可能なエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、及び／またはエリキシルが含まれるがこれらに限定されない。活性成分に加えて、液体投薬形態は、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコ

ール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実、塊根、トウモロコシ、胚芽、オリーブ、ヒマシ、及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物などの当該技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤を含み得る。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、アジュバント、例えば、湿潤剤、乳化及び懸濁剤、甘味、香味、及び／または風味剤を含み得る。非経口投与のための所定の実施形態では、組成物は、可溶化剤、例えば、CREMOPHOR（登録商標）、アルコール、油、変性油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー、及び／またはそれらの組み合わせと混合される。他の実施形態では、界面活性剤は、例えば、ヒドロキシプロピルセルロースが含まれる。

10

【0443】

注射用調製物、例えば、滅菌注射用水性または油性懸濁液は、好適な分散剤、湿潤剤、及び／または懸濁剤を使用して既知の技術に従って製剤化され得る。滅菌注射用調製物は、非毒性の非経口で許容可能な希釈剤及び／または溶媒中の滅菌注射用溶液、懸濁液、及び／またはエマルション、例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液であり得る。用いられ得る許容可能なビヒクル及び溶媒は、水、リンゲル液、U.S.P.、及び等張性塩化ナトリウム溶液である。滅菌固定油は、溶媒または懸濁媒体として好都合に用いられる。この目的のため、合成モノまたはジグリセリドを含む任意のブランドの固定油が用いられ得る。脂肪酸、例えば、オレイン酸が、注射剤の調製において使用され得る。

20

【0444】

注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを介する濾過によって、及び／または使用前に滅菌水または他の滅菌注射用媒体に溶解または分散され得る滅菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み込むことによって滅菌され得る。

【0445】

活性成分の効果を延長させるために、皮下または筋肉内注射からの活性成分の吸収を遅延させることがしばしば所望である。これは、水溶性が低い結晶性または非晶質物質の液体懸濁液の使用によって達成され得る。活性成分の吸収の速度は、溶解の速度に依存し、これは今度は、結晶サイズ及び結晶形態に依存し得る。代替的には、非経口で投与される薬物形態の吸収の遅延は、油ビヒクルに薬物を溶解または懸濁させることによって達成される。注射用デポ形態は、生分解性ポリマー、例えば、ポリラクチド-ポリグリコリド中のマイクロカプセル化された薬物のマトリックスを形成することによった作製される。薬物のポリマーに対する比及び用いられる特定のポリマーの特質に応じて、薬物放出の速度がコントロールされ得る。他の生分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）が含まれる。デポ注射用製剤は、身体組織と適合性のあるリポソームまたはマイクロエマルションに薬物を封入することによって調製される。

30

【0446】

眼または耳投与

いくつかの実施形態では、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、眼及び／または耳投与に好適な製剤で調製、包装、及び／または販売され得る。そのような製剤は、例えば、水性及び／または油性の液体賦形剤中の0.1/1.0%（w/w）の活性成分の溶液及び／または懸濁液を含む、眼滴下剤及び／または耳滴下剤の形態であり得る。そのような滴下剤は、緩衝剤、塩、及び／または本明細書に記載の任意の追加の成分の1つまたはより多くの他のものをさらに含み得る。有用な他の眼科的投与可能な製剤には、微結晶形態及び／またはリポソーム調製物に活性成分を含むものが含まれる。網膜下挿入物も投与の形態として使用され得る。

40

【0447】

検出可能な薬剤及び標識

刺激物、CA2生体回路システム及び成分、SRE及びペイロードを含むCA2エフェ

50

クターモジュールは、1つまたはより多くの放射性薬剤または検出可能な薬剤に関連付けまたは結合され得る。

【0448】

これらの薬剤には、様々な有機小分子、無機化合物、ナノ粒子、酵素または酵素基質、蛍光物質、発光物質（例えば、ルミノール）、生物発光物質（例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリン）、化学発光物質、放射性物質（例えば、 ^{18}F 、 ^{67}Ga 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 ^{82}Rb 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{133}Xe 、 ^{201}Tl 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^3H 、または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ （例えば、パーテクネート（テクネート（ VII ））、 TcO_4^- ）として）、及び造影剤（例えば、金（例えば、金ナノ粒子）、ガドリニウム（例えば、キレート化 Gd ）、酸化鉄（例えば、超常磁性酸化鉄（ SPiO ）、単結晶酸化鉄ナノ粒子（ MION ）、及び超小型超常磁性酸化鉄（ USPiO ））、マンガンキレート（例えば、 Mn-DPDP ）、硫酸バリウム、ヨード造影剤（イオヘキソール）、マイクロバブル、またはパーフルオロカーボン）が含まれる。

【0449】

いくつかの実施形態では、検出可能な薬剤は、活性化すると検出可能になる非検出可能な前駆体（例えば、蛍光性テトラジーンフルオロフォアコンストラクト（例えば、テトラジーン-BODIPY FL、テトラジーン-Oregon Green 488、またはテトラジーン-BODIPY TMR-X）または酵素活性化可能な蛍光性薬剤（例えば、 PROSENSE （登録商標）（ VisEn Medical ）））であり得る。酵素標識された組成物が使用され得る *in vitro* アッセイには、酵素結合免疫吸着アッセイ（ ELISA ）、免疫沈降アッセイ、免疫蛍光、酵素イムノアッセイ（ EIA ）、ラジオイムノアッセイ（ RIA ）、及びウエスタンブロット分析が含まれるがこれらに限定されない。

【0450】

キット

本開示は、本開示の方法を好都合及び／または効果的に行うための多様なキットを含む。典型的には、キットは、使用者が対象（複数可）の1つまたは複数の処置を実施すること、及び／または1つまたは複数の実験を実施することが可能となるのに十分な量及び／または数の成分を含む。

【0451】

一実施形態では、本開示は、*in vitro* または *in vivo* で遺伝子を阻害するためのキットであって、本開示の CA2 生体回路または本開示の CA2 生体回路の組み合わせを、任意の他の好適な活性剤と任意に組み合わせて含む、キットを提供する。

【0452】

キットは、包装及び指示書及び／または製剤組成物を形成するための送達剤をさらに含む得る。送達剤は、例えば、生理食塩水、緩衝溶液を含み得る。

【0453】

追加の実施形態では、アッセイスクリーニングキットが提供される。キットは、スクリーニングアッセイのための容器を含む。アッセイの使用のための指示書及びスクリーニング方法に関する情報がキットに含まれるべきである。

【0454】

IV. 用途

本開示の刺激物、 CA2 生体回路、 CA2 エフェクターモジュールのうちの1つまたはより多くを含む CA2 生体回路、 CA2 エフェクターモジュール、 SRE 、刺激物、組成物またはシステムは、治療、診断及び予後診断、バイオエンジニア、バイオプロセッシング、バイオ工場、研究機関、メタボロミクス、遺伝子発現、酵素補充などを含むがこれらに限定されない多様な用途において利用され得る。

【0455】

治療的使用

がん免疫療法

がん免疫療法は、がんに対する免疫系の反応性の誘導または回復を目的とする。免疫療法研究における著しい進歩は、能動的免疫療法及び受動的免疫療法に広く分類され得る様々なストラテジーの開発につながった。通常、これらのストラテジーは、がん細胞を直接的に殺傷するためまたは免疫抑制性腫瘍微小環境に対抗するために利用され得る。能動的免疫療法は、内因性の長期持続性腫瘍抗原特異的免疫反応の誘導を目的とする。反応は、免疫反応改変因子、例えば、サイトカインの非特異的刺激によってさらに向上し得る。対照的に、受動的免疫療法は、エフェクター免疫分子、例えば、腫瘍－抗原特異的細胞傷害性T細胞または抗体が宿主に投与されるアプローチを含む。このアプローチは、短命であり、複数の適用を必要とする。

【0456】

著しい進歩にもかかわらず、現行の免疫療法ストラテジーの有効性は、関連する毒性によって制限される。これらは、しばしば、免疫療法と関連する狭い治療ウィンドウに関連し、これは部分的に、臨床的に意味のある処置効果を得るために、潜在的に致命的な毒性の寸前まで治療用量を増やす必要性から浮かび上がる。さらに、養子移植免疫細胞は、患者内でしばしば予測不可能に増殖し続けるので、用量は *in vivo* で増大する。

【0457】

免疫療法に関与する主要なリスクは、腫瘍関連抗原（TAA）の正常な組織発現に反応するT細胞活性化に起因する標的上腫瘍外副作用である。特異的TAAに対してT細胞受容体を発現するT細胞を利用した臨床試験は、免疫療法に反応して皮膚発疹、大腸炎及び難聴を報告した。

【0458】

免疫療法はまた、腫瘍細胞が免疫療法に反応して殺傷される場合に出現する標的上腫瘍上毒性を発生させ得る。有害作用には、腫瘍溶解症候群、サイトカイン放出症候群及び関連するマクロファージ活性化症候群が含まれる。重要なことに、これらの有害作用は、腫瘍の破壊中に生じ得るので、成功裏の腫瘍上免疫療法であっても毒性をもたらす可能性がある。よって、免疫療法を制御可能にコントロールするためのアプローチは、毒性を低下させ、有効性を最大化する潜在性を有するため非常に望ましい。

【0459】

本開示は、がん免疫療法のためのシステム、組成物、免疫療法剤及び方法を提供する。これらの組成物は、免疫療法における遺伝子の発現及び機能の調整可能な制御を提供する。本開示はまたは、CA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、刺激反応要素（SRE）及びペイロード、ならびに前述のもののいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。一態様では、本開示のシステム、組成物、免疫療法剤及び他の成分は、別々に加えられる刺激物によってコントロールされ得、これはがん免疫療法を制御するための有意な柔軟性を提供する。さらに、本開示のシステム、組成物及び方法はまた、治療剤、例えば、化学療法剤、小分子、遺伝子療法、及び抗体と組み合わせられ得る。

【0460】

本開示のシステム及び組成物の調整可能な特質は、免疫療法の有効性の効力及び継続期間を改善する潜在性を有する。本開示の組成物を使用する養子移植細胞の生物学的活性の可逆的鎮静は、療法を回復できないほど頓挫させ、終結させることなく、細胞療法の潜在性を最大化することが可能である。

【0461】

本開示は、患者への投与の後に免疫療法を微調整するための方法を提供する。これは、今度は、免疫療法の安全性及び有効性を改善し、免疫療法から利益を受け得る対象集団を増加させる。

【0462】

一実施形態では、任意の薬剤の発現レベル及び活性を調整するCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、SRE、及び成分は、免疫療法のために使用され得る。非限定的な例として、免疫療法剤は、抗体ならびにその断片及びバリエーション、がん特異的T細胞受容体（TCR）及びそのバリエーション、抗腫瘍特異的キメラ抗原受容体（CAR）、キメ

10

20

30

40

50

ラスイッチ受容体、共阻害性受容体もしくはリガンドの阻害剤、共刺激性受容体及びリガンドのアゴニスト、サイトカイン、ケモカイン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、可溶性成長因子、代謝因子、自殺遺伝子、ホーミング受容体、または細胞及び対象において免疫反応を誘導する任意の薬剤であり得る。

【0463】

いくつかの実施形態では、免疫反応を誘導するための組成物は、CA2エフェクターモジュールを含み得る。いくつかの実施形態では、CA2エフェクターモジュールは、少なくとも1つのペイロードに機能可能に連結された刺激反応要素(SRE)を含み得る。一態様では、ペイロードは、免疫療法剤であり得る。

【0464】

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、及び組成物は、免疫療法剤のタンパク質(ペイロード)機能抗腫瘍免疫反応の翻訳後制御に関する。

【0465】

1. 養子細胞移植(養子免疫療法)

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、SRE(例えば、CA2 DD)、及び／または対象となるペイロード(免疫療法剤)を発現するように遺伝子改変された細胞は、養子細胞療法(ACT)のために使用され得る。本明細書で使用される場合、養子細胞移植は、直接的な抗がん活性を有する免疫細胞(自己、同種または遺伝子改変された宿主由来のもの)の投与を指す。ACTは、悪性及び感染性疾患に対する臨床用途で期待されている。例えば、CD19を認識するように遺伝子修飾されたT細胞が、濾胞性B細胞リンパ腫を処置するために使用されており(Kochenderfer et al., Blood, 2010, 116:4099-4102; 及びKochenderfer and Rosenberg, Nat Rev Clin Oncol., 2013, 10(5):267-276)、抗腫瘍T細胞受容体を発現するように遺伝子改変された自己リンパ球を使用するACTが、転移性黒色腫を処置するために使用されている(Rosenberg and Dudley, Curr. Opin. Immunol. 2009, 21:233-240)。

【0466】

本開示によれば、CA2生体回路及びシステムは、養子細胞療法などの細胞療法の開発及び実行において使用され得る。細胞療法においては有用な所定のエフェクターモジュールは、国際公開番号WO2017/180587(その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)における図7~12に提供されている。CA2生体回路、CA2エフェクターモジュールならびにそれらのSRE及びペイロードは、CAR療法をもたらすための細胞療法において、TILの操作または制御において、同種細胞療法において、他の処置ライン(例えば、放射線、サイトカイン)と組み合わせたT細胞療法において、修飾されたTCR、もしくは改変されたTCRをコードするために、またはTCR以外のT細胞を(例えば、サイトカイン遺伝子、チェックポイント阻害剤のための遺伝子PD1、CTLA4を導入することによって)増強するために使用され得る。

【0467】

本明細書では、養子細胞療法において使用するための方法が提供される。方法は、それを必要とする対象を事前コンディショニングすること、免疫細胞を本開示のSRE、CA2生体回路及び組成物で調節すること、本開示の組成物を発現する修飾された免疫細胞を対象に投与すること、ならびに対象内での修飾された細胞の生着の成功を伴う。

【0468】

いくつかの実施形態では、本開示のSRE、CA2生体回路及び組成物は、養子細胞療法に関連するレジメンの事前コンディショニングレジメンを最小化するために使用され得る。本明細書で使用される場合、「事前コンディショニング」は、養子細胞療法のアウトカムを改善するために対象に投与される任意の治療レジメンを指す。事前コンディショニングストラテジーには、全身照射及び／またはリンパ球枯渇化学療法が含まれるがこれら

10

20

30

40

50

に限定されない。事前コンディショニングを伴わない養子療法の臨床試験は、いかなる臨床的利益も実証することができず、A C Tにおけるその重要性を示唆している。さらに、事前コンディショニングは、重大な毒性に関連し、A C Tに好適な対象コホートを制限する。いくつかの例では、A C Tのための免疫細胞は、事前コンディショニングの必要性を減少させるために本開示のS R Eを使用してペイロードとしてサイトカイン、例えば、I L 1 2及びI L 1 5を発現するように修飾され得る（P e n g r a m e t a l . (2 0 1 2) B l o o d 1 1 9 (1 8) : 4 1 3 3 - 4 1 ; その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる）。

【0469】

いくつかの実施形態では、A C Tのための免疫細胞は、樹状細胞、T細胞、例えば、C D 8 + T細胞及びC D 4 + T細胞、ナチュラルキラー（N K）細胞、N K T細胞、細胞傷害性Tリンパ球（C T L）、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）、リンホカイン活性化キラー（L A K）細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞（T r e g）、ヘルパーT細胞、サイトカイン誘導キラー（C I K）細胞、及びそれらの任意の組み合わせであり得る。他の実施形態では、A C Tのための免疫刺激性細胞は、胚幹細胞（E S C）及び誘導多能性幹細胞（i P S C）から生成され得る。いくつかの実施形態では、自己または同種免疫細胞がA C Tのために使用される。

【0470】

いくつかの実施形態では、A C Tのために使用される細胞は、対象となる腫瘍細胞上の抗原に特異的な抗原結合ドメインを含むC A Rを発現するように修飾されたT細胞であり得る。他の実施形態では、A C Tのために使用される細胞は、対象となる腫瘍細胞上の抗原に特異的な抗原結合ドメインを含むC A Rを発現するように修飾されたN K細胞であり得る。免疫療法のための遺伝子改変されたT細胞（例えば、C A R T細胞）の養子移植に加えて、C A Rを発現する白血球の別のタイプが、単独でまたはC A R T細胞と組み合わせ、養子免疫療法のために使用され得る。一例では、T細胞及びN K細胞の混合物がA C Tのために使用され得る。T細胞及びN K細胞におけるC A Rの発現レベルは、本開示によれば、C A 2エフェクターモジュールにおいてC A Rに機能可能に連結されたD D（複数可）に結合する小分子によって調整及びコントロールされる。

【0471】

いくつかの実施形態では、本開示のC A Rは、T細胞の効力を向上させつつ、均一なC A R発現を達成するためにT細胞においてT細胞受容体アルファ定常（T R A C）遺伝子座の転写コントロール下に置かれ得る。T R A C遺伝子座は、C R I S P R / C a s 9、ジnkフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、T A L E Nを使用して破壊され、それに続いてC A Rコンストラクトが挿入され得る。T R A C遺伝子座に誘導されるC A Rコンストラクトを修飾する方法は、E y q u e m J . e t a l (2 0 1 7) N a t u r e . 5 4 3 (7 6 4 3) : 1 1 3 - 1 1 7（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0472】

いくつかの実施形態では、本組成物を発現するように修飾されたN K細胞は、A C Tのために使用され得る。N K細胞活性化は、標的細胞におけるパーフォリン／グランザイム依存性アポトーシスを誘導する。N K細胞活性化はまた、サイトカイン分泌、例えば、I F N γ 、T N F - α 及びG M - C S Fを誘導する。これらのサイトカインは、マクロファージの食細胞機能及びそれらの抗菌活性を向上させ、樹状細胞（D C）などの抗原提示細胞による抗原提示の上方制御を介して適応免疫応答を増強する（V i v i e r e t a l . , N a t . I m m u n o l . , 2 0 0 8 , 9 (5) : 5 0 3 - 5 1 0によってレビューされる）。

【0473】

遺伝子改変の他の例は、キメラ抗原受容体（C A R）の導入及び阻害性N K細胞受容体、例えば、N K G 2 Aの下方制御を含み得る。

【0474】

NK細胞はまた、腫瘍細胞との相互作用の際にNK細胞阻害性シグナルを回避するように遺伝子的にリプログラミングされ得る。例えば、CRISPR、ZF N、またはTALENを使用してNK細胞を遺伝子的に改変してそれらの阻害性受容体を鎮静させることは、NK細胞の抗腫瘍能力を向上させ得る。

【0475】

免疫細胞は、当該技術分野で知られている多様な方法を使用してex vivoで単離され、増殖され得る。例えば、細胞傷害性T細胞を単離し、増殖させる方法は、米国特許番号6,805,861及び6,531,451；米国特許公開番号US20160348072A1及び国際特許公開番号WO2016168595A1（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。NK細胞の単離及び増殖は、米国特許公開番号US20150152387A1、米国特許番号7,435,596；及びOyer, J. L. (2016). Cytotherapy. 18 (5): 653-63（これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。特に、ヒト初代NK細胞は、フィーダー細胞、例えば、膜結合型IL15、IL21、IL12及び4-1BBLを発現するように遺伝子改変された骨髓細胞株の存在下で増殖され得る。

【0476】

いくつかの例では、免疫細胞のサブ集団は、ACTのために濃縮され得る。免疫細胞濃縮のための方法は、国際特許公開番号WO2015039100A1で教示されている。別の例では、B及びTリンパ球アテニューエーターマーカーBT LA）について陽性のT細胞は、米国特許番号9,512,401（その各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、抗がん反応性であるT細胞を濃縮するために使用され得る。

【0477】

いくつかの実施形態では、ACTのための免疫細胞は、T細胞増殖を向上させるために特定のサブ集団が枯渇され得る。例えば、免疫細胞は、米国特許公開番号US20160298081A1（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている方法を使用して抗腫瘍免疫反応を最小化するためにFoxp3+Tリンパ球が枯渇され得る。

【0478】

いくつかの実施形態では、ACTのためのT細胞の活性化及び増殖は、細胞表面上の一過性に発現したキメラ抗原受容体(CAR)の抗原刺激によって達成される。そのような活性化方法は、国際特許番号WO2017015427（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている。

【0479】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、抗原提示細胞(APC)に関連した抗原によって活性化され得る。いくつかの実施形態では、APCは、抗原特異的または非特異的な樹状細胞、マクロファージまたはB細胞であり得る。APCは、それらの器官において自己または同種であり得る。いくつかの実施形態では、APCは、人工抗原提示細胞(aAPC)、例えば、細胞系aAPCまたは無細胞aAPCであり得る。細胞系aAPCは、遺伝子改変された同種細胞、例えば、ヒト赤白血病細胞または異種細胞、例えば、マウス線維芽細胞及びショウジョウバエ細胞から選択され得る。代替的には、APCは、無細胞であり得、その場合、抗原または共刺激性ドメインが、合成表面、例えば、ラテックスビーズ、ポリスチレンビーズ、脂質ベシクルまたはエクソソーム上に提示される。

【0480】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞、特にT細胞は、人工細胞プラットフォームを使用して増殖され得る。一実施形態では、成熟T細胞は、Seet CS et al. 2017. Nat Methods. 14, 521-530（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）によって記載された人工胸腺オルガノイド(ATO)を使用して生成され得る。ATOは、デルタ様カノニカルノッチリガンド(DLL1)

を発現する間質細胞株に基づく。この方法では、間質細胞は、遠心分離によって造血幹細胞及び前駆細胞と凝集され、気液界面における細胞培養インサート上に配置されて、オルガノイド培養物が生成される。ATO由来T細胞は、ナイーブ表現型、多様なT細胞受容体(TCR)レパートリー及びTCR依存性機能を有する。

【0481】

いくつかの実施形態では、養子細胞療法は、自己移植によって行われ、その場合、細胞は、処置を必要とする対象に由来し、細胞は、単離及びプロセッシングの後、同じ対象に投与される。他の例では、ACTは、最終的に細胞療法を受けるレシピエント対象以外のドナー対象から細胞が単離及び／または調製される同種移植を伴い得る。ドナー及びレシピエント対象は、遺伝的に同一、もしくは類似し得、または同じHLAクラスもしくはサブタイプを発現し得る。

10

【0482】

いくつかの実施形態では、ACTのための免疫細胞(例えば、T細胞及びNK細胞)に導入される複数の免疫療法剤は、同じCA2生体回路によってコントロールされ得る。他の実施形態では、ACTのための免疫細胞(例えば、T細胞及びNK細胞)に導入される複数の免疫療法剤は、異なるCA2生体回路によってコントロールされ得る。別の例では、自殺遺伝子及びCARコンストラクトが、2つの別個のCA2エフェクターモジュールに連結され得る。

【0483】

本開示のSRE、CA2生体回路及び組成物を使用する遺伝子調節の後、細胞は、それを必要とする対象に投与される。養子細胞療法のための細胞の投与のための方法は知られており、提供される方法及び組成物に関連して使用され得る。例えば、養子T細胞療法の方法は、例えば、Gruenbergらの米国特許出願公開番号2003/0170238; Rosenbergの米国特許番号4,690,915; Rosenberg(2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)に記載されている。例えば、Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10):928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4):e61338(これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

20

30

【0484】

いくつかの実施形態では、ACTのための免疫細胞は、免疫細胞の活性化、浸潤、増殖、生存及び抗腫瘍機能を促進する1つまたはより多くの免疫療法剤を発現するように改変され得る。免疫療法剤は、異なる標的分子に特異的な第2のCARもしくはTCR; サイトカインもしくはサイトカイン受容体; 阻害性シグナルを刺激性シグナルに変換するキメラスイッチ受容体; 養子移植細胞を標的部位、例えば、腫瘍組織に誘導するホーミング受容体; 免疫細胞の代謝を最適化する薬剤; または養子細胞移植後に重篤事象が観察された場合にもしくは移植された免疫細胞がもはや必要でない場合に活性化したT細胞を殺傷する安全性スイッチ遺伝子(例えば、自殺遺伝子)であり得る。

【0485】

40

いくつかの実施形態では、養子細胞移植のために使用される免疫細胞は、がん患者における腫瘍を殺傷するそれらの能力をさらに改善する全体的目的のために、それらの持続性、細胞傷害性、腫瘍標的化能力、及びin vivoで疾患部位にホーミングする能力を改善するように遺伝子操作され得る。1つの例は、サイトカイン、例えば、ガンマーサイトカイン(IL2及びIL15)を含む本開示のCA2エフェクターモジュールを免疫細胞に導入して、免疫細胞の増殖及び生存を促進することである。細胞へのサイトカイン遺伝子(例えば、ガンマーサイトカインIL2及びIL15)の形質導入は、外因性サイトカインを加えることなく免疫細胞を増殖させることができ、サイトカインを発現するNK細胞は、向上した腫瘍細胞傷害性を有する。

【0486】

50

いくつかの実施形態では、C A 2 生体回路、S R E または C A 2 エフェクターモジュールは、T 細胞消耗を防止するために利用され得る。本明細書で使用される場合、「T 細胞消耗」は、慢性 T 細胞活性化によって引き起こされる T 細胞機能の段階的及び進行性喪失を指す。T 細胞消耗は、抗ウイルス及び抗腫瘍免疫療法の有効性を限定する主要な要因である。消耗 T 細胞は、高いアポトーシス率及び複数の阻害性受容体の高い表面発現と同時に、低い増殖性及びサイトカイン生成能力を有する。消耗につながる T 細胞活性化は、抗原の存在または非存在下のいずれかで生じ得る。

【0487】

いくつかの実施形態では、C A 2 生体回路及びそれらの成分は、キメラ抗原受容体-T 細胞療法 (C A R-T) の文脈において T 細胞消耗を防止するために利用され得る。この観点において、いくつかの例における消耗は、C A R の細胞内ドメインの連続的活性化につながる細胞表面上の C A R の s c F v のオリゴマー化によって引き起こされ得る。非限定的な例として、本開示の C A R は、オリゴマー化することができない s c F v を含み得る。別の非限定的な例として、細胞表面上の慢性的な s c F v オリゴマー化を防止するために、抗原曝露後に迅速に内在化され、再発現する C A R も選択され得る。一実施形態では、s c F v のフレームワーク領域は、構成的 C A R シグナル伝達を防止するために改変され得る (Long et al., 2014, Cancer Research, 74 (19) S1 (その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる))。本開示の調整可能な C A 2 生体回路はまた、慢性 T 細胞活性化を防止するために T 細胞表面上の C A R の表面発現を制御するために使用され得る。本開示の C A R はまた、消耗を最小化するために修飾され得る。非限定的な例として、41-BB シグナル伝達ドメインは、T 細胞消耗を改善するために C A R 設計に組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、Long H A らによって開示された戦略のいずれかが、消耗を防止するために利用され得る (Long A H et al., (2015) Nature Medicine 21, 581-590 (その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる))。

【0488】

いくつかの実施形態では、本開示の C A 2 生体回路の調整可能な特質は、緊張性 C A R シグナル伝達で観察されるヒト T 細胞消耗を逆転させるために利用され得る。本開示の組成物を使用する養子移植細胞の生物学的活性の可逆的鎮静は、後に T 細胞を再活性化し得る緊張性シグナル伝達を逆転させるために使用され得る。消耗の逆転は、消耗に関連する複数の阻害性受容体の下方制御によって測定され得る。

【0489】

いくつかの実施形態では、T 細胞代謝経路は、T 細胞の消耗に対する感受性を減弱させるために改変され得る。代謝経路には、解糖、尿素回路、クエン酸回路、ベータ酸化、脂肪酸生合成、ペントースリン酸経路、ヌクレオチド生合成、及びグリコーゲン代謝経路が含まれ得るがこれらに限定されない。非限定的な例として、解糖の速度を低下させるペイロードが、T 細胞消耗を制限または防止するために利用され得る (Long et al., Journal for Immunotherapy of Cancer 2013, 1 (Suppl 1): P21 (その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる))。一実施形態では、本開示の T 細胞は、解糖の阻害剤、例えば、2-デオキシグルコース、及びラパマイシンと組み合わせて使用され得る。

【0490】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、T 細胞消耗に関連する T 細胞表面マーカーを標的とする抗体または断片と併せて使用され得る。使用され得る T 細胞消耗に関連する T 細胞表面マーカーには、C T L A-1、P D-1、T G I T、L A G-3、2 B 4、B T L A、T I M 3、V I S T A、及び C D 9 6 が含まれるがこれらに限定されない。

【0491】

一実施形態では、本開示のペイロードは、早期 T 細胞消耗に関連するマーカーの上方制御を示さない C D 2 7 6 C A R (C D 2 8、4-I B B、及び C D 3 ゼータ細胞内ドメインを有する) であり得る (国際特許公開番号 W O 2 0 1 7 0 4 4 6 9 9 (その内容は、

10

20

30

40

50

それらの全体が参照により組み込まれる) 参照)。

【0492】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、対象におけるTIL（腫瘍浸潤リンパ球）集団を変化させるために利用され得る。一実施形態では、本明細書に記載のペイロードのいずれかは、CD4陽性細胞のCD8陽性集団に対する比を変化させるために利用され得る。いくつかの実施形態では、TILは、*ex vivo*で選別され、本明細書に記載のサイトカインのいずれかを発現するように修飾され得る。本開示のペイロードは、TIL媒介免疫反応を向上させるためにTILのCD4及び／またはCD8集団を増殖させるために使用され得る。

【0493】

2. がんワクチン

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、対象となるペイロード（例えば、免疫療法剤）、ベクター、細胞及び組成物は、がんワクチンと併せて使用され得る。

【0494】

いくつかの実施形態では、がんワクチンは、腫瘍関連抗原（TAA）に由来するペプチド及び／またはタンパク質を含み得る。そのような戦略は、いくつかの例では、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）反応であり得る、対象における免疫反応を引き起こすために利用され得る。がんワクチンのために使用されるペプチドはまた、対象の変異プロファイルに合致するように改変され得る。例えば、療法を必要とする対象に見られる変異と合致する変異を有するEGFR由来ペプチドは、肺癌を有する患者において成功裏に使用されてきた（Li F et al. (2016) *Onc Immunology*. Oct 7; 5 (12): e1238539（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））。

【0495】

一実施形態では、本開示のがんワクチンは、スーパーアゴニストであるTAAに由来する変化したペプチドリガンド（APL）であり得る。これらは、1つまたはより多くのアミノ酸によってネイティブペプチド配列から逸脱した変異体ペプチドリガンドであり、特定のCTLクローンをネイティブエピトープよりも効果的に活性化する。これらの変化により、ペプチドは、制限クラスI MHC分子に対してより良好に結合し、または所与の腫瘍特異的CTLサブセットのTCRとより好ましく相互作用することが可能になり得る。APLは、米国特許公開番号US20160317633A1（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている方法を使用して選択され得る。

【0496】

3. 組み合わせ処置

いくつかの実施形態では、本開示の組成物、ベクター及び細胞を対象への投与のために組み合わせることが望ましい。異なる免疫療法剤を含む本開示の組成物は、免疫療法の向上のために組み合わせ使用され得る。

【0497】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物を、抗原特異的免疫反応の効力及び寿命を向上させ得るアジュバントと組み合わせることが望ましい。組み合わせ療法において免疫刺激剤として使用されるアジュバントには、生物学的分子または抗原を送達する送達担体が含まれる。非限定的な例として、本開示の組成物は、生物学的アジュバント、例えば、サイトカイン、トール様受容体、細菌毒素、及び／またはサポニンと組み合わせられ得る。他の実施形態では、本開示の組成物は、送達担体と組み合わせられ得る。例示的な送達担体には、ポリマーマイクロスフィア、免疫刺激複合体、エマルション（水中油または油中水）、アルミニウム塩、リポソームまたはビロソームが含まれる。

【0498】

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、

SRE（例えば、DD）及びペイロードを発現するように改変されたエフェクター免疫細胞は、本明細書に記載の生物学的アジュバントと組み合わせられ得る。CAR及びサイトカイン及びリガンドの二重制御は、内因性細胞T細胞増殖から標的媒介活性化の動態コントロールを分離する。そのような二重制御はまた、患者における事前コンディショニングレジメンの必要性を最小化する。非限定的な例として、DD制御CAR、例えば、CD19 CARは、CARの抗腫瘍有効性を向上させるためにサイトカイン、例えば、IL12と組み合わせられ得る（Pegram H. J., et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. Blood. 2012; 119: 4133-41（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））。別の非限定的な例として、Merchantらは、樹状細胞ベースのワクチン接種と組換えヒトIL7を組み合わせ、高リスクの小児肉腫患者におけるアウトカムを改善した（Merchant, M. S. et al. Adjuvant immunotherapy to Improve Outcome in High-Risk Pediatric Sarcomas. Clin Cancer Res. 2016. 22 (13): 3182-91（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））。

10

【0499】

いくつかの実施形態では、1つまたはより多くの抗原特異的TCRまたはCARを発現するように改変されたエフェクター免疫細胞は、免疫抑制性腫瘍微小環境を変換する免疫療法剤を含む本開示の組成物と組み合わせられ得る。

20

【0500】

一態様では、同じ細胞上の異なる標的分子に特異的なCARを発現するように改変されたエフェクター免疫細胞が組み合わせられ得る。別の態様では、同じCARコンストラクトを発現するように改変された異なる免疫細胞、例えば、NK細胞及びT細胞は、腫瘍処置のために組み合わせ使用され得る。例えば、CD19 CARを発現するように改変されたT細胞は、同じCD19 CARを発現するように改変されたNK細胞と組み合わせられて、B細胞悪性腫瘍を処置し得る。

【0501】

他の実施形態では、CARを発現するように改変された免疫細胞は、チェックポイント阻害剤と組み合わせられ得る。

30

【0502】

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、SRE（例えば、CA2 DD）及びペイロードを発現するように改変されたエフェクター免疫細胞は、本開示のがんワクチンと組み合わせられ得る。

【0503】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本開示の組成物と、がん、感染疾患及び他の免疫不全障害の処置において有用な他の薬剤、例えば、抗がん剤との組み合わせを含み得る。本明細書で使用される場合、用語「抗がん剤」は、例えば、がん細胞を殺傷すること、がん細胞におけるアポトーシスを誘導すること、がん細胞の成長速度を低下させること、転移の発生率もしくは数を減少させること、腫瘍サイズを減少させること、腫瘍成長を阻害すること、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給を減少させること、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫反応を促進すること、がんの進行を防止もしくは阻害すること、またはがんを有する対象の寿命を延長することによって、対象におけるがんへの影響を及ぼすことが可能な任意の薬剤を指す。

40

【0504】

いくつかの実施形態では、抗がん剤または療法は、本開示と組み合わせて、処置の治療的有効性を改善する化学療法剤、または放射線療法、免疫療法剤、手術、または任意の他の治療剤であり得る。

【0505】

50

一実施形態では、CD19 CARを含むCA2エフェクターモジュールは、国際特許出願番号WO2016164580（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている方法を使用して、アミノピリミジン誘導体、例えば、バーキットチロシン受容体キナーゼ（BTK）阻害剤と組み合わせて使用され得る。

【0506】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、本明細書に記載の本発明の療法以外の免疫療法剤、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかの標的分子に特異的な抗体と組み合わせて使用され得る。

【0507】

例示的な化学療法には、限定されないが、アシピシン；アクリルピシン；アコダゾール塩酸塩；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン；酢酸アメタントロン；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペリン、スリンダク、クルクミン、ナイトロジェンマスタード、例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン及びクロラムブシルを含むアルキル化剤；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン（BCU）、ロムスチン（CCNU）、及びセムスチン（メチル-CCU）；チレンイミン／メチルメラミン、例えば、トリエチレンメラミン（TEM）、トリエチレン、チオホスホルアミド（チオテパ）、ヘキサメチルメラミン（HMM、アルトレタミン）；スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン；トリアジン、例えば、ダカルバジン（DTIC）；葉酸アナログ、例えば、メトトレキサート及びトリメトトレキサート、ピロリジンアナログ、例えば、5-フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタビン、シトシンアラビノシド（AraC、シタラビン）、5-アザシチジン、2,2'-ジフルオロデオキシシチジン、プリンアナログ、例えば、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アザチオプリン、2'-デオキシコホルマイシン（ペントスタチン）、エリスロヒドロキシノニルアデニン（EHNA）、フルダラビンホスフェート、及び2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン、2-CD A）を含む代謝拮抗剤；抗有糸分裂薬、例えば、パクリタキセル、ビンブラスチン（VLB）、ビンクリスチン、及びビノレルビンを含むビンカアルカロイド、タキソテル、エストラムスチン、ならびにリン酸エストラムスチンを含む天然産物；エピボドフィロ毒素、例えば、エトポシド及びテニポシド；抗生物質、例えば、アクチノマイシンD、ダウノマイシン（ルビドマイシン）、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、イダルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、マイトマイシンC、及びアクチノマイシン；酵素、例えば、L-アスパラギナーゼ、サイトカイン、例えば、インターフェロン（IFN）-ガンマ、腫瘍壊死因子（TNF）-アルファ、TNF-ベータ及びGM-CSF、抗血管新生因子、例えば、アンギオスタチン及びエンドスタチン、FGFまたはVEGFの阻害剤、例えば、可溶性VEGF/VEGF受容体を含む、血管新生因子のための受容体の可溶性形態、白金配位錯体、例えば、シスプラチン及びカルボプラチン、アントラセンジオン、例えば、ミトキサントロン、置換ウレア、例えば、ヒドロキシウレア、N-メチルヒドラジン（MIFf）及びプロカルバジンを含むメチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、例えば、ミトタン（o, p'-DDD）及びアミノグルテチミド；副腎皮質ステロイドアンタゴニスト、例えば、プレドニゾン及び同等物、デキサメタゾン及びアミノグルテチミドを含むホルモン及びアンタゴニスト；プロゲスチン、例えば、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン及び酢酸メゲストロール；エストロゲン、例えば、ジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール同等物；抗エストロゲン剤、例えば、タモキシフェン；プロピオン酸テストステロン及びフルオキシメステロン／同等物を含むアンドロゲン；抗アンドロゲン剤、例えば、フルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモンアナログ及びリユープロリド；非ステロイド性抗アンドロゲン剤、例えば、フルタミド；キナーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、メチル化阻害剤、プロテアソーム阻害剤、モノクローナル抗体、酸化剤、抗酸化剤、テロメラゼ阻害剤、BH3模倣体、ユビキチンリガーゼ阻害剤、stat阻害剤及び受容体チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、メシル酸イマチニブ（GleevecまたはG

10

20

30

40

50

livacとして上市されている）及びTarvecaとして現在上市されているエルロチニブ（EGF受容体阻害剤）；抗ウイルス剤、例えば、リン酸オセルタミビル、アンプオテリシンB、及びパリビズマブ；Sdi1模倣体；セムスチン；老化由来阻害剤1；スパルフォシン酸；スピカマイシンD；スピロムスチン；スプレノペンチン；スポンジスタチン1；スクアラミン；スチピアミド；ストロメライシン阻害剤；スルフィノシン；超活性血管作動性腸管ペプチドアンタゴニスト；ベラレゾール；ベラミン；ベルディン；ベルテポルフィン；ビノレルピン；ピンクサルチン；ビタキシン；ボロゾール；ザノテロン；ゼニプラチン；ジラスコルブ；ならびにジノスタチンステマラマー；PI3K β 小分子阻害剤、GSK2636771；pan-PI3K阻害剤（BKM120）；BRAF阻害剤、ベムラフェニブ（Zelboraf）及びダブラフェニブ（Tafinlar）；または前述のものの任意のアナログもしくは誘導体及びバリエーションが含まれる。

10

【0508】

放射線治療剤及び因子には、DNA損傷を誘導する放射線及び波、例えば、 γ -照射、X線、UV-照射、マイクロ波、電子放出、放射性同位体などが含まれる。療法は、局在化した腫瘍部位を上述した形態の放射線で照射することによって達成され得る。これらの因子のすべてが、DNAの前駆体、DNAの複製及び修復、ならびに染色体の集合及び維持に対して、広範囲の損傷DNAをもたらす可能性が最も高い。X線の線量範囲は、長期期間（3～4週）について50～200レントゲンの1日線量から2000～6000レントゲンの単回線量の範囲である。放射性同位体の線量範囲は、広く変化し、同位体の半減期、放出される放射線の強度及びタイプ、ならびに新生物細胞による取り込みに依存する。

20

【0509】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、免疫調節剤、例えば、レナリドミド（LEN）であり得る。最近の研究は、レナリドミドがCAR改変T細胞の抗腫瘍機能を向上させ得ることを実証した（Ota et al., Oncoimmunology, 2015, 5(4): e1115940）。抗腫瘍抗体のいくつかの例には、トシリズマブ、シルツキシマブが含まれる。

【0510】

本開示の組成物と組み合わせて使用され得る他の薬剤にはまた、細胞表面受容体及びそれらのリガンド、例えば、Fas/Fasリガンド、DR4またはDR5/TRAIL及びギャップ結合の上方制御に影響を及ぼす薬剤、細胞増殖抑制性及び分化剤、細胞接着の阻害剤、例えば、接着斑キナーゼ（FAK）阻害剤及びロバスタチン、またはアポトーシス誘導因子に対する高増殖性細胞の感受性を増加させる薬剤、例えば、抗体C225が含まれ得るがこれらに限定されない。

30

【0511】

組み合わせは、本開示の組成物及び他の薬剤を同じ時間でまたは別々に投与することを含み得る。代替的には、本免疫療法は、数分、数日、数週間から数ヶ月の範囲の間隔で他の薬剤／療法に先行または後続し得る。

【0512】

4. 疾患

本開示では、腫瘍体積または負荷の減少を、必要とする対象において行う方法であって、本開示の組成物を対象に導入することを含む、方法が提供される。

40

【0513】

本開示はまたは、対象におけるがんを処置するための方法であって、本開示の少なくとも1つのCA2エフェクターモジュールを発現するように遺伝子改変された有効量のエフェクター免疫細胞を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0514】

がん

様々ながんは、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）で処置され得る。本

50

明細書で使用される場合、用語「がん」は、周囲組織を侵し、新たな身体部位に転移する傾向がある未分化細胞の増殖を特徴とする様々な悪性新生物のいずれかを指し、また、そのような悪性新生物の成長を特徴とする病理学的状態を指す。がんは、腫瘍または血液悪性腫瘍であり得、すべてのタイプのリンパ腫／白血病、がん及び肉腫、例えば、肛門、膀胱、胆管、骨、脳、乳房、子宮頸部、結腸／直腸、子宮内膜、食道、眼、胆嚢、頭頸部、肝臓、腎臓、喉頭、肺、縦隔（胸部）、口、卵巣、膵臓、陰茎、前立腺、皮膚、小腸、胃、脊髄、尾骨、精巣、甲状腺及び子宮に見られるそれらのがんまたは腫瘍を含むがこれらに限定されない。

【0515】

本開示の組成物で処置され得るがんのタイプには、パピローマ／がん、絨毛癌、内胚葉洞腫瘍、奇形腫、腺腫／腺癌、黒色腫、線維腫、脂肪腫、平滑筋腫、横紋筋腫、中皮腫、血管腫、骨腫、軟骨腫、神経膠腫、リンパ腫／白血病、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞未分化癌、基底細胞癌及び副鼻腔未分化癌が含まれるがこれらに限定されない。

【0516】

本開示の組成物で処置され得る肉腫のタイプには、軟組織肉腫、例えば、胞巣状軟部肉腫、血管肉腫、皮膚線維肉腫、類腱腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、骨外性軟骨肉腫、骨外性骨肉腫、線維肉腫、血管周囲細胞腫、血管肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、リンパ肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、滑液肉腫、及びアスキン腫瘍、ユーイング肉腫（未分化神経外胚葉腫瘍）、悪性血管内皮腫、悪性神経鞘腫、骨肉腫、及び軟骨肉腫が含まれるがこれらに限定されない。

【0517】

感染性疾患

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路は、感染性疾患の処置のために使用され得る。本開示のCA2生体回路は、養子細胞移植に好適な細胞、例えば、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、及び／またはT細胞において導入され得る。本開示のCA2生体回路によって処置される感染性疾患は、ウイルス、細菌、真菌、及び／または寄生生物によって引き起こされる疾患であり得る。本開示のIL15-IL15Raペイロードは、感染性疾患の処置において有用な免疫細胞増殖及び／または免疫細胞の持続性を増加させるために使用され得る。

【0518】

本明細書における「感染性疾患」は、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞に感染し、疾患状態を引き起こす任意の病原体または物質によって引き起こされる疾患を指す。その例には、細菌、酵母、真菌、原生動物、マイコプラズマ、ウイルス、プリオン、及び寄生生物が含まれる。例には、(a) 例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、HSV-I、HSV-II、CMV、またはVZV）、ポックスウイルス（例えば、オルトポックスウイルス、例えば、天然痘またはワクシニア、または伝染性軟属腫）、ピコルナウイルス（例えば、ライノウイルスまたはエンテロウイルス）、オルトミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、及び呼吸器合胞体ウイルス（RSV））、コロナウイルス（例えば、SARS）、パポバウイルス（例えば、パピローマウイルス、例えば、生殖器疣贅、一般的な疣贅、または足底疣贅を引き起こすもの）、肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎ウイルス）、フラビウイルス（例えば、C型肝炎ウイルスまたはデングウイルス）、またはレトロウイルス（例えば、レンチウイルス、例えば、HIV）による感染に起因する疾患などのウイルス性疾患；(b) 例えば、Escherichia、Enterobacter、Salmonella、Staphylococcus、Shigella、Listeria、Aerobacter、Helicobacter、Klebsiella、Proteus、Pseudomonas、Streptococcus、Chlamydia、Mycoplasma、Pneumococcus、Neisseria、Clostridium、Bacillus、Corynebacterium、Mycobacterium、Campylobacter、Vibri

10

20

30

40

50

o、Serratia、Providencia、Chromobacterium、Brucella、Yersinia、Haemophilus、またはBordetella属の細菌による感染に起因する疾患などの細菌性疾患；（c）他の感染性疾患、例えば、クラミジア、カンジダ症、アスペルギルス症、ヒストプラズマ症を含むがこれらに限定されない真菌性疾患、クリプトコッカス髄膜炎、マラリアを含むがこれに限定されない寄生虫疾患、ニューモシスチスカリニ肺炎、リーシュマニア症、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、及びトリパノソーマ感染症ならびにクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、致死性家族性不眠症及びクールーなどのヒト疾患を引き起こすプリオンに関与するものが含まれる。

10

【0519】

組み合わせ処置

本開示はさらに、他の医薬品及び／または他の治療方法、例えば、これらの障害を処置するために現在用いられているものなどの既知の医薬品及び／または既知の治療方法と組み合わせた、1つまたはより多くの形態のがんを処置するための本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）の使用に関する。例えば、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）はまた、1つまたはより多くの追加の抗がん処置、例えば、生物製剤、化学療法及び放射線療法と併せて投与され得る。したがって、処置には、例えば、イマチニブ（Gleevec）、all-trans-レチノイン酸、モノクローナル抗体処置（ゲムツズマブ、オゾガマイシン）、化学療法（例えば、クロラムブシル、プレドニゾン、プレドニゾロン、ビンクリスチン、シタラビン、クロファラビン、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、デシタビン、MDR1の阻害剤）、リツキシマブ、インターフェロン-α、アントラサイクリン薬（例えば、ダウノルビシンまたはイダルビシン）、L-アスパラギナーゼ、ドキシソルビシン、シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ブレオマイシン、フルダラビン、エトポシド、ペントスタチン、またはクラドリビン）、骨髄移植、幹細胞移植、放射線療法、代謝拮抗薬（メトトレキサート及び6-メルカプトプリン）、もしくは国際公開番号WO2017/180587（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）の表5で教示されている抗体のいずれかまたはそれらの組み合わせが含まれ得る。

20

30

【0520】

放射線との組み合わせ

放射線療法（放射線療法、X線療法、または照射とも称される）は、がん細胞を殺傷し、腫瘍を縮小するための電離放射線の使用である。放射線療法は、外部ビーム放射線療法（EBRT）を介して外部からまたは小線源療法を介して内部から投与され得る。放射線療法の効果は、処置されている領域に局在化され、限局される。放射線療法は、脳、乳房、子宮頸部、喉頭、肺、脾臓、前立腺、皮膚、胃、子宮、または軟部組織肉腫のがんを含む、ほぼすべてのタイプの固形腫瘍を処置するために使用され得る。放射線はまた、白血病及びリンパ腫を処置するために使用され得る。

40

【0521】

化学療法との組み合わせ

化学療法は、がん細胞を破壊し得る薬物でのがんの処置である。現在の使用法では、用語「化学療法」は、通常、標的療法とは対照的に、一般的に急速に分裂する細胞に影響を及ぼす細胞傷害性薬を指す。化学療法薬は、様々な可能な方法で、例えば、DNAの複製または新たに形成される染色体の分離を伴って細胞分裂に干渉する。ほとんどの形態の化学療法は、急速に分裂するすべての細胞を標的とし、がん細胞に特異的ではないが、ある程度の特異性は、多くのがん細胞がDNA損傷を修復できない（一方で、正常細胞は通常は可能である）ことに由来し得る。

【0522】

50

ほとんどの化学療法レジメンは、組み合わせで提供される。例示的な化学療法剤には、5-FUエンハンサー、9-AC、AG2037、AG3340、アグリカナーゼ阻害剤、アミノグルテチミド、アムサクリン(m-AMSA)、アスパラギナーゼ、アザシチジン、バチマスタット(BB94)、BAY12-9566、BCH-4556、ビスーナフタルイミド、ブスルファン、カペシタビン、カルボプラチン、6

【0523】

オサン、cdk4/cdk2阻害剤、クロロムブシル、CI-994、シスプラチン、クラドリビン、CS-682、シタラビンHCl、D2163、ダクチノマイシン、ダウノルビシンHCl、DepoCyt、デキシフォサミド、ドセタキセル、ドラスタイン、ドキシフルリジン、ドキシソルビシン、DX8951f、E7070、EGFR、エピルビシン、エリスロポエチン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エトポシド(VP16-213)、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、FK317、フラボピリドール、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル(5-FU)、フルタミド、フラジリン、ゲムシタビン、ヘキサメチルメラミン(HMM)、ヒドロキシウレア(ヒドロキシカルバミド)、イホスファミド、インターフェロンアルファ-2a、インターフェロンアルファ-2b、インターロイキン-2、イリノテカン、ISI641、クレスチン、レモナールDP2202、酢酸リュープロリド(LHRH放出因子アナログ)、レバミソール、LIGLA(リチウム-ガンマリノレネート)、ロジンシード、ロメテキソール、ロムスチン(CCNU)、マリミスタット、メクロレタミンHCl(ナイトロジェンマスタード)、酢酸メゲストロール、メグラミンGLA、メルカプトプリン、メスナ、ミトグアゾン(メチル-GAG;メチルグリオキサールビス-グアニルヒドラゾン;MGBG)、ミトタン(o,p'-DDD)、ミトキサントロン、ミトキサントロンHCl、MMI270、MMP、MTA/LY231514、オクトレオチド、ODN698、OK-432、オーラル白金、オーラルタキソイド、パクリタキセル(TAXOL.RTM.)、PARP阻害剤、PD183805、ペントスタチン(2'-デオキシコルフォルマイシン)、PKC412、プリカマイシン、プロカルバジンHCl、PSC833、ラリトレキシド、RASファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、RASがん遺伝子阻害剤、セムスチン(メチル-CCNU)、ストレプトゾシン、スラミン、クエン酸タモキシフェン、タキサンアナログ、テモゾロミド、テニポシド(VM-26)、チオグアニン、チオテパ、トポテカン、チロシンキナーゼ、UFT(テガフル/ウラシル)、バルルビシン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンデシン、VX-710、VX-853、YM116、ZD0101、ZD0473/アノルメド、ZD1839、ZD9331が含まれるがこれらに限定されない。

【0524】

免疫腫瘍学及び細胞療法

がんの分野における最近の進歩により、免疫系ががんを寄せ付けないことを補助するいくつかのアプローチが開発された。そのような免疫療法アプローチには、モノクローナル抗体を介するまたはex vivo修飾T細胞(例えば、キメラ抗原受容体または修飾T細胞受容体を含む)の養子移植を介するがん抗原の標的化が含まれる。

【0525】

いくつかの実施形態では、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール(それらのSREまたはペイロードを含む)は、1つまたはより多くのがんを標的とするための免疫系の調節または変化または利用において使用され得る。このアプローチはまた、他のそのような生物学的アプローチ、例えば、免疫反応改変療法、例えば、インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子、他のモノクローナル抗体、ワクチン、遺伝子療法の投与と共に考えられ得、非特異的免疫調節剤もまた、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール(それらのSREまたはペイロードを含む)と組み合わせられる抗がん療法として想定される。

【0526】

がん免疫療法は、患者自身の免疫系を誘導してがんを攻撃するように設計された治療ストラテジーの多様な集まりを指す。いくつかの実施形態では、本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R E またはペイロードを含む）は、免疫腫瘍学治療剤として設計される。

【0527】

細胞療法

腫瘍浸潤リンパ球（T I L）療法、キメラ抗原受容体（C A R）を保有する遺伝子修飾されたT細胞、及び組換えT C R技術を含む、いくつかのタイプの細胞性免疫療法が存在する。

【0528】

本開示によれば、C A 2 生体回路及びシステムは、養子細胞療法などの細胞療法の開発及び実行において使用され得る。細胞療法において有用な所定のC A 2 エフェクターモジュールは、国際公開W O 2 0 1 7 / 1 8 0 5 8 7 の図8～13（それらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で提供されている。C A 2 生体回路、C A 2 エフェクターモジュールならびにそれらのS R E 及びペイロードは、T C R 除去-T C R 遺伝子破壊、T C R 修飾をもたらすための細胞療法において、エピトープタグ化受容体を制御するために、T細胞を刺激するためのA P C プラットフォームにおいて、e x v i v o でのA P C 刺激を増強するためのツールとして、T細胞増殖の方法を改善するために、抗原によるe x v i v o 刺激において、T C R / C A R の組み合わせにおいて、T I L の操作または調節において、同種細胞療法において、他の処置ライン（例えば、放射線、サイトカイン）と組み合わされたT細胞療法において、修飾されたT C R、もしくは改変されたT C R をコードするために、またはT C R 以外のT細胞を（例えば、サイトカイン遺伝子、チェックポイント阻害剤のための遺伝子P D 1、C T L A 4 を導入することによって）増強するために使用され得る。

【0529】

いくつかの実施形態では、細胞療法の補助下で改善された反応率が得られる。

【0530】

細胞集団の増殖及び持続性は、T細胞、NK細胞または他の免疫関連細胞におけるペイロード、例えば、受容体または経路成分の制御または微調整を介して達成され得る。いくつかの実施形態では、C A 2 生体回路、S R E またはC A 2 エフェクターモジュールは、T細胞またはNK細胞反応を向上させるタンパク質の発現を空間的及び／または時間的にコントロールするように設計される。いくつかの実施形態では、C A 2 生体回路、S R E またはC A 2 エフェクターモジュールは、T細胞またはNK細胞反応を阻害するタンパク質の発現を空間的及び／または時間的にコントロールするように設計される。

【0531】

いくつかの実施形態では、C A 2 生体回路、S R E またはC A 2 エフェクターモジュールは、腫瘍微小環境を再構築して生体回路または薬学的組成物の有用性を直接的細胞殺傷を超えて拡張するように設計される。

【0532】

いくつかの実施形態では、C A 2 生体回路、S R E またはC A 2 エフェクターモジュールは、C A R サイトカインストームを減少、緩和または排除するように設計される。いくつかの実施形態では、そのような減少、緩和及び／または排除は、固形腫瘍または腫瘍微小環境において生じる。

【0533】

いくつかの実施形態では、C A 2 エフェクターモジュールは、1つまたはより多くのサイトカインをコードし得る。

【0534】

いくつかの実施形態では、細胞の増殖のために使用される本開示のC A 2 エフェクターモジュールは、R a s スーパーファミリーの遺伝子のいずれかを含むペイロードを含み得る。

10

20

30

40

50

【0535】

免疫系は、がん以外の疾患の処置のために利用され得る。CA2生体回路、それらの成分、SREまたはCA2エフェクターモジュールは、自己免疫疾患、アレルギー、移植片対宿主病、ならびに免疫不全、例えば、後天性免疫不全症候群(AIDS)をもたし得る疾患及び障害を含むがこれらに限定されない疾患の処置のための免疫療法において利用され得る。

【0536】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、免疫細胞(例えば、T細胞及びNK細胞)に形質導入される場合、CARの細胞外標的部位によって認識される分子を発現する標的(例えば、腫瘍細胞)に対して免疫細胞を再誘導することができるキメラ抗原受容体(CAR)であり得る。

【0537】

いくつかの実施形態では、CARコンストラクトの標的化部位は、標的分子の天然リガンド、または標的分子を結合させることが可能なそのバリエーション及び／または断片であり得る。いくつかの態様では、CARの標的部位は、標的化分子の受容体であり得る。

【0538】

いくつかの実施形態では、CARの標的化部位は、発現が腫瘍細胞に限定される腫瘍特異的抗原(TSA)、例えば、がんネオアンチゲンを認識し得る。

【0539】

非限定的な例として、本開示のCARは、5T4、707-AP、A33、AFP(α-フェトプロテイン)、AKAP-4Aキナーゼアンカータンパク質4)、ALK、α5β1-インテグリン、アンドロゲン受容体、アネキシンII、アルファ-アクチニン-4、ART-4、B1、B7H3、B7H4、BAGE(B黒色腫抗原)、BCMA、BCR-ABL融合タンパク質、ベーターカテニン、BKT-抗原、BTAA、CA-I(カルボニックアンヒドラーゼI)、CA50(がん抗原50)、CA125、CA15-3、CA195、CA242、カルレチニン、CAIX(カルボニックアンヒドラーゼ)、CAMEL(黒色腫での細胞傷害性Tリンパ球認識抗原)、CAM43、CAP-1、カスパーゼ-8/m、CD4、CD5、CD7、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD27、CD27/m、CD28、CD30、CD33、CD34、CD36、CD38、CD40/CD154、CD41、CD44v6、CD44v7/8、CD45、CD49f、CD56、CD68/KP1、CD74、CD79a/CD79b、CD103、CD123、CD133、CD138、CD171、cdc27/m、CDK4(サイクリン依存性キナーゼ4)、CDKN2A、CDS、CEA(がん胎児性抗原)、CEACAM5、CEACAM6、クロモグラニン、c-Met、c-Myc、coa-1、CSAp、CT7、CT10、シクロフィリンB、サイクリンB1、細胞質チロシンキナーゼ、サイトケラチン、DAM-10、DAM-6、dek-can融合タンパク質、デスミン、DEPDC1(DEPドメイン含有1)、E2A-PRL、EBNA、EGF-R(上皮成長因子受容体)、EGP-1(上皮糖タンパク質-1)(TROP-2)、EGP-2、EGP-40、EGFR(上皮成長因子受容体)、EGFRvII、EF-2、ELF2M、EMMPRIN、EpCAM(上皮細胞接着分子)、EphA2、エプスタインバーウイルス抗原、Erb(ErbB1;ErbB3;ErbB4)、ETA(上皮腫瘍抗原)、ETV6-AML1融合タンパク質、FAP(線維芽細胞活性化タンパク質)、FBP(葉酸結合タンパク質)、FGF-5、葉酸受容体α、FOS関連抗原1、フコシルGM1、G250、GAGE(GAGE-1;GAGE-2)、ガラクトシン、GD2(ガングリオシド)、GD3、GFAP(グリア線維性酸性タンパク質)、GM2(がん胎児性抗原-免疫原性-1;OFA-I-1)、GnT-V、Gp100、H4-RET、HAGE(ヘリカーゼ抗原)、HER-2/neu、HIF(低酸素症誘導性因子)、HIF-1α、HIF-2α、HLA-A2、HLA-A*0201-R170I、HLA-ALL、HMWMAA、Hom/Mel-40、HSP70-2M(ヒートショックタンパク質70)、HST-2、HTgp-175、hTERT(

10

20

30

40

50

またはhTERT)、ヒトパピローマウイルス-E6/ヒトパピローマウイルス-E7及びE6、iCE(免疫捕捉EIA)、IGF-1R、IGH-IGK、IL2R、IL5、ILK(インテグリン連結キナーゼ)、IMP3(インスリン様成長因子II mRNA結合タンパク質3)、IRF4(インターフェロン制御性因子4)、KDR(キナーゼインサートドメイン受容体)、KIAA0205、KRAB-ジンクフィンガータンパク質(KID)-3;KID31、KSA(17-1A)、K-ras、LAGE、LCK、LDLR/FUT(LDLR-フコシルトランスフェラーゼAS融合タンパク質)、LEY(ルイスY)、MAD-CT-1、MAGE(チロシナーゼ、黒色腫関連抗原)(MAGE-1;MAGE-3)、メラノ-A腫瘍抗原(MART)、MART-2/Ski、MC1R(メラノコルチン1受容体)、MDM2、メソテリン、MPHOSPH1、MSA(筋肉特異的アクチン)、mTOR(ラパマイシンの哺乳動物標的)、MUC-1、MUC-2、MUM-1(黒色腫関連抗原(変異型)1)、MUM-2、MUM-3、ミオシン/m、MYL-RAR、NA88-A、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、neo-PAP、NF-KB(核因子-カッパB)、ニューロフィラメント、NSE(ニューロン特異的エノラーゼ)、ノッチ受容体、NuMa、N-Ras、NY-BR-1、NY-CO-1、NY-ESO-1、オンコスタチンM、OS-9、OY-TES1、p53変異体、p190マイナーbcr-abl、p15(58)、p185erbB2、p180erbB-3、PAGE(前立腺関連遺伝子)、PAP(前立腺酸ホスファターゼ)、PAX3、PAX5、PDGFR(血小板由来成長因子受容体)、ペペリジン及びピロリジン利用に関与するシトクロムP450(PIPA)、Pml-RARアルファ融合タンパク質、PR-3(プロテイナーゼ3)、PSA(前立腺特異的抗原)、PSSM、PSMA(前立腺幹細胞抗原)、PRAME(黒色腫の優先的に発現した抗原)、PTPRK、RAGE(腎臓腫瘍抗原)、Raf(A-Raf、B-Raf及びC-Raf)、Ras、受容体チロシンキナーゼ、RCAS1、RGSS、ROR1(受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1)、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-3、SCP-1、SDCCAG16、SP-17(精液タンパク質17)、srcファミリー、SSX(滑液肉腫Xブレークポイント)-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-3、SSX-4、SSX-5、STAT-3、STAT-5、STAT-6、STEAD、STn、スルビピン、syk-ZAP70、TA-90(Mac-2結合タンパク質\シクロフィリンC関連タンパク質)、TAAL6、TACSTD1(腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質1)、TACSTD2、TAG-72-4、TAGE、TARP(T細胞受容体ガンマ交互リーディングフレームタンパク質)、TEL/AML1融合タンパク質、TEM1、TEM8(エンドシアリンまたはCD248)、TGFβ、TIE2、TLP、TMPRSS2 ETS融合遺伝子、TNF-受容体(TNF-α受容体、TNF-β受容体;またはTNF-γ受容体)、トランスフェリン受容体、TPS、TRP-1(チロシン関連タンパク質1)、TRP-2、TRP-2/INT2、TSP-180、VEGF受容体、WNT、WT-1(ウィルムス腫瘍抗原)ならびにXAGEから選択される腫瘍特異的抗原に結合することが可能な細胞外標的化ドメインを含み得る。

【0540】

非限定的な例として、本開示の標的化部位は、腫瘍特異的抗原(TSA)を認識するscFv抗体、例えば、ヒトメソテリンを特異的に認識し、結合する抗体SS、SS1及びHN1のscFv(米国特許番号:9,359,447)、GD2の抗体のscFv(米国特許番号:9,315,585)、CD19抗原結合ドメイン(米国特許番号:9,328,156);NKG2Dリガンド結合ドメイン(米国特許番号:9,273,283;米国特許公開番号:US20160311906A1);米国特許9,272,002の配列番号11及び12のアミノ酸配列を含むヒト抗メソテリンscFv;抗CS1結合剤(米国特許公開番号:US20160075784);抗BCMA結合ドメイン(国際特許公開番号:WO2016/014565);米国特許番号:9,102,761における配列番号20の抗CD19 scFv抗体;国際特許公開番号2016/02588

0の配列番号59及び79のアミノ酸配列を有するGFRアルファ4抗原結合断片；国際特許公開番号WO2016014535の配列番号47、44、48、49、50、39、40、41、42、43、45、46、51、73、70、74、75、76、65、66、67、68、69、71、72、77、195、86、83、87、88、89、78、79、80、81、82、84、85、90及び196のアミノ酸配列を有する抗CLL-1（C型レクチン様分子1）結合ドメイン）；国際特許公開番号WO2016014576の配列番号39～46のアミノ酸配列を有するCD33結合ドメイン；GPC3（グリピカン-3）結合ドメイン（国際特許公開番号WO2016036973の配列番号2及び配列番号4）；GFRアルファ4（グリコシル-ホスファチジルイノシトール（GPI）連結GDNFファミリー α -受容体4細胞-表面受容体）結合ドメイン（国際特許公開番号WO2016025880）；国際特許公開番号WO20160258896の配列番号480、483、485、478、158、159、160、157、217、218、219、216、276、277、278、及び275のアミノ酸配列を有するCD123結合ドメイン；抗ROR1抗体またはその断片（国際特許公開番号WO2016016344）；GPC-3に特異的なscFv（国際特許公開番号WO2016049459の配列番号1及び24）；CSPG4に対するscFv（国際特許公開番号WO2015080981の配列番号2；葉酸受容体アルファに対するscFv（米国特許公開番号US20170002072A1）（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））であり得る。

【0541】

CAR融合ポリペプチドの細胞内ドメインは、その標的分子に結合した後、エフェクター免疫細胞にシグナルを伝達し、細胞溶解活性（例えば、サイトカイン分泌）またはヘルパー活性を含む、エフェクター免疫細胞の通常のエフェクター機能の少なくとも1つを活性化する。そのため、細胞内ドメインは、T細胞受容体（TCR）の「細胞内シグナル伝達ドメイン」を含む。いくつかの実施形態では、本開示の細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）として知られているシグナル伝達モチーフを含有し得る。いくつかの実施形態では、本開示の細胞内領域は、追加のシグナルをエフェクター免疫細胞に提供する1つまたはより多くの共刺激性シグナル伝達ドメインをさらに含む。シグナル伝達ドメインと組み合わせられたこれらの共刺激性シグナル伝達ドメインは、CAR修飾免疫細胞（例えば、CAR T細胞）の増殖、活性化、記憶、持続性、及び腫瘍撲滅効率をさらに改善し得る。いくつかの場合では、共刺激性シグナル伝達領域は、1つまたはより多くの細胞内シグナル伝達及び／または共刺激性分子の1、2、3、または4つの細胞質ドメインを含有する。

【0542】

本開示の一実施形態では、本開示のCARは、CD19特異的CARである。本開示の文脈では、エフェクターモジュールは、CD19 CAR融合コンストラクトに機能可能に連結されたCA2 DDを含み得る。

【0543】

いくつかの実施形態では、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、自己免疫疾患を軽減するために自己抗体及び自己反応性免疫細胞などの1つまたはより多くの自己反応性免疫成分を標的とするための免疫系の調節または変化または利用において使用され得る。いくつかの実施形態では、本開示のSREは、自己免疫疾患の処置におけるその有用性を最適化するためにキメラ自己抗体受容体（CAAR）ベースのT細胞療法を制御または調整する際に利用され得る（Ellebrecht C. T. et al., Science, 2016, Jul 8; 353 (6295): 179-84（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））。いくつかの実施形態では、CA2生体回路、SREまたはCA2エフェクターモジュールは、自己免疫障害を軽減するためにTregを調節するように設計される。そのような場合、IL2は、本明細書に記載される単一の調整モジュールまたは複数の調整特徴を有するものを使用して制御され得る。

【0544】

いくつかの実施形態では、CA2生体回路、SREまたはCA2エフェクターモジュールは、移植片対宿主病（GVHD）を軽減または緩和するために免疫療法ベースの処置において利用され得る。GVHDは、幹細胞または骨髄の移植後の状態であって、同種ドナーの免疫細胞が宿主組織に対して反応するもの指す。いくつかの実施形態では、CA2生体回路、SREまたはCA2エフェクターモジュールは、GVHDの処置のためにTregを調節するように設計される。一実施形態では、TNF- α をコードするCA2エフェクターモジュールを含有するCA2生体回路は、GVHDを最小化するためにTregを調節するために使用され得る（Pierini, A. et al., Blood. 2016. Aug 11; 128(6): 866-71（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。

10

【0545】

いくつかの実施形態では、CA2生体回路、SREまたはCA2エフェクターモジュールは、当該技術分野における他の生体回路またはスイッチよりも有意に低い免疫原性となるように設計される。

【0546】

本明細書で使用される場合、「有意に低い免疫原性」は、免疫原性の検出可能な低下を指す。別の実施形態では、その用語は、免疫原性の倍数低下を指す。別の実施形態では、その用語は、有効量のCA2生体回路、SREまたはCA2エフェクターモジュールが検出可能な免疫反応を誘発せずに投与され得るような低下を指す。別の実施形態では、その用語は、CA2生体回路、SREまたはCA2エフェクターモジュールが免疫反応を引き起こさずに繰り返し投与され得るような低下を指す。別の実施形態では、低下は、CA2生体回路、SREまたはCA2エフェクターモジュールが免疫反応を引き起こさずに繰り返し投与され得るようなものである。

20

【0547】

別の実施形態では、CA2生体回路、SREまたはCA2エフェクターモジュールは、その未改変対応物または参照化合物よりも2倍低い免疫原性である。別の実施形態では、免疫原性は、3分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、5分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、7分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、10分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、15分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、1分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、50分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、100分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、200分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、500分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、1000分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、2000分の1に減少する。別の実施形態では、免疫原性は、別の倍数差で減少する。

30

【0548】

免疫原性を決定する方法は、当該技術分野でよく知られており、例えば、サイトカイン（例えば、IL12、IFNアルファ、TNF- α 、RANTES、MIP-1 α 、IL6、IFN- β 、またはIL8）の分泌を測定すること、DC活性化マーカー（例えば、CD83、HLA-DR、CD80及びCD86）の発現を測定すること、または適応免疫反応のためのアジュバントとして作用する能力を測定することが含まれる。

40

【0549】

疾患及び毒素

様々な感染性疾患は、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）で処置され得る。本明細書で使用される場合、用語「感染性疾患」は、生物、例えば、細菌、ウイルス、真菌または寄生生物によって引き起こされる任意の障害を指す。

【0550】

50

様々な毒素は、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）で処置され得る。毒素の非限定例には、リシン、*Bacillus anthracis*、志賀毒素及び志賀様毒素、ボツリヌス毒素が含まれる。

【0551】

様々な熱帯病は、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）で処置され得る。熱帯病の非限定的な例には、チクングンヤ熱、デング熱、シャーガス病、狂犬病、マラリア、エボラウイルス、マールブルグウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱病、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルスが含まれる。

【0552】

様々な食中毒及び胃腸炎は、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）で処置され得る。食中毒及び胃腸炎の非限定的な例には、ロタウイルス、ノーウォークウイルス（ノロウイルス）、*Campylobacter jejuni*、*Clostridium difficile*、*Entamoeba histolytica*、*Helicobacter pylori*、*Staphylococcus aureus*のエンテロトキシンB、A型肝炎ウイルス（HAV）、E型肝炎、*Listeria monocytogenes*、サルモネラ、*Clostridium perfringens*、及びサルモネラが含まれる。

【0553】

様々な感染性物質は、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）で処置され得る。感染性物質の非限定的な例には、アデノウイルス、*Anaplasma phagocytophilum*、*Ascaris lumbricoides*、*Bacillus anthracis*、*Bacillus cereus*、*Bacteriodes* sp、バーマフォレストウイルス、*Bartonella bacilliformis*、*Bartonella henselae*、*Bartonella quintana*、*Clostridium perfringens*のベータ毒素、*Bordetella pertussis*、*Bordetella parapertussis*、*Borrelia burgdorferi*、*Borrelia miyamotoi*、*Borrelia recurrentis*、*Borrelia* sp.、*Botulinum*毒素、*Brucella* sp.、*Burkholderia pseudomallei*、カリフォルニア脳炎ウイルス、*Campylobacter*、*Candida albicans*、チクングニアウイルス、*Chlamydia psittaci*、*Chlamydia trachomatis*、*Clonorchis sinensis*、*Clostridium difficile*菌、*Clostridium tetani*、コロラドダニ熱ウイルス、*Corynebacterium diphtheriae*、*Corynebacterium minutissimum*、*Coxiella burnetii*、コクサッキーA、コクサッキーB、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、サイトメガロウイルス、デングウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、エボラウイルス、エコーウイルス、*Ehrlichia chaffeensis*、*Ehrlichia equi*、*Ehrlichia* sp.、*Entamoeba histolytica*、*Enterobacter* sp.、*Enterococcus faecalis*、エンテロウイルス71、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Escherichia coli*、フラビウイルス、*Fusobacterium necrophorum*、*Gardnerella vaginalis*、B群streptococcus、*Haemophilus aegyptius*、*Haemophilus ducreyi*、*Haemophilus influenzae*、ハンタウイルス、*Helicobacter pylori*、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、

10

20

30

40

50

D型肝炎、E型肝炎、単純ヘルペスウイルス1及び2、ヒトヘルペスウイルス6、ヒトヘルペスウイルス8、ヒト免疫不全ウイルス1及び2、ヒトT細胞白血病ウイルスI及びII、インフルエンザウイルス(A、B、C)、ジェームスタウンキャニオンウイルス、抗原性日本脳炎、日本脳炎ウイルス、ジョンカニンガムウイルス、フニンウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)、*Klebsiella granulomatis*、*Klebsiella* sp.、キャサヌールフォレスト病ウイルス、ラクロスウイルス、ラッサウイルス、*Legionella pneumophila*、*Leptospira interrogans*、*Listeria monocytogenes*、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、リッサウイルス、マチュポウイルス、マールブルグウイルス、麻疹ウイルス、MERSコロナウイルス(MERS-CoV)、*Micrococcus sedentarius*、*Mobiluncus* sp.、*Molluscipoxvirus*、*Moraxella catarrhalis*、*Morbilli-Rubeola*ウイルス、ムンプスウイルス、*Mycobacterium leprae*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Mycobacterium ulcerans*、*Mycoplasma genitalium*、*Mycoplasma* sp.、ナイロウイルス、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Nocardia*、ノーウォークウイルス、ノロウイルス、オムスク出血熱ウイルス、パピローマウイルス、パラインフルエンザウイルス1～3、パラポックスウイルス、パルボウイルスB19、*Peptostreptococcus* sp.、*Plasmodium* sp.、ポリオウイルスI、II、及びIII型、*Proteus* sp.、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas pseudomallei*、*Pseudomonas* sp.、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リシン毒素、*Rickettsia australis*、*Rickettsia conorii*、*Rickettsia honei*、*Rickettsia prowazekii*、ロスリバーウイルス、ロタウイルス、風疹ウイルス、セントルイス脳炎、*Salmonella Typhi*、*Sarcoptes scabiei*、SARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)、*Serratia* sp.、志賀毒素及び志賀様毒素、*Shigella* sp.、シンノンブルウイルス、カンジキウサギウイルス、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptobacillus moniliformis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus A～H*群、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Treponema pallidum* subsp. *Pallidum*、*Treponema pallidum* var. *carateum*、*Treponema pallidum* var. *endemicum*、*Tropheryma whippelii*、*Ureaplasma urealyticum*、水痘帯状疱疹ウイルス、天然痘ウイルス、*Vibrio cholerae*、ウエストナイルウイルス、黄熱病ウイルス、*Yersinia enterocolitica*、*Yersinia pestis*、ならびにジカウイルスが含まれる。

【0554】

様々な希少疾患は、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール(それらのSREまたはペイロードを含む)で処置され得る。本明細書で使用される場合、用語「希少疾患」は、集団の少数の割合に影響を及ぼす任意の疾患を指す。

【0555】

様々な自己免疫疾患及び自己免疫関連疾患は、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール(それらのSREまたはペイロードを含む)で処置され得る。本明細書で使用される場合、用語「自己免疫疾患」は、身体が、その自己の組織を攻撃する抗体を生成する疾患を指す。非限定的な例として、自己免

10

20

30

40

50

疫疾患は、急性散在性脳脊髄炎（A D E M）、急性壊死性出血性白質脳炎、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、抗G B M／抗T B M腎炎、抗リン脂質症候群（A P S）、自己免疫性血管性浮腫、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性肝炎、自己免疫性脂質異常症、自己免疫性免疫不全、自己免疫性内耳疾患（A I E D）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性脾炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性血小板減少性紫斑病（A T P）、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫性じんましん、軸索及びニューロンニューロパシー、バロー病、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、キャッスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性疲労症候群**、慢性炎症性脱髄性多発性神経炎（C I D P）、慢性再発性多発性骨髄炎（C R M O）、チャグ・ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡／良性粘膜類天疱瘡、クローン病、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性心臓ブロック、コクサッキー心筋炎、C R E S T病、本態性混合型クリオグロブリン血症、脱髄性ニューロパシー、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性食道炎、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、実験的アレルギー性脳脊髄炎、エバンス症候群、線維筋痛**、線維化性肺炎、巨細胞動脈炎（側頭動脈炎）、巨細胞心筋炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発性血管炎を伴う肉芽腫症（G P A）（以前はウェゲナー肉芽腫症と称されていた）、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、低ガンマグロブリン血症、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、I g A腎症、I g G 4関連硬化性疾患、免疫制御性リポタンパク質、封入体筋炎、間質膀胱炎、若年性関節炎、若年性糖尿病（1型糖尿病）、若年性筋炎、川崎症候群、ランバート・イートン症候群、白血球破碎性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質結膜炎、線状I g A疾患（L A D）、ループス（S L E）、ライム病、慢性、メニエール病、顕微鏡的多発性血管炎、混合性結合組織病（M C T D）、モーレン潰瘍、ムッカ・ハーベルマン病、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、視神経脊髄炎（デビック）、好中球減少症、眼球癬痕性類天疱瘡、視神経炎、回帰性リウマチ、P A N D A S（連鎖球菌に関連する小児自己免疫性神経精神障害）、腫瘍随伴小脳変性症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（P N H）、パリーロンバーク症候群、パーソネイジ・ターナー症候群、扁平部炎（末梢ブドウ膜炎）、天疱瘡、末梢神経障害、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血、P O E M S症候群、結節性多発動脈炎、I、II、及びIII型自己免疫性多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、プロゲステロン皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、乾癬、乾癬性関節炎、特発性肺線維症、壊疽性膿皮症、赤芽球癆、レイノー現象、反応性関節炎、反射性交感神経性ジストロフィー、ライター症候群、再発性多発性軟骨炎、レストレスレッグス症候群、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、シュミット症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、精液及び精巣自己免疫、全身硬直症候群、亜急性細菌性心内膜炎（S B E）、スザック症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、血小板減少性紫斑病（T T P）、トローザ・ハント症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性結腸炎、未分化結合組織病（U C T D）、ブドウ膜炎、血管炎、小水疱水疱性皮膚病、白斑、ならびにウェゲナー肉芽腫症（現在は多発性血管炎を伴う肉芽腫症（G P A）と称される）であり得る。

【0556】

様々な腎臓疾患は、本開示の薬学的組成物、C A 2生体回路、C A 2生体回路成分、C A 2エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）で処置され得る。

【0557】

様々な心臓血管疾患は、本開示の薬学的組成物、C A 2生体回路、C A 2生体回路成分、C A 2エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）で処置され得る。非限定的な例として、心臓血管疾患は、冠動脈疾患としても知られている虚血性心臓疾患、脳血管疾患（脳卒中）、末梢血管疾患、心不全、リウマチ性心臓疾患、及び先天性心臓疾患であり得る。

【0558】

10

20

30

40

50

様々な抗体欠損症は、本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）で処置され得る。非限定的な例として、抗体欠損症は、X連鎖無ガンマグロブリン血症（X L A）、常染色体劣性無ガンマグロブリン血症（A R A）、分類不能型免疫欠損症（C V I D）、I g G（I g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4）サブクラス欠損症、選択的I g A欠損症、特定抗体欠損症（S A D）、幼児の一過性低ガンマグロブリン血症、正常なまたは上昇した免疫グロブリンを有する抗体欠損症、選択的I g M欠損症、胸腺腫を有する免疫不全（グッド症候群）、トランスコバラミンI I欠損症、疣贅、低ガンマグロブリン血症、感染症、骨髄性細胞貯留（W H I M）症候群、薬物誘導抗体欠損症、カップ鎖欠損症、重鎖欠損症、減数分裂後分離（P M S 2）障害、及び特定不能低ガンマグロブリン血症であり得る。

10

【0559】

様々な眼疾患は、本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）で処置され得る。非限定的な例として、眼疾患は、甲状腺眼疾患（T E D）、グレーブス病（G D）及び眼窩疾患、網膜変性症、白内障、視神経萎縮、黄斑変性症、レーバー先天性黒内障、網膜変性症、錐体杆体ジストロフィー、アッシャー症候群、レオパード症候群、光恐怖症、及び光嫌悪症であり得る。

【0560】

様々な神経疾患は、本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）で処置され得る。

20

【0561】

様々な精神障害は、本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）で処置され得る。

【0562】

様々な肺疾患は、本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）で処置され得る。非限定的な例として、肺疾患は、石綿症、喘息、気管支拡張症、気管支炎、慢性咳、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、クループ、嚢胞性線維症、ハンタウイルス、特発性肺線維症、百日咳、胸膜炎、肺炎、肺塞栓症、肺高血圧、サルコイドーシス、睡眠時無呼吸、肺活量測定、乳幼児突然死症候群（S I D S）、結核、アラジール症候群、自己免疫性肝炎、胆管閉鎖症、肝硬変、E R C P（内視鏡的逆行性胆道膵管造影）、及びヘモクロマトーシス、非アルコール性脂肪性肝炎、ポルフィリン症、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎であり得る。

30

【0563】

様々な骨疾患は、本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）で処置され得る。非限定的な例として、骨疾患は、骨粗鬆症、神経線維腫症、骨形成不全症（O I）、くる病、骨肉腫、軟骨形成不全症、骨折、骨髄炎、骨のユーイング腫瘍、骨軟化症、股関節異形成、骨のパジェット病、大理石骨病、骨軟骨腫、骨癌、骨疾患、骨軟骨症、骨腫、線維性異形成、鎖骨頭蓋骨形成不全症、骨巨細胞腫、骨嚢胞、代謝骨疾患、メロレオストーシス、仮骨、キャフィー症候群、及び下顎顔面骨形成不全症であり得る。

40

【0564】

様々な血液疾患は、本開示の薬学的組成物、C A 2 生体回路、C A 2 生体回路成分、C A 2 エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）で処置され得る。非限定的な例として、血液疾患は、貧血及びC K D（ヘルスケア専門家のため）、再生不良性貧血及び骨髄異形成症候群、深部静脈血栓症、ヘモクロマトーシス、血友病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、特発性血小板減少性紫斑病、鉄欠乏性貧血、悪性貧血、肺塞栓症、鎌状赤血球貧血、鎌状赤血球形質及び他の異常ヘモグロビン症、サラセミア、血栓性血小板減少性紫斑病、ならびにフォンヴィレブランド病であり得る。

50

【0565】

中枢神経系（CNS）

いくつかの実施形態では、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、脳脊髄（CSF）タンパク質を含む中枢神経系におけるタンパク質の調節または変化または利用において使用され得る。

【0566】

いくつかの例では、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、調整可能なERT（酵素補充療法）生成物を中枢神経系に提供するために使用され得る。多くのリソソーム蓄積症（LSD）は、CNS症状、例えば、精神遅滞、発作、重度神経変性、行動性異常、及び精神-運動欠損症を伴う。LSDのためのERTは、現代の分子医学において真の成功筋のうちの1つである。ERTの成功裏の適用は、コントロールされたリソソームタンパク質（例えば、酵素）及びCNS細胞への送達に依存する。

【0567】

いくつかの例では、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、CNS及びCSFにおけるタンパク質凝集体に対するモノクローナル抗体を局所的に生成するために使用され得る。そのような抗体は、アルツハイマー病（AD）、ハンチントン病（HD）及びパーキンソン病（PD）のような変性疾患を処置するために使用され得る。

【0568】

他の例では、本開示の薬学的組成物、CA2生体回路、CA2生体回路成分、CA2エフェクターモジュール（それらのSREまたはペイロードを含む）は、中枢神経系における神経栄養因子を制御するために使用され得る。

【0569】

遺伝子編集

CRISPR-Cas9システムは、遺伝子編集において使用するために開発及び改変されており、真核細胞においても核酸配列を編集するための高効果かつ特異的な技術であることが証明されている。多くの研究者が、細菌性CRISPR-Casシステムに対する様々な改変を開示し、CRISPR-Casシステムが、哺乳動物細胞及び植物細胞などの細胞における核酸を操作するために使用され得ることを実証した。代表的な参考文献には、米国特許番号：8,993,233；8,999,641；8,945,839；8,932,814；8,906,616；8,895,308；8,889,418；8,889,356；8,871,445；8,865,406；8,771,945；及び8,697,359；米国特許公開番号：20150031134；20150203872；20150218253；20150176013；20150191744；20150071889；20150067922；及び20150167000（これらの各々は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）が含まれる。

【0570】

しかしながら、CRISPR-Casシステム（例えば、ガイドRNA及びヌクレアーゼ）の効果及び活性のコントロールは、困難であり続けており、しばしば問題となり得る。

【0571】

本開示のCA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかは、CRISPR/Cas9システムの制御または調整においてその有用性を最適化するために利用され得る。

【0572】

システムを調整するための例は、国際公開番号WO2017/180587（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）の図19A及び図19Bに示されている。

【0573】

いくつかの実施形態では、本開示のCA2エフェクターモジュールのペイロードは、C

10

20

30

40

50

a s 9 酵素の代替的アイソフォームまたはオーソログを含み得る。

【0574】

最も一般的に使用されるCas9は、Streptococcus pyogenesに由来し、RuvCドメインは、D10A変異によって不活性化され得、HNHドメインは、H840A変異によって不活性化され得る。

【0575】

S. pyogenesに由来するCas9に加えて、他のRNAガイドエンドヌクレアーゼ（RGEN）もプログラム可能なゲノム編集のために使用され得る。Cas9配列は、600種を超える細菌株において特定されている。Cas9ファミリーは、高い多様性のアミノ酸配列及びタンパク質サイズを示すが、すべてのCas9タンパク質は、中央のHNHヌクレアーゼドメイン及び分割されたRuvC/RHase Hドメインを有する共通の構造を共有している。

【0576】

いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、分割Cas-9であり得る（Zetsche B et al. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. Nat Biotechnol. 2015 Feb; 33 (2) : 139-42（その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる））。

【0577】

Cas9オーソログに加えて、他のCas9バリエーション、例えば、不活性Cas9及び異なる機能を有するエフェクタードメインの融合タンパク質が、遺伝子調節のためのプラットフォームとして機能し得る。前述の酵素のいずれかは、本開示において有用であり得る。

【0578】

CRISPR/Cas9ベースのCA2生体回路は、国際公開番号：WO2016106244及びGao Y et al. Complex transcriptional modulation with orthogonal and inducible dCas9 regulators. Nat Methods. 2016 Dec; 13 (12) : 1043-1049（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている方法のいずれかによって生成され得る。

【0579】

CRISPR/Cas9システムはまた、遺伝子発現を調節するために利用され得、これはその遺伝子編集の有用性と組み合わせられ得る。いくつかの実施形態では、本開示のCA2エフェクターモジュールのペイロードには、CRISPR関連活性化因子、例えば、VP64-p65-Rta（VPR）；またはリプレッサー、例えば、CRISPR/Cas9システムに関連するクルッペル関連ボックス（KRAB）が含まれ得る。

【0580】

幹細胞用途

本開示のCA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかは、細胞の制御されたりプログラミング、幹細胞生着または他の用途であって、そのようなリプログラミング因子のコントロールされたまたは調整可能な発現が有用であるものにおいて利用され得る。

【0581】

本開示のCA2生体回路は、幹細胞または誘導幹細胞を含むリプログラミング細胞において使用され得る。誘導多能性幹細胞（iPSC）の誘導は、Takahashi及びYamanaka（Cell, 2006. 126 (4) : 663-76；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）によってKLF4、c-MYC、OCT4及びSOX2（別段、KMOSとして集合的に知られている）を発現させるためのウイルスベクターを使用して最初に達成された。

【0582】

本開示のCA2エフェクターモジュールは、リプログラミング細胞の補助下で、OCT

10

20

30

40

50

、例えば、OCT4、SOX、例えば、SOX1、SOX2、SOX3、SOX15及びSOX18、NANOG、KLF、例えば、KLF1、KLF2、KLF4及びKLF5、MYC、例えば、c-MYC及びn-MYC、REM2、TERT及びLIN28ならびにそれらのバリエーションを含むがこれらに限定されない遺伝子のいずれかを含むペイロードを含み得る。そのようなリプログラミング因子の配列は、例えば、国際出願PCT/US2013/074560（その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている。

【0583】

本開示のCA2エフェクターモジュールは、幹細胞動員に寄与する因子のいずれかを含むペイロードを含み得る。自己幹細胞療法では、移植のための幹細胞源には、骨髓、末梢血単核細胞及び臍帯血が含まれ得る。幹細胞は刺激されてこれらの源（例えば、骨髓）から血流中に入る。そのため、将来の再注入のための収集のために十分な幹細胞が利用可能である。G-CSF（フィルグラスチム）、GM-CSF、及びサイトカインに先行する化学療法（化学動員）を含むサイトカインストラテジーの1つまたは組み合わせが、幹細胞を動員するために使用され得る。

【0584】

代謝ペプチド及びホルモン

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかは、天然または合成のペプチドを制御するために使用され得る。天然に存在するペプチドには、限定されないが、ペプチドホルモン、ナトリウム利尿ペプチド、食物ペプチド、ならびに誘導体及び前駆体が含まれ得る。

【0585】

本開示のCA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかはまた、ホルモンまたは他のペプチド薬物の脈動的放出のために利用され得る。

【0586】

酵素補充療法（ERT）

酵素補充療法（ERT）は、患者において酵素を補充する医学的処置である。ERTは、欠損酵素によって引き起こされる多くの障害において根底にある代謝欠損に対処する治療的介入を提供する。そのような障害には、リソソーム蓄積症（LSD）、グリコシル化の先天性障害、及び細胞質における酵素活性の欠如または低下を特徴とする代謝障害が含まれるがこれらに限定されない。

【0587】

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかはまた、ERT中に酵素活性を制御するために利用され得る。非限定的な例として、本開示のCA2生体回路のペイロードは、ERTのための機能性リソソーム酵素、例えば、 α -D-マンノシダーゼ、N-アスパルチル- β -グルコサミニダーゼ、酸性リパーゼ；ヘキソサミニダーゼA、 α -ガラクトシダーゼA、 β -ガラクトシダーゼ、リソソームプロテアーゼ、セラミダーゼ、フコシダーゼ； β -グルコシダーゼ、N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ、スルファターゼ、ヒアルロニダーゼ、ガラクトセレブロシダーゼ；アリアルスルファターゼA；N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ； α -L-イズロニダーゼ；イズロン酸スルファターゼ；ヘパランスルファミダーゼ；N-アセチルグルコサミニダーゼ；アセチル-CoA： α -グルコサミニドアセチルトランスフェラーゼ；N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ；N-アセチルガラクトサミン-6-スルフェートスルファターゼ；N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ； β -グルクロニダーゼ；ヒアルロニダーゼ；シアリダーゼ；スルファターゼ；スフィンゴミエリナーゼ；酸 α -グルコシダーゼ； β -マンノシダーゼ；カテプシンK； β -ヘキソサミニダーゼA； β -ヘキソサミニダーゼB、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、シアリン、及びヘキソサミニダーゼであり得る。

【0588】

凝固

凝固欠損は、しばしば、出血及び／または血栓症を引き起こす。最もよく知られている凝固因子障害は、血友病である。3つの主要な形態は、血友病A（第ⅤⅠⅠⅠ因子欠損症）、血友病B（第ⅠⅩ因子欠損症、「クリスマス病」）及び血友病C（第ⅩⅠ因子欠損症、軽度出血傾向）である。欠陥凝固因子によって引き起こされる他の障害にはまた、フォンヴィレブランド病（フォンヴィレブランド因子（vWF）における欠陥によって引き起こされる）、ベルナル・スーリエ症候群（vWFの受容体であるGPⅠbにおける欠陥または欠損症によって引き起こされる）、血栓性静脈炎（第ⅩⅠⅠ因子における変異によって引き起こされる）、先天性無フィブリノゲン血症、家族性腎臓アミロイドーシス（第Ⅰ因子における変異によって引き起こされる）、先天性プロコンバーチン／第ⅤⅠⅠ因子欠損症、血栓形成傾向（第ⅠⅠⅠ因子欠損症によって引き起こされる）、先天性第Ⅹ因子欠損症、先天性第ⅩⅠⅠⅠa／b因子欠損症、プレカリクレイン／フレッチャー因子欠損症、キニノーゲン欠損症、フィブロンネクチン堆積を有する糸球体症、ヘパリンコファクターⅠⅠⅠ欠損症、プロテインC欠損症、プロテインS欠損症、プロテインZ欠損症、抗トロンビンⅠⅠⅠ欠損症、プラスミノーゲン欠損症Ⅰ型（木質結膜炎）、抗プラスミン欠損症、プラスミノーゲン活性化因子阻害因子-1欠損症、及びケベック血小板障害が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 5 8 9 】

凝固因子補充のための遺伝子療法は、凝固不全によって引き起こされる障害の医学的処置である。本開示によれば、本開示のC A 2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかはまた、遺伝子療法のために使用される凝固因子を制御するために利用され得る。いくつかの例では、凝固因子は、第Ⅰ因子（フィブリノゲン）、第ⅠⅠ因子（プロトロンビン）、第ⅠⅠⅠ因子（組織因子）、第ⅠⅤ因子、第Ⅴ因子（プロアクセレリン）、第ⅤⅠ因子、第ⅤⅠⅠ因子（安定因子）、第ⅤⅠⅠⅠ因子（抗血友病因子A）、第ⅠⅩ因子（抗血友病因子B）、第Ⅹ因子（スチュアート・プロワー因子）、第ⅩⅠ因子（血漿トロンボプラスチン前駆物質）、第ⅩⅠⅠ因子（ハーゲマン因子）、第ⅩⅠⅠⅠ因子（フィブリン安定化因子）、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン（フレッチャー因子）、高分子量キニノゲン（HMWK）（フィッツジェラルド因子）、フィブロンекチン、抗トロンビンⅠⅠⅠ、ヘパリンコファクターⅠⅠ、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤（ZPI）、プラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤1（PAI1）、及びプラスミノーゲン活性化因子阻害剤2（PAI2）から選択され得る。

【 0 5 9 0 】

一実施形態では、凝固因子は、野生型第ⅤⅢⅢⅢ因子、修飾第ⅤⅢⅢⅢ因子、活性化fⅤⅢⅢⅢ（fⅤⅢⅢⅢa）、またはその同等物を含む、血友病の遺伝子療法のための第ⅤⅢⅢⅢ因子である。例示的な修飾第ⅤⅢⅢⅢ因子には、Roberts et al（J. Genet. Syndr. Gene Ther., 2011, 1: S1-006（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））によって論述されているものが含まれ得る。

【 0 5 9 1 】

患者層別化

【 0 5 9 2 】

一実施形態では、患者はまた、それらの免疫細胞によって提示された免疫原性ペプチドに応じて層別化され、本開示の組成物について治療的に有益であり得る好適な患者コホートを決定するためのパラメータとして利用され得る。

【 0 5 9 3 】

マイクロバイオーム

本開示の C A 2 生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかは、マイクロバイオームの制御または調整において利用され得る。身体における環境的に曝露されるすべての部位には、相利共生微生物、片利共生微生物及び病原性微生物の多様なコミュニティが存在し

ており、本明細書で「マイクロバイーム」と称される。マイクロバイームが生息し得る身体的环境的に曝露される部位には、皮膚、鼻咽頭、口腔、気道、消化管、及び生殖管が含まれる。マイクロバイームと身体との密接な関連は、ヒトの健康ならびに喘息、炎症性腸疾患、代謝、心臓血管疾患及びがんを含む疾患に対して深い意味を有する。したがって、いくつかの実施形態では、本開示のC A 2生体回路、C A 2生体回路成分、C A 2エフェクターモジュール（それらのS R Eまたはペイロードを含む）は、マイクロバイーム及び／またはマイクロバイームの微小環境の調節または変化または利用において使用され得る。

【0594】

いくつかの実施形態では、マイクロバイームは、ペイロードとして非微生物生体分子からなるC A 2生体回路で修飾され得る。ペイロードの非限定的な例には、抗ウイルスペプチド、酵素、神経ペプチド、サイトカイン、及び他の可溶性因子が含まれる。そのような戦略は、マイクロバイームを、疾患の処置のための治療剤に変換する。非限定的な例として、グルカゴン様ペプチド-1は、ペイロードとして使用され得る。グルカゴン様ペプチド-1を発現するように修飾された*Lactobacillus gasseri*の投与は、宿主においてインスリン生成を誘導し、高血糖を低下させた（Duan, F., et al., Diabetes, 64, 1794-1803 (2015)（その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる））。

【0595】

いくつかの実施形態では、マイクロバイームは、キルスイッチを含み得る。本明細書で使用される場合、用語「キルスイッチ」は、ペイロードとして1つまたはより多くの毒素を含む本開示の生体回路を指す。i n v i v o投与のために修飾された微生物は、1つまたは複数の遺伝子の送達の後、及び／または宿主が治療効果を経験した後に、特定の時間で死滅するようにプログラムされ得る。具体的には、生物による宿主の長期的定着または対象となる領域外への微生物の拡散を防止することが有用であり得る。キルスイッチにおいて使用され得る毒素の例には、バクテリオシン、リシン、及び細胞膜を溶解すること、細胞DNAを分解すること、または他のメカニズムによって細胞死を引き起こす他の分子が含まれるがこれらに限定されない。

【0596】

トランスジェニック生物

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示のポリペプチドをコードする核酸を発現するトランスジェニック生物を提供する。本明細書で使用される場合、用語「トランスジェニック生物」は、人工的に移入された外因性遺伝物質を含有する任意の非ヒト実体を指す。このアプローチは、画定された細胞、組織、または生物全体においてペイロードを一時的に制御する能力を提供する。そのような方法は、所定の疾患状態のためのトランスジェニックモデルの作製において、または胚発生の研究のために有用であり得る。

【0597】

本明細書に記載のトランスジェニック生物には、げっ歯類、魚、爬虫類、及び無脊椎動物が含まれ得る。好ましい実施形態では、そのようなトランスジェニック生物は、マウス、及びラットを含むげっ歯類ファミリーから選択され得る。

【0598】

調整可能な制御

本開示のC A 2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかはまた、P O Iを含む組換えコンストラクトなどの別のエフェクターモジュールの発現を制御するために利用され得る。いくつかの実施形態では、C A 2生体回路及び／またはC A 2エフェクターモジュールは、プロテアーゼ（ペプチダーゼまたはプロテイナーゼとも称される）を含み得る。調整可能なプロテアーゼは、その2つの成分が細胞、組織または生物に共導入された場合に、非活性コンストラクトを活性コンストラクトに切断し得る。

【0599】

他の例では、プロテアーゼを含むC A 2生体回路及び／またはC A 2エフェクターモジ

10

20

30

40

50

ジュールはまた、より小さな活性タンパク質またはペプチドを生成するための初期タンパク質生成物の切断を含むタンパク質プロセッシングを制御するために利用され得る。

【0600】

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかは、タンパク質プロセッシング及び改変において役割を果たす因子のいずれかを含み得る。タンパク質翻訳後修飾には、酵素による疎水性基の付加（例えば、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化、プレニル化、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化、グリピ化（glypiation）、及びグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー）；向上した機能のためのコファクターの結合（例えば、リポイル化、フラビン、ホスホパンテテイン化、及びヘムC）；小さな化学基の付加（例えば、アシル化、ホルミル化、アルキル化、リン酸化、メチル化、アルギニル化、ポリグルタミル化、ポリグリシル化、ブチリル化、グリコシル化、プロピオニル化、S-グルタチオン化、S-ニトロシル化、S-スルフェニル化、スクシニル化、硫酸化、及びアセチル化）；他のタンパク質及び／またはペプチドの連結、例えば、ISG化、SUMO化、ユビキチン化、ネジ化（neddylation）、及びピル化；アミノ酸の化学的改変；ならびに構造変化が含まれ得るがこれらに限定されない。

【0601】

ブーリアンスイッチ（Boolean Switch）

本開示のCA2生体回路はまた、細胞性ブーリアンスイッチの設計に組み込まれ得る。本明細書で使用される場合、ブーリアンスイッチは、1つまたはより多くの入力に基づいて論理演算を実行するように設計され、出力を生成する回路を指す。ブーリアンスイッチによって実施される論理演算は、限定されないが、AND、OR、NOR、NAND、NOT、IMPLY、NIMPLY、XOR、及びXNORである。OR及びANDゲートは、最も基本的な論理演算を表し、ORは、1つまたはより多くの入力のいずれかが出力を生成するのに必要とされるシナリオを表すのに対し、ANDは、入力のすべてが出力を生成するのに必要とされるシナリオを表す。複数の論理演算からなる化合物ブーリアンスイッチもまた、本開示のCA2生体回路を使用して生成され得る。いくつかの実施形態では、CA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかは、ブーリアンスイッチにおける1つまたはより多くの入力を表し得る。他の実施形態では、本開示のCA2生体回路は、当該技術分野で知られているスイッチと組み合わせられてブーリアンスイッチを生成し得る。ブーリアンスイッチの出力は、利用されるペイロードに依存し得る。非限定的な例として、ANDベースのブーリアンスイッチが生成され得、その場合、第1の入力は、ペイロードとして遺伝子編集ヌクレアーゼであるCas9を有するCA2生体回路を含み、第2の入力は、ペイロードとして転写活性化因子であるVPRを有するCA2生体回路を含む。標的遺伝子ガイドRNAの存在下で、刺激物を両方の入力に加えることは、標的遺伝子の転写活性化に必要とされる（Gao Y et al. (2016) Nat Methods. 13 (12) : 1043-1049（その内容は、それらの全体が参照により組み込まれる））。

【0602】

バイオ工場

本開示のCA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかは、バイオ工場においてタンパク質生成のレベルを制御するために利用され得る。本明細書で使用される場合、用語「バイオ工場」は、治療目的（阻害剤、酵素、抗体、抗原など）を含む多数の用途を有するタンパク質または工業的対象となる一次もしくは二次生成物を生成し得る、遺伝子改変されたまたはされていない細胞、組織、器官または生物を指す。いくつかの例では、細胞は、原核細胞、真核細胞、哺乳動物細胞、植物細胞などであり得る。

【0603】

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路は、標的組織、例えば、肝臓及び腎臓において生成される薬剤タンパク質を制御するために使用され得る。肝臓は、主要な血漿タンパク質、止血及び線溶における因子、キャリアタンパク質、ホルモン、プロホルモ

ン及びアポリボタンパク質を含む分泌タンパク質、または通常は強固に制御される様々な短命の代謝ペプチド及び酵素、または非肝臓タンパク質を生成する器官である。その文脈において、肝臓は、遺伝子発現工場（バイオ工場）の役割を果たし、疾患、例えば、代謝疾患の処置のためのタンパク質を供給する。

【0604】

他の実施形態では、本開示のCA2生体回路は、工業的プロセスのためにタンパク質を制御するために使用され得る。

【0605】

肝臓標的化

肝臓は、タンパク質を生成し、かつ血液凝固及び多数の代謝機能を伴う重要な器官である。多様な疾患は、肝臓に影響を及ぼし得、疾患処置のために肝臓を標的とすることは、有望なアプローチ、特に肝臓標的化遺伝子療法であり続けている。本開示のCA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかは、肝臓標的化遺伝子療法及び遺伝子移入を制御するために利用され得る。

【0606】

肝臓に標的化され、制御のために本CA2生体回路に構築され得るタンパク質には、肝臓癌、例えば、肝細胞癌（HCC）、線維層状（Fibrolamellar）HCC、胆管癌、血管肉腫及び二次肝臓癌；欠陥遺伝子によって引き起こされる遺伝性障害、例えば、ヘモクロマトーシス、ウィルソン病、チロシン血症、アルファ1アンチトリプシン欠損症、グリコーゲン蓄積症；酵素欠損による代謝障害、例えば、ジルベール症候群、リソソーム酸性リパーゼ欠損症（LALD）及びゴーシェ病；自己免疫性肝炎；脂肪肝疾患；ならびにウイルス性肝炎（A、B及びC）におけるものが含まれ得る。いくつかの例では、本CA2生体回路は、肝細胞癌（HCC）のためのIL12、及び糖尿病性ニューロパシーのためのIL10を誘導するために使用され得る。

【0607】

いくつかの実施形態では、本CA2生体回路は、遺伝子療法のための肝臓特異的遺伝子産物をコントロールするために使用され得る。

【0608】

いくつかの実施形態では、本CA2生体回路は、（例えば、血液に）分泌される肝臓タンパク質をコントロールするために使用され得る。

【0609】

マイクロフルイディクス

いくつかの実施形態では、本開示のCA2生体回路及び／またはそれらの成分のいずれかを含有する細胞は、マイクロフルイディクスデバイスにおいて利用され得る。本明細書で使用される場合、「マイクロフルイディクスデバイス」は、人工的に制作されたマイクロシステム内でのピコリットルからナノリットルの規模の体積の流体の操作を指す。本開示のCA2生体回路を含むマイクロフルイディクスデバイスは、細胞培養モデル、細胞微小環境、細胞分泌、走化性、アポトーシス、血管機能、ニューロン細胞成長、胚発生、単一細胞メタボロミクス、遺伝子発現、薬物研究、細胞分離、幹細胞生物学、バイオリアクター、三次元細胞培養、及び組織修飾を研究するために利用され得る。

【0610】

治療剤を作製するためのツール及び薬剤

本開示では、限定されないが、必要とする対象における腫瘍体積または負荷を減少させるための免疫療法剤などの治療剤の生成において使用され得るツール及び薬剤が提供される。ペイロードの構造、細胞のタイプ、遺伝子移入の方法、ex vivo増殖の方法及び時間、事前コンディショニングならびに対象における腫瘍負荷の量及びタイプなどの相当数の可変要素が治療剤の生成に関与する。そのようなパラメータは、本明細書に記載のツール及び薬剤を使用して最適化され得る。

【0611】

細胞株

本開示は、本開示の組成物で遺伝子改変された哺乳動物細胞を提供する。好適な哺乳動物細胞には、初代細胞及び不死化細胞株が含まれる。好適な哺乳動物細胞株には、ヒト胚腎臓細胞株293、線維芽細胞株NIH 3T3、ヒト大腸癌細胞株HCT116、卵巣癌細胞株SKOV-3、不死化T細胞株（例えば、Jurkat細胞及びSupT1細胞）、リンパ腫細胞株Raji細胞、NALM-6細胞、K562細胞、HeLa細胞、PC12細胞、HL-60細胞、NK細胞株（例えば、NKL、NK92、NK962、及びYTS）などが含まれるがこれらに限定されない。いくつかの例では、細胞は、不死化細胞株ではないが、代わりに個体から得られた細胞であり、本明細書で初代細胞と称される。例えば、細胞は、個体から得られたTリンパ球である。他の例には、個体から得られた細胞傷害性細胞、幹細胞、末梢血単核細胞または前駆細胞が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0612】

SRE、生体回路及び細胞株の追跡

いくつかの実施形態では、本開示の組成物または本開示の組成物によって改変された細胞を追跡することが所望であり得る。追跡は、本明細書で使用される場合、入力に反応して検出可能なシグナルを生成することが可能な任意のタンパク質を指すレポーター部位などのペイロードを使用することによって達成され得る。例には、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、β-グルクロニダーゼ、ペルオキシダーゼ、β-ラクタマーゼ、触媒抗体、生物発光タンパク質、例えば、ルシフェラーゼ、及び蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）が含まれる。

20

【0613】

レポーター部位は、SREに対応するリガンドの添加時に、SREの反応をモニターするために使用され得る。他の例では、レポーター部位は、細胞生存、持続性、細胞成長、及び／または局在化を*in vitro*、*in vivo*、または*ex vivo*で追跡するために使用され得る。

【0614】

いくつかの実施形態では、好ましいレポーター部位は、ルシフェラーゼタンパク質であり得る。

【0615】

シャペロン

いくつかの実施形態では、本開示のCA2エフェクターモジュールは、ペイロードの発現を制御するための1つまたはより多くのシャペロンを含み得る。本開示において有用なシャペロンは、細胞性シャペロンまたは薬理学的シャペロンと称される小分子であり得る。細胞性シャペロンは、フォールディングされていないクライアントタンパク質を安定化させること、または膜を介する転位のためもしくは分解のためにクライアントタンパク質のフォールディングを解くこと、及び／またはそれらの正しいフォールディング及び集合を補助することが役割である関連性のないタンパク質ファミリーの大きな群を指す。シャペロンはまた、プロテアソームシステム及びオートファジーなどのプロテオスタシスネットワークの他の成分と協働してタンパク質のクリアランスを促進する。分子シャペロンファミリーの例には、小ヒートショックタンパク質、例えば、hsp25；ヒートショックタンパク質60ファミリータンパク質、例えば、cpn60及びGroEL；ヒートショックタンパク質70ファミリータンパク質、例えば、DnaK及びBiP；ヒートショックタンパク質90ファミリータンパク質；ヒートショックタンパク質100ファミリータンパク質、例えば、Cip；レクチンシャペロン、例えば、カルネキシン及びカルレチキュリン；ならびにフォールディングシャペロン、例えば、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（PDI）、ペプチジルプロリルc-イートランスイソメラーゼ（PPI）及びERp57が含まれる。いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、細胞性シャペロンであり得る。SREを安定化する刺激物の非存在下で、細胞性シャペロンは、SREに結合し得、そのため、そのクライアントタンパク質と相互作用することが不可能である。S

30

40

50

RE に特異的な刺激物の存在下で、SRE は安定化され、シャペロンはクライアントタンパク質と相互作用することが可能である。いくつかの実施形態では、本開示のペイロードは、ペイロードの安定性または不安定性が向上され得るようにシャペロンに付加され得る。他の実施形態では、本開示のSRE は、1つまたはより多くの分子シャペロンからなり得る。

【0616】

本開示において有用なシャペロンにはまた、細胞性タンパク質の正しいフォールディング及び安定化を容易化するための小分子を利用する薬理的シャペロンが含まれ得る。細胞性タンパク質における変異は、最終的にそれらの分解をもたらすタンパク質ミスフォールディング及び／または凝集をもたらし得る。薬理的シャペロンは、ミスフォールディングされた標的タンパク質に結合し、それらの正しい折り畳みを容易化し、それによりそれらの分解を防止するように設計されている。いくつかの実施形態では、本開示のSRE は、1つまたはより多くのミスフォールディングされたタンパク質を含み得、SRE に特異的な刺激物には、CA2エフェクターモジュールが薬理的シャペロンの存在下でのみ安定化されるような1つまたは薬理的シャペロンが含まれ得る。

【0617】

動物モデル

本開示の組成物の有用性及び有効性は、*in vivo*動物モデル、好ましくはマウスモデルで試験され得る。使用されるマウスモデルは、同系マウスモデルであり得、そのマウス細胞は、本開示の組成物で改変され、同じ遺伝的背景のマウスにおいて試験される。例には、pMEL-1及び4T1マウスモデルが含まれる。代替的には、ヒト細胞、例えば、腫瘍細胞及び免疫細胞が免疫不全マウスに導入された異種移植モデルもまた、そのような研究において利用され得る。使用される免疫不全マウスは、CBYJ、Cg-Foxn1nu/J、B6;129S7-Rag1tm1Mom/J、B6.129S7-Rag1tm1Mom/J、B6.CB17-Prkdcscid/SzJ、NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J、NOD.Cg-Rag1tm1MomPrf1tm1Sdz/Sz、NOD.CB17-Prkdcscid/SzJ、NOD.Cg-PrkdcscidB2mtm1Unc/J、NOD-scid IL2Rgnull、Nude(nu)マウス、SCIDマウス、NODマウス、RAG1/RAG2マウス、NOD-Scidマウス、IL2rgnullマウス、b2mnullマウス、NOD-scid IL2r□nullマウス、NOD-scid-B2mnullマウス、beigeマウス、及びHLAトランスジェニックマウスであり得る。

【0618】

細胞アッセイ

いくつかの実施形態では、免疫療法剤としての本開示の組成物の有効性は、細胞アッセイを使用して評価され得る。本開示の組成物の発現及び／または同一性のレベルは、タンパク質を特定するための及び／またはタンパク質レベルを定量するための当該技術分野で知られている任意の方法に従って決定され得る。いくつかの実施形態では、そのような方法は、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、及びイムノアッセイを含み得る。

【0619】

本明細書では、本開示のSRE、CA2生体回路及び組成物を発現する細胞を機能的に特性化するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、機能的特性化は、初代免疫細胞または不死化免疫細胞株で行われ、細胞表面マーカーの発現によって決定され得る。T細胞のための細胞表面マーカーの例には、CD3、CD4、CD8、CD14、CD20、CD11b、CD16、CD45及びHLA-DR、CD69、CD28、CD44、IFNガンマが含まれるがこれらに限定されない。T細胞消耗のためのマーカーには、PD1、TIM3、BTLA、CD160、2B4、CD39、及びLAG3が含まれる。抗原提示細胞のための細胞表面マーカーの例には、MHCクラスI、MHCクラスII、CD40、CD45、B7-1、B7-2、IFNγ受容体及びIL2受容体、IC

10

20

30

40

50

AM-1及び／またはFcγ受容体が含まれるがこれらに限定されない。樹状細胞のための細胞表面マーカーの例には、MHCクラスI、MHCクラスII、B7-2、CD18、CD29、CD31、CD43、CD44、CD45、CD54、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR及び／またはデクチン-1などが含まれるがこれらに限定されず；その一方で、いくつかの場合では、CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD56、及び／またはCD57の非存在も有する。NK細胞のための細胞表面マーカーの例には、CCL3、CCL4、CCL5、CCR4、CXCR4、CXCR3、NKG2D、CD71、CD69、CCR5、ホスホJAK／STAT、ホスホERK、ホスホp38／MAPK、ホスホAKT、ホスホSTAT3、グラニュリシン、グランザイムB、グランザイムK、IL10、IL22、IFNγ、LAP、パーフォリン、及びTNFαが含まれるがこれらに限定されない。

【0620】

診断

いくつかの実施形態では、本開示のscFv、CAR及び組成物は、診断として使用され得る。いくつかの場合では、本開示のscFv、CAR及び／組成物は、標的抗原を発現する細胞、組織、器官などを特定、標識または染色するために使用され得る。さらなる実施形態では、本開示のscFv、CAR及び／組成物は、がん細胞を有することが知られているまたは疑われる組織を含む組織切片（すなわち、組織学的組織切片）に存在するCD19を特定するために使用され得る。本開示のscFvを使用するそのような方法は、いくつかの場合では、組織切片におけるがん細胞または腫瘍を特定するために使用され得る。組織切片は、乳房、結腸、膵臓、卵巣、脳、肝臓、腎臓、脾臓、肺、皮膚、胃、腸、食道、及び骨を含むがこれらに限定されない任意の組織または器官のものであり得る。本開示のscFv、CAR及び／組成物はまた、がん血液試料を有することが疑われるまたはがん血液試料であることが知られている血液試料を特定し、それを正常組織から区別するために使用され得る。

【0621】

T細胞消耗

いくつかの実施形態では、CA2生体回路、SREまたはCA2エフェクターモジュールは、T細胞消耗を防止するために利用され得る。本明細書で使用される場合、「T細胞消耗」は、慢性T細胞活性化によって引き起こされるT細胞機能の段階的及び進行性喪失を指す。T細胞消耗は、抗ウイルス及び抗腫瘍免疫療法の有効性を限定する主要な要因である。消耗T細胞は、高いアポトーシス率及び複数の阻害性受容体の高い表面発現と同時に、低い増殖性及びサイトカイン生成能力を有する。消耗につながるT細胞活性化は、抗原の存在または非存在下のいずれかで生じ得る。

【0622】

細胞

本開示によれば、本開示の少なくとも1つのCA2生体回路、SRE（例えば、CA2DD）、CA2エフェクターモジュール及び免疫療法剤を発現するように遺伝子改変された細胞が提供される。本開示の細胞は、限定されないが、免疫細胞、幹細胞及び腫瘍細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、限定されないが、T細胞、例えば、CD8+T細胞及びCD4+T細胞（例えば、Th1、Th2、Th17、Foxp3+細胞）、メモリーT細胞、例えば、Tメモリー幹細胞、セントラルTメモリー細胞、及びエフェクターメモリーT細胞、最終分化エフェクターT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK T細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、制御性T細胞（Treg）、及び樹状細胞（DC）、エフェクター機能を誘発し得る他の免疫細胞、またはそれらの混合物を含むエフェクター免疫細胞であり得る。T細胞は、Tαβ細胞及びTγδ細胞であり得る。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ヒト胚幹細胞、間葉幹細胞、及び神経幹細胞に由来し得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、枯渇した内因性T細胞受容体であり得る（米国特許番号9,273,283；9,181,5

10

20

30

40

50

27；及び9，028，812（これらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。

【0623】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、特定の個々の対象に対して自己、同種、同系、または異種であり得る。

【0624】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、哺乳動物細胞、特にヒト細胞であり得る。本開示の細胞は、初代細胞または不死化細胞株であり得る。

【0625】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、細胞の増殖及び増加を誘発させるためのペイロードとしての増加要素を含み得る。例示的なペイロードには、RASスーパーファミリーのメンバーが含まれる。

【0626】

修飾免疫細胞は、細胞組成物を対象となるCA2生体回路、CA2エフェクターモジュール、SRE及び／またはペイロード（例えば、免疫療法剤）のポリペプチド、または前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または前記ポリヌクレオチドを含むベクターで形質導入することによって達成され得る。ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクター、ガンマーレトロウイルスベクター、組換えAAV、アデノウイルスベクター及び腫瘍溶解性ウイルスベクターであり得る。他の態様では、非ウイルスベクター、例えば、ナノ粒子及びリポソームも使用され得る。いくつかの実施形態では、本開示の免疫細胞は、刺激物を使用して調整可能な本開示の少なくとも1つの免疫療法剤を発現するように遺伝子改変される。いくつかの例では、同じCA2生体回路及びCA2エフェクターモジュールにおいて構築された2つ、3つまたはそれより多くの免疫療法剤が細胞に導入される。他の例では、2つ、3つ、またはそれより多くのCA2生体回路、CA2エフェクターモジュールであって、その各々が免疫療法剤を含むものが細胞に導入され得る。

【0627】

いくつかの実施形態では、本開示の免疫細胞は、抗原特異的T細胞受容体（TCR）、または本明細書で教示される抗原特異的キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように改変されたT細胞（CAR T細胞として知られている）であり得る。したがって、本明細書に記載のCARシステム（またはTCR）をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド、またはそのポリヌクレオチドを含むベクターがT細胞に導入される。CARまたはTCRを発現するT細胞は、CARまたはTCRの細胞外標的化部位を介して特定の抗原に結合し、それにより細胞内シグナル伝達ドメイン（複数可）を介するシグナルがT細胞に伝達され、結果として、T細胞が活性化される。活性化したCAR T細胞は、細胞傷害性サイトカイン（例えば、腫瘍壊死因子、及びリンホトキシンなど）の放出、細胞増殖速度の改善、細胞表面分子の変化などを含むその挙動を変化させる。そのような変化は、CARまたはTCRによって認識される抗原を発現する標的細胞の破壊を引き起こす。また、サイトカインの放出または細胞表面分子の変化は、他の免疫細胞、例えば、B細胞、樹状細胞、NK細胞、及びマクロファージを刺激する。

【0628】

いくつかの実施形態では、本開示のCAR T細胞は、別の1つ、2つ、3つまたはそれより多くの免疫療法剤を発現するようにさらに改変され得る。免疫療法剤は、異なる標的分子に特異的な別のCARもしくはTCR；サイトカイン、例えば、IL2、IL12、IL15及びIL18、もしくはサイトカイン受容体、例えば、IL15Ra；阻害性シグナルを刺激性シグナルに変換するキメラスイッチ受容体；養子移植細胞を標的部位、例えば、腫瘍組織に誘導するホーミング受容体；免疫細胞の代謝を最適化する薬剤；または養子細胞移植後に重篤事象が観察された場合にもしくは移植された免疫細胞がもはや必要でない場合に活性化したT細胞を殺傷する安全性スイッチ遺伝子（例えば、自殺遺伝子）であり得る。これらの分子は、同じエフェクターモジュールにまたは別個のエフェクタ

10

20

30

40

50

ーモジュールに含まれ得る。

【0629】

一実施形態では、本開示のCAR T細胞（TCR T細胞を含む）は、CARを含むCA2エフェクターモジュール及びサイトカインを含むCA2エフェクターモジュールで形質転換された「武装」CAR T細胞であり得る。誘導性または構成的に分泌される活性サイトカインは、CAR T細胞をさらに装甲化して有効性及び持続性を改善する。この文脈において、そのようなCAR T細胞は、「装甲CAR T細胞」とも称される。「装甲」分子は、腫瘍微小環境ならびに自然免疫系及び適応免疫系の他の要素に基づいて選択され得る。いくつかの実施形態では、分子は、異なるメカニズムを介して不利な腫瘍微小環境にもかかわらずCAR T細胞の有効性及び持続性をさらに向上させることが示されているIL2、IL12、IL15、IL18、I型IFN、CD40L及び4-1BBLなどの刺激性因子であり得る（Yeku et al., Biochem Soc Trans., 2016, 44 (2) : 412-418）。

10

【0630】

いくつかの実施形態では、本開示の免疫細胞は、抗原特異的T細胞受容体（TCR）、または本明細書で教示される抗原特異的キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように改変されたNK細胞であり得る。

【0631】

NK細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）から単離され得、またはヒト胚幹（ES）細胞及び誘導多能性幹細胞（iPSC）に由来し得る。PBMCから単離された初代NK細胞は、養子免疫療法のためにさらに増殖され得る。NK細胞の増殖に有用な戦略及びプロトコルには、インターロイキン2（IL2）刺激及び自己フィーダー細胞の使用、または遺伝子改変された同種フィーダー細胞の使用を含み得る。いくつかの態様では、NK細胞は、IL15、IL21、IL2、41BBL、IL12、IL18、MICA、2B4、LFA-1、及びBCM1／SLAMF2を含む刺激リガンドの組み合わせで選択的に増殖され得る（例えば、米国特許公開番号US20150190471）。

20

【0632】

CAR及び／または他の免疫療法剤を含むCA2エフェクターモジュールを発現する免疫細胞が、がん免疫療法として使用され得る。免疫療法は、活性成分としてCAR及び／または他の免疫療法剤を発現する細胞を含み、好適な賦形剤をさらに含み得る。賦形剤の例には、様々な細胞培地、及び等張性塩化ナトリウムを含む前述した薬学的に許容可能な賦形剤が含まれ得る。

30

【0633】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、本開示の組成物を発現するように遺伝子改変された樹状細胞であり得る。そのような細胞は、がんワクチンとして使用され得る。

【0634】

V. 定義

本明細書における様々な箇所で、本開示の組成物の特徴または機能が、群または範囲で開示されている。本開示は、そのような群及び範囲のメンバーの各々かつすべての個々の副次的組み合わせを含むことが特に意図されている。以下のは、用語の定義の非限定的なリストである。

40

【0635】

活性：本明細書で使用される場合、用語「活性」は、物事が発生しているまたは行われている状態を指す。本開示の組成物は、活性を有し得、この活性は、1つまたはより多くの生物学的事象を伴い得る。いくつかの実施形態では、生物学的事象は、細胞シグナル伝達事象を含み得る。いくつかの実施形態では、生物学的事象は、1つまたはより多くの対応するタンパク質、受容体、小分子または本明細書に記載の生体回路成分のいずれかとの細胞シグナル伝達事象関連タンパク質相互作用を含み得る。

【0636】

養子細胞療法（ACT）：用語「養子細胞療法」または「養子細胞移植」は、本明細書

50

で使用される場合、患者への細胞の移植を伴う細胞療法であって、細胞が、患者、または別の個体に由来するものであり得、かつ患者に移植して戻される前に、修飾（変化）されているものを指す。治療細胞は、免疫系、例えば、エフェクター免疫細胞：CD4+T細胞；CD8+T細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）；ならびにB細胞及び切除された腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球（TIL）に由来し得る。最も一般的に移植される細胞は、ex vivo増殖または操作の後の自己抗腫瘍T細胞である。例えば、自己末梢血リンパ球は、T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現することによって特定の腫瘍抗原を認識するように遺伝子修飾され得る。

【0637】

薬剤：本明細書で使用される場合、用語「薬剤」は、生物学的、薬学的、または化学的化合物を指す。非限定的な例には、単純または複雑な有機または無機分子、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体、抗体誘導体、抗体断片、受容体、及び可溶性因子が含まれる。

【0638】

アゴニスト：用語「アゴニスト」は、本明細書で使用される場合、受容体と組み合わせて、細胞反応を生み出し得る化合物を指す。アゴニストは、受容体に直接的に結合するリガンドであり得る。代替的には、アゴニストは、例えば、（a）受容体に直接的に結合する別の分子と複合体を形成し、または（b）そうでなければ、他の化合物が受容体に直接的に結合するように別の化合物の改変をもたらすことによって受容体と間接的に組み合わせられ得る。アゴニストは、特定の受容体または受容体のファミリーのアゴニスト、例えば、共刺激性受容体のアゴニストと称され得る。

【0639】

アンタゴニスト：用語「アンタゴニスト」は、本明細書で使用される場合、それが結合する標的（複数可）の生物学的活性を阻害または低下させる任意の薬剤を指す。

【0640】

抗原：用語「抗原」は、本明細書で使用される場合、対象に導入された場合または対象によって生成された場合（例えば、がん発症自体によって生じる腫瘍抗原）に、免疫反応を引き起こす分子として定義される。この免疫反応は、抗体生成、もしくは特定の免疫学的に有能な細胞、例えば、細胞傷害性Tリンパ球及びTヘルパー細胞の活性化、またはその両方を伴い得る。抗原は、生物、タンパク質／抗原のサブユニット、殺傷または不活性化された細胞全体またはライセートに由来し得る。本開示の文脈において、用語「対象となる抗原」または「所望の抗原」は、本開示の抗体及び／または本明細書に記載されるその断片、変異体、バリエーション、及び／または変化体と免疫特異的に結合または相互作用する本明細書で提供されるそれらのタンパク質及び／または他の生体分子を指す。いくつかの実施形態では、対象となる抗原は、本明細書に記載のポリペプチドもしくはペイロードもしくはタンパク質、またはその断片もしくは部分のいずれかを含み得る。

【0641】

およそ：本明細書で使用される場合、用語「およそ」または「約」は、対象となる1つまたはより多くの値に適用される場合、記述された参照値と類似する値を指す。所定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、別段記述されない限りまたは文脈から明らかでない限り、記述された参照値のいずれかの方向（より上またはより下）に25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、またはそれ未満に入る値の範囲を指す（そのような数値が可能な値の100を超えるであろう場合を除く）。

【0642】

に関連付けられた：本明細書で使用される場合、用語「と関連付けられた」、「コンジュゲートされた」、「連結された」、「結合した」、及び「繋がれた」は、2つまたはより多くの部位に関して使用される場合、部位が、直接的にまたは連結剤として機能する1つまたはより多くの追加の部位を介して、互いに物理的に関連付けられ、または接続されることで、構造が使用される条件、例えば、生理的条件下で部位が物理的に関連付けられ

10

20

30

40

50

たままになるように十分に安定した構造が形成されることを意味する。「関連」は、厳密には、直接的な共有化学結合を介するものである必要はない。また、イオンもしくは水素結合または「関連付けられた」実体が物理的に関連付けられたままになるように十分に安定したハイブリダイゼーションベースの接続性を示唆し得る。

【0643】

自己：用語「自己」は、本明細書で使用される場合、後に個体に再導入される同じ個体に由来する物質を意味する。

【0644】

バーコード：用語「バーコード」は、本明細書で使用される場合、あるポリヌクレオチドまたはアミノ酸を別のものから区別するポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列を指す。

【0645】

がん：用語「がん」は、本明細書で使用される場合、身体における異常な細胞の制御不能な成長を特徴とする様々な疾患の広範な群を指す。制御されない細胞分裂及び成長は、悪性腫瘍の形成をもたらし、これは隣接組織に侵入し、最終的にはリンパ系または血流を介して身体の遠位部分に転移する。

【0646】

共刺激性分子：本明細書で使用される場合、免疫T細胞活性化におけるその意味に従って、T細胞とAPCとの間で係合し、APC上の抗原/MHC複合体(pMHC)のT細胞受容体(TCR)認識に起因するT細胞における刺激性シグナルと組み合わさるT細胞における阻害性シグナルを生成する免疫細胞表面受容体/リガンドの群を指す。

【0647】

サイトカイン：用語「サイトカイン」は、本明細書で使用される場合、免疫系の機能に影響を及ぼし、制御し得る多くの種類の細胞タイプによって生成される、多面的な機能を有する小さな可溶性因子のファミリーを指す。

【0648】

送達：用語「送達」は、本明細書で使用される場合、化合物、物質、実体、部位、搭載物またはペイロードを送達する作用または手法を指す。「送達剤」は、細胞、対象または他の生体系細胞への1つまたはより多くの物質(本開示の化合物及び/または組成物を含むがこれらに限定されない)の少なくとも部分的なin vivoの送達を容易化する任意の薬剤を指す。

【0649】

脱安定化された：本明細書で使用される場合、用語「脱安定性」、「脱安定化する」、「脱安定化領域」または「脱安定化ドメイン」は、一領域または分子であって、同じ領域または分子の開始、参照、野生型またはネイティブ形態よりも安定性が低いものを意味する。

【0650】

修飾された：本明細書で使用される場合、本開示の実施形態は、構造的または化学的にかかわらず、出発点である野生型またはネイティブ分子から変化する特徴または性質を有するように設計されている場合、「修飾」される。

【0651】

発現：本明細書で使用される場合、核酸配列の「発現」は、以下の事象のうちの1つまたはより多くを指す：(1) DNA配列からのRNA鋳型の生成(例えば、転写による)；(2) RNA転写産物のプロセッシング(例えば、スプライシング、編集、5'キャップ形成、及び/または3'末端プロセッシングによる)；(3) RNAのポリペプチドまたはタンパク質への翻訳；(4) ポリペプチドまたはタンパク質のフォールディング；及び(5) ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾。

【0652】

特徴：本明細書で使用される場合、「特徴」は、特性、性質、または区別可能な要素を指す。

【0653】

10

20

30

40

50

製剤：本明細書で使用される場合、「製剤」は、少なくとも本開示の化合物及び／または組成物及び送達剤を含む。

【0654】

断片：「断片」は、本明細書で使用される場合、部分を指す。例えば、タンパク質の断片は、全長タンパク質を消化することによって得られるポリペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質の断片は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250またはそれより多くのアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、抗体の断片には、抗体の部分が含まれる。

10

【0655】

機能性：本明細書で使用される場合、「機能性」生物学的分子は、特徴となる性質及び／または活性を示す構造を有し、形態をとる生物学的実体である。

【0656】

免疫細胞：用語「免疫細胞」は、本明細書で使用される場合、2つの主要系列、すなわち、骨髄系前駆細胞（骨髄細胞、例えば、単球、マクロファージ、樹状細胞、巨核球及び顆粒球を生じさせる）及びリンパ系前駆細胞（リンパ系細胞、例えば、T細胞、B細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞を生じさせる）を生じさせる、骨髄における造血幹細胞を起源とする免疫系の任意の細胞を指す。例示的な免疫系細胞には、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4-CD8-ダブルネガティブT細胞、 $\gamma\delta$ 細胞、 $\alpha\beta$ 細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラー細胞、及び樹状細胞が含まれる。マクロファージ及び樹状細胞は、「抗原提示細胞」または「APC」と称され得、これは、ペプチドと複合化したAPCの表面上の主要組織適合性複合体（MHC）受容体がT細胞の表面上のTCRと相互作用した場合にT細胞を活性化し得る特殊な細胞である。

20

【0657】

免疫療法：用語「免疫療法」は、本明細書で使用される場合、疾患に対する免疫系の反応性の誘導または回復による疾患の処置のタイプを指す。

【0658】

免疫療法剤：用語「免疫療法剤」は、本明細書で使用される場合、生物学的、薬学的、または化学的化合物を用いる疾患に対する免疫系の反応性の誘導または回復による疾患の処置を指す。

30

【0659】

in vitro：本明細書で使用される場合、用語「*in vitro*」は、生物（例えば、動物、植物、または微生物）内ではなく、人工環境、例えば、試験管または反応容器、細胞培養、ペトリ皿などにおいて生じる事象を指す。

【0660】

in vivo：本明細書で使用される場合、用語「*in vivo*」は、生物（例えば、動物、植物、もしくは微生物またはその細胞もしくは組織）内で生じる事象を指す。

【0661】

リンカー：本明細書で使用される場合、リンカーは、2つまたはより多くのドメイン、部位または実体を接続させる部位を指す。一実施形態では、リンカーは、10個またはより多くの原子を含み得る。さらなる実施形態では、リンカーは、原子の群、例えば、10～1,000個の原子を含み得、原子または基、例えば、限定されないが、炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、硫黄、スルホキシド、スルホニル、カルボニル、及びイミンから構成され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つまたはより多くのヌクレオチドを含む1つまたはより多くの核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーによって結合される部位には、原子、化学基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸塩基、糖、核酸、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、ペイロード（例えば、治療剤）、またはマーカー（化学的、蛍光、放射性または

40

50

生物発光マーカを含むがこれらに限定されない) が含まれ得るがこれらに限定されない。リンカーは、多重体またはコンジュゲートを形成するため、及び本明細書に記載されるようにペイロードを投与するためなどの任意の有用な目的のために使用され得る。リンカーに組み込まれ得る化学基の例には、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキレン、ヘテロアルキレン、アリール、またはヘテロシクリルが含まれるがこれらに限定されず、その各々は、本明細書に記載されるように、任意に置換され得る。リンカーの例には、不飽和アルカン、ポリエチレングリコール（例えば、エチレンまたはプロピレングリコールモノマー単位、例えば、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコール、またはテトラエチレングリコール）、及びデキストランポリマーが含まれるがこれらに限定されない。他の例には、例えば、還元剤または光分解を使用して切断され得るジスルフィド結合 ($-S-S-$) またはアゾ結合 ($-N=N-$) などのリンカー内の切断可能な部位が含まれるがこれらに限定されない。選択的に切断可能な結合の非限定的な例には、例えば、トリス (2-カルボキシエチルホスフィン (TCPEP))、または他の還元剤、及び／または光分解の使用によって切断され得るアミド結合、ならびに、例えば、酸性または塩基性加水分解によって切断され得るエステル結合が含まれる。

【0662】

チェックポイント／因子：本明細書で使用される場合、チェックポイント因子は、機能がプロセスの分岐点で作用する任意の部位または分子である。例えば、チェックポイントタンパク質、リガンドまたは受容体は、細胞周期を失速または加速させるように機能し得る。

【0663】

代謝産物：代謝産物は、細胞内で天然に生じる酵素によって触媒される代謝反応の中間体生成物である。この用語は、通常、小分子、より大きな生体分子の断片または処理された生成物を記述するために使用される。

【0664】

改変された：本明細書で使用される場合、用語「改変された」は、親または参照分子または実体と比較して、分子または実体の変化した状態または構造を指す。分子は、化学的、構造的、及び機能的を含む多くの方法で改変され得る。いくつかの実施形態では、本開示の化合物及び／または組成物は、非天然アミノ酸の導入によって改変される。

【0665】

変異：本明細書で使用される場合、用語「変異」は、変化及び／または変更を指す。いくつかの実施形態では、変異は、タンパク質（ペプチド及びポリペプチドを含む）及び／または核酸（ポリ核酸を含む）に対する変化及び／または変更であり得る。いくつかの実施形態では、変異は、タンパク質及び／または核酸配列に対する変化及び／または変更を含む。そのような変化及び／または変更は、1つまたはより多くのアミノ酸（タンパク質及び／またはペプチドの場合）及び／またはヌクレオチド（核酸及びまたはポリ核酸、例えば、ポリヌクレオチドの場合）の付加、置換及びまたは欠失を含み得る。いくつかの実施形態では、変異がアミノ酸及び／またはヌクレオチドの付加及び／または置換を含む場合、そのような付加及び／または置換は、1つまたはより多くのアミノ酸及び／またはヌクレオチド残基を含み得、改変されたアミノ酸及び／またはヌクレオチドを含み得る。変異、変化または変更の得られるコンストラクト、分子または配列は、本明細書で変異体と称され得る。

【0666】

ネオアンチゲン：用語「ネオアンチゲン」は、本明細書で使用される場合、腫瘍細胞には存在するが正常細胞には存在しない腫瘍抗原を指し、胸腺におけるそれらの同種の抗原特異的T細胞の欠失を誘発しない（すなわち、中枢性トレランス）。これらの腫瘍ネオアンチゲンは、がん免疫療法に必要とされる有効な免疫反応を誘導するために、病原体に類似する「外来」シグナルを提供し得る。ネオアンチゲンは、特定の腫瘍に限定され得る。

ネオアンチゲンは、特定の腫瘍に限定され得る。ネオアンチゲンは、ミスセンス変異を有するペプチド／タンパク質（ミスセンスネオアンチゲン）、または新規オープンリーディングフレーム（neoORF）からの長鎖完全新規アミノ酸ストレッチを有する新規ペプチドであり得る。neoORFは、フレーム外挿入または欠失（マイクロサテライト不安定性を引き起こすDNAミスマッチ修復の欠損に起因する）、遺伝子融合、終止コドンにおけるリードスルー変異、または不適切にスプライシングされたRNAの翻訳によって一部の腫瘍において生成され得る（例えば、Saeterdal et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98:13255-13260）。

【0667】

標的外：本明細書で使用される場合、「標的外」は、任意の1つまたはより多くの標的、遺伝子、細胞性転写産物、細胞、及び／または組織に対する任意の意図しない影響を指す。

【0668】

機能可能に連結された：本明細書で使用される場合、語句「機能可能に連結された」は、2つまたはより多くの分子、コンストラクト、転写産物、実体、部位などの間の機能的接続を指す。

【0669】

ペイロードまたは対象となるペイロード（POI）：用語「ペイロード」及び「対象となるペイロード（POI）」は、本明細書で使用される場合、互換的に使用され得る。対象となるペイロード（POI）は、機能が変更される任意のタンパク質または化合物を指す。本開示の文脈において、POIは、自然免疫系及び適応免疫系の両方を含む免疫系の構成要素である。対象となるペイロードは、タンパク質、融合タンパク質をコードする融合コンストラクト、もしくはノンコーディング遺伝子、またはそのバリエーション及び断片であり得る。対象となるペイロードは、アミノ酸ベースである場合、対象となるタンパク質と称され得る。

【0670】

薬学的に許容可能な賦形剤：用語「薬学的に許容可能な賦形剤」は、本明細書で 사용되는場合、薬学的組成物に存在する活性成分（例えば、本明細書されるもの）以外の任意の成分であって、対象において実質的に非毒性及び非炎症性である特性を有するものを指す。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な賦形剤は、活性薬剤を懸濁及び／または溶解することが可能なビヒクルである。賦形剤には、例えば、抗接着剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング剤、圧縮補助剤、崩壊剤、色素（着色剤）、軟化剤、乳化剤、充填剤（希釈剤）、膜形成剤またはコーティング剤、香料、芳香剤、流動促進剤（流動性向上剤）、滑沢剤、防腐剤、印刷インク、吸着剤、懸濁または分散剤、甘味料、及び水和水が含まれ得る。例示的な賦形剤には、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（二塩基性）、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスボビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微結晶性セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、アルファ化デンプン、プロピルパラベン、パルミチン酸レチノール、シェラック、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン（トウモロコシ）、ステアリン酸、スクロース、タルク、二酸化チタン、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC、及びキシリトールが含まれるがこれらに限定されない。

【0671】

薬学的に許容可能な塩：本明細書に記載の化合物の薬学的に許容可能な塩は、開示される化合物の形態であって、酸または塩基部位がその塩形態であるもの（例えば、遊離塩基を好適な有機酸と反応させることによって生成される）である。薬学的に許容可能な塩の例には、塩基性残基、例えば、アミンの鉱酸または有機酸塩；酸性残基、例えば、カル

10

20

30

40

50

ボン酸のアルカリまたは有機塩などが含まれるがこれらに限定されない。代表的な酸付加塩には、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが含まれる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩には、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、及びマグネシウムなど、ならびに非毒性アンモニウム、第4級アンモニウム、及びアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、及びエチルアミンなどを含むがこれらに限定されないアミンカチオンが含まれる。薬学的に許容可能な塩には、従来の非毒性塩、例えば、非毒性無機または有機酸由来のものが含まれる。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な塩は、従来の化学的方法によって塩基性または酸性部位を含有する親化合物から調製される。通常、そのような塩は、これらの化合物の遊離酸または塩基の形態を、化学量論量の適切な塩基または酸と、水中もしくは有機溶媒中、またはその2つの混合物中で反応させることによって調製され得る；通常、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリルのような非水性媒体が好ましい。好適な塩のリストは、Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, 及び Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977) (その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。薬学的に許容可能な溶媒和物：用語「薬学的に許容可能な溶媒和物」は、本明細書で使用される場合、好適な溶媒の分子が結晶格子に組み込まれた化合物の結晶形態を指す。例えば、溶媒和物は、有機溶媒、水、またはそれらの混合物を含む溶液からの結晶化、再結晶化、または析出によって調製され得る。好適な溶媒の例は、エタノール、水（例えば、一、二、及び三水和物）、N-メチルピロリジノン（NMP）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N、N'-ジメチルホルムアミド（DMF）、N、N'-ジメチルアセトアミド（DMAC）、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン（DMEU）、1, 3-ジメチル-3, 4, 5, 6-テトラヒドロ-2-(1H)-ピリミジノン（DMPU）、アセトニトリル（ACN）、プロピレングリコール、酢酸エチル、ベンジルアルコール、2-ピロリドン、安息香酸ベンジルなどである。水が溶媒である場合、溶媒和物は、「水和水」と称される。いくつかの実施形態では、溶媒和物に組み込まれる溶媒は、溶媒和物が投与される（例えば、薬学的組成物の単位投薬形態で）生物にとって生理的に忍容可能なタイプまたはレベルのものである。

【0672】

安定な：本明細書で使用される場合、「安定な」は、反応混合物から有用な純度への単離に耐えるのに十分に頑強であり、好ましくは有効な治療剤に製剤化可能である化合物または実体を指す。

【0673】

安定化した：本明細書で使用される場合、用語「安定化する」、「安定化した」、「安定化した領域」は、安定にするまたは安定になることを意味する。いくつかの実施形態で

10

20

30

40

50

は、安定性は、絶対値に対して測定される。いくつかの実施形態では、安定性は、二次的状況もしくは状態に対してまたは参照化合物もしくは実体に対して測定される。

【0674】

標準的CAR：本明細書で使用される場合、用語「標準的CAR」は、キメラ抗原受容体の標準的な設計を指す。細胞外scFv断片、膜貫通ドメイン及び1つまたはより多くの細胞内ドメインを含むCAR融合タンパク質の成分は、単一の融合タンパク質として線状に構築され得る。

【0675】

刺激反応要素（SRE）：用語「刺激反応要素（SRE）」は、本明細書で使用される場合、エフェクターモジュールの1つまたはより多くのペイロードに接合、結合、連結または関連付けられたエフェクターモジュールの成分であり、いくつかの例では、1つまたはより多くの刺激物に対するエフェクターモジュールの反応性特質の原因である。本明細書で使用される場合、刺激物に対するSREの「反応性」特質は、刺激物に対する共有もしくは非共有結合性相互作用、直接的もしくは間接的関連または構造的もしくは化学的反応を特徴とし得る。さらに、任意のSREの刺激物に対する反応は、程度または種類の問題であり得る。反応は、部分的反応であり得る。反応は、可逆的反応であり得る。反応は、最終的に、制御されたシグナルまたは出力につながり得る。そのような出力シグナルは、刺激物に対する相対的な特質のもの、例えば、1～100の間の調節性効果または2倍、3倍、4倍、5倍、10倍もしくはそれより大などの倍数増加もしくは減少の生成であり得る。SREの1つの非限定的な例は、脱安定化ドメイン（DD）である。

【0676】

対象：本明細書で使用される場合、用語「対象」または「患者」は、本開示に従う組成物が、例えば、実験、診断、予防、及び／または治療目的のために投与され得る任意の生物を指す。典型的な対象には、動物（例えば、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及びヒト）及び／または植物が含まれる。

【0677】

T細胞：T細胞は、T細胞受容体（TCR）を生成する免疫細胞である。T細胞は、ナイーブ（抗原に曝露されていない；TCMと比較してCD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127、及びCD45RAの増加した発現、ならびにCD45ROの減少した発現）、メモリーT細胞（TM）（抗原経験しており、長命である）、及びエフェクター細胞（抗原経験しており、細胞傷害性がある）であり得る。TMは、セントラルメモリーT細胞（TCM、ナイーブT細胞と比較してCD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO、及びCD95の増加した発現、ならびにCD54RAの減少した発現）及びエフェクターメモリーT細胞（TEM、ナイーブT細胞またはTCMと比較してCD62L、CCR7、CD28、CD45RAの減少した発現、及びCD127の増加した発現）のサブセットにさらに分けられ得る。エフェクターT細胞（TE）は、TCMと比較してCD62L、CCR7、CD28の発現が減少しており、かつグランザイム及びパーフォリンが陽性である抗原経験CD8+細胞傷害性Tリンパ球を指す。他の例示的なT細胞には、制御性T細胞、例えば、CD4+CD25+（Foxp3+）制御性T細胞及びTreg17細胞、ならびにTr1、Th3、CD8+CD28-、及びQa-1制限T細胞が含まれる。

【0678】

T細胞受容体：T細胞受容体（TCR）は、MHC受容体に結合した抗原ペプチドに特異的に結合することが可能な可変抗原結合ドメイン、定常ドメイン、膜貫通領域、及び短い細胞質尾部を有する免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーを指す。TCRは、細胞の表面上でまたは可溶性形態で見られ得、通常、α及びβ鎖（それぞれ、TCRα及びTCRβとしても知られている）、またはγ及びδ鎖（それぞれ、TCRγ及びTCRδとしても知られている）を有するヘテロ二量体を含む。TCR鎖（例えば、α鎖、β鎖）の細胞外部分は、2つの免疫グロブリンドメインであるN末端における可変ドメイン（例えば、α鎖可変ドメインまたはVα、β鎖可変ドメインまたはVβ）、及び細胞膜に隣接

10

20

30

40

50

した1つの定常ドメイン（例えば、 α 鎖定常ドメインまたは C_{α} 及び β 鎖定常ドメインまたは C_{β} ）を含有する。免疫グロブリンと同様に、可変ドメインは、フレームワーク領域（FR）によって分離された相補性決定領域（CDR）を含有する。TCRは、通常、CD3と関連付けられてTCR複合体を形成する。本明細書で使用される場合、用語「TCR複合体」は、CD3とTCRとの関連によって形成される複合体を指す。例えば、TCR複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、CD3 ζ 鎖のホモ二量体、TCR α 鎖、及びTCR β 鎖から構成され得る。代替的に、TCR複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、CD3 ζ 鎖のホモ二量体、TCR γ 鎖、及びTCR δ 鎖から構成され得る。「TCR複合体の成分」は、本明細書で使用される場合、TCR鎖（すなわち、TCR α 、TCR β 、TCR γ またはTCR δ ）、CD3鎖（すなわち、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ またはCD3 ζ ）、または2つまたはより多くのTCR鎖もしくはCD3鎖によって形成される複合体（例えば、TCR α 及びTCR β の複合体、TCR γ 及びTCR δ の複合体、CD3 ϵ 及びCD3 δ の複合体、CD3 γ 及びCD3 ϵ の複合体、またはTCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、及び2つのCD3 ϵ 鎖のサブTCR複合体を指す。

【0679】

治療的有効量：本明細書で使用される場合、用語「治療的有効量」は、感染症、疾患、障害、及び／または病態に罹患しているまたは罹患しやすい対象に投与される場合、感染症、疾患、障害、及び／または病態の処置、その症状の改善、診断、予防、及び／または発症の遅延をするのに十分な、送達される薬剤（例えば、核酸、薬物、治療剤、診断剤、予防剤など）の量を意味する。いくつかの実施形態では、治療的有効量は、単回用量で提供される。いくつかの実施形態では、治療的有効量は、複数の用量を含む投薬レジメンで投与される。当業者は、いくつかの実施形態では、単位投薬形態が、そのような投薬レジメンの一部として投与される場合に有効な量を含む場合、治療的有効量の特定の薬剤または実体を含むとみなされ得ることを理解する。

【0680】

処置または処置すること：本明細書で使用される場合、用語「処置」または「処置すること」は、好ましくは有益なまたは所望の臨床的結果を含む有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチを意味する。そのような有益なまたは所望の臨床的結果には、以下のうちの1つまたはより多くが含まれるがこれらに限定されない：がん細胞または他の罹患細胞の増殖を減少させること（または破壊すること）、がんに見られるがん細胞の転移を減少させること、腫瘍のサイズの縮小、疾患に起因する症状を軽減すること、疾患に罹患している人の生活の質を向上させること、疾患を処置するために必要とされる他の薬の用量を減少させること、疾患の進行を遅らせること、及び／または個体の生存を延長させること。

【0681】

調整する：本明細書で使用される場合、用語「調整する」は、ある物事を刺激物に反応してまたは特定のアウトカムに向けて調節する、バランスをとるまたは適応させることを意味する。1つの非限定的な例では、本開示のSRE及び／またはDDは、特定の刺激物及び／または環境に反応して、それらが付加、結合または関連付けられた組成物の機能または構造を調節する、バランスをとるまたは適応させる。

【0682】

均等物及び範囲

当業者は、日常的な実験を超えるものを使用することなく、本明細書に記載の開示に従って特定の実施形態に対する多くの均等物を認識し、または確認することができる。本開示の範囲は、上記の記載に限定されることは意図されておらず、むしろ、添付の特許請求の範囲に示されるとおりである。

【0683】

特許請求の範囲において、「a」、「an」、「the」などの冠詞は、反対に示されない限りまたは文脈から明らかでない限り、1つまたは複数を意味し得る。群の1つまた

10

20

30

40

50

はより多くのメンバーの間に「または」を含む請求項または記述は、反対に示されない限りまたは文脈から明らかでない限り、群のメンバーの1つ、複数、またはすべてが所定の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する場合に満たされると考えられる。本開示には、群の正確に1つのメンバーが所定の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する実施形態が含まれる。本開示には、群のメンバーの複数、または全体が所定の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する実施形態が含まれる。

【0684】

また、用語「含む」は、オープンであり、追加の要素または工程の包含を許可するが、必要としないことが意図されることが留意される。よって、用語「含む」が本明細書で使

10

【0685】

範囲が示される場合、端点が含まれる。さらに、別段示されない限りまたは別段文脈及び当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値は、文脈が別段明らかに示していない限り、範囲の下限の単位の10分の1まで、本開示の異なる実施形態において記述された範囲内の任意の特定の値または副次的範囲を想定し得ることを理解されたい。

【0686】

また、先行技術に該当する本開示の任意の特定の実施形態は、請求項のうちの任意の1つまたはより多くから明示的に除外され得ることを理解されたい。そのような実施形態は、当業者に知られていると考えられるので、それらは、除外が本明細書において明白に示

20

【0687】

使用されている用語は、限定ではなく説明の用語であること、ならびに、本開示のより広い態様の真の範囲及び趣旨から逸脱することなく、添付の特許請求の範囲の範囲内で変更がなされ得ることを理解されたい。

【0688】

本開示は、いくつかの記載された実施形態に関して、ある程度の長さである程度の特定性をもって説明されているが、任意のそのような特定物もしくは実施形態または任意の特定の実施形態に限定されるべきことは意図されておらず、先行技術に鑑みてそのような特許請求の範囲の最も広い可能な解釈を提供し、そのため、本開示の意図された範囲を効果的に包含するように添付の特許請求の範囲を参照して解釈されるべきである。本開示は、以下の非限定的な例によってさらに説明される。

30

【実施例】

【0689】

以下の実施例では、コンストラクト及びDDは、それらの識別子（例えば、OT-001976）によって称される。コンストラクト及びDDに関する追加の情報は、本明細書を通して見ることができる。

40

【0690】

実施例1. CA2変異体飽和ライブラリ

配列番号11717の位置2～260内のあらゆるアミノ酸が変異した変異体ライブラリを生成した。変異のライブラリをリンカーを介してレポータータンパク質、例えば、AcGFPに融合し、Jurkat細胞に形質導入した。ライブラリ発現細胞を選択可能なマーカー、mCherryを使用して選択した。ライブラリ発現細胞を「低選別」に供し、GFP陽性集団の下位10%を選別して最も低い基底発現クローンのみを収集した。ライブラリ発現細胞を10μMのセレキシブで24時間処置し、上位10%及び上位10～30%のGFP陽性細胞を別々に選別し、収集して、リガンドの存在下で高いGFP発現を有する細胞のみをこの工程で選択したことを確保した。2つの集団、すなわち、上位

50

10%及び上位10～30%を次の選別工程のために組み合わせ、その工程において、GFPを発現する細胞の下位22%を選別し、収集した。最終ライブラリをDMSOまたは10μMのセレコキシブで処置し、同様の条件下でOT-001987及びOT-001515（CA2のW208S変異を有する）と比較した。低い基底発現及びリガンド依存性安定化がリガンド処置で観察されたが、最大発現は、OT-001987コンストラクトほど高くはなかった。OT-001987と比較すると、OT-001515は、セレコキシブでリガンド依存性安定化を示した。ゲノムDNAを最終ライブラリから単離し、増幅し、ギブソンアセンブリによってレンチウイルスベクターに挿入した。表16は、この方法によって生成されたカルボニックアンヒドラーゼ2変異体及びそれらの最終ライブラリにおける存在頻度を提供する。表16において、「*」は、終止コドンの翻訳を表す。表16において、コンストラクトID（OT-XXXXXXXX）は、参照CA2変異体を含むコンストラクトを指し、ライブラリID（LibCXXXXXXXX）は、CA2変異体自体を指す。

10

20

30

40

50

【表 16-1】

表 16. CA2 飽和ライブラリ変異体

コンストラクト ID/ライブラリ ID	変異	頻度
OT-001976	Y51N	28
OT-001977	S56N	23
LibC000098;LibC000097	Y51T	19
OT-001978	D72F;V241F;P249L	13
LibC000084	D71F;N231F	9
LibC000079;LibC000078	S56F	9
LibC000094	T35K;D72F;K260D	7
OT-001979	D71L;T87N;L250R	5
OT-001980	L183S	5
LibC000076	A77I;P249F	4
LibC000099	D71K;P249H	4
LibC000081	D72F;P249F	4
LibC000065	Q53N;N61Y	4
LibC000066;LibC000069	Y193I	3
LibC000056	S73N, R89Y	2
LibC000057	D71K, T192F	2
LibC000061	E238*	2
LibC000083	G144D	2
LibC000092	Y193L, K260L	2
LibC000053	V206M	1
LibC000054	D71F, V241F, P249L	1
LibC000055	Y193F	1
LibC000058	L147F, Q248F	1
LibC000059	D52I, S258P	1
LibC000060	D72S, T192N	1
LibC000062	D179E, T192I	1
LibC000063	Y193L	1
LibC000064	S56N, Q103K	1
LibC000067	D71Y, Q248L	1
LibC000068	S73N, R89F	1
LibC000070	D71K, N231L, E235G, L239F	1
LibC000071	D71F	1
LibC000072	D72F, P249I	1
LibC000074	T192N	1

10

20

30

40

50

【表 16-2】

LibC000075	D72X, V241X, P249X	1
LibC000077	A54X, S56X, L57X, T192X	1
LibC000080	Y193V, K260F	1
LibC000085	G63D, M240L	1
LibC000086	V134F, L228F	1
LibC000087	D71G, N231K	1
LibC000088	S56F, D71S	1
LibC000089	D52L, G128R, Q248F	1
LibC000091	S73X, R89X	1
LibC000093	Y193X	1
LibC000096	Y51X, D72X, V241X, P249X	1
LibC000100	D72I, W97C	1
LibC000102	D71K, T192F, N231F	1

10

【0691】

特定のコンストラクトをNIH3T3細胞に形質導入し、24時間の増加用量のアセタゾラミド、セレコキシブまたはビヒクル対照に対する変異体の反応をFACSを使用して試験した。表17及び表18は、リガンドでの処置なしのMFI、最大倍数変化、及びEC50を示している。試験されたすべてのコンストラクトについてのMFIは、利用されたリガンドの用量の増加と共に増加した。通常、OT-001977及びOT-001979は、両方のリガンドでMFIの最も強力な増加を示した。アセタゾラミドで得られたMFI値は、セレコキシブ処置で得られたMFIよりもはるかに高かった。

20

【表 17】

表 17. アセタゾラミド用量反応

コンストラクト ID	基底 MFI	最大倍数変化	EC50
OT-001515	179	6.5	1.41
OT-001977	496	5.98	0.185
OT-001978	135.67	13.92	0.493
OT-001979	576.33	5.43	0.371
OT-001980	367.33	6.29	0.179

30

40

50

【表 18】

表 18. セレコキシブ用量反応

コンストラクト ID	基底 MFI	最大倍数変化	EC50
OT-001515	230.33	3.85	2.949
OT-001977	652	4.47	0.943
OT-001978	175.33	9.83	0.911
OT-001979	835	3.32	1.181
OT-001980	496	4.53	0.548

10

【0692】

代替的には、最終選別されたライブラリプールの蛍光活性化細胞選別によって単一の細胞クローンを生成した。10 μ Mのアセタゾラミドでの処置によってクローンを試験した。GFP発現がビヒクル処置に対して少なくとも5倍の増加を示すクローンを増殖させた。ゲノムDNAを単離し、DRDをPCRによって増幅させ、ギブソンアセンブリによってレンチウイルスベクターに挿入した。レンチウイルスを生成し、使用してJurkat細胞を感染させ、安定な細胞株を作製した。細胞株を、アセタゾラミドで24時間処置し、フローサイトメトリーによってGFP発現を測定することによって特性化した。

20

【0693】

実施例2. CA2のシステインからセリンへの変異体

配列番号11717の位置205におけるシステインの変異は、後にリガンドの添加によって安定化され得るタンパク質を脱安定化するのに役立つ可能性がある。これを試験するために、位置205におけるシステインをセリンに変異させ、表19に示される他の変異と組み合わせた。これにより生成されたCA2 DDをAcGFPに連結させ、レンチウイルスベクターにクローニングした。Jurkat細胞をレンチウイルスで形質導入し、10 μ Mで24時間処置し、GFP発現をFACSによって分析した。表19は、各条件についてのGFPの蛍光強度中央値を示している。

30

【表 19】

表 19. セリン変異体でのセレコキシブ用量反応

サンプル名	処置	MFI (AcGFP)	安定化比
親 Jurkat	DMSO	71	-
	セレコキシブ	85.7	1.21
OT-001570	DMSO	87.9	-
	セレコキシブ	101	1.15
OT-001681	DMSO	90.7	-
	セレコキシブ	103	1.14
OT-001682	DMSO	83.6	-
	セレコキシブ	101	1.21

40

【0694】

表19に示されているように、リガンドの添加は、組み合わせの変異において安定化比が最大で1.2の増加しか誘導せず、システイン残基が、DDの脱安定化に有意に寄与しなかったことを示唆している。

【0695】

50

実施例 3 . C A 2 制御キメラ抗原受容体

本明細書に記載の C A 2 D D を C A R に機能可能に連結させて調整可能な C A R コンストラクトを生成した。ヒトドナーからの活性化 T 細胞を、10 μ L の示されたコンストラクトのためのレンチウイルスで形質導入した。T 細胞増殖の 6 日目に、細胞を 10 μ M のアセタゾラミド、または示されているバルデコキシブ、または DMSO ビヒクル対照と共に一晩インキュベーションした。翌日、細胞を 10 μ g / mL の C D 19 - F c 、続いて抗ヒト - B V 4 2 1 がコンジュゲートされた二次抗体で染色することによって細胞表面 C A R 発現を検出した。ヒストグラムを生細胞ゲートからプロットした。同様の実験を 8 日目にも実施し、細胞を 9 日目に収穫した。データは、C A R 陽性細胞の割合として表 20 に示されている。安定化比も計算し、表 20 において S R として含まれている。

【表 20】

表 20 . % C A 2 C A R 陽性細胞

コンストラクト	T 細胞増殖の日	DMSO	10 μ M アセタゾラミド		10 μ M バルデコキシブ	
		% CAR	% CAR	SR	% CAR	SR
OT-001988	7	23.7	59.2	2.5	40.3	1.7
	9	3.5	36.7	10.5	6.4	1.8
OT-001989	7	45.1	65	1.4	59.3	1.3
	9	5.9	42	7.1	19.0	3.2

【0696】

表 20 に示されているように、基底 C A R 発現は、7 日目から 9 日目まで減少した。両方のコンストラクトは、アセタゾラミド及びバルデコキシブの両方でリガンド依存性安定化を示した。アセタゾラミドではバルデコキシブと比較して 7 日目及び 9 日目の両方でより高い C A R 制御が観察された一方で、制御は、バルデコキシブ処置では 7 日目でより明白であった。

【0697】

ヒトドナーからの活性化 T 細胞を、10 μ L の示されたコンストラクトのためのレンチウイルスで形質導入した。T 細胞増殖の 8 日目に、細胞を、示されているように 10 μ M から開始し、3 倍希釈してアセタゾラミド、またはバルデコキシブの調節物と共に一晩インキュベーションした。翌日、細胞を 10 μ g / mL の C D 19 - F c 、続いて抗ヒト - B V 4 2 1 がコンジュゲートされた二次抗体で染色することによって細胞表面 C A R 発現を検出した。リガンド誘導 C A R + 細胞の割合は、ビヒクル処置陰性対照細胞に対する生細胞ゲートからプロットされる。図 1 及び表 21 に示されているように、アセタゾラミドは、臨床的に達成可能な用量で O T - 001988 及び O T - 001989 の両方において C A R 発現を制御することができた。バルデコキシブでは C A R のリガンド依存性制御はほとんど～全く観察されなかった。

【表 2 1】

表 2 1. 臨床的に達成可能な用量での C A R 発現の制御

リガンド (μ M)	OT-001988		OT-001989	
	アセタゾラミ ド	バルデコキシ ブ	アセタゾラミ ド	バルデコキシ ブ
0	3.91	3.11	6.07	5.73
0.000169	4.22	3.50	8.07	6.80
0.000508	4.41	4.59	6.28	6.44
0.00152	3.71	3.76	7.72	6.54
0.0045	4.67	3.91	7.19	7.31
0.0137	4.91	3.97	8.05	6.75
0.041	4.59	3.74	9.31	7.18
0.123	6.05	4.50	13.30	8.53
0.37	7.58	3.74	20.30	7.81
1.11	12.8	3.87	31.20	7.65
3.33	25.4	4.72	38.30	11.00
10	36.7	6.35	42.00	19.00

【0 6 9 8】

ヒトドナーからの活性化 T 細胞を $10 \mu\text{L}$ のコンストラクト OT-001988 及び OT-001989 のためのレンチウイルスで形質導入した。T 細胞増殖の 10 日目に、細胞を Na lm6-Nuc Light Red 細胞と 10 : 1、3 : 1、1 : 1、0.3 : 1、0.1 : 1、0.03 : 1 のエフェクター : 標的 (E : T) 細胞比で混合し、 $10 \mu\text{M}$ のアセタゾラミド、またはビヒクル (DMSO) 対照のいずれかで 5 日間処置した。赤色蛍光画像を収集し、Na lm6 腫瘍細胞増殖の指標として IncuCyte Zoom を使用して 2 時間毎に定量した。表 2 2 に示されているように、実験の過程、すなわち、120 時間にわたって、ベクターで形質導入された T 細胞は、Na lm6 増殖を阻害しなかったが、OT-001407 (配列番号 210963 ; 配列番号 210964 によってコードされる) 構成的 C A R が形質導入された T 細胞は、10 : 1、3 : 1 または 1 : 1 の E : T 比で培養された場合に増殖を阻害する。OT-001988 及び OT-001989 で形質導入された T 細胞は、10 : 1 及び 3 : 1 の高い E : T 比ではリガンドの非存在下で Na lm6 細胞殺傷を示し、基底活性を示唆しているが、より低い E : T 比 1 : 1、0.3 : 1、0.1 : 1、0.03 : 1 ではアセタゾラミドの存在下で特異的かつ制御された殺傷を示している。

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 2 2. 低いエフェクター：標的比での特異的かつ制御された細胞殺傷

E:T 比	pELNS-001CD19	OT-001407	OT-001988		OT-001989	
			DMSO	アセタゾラミド	DMSO	アセタゾラミド
10:1	959649.6	5249.566	74146.59	7893.327	12465.3	7622.067
3:1	1127883	11229.93	1088639	19106.14	71778.56	23231.23
1:1	882079.4	42540.54	1003951	95252.77	774615.1	37405.95
0.3:1	926912.4	709645.5	1101745	751518.2	988053.8	441702.9
0.1:1	1049394	987900.1	977582.9	1005333	1024032	801499.2
0.03:1	1002171	919210	1042175	929015.9	978911.8	966327.7

10

【0 6 9 9】

7 2 時間で、上清を共培養物から収集し、M S D アッセイによって I F N ガンマ及び I L 2 レベルについて分析した。サイトカインレベルを、未形質導入 T 細胞と N a l m 6 - N u c L i g h t R e d 細胞との共培養について倍数変化として正規化した。表 2 3 及び表 2 4 に示される結果は、ベクターで形質導入された T 細胞が I F N g も I L 2 も分泌しなかったが、O T - 0 0 1 4 0 7 構成的 C A R が形質導入された T 細胞は、細胞用量依存的に分泌したことを実証している。C A 2 D D が形質導入された T 細胞は、リガンドの非存在下では高い E : T 比、例えば、1 0 : 1 及び 3 : 1 である程度のサイトカインを示すが、リガンドの存在下では 1 : 1、0 . 3 : 1、0 . 1 : 1、及び 0 . 0 3 : 1 の比で特異的かつ制御されたサイトカイン分泌を示す。

20

【表 2 3】

表 2 3. 低いエフェクター：標的細胞比での特異的かつ制御された I F N ガンマ分泌

E:T 比	pELNS-001CD19	OT-001407	OT-001988		OT-001989	
			DMSO	アセタゾラミド	DMSO	アセタゾラミド
10:1	1.2	9	3.4	8.5	2.7	10.4
3:1	1.1	64	1.5	76.8	24.1	100.3
1:1	1	158.4	0.6	163.8	6.7	216.8
0.3:1	0.9	282.1	1	186.4	1	281.6
0.1:1	0.8	126.9	0.9	37.6	1.4	63.3
0.03:1	1	19.6	1	45.1	1	12.2

30

40

【表 2 4】

表 2 4. 低いエフェクター：標的細胞比での特異的かつ制御された I L 2 分泌

E:T 比	pELNS- 001CD19	OT-001407	OT-001988		OT-001989	
			DMSO	アセタゾラ ミド	DMSO	アセタゾラ ミド
10:1	1.1	3.9	80.3	0.7	3.5	0.9
3:1	0.6	8.7	49.3	58.2	112.4	148
1:1	0.9	1016.7	8.3	1504.6	158.7	2105.2
0.3:1		1023	6.5	904.7	12.9	998.4
0.1:1		434.2	1.7	182.6	10.2	245.9
0.03: 1		126.4	1	297.3	1.8	125.2

10

【0700】

実施例 4. ヒトカルボニックアンヒドラーゼ 2 の脱安定化変異体スクリーニング

リガンドが CA 2 に結合すると安定化されるヒト CA 2 の脱安定化変異を特定するために、Genscript (China) によって提供されたレンチウイルス CA 2 変異体ライブラリを使用して、2 回の変異体スクリーニングを実施した。これらの方法は、変異誘発プライマー及びエラープローン PCR を使用して変異体ポリペプチドのライブラリを生成するために使用した。GFP に機能可能に連結されたテンプレート野生型ヒト CA 2 を発現するレンチウイルスベクター (OT-001986) も CA 2 変異体ライブラリと共に Genscript によって提供された。ライブラリをレンチウイルスにパッケージングし、およそ 0.3 の感染多重度 (MOI) で NIH3T3 細胞に形質導入し、特定の安定な細胞プールを選択マーカーのピューロマイシンを用いて選択することによって誘導した。

20

【0701】

CA 2 がその対応するリガンドに結合した場合に安定化する CA 2 の脱安定化変異体を含有する細胞プールを特定するために、細胞を FACS を使用して選別した。最初の回では、リガンドの非存在下で GFP 陰性となった集団のうち下位 15 % を選択した。細胞を増殖させ、次いで 10 μ M のセレコキシブで 24 時間処置し、細胞選別のために収穫した。未処置と比較してリガンド処置に対しても反応性であった上位 11 % の GFP 陽性細胞を収集した。セレコキシブを培養物から除去し、DMSO で置き換えた。細胞を FACS によって分析し、セレコキシブの存在下で GFP 発現を示した先行する選別からの集団と重複しなかった細胞集団のみを選択した。初期 CA 2 ライブラリとは対照的に、最終選別後のライブラリは、DMSO 対照処置と比べて、セレコキシブまたはバルデコキシブで処置した場合に GFP 発現が 4 ~ 6 倍の誘導を示した。ゲノム DNA を単離し、増幅された CA 2 変異体を、CA 2 が GFP に機能可能に連結されたレンチウイルスベクターに再導入した。コンストラクトを、各クローンについてのレンチウイルスベクターを用いて NIH3T3 細胞に形質導入した。細胞を 10 μ M のバルデコキシブまたは 10 μ M のセレコキシブで 24 時間処置し、FACS によって分析した。表 2 5 は、「PE 中央値」として示される蛍光強度中央値及び SR として示される安定化比を示している。表 2 5 において、コンストラクト ID (OT-XXXXXX) は、参照 CA 2 変異体を含むコンストラクトを指し、ライブラリ ID (LibCXXXXXX) は、CA 2 変異体自体を指す。

30

40

【表 25】

表 25. CA2 変異体のリガンド依存性反応

コンストラクト	処置	親	DMSO	10 μ M バルデ コキシ ブ	10 μ M セレ コキシブ
OT-001986	PE 中央値	93.7	33200	33000	35000
	SR		1	0.99	1.05
LibC000226	PE 中央値	93.7	441	3588	3816
	SR		1	7.93	8.65
OT-002006	PE 中央値	93.7	1763	9453	6983
	SR		1	5.36	3.96
OT-002001	PE 中央値	93.7	209	251	236
	SR		1	1.2	1.13
LibC000186	PE 中央値	93.7	816	6570	8156
	SR		1	8.05	10
LibC000193	PE 中央値	93.7	693	6445	7428
	SR		1	9.3	10.71
LibC000191	PE 中央値	93.7	160	177	173
	SR		1	1.11	1.08
LibC000208	PE 中央値	93.7	926	8006	8690
	SR		1	8.65	9.38
LibC000188	PE 中央値	93.7	206	228	225
	SR		1	1.11	1.09
LibC000211	PE 中央値	93.7	13000	19800	20800
	SR		1	1.52	1.6
LibC000212	PE 中央値	93.7	30100	30700	30700
	SR		1	1.02	1.02
LibC000198	PE 中央値	93.7	275	552	535
	SR		1	2	1.95
LibC000220	PE 中央値	93.7	311	408	384
	SR		1	1.31	1.2

【0702】

リガンド処置に反応して、LibC000198、LibC000208、LibC000193；LibC000186；OT-002006；LibC000226は、2を超える安定化比を示した。

【0703】

24時間のバルデコキシブまたはセレコキシブの様々な用量に対するNIH3T3細胞の反応をFACSによって測定し、分析した。表26及び表27は、「Med」として示される蛍光強度中央値、「P」としての親細胞及びSRとして示されるバルデコキシブまたはセレコキシブ処置での安定化比をそれぞれ示している。

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表 2 6 . バルデコキシブでの C A 2 変異体用量反応

Val (μ M)	OT- 001986		LibC000 226		OT- 002006		LibC0001 86		LibC0001 93		LibC0002 08		LibC00 0218	
	Med	SR	Me d	SR	Me d	SR	Med	SR	Me d	SR	Me d	SR	M ed	SR
P	82.7		83. 3		83. 3		82.7		82. 7		82. 7		82 .7	
0	216 00	1	53 1	1	166 3	1	934	1	826	1	906	1	14 5	1
0.0 3	-	-	58 0	1.0 9	196 2	1. 18	122 3	1.3 1	932	1.1 3	104 9	1.1 6	15 6	1. 08
0.1	-	-	62 3	1.1 7	197 8	1. 19	121 7	1.3	101 3	1.2 3	113 1	1.2 5	15 7	1. 08
0.3	-	-	65 5	1.2 3	203 8	1. 23	136 3	1.4 6	106 4	1.2 9	121 9	1.3 5	15 7	1. 08
1	-	-	87 3	1.6 4	218 5	1. 31	171 1	1.8 3	158 3	1.9 2	174 7	1.9 3	15 9	1. 1
3	224 00	1. 04	15 72	2.9 6	302 3	1. 82	335 7	3.5 9	366 7	4.4 4	360 3	3.9 8	16 1	1. 11
10	236 00	1. 09	39 02	7.3 5	630 1	3. 79	789 0	8.4 5	744 9	9.0 2	828 4	9.1 4	15 7	1. 08
30	237 00	1. 1	62 45	11. 76	973 6	5. 85	118 00	12. 63	946 0	11. 45	113 00	12. 48	15 0	1. 03

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表 2 7. セレコキシブでの C A 2 変異体用量反応

Ce 1 (μ M)	OT- 001986		LibC000 226		OT- 002006		LibC0001 86		LibC0001 93		LibC0002 08		LibC000 218	
	Med	SR	Me d	SR	Med	SR	Med	SR	Me d	SR	Med	SR	Me d	SR
P	82.7		83. 3		83.3		82.7		82. 7		82.7		82. 7	
0	216 00	1	531	1	166 3	1	934	1	826	1	906	1	145	1
0.0 3			711	1.3 4	200 6	1.2 1	117 7	1.2 6	935	1.1 3	101 7	1.1 2	155	1.0 7
0.1			661	1.2 4	215 9	1.3	129 0	1.3 8	100 5	1.2 2	119 4	1.3 2	160	1.1
0.3			750	1.4 1	245 8	1.4 9	147 0	1.5 7	121 1	1.4 7	145 7	1.6 1	162	1.1 2
1			120 7	2.2 7	364 9	2.1 9	206 5	2.2 1	205 8	2.4 9	222 1	2.4 5	160	1.1
3	217 00	1	254 4	4.7 9	634 1	3.8 1	417 1	4.4 7	428 3	5.1 9	540 4	5.9 6	165	1.1 4
10	239 00	1. 11	522 7	9.8 4	102 00	6.1 3	820 2	8.7 8	775 1	9.3 8	976 6	10. 78	182	1.2 6
30	237 00	1. 1	717 1	13. 5	131 00	7.8 8	102 00	10. 92	111 00	13. 44	132 00	14. 57	236	1.6 3

【0 7 0 4】

L i b C 0 0 0 2 2 6、O T - 0 0 2 0 0 6、L i b C 0 0 0 1 8 6、L i b C 0 0 0 1 9 3、及び L i b C 0 0 0 2 0 8 は、バルデコキシブまたはセレコキシブのいずれかで処置された場合、用量依存性安定化を示した。

【0 7 0 5】

L i b C 0 0 0 2 2 6、O T - 0 0 2 0 0 6、L i b C 0 0 0 1 8 6、L i b C 0 0 0 1 9 3 及び L i b C 0 0 0 2 0 8 のリガンド依存性安定化はまた、N I H 3 T 3 細胞を 1、3、10 または 30 μ M のセレコキシブまたはバルデコキシブで 24 時間処置することによって確認された。リガンドの存在下でのタンパク質発現を、G F P について細胞ライセートを免疫プロットすることによって測定した。試験されたすべてのコンストラクトは、リガンド用量の増加と共に G F P の安定化を示した。O T - 0 0 1 9 8 6 コンストラクトでは、リガンドの存在下または非存在下のいずれでも発現の変化は観察されなかった。

【0 7 0 6】

24 時間のアセタゾラミドの様々な用量に対する N I H 3 T 3 細胞の反応を F A C S によって測定し、分析した。表 2 8 は、「F I T C 中央値」として示される蛍光強度中央値及び S R として示されるアセタゾラミドでの安定化比を示している。

10

20

30

40

50

【表 28】

表 28. アセタゾラミドでのCA2変異体用量反応

コンストラクト	記	親	DMSO	アセタゾラミド (μ M)						
				0.03	0.1	0.3	1	3	10	30
OT-001986	FITC 中央値	74	17100	17400	17800	18400	19300	20200	20900	22400
	倍数変化	-	1	1.02	1.04	1.08	1.13	1.18	1.22	1.31
LibC000226	PE 中央値	74	380	499	704	1360	3594	6645	9295	10900
	倍数変化	-	1	1.31	1.85	3.58	9.46	17.49	24.46	28.68
OT-002006	PE 中央値	74	1529	2096	2836	1564	9825	14400	17300	18400
	倍数変化	-	1	1.37	1.85	1.02	6.43	9.42	11.31	12.03
LibC000186	PE 中央値	74	734	872	867	903	936	943	1189	1827
	倍数変化	-	1	1.19	1.18	1.23	1.28	1.28	1.62	2.49
LibC000193	PE 中央値	74	557	854	1628	3669	7445	10200	11900	12900
	倍数変化	-	1	1.53	2.92	6.59	13.34	18.31	21.36	23.16
LibC000208	PE 中央値	74	757	1190	2137	4715	9970	13900	16900	17800
	倍数変化	-	1	1.57	2.82	6.23	13.17	18.36	22.32	23.51

【0707】

LibC000208を含む試験されたすべてのCA2 DD/CA2コンストラクトは、アセタゾラミドに反応してGFP発現の用量反応安定化を示した。

【0708】

LibC000184、OT-002006、LibC000186、LibC000193及びLibC000208のリガンド依存性安定化はまた、NIH3T3細胞を0.3、1、3、10または30 μ Mのアセタゾラミドで24時間処置することによって確認された。リガンドの存在下でのタンパク質発現を、GFPについて細胞ライセートを免疫ブロットすることによって測定した。試験されたすべてのコンストラクトは、リガンド用量の増加と共にGFPの安定化を示した。OT-001986コンストラクトでは、リガンドの存在下または非存在下のいずれでも発現の変化は観察されなかった。

【0709】

異なるリガンドで処置されたクローンを比較して、リガンドでの各変異体の挙動を調べた。異なる日数で実施された異なる実験にわたる比較を可能とするために、セレコキシブ及びバルデコキシブデータを以下のように正規化した：(MFI (実験日x) / MFI (親日x)) * MFI (親日1) (親日1は、アセタゾラミドで処置されたクローンのDMSO値を表す)。結果が表29に示されている。

【表 29】

表 29. CA2 変異体の比較分析

クローン ID	DMSO	アセタゾ ラミド 10 μ M	アセタゾ ラミド 30 μ M	セレコキ シブ μ M	バルデコ キシブ μ M
LibC000184	380	9295	10900	4660.217	3478.892
LibC000193	557	11900	12900	6910.53	6641.277
LibC000186	734	1189	1827	7312.627	7034.458
LibC000208	757	16900	17800	8707.036	7385.735
OT-002006	1529	17300	18400	9093.976	5617.759
LibC000211	10344.09	-	-	16550.54	15754.84
OT-001986	17100	20900	22400	-	-

【0710】

実施例 5. キメラコンストラクトの *in vitro* 活性

IL15 キメラコンストラクト OT-002019 (Met; CD34 (WT の aa 1~32、M1G、S32A); IL15 (WT の 30~162); リンカー ((GS) 15); CD8a ヒンジ及び膜貫通ドメイン; リンカー (GS); 終止)、アミノ酸配列番号 210876、核酸配列番号 210877) 及び OT-002090 ((Ig カップ 軽鎖リーダー; IL15 (WT の 49~162); リンカー ((GS) 15); B7-1 ヒンジ、膜貫通ドメイン及びテール; リンカー (GS); 終止)、アミノ酸配列番号 210878、核酸配列番号 210879) 及び CA2 制御 IL15 キメラコンストラクト (OT-002094) の *in vitro* 活性をヒト初代 T 細胞において試験した。ヒト初代 T 細胞を、CD3/CD28 ビーズで活性化してから 24 時間後にレンチウイルスで形質導入した。細胞を 10 日間増殖させた。10 μ M のアセタゾラミド (Acz) での 24 時間の処置の後、制御された IL15 の発現を 6 日目にフローサイトメトリーによって分析した。各処置群について得られた IL15 陽性細胞の割合は以下のとおりである。a) OT-002019: 82.3% (b) OT-002090: 43.6% (c) DMSO を用いた OT-002094: 0.7% (d) 10 μ M の Acz を用いた OT-002094: 27.9% 及び (e) 未形質導入 (UT): 0.3%。

【0711】

IL15 依存性増殖を試験するために、ビーズを 10 日目に除去し、細胞を洗浄した。次いで IL15 発現 T 細胞または対照 T 細胞を単独でまたはアセタゾラミドもしくは外因性 IL15 (1 ng/ml) の存在下で新たな培地中で 10 日間培養した。T 細胞数 (表 30) 及び CD4/CD8 比の変化 (表 31) をフローサイトメトリーによって決定した。IL15 について陽性の細胞の割合が表 32 に示されている。

10

20

30

40

50

【表 3 0】

表 3 0 : T細胞数

培養 日数	UT	UT +IL15	OT- 00201 9	OT- 00201 9 +3uM ACZ	OT- 00201 9 +10uM ACZ	OT- 00209 0	OT- 00209 4	OT- 00209 4 +3uM ACZ	OT- 00209 4 +10uM ACZ
0	1.0E+ 06	1.0E+ 06	1.0E+ 06	1.0E+ 06	1.0E+ 06	1.0E+ 06	1.0E+ 06	1.0E+ 06	1.0E+ 06
3	8.1E+ 05	3.2E+ 06	2.0E+ 06	1.7E+ 06	1.7E+ 06	1.3E+ 06	6.3E+ 05	9.3E+ 05	8.7E+ 05
7	1.4E+ 05	5.4E+ 06	6.7E+ 06	5.7E+ 06	5.6E+ 06	4.1E+ 06	2.5E+ 05	1.8E+ 06	1.9E+ 06
10	3.0E+ 04	1.2E+ 07	2.1E+ 07	1.7E+ 07	1.6E+ 07	1.0E+ 07	2.3E+ 05	3.3E+ 06	3.6E+ 06

10

【表 3 1】

表 3 1 : C D 4 / C D 8 比

培養 日数	UT	UT +IL15	OT- 002090	OT- 002019	OT- 002019 +3uM ACZ	OT- 002019 +10uM ACZ	OT- 002094	OT- 002094 +3uM ACZ	OT- 002094 +10uM ACZ
0	5.64	5.64	3.79	2.51	2.51	2.51	3.83	3.83	3.83
3	1.58	2.57	0.66	0.45	0.46	0.47	1.00	0.83	0.84
7	0.49	0.64	0.09	0.06	0.06	0.07	0.48	0.15	0.15
10	0.98	0.28	0.04	0.02	0.02	0.03	0.35	0.07	0.08

20

【表 3 2】

表 3 2 : I L 1 5 陽性細胞の割合

培養日数	未形質導 入	未形質導 入+IL15	OT- 002090	OT- 002019	OT- 002019 +3uM ACZ	OT- 002019 +10uM ACZ
0	0	0	30	75	75	75
3	0	1	40	82	82	82
7	0	0	38	84	84	85
10	0	1	16	76	78	79

30

【0 7 1 2】

培養下での連続的なアセタゾラミドは、10日間で3.6倍の増殖をもたらし、アセタゾラミド処置は、C D 4 / C D 8 比を低下させた。

40

【0 7 1 3】

実施例 6 . T細胞における *i n v i t r o*でのC D 4 0 Lの制御

カルボニックアンヒドラーゼD Dによって制御されるC D 4 0 Lコンストラクトを生成し、レンチウイルスベクターにクローニングした。精製されたT細胞を解凍し、a C D 3 a C D 2 8 Dynabeadsと共に(3ビーズ対1T細胞の比で)培養した。

【0 7 1 4】

翌日、コンストラクトをT細胞に形質導入した。ウイルスの添加から48時間後、リガンド依存性制御を50μMのアセタゾラミド、またはビヒクル対照(DMSO)を使用して試験した。リガンドの添加から24時間後、T細胞をC D 4 0 L発現のために染色し、

50

FACSを使用して分析した。アセタゾラミドの存在下で、OT-001990は、ビヒクル対照及び挿入物のない空のベクターを発現するT細胞と比較してCD40L発現の増加を実証した。アセタゾラミドの増加用量に反応したCD40L発現をCD4+及びCD8+T細胞において測定した。細胞をアセタゾラミドで24時間処置し、CD40L発現をFACSを使用して測定した。結果が、表33では蛍光強度中央値として及び表34ではCD40L陽性細胞の割合として示されている。

【表33】

表33. CD40L MFI

アセタゾラミド (μ M)	CD4+	CD8+
0.01	112	105
0.05	123	104
0.2	185	136
0.8	481	307
3.1	840	380
12.5	2783	1599
50	3728	2184

10

20

【表34】

表34. CD40L陽性細胞の割合

アセタゾラミド (μ M)	CD4+	CD8+
0.01	4.13	0.59
0.05	5.44	0.44
0.2	10.3	1.48
0.8	45.6	25.2
3.1	69.3	41.2
12.5	90.3	77.2
50	91.1	80.7

30

【0715】

表33及び表34に示されているように、CD4+T細胞及びCD8+T細胞の両方においてリガンド依存性制御が観察された。しかしながら、絶対MFI値及びCD40L陽性細胞の割合は、CD4+細胞においてより高かった。アセタゾラミドの量は、ヒトにおいて達成され得るリガンドのレベル内でのCD40Lの安定化を達成するために必要であった。

40

【0716】

実施例7. 初代ヒトCAR-T細胞における膜結合型IL12-CA2の制御

膜結合型のIL12のCA2 DD制御発現と共にCD19-CAR発現を付与するバイシストロン性コンストラクト(OT-002008)でT細胞を形質導入した。T細胞を活性化し、示されたコンストラクトで形質導入し、上述したように増殖させた。形質導入された細胞を100 μ Mのアセタゾラミド(または対照としてのビヒクル)で20時間処置した。表面IL12発現を抗IL12p70抗体(BD, Franklin Lak

50

es, NJ) で検出した。アセタゾラミド処置は、ビヒクル対照と比較した場合、表面 IL 12 の発現の 6 倍の増加を誘導した。OT-002008 発現細胞による IL 12 の発現は、CAR のみのコンストラクト OT-001407 で形質導入された T 細胞で観察された IL 12 レベルよりも高かった。

【0717】

0 日目に、初代ヒト T 細胞を Dynabeads (T-エキспанダー CD3 / CD28) で 3 : 1 のビーズ : 細胞比で 10 % ウシ胎仔血清 (FBS) を含有する培地中で刺激した。翌日、CD19-CAR 及び膜結合型 flexi IL 12 を発現するコンストラクト OT-002007、OT-002008、OT-002010、及び OT-002012 を用いて生成されたレンチウイルスを低減血清 (5 % FBS) の存在下で添加した。2 日目に、細胞を新たな 10 % FBS 培地で 1 : 2 で希釈した。細胞を合計で 10 ~ 11 日間増殖させた後、液体窒素中で凍結させた。次に、T 細胞を解凍し、カウントした。96 ウェル V 底プレートのウェル当たり 1 ~ 2 e5 細胞を播種し、可溶性 CD3 / CD28 Immunocult 試薬 (Stem Cell Technologies) で再刺激し、0 ~ 100 μ M の範囲のアセタゾラミドの用量反応で処置した。24 時間のインキュベーションの後、ペイロード発現を CD19-Fc を使用してフローサイトメトリーによって分析して表面 CAR 発現を検出した。表面 IL 12 発現を抗 IL 12 p70 抗体 (BD) で検出した。CAR+細胞上の表面 IL 12 p70 発現の幾何 MFI (表 35) をプロットし、Prism Software を使用して用量反応曲線当てはめを実施した。用量反応曲線当てはめが図 2 に示されている。

【表 35】

表 35. 表面 IL 12 の MFI

リガンド 濃度 (μ M)	OT- 002007	OT-002008	OT- 002010	OT- 002012
100	7835	6432	9871	6616
33	5592	5222	7760	5061
11.1	4383	3869	5678	3822
3.7	4132	3281	5043	3070
1.2	3800	3315	4385	2894
0.41	3743	2778	4531	2778
0.14	3716	2919	4530	2734
0.046	3597	3018	4581	2934
0.015	3749	3099	4700	2814
0.001	3665	2971	4411	2858

【0718】

表 35 に示されているように、OT-002010 は、最低濃度のリガンドにおける低発現でのアセタゾラミドに対する動態用量反応及びリガンドの存在下で強力な誘導を示した。これらのデータは、CA2 DD が、膜結合型 IL 12 ペイロードを制御することができることを示している。

【0719】

実施例 8. T 細胞における in vitro での CD40L の時間経過制御

カルボニックアンヒドラーゼ DD によって制御される CD40L コンストラクトを生成し、レンチウイルスベクターにクローニングした。精製された T 細胞を解凍し、aCD3 aCD28 Dynabeads と共に (3 ビーズ対 1 T 細胞の比で) 培養した。

【0720】

コンストラクトを T 細胞に形質導入し、50 μ M のアセタゾラミドまたはビヒクル対照 (DMSO) で 48 時間投薬した。空のベクター (EV) の対照及び構成的 CD40L (

OT-001661)も評価した。細胞を2、4、6、8、24、及び48時間で固定し、次いでT細胞をCD40L発現のために染色し、FACSを使用して分析した。結果が、表36では蛍光強度中央値として及び表37ではCD40L陽性細胞の割合として示されている。

【表36】

表36. CD40L MFI

時間(時)	EV		構成的 CD40L (OT-001661)		CA2 制御 CD40L (OT-001990) DMSO		CA2 制御 CD40L (OT-001990) 50 μ M のアセタゾラミド	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
2	1030	482	4042	2212	406	305	620	351
4	1371	457	4651	2994	381	270	1731	540
6	1239	360	3156	1773	302	224	2410	742
24	1533	321	9491	3563	400	221	10982	2376
48	1282	283	5639	2313	396	210	10384	3050

10

【表37】

表37. CD40L陽性細胞の割合

時間(時)	EV		構成的 CD40L (OT-001661)		CA2 制御 CD40L (OT-001990) DMSO		CA2 制御 CD40L (OT-001990) 50 μ M のアセタゾラミド	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
2	52	28.6	72.8	56.9	12.1	4.9	34.7	10.8
4	67.6	17.8	77	63.2	11.6	5.9	72.2	28
6	65	9.6	67.2	48.5	6.6	1	81.2	42.7
24	77.5	10.7	93.3	71.2	10.5	1.1	96.3	73.7
48	69.3	6.8	88.5	71.1	11.2	2.2	97.4	79.2

20

【0721】

アセタゾラミドの存在下で、OT-001990は、ビヒクル対照及び挿入物のない空のベクターを発現するT細胞と比較してCD40L発現の増加を実証した。アセタゾラミドの増加用量に反応したCD40L発現をCD4+及びCD8+T細胞において測定した。表36及び表37に示されているように、CD4+T細胞及びCD8+T細胞の両方においてリガンド依存性制御が観察された。絶対MFI値及びCD40L陽性細胞の割合は、CD4+細胞においてより高かった。発現は、構成的レベルよりも高く発現する最高用量で24時間でそのピークに達した。

【0722】

実施例9. CA2によるT細胞におけるCD40Lの制御

40

制御を試験するために、活性化T細胞をCA2制御CD40L(OT-001990)及びCD40Lの対照(OT-001661)を用いてレンチウイルスで形質導入した。2日後、細胞をビヒクルまたは50mMのリガンドで表38に記載されたように24時間処置し、その後、それらをCD40L表面発現について分析した。CD4+及びCD8+細胞ならびに全細胞についての結果が以下に示されている。表において、「Acz」は、アセタゾラミドである。

50

【表 3 8】

表 3 8 : C D 4 0 L を発現する細胞の割合

コンストラクト (DD)	リガン ド	CD4+		CD8+		全細胞	
		CD40L 陽性	MFI	CD40L 陽性	MFI	CD40L 陽性	MFI
OT-001661 (CD40L 対照)	N/A	98.7%	24489	97.8%	14352	98%	20451
OT-001990 (CA2)	DMSO	4.9%	112	0.1%	97.9	4%	110
OT-001990 (CA2)	50uM Acz	91.1%	3728	80.7%	2184	88.8%	3304

10

【 0 7 2 3】

脱安定化ドメインでの発現の制御は、C D 4 0 L 発現を内因性レベルを超えて有意に向上させた。C A 2 脱安定化ドメインは、臨床に近い関連レベルのリガンド用量で構成的発現に近いレベルを示した。

【 0 7 2 4】

実施例 1 0 . リガンド用量の調節

アセタゾラミドに反応する C A 2 制御 C A R 発現を評価するために、T 細胞を解凍し、C D 3 / C D 2 8 D y n a b e a d s の存在下で 3 : 1 のビーズ : 細胞比で一晩活性化した。翌日、示されたコンストラクトまたは空のベクターで細胞を形質導入した。細胞を 1 0 日にわたって新鮮な培地の添加によって増殖させ、約 0.5×10^6 細胞 / mL の細胞を維持した。増殖の 8 日目に、細胞のアリコートに 9 6 ウェルプレートに播種し、アセタゾラミドの調節物で処置し、次いで $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ の C D 1 9 - F c での F A C S 染色によって 2 4 時間のインキュベーション後に C A R 発現について分析した。

20

【 0 7 2 5】

表 3 9 に示されているように、例えば、O T - 0 0 2 1 7 5 は、低い基底 C A R 発現の良好な特性と共に、制御された発現の低い ($< 1 \mu\text{M}$) リガンド濃度での 1 0 倍を超える増加を実証している。

30

40

50

【表 3 9】

表 3 9. アセタゾラミド (ACZ) に反応したCA2制御CAR発現

ACZ (μ M)	OT-001988	OT-001989	OT-002173	OT-002174	OT-002175	OT-002176	OT-002177	OT-002178	OT-002179	OT-002180
0	13.9	14.6	23.9	19.8	3.49	3.27	10.1	1.56	15.1	10
0.015	12.6	17.1	26.3	19.9	4.6	4.2	13	2.18	17.3	
0.046	16.8	20.4	27.6	23.2	6.5	5.26	16.2	2.88	19.4	
0.137	15.9	28.5	32.7	20.7	13	7.78	20.4	7.05	22.5	
0.412	22.6	39.4	40	20.4	24.8	13.2	23.3	10.7	25.8	
1.235	39.9	47.5	44.4	20.3	33.9	21.5	25.1	12.3	27.9	
3.704	51.2	50.4	47.9	21.9	38.1	27.2	25.7	13.9	28.8	
11.111	55.1	52.2	48.8	22.3	39.6	29	26.2	13.9	28.6	29
33.333	56.2	51.2	49.1	26.2	40	30.4	26.4	14.3	28.7	
100	58	52.7	48.3	33.3	41.6	31.5	25.9	14.2	28.6	

10

20

【0726】

表 4 0 に示される EC50 値は、Singlet | Live Cell ゲート対リガンドの用量において 4-パラメータ曲線を %CAR+細胞に当てはめることによって Spotfire で計算した。

【表 4 0】

表 4 0. アセタゾラミドに反応したCA2制御CAR発現-EC50 値

コンストラクト	変異体	EC50 (μ M)
OT-001988	I59N G102R	0.98
OT-001989	L156H	0.23
OT-002173	G63D E69V N231I	0.27
OT-002174	L197P	>10
OT-002175	L156H S172C F178Y E186D	0.33
OT-002176	R27L T87I H122Y N252D	0.72
OT-002177	S56N	0.08
OT-002178	D72F V241F P249L	0.18
OT-002179	D71L T87N L250R	0.14
OT-002180	L183S	ND

40

【0727】

実施例 11. in vivo 研究のための大バッチの細胞における CA2 制御 CAR 発現及び細胞傷害性の確認

50

in vivo 研究のための大バッチの細胞におけるCAR発現を確認するために、T細胞を解凍し、CD3／CD28 Dynabeadsの存在下で3：1のビーズ：細胞比で一晩活性化した。翌日、細胞をコンストラクトpELDS-001、OT-001407、またはOT-002175からのレンチウイルスで形質導入した。細胞を10日にわたって新鮮な培地の添加によって増殖させ、約 0.5×10^6 細胞/mLの細胞を維持し、次いで凍結させた。CAR発現を確認するために、細胞を解凍し、T細胞培地においてDMSOまたは10 μ Mのアセタゾラミドの存在下でCD3／CD28ビーズ（1：1のビーズ：細胞比）、またはサイトカイン（各々10 ng/mLのIL2、IL7、IL15、及びIL21）と共に一晩培養した。24時間のインキュベーション後のCAR発現について1 μ g/mLのCD19-FcでのFACS染色によって細胞を分析し、%CAR+細胞をSinglet | Live Cellゲートを使用して決定した。

【0728】

表41に示されているように、解凍した細胞を一晩培養した後、約40～50%の細胞がCAR陽性であった。

【表41】

表41. 大バッチでのCAR+解凍後細胞の割合

	pELNS-001: DMSO	OT-001407: DMSO	OT-002175: DMSO	OT-002175: ACZ 10 μ M
ビーズなし	1.01	42.8	3.17	17.8
CD3/28 ビーズ	1.61	52.2	31.6	42.8
サイトカイン なし	0.091	41.1	0.91	18.3
サイトカイン	0.12	37.2	4	39.6

【0729】

in vivo 研究のための大バッチの細胞における細胞傷害性を確認するために、T細胞を解凍し、CD3／CD28 Dynabeadsの存在下で3：1のビーズ：細胞比で一晩活性化した。翌日、細胞をコンストラクトpELDS-001、OT-001407、またはOT-002175からのレンチウイルスで形質導入した。細胞を10日にわたって新鮮な培地の添加によって増殖させ、約 0.5×10^6 細胞/mLの細胞を維持し、次いで凍結させた。細胞傷害性を確認するために、細胞を解凍し、NaIm6-NucLightRed細胞と10：1、3：1、1：1、0.3：1、0.1：1、0.03：1のエフェクター：標的（E：T）細胞比で混合し、10 μ Mのアセタゾラミド、またはビヒクル（DMSO）対照のいずれかで5日間処置した。赤色蛍光画像を収集し、NaIm6腫瘍細胞増殖の指標としてIncucyte Zoomを使用して2時間毎に定量した。

【0730】

表42に示される結果は、実験の過程、すなわち、120時間にわたって、ベクターで形質導入されたT細胞が、NaIm6増殖を阻害しなかったが、OT-001407（配列番号210963；配列番号210964によってコードされる）構成的CARが形質導入されたT細胞は、10：1、3：1または1：1のE：T比で培養された場合に増殖を阻害することを示している。OT-002175で形質導入されたT細胞は、リガンドの非存在下で10：1の高いE：T比でNaIm6細胞殺傷を示し、基底活性を示唆しているが、アセタゾラミドの存在下で殺傷が増加した。

10

20

30

40

50

【表 4 2】

表 4 2. 大バッチでの解凍後細胞の細胞傷害性

E:T 比	pELNS-001: DMSO	OT-001407: DMSO	OT-002175: DMSO	OT-002175: ACZ 10uM
10:1	692374	5715	255406	42811
3:1	1010606	13781	720078	580132
1:1	1104630	341838	834657	887002

【 0 7 3 1】

72時間、上清を共培養物から収集し、MSDアッセイによってIFN- γ 及びIL-2レベルについて分析した。表43に示される結果は、ベクターで形質導入されたT細胞がIFN- γ もIL-2も分泌しなかったが、OT-001407構成的CARが形質導入されたT細胞は、細胞用量依存的に分泌したことを実証している。OT-002175で形質導入されたT細胞は、リガンドの存在下で10:1、及び3:1の比で制御されたサイトカイン分泌を示した。

10

【表 4 3】

表 4 3. IFN- γ 及びIL-2レベルは、細胞傷害性の継続期間及びレベルと対応する

	pELNS-001: DMSO	OT-001407: DMSO	OT-002175: DMSO	OT-002175: ACZ 10uM
10:1 IFN- γ	0	56251	473	9338
3:1 IFN- γ	0	33337	30	1096
10:1 IL-2	0.3	243	46	530
3:1 IL-2	0.1	5501	10	295

20

【 0 7 3 2】

実施例12. CA2制御CD19 CARの*in vivo*有効性、薬力学、及び薬物動態
OT-002175からの有望な*in vitro*の結果を受けて、このコンストラクトの有効性、薬力学、及び薬物動態を8週齢の雌NSGマウスでNALM6-luc異種移植片モデルにおいて*in vivo*で試験した。実験設計が表44にまとめられている。

30

40

50

【表 4 4】

表 4 4. OT-002175 の in vivo 分析の実験設計

群	N	コンストラクト	in vivo 処置	投薬スケジュール	細胞用量
1A, 1B	8	pELDS-001-013	ビヒクル	QD	5M
2A, 2B	8	OT-001407	ビヒクル	QD	5M
3A, 3B	8	OT-001407	アセタゾラミド	QD 200mg/kg	5M
4A, 4B	8	OT-002175	ビヒクル	QD	5M
5A, 5B	8	OT-002175	アセタゾラミド	QD 200mg/kg	5M
6A, 6B	8	OT-002175	アセタゾラミド	QD 100mg/kg	5M
7A, 7B	8	OT-002175	アセタゾラミド	QD 30mg/kg	5M
1C	4	pELNS-001	ビヒクル	QD	5M
2C	4	OT-001407	ビヒクル	QD	5M
4C	4	OT-002175	ビヒクル	QD	5M
5C	4	OT-002175	アセタゾラミド	QD 200mg/kg	5M

【0733】

200mg/kg でのアセタゾラミドの単回及び繰り返し経口用量をビヒクル（水中の 10% DMSO；20% Kolliphor RH40；30% PEG400；40%（12%）Captisol）中で投与した。単回投薬後 24 時間まで、及び 100 時間までの毎日の繰り返し投薬の後、アセタゾラミドの血漿濃度を測定した（データは示されていない）。毎日の繰り返し投薬の後 12 日間まで、0～4 及び 8～11 日目に体重を測定した（データは示されていない）。複数用量のパラダイムは、アセタゾラミドの繰り返し投薬が、毎日の 1 時間 Cmax 値を上昇させないこと、及び体重が、投薬開始から変化して毎日の投薬の最初の週の最後までに安定したことを示しており、複数用量のアセタゾラミドを摂取した動物が、長期の繰り返し投薬を忍容することができることを示唆している。

【0734】

腫瘍移植から 32 日後までの間、リガンドを繰り返し摂取したマウスにおける総フラックスを測定することによって OT-002175 の用量反応性を試験した（データは示されていない）。30mg/kg、100mg/kg、及び 200mg/kg のアセタゾラミドの濃度は、それぞれ、体重に対する同等の影響を伴って、増加する抗腫瘍活性を示した。

【0735】

これらの結果は、体重に対するアセタゾラミド投薬の初期の影響が、投薬の 2 週目から克服され始め、リガンドの良好な長期忍容性及び高い CAR 発現の維持を示唆している。OT-002175 では用量依存性抗腫瘍有効性が達成された。

【0736】

CAR-T 細胞注入後の全血における CA2 制御 CAR 発現をモニターした。50ul の血液におけるヒト T 細胞の数は、注入後 7 日目にカウントしたところ、構成的に発現した CD19 CAR 発現対照において観察された細胞増殖よりも低い、依然としてアセタゾラミド処置によって制御されることが判明した（データは示されていない）。CD19 OT-002175 CAR-T 細胞を収穫し、CD69 及び CD25 発現について評価したところ、活性化 CD8+ 表現型に偏っていることが判明した（データは示されていない）。

【0737】

これらの結果は、CA2 制御 CAR が、有効性実験と一貫した抗腫瘍活性を示し、アセタゾラミド処置が、CAR 媒介 T 細胞増殖を可能とし、アセタゾラミドが臨床的に達成可能なレベルで投薬された血液中の CAR 発現を制御したと共に、CD19 CAR が CD

8 + 表現型に偏っていたことを実証している。

【0738】

抗原回避が構成的CAR対照と比較して低下したCD19 OT-002175 CAR-T細胞の制御された有効性を説明し得るかどうかを決定するために、骨髄及び転移におけるNaIm6のCD19抗原状態を評価するために最終収集を実施した。腫瘍及び骨髄サンプルにおいてCD19発現が観察され、抗原回避の証拠は観察されなかった（データは示されていない）。

【0739】

実施例13．個々の変異及びスクリーンで特定された変異と構造誘導変異の組み合わせの特性化

スクリーンで特定された変異体に由来する個々のまたはペアの点変異でCA2 DDを設計した。また、合理的に設計された新規の変異を有するCA2 DDも設計した。これにより生成されたCA2 DDをAcGFPに連結させ、レンチウイルスベクターにクローニングした。Jurkat細胞をレンチウイルスで形質導入し、アセタゾラミドで24時間処置し、GFP発現をFACSによって分析した。

【0740】

表45～51は、様々なCA2 DD変異体の特性化を示している。

【表45】

表45：CA2 DDの特性化

コンストラクト	DRD	基底	最大	[ACZ], μM	倍数変化	EC50, μM
OT-CA2-058	CA2(G63D,M240L)	171	1346	30	7.9	0.54
OT-CA2-059	CA2(A77I,P249F)	124	1208	30	9.8	1.1
OT-CA2-060	CA2(D71K,T192F)	234	1352	30	5.8	0.14

【表 4 6】

表 4 6 : C A 2 D D の特性化

コンストラクト	DRD	基底	最大	[ACZ], μ M	倍数変化	EC50, μ M
OT-CA2-085	CA2 (Y51T)	19078	54252	30	2.8	0.15
OT-CA2-086	CA2 (S73N, R89F)	16867	48989	30	2.9	0.07
OT-CA2-087	CA2 (D72F, P249F)	11516	60576	30	5.3	0.11
OT-CA2-088	CA2 (T55K, G63N, Q248N)	7266	82304	30	11.3	0.73
OT-CA2-089	CA2 (Y193I)	9777	58225	30	6	0.25
OT-CA2-090	CA2 (S56F)	8070	87425	30	10.8	0.77
OT-CA2-091	CA2 (S56F, D71S)	3395	67527	30	19.9	1.6
OT-CA2-092	CA2 (S73N, R89Y)	23056	75755	30	3.3	0.07
OT-CA2-093	CA2 (V134F, L228F)	26215	50435	30	1.9	0.02

10

20

30

40

50

【表 4 7】

表 4 7 : C A 2 D D の特性化

コンストラクト	DRD	基底	最大	[ACZ], μ M	倍数変化
OT-CA2-096	CA2 (L156H, 4AA del C 末端)	30.85	217.6	30	7.1
OT-CA2-097	CA2 (L156H, 4AA del N 末端)	40.5	131.6	30	3.2
OT-CA2-098	CA2 (W4Y, L156H)	39	533.1	30	13.7
OT-CA2-099	CA2 (L156H, GEP del ループ P2)	27.7	356.6	30	12.9
OT-CA2-101	CA2 (L156H, F225L)	67.1	960.6	30	14.3
OT-CA2-102	CA2 (D70N, D74N, D100N, L156H)	38.05	180.6	30	4.7

10

【表 4 8】

表 4 8 : C A 2 D D の特性化

コンストラクト	DRD	基底	最大	[ACZ], μ M	倍数変化
OT-CA2-073	CA2 (R27L,H122Y)	173.5	725	30	4.2
OT-CA2-075	CA2 (T87I,H122Y)	493.5	1277.5	30	2.6
OT-CA2-077	CA2 (H122Y,N252D)	318.5	1091.5	30	3.4
OT-CA2-078	CA2 (D72F,V241F)	395	1569.5	30	4
OT-CA2-079	CA2 (V241F,P249L)	1376	2262.5	30	1.6
OT-CA2-080	CA2 (D72F,P249L)	578	1563.5	30	2.7
OT-CA2-081	CA2 (D71L,T87N)	1567.5	2372.5	30	1.5
OT-CA2-082	CA2 (D71L,L250R)	454	1674	30	3.7

20

30

40

50

【表 4 9】

表 4 9 : C A 2 D D の特性化

コンストラクト	DRD	基底	最大	[ACZ], μ M	倍数変化
OT-CA2-006	CA2 (E106D)	98943	268996	50	2.8

【表 5 0】

表 5 0 : C A 2 D D の特性化

コンストラクト	DRD	基底	最大	[ACZ], μ M	倍数変化
OT-CA2-038	CA2 (I59N)	76.6	1156.6	30	15.1
OT-CA2-039	CA2 (G63D)	644.1	2086.6	30	3.2
OT-CA2-046	CA2 (H122Y)	237.8	220.8	30	0.9

【表 5 1】

表 5 1 : C A 2 D D の特性化

コンストラクト	DRD	基底	最大	[ACZ], μ M	倍数変化
OT-CA2-031	CA2(L197P)	660	1753	30	2.7
OT-CA2-032	CA2(L156H, S172C, F178Y, E186D)	483	12826	30	26.6
OT-CA2-033	CA2(L156H)	683	17726	30	26
OT-CA2-034	CA2(R27L, T87I, H122Y, N252D)	306	10826	30	35.4

【 0 7 4 1】

表 5 2 及び図 3 は、O T - 0 0 2 3 4 7 及び O T - 0 0 1 9 7 8 についての用量反応の結果を示している。

10

20

30

40

50

【表 5 2】

表 5 2 : C A 2 DDの用量反応

[ACZ], μ M	OT- 002347	OT- 001978
30	87667.5	28337.5
10	81749	25959.83
3.3	75551.67	24250.17
1.1	65318.33	20978.83
0.36	48149.33	15438.67
0.12	29860.33	9858.5
0.04	21283.67	6473.5
0.0133	18682.67	5499.333
0.004433	16782.17	5327.167
0	16539.67	5077.667
EC50, μ M	0.4796	0.4589

10

【0 7 4 2】

本開示は、いくつかの記載された実施形態に関して、ある程度の長さである程度の特定性をもって説明されているが、任意のそのような特定物もしくは実施形態または任意の特定の実施形態に限定されるべきことは意図されておらず、先行技術に鑑みてそのような特許請求の範囲の最も広い可能な解釈を提供し、そのため、本開示の意図された範囲を効果的に包含するように添付の特許請求の範囲を参照して解釈されるべきである。

20

【0 7 4 3】

本明細書で挙げられるすべての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先する。また、項の見出し、物質、方法、及び例は、例示にすぎず、限定することは意図されていない。特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (SRE) 及び前記 SRE に機能可能に連結された少なくとも 1 つのペイロードを含み、前記 SRE は、脱安定化ドメイン (DD) を含み、前記 DD は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ 2 (CA2 ; 配列番号 1 1 7 1 7) の一領域または全体を含み、配列番号 1 1 7 1 7 の位置 1 2 2 におけるアミノ酸 (H 1 2 2) の H 1 2 2 Y 変異をさらに含む、前記組成物。

30

(項目 2)

前記 DD は、

(i) 配列番号 1 1 7 1 7 の位置 2 7 におけるアミノ酸 (R 2 7) の R 2 7 L 変異、

(i i) 配列番号 1 1 7 1 7 の位置 8 7 におけるアミノ酸 (T 8 7) の T 8 7 I 変異、

(i i i) 配列番号 1 1 7 1 7 の位置 2 5 2 におけるアミノ酸 (N 2 5 2) の N 2 5 2 D 変異、または

40

(i v) (i)、(i i) 及び／または (i i i) の組み合わせ

をさらに含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 3)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (SRE) 及び前記 SRE に機能可能に連結された少なくとも 1 つのペイロードを含み、前記 SRE は、脱安定化ドメイン (DD) を含み、前記 DD は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ 2 (CA2 ; 配列番号 1 1 7 1 7) の一領域または全体を含み、配列番号 1 1 7 1 7 の位置 1 0 6 におけるアミノ酸 (E 1 0 6) の E 1 0 6 D 変異をさらに含む

50

、前記組成物。

(項目4)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (SRE) 及び前記 SRE に機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含み、前記 SRE は、脱安定化ドメイン (DD) を含み、前記 DD は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2 (CA2; 配列番号11717) の一領域または全体を含み、配列番号11717の位置208におけるアミノ酸 (W208) の W208S 変異をさらに含む、前記組成物。

(項目5)

前記 DD は、配列番号11717の位置205におけるアミノ酸 (C205) の C205S 変異をさらに含む、項目3または4に記載の組成物。

10

(項目6)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (SRE) 及び前記 SRE に機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含み、前記 SRE は、脱安定化ドメイン (DD) を含み、前記 DD は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2 (CA2; 配列番号11717) の一領域または全体を含み、配列番号11717の位置59におけるアミノ酸 (I59) の I59N 変異をさらに含む、前記組成物。

(項目7)

前記 DD は、配列番号11717の位置102におけるアミノ酸 (G102) の G102R 変異をさらに含む、項目6に記載の組成物。

20

(項目8)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (SRE) 及び前記 SRE に機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含み、前記 SRE は、脱安定化ドメイン (DD) を含み、前記 DD は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2 (CA2; 配列番号11717) の一領域または全体を含み、配列番号11717の位置156におけるアミノ酸 (L156) の L156H 変異をさらに含む、前記組成物。

(項目9)

前記 DD は、
(i) 配列番号11717の位置4におけるアミノ酸 (W4) の W4Y 変異、
(ii) 配列番号11717の位置225におけるアミノ酸 (F225) の F225L 変異、
(iii) 配列番号11717の位置257~260におけるアミノ酸の欠失、
(iv) 配列番号11717の位置1~5におけるアミノ酸の欠失、または
(v) 配列番号11717のアミノ酸 G234、E235 及び P236 の欠失を含む、項目8に記載の組成物。

30

(項目10)

前記 DD は、配列番号11717に対する4つの変異を含み、前記変異は、
(i) L156H、S172C、F178Y、及び E186D、または
(ii) D70N、D74N、D100N、及び L156H
に対応する、項目8に記載の組成物。

40

(項目11)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (SRE) 及び前記 SRE に機能可能に連結された少なくとも1つのペイロードを含み、前記 SRE は、脱安定化ドメイン (DD) を含み、前記 DD は、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ2 (CA2; 配列番号11717) の一領域または全体を含み、配列番号11717に対する第1の変異及び第2の変異をさらに含む、
(i) 前記第1の変異は、配列番号11717の位置73におけるアミノ酸 (S73) の S73N 変異であり、

50

(i i) 前記第 2 の変異は、配列番号 1 1 7 1 7 のアミノ酸位置 8 9 (R 8 9) における F または Y の置換である、
前記組成物。

(項目 1 2)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (S R E) 及び前記 S R E に機能可能に連結された少なくとも 1 つのペイロードを含み、前記 S R E は、脱安定化ドメイン (D D) を含み、前記 D D は、ヒトカルボニクアンヒドラーゼ 2 (C A 2 ; 配列番号 1 1 7 1 7) の一領域または全体を含み、配列番号 1 1 7 1 7 のアミノ酸位置 5 6 (S 5 6) における N または F の置換をさらに含む、前記組成物。

10

(項目 1 3)

前記 D D は、S 5 6 F 及び D 7 1 S に対応する、配列番号 1 1 7 1 7 に対する 2 つの置換を含む、項目 1 2 に記載の組成物。

(項目 1 4)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (S R E) 及び前記 S R E に機能可能に連結された少なくとも 1 つのペイロードを含み、前記 S R E は、脱安定化ドメイン (D D) を含み、前記 D D は、ヒトカルボニクアンヒドラーゼ 2 (C A 2 ; 配列番号 1 1 7 1 7) の一領域または全体を含み、配列番号 1 1 7 1 7 に対する 1 つまたはより多くの置換をさらに含み、少なくとも 1 つの置換は、配列番号 1 1 7 1 7 のアミノ酸位置 6 3 (G 6 3) における D または N の置換であり、前記 1 つまたはより多くの置換は、

20

G 6 3 D、

G 6 3 D 及び M 2 4 0 L、

G 6 3 D、E 6 9 V 及び N 2 3 1 I、または

T 5 5 K、G 6 3 N 及び Q 2 4 8 N

に対応する、前記組成物。

(項目 1 5)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (S R E) 及び前記 S R E に機能可能に連結された少なくとも 1 つのペイロードを含み、前記 S R E は、脱安定化ドメイン (D D) を含み、前記 D D は、ヒトカルボニクアンヒドラーゼ 2 (C A 2 ; 配列番号 1 1 7 1 7) の一領域または全体を含み、配列番号 1 1 7 1 7 に対する 2 つまたはより多くの置換をさらに含み、前記 2 つまたはより多くの置換のうち 1 つは、配列番号 1 1 7 1 7 のアミノ酸位置 7 1 (D 7 1) における L または K の置換であり、前記 2 つまたはより多くの置換は、

30

D 7 1 L 及び T 8 7 N、

D 7 1 L 及び L 2 5 0 R、

D 7 1 L、T 8 7 N 及び L 2 5 0 R、または

D 7 1 K 及び T 1 9 2 F

に対応する、前記組成物。

(項目 1 6)

40

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激反応要素 (S R E) 及び前記 S R E に機能可能に連結された少なくとも 1 つのペイロードを含み、前記 S R E は、脱安定化ドメイン (D D) を含み、前記 D D は、ヒトカルボニクアンヒドラーゼ 2 (C A 2 ; 配列番号 1 1 7 1 7) の一領域または全体を含み、配列番号 1 1 7 1 7 に対する 2 つまたはより多くの置換をさらに含み、前記 2 つまたはより多くの置換のうち少なくとも 1 つは、

(i) 配列番号 1 1 7 1 7 のアミノ酸位置 2 4 1 (V 2 4 1) における F の置換、または

(i i) 配列番号 1 1 7 1 7 のアミノ酸位置 2 4 9 (P 2 4 9) における F もしくは L の置換であり、

前記 2 つまたはより多くの置換は、

50

D 7 2 F 及び V 2 4 1 F、
D 7 2 F 及び P 2 4 9 L、
D 7 2 F 及び P 2 4 9 F、
D 7 2 F、V 2 4 1 F 及び P 2 4 9 L、
A 7 7 I 及び P 2 4 9 F、または
V 2 4 1 F 及び P 2 4 9 L
に対応する、前記組成物。

(項目 17)

エフェクターモジュールを含む組成物であって、前記エフェクターモジュールは、刺激
反応要素 (SRE) 及び前記 SRE に機能可能に連結された少なくとも 1 つのペイロード
を含み、前記 SRE は、脱安定化ドメイン (DD) を含み、前記 DD は、ヒトカルボニッ
クアンヒドラーゼ 2 (CA2; 配列番号 11717) の一領域または全体を含み、Y51
T、L183S、Y193I、L197P ならびに V134F 及び L228F の組み合わ
せから選択される、配列番号 11717 に対する 1 つまたはより多くの置換をさらに含む
、前記組成物。

(項目 18)

前記 DD は、CA2 の一領域に由来し、前記領域は、CA2 のアミノ酸 2～260 (配
列番号 210492) を含む、項目 1～17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 19)

前記 SRE は、1 つまたはより多くの刺激物に対して反応性である、項目 1～18 のい
ずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 20)

前記刺激物は、小分子であり、前記小分子は、アセタゾラミド、セレコキシブ、バルデ
コキシブ、ロフェコキシブ、メタゾラミド、ドルゾラミド、プリンゾラミド、ジクロフェ
ナミド、エトキシゾラミド、ゾニサミド、ダンシルアミド、またはジクロルフェナミドか
ら選択される、項目 19 に記載の組成物。

(項目 21)

前記 DD における少なくとも 1 つの変異または置換は、刺激物の非存在下で前記 DD 及
び前記少なくとも 1 つのペイロードを脱安定化し、前記 DD 及び前記ペイロードは、前記
刺激物の存在下で安定化される、項目 1～20 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 22)

前記少なくとも 1 つのペイロードは、治療剤、天然タンパク質、融合ポリペプチド、抗
体、またはそのバリエーションもしくは断片である、項目 1～21 のいずれか 1 項に記載の組
成物。

(項目 23)

前記組成物は、1 つまたはより多くのポリペプチドである、項目 1～22 のいずれか 1
項に記載の組成物。

(項目 24)

前記治療剤は、CD19 CAR である、項目 22 に記載の組成物。

(項目 25)

項目 1～24 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む、生体回路システム。

(項目 26)

項目 1～24 のいずれか 1 項に記載の組成物、及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む薬
学的組成物。

(項目 27)

項目 1～24 のいずれか 1 項に記載の組成物をコードするポリヌクレオチド。

(項目 28)

項目 27 に記載のポリヌクレオチド、及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む薬学的組成
物。

(項目 29)

10

20

30

40

50

項目 2 7 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(項目 3 0)

項目 2 7 に記載のポリヌクレオチドを含む細胞。

(項目 3 1)

前記細胞は、養子細胞移植 (A C T) のための免疫細胞である、項目 3 0 に記載の細胞。

(項目 3 2)

項目 3 0 または 3 1 に記載の細胞、及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む薬学的組成物。

(項目 3 3)

改変細胞を生成する方法であって、前記方法は、項目 2 7 に記載のポリヌクレオチドを含む核酸分子を細胞に導入することを含む、前記方法。

(項目 3 4)

項目 3 0 に記載の細胞においてペイロードの発現、機能、及び／またはレベルを調節する方法であって、前記方法は、前記細胞に刺激物を投与することを含み、前記 S R E は、前記刺激物に対して反応性であり、前記ペイロードの前記発現、機能、及び／またはレベルは、前記刺激物に反応して調節される、前記方法。

(項目 3 5)

疾患の処置を、それを必要とする対象において行う方法であって、前記方法は、

(a) 治療的有効量の項目 3 0 に記載の細胞を前記対象に投与することであって、前記細胞は、前記疾患を処置するペイロードを含む、前記投与すること、及び

(b) 前記対象に、治療的有効量の刺激物を投与すること

を含み、

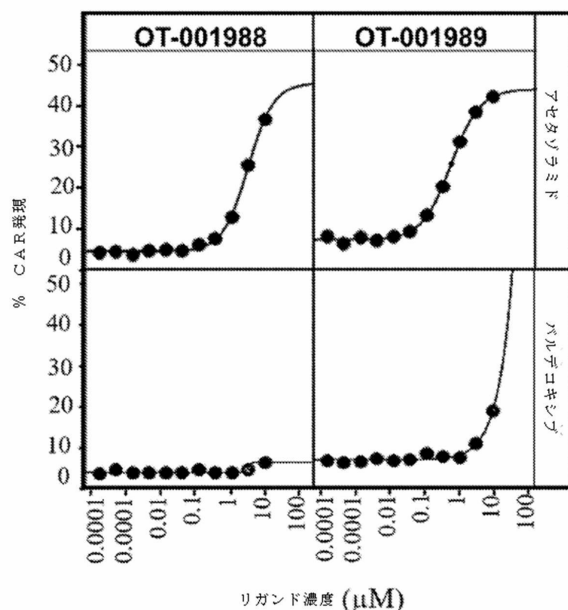
前記 S R E は、前記刺激物に対して反応性であり、前記ペイロードの発現は、前記刺激物に反応して調節され、それにより前記疾患を処置する、前記方法。

(項目 3 6)

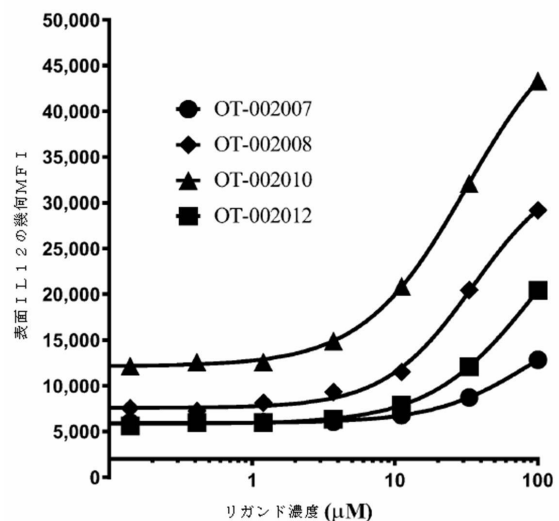
前記刺激物は、アセタゾラミド、セレコキシブ、バルデコキシブ、ロフェコキシブ、メタゾラミド、ドルゾラミド、プリンゾラミド、ジクロフェナミド、エトキシゾラミド、ゾニサミド、ダンシルアミド、またはジクロルフエナミドから選択される、項目 3 4 または 3 5 のいずれかに記載の方法。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

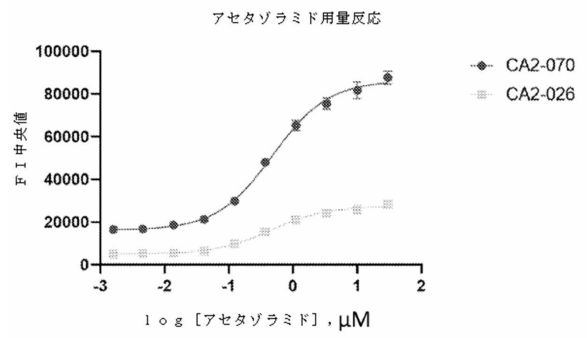
20

30

40

50

【図 3】



10

【配列表】

0007620560000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I
C 1 2 N 15/19 (2006.01) C 1 2 N 15/19

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/815,402

(32)優先日 平成31年3月8日(2019.3.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/826,443

(32)優先日 平成31年3月29日(2019.3.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/835,552

(32)優先日 平成31年4月18日(2019.4.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/860,388

(32)優先日 令和1年6月12日(2019.6.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/835,548

(32)優先日 平成31年4月18日(2019.4.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 スリ, ヴィピン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02478, ベルモント, クーリッジ ロード 3

(72)発明者 リチャードソン, セレステ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02467, ブルックライン, ウォルコット ロード 199

(72)発明者 ドリンスキ, ブライアン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
1030, スイート 400, オブシディアン セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 クルカルニ, アビシェク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02445, ブルックライン, タッパン ストリート 360
ナンバー3

(72)発明者 イニス, マラ クリスティーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01915, ビバリー, ハイランド アベニュー 11, ユ
ニット 2

(72)発明者 スン, デシュエ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
1030, スイート 400, オブシディアン セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ワイスマン, エリザベス ジェーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
1030, スイート 400, オブシディアン セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 オリンガー, グレース ワイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02141, ケンブリッジ, ウォーター ストリート 22,
ナンバー431

-
- (72)発明者 ヘラー, スコット フランシス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02072, ストートン, プレイン ストリート 559
- (72)発明者 ゴリ, ジェニファー リア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02130, ジャマイカ プレイン, スパルディング ストリート 20, ユニット 1
- (72)発明者 オルス, ミッシェル リン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01532, ノースバラ, オーク アベニュー 65
- (72)発明者 エルペク, クトゥル ゴクス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 1030, スイート 400, オブシディアン セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 エゼル, タッカー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 1030, スイート 400, オブシディアン セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 シェベスタ, マイケル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 1030, スイート 400, オブシディアン セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 フルーリー, ミッシェル ロイス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, ダナ ストリート 63, アパートメント 7
- (72)発明者 セティ, ドゥルヴ カム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02090, ウェストウッド, バージェス アベニュー 81
- 審査官 北村 悠美子
- (56)参考文献 国際公開第2018/161017 (WO, A1)
国際公開第2018/161038 (WO, A1)
国際公開第2018/160993 (WO, A1)
Biochemistry, 2009年, Vol.48, pp.5358-5364
Journal of molecular Biology, 2004年, Vol.342, pp.619-633
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C07K 1/00-19/00
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq